

**Funktionelle Charakterisierung der Region von *hrpE* bis *hrpF* in  
*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria***

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

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

von Frau Daniela Büttner

geb. am: 4.8.1974      in: Leverkusen

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. U. Bonas  
Institut für Genetik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. D. Scheel  
Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale)
3. Prof. Dr. R. Eichenlaub  
Universität Bielefeld

Halle (Saale), den 18.10.2002

**urn:nbn:de:gbv:3-000004138**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004138>]

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Bonas für die Möglichkeit, an dieser interessanten Themenstellung zu arbeiten. Insbesondere bedanke ich mich für ihre Unterstützung bei allen praktischen und theoretischen Problemen und ihr reges Interesse am Voranschreiten der Experimente.

Bei Herrn Dr. Nennstiel möchte ich mich für die exzellente Betreuung in der Anfangsphase der Arbeit und seine ständige Hilfsbereitschaft ganz herzlich bedanken.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die freundliche Atmosphäre und ihre Hilfe, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ganz besonders bedanke ich mich bei Angelika Landgraf für die ausgezeichnete technische Assistenz.

Mein herzlicher Dank gilt meinem Banknachbarn Laurent Noël für seine Hilfsbereitschaft und Freundschaft. Ebenfalls herzlich möchte ich mich bei Thomas Lahaye und Ralf Koebnik für ihre Unterstützung und ihre Bereitschaft, bei Problemen zu helfen, bedanken.

Meiner Familie verdanke ich vieles. Ihr gilt mein aufrichtiger Dank.

Diese Arbeit wurde zum Teil durch den Fonds der Chemischen Industrie finanziert.

## Zusammenfassung

Das Gram-negative Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit bei Paprika und Tomate und einer der Modellorganismen zum Studium bakterieller Pflanzenpathogene. Essentiell für die Interaktion mit der Wirtspflanze ist ein Typ-III-Sekretionssystem (TTSS), das die Proteinsekretion in das extrazelluläre Medium sowie die Translokation von Effektorproteinen in die pflanzliche Wirtszelle ermöglicht. Das TTSS wird von *hrp*-Genen kodiert, die in einem chromosomalen Cluster in sechs Transkriptionseinheiten, *hrpA* bis *hrpF*, organisiert sind. In dieser Arbeit wurde die Funktion von *hrpF* sowie benachbarter Gene in der *hrpE-hrpF*-Region näher charakterisiert. Durch genetische und biochemische Analysen konnten funktionell wichtige Proteinregionen in HrpF identifiziert werden. Die Ergebnisse von Membraninsertionsstudien unterstützen die Hypothese, daß HrpF als Komponente des postulierten Typ-III-Translokons in die pflanzliche Zellmembran inseriert. Der Nachweis einer HrpF-abhängigen Porenbildung in künstlichen Membranen deutet dabei auf die Existenz eines Translokationskanals hin. Neben *hrpF* wurden die Funktionen von *hpaB* und *hpaE* (*hpa*, „*hrp* associated“), zwei Genen des *hrpE*-Operons, sowie von *hpaD* analysiert. *hpaD* wurde als ein neues Gen des *hrp*-Genclusters von *X. campestris* pv. *vesicatoria* identifiziert. Die experimentellen Daten zeigen, daß einige Hpa-Proteine an der Typ-III-abhängigen Sekretion von Effektorproteinen beteiligt sind.

## Summary

The Gram-negative bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is the causal agent of bacterial spot in pepper and tomato and one of the model organisms to study bacterial plant pathogens. Essential for the interaction with the host plant is a type III secretion system (TTSS) which mediates protein secretion into the extracellular medium as well as translocation of effector proteins into the eukaryotic host cell. The TTSS is encoded by *hrp* genes which are organized in a chromosomal cluster comprising six operons, *hrpA* to *hrpF*. In this study, the function of *hrpF* as well as of several genes located in the *hrpE-hrpF* region was characterized. Based on genetic and biochemical analyses, important functional regions of HrpF were identified. The hypothesis that HrpF is inserted into the plant plasma membrane as a component of the predicted type III translocon is supported by the results of membrane insertion studies. The finding of a

HrpF-dependent pore-forming activity indicates the presence of a translocation channel in the host cell membrane. Besides *hrpF*, the functions of *hpaB* and *hpaE* (*hpa*, *hrp* associated), which are located in the *hrpE* operon, as well as of *hpaD* were analyzed. *hpaD* was identified as a novel gene in the *hrp* gene cluster of *X. campestris* pv. *vesicatoria*. The experimental data indicate that some Hpa proteins are involved in type III secretion of effector proteins.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b> .....	i
<b>Zusammenfassung</b> .....	ii
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	iv
<b>Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</b> .....	vi
<b>Liste der Abkürzungen</b> .....	vii
<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Molekulare Konversation - die Interaktion Gram-negativer pflanzenpathogener Bakterien mit ihren Wirtspflanzen.....	1
1.2 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> - ein Modellsystem.....	2
1.3 Typ-III-Sekretionssysteme (TTSS) .....	3
1.3.1 Das <i>hrp</i> -Gencluster - genetisches Requisit für die bakterielle Pathogenität.....	5
1.3.2 Die Regulation der <i>hrp</i> -Gene .....	7
1.3.3 Der Typ-III-Sekretionsapparat ist mit dem Hrp-Pilus assoziiert .....	9
1.3.4 Die Erkennung Typ-III-abhängig sekretierter Proteine durch das TTSS.....	10
1.3.5 Die Rolle von Typ-III-Sekretionschaperonen .....	12
1.3.6 Die Substrate des TTSS.....	13
1.3.6.1 Harpin-Proteine.....	13
1.3.6.2 Effektorproteine.....	13
1.3.6.2.1 Effektorproteine werden in die Wirtszelle transloziert .....	14
1.3.7 Das Typ-III-Translokon – ein bakterieller Proteinkanal in der Wirtszellmembran?.....	16
1.4 Die Komponenten und Substrate des TTSS von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> ....	17
1.5 Die Thematik der Arbeit.....	19
1.5.1 Vorarbeiten zu HrpF .....	20
<b>2. Ergebnisse</b> .....	22
2.1 Funktionelle Charakterisierung von HrpF, einem potentiellen Typ-III-Translokonprotein von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .....	22
2.1.1 Artikel: Büttner, D., Nennstiel, D., Klüsener, B. und Bonas, U. (2002) Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> . <i>J. Bacteriol.</i> , <b>184</b> (9), 2389-2398.....	22

2.1.2 Ergänzende Ergebnisse.....	32
2.1.2.1 Konstruktion und Analyse von HrpF <sub>(1-200)</sub> -AvrBs3Δ2.....	32
2.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	34
2.2 Charakterisierung von <i>hpa</i> -Genen in der <i>hrpE-hrpF</i> -Region von <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .....	35
2.2.1 Manuskript: Büttner, D., Noël, L. und Bonas, U. Functional characterization of <i>hpa</i> genes in the <i>hrpE-hrpF</i> region from <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .....	35
2.2.2 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	62
<b>3. Diskussion</b> .....	<b>63</b>
3.1 Die Typ-III-abhängige Proteintranslokation in tier- und pflanzenpathogenen Bakterien .....	63
3.2 Die Typ-III-abhängige Proteinsekretion – ein komplexer Prozeß.....	69
3.2.1 Besitzt <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> Typ-III-Sekretionschaperone?.....	69
3.2.2 Die Kontrolle der Typ-III-abhängigen Proteinsekretion .....	70
3.2.3 Ein Modell zur hierarchischen Sekretion unterschiedlicher Substrate des TTSS .....	72
<b>4. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>76</b>

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### Abbildungen:

Abbildung 1: Bakterielle Fleckenkrankheit bei Paprika und Tomate. ....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung von Proteinsekretionssystemen in Gram-negativen Bakterien.....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung der <i>hrp</i> -Gencluster von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> und <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000.....	6
Abbildung 4: Modell der <i>hrp</i> -Genregulation in <i>P. syringae</i> und <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .....	8
Abbildung 5: Modell des Typ-III-Sekretionssystems Gram-negativer phytopathogener Bakterien.. ....	10
Abbildung 6: Modell der molekularen Wirkungsweise von AvrBs3 in suszeptiblen und resistenten Pflanzen.....	15
Abbildung 7: Typ-III-abhängige Sekretion von HrpF-AvrBs3 $\Delta$ 2-Fusionsproteinen in <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .....	33
Abbildung 8: Strukturmerkmale von Typ-III-Translokonproteinen.....	64
Abbildung 9: Zusammenfassung der im <i>hrp</i> -Gencluster von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> kodierten Funktionen.....	71
Abbildung 10: Modell der Typ-III-abhängigen Proteinsekretion in <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> . ....	74

### Tabellen:

Tabelle 1: Interaktionen von <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> -Stämmen mit fast isogenen Paprikakultivaren.....	3
Tabelle 2: Typ-III-abhängig sekretierte Proteine in <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> . ....	18
Tabelle 3: HrpF und homologe Proteine in Gram-negativen Bakterien. ....	20
Tabelle 4: Pflanzliche Reaktionen auf HrpF-AvrBs3-Konstrukte. ....	34
Tabelle 5: Typ-III-Translokonproteine in Gram-negativen bakteriellen Pathogenen....	67

## Liste der Abkürzungen

AAD : „acidic activation domain“  
As : Aminosäuren  
*avr*, Avr : Avirulenz  
bp : Basenpaare  
Bs : „bacterial spot“  
BSA : „bovine serum albumin“  
CFU : „colony forming units“  
CW : Zellwand  
DNA : Desoxyribonukleinsäure  
ECF : „extracytoplasmic function“  
ECW : „Early Cal Wonder“  
EPEC : enteropathogene *Escherichia coli*  
Esp : „*E. coli* secreted protein“  
GUS :  $\beta$ -Glucuronidase  
*hpa*, Hpa : „*hrp* associated“  
HR : hypersensitive Reaktion  
*hrc*, Hrc : „*hrp* conserved“  
*hrp*, Hrp : „hypersensitive response and pathogenicity“  
IM : innere Membran  
Ipa : „invasion plasmid antigen“  
IS : „insertion sequence“  
kb : Kilobasen  
kDa : Kilodalton  
NLS : „nuclear localization signal“  
OD : optische Dichte  
OM : äußere Membran  
ORF : „open reading frame“  
PAGE : Polyacrylamidgelelektrophorese  
PCR : „polymerase chain reaction“  
PIP : „plant inducible promoter“  
PM : Plasmamembran  
pv. : Pathovar  
R : Resistenz  
RNA : Ribonukleinsäure  
SDS : Natriumdodecylsulfat  
Sip : „*Salmonella* invasion protein“  
spp. : Subspezies  
TTSS : „type III secretion system“  
U : „unit“  
Xop : „*Xanthomonas* outer protein“  
Yop : „*Yersinia* outer protein“



## 1. Einleitung

### 1.1 Molekulare Konversation - die Interaktion Gram-negativer pflanzenpathogener Bakterien mit ihren Wirtspflanzen

Welche molekularen Mechanismen ermöglichen bakteriellen Pathogenen die Besiedelung ihrer pflanzlichen Wirte? Die Beantwortung dieser Frage ist angesichts der von pflanzenpathogenen Bakterien verursachten großen Ertragsminderungen unter Kulturpflanzen von zentralem Interesse. Berücksichtigt man Zahl und Mannigfaltigkeit potentieller bakterieller Krankheitserreger, so ist die erfolgreiche Infektion von Pflanzen allerdings eher eine Ausnahme als die Regel, da diese sich gegenüber der Mehrzahl möglicher Pathogene durch eine dauerhafte Nicht-Wirt-Resistenz auszeichnen. Eine Besiedelung der Pflanze gelingt daher nur spezialisierten Pathogenen. Diese dringen meist durch natürliche Öffnungen der Pflanzenoberfläche wie Stomata oder aber durch Wunden in die Interzellularräume ein und vermehren sich dort auf Kosten des Wirtes.

Gram-negative pflanzenpathogene Bakterien haben im Laufe der Evolution verschiedene Strategien entwickelt, die ihnen eine Infektion von Pflanzen ermöglichen. Essentiell für die Pathogenität sind extrazelluläre Proteine wie beispielsweise bakterielle Toxine oder hydrolytische Enzyme. Letztere tragen zum Abbau der pflanzlichen Zellwand bei (Alfano und Collmer, 1996; Thanassi und Hultgren, 2000). Viele bakterielle Pathogene transportieren außerdem Effektorproteine direkt in die Wirtszelle. Effektorproteine interferieren in suszeptiblen Pflanzen vermutlich mit zellulären Prozessen des Wirtes zugunsten des Pathogens, welches sich daraufhin erfolgreich in den pflanzlichen Interzellularräumen vermehren kann. In resistenten Pflanzen dagegen können bestimmte Effektorproteine, die auch als Avirulenzproteine (Avr-Proteine) bezeichnet werden, von korrespondierenden pflanzlichen Resistenzgenprodukten (R-Proteine) erkannt werden (Flor, 1971). In diesem Fall induziert die Pflanze spezifische Abwehrreaktionen, wobei häufig die pflanzlichen Zellen an der Infektionsstelle absterben. Das Pathogen wird dadurch an einer weiteren Ausbreitung in der Pflanze gehindert. Makroskopisch sichtbar wird diese sogenannte hypersensitive Reaktion (HR, „hypersensitive reaction“) als lokale Nekrose des pflanzlichen Gewebes (Klement, 1982).

## 1.2 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - ein Modellsystem

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* bezeichnet wurde (Vauterin *et al.*, 2000). Bakterien der Gattung *Xanthomonas* verursachen weltweit Krankheiten an allen Hauptgruppen höherer Pflanzen, die mit chlorotischen und nekrotischen Läsionen, Welke und Fäulen einhergehen. Infektionen durch *Xanthomonas* spp. (wie z.B. durch *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, einem Reispathogen) richten große Schäden unter Kulturpflanzen an. Die Aufklärung der Infektionsstrategien dieser Pathogene sowie die Entwicklung von Methoden zur Bekämpfung von *Xanthomonas*-Infektionen ist daher ein Schwerpunkt vieler Forschungsarbeiten. Erst kürzlich konnten potentielle Virulenzfaktoren durch Analyse der genomischen DNA-Sequenzen von *X. axonopodis* pv. *citri*, dem Erreger des Citruskrebs, und *X. campestris* pv. *campestris*, dem Erreger der Aderschwärze an *Brassica*-Arten, identifiziert werden (Da Silva *et al.*, 2002).

*X. campestris* pv. *vesicatoria* ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit bei Paprika und Tomate (Abb. 1), die vor allem in Regionen mit feucht-warmem Klima von ökonomischer Bedeutung ist. Die Bakterien gelangen mittels Wassertropfen durch Oberflächenöffnungen in das pflanzliche Gewebe. In suszeptiblen Pflanzen vermehren sie sich in den Interzellularräumen und verursachen die Ausbildung von Krankheitssymptomen, sogenannten wässrigen Läsionen, die später nekrotisch werden (Abb. 1). In resistenten Pflanzen führt die Erkennung bakterieller Avr-Proteine zur Induktion spezifischer Abwehrreaktionen (Tab. 1).

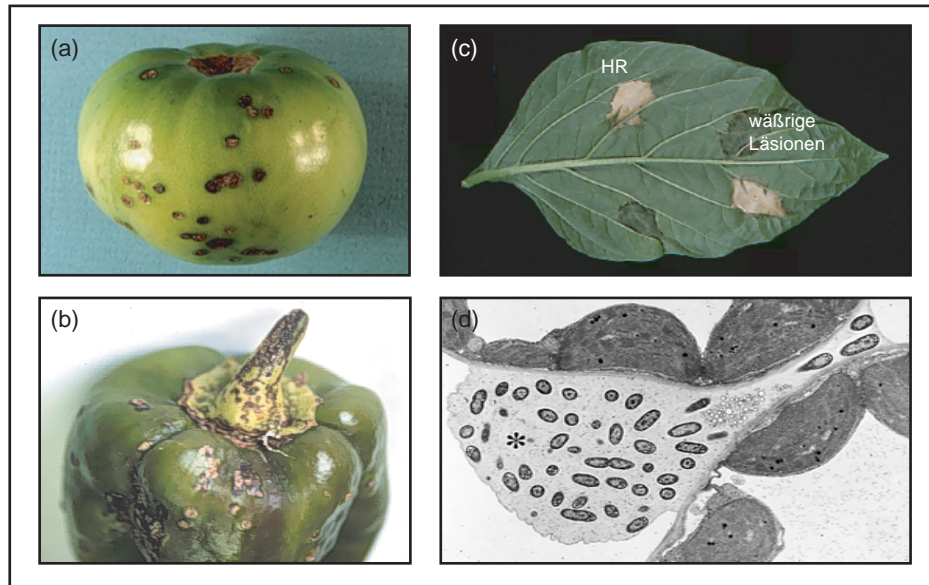


Abbildung 1: Bakterielle Fleckenkrankheit bei Paprika und Tomate.

(a) und (b) Symptome der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Früchten befallener Tomaten- und Paprikapflanzen.

(c) Unter Laborbedingungen entstandene Phänotypen, die durch Injektion bakterieller Suspensionen hoher Dichte in die Interzellularräume entwickelter Blätter hervorgerufen wurden. Erkennbar sind die durch einen avirulenten Bakterienstamm induzierte HR sowie die durch einen virulenten Stamm verursachten wässrigen Läsionen.

(d) *X. campestris* pv. *vesicatoria* vermehrt sich in den Interzellularräumen des Blattgewebes. Der Stern (\*) markiert eine in extrazelluläre Polysaccharide eingebettete Bakterienkolonie zwischen zwei Pflanzenzellen.

Tabelle 1: Interaktionen von *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämmen mit fast isogenen Paprikakultivaren.

<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> <sup>a</sup>	<i>avr</i> -Gen	Paprikakultivare (Resistenzgen) <sup>b</sup>			
		ECW	ECW-10R ( <i>Bs1</i> )	ECW-20R ( <i>Bs2</i> )	ECW-30R ( <i>Bs3</i> )
85-10	<i>avrBs1</i>	WL	HR	HR	WL
82-8	<i>avrBs3, avrBs4, avrRxv</i>	WL	WL	HR	HR
75-3	<i>avrBs1, avrBsT, avrRxv</i>	HR	HR	HR	HR

<sup>a</sup> Alle *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme enthalten *avrBs2*.

<sup>b</sup> Alle Paprikakultivare erkennen AvrBsT. HR, hypersensitive Reaktion; WL, wässrige Läsionen.

### 1.3 Typ-III-Sekretionssysteme (TTSS)

Gram-negative Bakterien besitzen sechs Hauptgruppen von Proteinsekretionssystemen, die Proteine über die innere und äußere Bakterienmembran in das extrazelluläre Medium sekretieren (Abb. 2; Thanassi und Hultgren, 2000). Vier dieser Gruppen sind vom Sec-System abhängig, welches Proteine nach Abspaltung eines N-terminalen

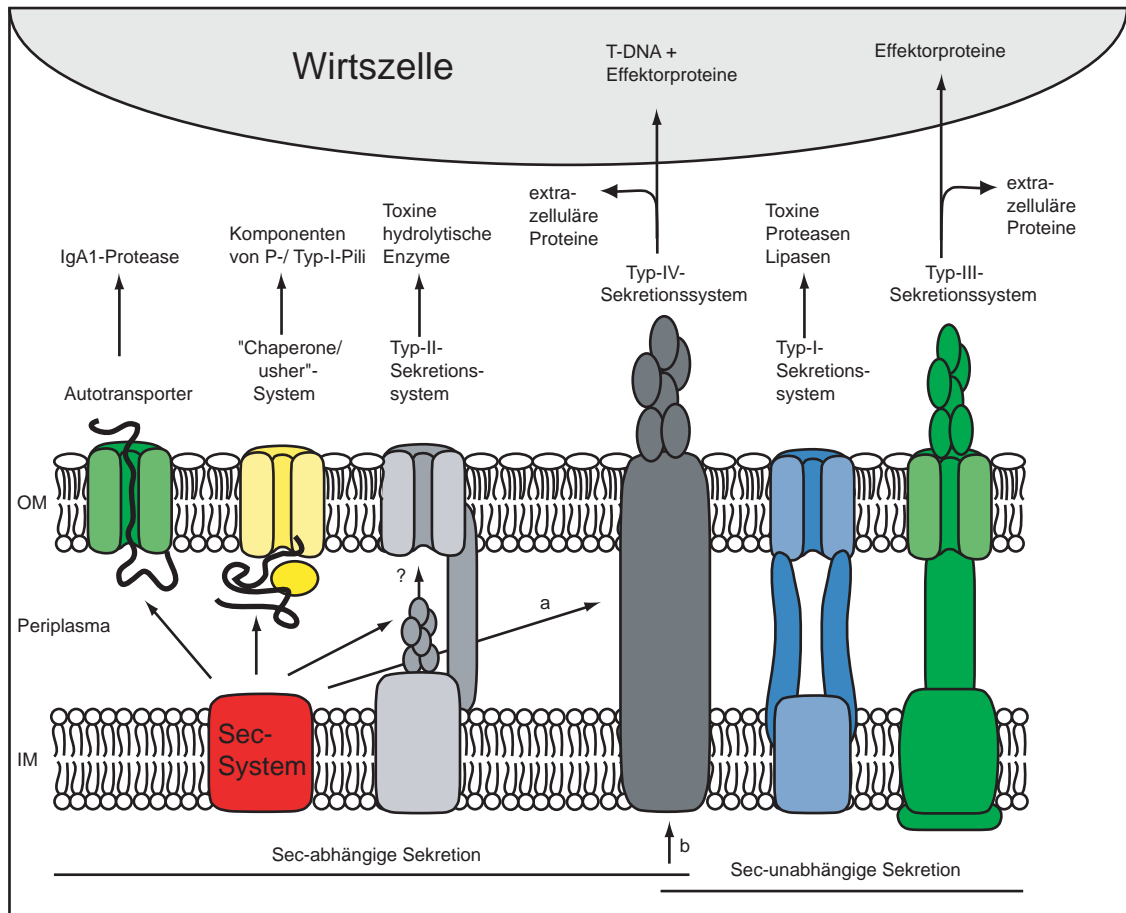


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Proteinsekretionssystemen in Gram-negativen Bakterien.

Bei vier der sechs Hauptgruppen bakterieller Sekretionssysteme werden Proteine mit Hilfe des Sec-Systems über die innere Membran transportiert. Zu ihnen zählen Autotransporter, wie z.B. die IgA1-Protease von *Neisseria gonorrhoeae*, die eine N-terminale Passagerdomäne über die äußere Membran transportieren (Henderson *et al.*, 1998). „Chaperone/usher“-Sekretionssysteme bestehen aus einem periplasmatischen Chaperon und einem Protein in der äußeren Membran, dem sogenannten „usher“, das den Transportkanal bildet (Thanassi *et al.*, 1998). In uropathogenen *E. coli* dienen sie z.B. der Bildung von P- und Typ-1-Pili. In den komplexeren Typ-II-Sekretionssystemen erfolgt der Proteintransport über die äußere Membran durch einen Kanalkomplex, der von einem Mitglied der Sekretin-Proteinfamilie gebildet wird (Sandkvist, 2001). Vier mit der inneren Membran assoziierte Proteine bilden möglicherweise eine Pilus-ähnliche Struktur (Nunn, 1999). Typ-II-Sekretionssysteme dienen häufig dem Export von extrazellulären Enzymen und Toxinen. Typ-IV-Sekretion kann sowohl unter Beteiligung des Sec-Systems (a) als auch Sec-unabhängig (b), wie z.B. bei der Translokation von T (Transfer)-DNA durch *Agrobacterium tumefaciens*, erfolgen. Das Sec-System ist nicht an Typ-I- und Typ-III-Sekretionssystemen beteiligt. Typ-I-Sekretionssysteme sekretieren Toxine, Proteasen oder Lipasen (Binet *et al.*, 1997), während durch Typ-III-Sekretionssysteme u.a. Effektorproteine direkt in die Wirtszelle transloziert werden (Hueck, 1998). Sekretierte und translozierte Substrate einzelner Sekretionssysteme sind exemplarisch aufgeführt. Einige Sekretionsapparate sind mit Pilus-ähnlichen Strukturen assoziiert (modifiziert nach Büttner und Bonas, 2002). OM, äußere Membran; IM, innere Membran.

Sekretionssignals über die innere Bakterienmembran transportiert (Driessen *et al.*, 1998).

Die Substrate von TTSS besitzen kein abspaltbares Signalpeptid und werden unabhängig vom Sec-System und damit wahrscheinlich ohne das Auftreten periplasmatischer Intermediate sekretiert (Hueck, 1998). TTSS ermöglichen die Proteinsekretion in das extrazelluläre Medium sowie die Proteintranslokation über die eukaryontische Wirtszellmembran (Hueck, 1998). Am Aufbau des membranständigen Sekretionsapparates sind ca. 20 Proteine beteiligt. Das kanalbildende Protein in der äußeren Membran gehört zur Familie der Sekretine und ist homolog zu den äußeren Membranproteinen von Typ-II-Sekretionssystemen (Sandkvist, 2001). Einige der inneren Membranproteine weisen dagegen Homologien zu Komponenten des Flagellumexportapparates auf, der ebenfalls zu den TTSS gezählt wird (He, 1998; Hueck, 1998; Aizawa, 2001; Macnab, 1999; Young und Young, 2002).

TTSS wurden erstmals in dem tierpathogenen Bakterium *Yersinia* spp. identifiziert (Michiels *et al.*, 1990) und sind seither in vielen tier- und pflanzenpathogenen Bakterien charakterisiert worden (Cornelis und Van Gijsegem, 2000). TTSS sind nicht nur für die bakterielle Pathogenität essentiell, sondern spielen beispielsweise auch bei der Symbiose von *Rhizobium* spp. und Leguminosen eine wichtige Rolle (Viprey *et al.*, 1998).

### **1.3.1 Das *hrp*-Gencluster - genetisches Requisit für die bakterielle Pathogenität**

In Gram-negativen phytopathogenen Bakterien wird das TTSS von *hrp*-Genen (*hrp*, „hypersensitive response and pathogenicity“) kodiert, die essentiell für die bakterielle Pathogenität sind. *hrp*-Mutanten sind nicht mehr in der Lage, sich in suszeptiblen Pflanzen zu vermehren und Krankheitssymptome zu verursachen bzw. in resistenten Pflanzen die HR zu induzieren (Lindgren, 1997). Die ersten *hrp*-Gene wurden durch Analyse nicht-pathogener Mutanten in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* und *P. syringae* pv. *phaseolicola* identifiziert (Lindgren *et al.*, 1986; Niepold *et al.*, 1985). Heute sind *hrp*-Gene in vielen Gram-negativen pflanzenpathogenen Bakterien mit Ausnahme von *Agrobacterium* spp. bekannt. Sie liegen häufig als Cluster von mehr als 20 Genen vor (Steinberger und Beer, 1988; Barny *et al.*, 1990; Boucher *et al.*, 1987; Arlat *et al.*, 1991; Bonas *et al.*, 1991; Rainbow *et al.*, 2002). Basierend auf der Organisation von *hrp*-Genclustern und der Regulation der Gene erfolgte die Einteilung

pflanzenpathogener Bakterien in Gruppe I (*P. syringae* und *Erwinia amylovora*) und Gruppe II (*Ralstonia solanacearum* und *Xanthomonas* spp.) (Abb. 3; Alfano und Collmer, 1996). In den *hrp*-Genclustern beider Gruppen sind mindestens neun Gene enthalten, die auch in tierpathogenen Bakterien konserviert sind (He, 1998; Hueck, 1998). Sie wurden daher als *hrc*-Gene (*hrc*, „*hrp* conserved“) bezeichnet, gefolgt von dem Buchstaben für das entsprechende homologe Gen in *Yersinia* spp. (Bogdanove *et al.*, 1996). Hrc-Proteine bilden vermutlich die Grundbausteine des Sekretionsapparates. Dagegen ist die Funktion nicht-konservierter Hrp-Proteine, die meist keine oder nur wenig Homologie zu Proteinen in der Datenbank aufweisen, weitgehend unbekannt. Analysen in *X. campestris* pv. *vesicatoria* und *R. solanacearum* zeigten, daß einige der nicht-konservierten Hrp-Proteine an der Typ-III-abhängigen Sekretion *in vitro* und/oder der Hrp-Pilusproduktion beteiligt sind (Rossier *et al.*, 2000; Van Gijsegem *et al.*, 2002).

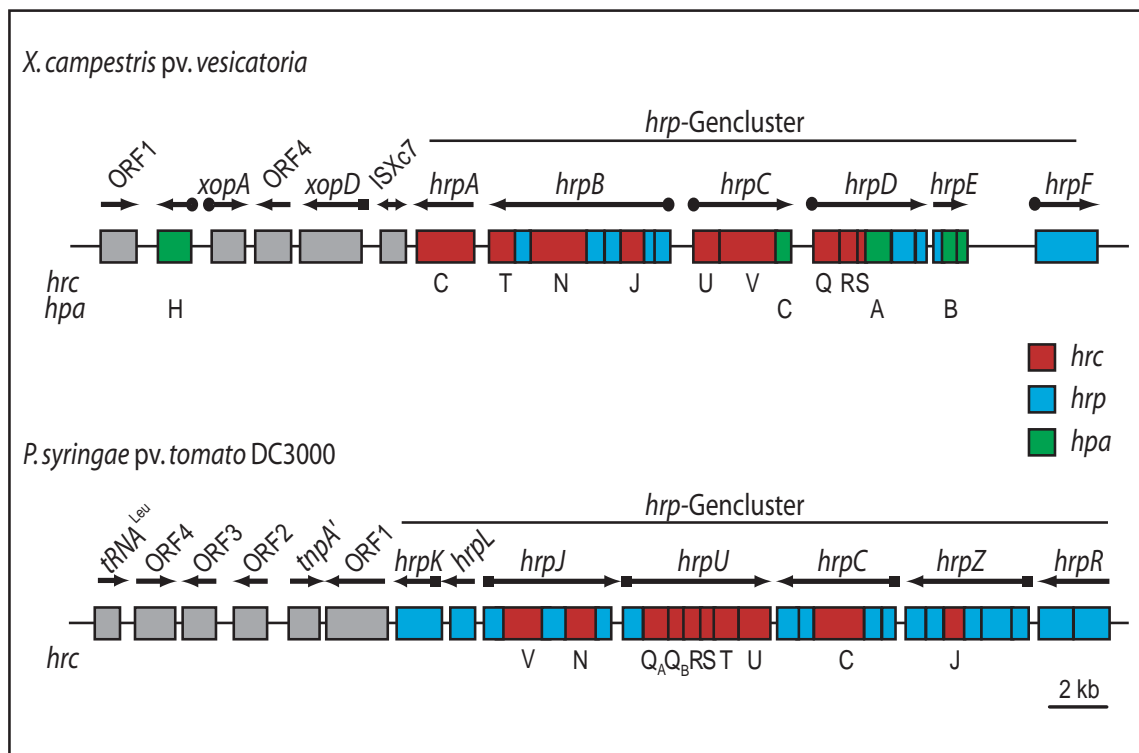


Abbildung 3: Schematische Darstellung der *hrp*-Gencluster von *X. campestris* pv. *vesicatoria* und *P. syringae* pv. *tomato* DC3000.

Dargestellt sind die *hrp*-Gencluster sowie die *hrcC*- bzw. *hrpK*-flankierenden Regionen von *X. campestris* pv. *vesicatoria* bzw. *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. Pfeile bezeichnen die Richtung der Transkription mit Quadraten als *hrp*- und Kreisen als PIP-Boxen (PIP, „plant inducible promoter“). IS und *tnp* bezeichnen Sequenzen mit Homologie zu IS („insertion sequence“)-Elementen bzw. Transposasen (nach Noël *et al.*, 2002 und Alfano *et al.*, 2000).

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

Die Expression der *hrp*-Gene wird *in vivo* vermutlich nach Kontakt der Bakterien mit der Pflanzenzelle aktiviert (Marenda *et al.*, 1998). Pflanzliche Moleküle, die die *hrp*-Genexpression induzieren, wurden bisher jedoch noch nicht identifiziert. In *R. solanacearum* dient vermutlich ein nicht-diffundierendes pflanzliches Zellwandmolekül als Signal, das von PrhA („plant regulator of *hrp* genes“), einem Protein mit Homologie zu TonB-abhängigen Siderophor-Rezeptoren der äußeren Membran, an eine Signaltransduktionskaskade weitergeleitet wird (Brito *et al.*, 1999; Aldon *et al.*, 2000; Brito *et al.*, 2002). *In vitro* kann die Expression von *hrp*-Genen in Minimalmedien mit ähnlichen Salz- und Nährstoffkonzentrationen wie im pflanzlichen Apoplasten induziert werden (Lindgren, 1997).

In Gruppe-I-Bakterien (*P. syringae* und *E. amylovora*) werden *hrp*-Gene sowie Gene, die Effektor- und Harpin-Proteine kodieren, von HrpL, einem alternativen Sigma-Faktor der ECF-Familie (ECF, „extracytoplasmic function“), reguliert (Xiao und Hutcheson, 1994; Wei und Beer, 1995; Innes *et al.*, 1993; Ritter und Dangl, 1995; Gaudriault *et al.*, 1997; Kim und Beer, 1998). In *P. syringae* wird die Expression von *hrpL* durch HrpR und HrpS, Mitglieder der NtrC-Familie von transkriptionellen Aktivatoren, sowie durch den alternativen Sigma-Faktor RpoN kontrolliert (Abb. 4a; Xiao *et al.*, 1994; Grimm *et al.*, 1995; Hendrickson *et al.*, 2000). In *E. amylovora* aktiviert eine regulatorische Kaskade bestehend aus HrpS sowie HrpX und HrpY, dem Sensor und Aktivator eines Zwei-Komponenten-Regulationssystems, die Expression von *hrpL* (Wei *et al.*, 2000b). Promotoren HrpL-regulierter Gene besitzen eine Konsensussequenz, die sogenannte *hrp*-Box (Konsensus GGAACCNA-N<sub>14</sub>-CCACNNA), die möglicherweise eine Bindestelle für HrpL repräsentiert (Innes *et al.*, 1993; Xiao und Hutcheson, 1994; Fouts *et al.*, 2002).

In phytopathogenen Bakterien der Gruppe II (*R. solanacearum* und *Xanthomonas* spp.) regulieren Transkriptionsfaktoren der AraC-Familie, zu denen HrpB in *R. solanacearum* und HrpX in *X. campestris* pv. *vesicatoria* gehören, die Expression der *hrp*-Gene (Genin *et al.*, 1992; Wengelnik und Bonas, 1996). *hrpB/hrpX* ihrerseits werden durch HrpG, einen Transkriptionsaktivator der OmpR-Familie von Zwei-Komponenten-Regulationssystemen, aktiviert (Brito *et al.*, 1999; Wengelnik *et al.*, 1996b). Die postulierte zugehörige Sensorkinase ist bisher noch nicht identifiziert worden. In *X. campestris* pv. *vesicatoria* konnten mittels Transkriptomanalysen genomweit Gene

identifiziert werden, deren Expression von HrpG reguliert wird (Noël *et al.*, 2001). In den meisten Fällen erfolgt die Genaktivierung über HrpX (Abb. 4b). Dies wurde z.B. für die Transkriptionseinheiten *hrpB-hrpF* (Wengelnik und Bonas, 1996), für *avrXv3* (Astua-Monge *et al.*, 2000a) und verschiedene *xop*-Gene („*Xanthomonas* outer protein“) gezeigt (s. auch Tab. 2).

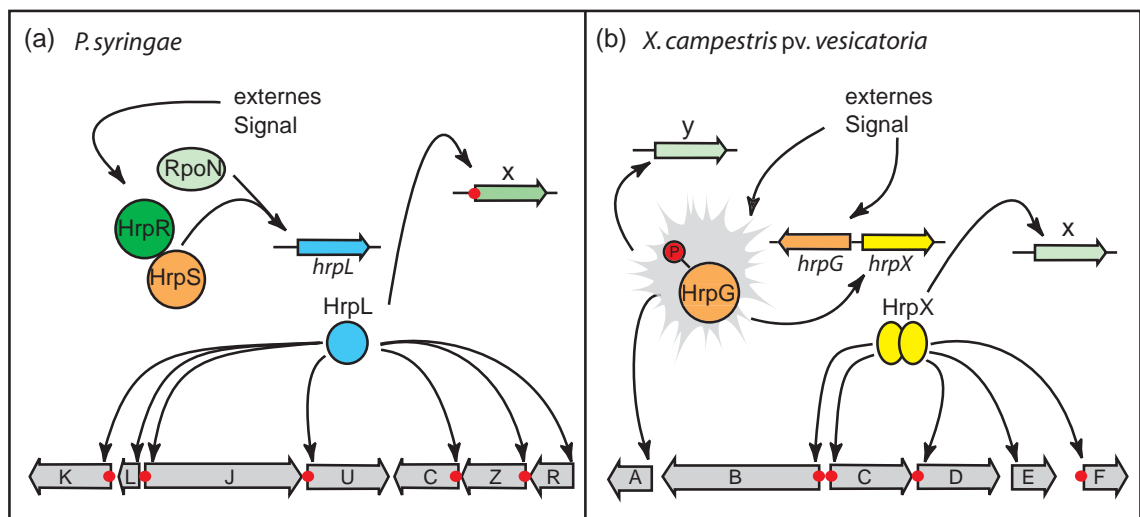


Abbildung 4: Modell der *hrp*-Genregulation in *P. syringae* und *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

(a) *hrp*-Genregulation in *P. syringae*. Die Expression des alternativen Sigma-Faktors HrpL wird durch HrpR, HrpS und den Sigma-Faktor RpoN reguliert. HrpL aktiviert die Expression von Genen des *hrp*-Clusters sowie von Genen (dargestellt als „x“), die Effektor- und Harpinproteine kodieren. Rote Kreise repräsentieren *hrp*-Boxen.

(b) *hrp*-Genregulation in *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Der OmpR-homologe Transkriptionsaktivator HrpG induziert die Expression von *hrpA* sowie einiger bisher nicht näher charakterisierter Gene (dargestellt als „y“), von denen eines Homologie zu einer Metallopeptidase aufweist (Noël *et al.*, 2001). HrpG aktiviert zudem über den AraC-ähnlichen Transkriptionsaktivator HrpX die Expression von *hrpB-hrpF* und einer Reihe von Genen (dargestellt als „x“), die beispielsweise Xop („*Xanthomonas* outer protein“-) Proteine kodieren. PIP („plant inducible promoter“-) Boxen in Promotoren von *hrp*-Transkriptionseinheiten sind als rote Kreise dargestellt.

IM, innere Membran; OM, äußere Membran.

Viele HrpX-regulierte Gene enthalten ein konserviertes Promotorelement, die sogenannte PIP-Box (PIP, „plant inducible promoter“, Konsensus TTCGC-N<sub>15</sub>-TTCGC), die möglicherweise eine Bindestelle für HrpX ist (Fenselau und Bonas, 1995; Wengelnik und Bonas, 1996; Noël *et al.*, 2002). Da es jedoch auch HrpX-unabhängig exprimierte Gene gibt, deren Promotoren PIP-Boxen enthalten (z.B. *avrRxv*; Tab. 2), erscheint es fraglich, ob dieses Sequenzmotiv allein die HrpX-abhängige Genregulation



vermittelt. PIP-Box-ähnliche Sequenzen wurden nicht nur in *X. campestris* pv. *vesicatoria*, sondern auch in *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. campestris* pv. *campestris* sowie in *R. solanacearum* gefunden (Fenselau und Bonas, 1995; Wengelnik und Bonas, 1996; Salanoubat *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2002).

### 1.3.3 Der Typ-III-Sekretionsapparat ist mit dem Hrp-Pilus assoziiert

Die biochemische Isolierung kompletter Typ-III-Sekretionsapparate aus den tierpathogenen Bakterien *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* und *Escherichia coli* zeigte, daß TTSS ähnlich wie Flagellumexportapparate aus einem membranverankerten Proteinkomplex bestehen, der mit einer nadelförmigen Struktur assoziiert ist (Kubori *et al.*, 1998; Tamano *et al.*, 2000; Blocker *et al.*, 2001; Sekiya *et al.*, 2001). Ob die extrazellulären Nadeln essentiell für den Transport sekretierter Proteine sind und/oder den Kontakt zur Zielzelle herstellen, ist noch ungeklärt.

Typ-III-abhängige extrazelluläre Strukturen, sogenannte Hrp-Pili, wurden auch in den pflanzenpathogenen Bakterien *P. syringae* pv. *tomato*, *E. amylovora*, *R. solanacearum* und *X. campestris* pv. *vesicatoria* identifiziert (Roine *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2001; Van Gijsegem *et al.*, 2000; U. Bonas *et al.*, unveröffentlichte Daten). Die Hrp-Pilusproteine weisen keine Homologie zu den Nadelkomponenten tierpathogener Bakterien auf und bilden wesentlich längere Strukturen (Romantschuk *et al.*, 2001). Mit einem äußeren Durchmesser von 6-10 nm und einer Länge von mehreren Mikrometern *in vitro* könnten Hrp-Pili die ca. 200 nm dicke pflanzliche Zellwand durchspannen (Abb. 5; Romantschuk *et al.*, 2001).

Hrp-Pili sind für den Typ-III-abhängigen Proteintransport essentiell. In *P. syringae* und *R. solanacearum* führt die Mutation von *hrpA* bzw. *hrpY*, die beide das Pilin, die Hauptkomponente des Hrp-Pilus, kodieren, zum Verlust der Typ-III-abhängigen Sekretion von Effektorproteinen *in vitro* (Wei *et al.*, 2000a; Van Gijsegem *et al.*, 2000). Die Hypothese, daß Hrp-Pili als Transportkanal für sekretierte Proteine dienen, wurde kürzlich durch immunocytochemische Analysen von Hrp-Pili und Effektorproteinen bestätigt (Brown *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2001; Jin und He, 2001; Li *et al.*, 2002). Mit Hilfe induzierbarer Expressionskonstrukte konnte durch Immunogoldmarkierungen in *P. syringae* gezeigt werden, daß der Hrp-Pilus an der Spitze „wächst“ und die TTSS-Substrate AvrPto und HrpZ ebenfalls an der Spitze des Hrp-Pilus freigesetzt werden (Jin und He, 2001; Li *et al.*, 2002).

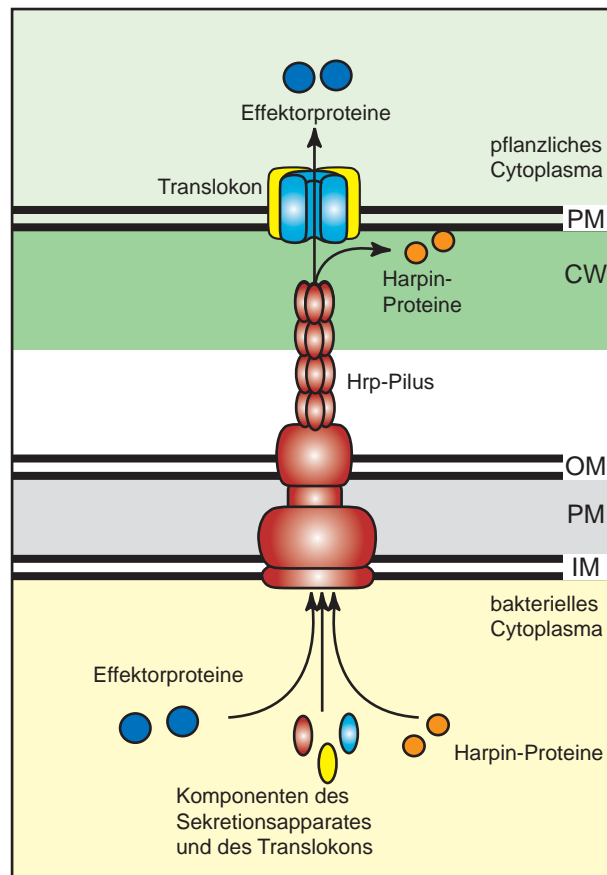


Abbildung 5: Modell des Typ-III-Sekretionssystems Gram-negativer phytopathogener Bakterien.

Der Typ-III-Sekretionsapparat ist mit dem extrazellulären Hrp-Pilus assoziiert, der die pflanzliche Zellwand (ca. 200 nm breit, nicht maßstabsgetreu dargestellt) durchspannt. Unter den sekretierten Proteinen befinden sich strukturelle Komponenten des Sekretions- und Translokationsapparates sowie Harpin- und Effektorproteine. Harpin-Proteine bleiben vermutlich an der pflanzlichen Zelloberfläche lokalisiert. Effektorproteine werden mit Hilfe des Typ-III-Translokons, das in die pflanzliche Zellmembran inseriert, in die Wirtszelle transloziert.

CW, Zellwand; IM, innere Membran; OM, äußere Membran; PM, Plasmamembran.

#### 1.3.4 Die Erkennung Typ-III-abhängig sekretierter Proteine durch das TTSS

Bisher ist nicht bekannt, welche Faktoren die Typ-III-abhängige Proteinsekretion und -translokation aktivieren. In *Erwinia* spp., *P. syringae* und *R. solanacearum* konnten einige Substrate des TTSS nach Inkubation der Bakterien in *hrp*-Gen-induzierenden Medien im Kulturüberstand nachgewiesen werden (z.B. Van Gijsegem *et al.*, 2000; Gaudriault *et al.*, 1997; Mudgett und Staskawicz, 1999). In *X. campestris* pv. *vesicatoria* dagegen ist die Expression der *hrp*-Gene nicht ausreichend, um die

Sekretion von Effektorproteinen *in vitro* zu induzieren (Rossier, 1999). Für die Identifizierung Typ-III-abhängig sekretierter Proteine war daher die Etablierung geeigneter *in vitro*-Kulturbedingungen eine notwendige Voraussetzung. In *X. campestris* pv. *vesicatoria* wird die Typ-III-abhängige Sekretion *in vitro* durch Inkubation von *hrpG\**-Mutanten in Minimalmedium mit saurem pH-Wert ermöglicht, das vermutlich die Bedingungen im pflanzlichen Apoplasten simuliert (Rossier *et al.*, 1999). *hrpG\** kodiert eine mutante Form des *hrp*-Regulators HrpG (s. 1.3.2), die sich durch einen einzelnen Aminosäureaustausch (E44K) vom Wildtyp unterscheidet und zu einer konstitutiven Expression der *hrp*-Gene führt (Wengelnik *et al.*, 1999; Rossier *et al.*, 1999). Unter den von *X. campestris* pv. *vesicatoria* Typ-III-abhängig sekretierten Proteinen konnten neben Hrp- und Avr-Proteinen auch heterolog exprimierte Proteine wie PopA von *R. solanacearum*, AvrB von *P. syringae* pv. *glycinea* und YopE von *Yersinia pseudotuberculosis* im Kulturüberstand immunologisch nachgewiesen werden (Rossier *et al.*, 1999). Ähnliche Beobachtungen wurden für das TTSS von *Erwinia chrysanthemi* beschrieben, welches nach Expression in *E. coli* die Sekretion heterologer Proteine von pflanzen- und tierpathogenen Bakterien ermöglicht (Ham *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 1999).

Die große Variabilität sowie das Fehlen konservierter Sequenzabschnitte in Substraten des TTSS erschwert die Identifizierung einer möglichen Signalsequenz. Basierend auf Analysen vor allem in *Yersinia* spp. wurde ein Sekretionssignal im N-Terminus sekretierter Proteine postuliert (Lloyd *et al.*, 2001a). So sind die N-terminalen 15-17 Aminosäuren von YopE und YopH ausreichend, um die Typ-III-abhängige Sekretion eines Reporterproteins (verwendet wurde die Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis*) zu ermöglichen (Sory *et al.*, 1995; Schesser *et al.*, 1996). Kürzlich zeigten vergleichende Sequenzanalysen in *P. syringae*-Pathovaren, daß die N-terminalen Regionen Typ-III-abhängig sekretierter Proteine sowie potentieller TTSS-Substrate eine ähnliche Aminosäurezusammensetzung aufweisen, insbesondere einen hohen Anteil an Serin- und Asparaginresten (Guttman *et al.*, 2002; Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2002). Systematische Mutageneseexperimente führten jedoch zu Zweifeln am Modell eines N-terminalen Sekretionssignals. Da Leserastermutationen, die die N-terminale Aminosäuresequenz vollständig änderten, in *Yersinia enterocolitica* keinen Einfluß auf die Typ-III-abhängige Sekretion der als Reporterprotein verwendeten Neomycinphosphotransferase ausübten, postulierten Schneewind *et al.* die Existenz eines Signals in Sekundärstrukturen des 5'-Bereiches der mRNA von Effektorgenen

(Anderson und Schneewind, 1997). Dieses Modell, das eine cotranslationale Sekretion vorschlägt, ist in Fachkreisen jedoch umstritten. So beeinträchtigten beispielsweise Mutationen, die zu einer völlig veränderten mRNA-Struktur führten, nicht die Typ-III-abhängige Sekretion von YopE (Lloyd *et al.*, 2001b).

### 1.3.5 Die Rolle von Typ-III-Sekretionschaperonen

Einige Effektorproteine von tierpathogenen Bakterien benötigen für die effiziente Typ-III-abhängige Sekretion und Translokation die Anwesenheit spezifischer Chaperone (Bennett und Hughes, 2000; Lloyd *et al.*, 2001a). Typ-III-Sekretionschaperone sind kleine, saure Proteine, die durch Bindung an ihr entsprechendes Effektorprotein zu dessen Stabilität beitragen und seiner Aggregation im bakteriellen Cytosol vorbeugen. Außerdem verhindern sie die Faltung bestimmter Proteinregionen und begünstigen so vermutlich die Erkennung von Effektorproteinen durch das TTSS (Bennett und Hughes, 2000; Isberg und Dumenil, 2001). Für einige Chaperone konnten zudem regulatorische Funktionen nachgewiesen werden. So aktiviert SicA von *Salmonella* spp. die Expression von Virulenzgenen, indem es mit dem AraC-ähnlichen Transkriptionsaktivator InvF interagiert (Darwin und Miller, 2000; Darwin und Miller, 2001; Tucker und Galan, 2000). Desweiteren reguliert FlgN, ein Chaperon des Flagellumexportapparates, die Translation des anti-Sigma 28-Faktors FlgM (Karlinsky *et al.*, 2000). In *Yersinia* spp. ist LcrH, das Chaperon der potentiellen Typ-III-Translokonproteine (s. 1.3.7) YopB und YopD, an der negativen Regulation der *yop*-Genexpression beteiligt. Die Interaktion mit YopD ist dabei essentiell für die regulatorische Funktion (Francis *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2002).

Chaperone des TTSS weisen untereinander wenig Sequenzhomologien auf und wurden bisher hauptsächlich in tierpathogenen Bakterien identifiziert. In pflanzenpathogenen Bakterien ist DspB von *E. amylovora*, welches essentiell für die Stabilität und/oder Sekretion des Virulenzfaktors DspA ist, bisher der einzig bekannte Kandidat für ein Typ-III-Sekretionschaperon (Gaudriault *et al.*, 1997; Gaudriault *et al.*, 2002).

### 1.3.6 Die Substrate des TTSS

#### 1.3.6.1 Harpin-Proteine

Die ersten bekannten Substrate von TTSS waren die Harpin-Proteine HrpZ von *P. syringae* pv. *syringae* und PopA von *R. solanacearum* (He *et al.*, 1993; Arlat *et al.*, 1994). Harpin-Proteine sind kleine, Glycin-reiche Proteine ohne Cysteinreste, die eine hitzestabile HR-Elicitoraktivität in Nicht-Wirtspflanzen besitzen. Harpin-Proteine wurden in *E. amylovora* (HrpN, HrpW; Wei *et al.*, 1992; Gaudriault *et al.*, 1998), *P. syringae* (HrpW, HrpZ; Charkowski *et al.*, 1998; He *et al.*, 1993) und *R. solanacearum* (PopA; Arlat *et al.*, 1994) identifiziert. Ihre jeweilige biologische Funktion ist jedoch noch ungeklärt. Bisher wurde nur für HrpN aus *E. amylovora* eine Beteiligung an der bakteriellen Virulenz nachgewiesen (Wei *et al.*, 1992; Barny, 1995). Harpin-Proteine werden vermutlich nicht in die pflanzliche Wirtszelle transloziert. So wurde beispielsweise PopA von *R. solanacearum* durch Fraktionierungsexperimente nach transienter Expression in Tabak in der pflanzlichen Plasmamembran lokalisiert (H. Keller, persönliche Mitteilung). Desweiteren deutet die Identifizierung von Bindestellen für HrpZ von *P. syringae* in der Wirtszellmembran darauf hin, daß der Wirkungsort von Harpin-Proteinen die pflanzliche Zelloberfläche ist (Abb. 5; Lee *et al.*, 2001a). Für HrpZ konnte außerdem eine Membraninsertion und Porenbildung in künstlichen Membranen nachgewiesen werden (Lee *et al.*, 2001b).

#### 1.3.6.2 Effektorproteine

Ein überwiegender Teil der bekannten Effektorproteine wurde genetisch als Produkte von *avr*-Genen identifiziert (Vivian und Arnold, 2000). Avr-Proteine induzieren in resistenten Pflanzen mit korrespondierenden R-Proteinen spezifische Abwehrreaktionen (Flor, 1971), die meist in Form der HR makroskopisch sichtbar werden (s. 1.1). Trotz ihrer Avirulenzfunktion in resistenten Pflanzen stellt der Besitz von *avr*-Genen für bakterielle Pathogene wahrscheinlich einen selektiven Vorteil dar, da *avr*-Gene vermutlich entscheidend zur biologischen Fitneß des Pathogens in suszeptiblen Pflanzen beitragen.

Für einige Avr-Proteine wie beispielsweise AvrBs2 von *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Kearney und Staskawicz, 1990; Swords *et al.*, 1996) oder AvrRpm1 von *P. syringae* pv. *maculicola* (Ritter und Dangl, 1995) konnte eine Beteiligung an der bakteriellen Virulenz, d.h. an der Ausbildung von Krankheitssymptomen und am bakteriellen

Wachstum in suszeptiblen Pflanzen nachgewiesen werden. Desweiteren wurde in *X. campestris* pv. *vesicatoria* gezeigt, daß das Avr-Protein AvrBs3 in suszeptiblen Pflanzen die Ausbildung der Hypertrophie, d.h. der Vergrößerung von pflanzlichen Mesophyllzellen, verursacht (Marois *et al.*, 2002). In Paprikapflanzen dagegen, die das korrespondierende *R*-Gen *Bs3* besitzen, induziert AvrBs3 die HR (Abb. 6; Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Pierre *et al.*, 2000).

#### **1.3.6.2.1 Effektorproteine werden in die Wirtszelle transloziert**

Die Typ-III-abhängige Translokation von Effektorproteinen in das Wirtszelleytosol wurde erstmals in dem tierpathogenen Bakterium *Yersinia* spp. nachgewiesen (Rosqvist *et al.*, 1994; Sory und Cornelis, 1994). In pflanzenpathogenen Bakterien deutete zunächst die Tatsache, daß Avr-Proteine zur Induktion der *R*-Gen-spezifischen HR ein funktionelles TTSS benötigen (Kjemtrup *et al.*, 2000; Mudgett und Staskawicz, 1998), auf die Translokation von Effektorproteinen hin. Für einige Avr-Proteine konnte *in vitro* eine Typ-III-abhängige Sekretion nachgewiesen werden (Ham *et al.*, 1998; Mudgett und Staskawicz, 1999; Rossier *et al.*, 1999; van Dijk *et al.*, 1999; Mudgett *et al.*, 2000; Ballvora *et al.*, 2001; Escolar *et al.*, 2001). Zudem wurde gezeigt, daß *avr*-Gene bei transienter Expression *in planta* die *R*-Gen-spezifische HR induzieren können (Bonas und Van den Ackerveken, 1999; Cornelis und Van Gijsegem, 2000).

Manche Effektorproteine besitzen typisch eukaryontische Proteinmotive. So ließen die potentiellen Myristoylierungsmotive im N-Terminus verschiedener Avr-Proteine von *P. syringae* vermuten, daß diese Proteine zur pflanzlichen Plasmamembran transportiert werden. AvrB, AvrRpm1 und AvrPto wurden in der Tat in der Plasmamembran lokalisiert (Nimchuk *et al.*, 2000; Shan *et al.*, 2000). In allen drei Proteinen sind die Myristoylierungsmotive essentiell für die Avirulenzfunktion.

Auch die Mitglieder der AvrBs3-Proteinfamilie aus *Xanthomonas* spp. enthalten eukaryontische Motive. AvrBs3-ähnliche Proteine besitzen im C-terminalen Proteinbereich nukleäre Lokalisierungssignale (NLS) sowie eine saure transkriptionelle Aktivierungsdomäne (AAD, „acidic activation domain“), typische Merkmale eukaryontischer Transkriptionsfaktoren (Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Szurek *et al.*, 2001; Lahaye und Bonas, 2001). In AvrBs3 von *X. campestris* pv. *vesicatoria*, dem namensgebenden Protein der Familie (Bonas *et al.*, 1989; Gabriel, 1999), sind NLS und AAD für die Avirulenzaktivität in resistenten Pflanzen sowie für die Induktion der

Hypertrophie (s. oben) in suszeptiblen Pflanzen essentiell (Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Szurek *et al.*, 2001; Marois *et al.*, 2002). Außerdem konnte eine AvrBs3-vermittelte transkriptionelle Aktivierung pflanzlicher Gene nachgewiesen werden, die von der Gegenwart der NLS und AAD abhängig ist (Abb. 6; Marois *et al.*, 2002).

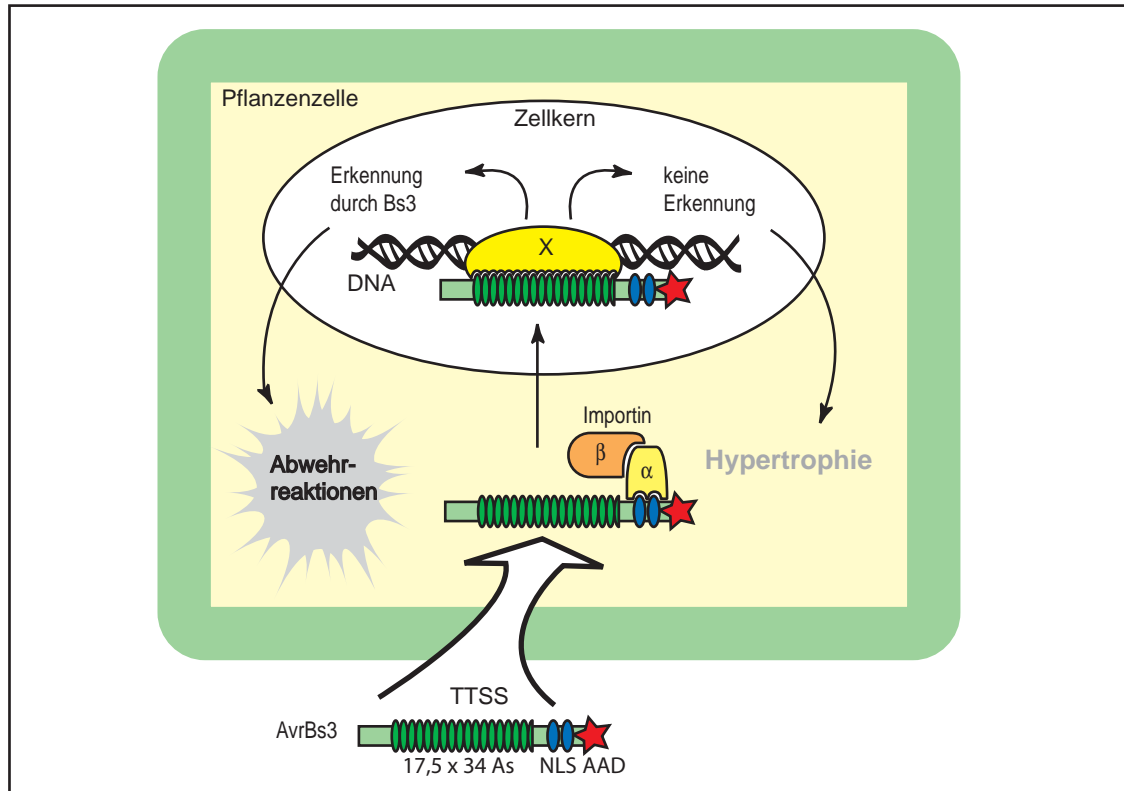


Abbildung 6: Modell der molekularen Wirkungsweise von AvrBs3 in suszeptiblen und resistenten Pflanzen.

Charakteristische Merkmale von AvrBs3 sind die zentralen 17,5 nahezu identischen 34-Aminosäuren-langen Sequenzwiederholungen, die C-terminalen nukleären Lokalisierungssignale (NLS) sowie die saure transkriptionelle Aktivierungsdomäne (AAD). Eine NLS und die AAD sind für die Virulenz- und Avirulenzaktivität von AvrBs3 essentiell (Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Szurek *et al.*, 2001; Marois *et al.*, 2002). AvrBs3 wird durch das Typ-III-Sekretionssystem (TTSS) in die Pflanzenzelle transportiert. Die NLS interagieren mit Importin  $\alpha$ , welches zusammen mit Importin  $\beta$  den Transport von AvrBs3 in den pflanzlichen Zellkern vermittelt. Zwei Gene für Importin  $\alpha$  wurden mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen aus Paprika isoliert (Szurek *et al.*, 2001). AvrBs3 bindet direkt oder indirekt (mittels eines pflanzlichen Zielproteins X) an die DNA und aktiviert die Expression pflanzlicher Gene. In suszeptiblen Pflanzen induziert AvrBs3 die Hypertrophie. In resistenten Pflanzen wird AvrBs3 durch das korrespondierende R-Protein Bs3 erkannt, das spezifische Abwehrreaktionen aktiviert.

AvrBs3 wurde kürzlich in elektronenmikroskopischen Analysen mit Hilfe eines AvrBs3-spezifischen Antikörpers im Zellkern von mit *X. campestris* pv. *vesicatoria* infizierten Pflanzenzellen lokalisiert (Szurek *et al.*, 2002). Dies ist der erste direkte

Nachweis eines bakteriellen Effektorproteins in pflanzlichen Zellen. Die Typ-III-abhängige Translokation anderer Effektorproteine von pflanzenpathogenen Bakterien wurde dagegen indirekt durch Fusion an Reporterproteine wie AvrRpt2<sub>81-255</sub> und die Adenylatcyclase von *B. pertussis* nachgewiesen (Mudgett *et al.*, 2000; Guttman und Greenberg, 2001; Guttman *et al.*, 2002; Casper-Lindley *et al.*, 2002).

### **1.3.7 Das Typ-III-Translokon – ein bakterieller Proteinkanal in der Wirtszellmembran?**

Der gerichtete Transport bakterieller Proteine in die eukaryontische Wirtszelle wird vermutlich durch das Typ-III-Translokon ermöglicht, das in die Wirtszellmembran inseriert (Abb. 5). Potentielle Translokonproteine wurden bisher hauptsächlich in tierpathogenen Bakterien identifiziert. Ihre Mutation führt zum Verlust der Typ-III-abhängigen Translokation von Effektorproteinen, beeinträchtigt dagegen in den meisten Fällen nicht die Proteinsekretion *in vitro*.

Typ-III-Translokonproteine vermitteln in einigen tierpathogenen Bakterien eine lytische Aktivität auf Erythrozyten und Makrophagen (Håkansson *et al.*, 1996; Neyt und Cornelis, 1999a; Blocker *et al.*, 1999; Warawa *et al.*, 1999). Dies deutet darauf hin, daß das Typ-III-Translokon als Proteinkanal in die Wirtszellmembran inseriert. Diese Hypothese wurde durch die Tatsache unterstützt, daß Erythrozyten, die mit sekretierten Yops („*Yersinia* outer protein“) inkubiert wurden, nach Fusion mit künstlichen Lipiddoppelschichten zu Stromflüssen im elektrischen Feld führten (Tardy *et al.*, 1999). Eine porenbildende Aktivität isolierter Translokonproteine wurde für LcrV von *Y. pseudotuberculosis* und das homologe Protein PcrV von *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt (Holmström *et al.*, 2001). LcrV bildet vermutlich die zentrale Pore des Typ-III-Translokons in *Yersinia* spp. Für dessen weitere Komponenten YopB und YopD konnte zwar keine Porenbildung nachgewiesen werden, wohl aber eine Insertion in eukaryontische Membranen sowie eine Beteiligung an der lytischen Aktivität auf Erythrozyten (Håkansson *et al.*, 1996; Tardy *et al.*, 1999; Holmström *et al.*, 2001). Es ist anzunehmen, daß YopB und YopD durch Interaktion mit LcrV (Sarker *et al.*, 1998a) die *in vivo*-Funktionalität des Translokons entscheidend beeinflussen. *Yersinia*-Stämme, die in *yopB*, *yopD* oder *lcrV* mutiert sind, können Effektorproteine nicht mehr in die Wirtszelle translozieren (Sory und Cornelis, 1994; Boland *et al.*, 1996; Håkansson *et al.*, 1996; Fields *et al.*, 1999; Pettersson *et al.*, 1999).



#### 1.4 Die Komponenten und Substrate des TTSS von *X. campestris* pv. *vesicatoria*

Das *hrp*-Gencluster von *X. campestris* pv. *vesicatoria* ist auf einer 23-kb großen chromosomalen Genregion lokalisiert und umfaßt sechs Transkriptionseinheiten (*hrpA* bis *hrpF*; Bonas *et al.*, 1991). Durch DNA-Sequenzanalysen sowie phänotypische Analysen nicht-polarer Mutanten konnten drei Klassen von Genen identifiziert werden: (i) *hrc*-Gene (s. 1.3.1), (ii) *hrp*-Gene, die nicht in allen bakteriellen Pflanzenpathogenen vorhanden, jedoch für die Pathogenität von *X. campestris* pv. *vesicatoria* essentiell sind, und (iii) *hpa*-Gene (*hpa*, „*hrp* associated“), die nicht essentiell für die Interaktion mit der Wirtspflanze sind, jedoch einen mehr oder weniger starken modulierenden Einfluß auf die bakterielle Pathogenität ausüben (Fenselau *et al.*, 1992; Fenselau und Bonas, 1995; Wengelnik *et al.*, 1996a; Huguet und Bonas, 1997; Huguet *et al.*, 1998; Rossier *et al.*, 2000; U. Bonas *et al.*, unveröffentlichte Daten). Durch Analysen von Transposoninsertionsmutanten wurden bisher neben *hpaA* (im *hrpD*-Operon) auch *hpaC* (im *hrpC*-Operon) sowie *hpaB* (im *hrpE*-Operon) identifiziert (Abb. 3; Huguet *et al.*, 1998; U. Bonas *et al.*, unveröffentlichte Daten).

Unter den immunologisch nachgewiesenen Typ-III-abhängig sekretierten Proteinen von *X. campestris* pv. *vesicatoria* befinden sich Xop-Proteine sowie die im *hrp*-Gencluster kodierten Proteine HrpB2, HrpF und HpaA (Tab. 2; Rossier *et al.*, 1999; Rossier *et al.*, 2000; Mudgett *et al.*, 2000; Ballvora *et al.*, 2001; Escolar *et al.*, 2001; Noël *et al.*, 2001; Noël *et al.*, 2002; K. Hahn und U. Bonas, unveröffentlichte Daten).

Die Funktion von HpaA, das für die volle Virulenzaktivität von *X. campestris* pv. *vesicatoria* essentiell ist, konnte bisher nicht geklärt werden. So weisen funktionelle NLS in HpaA einerseits auf eine Aktivität in der Wirtszelle hin, andererseits ist HpaA jedoch auch an der Typ-III-abhängigen Sekretion bestimmter TTSS-Substrate beteiligt. So sekretieren *hpaA*-Mutanten zwar noch AvrBs3, nicht mehr jedoch das heterolog exprimierte PopA-Protein von *R. solanacearum* (Huguet *et al.*, 1998; Rossier *et al.*, 2000). Es bleibt zu klären, ob HpaA möglicherweise extrazellulär mit dem Sekretionsapparat assoziiert ist. So ist in *R. solanacearum* HrpV, das homologe Protein zu HpaA, am Aufbau des Hrp-Pilus beteiligt (Van Gijsegem *et al.*, 2002).

Tabelle 2: Typ-III-abhängig sekretierte Proteine in *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Protein <sup>a</sup>	Charakteristika/Homologie <sup>b</sup>	Expression <sup>c</sup>	Literatur
<b>Komponenten des Sekretionsapparates</b>			
HrpB2 ‡	extrazelluläre Komponente des TTSS	induziert; PIP-Box	(Rossier <i>et al.</i> , 2000; Wengelnik und Bonas, 1996)
HrpE1 ‡	Hauptkomponente des Hrp-Pilus	basale Expression; induziert	(Wengelnik und Bonas, 1996; Rossier, 1999) (Bonas <i>et al.</i> , unveröffentlichte Daten)
HrpF	Translokonprotein	induziert; PIP-Box	(Rossier <i>et al.</i> , 2000; Büttner <i>et al.</i> , 2002; Wengelnik und Bonas, 1996)
<b>Xops („Xanthomonas outer proteins“)<sup>d</sup></b>			
√ XopA	Hpa1 ( <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> )	induziert; PIP-Box	(Noël <i>et al.</i> , 2002)
XopB	AvrPphD ( <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> )	induziert	(Noël <i>et al.</i> , 2001; Noël, 2001)
XopC		induziert	(Noël <i>et al.</i> , 2001; Noël, 2001)
XopD	PsvA ( <i>P. syringae</i> pv. <i>eriobotryae</i> )	induziert; <i>hrp</i> -Box	(Noël <i>et al.</i> , 2002)
XopJ	AvrRxv/YopJ-Familie putative Cystein-Protease	induziert	(Noël <i>et al.</i> , 2001; Noël, 2001)
√ HpaA	NLS	induziert; PIP-Box	(Huguet <i>et al.</i> , 1998; Wengelnik und Bonas, 1996; U. Bonas <i>et al.</i> , unveröffentlichte Daten)
AvrBs1 *	C-Terminus ist homolog zu AvrA ( <i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> )	konstitutiv	(Ronald und Staskawicz, 1988; Escolar <i>et al.</i> , 2001)
√ AvrBs2 *	Agrocinopinsynthase ( <i>A. tumefaciens</i> ); Phosphodiesterase ( <i>E. coli</i> )	nd	(Kearney und Staskawicz, 1990; Swords <i>et al.</i> , 1996; Mudgett <i>et al.</i> , 2000)
√ AvrBs3 *	NLS; AAD; AvrBs3-Familie	konstitutiv	(Van den Ackerveken <i>et al.</i> , 1996; Rossier <i>et al.</i> , 1999; Szurek <i>et al.</i> , 2001; Marois <i>et al.</i> , 2002)
AvrBs4 *	NLS; AAD; AvrBs3-Familie	konstitutiv	(Ballvora <i>et al.</i> , 2001; Bonas <i>et al.</i> , 1993)
AvrRxv	AvrRxv/YopJ-Familie putative Cystein-Protease	konstitutiv; PIP-Box	(Rossier <i>et al.</i> , 1999; Ciesiolka <i>et al.</i> , 1999)
AvrBsT *	AvrRxv/YopJ-Familie putative Cystein-Protease	konstitutiv	(Escolar <i>et al.</i> , 2001; Orth <i>et al.</i> , 2000)
AvrXv3 *	AAD	induziert; PIP-Box	(Astua-Monge <i>et al.</i> , 2000a)
AvrXv4	AvrRxv/YopJ-Familie putative Cystein-Protease	nd; PIP-Box	(Astua-Monge <i>et al.</i> , 2000b)

<sup>a</sup> ‡, essentiell für Typ-III-abhängige Sekretion *in vitro*; √, nachgewiesene Virulenzfunktion; \*, Protein induziert R-Gen-spezifische HR bei transienter Expression in der resistenten Wirtspflanze.

<sup>b</sup> AAD, saure Aktivierungsdomäne; NLS, nukleäres Lokalisierungssignal; TTSS, Typ-III-Sekretionssystem; Yop, „*Yersinia* outer protein“.

<sup>c</sup> Expression unter *hrp*-Gen-induzierenden Bedingungen. nd, nicht durchgeführt; PIP, „plant inducible promoter“.

<sup>d</sup> Aufgeführt sind Typ-III-abhängig sekretierte Proteine mit unbekanntem Zielort sowie Avr-Proteine.

In *X. campestris* pv. *vesicatoria* wird der Hrp-Pilus vermutlich von HrpE1 gebildet (T. Ojahn-Reuhs und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Möglicherweise ist auch HrpB2 eine Komponente des Hrp-Pilus, da es nicht nur sekretiert wird, sondern auch selbst für die Typ-III-abhängige Proteinsekretion essentiell ist (Rossier *et al.*, 2000). Dagegen spielt HrpF keine Rolle bei der Proteinsekretion *in vitro*. Da die Mutation von HrpF jedoch zum Verlust der bakteriellen Pathogenität führt, wurde postuliert, daß HrpF an der Translokation von Effektorproteinen in die Wirtszelle beteiligt ist (Rossier *et al.*, 2000).

### 1.5 Die Thematik der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die genetische und biochemische Charakterisierung nicht-konservierter Gene in der Region zwischen *hrpE* und *hrpF* im *hrp*-Gencluster von *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Mutationen in individuellen Genen sollten hinsichtlich ihres Einflusses auf die Interaktion von *X. campestris* pv. *vesicatoria* mit suszeptiblen und resistenten Wirtspflanzen sowie auf die Typ-III-abhängige Proteinsekretion *in vitro* untersucht werden. Zudem sollten in Wildtyp-Stämmen die potentiellen Genprodukte immunologisch nachgewiesen werden.

Im Fokus der experimentellen Arbeiten stand dabei die Charakterisierung von HrpF, einem Typ-III-abhängig sekretierten Protein von *X. campestris* pv. *vesicatoria*. In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits durch Analyse von Transposoninsertionsmutanten gezeigt, daß *hrpF* essentiell für die bakterielle Pathogenität ist, jedoch keinen Einfluß auf die Typ-III-abhängige Proteinsekretion *in vitro* ausübt (Rossier *et al.*, 2000). Die Hypothese, daß HrpF an der Translokation von Effektorproteinen über die pflanzliche Wirtszellmembran beteiligt ist, sollte in dieser Arbeit durch geeignete experimentelle Ansätze überprüft werden.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit war die Aufklärung der Funktion der zu *hrpF* benachbarten Gene des *hrp*-Genclusters. Durch genetische und biochemische Analysen sollten Einblicke in die Funktionen von ORFE2, das durch Analyse von Transposoninsertionsmutanten bereits als *hpaB* identifiziert worden war (U. Bonas *et al.*, unveröffentlichte Daten), und ORFE3 gewonnen werden. Beide Gene sind im *hrpE*-Operon lokalisiert, das durch eine ca. 3,6-kb große DNA-Region von *hrpF* getrennt ist. Dieser Sequenzabschnitt enthält zwei offene Leserasterrahmen (ORF, „open reading frame“) mit unbekannter Funktion. Der Nachweis möglicher Genprodukte sowie die

Analyse von Deletionsmutanten sollten auch hier zu einer Charakterisierung möglicher Genfunktionen beitragen.

### 1.5.1 Vorarbeiten zu HrpF

Aufgrund bisheriger Daten ist HrpF ein guter Kandidat für ein Typ-III-Translokonsprotein. Durch *in vitro*-Sekretionsanalysen wurde HrpF Typ-III-abhängig im Kulturüberstand nachgewiesen. Zudem zeigte die Analyse von Transposoninsertionsmutanten, daß HrpF für die Interaktion von *X. campestris* pv. *vesicatoria* mit suszeptiblen und resistenten Wirtspflanzen essentiell ist, jedoch keinen Einfluß auf die Typ-III-abhängige Proteinsekretion *in vitro* ausübt (Huguet und Bonas, 1997; Rossier *et al.*, 2000).

HrpF ist ein 87-kDa großes Protein, das zwei N-terminale nahezu identische Sequenzwiederholungen sowie zwei hydrophobe Aminosäurebereiche im C-Terminus enthält (Huguet und Bonas, 1997). HrpF ist zu den gleichnamigen Proteinen der verwandten bakteriellen Phytopathogene *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. axonopodis* pv. *citri* und *X. campestris* pv. *campestris* sowie zu PopF1 und PopF2 von *R. solanacearum* homolog (Tab. 3). Die Funktion dieser Proteine während der Interaktion mit der Wirtspflanze ist bisher nicht bekannt.

Tabelle 3: HrpF und homologe Proteine in Gram-negativen Bakterien.

Protein <sup>a</sup>	Organismus	Sequenzvergleich mit HrpF <sup>b</sup> (Identität/Ähnlichkeit)
HrpF (806; AAB86527)	<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	100% / 100%
HrpF (824; NP640749)	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	82% / 87%
HrpF (921; NP636591)	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	59% / 68%
HrpF (790; BAB07869)	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	91% / 94%
PopF1 (726; NP523114)	<i>R. solanacearum</i>	42% / 55%
PopF2 (736; NP522461)	<i>R. solanacearum</i>	39% / 54%
NoIX (596; NP444155)	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	53% / 70%
NoIX (634; NP106860)	<i>Mesohizobium loti</i>	52% / 67%
NoIX (596; AAG45732)	<i>Sinorhizobium fredii</i>	45% / 61%
HrpK (780; AAF71489)	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	22% / 34%

<sup>a</sup> Proteinlänge in Aminosäuren sowie die „accession number“ sind in Klammern angegeben.

<sup>b</sup> Proteinidentitäten und -ähnlichkeiten wurden mittels BLAST 2 basierend auf der Matrix BLOSUM 62 ermittelt.

HrpF weist außerdem Homologie zu NolX, einem Typ-III-abhängig sekretierten Protein in einigen spp. des Bodenbakteriums *Rhizobium*, auf (Tab. 3; Huguet und Bonas, 1997; Viprey *et al.*, 1998; Krishnan, 2002). NolX ist ein Flavonoid-abhängig exprimiertes Genprodukt des *nolXWBTUV*-Lokus und wurde durch elektronenmikroskopische Analysen kürzlich in bakteriellen Infektionsschläuchen von *Sinorhizobium fredii* nachgewiesen (Krishnan, 2002). Ob NolX in die pflanzliche Membran inseriert oder in die Wirtszelle transloziert wird, ist bislang nicht geklärt.

Eine geringe Homologie besteht auch zwischen HrpF und HrpK, einem Protein von *P. syringae* pv. *tomato* mit unbekannter Funktion, welches am linken Ende des *hrp*-Genclusters kodiert ist (Alfano und Collmer, 1997).

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Funktionelle Charakterisierung von HrpF, einem potentiellen Typ-III-Translokonprotein von *X. campestris* pv. *vesicatoria*

#### 2.1.1 Artikel:

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, May 2002, p. 2389–2398  
0021-9193/02/\$04.00+0 DOI: 10.1128/JB.184.9.2389–2398.2002  
Copyright © 2002, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 184, No. 9

### Functional Analysis of HrpF, a Putative Type III Translocon Protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Daniela Büttner,<sup>1</sup> Dirk Nennstiel,<sup>1†</sup> Birgit Klüsener,<sup>2</sup> and Ulla Bonas<sup>1\*</sup>

*Institut für Genetik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, D-06099 Halle (Saale),<sup>1</sup> and  
Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Ruhr-Universität Bochum, D-44780 Bochum,<sup>2</sup> Germany*

Received 29 November 2001/Accepted 3 February 2002

**Type III secretion systems (TTSSs) are specialized protein transport systems in gram-negative bacteria which target effector proteins into the host cell. The TTSS of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, encoded by the *hrp* (hypersensitive reaction and pathogenicity) gene cluster, is essential for the interaction with the plant. One of the secreted proteins is HrpF, which is required for pathogenicity but dispensable for type III secretion of effector proteins in vitro, suggesting a role in translocation. In this study, complementation analyses of an *hrpF* null mutant strain using various deletion derivatives revealed the functional importance of the C-terminal hydrophobic protein region. Deletion of the N terminus abolished type III secretion of HrpF. Employing the type III effector AvrBs3 as a reporter, we show that the N terminus of HrpF contains a signal for secretion but not a functional translocation signal. Experiments with lipid bilayers revealed a lipid-binding activity of HrpF as well as HrpF-dependent pore formation. These data indicate that HrpF presumably plays a role at the bacterial-plant interface as part of a bacterial translocon which mediates effector protein delivery across the host cell membrane.**

The interaction of many gram-negative plant and animal pathogenic bacteria with their hosts depends on a highly conserved type III protein secretion system (TTSS), which transports proteins without cleavage of a classical N-terminal signal peptide into the extracellular milieu as well as into the host cell (13, 25). In plant-pathogenic bacteria, the TTSS is encoded by *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) genes. *hrp* mutants are no longer able to multiply and cause disease in susceptible plants and to induce defense responses such as the hypersensitive reaction (HR) in resistant host and nonhost plants (1). The HR is a rapid, localized cell death of infected plant tissue which halts bacterial ingress. At least nine *hrp* genes, designated *hrc* (for *hrp* conserved), are conserved between plant and animal bacterial pathogens (8, 22) and probably encode the core components of the type III secretion apparatus.

Analyses of nonpolar mutants revealed that an additional set of nonconserved proteins, encoded in the *hrp* gene clusters, were essential for secretion and/or translocation. Among the nonconserved proteins are secreted proteins such as the subunits of the Hrp pilus, which is associated with the TTSS of plant-pathogenic bacteria (48). Hrp pili have been described for *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, and *Erwinia amylovora* (30, 47, 61) and probably mediate contact between the bacterial and plant cell surface. In addition, Hrp pili have been shown to be essential for type III secretion in vitro (47, 61) and were proposed to function as conduits for secreted proteins traversing the plant cell wall (29, 30). Other proteins traveling the TTSSs of plant-pathogenic bacteria include

harpins and effector proteins, the latter of which have been suggested to be translocated into the plant cell (32).

Intensive studies of *Yersinia* outer proteins (Yops) defined the N terminus of type III-secreted proteins as an important region which directs secretion (12, 37, 56). In addition, a secretion signal in the 5' region of the mRNA has been discussed (2, 3, 41). A translocation signal has been proposed to be located within the first 50 to 100 codons of genes encoding effector proteins of both plant and animal pathogens (41, 53, 56). Translocation of effector proteins into the host cell was first described for *Yersinia* spp. (19, 49, 57) and appears to be the key function of TTSSs.

Translocation is mediated by the translocon, a bacterial protein or protein complex which presumably forms channel-like structures in the host cell membrane. In plant-pathogenic bacteria, there is indirect evidence for translocation of effectors because expression of bacterial avirulence (*avr*) genes in the plant cell resulted in the induction of a resistance (*R*) gene-specific HR (11). *avr* genes are present in *Pseudomonas* and *Xanthomonas* spp. (69) and were originally defined based on their ability to trigger a host defense reaction, in most cases the HR. Plant defense induction depends on the specific recognition of an Avr protein by a plant expressing the corresponding *R* gene (31, 36). In the absence of the *avr* or the *R* gene or both, the interaction between pathogen and plant leads to disease.

Our laboratory studies type III secretion in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, the causal agent of bacterial spot on pepper and tomato. The TTSS is encoded by the 23-kb chromosomal *hrp* gene cluster (9). Expression of the six operons, *hrpA* to *hrpF*, is induced in the plant (55) and in minimal medium XVM2 (66) and is regulated by the products of the regulatory genes *hrpX* and *hrpG*. HrpG belongs to the OmpR family of two-component response regulators and activates the expression of *hrpA* and *hrpX* (68). HrpX, an AraC-type transcriptional activator, controls the expression of operons *hrpB*

\* Corresponding author. Mailing address: Institut für Genetik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, D-06099 Halle (Saale), Germany. Phone: (49) 345 5526290. Fax: (49) 345 5527277. E-mail: bonas@genetik.uni-halle.de.

† Present address: Zentrale Forschung, Bayer AG, D-51368 Leverkusen, Germany.

to *hrpF* (66) as well as the expression of *avrXv3* (4) and a number of putative virulence factors (45).

The TTSS of *X. campestris* pv. *vesicatoria* secretes a number of Hrp and Avr proteins as well as Xops (*Xanthomonas* outer proteins) into the culture supernatant (6, 16, 41, 45, 50, 51). One of the proteins secreted by the TTSS is HrpF, an overall hydrophilic protein of 87 kDa (26). HrpF contains two N-terminal imperfect direct repeats and two C-terminal hydrophobic segments (26, 50) and shows 48% sequence identity with NolX, a type III-secreted protein from *Rhizobium fredii* (26, 63). Intriguingly, HrpF, which is dispensable for type III secretion *in vitro*, has been found to be essential for the interaction of *X. campestris* pv. *vesicatoria* with the plant. It has therefore been suggested that HrpF plays a role in type III translocation (50).

In this study, we report on the functional importance of different regions in the HrpF protein. Furthermore, we obtained indirect evidence that HrpF is not translocated into the host cell. Lipid-binding activity of secreted HrpF and the observation of HrpF-dependent pore formation in lipid bilayers support the hypothesis that HrpF acts as a translocon protein.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, growth conditions, and plasmids.** Bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1. *Escherichia coli* cells were cultivated at 37°C in Luria-Bertani (LB) or Super medium (Qiagen, Hilden, Germany). *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains were grown at 30°C in NYG broth (15) or in minimal medium A (5) supplemented with sucrose (10 mM) and Casamino Acids (0.3%), and *Agrobacterium tumefaciens* strains were grown at 30°C in yeast extract-beef (YEB) medium. Antibiotics were added to the media at following final concentrations: ampicillin, 100 µg/ml; kanamycin, 25 µg/ml; rifampin, 100 µg/ml; spectinomycin, 100 µg/ml; and tetracycline, 10 µg/ml.

Plasmids were introduced into *E. coli* by electroporation and into *X. campestris* pv. *vesicatoria* and *A. tumefaciens* by conjugation, using pRK2013 as a helper plasmid in triparental matings (17).

**Plant material and plant inoculations.** The near-isogenic pepper cultivars Early Cal Wonder (ECW), ECW-10R, and ECW-30R (40) were grown and inoculated with *X. campestris* pv. *vesicatoria* or *A. tumefaciens* as described previously (10, 60). Bacteria were hand-infiltrated into the intercellular spaces of fully expanded leaves at concentrations of  $4 \times 10^8$  CFU/ml in 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Reactions were scored over a period of 3 days.

**Agrobacterium-mediated transient expression.** *Agrobacterium*-mediated transient expression assays were performed as described (60) with the following modifications: bacteria were incubated in induction medium for 4 to 6 h and infiltrated into the intercellular spaces of fully expanded leaves at concentrations of  $5 \times 10^8$  CFU/ml in infiltration medium (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MES [morpholineethanesulfonic acid, pH 5.3], 150 µM acetosyringone).

**Generation of an *hrpF* null mutant.** A 5.3-kb *EcoRV* fragment, derived from construct pBF (26), which contains the monocistronic *hrpF* locus, was subcloned in pUC119, giving pU5hrpF. A 2.9-kb fragment containing the *hrpF* coding region, 253 bp upstream, and 319 bp downstream region was deleted by *Clal* digestion and religation of the plasmid. This mutation should not have a polar effect on other operons. The remaining 2-kb insert was cloned into the suicide plasmid pOK1 (27), giving pOKΔhrpF. *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains 85-10ΔhrpF and 85\*ΔhrpF were generated by introduction of pOKΔhrpF into 85-10 and 85\*, respectively, as described (27).

**Construction of *hrpF* derivatives.** For expression and purification of recombinant HrpF, plasmid pDhrpF was constructed. *hrpF* was amplified by PCR from genomic DNA of *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85-10, using *Pfu* polymerase (Stratagene, Heidelberg, Germany) and primers HrpF-For (5'-TACTGAATTC GCCTCTATGTCGCTC-3'), containing an *EcoRI* site, and HrpF-Rev (5'-GTA AGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGCCCGGGTCTGCGACGGATCCG GAC-3'), introducing a *SmaI* site, the coding sequence for six histidine residues, and a *HindIII* site (restriction sites are underlined in primer sequences). The PCR product was cloned by partial *EcoRI* and *HindIII* digestion into pUC119, pBluescript II KS and the broad-host-range vectors pDSK602 and pLAFR3 for

expression in both *E. coli* and *X. campestris* pv. *vesicatoria*, giving constructs pUhrpF, pKhrpF, pDhrpF, and pLhrpF, respectively.

*hrpF*ΔI was generated by a 1,380-bp *SgrAI* deletion in construct pUhrpF which leads to the deletion of amino acids 118 to 575. The resulting fragment was cloned into pDSK602, giving pDhrpFΔI. Construct pDhrpFΔN is a derivative of pDhrpF in which 456 bp encoding the N terminus of HrpF were replaced by an adaptor (5'-AATTCGCCTCTATGCTCTAGAC-3'). In construct pLhrpFΔC109, a nonsense mutation was introduced by PCR, resulting in a translational stop after amino acid 697. To construct a C-terminal deletion derivative of HrpF, a 600-bp fragment at the 3' end of *hrpF* in plasmid pLhrpF was deleted by digestion with *SacI* and *SmaI*, Klenow fill-in reaction, and religation. The resulting construct was designated pLhrpFΔC249.

For deletion of the C-terminal hydrophobic segments, the 600-bp *SacI/HindIII* fragment encoding the C terminus of HrpF was replaced by deletion derivatives. The *SacI/HindIII* cassette was amplified by PCR, introducing *XbaI* sites in the sequences flanking the hydrophobic segment-encoding region. The PCR products flanked by *SacI/XbaI* and *XbaI/HindIII* sites were fused at the *XbaI* site and introduced into the *SacI* and *HindIII* sites of constructs pLhrpF and pDhrpF. This resulted in deletion of amino acids 610 to 647 (pDhrpFΔH1), 647 to 692 (pLhrpFΔH2), and 610 to 692 (pDhrpFΔH12) in the corresponding gene products.

For *Agrobacterium*-mediated transient expression, *hrpF* derived from construct pKhrpF was cloned into the *EcoRI* and *XhoI* sites of pBI1.4, giving construct pBIhrpF. For construct pBIShrpF, a PCR product containing the signal peptide sequence of the tobacco PR1a gene (14) was fused to the *hrpF* open reading frame. For technical reasons, the signal peptide sequence contained 1 bp exchange, resulting in a conserved amino acid exchange at position 17 of the signal peptide. For generation of plasmids expressing the HrpF-AvrBs3 fusion protein, the 1.1-kb *EcoRI* fragment of construct pKhrpF encoding the N terminus of HrpF was cloned into the *EcoRI* site of constructs pDS356F and pBI356F, generating constructs pDhrpFN356 and pBIhrpFN356, respectively.

**HrpF expression, purification, and antibody production.** For the production of a polyclonal anti-HrpF antiserum and for TRANSIL experiments, HrpF was expressed from pDhrpF and purified from *E. coli* BL21. Bacteria were grown in Super medium at 37°C. Expression was induced at an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.7 with IPTG (isopropylthiogalactopyranoside, 2 mM final concentration) for 2 h at 30°C. Cells were harvested, resuspended in 8 M urea-0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-0.01 M Tris-HCl, pH 8.0, and broken with a French press. After removal of cell debris, HrpF was purified from the supernatant using Ni-nitrilotriacetic acid-agarose (Qiagen). After washing with 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.01 M Tris-HCl, pH 6.3, the protein was eluted with 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-0.01 M Tris-HCl (pH 8.0)-150 mM histidine.

For antibody production, rabbits were immunized with the purified HrpF protein (Eurogentec, Herstal, Belgium). The serum after the third booster injection was used for immunoblot analyses.

For expression of glutathione *S*-transferase (GST) fusion proteins, *hrpF* derivatives from pUhrpF and pLhrpFΔC249 were cloned into the *EcoRI* and *XhoI* sites of the GST fusion vector pGEX-2TKM, generating pGhrpF and pGhrpFΔC249. In addition, *hrpE2* was PCR amplified and cloned into the *EcoRI* and *XhoI* sites of pGEX-2TKM, giving pGhrpE2.

For the analysis of recombinant proteins in planar lipid bilayer experiments, *E. coli* BL21 carrying pGhrpF, pGhrpFΔC249, or pGhrpE2 was grown as described above. All GST fusion proteins were purified from inclusion bodies. Cells were broken with a French press, and inclusion bodies were pelleted by centrifugation. After extensive washing with phosphate-buffered saline (PBS), the inclusion bodies were broken in 8 M urea-0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-0.01 M Tris-HCl, pH 8.0, with a French press. Insoluble debris was removed by centrifugation, and the samples were dialyzed for 16 h against PBS at 4°C. Then 200 µl of dialysate was incubated with 1 U of thrombin protease for 2 h at room temperature, and cleaved GST was removed by incubation with glutathione-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) for 30 min at room temperature with shaking. After centrifugation, protein amounts in the supernatant fraction were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Coomassie staining.

**Secretion experiments and protein analysis.** Bacteria were cultivated in minimal medium A overnight and resuspended to a concentration of 10<sup>8</sup> CFU/ml in minimal medium A at pH 5.4 (acidified by the addition of HCl and containing 100 µg of bovine serum albumin [BSA] per ml). After 3 h of cultivation, 0.5 ml of total cultures was pelleted by centrifugation (10,000 × g for 10 min at 4°C) and resuspended in 1/10th volume of Laemmli buffer (35). Two milliliters of culture supernatants was filtered with a low-protein-binding filter (HT Tuffryn; 0.45 µm; PALL Gelman Laboratory, Ann Arbor, Mich.), precipitated with 10% trichloroacetic acid, and resuspended in 1/100th volume of Laemmli buffer, and 10-µl

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Source or reference
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>		
85-10	Pepper race 2; wild type; Rif <sup>r</sup>	10
85*	Derivative of 85-10 carrying <i>hrpG</i> *	67
82-8	Pepper race 1; wild type; Rif <sup>r</sup>	40
82*	Derivative of 82-8 carrying <i>hrpG</i> *	67
85-10Δ <i>hrpF</i>	<i>hrpF</i> deletion mutant of 85-10	This study
85*Δ <i>hrpF</i>	<i>hrpF</i> deletion mutant of 85*	This study
85*Δ <i>hrcV</i>	<i>hrcV</i> deletion mutant of 85*	50
82*Δ <i>hrpF</i>	<i>hrpF</i> deletion mutant of 82*	This study
82*Δ <i>hrcV</i>	<i>hrcV</i> deletion mutant of 82*	51
<i>E. coli</i>		
DH5α	F <sup>-</sup> <i>recA hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) φ80d <i>lacZΔM15</i>	Bethesda Research Laboratories, Bethesda, Md.
DH5α λpir	F <sup>-</sup> <i>recA hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) φ80d <i>lacZΔM15</i> (λpir)	38
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS20</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal</i>	Stratagene
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	Cured of Ti plasmid, Rif <sup>r</sup>	24
Plasmids		
pBI1.4t	Binary vector, derivative of pBI121 (Clontech), p35S* with bacterial transcription terminator; Km <sup>r</sup>	39
pBluescript (II) KS	Phagemid, pUC derivative; Ap <sup>r</sup>	Stratagene
pDSK602	Contains triple <i>lacUV5</i> promoter; Sm <sup>r</sup>	43
pGEX-2TKM	p <sub>lac</sub> GST <i>lacI</i> <sup>a</sup> pBR322 <i>ori</i> ; Ap <sup>r</sup> , derivative of pGEX-2TK, polylinker of pDSK604	Stratagene (16)
pLAFR3	RK2 replicon, Mob <sup>+</sup> Tra <sup>-</sup> ; contains p <sub>lac</sub> ; Tc <sup>r</sup>	58
pUC119	ColE1 replicon; Ap <sup>r</sup>	62
pOK1	<i>sacB sacQ mobRK2 oriRK6</i> ; Km <sup>r</sup>	27
pRK2013	ColE1 replicon, TraRK <sup>+</sup> Mob <sup>+</sup> ; Km <sup>r</sup>	17
pDS300F	pDSK602 expressing AvrBs3, Flag tag	60
pVS300F	Binary vector pVB60 expressing AvrBs3, Flag tag	60
pDS356F	pDSK602 expressing AvrBs3 deleted in N-terminal 152 aa	O. Rossier and U. Bonas, unpublished data
pBI356F	Binary vector pBI1.4t carrying AvrBs3 deleted in N-terminal 152 aa	B. Szurek and U. Bonas, unpublished data
pOKΔ <i>hrpF</i>	2-kb fragment containing the <i>hrpF</i> flanking regions in pOK1	This study
pD <i>hrpF</i>	pDSK602 expressing HrpF, His <sub>6</sub> tag	This study
pL <i>hrpF</i>	pLAFR3 expressing HrpF, His <sub>6</sub> tag	This study
pD <i>hrpF</i> ΔI	pDSK602 expressing HrpF deleted in internal 460 aa, His <sub>6</sub> tag	This study
pD <i>hrpF</i> ΔN	pDSK602 expressing HrpF deleted in N-terminal 152 aa, His <sub>6</sub> tag	This study
pL <i>hrpF</i> ΔC109	pLAFR3 expressing HrpF deleted in C-terminal 109 aa	This study
pL <i>hrpF</i> ΔC249	pLAFR3 expressing HrpF deleted in C-terminal 249 aa	This study
pD <i>hrpF</i> ΔH1	pDSK602 expressing HrpF deleted in H1, His <sub>6</sub> tag	This study
pL <i>hrpF</i> ΔH2	pLAFR3 expressing HrpF deleted in H2, His <sub>6</sub> tag	This study
pD <i>hrpF</i> ΔH12	pDSK602 expressing HrpF deleted in H1 and H2, His <sub>6</sub> tag	This study
pBI <i>hrpF</i>	pBI1.4t carrying HrpF, His <sub>6</sub> tag	This study
pBI <i>S</i> PhrpF	pBI1.4t carrying HrpF containing the PR1a signal peptide, His <sub>6</sub> tag	This study
pD <i>hrpF</i> N356,	pDSK602 and pBI1.4t expressing the fusion protein between the N-terminal 387 aa of HrpF and AvrBs3Δ2	This study
pBI <i>hrpF</i> N356		
pG <i>hrpF</i> , pG <i>hrpF</i> ΔC249	pGEX-2TKM expressing HrpF and HrpFΔC249	This study
pG <i>hrpF</i> E2	pGEX-2TKM expressing HrpE2	This study

<sup>a</sup> aa, amino acids; Ap, ampicillin; Km, kanamycin; Rif, rifampin; Sm, spectinomycin; Tc, tetracycline; r, resistant.

aliquots of cell extracts and 15-μl aliquots of supernatants, adjusted for equal protein loading, were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. Secretion experiments were performed at least three times.

Protein extracts from infected plant leaves were prepared by grinding leaf disks in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)–150 mM NaCl–1 mM EDTA–1% Triton–0.1% SDS. Laemmli buffer was added, and samples containing approximately 70 μg of proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

Immunoblots were incubated with polyclonal antisera against HrpF, AvrBs3 (33), and the intracellular HrcN protein (50) to ensure that no cell lysis had occurred.

Horseshoe peroxidase-labeled goat anti-rabbit immunoglobulin antibodies (Amersham Pharmacia Biotech) were used as secondary antibodies. Reactions were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech).

**Lipid binding and planar lipid bilayer experiments.** Lipid binding experiments were performed with silica beads (TRANSIL; Nimbus Biotechnology, Leipzig,

Germany) coated with POPC [1-hexadecanoyl-2-(cis-9-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine]-POPS [1-hexadecanoyl-2-(cis-9-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphoserin, 90:10]. From 1 to 3 μg of recombinant protein or 1 ml of *X. campestris* pv. *vesicatoria* culture supernatant was incubated with 2 to 5 μl of TRANSIL beads under shaking at room temperature for 1 h in 10 mM Tris (pH 7.4)–150 mM NaCl–0.5% Tween 20 (final concentration). In control samples, proteins and culture supernatants were incubated without TRANSIL beads. The beads were precipitated by centrifugation (10,000 × g for 30 s at room temperature), and the unbound material in the supernatant was collected. For secreted proteins, unbound material was precipitated on ice with 10% trichloroacetic acid and resuspended in 1/50th volume of Laemmli buffer. TRANSIL beads were washed three times with 1 ml of 10 mM Tris (pH 7.4)–1 M NaCl and resuspended in 20 μl of Laemmli buffer. Total proteins and bound and unbound material were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie staining and/or immunoblotting.

Planar lipid bilayers (42) were prepared from a solution of 80 parts (wt/wt) 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphatidylcholine and 20 parts (wt/wt) 1,2-dio-



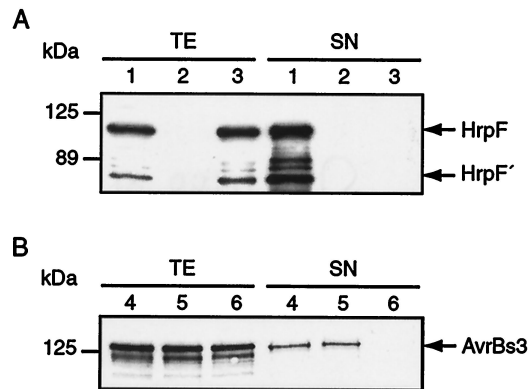


FIG. 1. Immunoblot analysis of wild-type and *hrpF* null mutant strains. (A) Detection of HrpF with a polyclonal antiserum. *X. campestris* pv. vesicatoria strains 85\* (lane 1), 85\* $\Delta$ *hrpF* (lane 2), and 85\* $\Delta$ *hrcV* (lane 3), which contains a nonpolar deletion in a conserved TTSS gene, were grown in secretion medium. Equal protein amounts of total protein extracts (TE) and culture supernatants (SN) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with the HrpF-specific antiserum (see Materials and Methods). (B) The *hrpF* null mutant secretes AvrBs3. *X. campestris* pv. vesicatoria strains 82\* (lane 4), 82\* $\Delta$ *hrpF* (lane 5), and 82\* $\Delta$ *hrcV* (lane 6) were grown in secretion medium as above. Equal protein amounts of total protein extracts (TE) and culture supernatants (SN) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with the AvrBs3-specific antiserum. The same blot was reacted with an HrcN-specific antibody to rule out that bacterial lysis had occurred (data not shown).

lecyl-glycero-3-phosphatidylethanolamine (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, Ala.) dissolved in *n*-decane (15 mg/ml). Proteins were added to the *cis*-aqueous solution of the bilayer cuvette. Electrolyte solutions contained 100 mM KCl and 10 mM HEPES, pH 7.0. Current signals were filtered at corner frequencies between 3 and 10 kHz and recorded continuously on a digital tape recorder. As a membrane amplifier, we used a BLM-120 (Bio-Logic, Claix, France) with a low-pass linearized five-pole Techebicheff filter.

## RESULTS

**Specific antiserum detects HrpF in the culture supernatant.** Recently, we showed type III-mediated secretion of HrpF, using a Flag-tagged version of the protein (50). For the analysis of native HrpF, a polyclonal antiserum was generated. In Western blot analyses, the antiserum reacted specifically with two proteins of approximately 100 and 70 kDa (Fig. 1A) in total extracts of *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85\* (85–10 carrying the *hrpG*\* mutation, which renders *hrp* gene expression constitutive [67]). Since both proteins were absent in extracts of an *hrpF* null mutant (Fig. 1A), they were *hrpF* specific, indicating that the smaller protein corresponds to a processed form of HrpF, which was designated HrpF'. The processing probably occurs at the C terminus, since an anti-His<sub>6</sub> antibody failed to detect HrpF' in protein extracts of strain 85\*(pDhrpF), which expresses a C-terminally His<sub>6</sub>-tagged HrpF protein (data not shown). In secretion experiments, HrpF and HrpF' were detected in the supernatant of strain 85\* but not of 85\* $\Delta$ *hrcV*, a TTSS mutant (Fig. 1A). Depending on the experiment and protein amounts loaded, the antiserum also detected two additional proteins which are probably minor degradation prod-

ucts of HrpF. Similar results were obtained for strain 82\* and derivatives (data not shown).

**Complementation analyses of *hrpF* deletion derivatives.** Previous genetic analysis of *hrpF*, which is the only gene in the operon, was based on transposon insertion mutants (26, 50). For functional studies of the HrpF protein, we deleted *hrpF* from the genome of *X. campestris* pv. vesicatoria strains 85–10, 85\*, and 82\*. As expected, *hrpF* null mutants displayed a typical *hrp* phenotype. When inoculated into the plant, strains 85–10 $\Delta$ *hrpF* and 85\* $\Delta$ *hrpF* failed to grow in planta, and they were unable to cause disease symptoms in susceptible pepper ECW plants or to induce the HR in resistant ECW-10R plants, which carry the *Bs1* gene.

The *Bs1* resistance gene determines recognition of AvrBs1, which is expressed in strains 85–10 and 85\* (40). Similar results were obtained when strain 82\* $\Delta$ *hrpF* was inoculated into susceptible and resistant plants. *X. campestris* pv. vesicatoria strain 82\* expresses the effector protein AvrBs3 (10) and induces the HR on ECW-30R plants, which carry the *Bs3* resistance gene. As shown in Fig. 1B, AvrBs3 was detected in Western blot analysis of culture supernatants of strain 82\* $\Delta$ *hrpF*. Thus, in contrast to the *hrcV* TTSS mutant, *hrpF* null mutants were not impaired in type III secretion.

In order to identify functionally important regions in HrpF, several deletion derivatives (Fig. 2) were constructed and expressed in strains 85–10 $\Delta$ *hrpF* and 85\* $\Delta$ *hrpF* from broad-host-range plasmids. In plant infection tests, the mutant phenotype of both strains could be complemented by constructs expressing full-length HrpF or HrpF $\Delta$ C109, but not by constructs expressing HrpF $\Delta$ N and deletion derivatives lacking hydrophobic region H1 or H2 or both (Fig. 2). Interestingly, expression of *hrpF* $\Delta$ I, which is deleted in the internal region, resulted in partial complementation of strain 85\* $\Delta$ *hrpF*, i.e., delayed disease symptoms in pepper cultivar ECW and a partial hypersensitive reaction in ECW-10R plants (Fig. 2). In immunoblot analyses, HrpF $\Delta$ I was not recognized by the HrpF-specific antiserum and could only be detected by an anti-His<sub>6</sub> antibody in protein extracts of high-cell-density cultures (data not shown), indicating that the protein is unstable. In contrast, N- and C-terminal deletion derivatives were detected by the polyclonal HrpF-specific antibody, albeit in different amounts (Fig. 3).

The inability of *hrpF* deletion derivatives to complement an *hrpF* null mutant could be due to the lack of secretion of the corresponding gene products. However, all C-terminal HrpF deletion derivatives were secreted by the TTSS *in vitro* (Fig. 3). In contrast, the N-terminal deletion derivative HrpF $\Delta$ N was not detected in the culture supernatant.

**The N terminus of HrpF does not target the AvrBs3 protein into the host cell.** We then addressed the question of whether HrpF is not only secreted *in vitro* but could possibly be translocated into the plant cell, as has been observed for putative translocon proteins of animal-pathogenic bacteria (13). For this, we used an N-terminal deletion derivative (AvrBs3 $\Delta$ 2) of the type III effector AvrBs3 as a reporter. AvrBs3 $\Delta$ 2 is not secreted by *X. campestris* pv. vesicatoria but induces a specific hypersensitive reaction when fused with a functional translocation domain and when the gene is expressed in the resistant plant (E. Huguet, O. Rossier, and U. Bonas, unpublished data). Here, we fused the first 386 amino acids of HrpF to

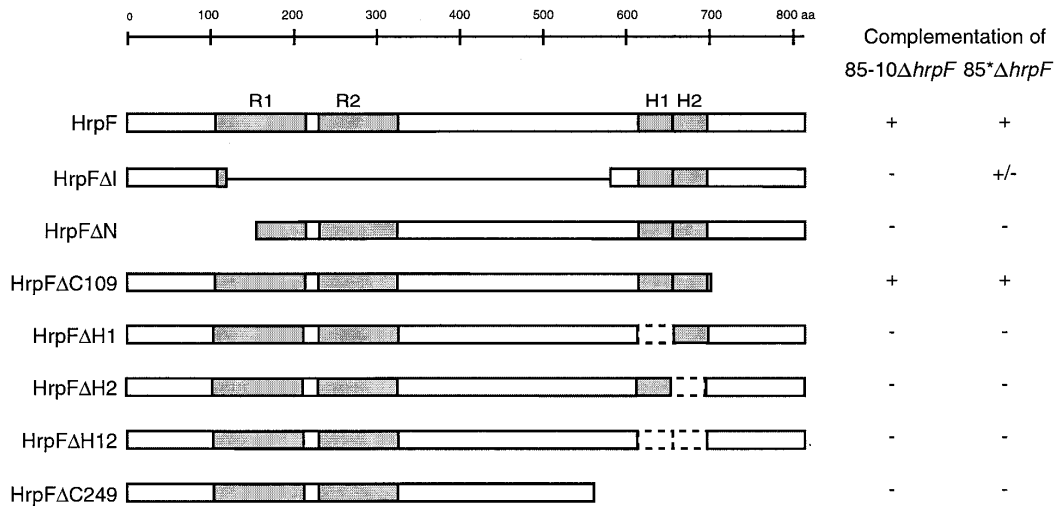


FIG. 2. Analysis of HrpF and different HrpF deletion constructs. The HrpF protein (806 amino acids) contains two repeats (R1 and R2) and two hydrophobic segments (H1 and H2). HrpF deletion derivatives were generated as described in Materials and Methods. Construct numbers refer to the numbers of deleted amino acids. Except for HrpFΔC109 and HrpFΔC249, all HrpF derivatives contain a C-terminal His<sub>6</sub> tag (for details see Materials and Methods and Table 1). The ability of HrpF derivatives to complement an *X. campestris* pv. vesicatoria *hrpF* null mutant for disease symptom formation and HR induction is indicated on the right. Strains 85-10ΔhrpF and 85\*ΔhrpF harboring the different deletion constructs were inoculated at a bacterial density of  $4 \times 10^8$  CFU/ml into the intercellular spaces of leaves of pepper plants ECW-10R and ECW. Plant reactions were scored over a period of 1 to 3 days. +, disease in susceptible plants and HR in resistant plants; -, no disease symptoms, no HR; +/-, intermediate phenotype: delayed disease symptoms, partial HR.

AvrBs3Δ2 and introduced the fusion construct (pDhrpFN356) into strain 85\*.

In total protein extracts, the HrpF-AvrBs3Δ2 protein could be detected by both the AvrBs3-specific (Fig. 4) and the HrpF-specific (data not shown) antiserum. The presence of smaller proteins which are detected by the AvrBs3-specific antibody might be due to protein instability (Fig. 4). In secretion experiments, the HrpF-AvrBs3Δ2 construct was detected in culture supernatants of strain 85\* but not of the TTSS mutant 85\*ΔhrcV, indicating the presence of a type III secretion signal in the N terminus of HrpF. This is in agreement with the finding that deletion of the N terminus abolished type III secretion of HrpF (Fig. 3). In plant inoculation experiments,

strain 85\*(pDhrpFN356) did not induce the HR in pepper genotype ECW-30R (Table 2).

To test whether the fusion of the HrpF-N terminus to AvrBs3Δ2 had a deleterious effect on recognition by *Bs3*, we expressed the fusion protein in ECW-30R, using pBIhrpFN356 and *Agrobacterium*-mediated gene transfer. In this case, the HrpF-AvrBs3Δ2 construct induced the HR in ECW-30R, as did full-length AvrBs3 and AvrBs3Δ2 (Table 2), demonstrating that the fusion protein is recognized by *Bs3* inside the plant cell. Taken together, these data show that the HrpF-AvrBs3Δ2 fusion protein was not delivered into the plant cell when expressed in *X. campestris* pv. vesicatoria, although it was secreted by the TTSS in vitro.

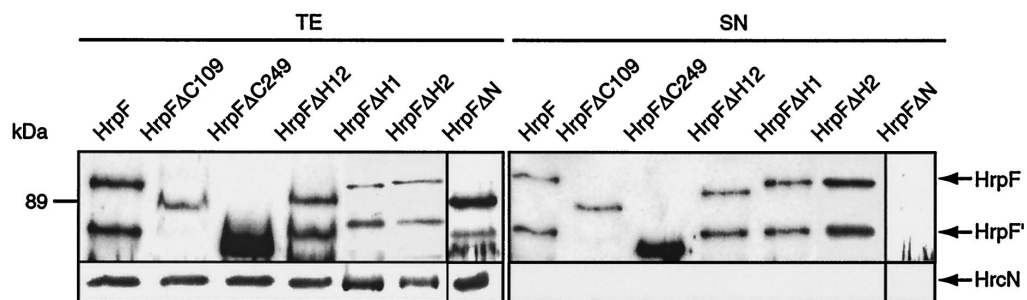


FIG. 3. Secretion analysis of HrpF deletion constructs. *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85\*ΔhrpF expressing HrpF or a mutant derivative was grown in secretion medium. Equal protein amounts of total protein extracts (TE) and culture supernatants (SN) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with antibodies directed against HrpF and the intracellular HrcN protein, respectively.

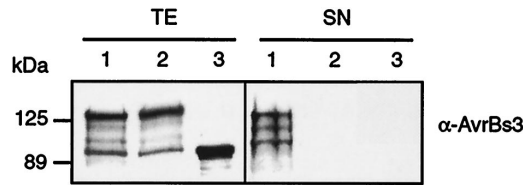


FIG. 4. The N terminus of HrpF contains a type III secretion signal. *X. campestris* pv. vesicatoria strains (lane 1) 85\* (pDhrpFN356), (lane 2) 85\* $\Delta$ hrpV (pDhrpFN356), and (lane 3) 85\* (pDS356F), expressing the HrpF-AvrBs3 $\Delta$ 2 fusion protein (lanes 1 and 2) and AvrBs3 $\Delta$ 2 (lane 3), respectively, were grown in secretion medium. Equal amounts of total protein extracts (TE) and culture supernatants (SN) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using the AvrBs3-specific antiserum.

In additional experiments, we investigated a putative function of HrpF inside the plant cell by transient expression of HrpF in planta. When *A. tumefaciens* strain GV3101 (pBIHrpF) was inoculated into ECW-30R plants, no obvious plant reaction was observed (Table 2), although the protein was expressed, as shown by immunoblot analyses (data not shown). Furthermore, transiently expressed HrpF could not transcomplement an *X. campestris* pv. vesicatoria *hrpF* null mutant strain for disease and HR induction in ECW and ECW-10R, respectively. Since fusion of HrpF to the signal peptide sequence of the tobacco PR1a gene (14) rendered the protein unstable (data not shown), transcomplementation experiments with in planta-expressed HrpF targeted to the apoplast could not be performed.

**Lipid-binding activity of HrpF.** Most putative type III translocon proteins identified so far contain predicted transmembrane regions and have been shown to associate with membranes (7, 20, 21, 23, 28, 52, 59, 64). Considering the presence of two putative transmembrane segments in HrpF as well as its proposed role during effector protein translocation, we investigated the lipid-binding activity of the protein. For this, we used a lipid bilayer system (TRANSIL beads; Nimbus Biotechnology), which consists of silica particles coated with a single phospholipid bilayer, noncovalently bound to the matrix. The bilayer contained negatively charged phospholipids which are also present in plant plasma membranes. Beads were incubated with purified recombinant HrpF protein (see Materials and Methods), and the lipid-bound and unbound material was analyzed by SDS-PAGE and Coomassie staining or immunoblotting. To remove proteins that were associated with the lipid

bilayer via ionic interactions, beads were washed under high-salt conditions (18).

As shown in Fig. 5A, recombinant HrpF associated with the lipid matrix. In contrast, BSA, used as a negative control, was only present in the supernatant. Furthermore, HrpF was not detected in the pellet when proteins were incubated without beads, ruling out that detection was due to protein precipitation. The lipid-binding activity of HrpF could be confirmed for the native protein expressed in *X. campestris* pv. vesicatoria. For this, TRANSIL beads were incubated with culture supernatants of strain 82\*. While secreted HrpF bound to the lipid matrix, the truncated HrpF' protein (see above) was only detected in the unbound material (Fig. 5B). The comparison of HrpF present in total supernatants and unbound and bound material indicated that approximately 40% of secreted HrpF was bound to the TRANSIL beads (Fig. 5C).

In order to identify regions in HrpF which are important for membrane association, we tested HrpF deletion derivatives for their binding to TRANSIL beads. Deletion of the N terminus and of both hydrophobic segments did not affect the lipid-binding ability of HrpF (HrpFAH12 and HrpFAN, Fig. 5B). In contrast, HrpF $\Delta$ C249, lacking a large C-terminal protein region, was not detected in the lipid-bound material (Fig. 5B). This is in agreement with the finding that HrpF', which is similar in size to HrpF $\Delta$ C249 (see Fig. 3), did not bind to the lipid matrix.

**HrpF-dependent pore formation.** The lipid-binding activity of HrpF prompted us to investigate whether HrpF would form ion-conducting pores in a planar lipid bilayer system. When recombinant HrpF (see Materials and Methods) was added to the *cis* compartment of the artificial membrane, the conductivity across the bilayer increased when voltage was applied. We observed changes of open and closed channel states as well as prolonged phases of both states (Fig. 6A). HrpF-dependent pore formation did not alter significantly when different membrane potentials were applied (from  $-100$  to  $+100$  mV; data not shown). Surprisingly, the C-terminally truncated form of HrpF, HrpF $\Delta$ C249, induced channels with similar properties (data not shown). To rule out that the channel formation was due to *E. coli* proteins present in the HrpF preparation, we used HrpE2 as a control, which was isolated similarly to HrpF (see Materials and Methods). HrpE2 is an 18.4-kDa acidic protein from *X. campestris* pv. vesicatoria and is predicted to be a soluble protein (U. Bonas, unpublished data). When applied to the artificial membrane, recombinant HrpE2 did not induce any current fluctuations (Fig. 6B).

## DISCUSSION

In this study, we investigated functionally important regions and membrane-binding activity of the HrpF protein from the plant pathogen *X. campestris* pv. vesicatoria. Our data strongly support the hypothesis that HrpF plays a role in protein translocation. So far, HrpF is the only known putative type III translocon protein of a plant-pathogenic bacterium.

Analyses of *hrpF* null mutant strains revealed that HrpF is essential for pathogenicity but dispensable for type III-mediated protein secretion in vitro. This is in agreement with results based on the analyses of *hrpF* transposon insertion mutants (50). An interesting feature of the HrpF protein is the presence

TABLE 2. Plant reactions to AvrBs3 and HrpF derivatives<sup>a</sup>

Protein expressed	Phenotype on pepper ECW-30R	
	Delivery by <i>X. campestris</i> pv. vesicatoria 85*	Expression in planta via <i>A. tumefaciens</i> GV3101
AvrBs3	HR	HR
AvrBs3 $\Delta$ 2	+	HR
HrpF-AvrBs3 fusion	+	HR
HrpF	+	-

<sup>a</sup> Symptoms observed 3 days after inoculation at a bacterial density of  $4 \times 10^8$  CFU/ml (delivery) or  $5 \times 10^8$  CFU/ml (in planta). HR, hypersensitive response. +, disease symptoms; -, no phenotypic reaction.

VOL. 184, 2002

TYPE III TRANSLOCON PROTEIN 2395

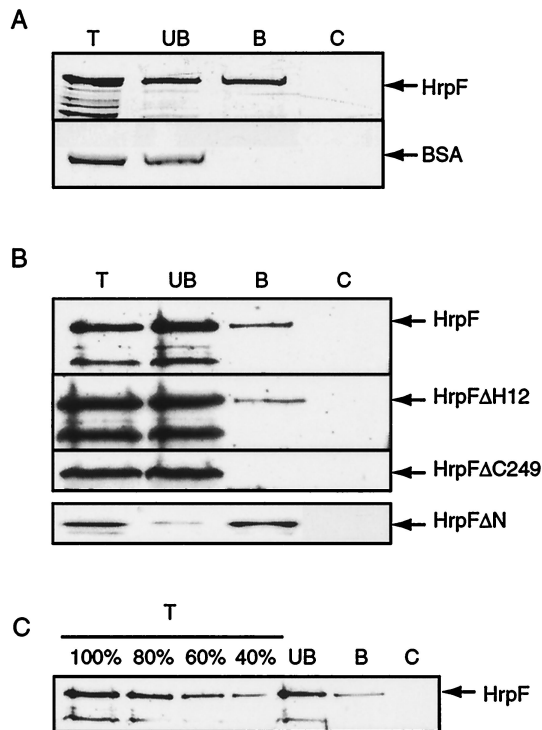


FIG. 5. HrpF binds to lipid bilayers. (A) TRANSIL beads (2  $\mu$ l) coated with POPC/POPS (90:10) were incubated with 3  $\mu$ g of recombinant HrpF and BSA. After centrifugation and stringent washing of the beads, 20% of total proteins (T) and unbound (UB) and lipid-bound (B) material were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie staining. As a negative control (C), proteins were incubated without TRANSIL beads, and after centrifugation and stringent washing, samples corresponding to the lipid-bound material were analyzed as above. (B) *X. campestris* pv. vesicatoria strains 82\* (top) and 82\* $\Delta$ hrpF carrying plasmids pDhrpFΔH12 and pLhrpFΔC249 were grown in secretion medium. Culture supernatants were incubated with 4  $\mu$ l of TRANSIL beads as above. Total culture supernatants (T) as well as unbound (UB) and lipid-bound (B) material were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with the HrpF-specific antiserum. HrpFΔN (bottom), which is not secreted in vitro, was analyzed as a recombinant protein; 0.5  $\mu$ g of recombinant HrpFΔN was incubated with TRANSIL as described for A, and 20% of total protein and unbound and lipid-bound material was analyzed by immunoblotting with the anti-HrpF antibody. As a negative control, culture supernatants as well as recombinant HrpFΔN were incubated without TRANSIL (C) and analyzed as above. (C) Quantification of membrane-bound HrpF. Culture supernatants of *X. campestris* pv. vesicatoria strain 82\* were incubated with 4  $\mu$ l of TRANSIL beads and analyzed as described for B. Unbound (UB) and bound (B) material as well as samples incubated without TRANSIL (C) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with the HrpF-specific antiserum. As reference samples, 100, 80, 60, and 40% of total supernatant (T) were loaded.

of two imperfect repeats in the N terminus. Deletion studies showed that the presence of the second repeat is sufficient for protein function (26). Here, complementation experiments demonstrated that the region C-terminal to the hydrophobic segments is also not required. In contrast, the hydrophobic

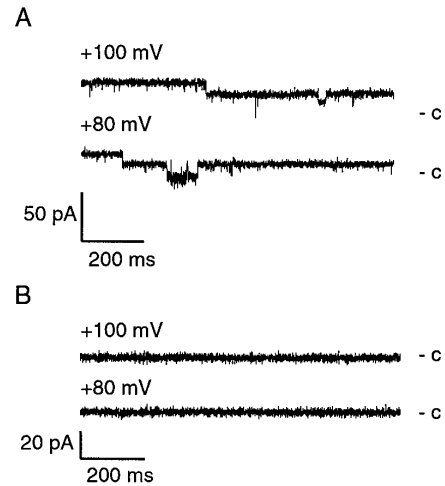


FIG. 6. HrpF-dependent pore formation in planar lipid bilayers. (A) HrpF induces current fluctuations in planar lipid bilayers. Recombinant HrpF (0.5  $\mu$ g/ml, purified as described in Materials and Methods) was added to the *cis*-aqueous solution of the lipid bilayer cuvette, and current traces were recorded. c, closed state. (B) HrpE2 shows no pore-forming properties in lipid bilayer experiments. HrpE2 was tested as a control protein. The experimental conditions were the same as in A.

segments are essential for HrpF function. Interestingly, the internal protein region appears to be less important, since the *hrpF* null mutant could be partially complemented by HrpFΔI. However, partial complementation was only observed in an *hrpG*\* background, which leads to a more efficient expression of the TTSS. Lack of complementation of the *hrpF* null mutant by HrpFΔN is probably due to the inability of the bacteria to secrete this derivative. This indicates that HrpF is targeted for type III secretion by its N terminus and that secretion is essential for HrpF function.

The hypothesis of a secretion signal in the N terminus is supported by the finding that a fusion protein between the N-terminal 386 amino acids of HrpF and AvrBs3Δ2 is secreted in vitro. AvrBs3, like other type III effectors, is probably translocated into the plant cell, because in planta expression of the gene triggers the HR (60). However, bacteria expressing the HrpF-AvrBs3 fusion protein did not induce the AvrBs3-specific HR, indicating that the N terminus of HrpF does not contain a translocation signal. HrpF might have to be delivered from outside of the plant cell, a hypothesis which is supported by the inability of in planta-expressed HrpF to transcomplement the phenotype of an *hrpF* null mutant.

Taken together, these data support the hypothesis that HrpF acts at the bacterial-plant interface as a translocon protein. So far, putative components of the predicted type III translocon have only been identified in animal-pathogenic bacteria, where they presumably form a transmembrane channel. In *Yersinia*, *Shigella*, and enteropathogenic *E. coli* spp., the existence of a translocation channel has been proposed based on their ability to induce the lysis of erythrocytes and macrophages (7, 20, 44, 65). Furthermore, fusion of planar lipid bilayers with liposomes which had been incubated with secreted Yops induced



current fluxes, indicating the formation of transmembrane pores (59). Lytic activity of *Yersinia* requires at least three proteins, YopB, YopD, and LcrV (20, 23, 44). Recent demonstration of a pore-forming activity of purified LcrV suggested that LcrV is the channel size-determining component of the type III translocation channel, which is stabilized by YopB and YopD (23).

The putative translocon proteins from animal-pathogenic bacteria are not conserved among different species, but some of them have structural similarities, such as putative transmembrane regions. The presence of two predicted transmembrane segments in HrpF (26) prompted us to investigate its lipid-binding activity. A tendency of HrpF to bind to membranes had already been indicated by fractionation studies (26). From 30 to 40% of a Flag-tagged HrpF protein was localized to the inner membrane of *X. campestris* pv. *vesicatoria* under nonsecreting conditions. Here, using the TRANSIL system which provides a highly mobile artificial lipid bilayer, mimicking diffusion and other surface properties of natural lipid bilayers (54), we could demonstrate lipid-binding activity of recombinant as well as native secreted HrpF. The fact that high-salt washes did not remove HrpF from the lipid matrix is interpreted as membrane insertion rather than membrane binding.

Lipid-binding in vitro using the TRANSIL system was independent of the presence of the hydrophobic segments in HrpF, indicating that HrpF interacts with lipids via nonhydrophobic regions, presumably in the C terminus. This was surprising because the hydrophobic segments have been speculated to act as a transmembrane anchor. So far, except for IpaC from *Shigella flexneri* (46), it has not been investigated whether predicted transmembrane regions are essential for lipid binding in other putative translocon proteins. Interestingly, using the TM-PRED program ([http://www.ch.embnet.org/software/TM-PRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TM-PRED_form.html)), no transmembrane regions are predicted for LcrV from *Yersinia* spp. and PerV from *Pseudomonas aeruginosa*, which have both been demonstrated to form transmembrane channels (23).

It is tempting to speculate that these proteins span the membrane via  $\beta$ -barrel structures.  $\beta$ -Barrel structures are typical of many bacterial outer membrane proteins (34) and are also found in several bacterial toxins which assemble to oligomeric channels in the eukaryotic host cell membrane. The presence of  $\beta$ -barrels in putative translocon proteins of the TTSS has not been investigated yet.

To address the question of whether HrpF forms transmembrane channels, we used a planar lipid bilayer system. Indeed, recombinant HrpF induced altered current fluxes, indicative of pore formation. Unexpectedly, this was also observed for an HrpF derivative lacking the C terminus, which was shown to be essential for lipid binding in the TRANSIL system. We speculate that this derivative has a residual in vitro lipid-binding activity which can only be detected by the very sensitive planar lipid bilayer assays. Similar findings have been reported for LcrV from *Yersinia enterocolitica*: deletion of a C-terminal protein region, which was demonstrated to be essential for Yop delivery as well as for induction of erythrocyte lysis, did not alter its pore-forming activity (23).

It has to be kept in mind that artificial lipid bilayers have smooth surfaces without any exposed structures, like lipid-bound polysaccharides or membrane proteins, which could

influence the insertion of proteins in natural membranes. Here, we show that the C terminus of HrpF from *X. campestris* pv. *vesicatoria*, which is dispensable for pore formation in vitro, is essential for its biological function. It is conceivable that this region is required for efficient protein translocation in vivo, stabilizing the pore or interacting with accessory proteins. Whether HrpF alone is sufficient to form the translocation channel in vivo remains to be investigated.

In animal-pathogenic bacteria, the observation of protein-protein interactions between putative translocon components suggests that the translocon is a heterogenic protein complex (23). Future experimental approaches will therefore focus on the identification of HrpF's interaction partners.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Angelika Landgraf for technical assistance, Laurent Noël for helpful suggestions, and O. Rossier for construction of pDS356F.

This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to U.B. (BO 790/7-1) and a fellowship from the Verband der Chemischen Industrie to D.B.

#### REFERENCES

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.). 1996. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- Ballvora, A., M. Pierre, G. van den Ackerveken, S. Schornack, O. Rossier, M. Ganai, T. Lahaye, and U. Bonas. 2001. Genetic mapping and functional analysis of the tomato *Bs4* locus governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AvrBs4 protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:629–638.
- 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.
- Bogdanove, A., S. V. Beer, U. Bonas, C. A. Boucher, A. Collmer, D. L. Coplin, G. R. Cornelis, H.-C. Huang, S. W. Hutcheson, N. J. Panopoulos, and F. Van Gijsegem. 1996. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* **20**:681–683.
- 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.
- 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.
- Bonas, U., and G. Van den Ackerveken. 1999. Gene-for-gene interactions: bacterial avirulence proteins specify plant disease resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:94–98.
- Cheng, L. W., D. M. Anderson, and O. Schneewind. 1997. Two independent type III secretion mechanisms for YopE in *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **24**:757–765.
- Cornelis, G. R., and F. Van Gijsegem. 2000. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:735–774.
- Cornelissen, B. J., J. Horowitz, J. A. van Kan, R. B. Goldberg, and J. F. Bol. 1987. Structure of tobacco genes encoding pathogenesis-related proteins from the PR-1 group. *Nucleic Acids Res.* **15**:6799–6811.
- 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.
- 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. **Figurski, D., 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.
18. **Finberg, K. E., T. R. Muth, S. P. Young, J. B. Maken, S. M. Heitritter, A. N. Binns, and L. M. Banta.** 1995. Interactions of VirB9, -10, and -11 with the membrane fraction of *Agrobacterium tumefaciens*: solubility studies provide evidence for tight associations. J. Bacteriol. **177**:4881–4889.
19. **Håkansson, S., E. E. Galvov, R. Rosqvist, and H. Wolf-Watz.** 1996. The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. Mol. Microbiol. **20**:593–603.
20. **Håkansson, S., K. Schesser, C. Persson, E. E. Galvov, R. Rosqvist, F. Hombler, and H. Wolf-Watz.** 1996. The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. EMBO J. **15**:5812–5823.
21. **Hayward, R. D., E. J. McGhie, and V. Koronakis.** 2000. Membrane fusion activity of purified SipB, a *Salmonella* surface protein essential for mammalian cell invasion. Mol. Microbiol. **37**:727–739.
22. **He, S. Y.** 1998. Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. **36**:363–392.
23. **Holmström, A., J. Olsson, P. Cherepanov, E. Maier, R. Nordfelth, J. Petersson, 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.
24. **Holsters, M., B. Silva, F. Van Vliet, C. Genetello, M. De Block, P. Dhase, A. Depicker, D. Inze, G. Engler, R. Villarroel, et al.** 1980. The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTIC58. Plasmid **3**:212–230.
25. **Hueck, C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**:379–433.
26. **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.
27. **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.
28. **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.
29. **Jin, Q., and S. Y. He.** 2001. Role of the Hrp pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. Science **294**:2556–2558.
30. **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.
31. **Keen, N. T.** 1990. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. Annu. Rev. Genet. **24**:447–463.
32. **Kjemtrup, S., Z. Nimchuk, and J. L. Dangl.** 2000. Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. Curr. Opin. Microbiol. **3**:73–78.
33. **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.
34. **Koebnik, R., K. P. Locher, and P. Van Gelder.** 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. Mol. Microbiol. **37**:239–253.
35. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680–685.
36. **Lahaye, T., and U. Bonas.** 2001. Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. Trends Plant Sci. **6**:479–485.
37. **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**:520–532.
38. **Ménard, R., P. J. Sansonetti, and C. Parsot.** 1993. Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. J. Bacteriol. **175**:5899–5906.
39. **Mindrinis, M., F. Katagiri, G. L. Yu, and F. M. Ausubel.** 1994. The *A. thaliana* disease resistance gene *RPS2* encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. Cell **78**:1089–1099.
40. **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.
41. **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.
42. **Mueller, P., D. O. Rudin, H. Tien, and W. C. Wescott.** 1962. Reconstitution of a cell membrane structure *in vitro* and its transformation into an excitable system. Nature **194**:979–980.
43. **Murillo, J., H. Shen, D. Gerhold, A. Sharma, D. A. Cooksey, and N. T. Keen.** 1994. Characterization of pPT23B, the plasmid involved in syringolide production by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* PT23. Plasmid **31**:275–287.
44. **Neyt, C., and G. R. Cornelis.** 1999. Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. Mol. Microbiol. **33**:971–981.
45. **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.
46. **Picking, W. L., L. Coye, J. C. Osiecki, A. Barnoski Serfis, E. Schaper, and W. D. Picking.** 2001. Identification of functional regions within invasion plasmid antigen C (IpaC) of *Shigella flexneri*. Mol. Microbiol. **39**:100–111.
47. **Roine, E., W. S. Wei, J. Yuan, E. L. Nurmiaho-Lassila, N. Kalkkinen, M. Romantschuk, and S. Y. He.** 1997. Hrp pilus: A *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**:3459–3464.
48. **Romantschuk, M., E. Roine, and S. Taira.** 2001. Hrp pilus-reaching through the plant cell wall. Eur. J. Plant Pathol. **107**:153–160.
49. **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.
50. **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.
51. **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.
52. **Scherer, C. A., E. Cooper, and S. I. Miller.** 2000. The *Salmonella* type III secretion translocon protein SspC is inserted into the epithelial cell plasma membrane upon infection. Mol. Microbiol. **37**:1133–1145.
53. **Schesser, K., E. Frithz-Lindsten, and H. Wolf-Watz.** 1996. Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes. J. Bacteriol. **178**:7227–7233.
54. **Schmitz, A. A., E. Schleiff, C. Rohring, A. Loidl-Stahlhofen, and G. Vergeres.** 1999. Interactions of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS)-related protein with a novel solid-supported lipid membrane system (TRANSIL). Anal. Biochem. **268**:343–353.
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. **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 *cyoA* gene fusion approach. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**:11988–11991.
57. **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.
58. **Staskawicz, B. J., D. Dahlbeck, N. Keen, and C. Napoli.** 1987. Molecular characterization of cloned avirulence genes from *race0* and *race1* of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. J. Bacteriol. **169**:5789–5794.
59. **Tardy, F., F. Hombler, C. Neyt, R. Wattiez, G. R. Cornelis, J. M. Ruyschaert, and V. Cabiaux.** 1999. *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. EMBO J. **18**:6793–6799.
60. **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.
61. **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.
62. **Vieira, J., and J. Messing.** 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. Methods Enzymol. **153**:3–11.
63. **Viprey, V., A. Del Greco, W. Golinowski, W. J. Broughton, and X. Perret.** 1998. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. Mol. Microbiol. **28**:1381–1389.
64. **Wachter, C., C. Beinke, M. Mattes, and M. A. Schmidt.** 1999. Insertion of EspD into epithelial target cell membranes by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **31**:1695–1707.
65. **Warawa, J., B. B. Finlay, and B. Kenny.** 1999. Type III secretion-dependent hemolytic activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **67**:5538–5540.

2398 BÜTTNER ET AL.

J. BACTERIOL.

66. **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.
67. **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.
68. **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.
69. **White, F. F., B. Yang, and L. B. Johnson.** 2000. Prospects for understanding avirulence gene function. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**:291–298.

### 2.1.2 Ergänzende Ergebnisse

Die im vorangegangenen Artikel vorgestellten Daten deuten darauf hin, daß HrpF während der Interaktion von *X. campestris* pv. *vesicatoria* mit der Wirtspflanze in die pflanzliche Zellmembran inserieren könnte. Bislang gibt es keinerlei Hinweise darauf, daß HrpF in das Wirtszellcytosol transloziert wird. Die Signale, die die Typ-III-abhängige Translokation von Proteinen ermöglichen, sind vermutlich innerhalb der N-terminalen 50-100 Aminosäuren lokalisiert (Sory *et al.*, 1995; Schesser *et al.*, 1996; Mudgett *et al.*, 2000). Ein Fusionsprotein zwischen den N-terminalen 387 Aminosäuren von HrpF und einem N-terminalen Deletionsderivat von AvrBs3 (AvrBs3 $\Delta$ 2) wird jedoch nicht in die Pflanzenzelle transloziert.

#### 2.1.2.1 Konstruktion und Analyse von HrpF<sub>(1-200)</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2

Um die unter 2.1.1 beschriebenen Analysen des Fusionsproteins HrpF<sub>(1-387)</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 zu überprüfen, wurde ein weiteres HrpF-AvrBs3 $\Delta$ 2-Konstrukt hergestellt und analysiert. Hierzu wurden die ersten 600 bp von *hrpF* unter Verwendung der Primer HrpF-For (5'-TACTGAATTCGCCTCTATGTCGCTC-3') und HrpF(200)-Rev (5'-CTGTCGAATTCGATCTTGCCGCCGCACTTG-3') amplifiziert und mittels der in den Primersequenzen enthaltenen *Eco*RI-Schnittstellen (unterstrichen) in pDS356F kloniert. pDS356F exprimiert AvrBs3 $\Delta$ 2 unter der Kontrolle des lac-Promotors (s. 2.1.1; O. Rossier und U. Bonas, unveröffentlichte Daten). Das resultierende Konstrukt pDhrpF<sub>(1-200)</sub>356 wurde anschließend in die *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme 85\* und 85\* $\Delta$ *hrcV* konjugiert.

Stamm 85\* enthält *hrpG*\*, das die konstitutive Expression der *hrp*-Gene ermöglicht (Wengelnik *et al.*, 1999). Die Deletion von *hrcV* in Stamm 85\* (85\* $\Delta$ *hrcV*) führt zum Verlust der Typ-III-abhängigen Proteinsekretion *in vitro* (Rossier *et al.*, 2000).



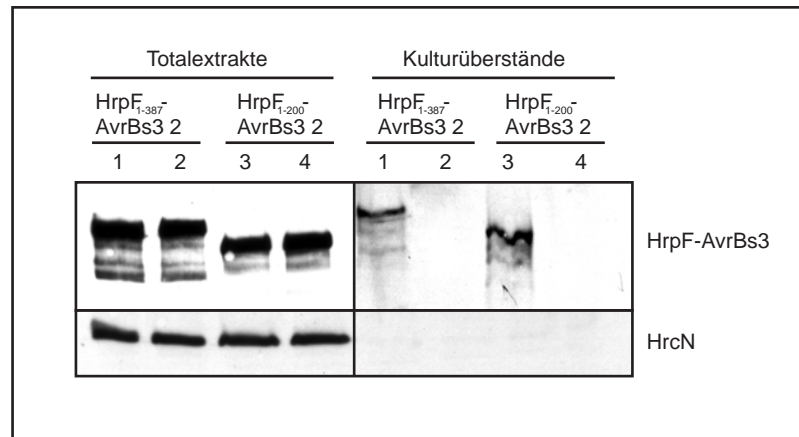


Abbildung 7: Typ-III-abhängige Sekretion von HrpF-AvrBs3 $\Delta$ 2-Fusionsproteinen in *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

*X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stämme (1) 85\*(pDhrpF<sub>(1-387)</sub>356), (2) 85\* $\Delta$ *hrcV* (pDhrpF<sub>(1-387)</sub>356), (3) 85\*(pDhrpF<sub>(1-200)</sub>356) und (4) 85\* $\Delta$ *hrcV*(pDhrpF<sub>(1-200)</sub>356) wurden in Sekretionsmedium inkubiert. Gleiche Proteinmengen von Totalextrakten und Kulturüberständen wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotanalysen unter Verwendung des AvrBs3-spezifischen Antiserums (Knoop *et al.*, 1991) analysiert. Um auszuschließen, daß Zellysis stattgefunden hat, wurden die Membranen mit dem Antiserum gegen das intrazelluläre HrcN-Protein inkubiert (Rossier *et al.*, 2000). pDhrpF<sub>(1-387)</sub>356 wurde unter 2.1.1 als pDhrpFN356 bezeichnet. Der Übersichtlichkeit halber ist hier jedoch die Anzahl der fusionierten Aminosäuren von HrpF angegeben.

Für die Analyse der Typ-III-abhängigen Sekretion des Fusionsproteins wurden die Stämme 85\*(pDhrpF<sub>(1-200)</sub>356) und 85\* $\Delta$ *hrcV*(pDhrpF<sub>(1-200)</sub>356) in Sekretionsmedium inkubiert. Westernblot-Analysen von zellulären Proteinextrakten und Kulturüberständen zeigten, daß HrpF<sub>(1-200)</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 stabil exprimiert und Typ-III-abhängig sekretiert wird (Abb. 7). Nach Inokulation von Stamm 85\*(pDhrpF<sub>(1-200)</sub>356) in Paprikakultivar ECW-30R, welches das zu *avrBs3* korrespondierende Resistenzgen *Bs3* besitzt, entstanden jedoch typische Krankheitssymptome und keine HR (Tab. 4).

Somit wurde auch hier im N-Terminus von HrpF ein Sekretionssignal, jedoch kein funktionelles Translokationssignal nachgewiesen. Die Möglichkeit, daß dennoch ein Translokationssignal vorhanden ist, dieses jedoch aufgrund der Struktur des Fusionsproteins nicht vom TTSS erkannt wird, kann aufgrund der übereinstimmenden Ergebnisse der Analysen von zwei unabhängigen HrpF-AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporterkonstrukten als gering eingestuft werden.

Tabelle 4: Pflanzliche Reaktionen auf HrpF-AvrBs3-Konstrukte.

Protein <sup>a</sup>	Phänotypen auf Paprikakultivar ECW-30R <sup>b</sup>
AvrBs3	HR
HrpF <sub>(1-387)</sub> -AvrBs3Δ2	WL
HrpF <sub>(1-200)</sub> -AvrBs3Δ2	WL

<sup>a</sup> Proteine wurden in *X. campestris* pv. *vesicatoria*-Stamm 85\* exprimiert.

<sup>b</sup> Phänotypen wurden drei Tage nach Inokulation mit einer bakteriellen Suspension von  $4 \times 10^8$  CFU/ml analysiert. HR, hypersensitive Reaktion; WL, wässrige Läsionen.

### 2.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

HrpF ist ein Substrat des TTSS von *X. campestris* pv. *vesicatoria* und essentiell für die Interaktion mit suszeptiblen und resistenten Wirtspflanzen. Die Hypothese, daß HrpF an der Typ-III-abhängigen Proteintranslokation von Effektorproteinen beteiligt ist, fand in den hier vorgestellten experimentellen Daten eine erste Bestätigung.

Die Herstellung eines polyklonalen HrpF-spezifischen Antiserums ermöglichte den Nachweis und die Analyse von HrpF sowie verschiedener Deletionsderivate in Zellextrakten und Kulturüberständen von *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Durch phänotypische Komplementationsanalysen konnten der C-terminale hydrophobe Aminosäurebereich von HrpF sowie die N-terminale Proteinregion als funktionell wichtige Regionen identifiziert werden. Die Deletion der N-terminalen Region führte zum Verlust der Typ-III-abhängigen Sekretion von HrpF. Die Analysen von HrpF-AvrBs3Δ2-Reporterkonstrukten zeigten, daß im N-Terminus von HrpF zwar ein Typ-III-Sekretionssignal, jedoch kein funktionelles Translokationssignal vorhanden ist.

Die Ergebnisse von Membraninsertionsstudien weisen darauf hin, daß HrpF während der Interaktion von *X. campestris* pv. *vesicatoria* mit der Wirtspflanze in die pflanzliche Zellmembran inserieren könnte. So konnte eine Interaktion von nativem, sekretierten HrpF-Protein mit künstlichen Membranen gezeigt werden. Dabei ergab die Analyse verschiedener Deletionsderivate, daß die C-terminale, nicht jedoch die hydrophobe Proteinregion für die Membranassoziation von HrpF essentiell ist. In weiteren Experimenten mit künstlichen Lipiddoppelschichten wurde außerdem eine HrpF-abhängige porenbildende Aktivität nachgewiesen, die zu Stromflüssen im elektrischen Feld führte. Diese experimentellen Daten lassen vermuten, daß HrpF die kanalbildende Komponente des postulierten Typ-III-Translokons ist.

## 2.2 Charakterisierung von *hpa*-Genen in der *hrpE-hrpF*-Region von *X. campestris* pv. *vesicatoria*

### 2.2.1 Manuskript: Functional characterization of *hpa* genes in the *hrpE-hrpF* region from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

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

Daniela Büttner, Laurent Noël<sup>1</sup> and Ulla Bonas\*

Institut für Genetik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, D-06099 Halle (Saale), Germany.

<sup>1</sup> present address: Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, D-50829 Köln, Germany.

\*Corresponding author. Mailing address: Institut für Genetik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, D-06099 Halle (Saale), Germany. Phone: (+49) 345 5526290. Fax: (+49) 345 5527277. E-mail: bonas@genetik.uni-halle.de

Running title: *hpa* genes in the *hrpE-hrpF* region

#### **Abstract**

Gram-negative pathogenic bacteria use specialized type III secretion (TTS) systems to inject effector proteins into their eukaryotic host cells. In the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, the TTS system is encoded by *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) genes which are essential for the interaction with the host plants pepper and tomato. Here, three new *hpa* (*hrp* associated) genes were identified by the analysis of nonpolar mutants. *hpaB* and *hpaE* were shown to be not essential for the interaction with the plant but to contribute to bacterial growth and disease symptom formation in susceptible plants. Furthermore, *hpaB* is involved in type III secretion of *Xanthomonas* effector proteins as well as of the PopA protein from *Ralstonia solanacearum*. In contrast, secretion of the *Xanthomonas* outer protein XopA and the putative translocon protein HrpF is not affected in *hpaB* mutants. In addition to *hpaB*, efficient secretion of the effector protein AvrBs3 requires the presence of two ORFs, designated ORF1 and *hpaD*, which are located between the *hrpE* and *hrpF*

operon. We propose that HpaB and HpaD are accessory proteins which are specifically involved in type III secretion of effector proteins.

Key words: bacterial spot, chaperone, mRNA, outer membrane, PIP box

### **Introduction**

Pathogenicity of Gram-negative bacterial pathogens depends on a specialized type III secretion (TTS) system which mediates protein secretion into the extracellular medium as well as translocation of effector proteins into the eukaryotic host cell (Cornelis and Van Gijsegem 2000; Hueck 1998). In plant pathogenic bacteria, TTS systems are encoded by *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) genes which are usually organized in large gene clusters comprising more than 20 genes (Lindgren 1997). *hrp* genes have been identified as essential pathogenicity determinants: *hrp* mutants are no longer able to grow and cause disease symptoms in susceptible plants. In addition, *hrp* mutants do not induce the hypersensitive response (HR) in resistant plants (Alfano and Collmer 1997). The HR is a rapid localized cell death at the infection site and is part of the plant's innate immune response that halts bacterial ingress (Klement 1982). The induction of specific plant defense reactions results from the recognition of bacterial effector proteins, designated avirulence (Avr) proteins, by corresponding plant resistance (R) proteins (Flor 1971).

At least nine *hrp* genes - designated *hrc* for *hrp* conserved - are conserved between plant and animal pathogenic bacteria and probably encode the core components of the TTS apparatus (Bogdanove *et al.* 1996; He 1998; Hueck 1998). The precise role of nonconserved *hrp* genes is less well understood, and only in a few cases their functional impact in the TTS process has been clarified. For instance, in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Ralstonia solanacearum*, the nonconserved Hrp proteins HrpA and HrpY, respectively, encode the major subunit of the Hrp pilus (Wei *et al.* 2000; Van Gijsegem *et al.* 2000). The Hrp pilus is a *hrp*-dependent surface appendage which is essential for type III secretion *in vitro* (Roine *et al.* 1997; Hu *et al.* 2001; Jin *et al.* 2001; Van Gijsegem *et al.* 2000; Wei *et al.* 2000). Hrp pili presumably cross the plant cell wall and serve as conduits for TTS substrates (Brown *et al.* 2001; Jin and He 2001; Jin *et al.* 2001; Li *et al.* 2002; Romantschuk *et al.* 2001).

Our laboratory studies *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, the causal agent of bacterial spot disease in pepper and tomato. The TTS system of *X. campestris* pv. *vesicatoria* is encoded by a 23-kb chromosomal *hrp* gene cluster which is organized in six operons, *hrpA* to *hrpF* (Bonas *et al.* 1991). Based on DNA sequence similarities and the phenotype of nonpolar mutants, *hrp* genes have been classified in (i) *hrc* genes, (ii) nonconserved *hrp* genes (essential for the plant interaction), and (iii) *hpa* (*hrp* associated) genes which contribute to but are not essential for bacterial pathogenicity (Fenselau *et al.* 1992; Fenselau and Bonas 1995; Wengelnik *et al.* 1996a; Huguet and Bonas 1997; Huguet *et al.* 1998; Rossier *et al.* 2000; U. Bonas *et al.*, unpublished).

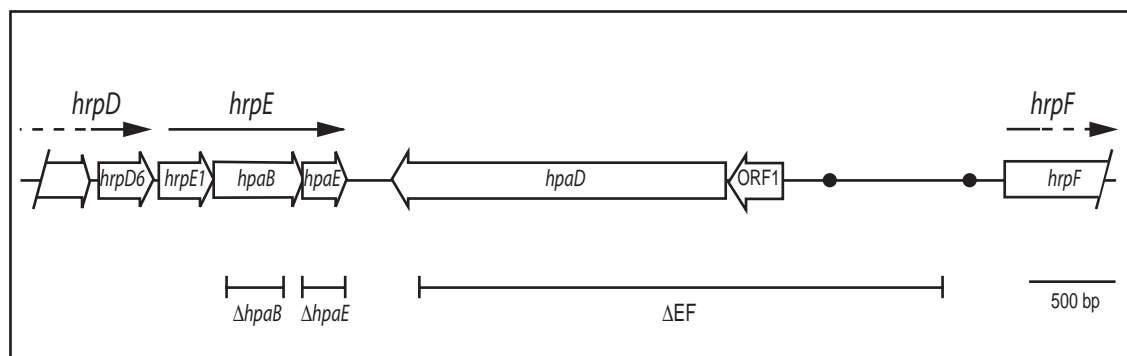
*hrp* gene expression is activated *in planta* or in the minimal medium XVM2 by the products of two regulatory genes, *hrpG* and *hrpX*, which are located outside the *hrp* gene cluster. HrpG is a member of the OmpR family of two-component response regulators and controls, in most cases via the AraC-type transcriptional activator HrpX (Wengelnik and Bonas 1996), a genome-wide regulon including *hrp* and *xop* (*Xanthomonas* outer proteins) genes (Wengelnik *et al.* 1996a; Wengelnik *et al.* 1996b; Astua-Monge *et al.* 2000; Noël *et al.* 2001; Noël *et al.* 2002). Using a constitutively active version of *hrpG*, *hrpG\** (Wengelnik *et al.* 1999), and a special minimal medium, *in vitro* type III secretion could be demonstrated. Secreted proteins include Hrp and Xop proteins as well as heterologous proteins from *R. solanacearum* and *Yersinia pseudotuberculosis* (Rossier *et al.* 1999; Rossier *et al.* 2000; Mudgett *et al.* 2000; Ballvora *et al.* 2001; Escolar *et al.* 2001; Noël *et al.* 2001; Noël *et al.* 2002). The analysis of nonpolar mutations revealed that type III secretion *in vitro* requires at least six nonconserved Hrp proteins which are presumably associated with the secretion apparatus (Rossier *et al.* 2000).

In this study, we report on the role of three *hpa* genes (*hpaB*, *hpaE*, *hpaD*) in the *hrpE*-*hrpF* region from *X. campestris* pv. *vesicatoria* in bacterial pathogenicity. Our data indicate that *hpaB* and *hpaD* are required for efficient secretion of a subset of TTS substrates.

## Results

### Sequence analysis of the *hrpE*-*hrpF* region

Sequence analysis of the *hrpE* operon revealed the presence of three open reading frames (ORFs), designated *hrpE1*, ORFE2 and ORFE3 (Fig. 1). Previous analyses of transposon insertion mutants in *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85-10 demonstrated that *hrpE1* is essential for the interaction with the host plant and is thus a true *hrp* gene (Rossier 1999). *hrpE1* presumably encodes the pilin, the major subunit of the Hrp pilus, and will be described elsewhere (U. Bonas *et al.*, unpublished).



**Fig. 1.** Schematic overview of the *hrpE*-*hrpF* region in *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

The presence of translatable open reading frames (ORFs) was predicted using the DNASTAR program (Genequest, *Pseudomonas aeruginosa* codon preference matrix). Arrows indicate the direction of transcription. Black dots refer to the presence of PIP boxes or PIP-box-like sequences. The lines below the map indicate the extent of generated deletions.

ORFE2 and ORFE3 are located downstream of *hrpE1* (Fig. 1). Because of their mutant phenotypes (see below), the genes were designated *hpaB* (ORFE2) and *hpaE* (ORFE3). *hpaB* and *hpaE* encode putative proteins of 18.4 kDa and 9.3 kDa, respectively (Table 1). The predicted HpaB protein shows homology to the putative HpaB proteins encoded in the *hrp* gene clusters of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *X. campestris* pv. *campestris*, *R. solanacearum* and *Burkholderia pseudomallei* (Table 1; Da Silva *et al.* 2002; Rainbow *et al.* 2002; Salanoubat *et al.* 2002). For *hpaE* and its predicted gene product, no homologous sequences on the DNA or protein level, respectively, were found in the database.

*hpaE* is separated from *hrpF* by a 3.6-kb region. Sequence analysis and codon preference data of this region revealed the presence of two ORFs, ORF1 and ORF2, which have an overlapping stop and start codon (Fig. 1). Because of its mutant phenotype (see below), ORF2 was designated *hpaD*. ORF1 and *hpaD* encode putative

proteins of 7.5 kDa and 70.4 kDa, respectively, with no homology to known proteins in the database (Table 1). On the DNA level, sequences homologous to *hpaD* are present in the *hrp* gene clusters of *X. oryzae* pv. *oryzae* (AB045311), *X. axonopodis* pv. *citri* (AE011665) and *X. campestris* pv. *campestris* (AE012221). However, no continuous ORF corresponding to *hpaD* was found, all homologous sequences are interrupted by several stop codons.

Table 1: Description of genes in the *hrpE-hrpF* region from *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Gene	Comments <sup>a</sup>	Protein homologs (organism; accession) <sup>b</sup>	Identity/ similarity <sup>c</sup>
<i>hpaB</i>	162 aa; pI=4.3	HpaB ( <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ; BAB07868)	94% / 97%
		HpaB ( <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ; AAM35287)	93% / 97%
		HpaB ( <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> ; NP636594)	85% / 91%
		HpaB ( <i>B. pseudomallei</i> ; AAK73244)	51% / 68%
		HpaB ( <i>R. solanacearum</i> ; NP522414)	49% / 63%
<i>hpaE</i>	86 aa; pI=9.3	-	-
ORF1	91 aa; imperfect PIP box; pI=4.2	-	-
<i>hpaD</i>	671 aa; pI=8.8	-	-

<sup>a</sup> aa, amino acids, refers to the size of the predicted gene product; pI, isoelectric point.

<sup>b</sup> Homologous proteins were found using the BLASTP program in nonredundant databases.

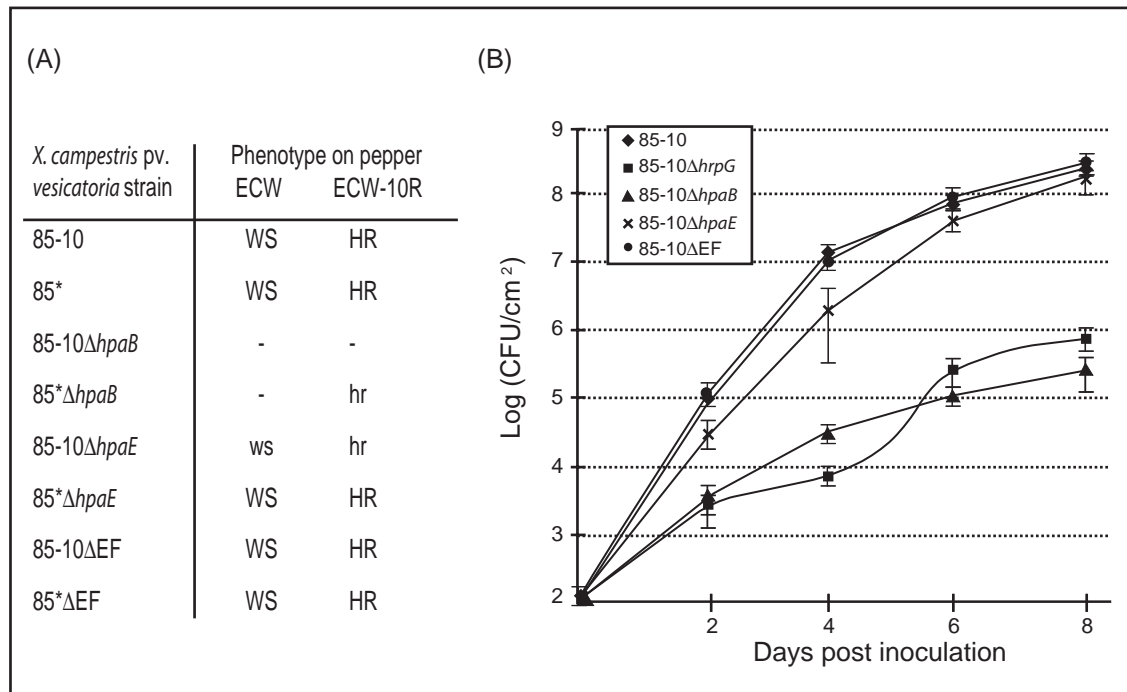
<sup>c</sup> Identities and similarities were determined using the BLAST 2 program based on the matrix BLOSUM 62.

### ***hpaB* and *hpaE* contribute to bacterial pathogenicity**

Previous analyses of transposon insertion mutants already indicated that *hpaB* and *hpaE* contribute to but are not essential for the interaction of *X. campestris* pv. *vesicatoria* with the host plant (Brown *et al.* 1995; E. Huguet and U. Bonas, unpublished). Since transposon insertion mutations presumably have polar effects, we generated deletions in *hpaB* and *hpaE*, respectively, in order to analyze their role in pathogenicity and type III secretion *in vitro*. Using the suicide plasmid pOK1, the deletions (see Fig. 1 and *Material and Methods*) were introduced into *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains 85-10, 85\* and 82\*. Strain 85-10 expresses the *avrBs1* gene and induces the HR in pepper line ECW-10R which contains the corresponding *R* gene *Bs1*. Strain 85\* is a derivative of 85-10, carrying the *hrpG*\* mutation which renders *hrp* gene expression constitutive (Wengelnik *et al.* 1999). Similarly, strain 82\* is a *hrpG*\* derivative of 82-8 which expresses the *avrBs3* gene from an endogenous plasmid (Bonas *et al.* 1989). *hpaB* and

*hpaE* mutants were tested for bacterial growth and the formation of disease symptoms, so-called water-soaked lesions, in the susceptible pepper line ECW as well as for HR induction in the pepper lines ECW-10R (AvrBs1 recognition) or ECW-30R (carries the *Bs3* resistance gene, AvrBs3 recognition).

Strain 85-10 $\Delta$ *hpaB* was not able to grow and cause disease symptoms in susceptible plants and did not induce the HR in resistant plants (Fig. 2). In contrast, strain 85\* $\Delta$ *hpaB* induced a partial HR in ECW-10R plants, however, disease symptom formation in ECW plants was abolished (Fig. 2A). A similar phenotype was observed with strain 82\* $\Delta$ *hpaB* when inoculated into ECW-30R and ECW plants (data not shown).



**Fig. 2.** Effects of deletions in the *hrpE-hrpF* region on the plant interaction.

(A) Summary of phenotypes in the susceptible pepper line ECW and the resistant pepper line ECW-10R. *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains were inoculated at bacterial densities of  $2 \times 10^8$  CFU/ml in 1 mM  $MgCl_2$  into the intercellular spaces of fully expanded leaves. Plant reactions were scored over a period of one to five days.

HR, hypersensitive reaction; hr, delayed and partial HR; WS, water-soaked lesions; ws, delayed and partial water-soaked lesions.

(B) Bacterial growth in the susceptible pepper line ECW. *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains were inoculated at bacterial densities of  $10^4$  CFU/ml in 1 mM  $MgCl_2$ . Bacterial growth was monitored over a period of eight days. Values represent the mean of three samples from three different plants.



85\* $\Delta$ *hpaB* could be complemented for HR induction and disease symptom formation by plasmid pLhrpE which carries the complete *hrpE* operon. In strain 85-10 $\Delta$ *hpaB*, however, pLhrpE only partially restored the wild-type phenotype (data not shown). Surprisingly, the phenotype of both 85-10 $\Delta$ *hpaB* and 85\* $\Delta$ *hpaB* strains could not be complemented by construct pDM20. pDM20 expresses *hpaB* from the lac promoter, which is constitutively active in *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

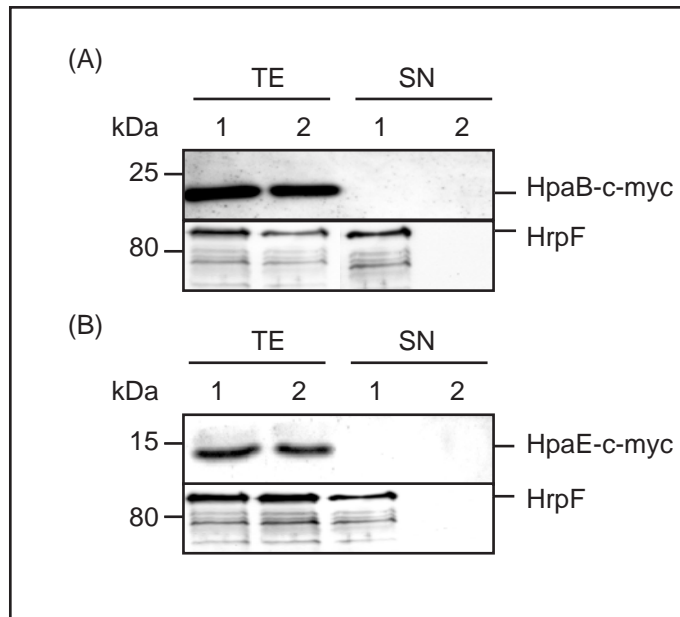
Deletion of *hpaE* in strain 85-10 (85-10 $\Delta$ *hpaE*) resulted in an intermediate phenotype: reduced bacterial growth and disease symptom formation in susceptible plants as well as induction of a partial HR in resistant plants (Fig. 2). In contrast, strain 85\* $\Delta$ *hpaE* displayed a wild-type phenotype (Fig. 2A). The mutant phenotype of strain 85-10 $\Delta$ *hpaE* could be complemented by plasmid pDM30 (see Table 1 and *Material and Methods*).

To investigate the contribution of ORF1 and *hpaD* to bacterial pathogenicity, we generated a deletion of both ORFs (see Fig. 1 and *Materials and Methods*) in strains 85-10, 85\* and 82\*, using the suicide plasmid pOK1. The mutant strain 85-10 $\Delta$ EF behaved like the wild type with respect to bacterial growth and disease symptom formation in susceptible plants as well as HR induction in resistant plants (Fig. 2). Similarly, strains 85\* $\Delta$ EF (Fig. 2A) and 82\* $\Delta$ EF (data not shown) displayed a wild-type phenotype when inoculated into susceptible and resistant pepper plants.

### **Protein studies of HpaB and HpaE**

Since polyclonal antibodies raised against HpaB- and HpaE-GST fusion proteins (see *Materials and Methods*) failed to detect the proteins in *X. campestris* pv. *vesicatoria* due to a lack of sensitivity of the antiserum (data not shown), HpaB and HpaE were tagged with a C-terminal c-myc epitope. When expressed in *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85\* from plasmids pDM20 and pDM30, respectively, proteins of the expected size (18 kDa plus 5-kDa epitope for HpaB and 9 kDa plus 5-kDa epitope for HpaE) could be detected (Fig. 3).

To investigate whether HpaB or HpaE are secreted by the TTS system, bacteria were incubated in secretion medium as described (Rossier *et al.* 1999). As shown in Fig. 3, neither HpaB nor HpaE could be detected in the culture supernatants. In contrast, the type III-secreted protein HrpF (Büttner *et al.* 2002), which was analyzed as a positive control, was detected in the culture supernatants (Fig. 3). We therefore conclude that both HpaB and HpaE are intracellular proteins.



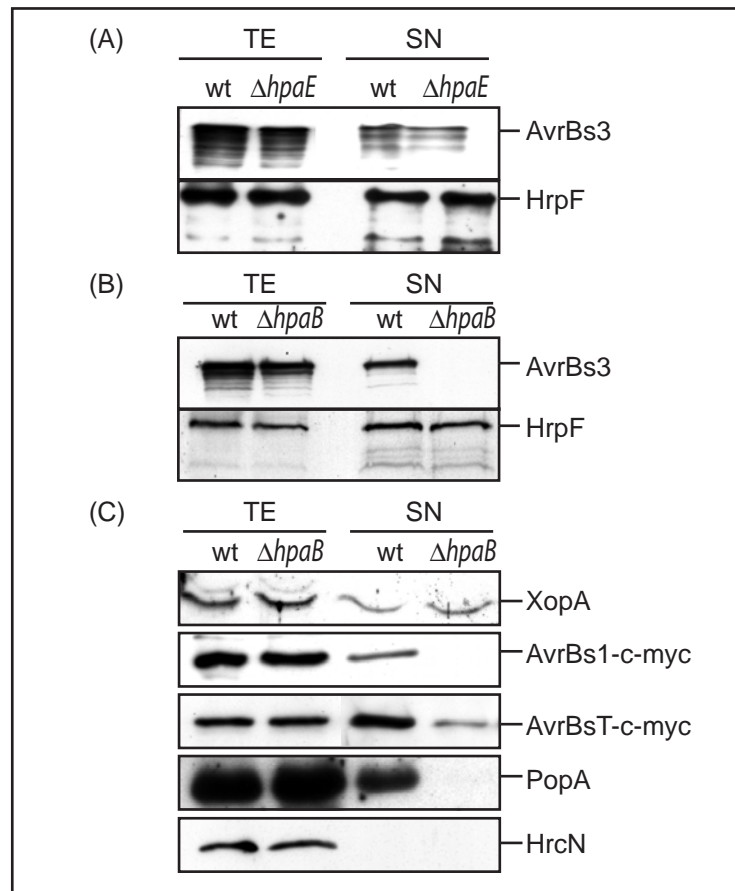
**Fig. 3.** HpaB and HpaE are not detectable in the culture supernatants of *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains.

(A) HpaB-c-myc-expressing *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains (1) 85\*(pDM20) and (2) 85\* $\Delta$ *hrpV*(pDM20) were grown in secretion medium. Equal protein amounts of total protein extracts (TE) and culture supernatants (SN) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting, using a monoclonal anti-c-myc antibody (top) and a polyclonal HrpF-specific antiserum (bottom).

(B) Total protein extracts and culture supernatants of HpaE-c-myc-expressing *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains (1) 85\*(pDM30) and (2) 85\* $\Delta$ *hrpV*(pDM30) were analyzed as in (A).

### HpaB is involved in type III secretion

Previously, nonpolar mutagenesis of *hrp* genes from *X. campestris* pv. *vesicatoria* revealed that at least six nonconserved *hrp* genes in the *hrpB* and *hrpD* operon are essential for type III secretion *in vitro* (Rossier *et al.* 2000). To determine the role of *hpaB* and *hpaE* in secretion, we performed *in vitro* secretion experiments, using the putative translocon protein HrpF and the effector protein AvrBs3 as reporters. Both proteins were detectable in culture supernatants of strains 85\* and 85\* $\Delta$ *hpaE*, expressing AvrBs3 from plasmid pDS300F (Fig. 4A; Van den Ackerveken *et al.* 1996). In contrast, AvrBs3 was not detected in the culture supernatant of the *hpaB* deletion mutant 85\* $\Delta$ *hpaB*(pDS300F) (data not shown). Similar results were obtained with strain 82\* $\Delta$ *hpaB* which carries the *avrBs3* gene in the genome (Fig. 4B). Interestingly, secretion of HrpF as well as of XopA, which was recently identified (Noël *et al.* 2002), was not affected in *hpaB* deletion mutants (Fig. 4B and C).



**Fig. 4.** Effect of *hpaB* and *hpaE* deletions on *in vitro* type III secretion.

(A) *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains 85\*(pDS300F) (wt) and 85\* $\Delta$ *hpaE*(pDS300F) ( $\Delta$ *hpaE*) were grown in secretion medium. Both strains express AvrBs3 from plasmid pDS300F. Equal protein amounts of total protein extracts (TE) and culture supernatants (SN) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting, using polyclonal antisera against AvrBs3 and HrpF.

(B) *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains 82\* (wt) and 82\* $\Delta$ *hpaB* ( $\Delta$ *hpaB*) were grown in secretion medium. Total protein extracts (TE) and culture supernatants (SN) were analyzed as in (A).

(C) Effect of *hpaB* deletion on secretion of different proteins. The following *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains were tested: 85\* and 85\* $\Delta$ *hpaB* for XopA secretion, 85\*(pDSM100) and 85\* $\Delta$ *hpaB*(pDSM100) for AvrBs1-c-myc secretion, 82\*(pDSM440) and 82\* $\Delta$ *hpaB*(pDSM440) for AvrBsT-c-myc secretion and 82\*(pLAZ13) and 82\* $\Delta$ *hpaB*(pLAZ13) for PopA secretion. Bacteria were grown in secretion medium. Equal protein amounts of total protein extracts (TE) and culture supernatants (SN) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting, using a monoclonal anti-c-myc antibody or polyclonal antisera directed against XopA and PopA. wt indicates a wild-type background,  $\Delta$ *hpaB* the *hpaB* deletion.

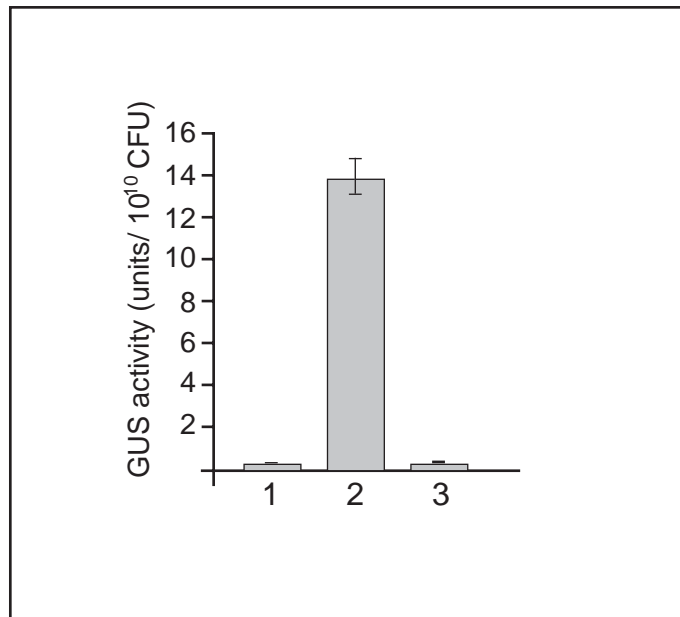
Blots in (A), (B) and (C) were reprobated with the antiserum against the intracellular protein HrcN to ensure that no bacterial lysis had occurred. One representative experiment is shown in (C).

To study type III secretion of additional proteins, plasmids expressing AvrBs1-c-myc, AvrBsT-c-myc (Escolar *et al.* 2001) or PopA from *R. solanacearum* (Arlat *et al.* 1994; Rossier *et al.* 1999) were introduced into strains 85\* and 82\* and the corresponding *hpaB* deletion mutants. As shown in Fig. 4C, AvrBs1-c-myc and PopA were not detected in the culture supernatants of *hpaB* mutants. Furthermore, the secretion of AvrBsT-c-myc was reduced when compared to the wild-type strain.

**The region between *hpaE* and *hrpF* contains a *hrpG*- and *hrpX*-regulated promoter**

The presence of an imperfect PIP (plant inducible promoter) box (TTCGC-N<sub>6</sub>-TTCGC) 322 bp upstream of the putative translational start codon of ORF1 (Fig. 1) prompted us to test this region for promoter activity. PIP boxes (consensus sequence TTCGC-N<sub>15</sub>-TTCGC (Fenselau and Bonas 1995)) have been identified in promoters of many *hrpG/hrpX*-regulated *hrp* and *xop* genes and are predicted to provide the binding site for HrpX (Fenselau and Bonas 1995; Wengelnik and Bonas 1996; Noël *et al.* 2002).

Here, ORF1 including 562 bp upstream sequence was fused to a promoterless *uidA* gene encoding β-glucuronidase (GUS). The resulting construct, pLP1GUS, was conjugated into *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains 85-10, 85\* and 85\*Δ*hrpX*. GUS activity of strain 85\*(pLP1GUS) was 25 times higher than of strains 85-10(pLP1GUS) and 85\*Δ*hrpX*(pLP1GUS), all grown in NYG medium (Fig. 5). These data indicate the presence of a *hrpG*- and *hrpX*-regulated promoter. A second construct (pLP2GUS), in which the ORF1 coding sequence and the first 449 bp of *hpaD* were fused to *uidA*, did not show any GUS activity in strain 85\* (data not shown). These data suggest that the *hrpX*-regulated promoter is located upstream of ORF1 and that ORF1 and *hpaD* are part of the same operon.



**Fig. 5.** Activity of the ORF1/*hpaD* promoter.

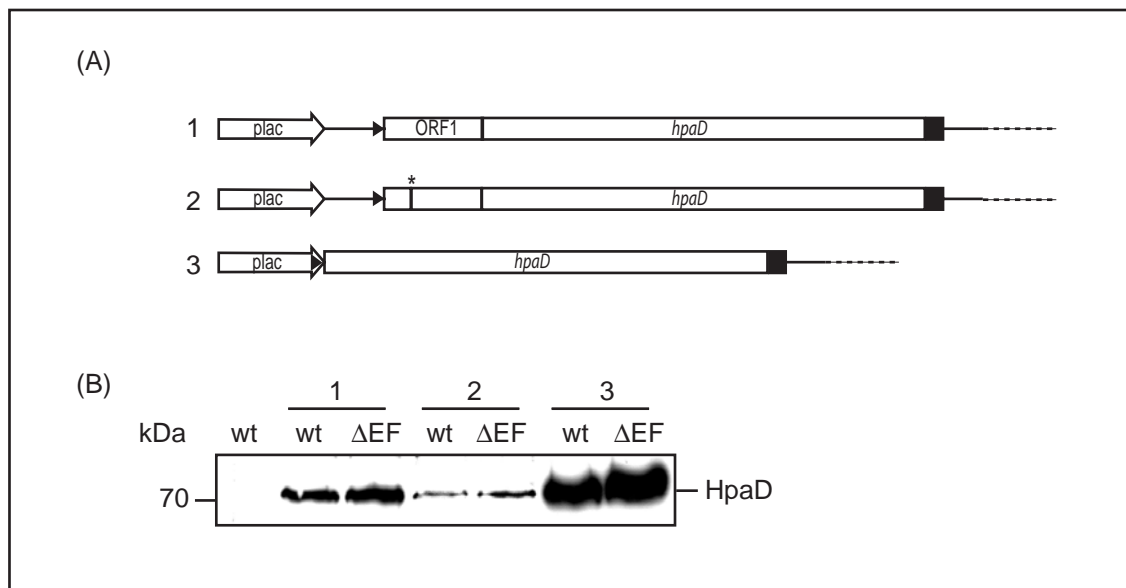
*X. campestris* pv. *vesicatoria* strains (1) 85-10, (2) 85\* and (3) 85\* $\Delta$ *hrpX*, all containing the reporter plasmid pLP1GUS, were grown for 16 h in NYG medium. Specific GUS activities are the average of two cultures with duplicates. One unit of GUS activity is defined as 1 nmol of 4-methylumbelliferone released per minute per bacterium.

#### **HpaD can be detected in *X. campestris* pv. *vesicatoria* upon overexpression**

The data described above prompted us to investigate the predicted ORF1 and *hpaD* gene products. For the analysis of HpaD, a polyclonal antiserum was generated. When expressed from construct pLH10D (Fig. 6A, construct 1) in strain 82\*, a 70-kDa protein was detected by the HpaD-specific antiserum (Fig. 6B). Surprisingly, HpaD was not detected in the plasmid-free strain 82\* (Fig. 6B, wt), indicating that the protein is expressed at a low level or is unstable. Similar results were obtained with strain 85\* (data not shown). For technical reasons, strain 82\* was used for further protein expression studies.

To analyze the predicted ORF1 protein, a C-terminally His<sub>6</sub>-tagged version of ORF1 was cloned under the control of the lac promoter (construct pDH10). However, using a monoclonal antibody directed against the His<sub>6</sub> epitope, the predicted ORF1 gene product could not be detected in total protein extracts of strain 82\*(pDH10) (data not shown). To investigate whether HpaD is needed for expression/detection of the ORF1 protein, an internal HA epitope was introduced into the ORF1 sequence (construct pLH11D). However, using an HA-specific antibody, the predicted ORF1 protein was not detectable in protein extracts of strain 82\*(pLH11D) (data not shown).

To investigate whether HpaD requires ORF1 for stable expression, we analyzed additional HpaD expression constructs (Fig. 6A). HpaD was detected in high amounts in total protein extracts of *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 82\* when expressed from construct pDD (Fig. 6A, construct 3), irrespective of the ORF1/*hpaD* deletion (Fig. 6B). In an additional construct (pLH12D), an early stop codon was introduced after the fourth codon of ORF1 (Fig. 6A, construct 2), resulting in a low expression of HpaD in strain 82\*(pLH12D). Similar amounts of HpaD were detected in the deletion mutant 82\* $\Delta$ EF(pLH12D) (Fig. 6B). The low expression level of HpaD might be due to a polar effect of the introduced early stop codon in ORF1 which could lead to a dissociation of the ribosomes from the mRNA. However, as shown above, it is not clear whether ORF1 is translated. Taken together, these data suggest that stable expression of HpaD does not require the presence of ORF1.



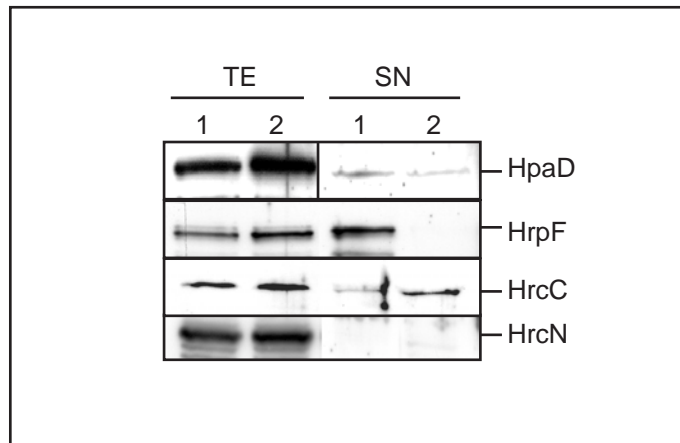
**Fig. 6.** Expression of the HpaD protein in *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

(A) HpaD expression constructs (1) pLH10D, (2) pLH12D and (3) pDD were generated as described in *Material and Methods*. All HpaD derivatives are expressed from the lac promoter and contain a C-terminal His<sub>6</sub> tag for detection (indicated as a black box). The star indicates the introduction of a stop codon, black triangles refer to Shine-Dalgarno sequences.

(B) Equal protein amounts of total protein extracts from strain 82\* (wt, first lane) as well as from strains 82\* (wt) and 82\* $\Delta$ EF ( $\Delta$ EF), carrying constructs (1) pLH10D, (2) pLH12D and (3) pDD, respectively, were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. The blot was probed with the HpaD-specific polyclonal antiserum.

### HpaD is present in the culture supernatant

To investigate whether HpaD is secreted by the TTS system, we performed *in vitro* secretion experiments. Surprisingly, small amounts of HpaD were detected in the culture supernatants of both strain 82\*(pDD) and the TTS mutant 82\* $\Delta$ *hrcV*(pDD) (Fig. 7). Furthermore, also HrcC, the outer membrane component of the TTS apparatus, was present in the culture supernatant of the wild-type strain and the TTS mutant. This cannot be explained by bacterial lysis since the intracellular HrcN and the type III-secreted HrpF protein were not detected in the culture supernatant of the TTS mutant (Fig. 7).

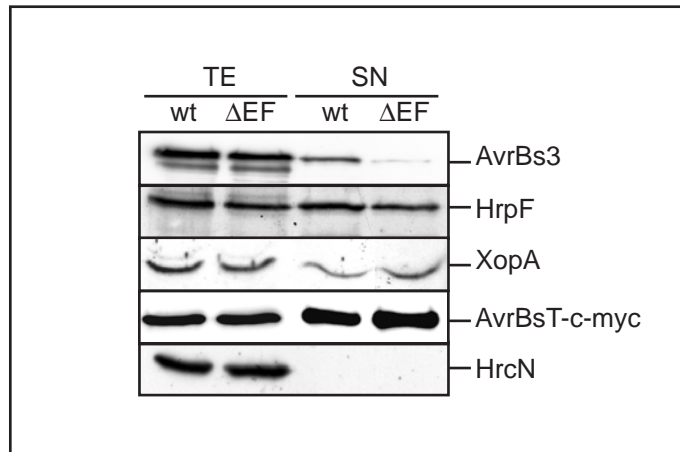


**Fig. 7.** HpaD is present in the culture supernatants of *X. campestris* pv. *vesicatoria* wild-type and TTS mutant strains.

Strains (1) 82\* and (2) 82\* $\Delta$ *hrcV*, both expressing HpaD from plasmid pDD, were grown in secretion medium. Equal protein amounts of total protein extracts (TE) and culture supernatants (SN) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting, using polyclonal antibodies directed against HpaD, HrpF, HrcC and HrcN.

### ORF1 and HpaD are involved in type III secretion

In addition to *hpaB* and *hpaE*, we also investigated the influence of ORF1 and HpaD on type III secretion *in vitro*. In order to analyze secretion of AvrBs3, we used strains 82\* and the ORF1/*hpaD* deletion mutant 82\* $\Delta$ EF. When compared to strain 82\*, the AvrBs3 protein was barely detectable in the culture supernatant of strain 82\* $\Delta$ EF.



**Fig. 8.** Effect of the ORF1/*hpaD* deletion on *in vitro* type III secretion.

*X. campestris* pv. *vesicatoria* strains 82\* for AvrBs3 and HrpF secretion, 85\* for XopA secretion, 82\*(pDSM440) for AvrBsT-c-myc secretion and the corresponding ΔEF derivatives were grown in secretion medium. Equal protein amounts of total protein extracts (TE) and culture supernatants (SN) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. wt indicates the genomic wild-type background, ΔEF the ORF1/*hpaD* deletion. Blots were probed with an anti-c-myc antibody as well as with polyclonal antibodies directed against AvrBs3, HrpF and XopA. To ensure that no bacterial lysis had occurred, blots were re-probed with the HrcN-specific antiserum. One representative experiment is shown.

In contrast, secretion of HrpF was not affected (Fig. 8). Similarly, comparable amounts of XopA were present in the culture supernatants of strains 85\* and 85\*ΔEF (Fig. 8). We also tested secretion of AvrBsT-c-myc which was expressed from plasmid pDSM440 under the control of its own promoter. Similar amounts of AvrBsT-c-myc were detected in the culture supernatants of strains 82\*(pDSM440) and 82\*ΔEF(pDSM440) (Fig. 8). In conclusion, the region containing ORF1 and *hpaD* plays a role for secretion or extracellular stability of AvrBs3 but not of other proteins tested.

## Discussion

The *X. campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster is involved in the establishment of a TTS system which allows the secretion of Hrp and Xop proteins and controls the interaction with the host plant. Previous analysis of nonpolar mutations in the *hrp* gene cluster revealed the presence of *hpa* genes which are not essential for but contribute to the plant interaction (Huguet *et al.* 1998; U. Bonas *et al.*, unpublished). In this study, we investigated the role of genes located in the region between *hrpE1* and *hrpF*. Besides



*hpaB* and *hpaE*, both located in the *hrpE* operon, we identified *hpaD*, a novel gene in the *X. campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster.

Deletion of *hpaB* and *hpaE*, respectively, resulted in an intermediate phenotype with respect to disease symptom formation and HR induction. The mutant phenotypes were more pronounced in strain 85-10 than in strain 85\*. This might be due to a compensation of the deletions in *hrpG*\* strains which show a higher expression level of *hrp* genes (Wengelnik *et al.* 1999). It is puzzling that the phenotype of *hpaB* deletion mutants could not be complemented by *hpaB in trans* and that expression of the complete *hrpE* operon only fully restored the wild-type phenotype in strain 85\* $\Delta$ *hpaB*, but not in 85-10 $\Delta$ *hpaB*. We speculate that expression of *hpaB* under the control of the *lac* promoter causes a negative effect, which in part can be counteracted by the *hrpG*\* mutation.

HpaB and HpaE presumably act inside the bacterial cytosol since both proteins could not be detected in the culture supernatant. The exact role of HpaE in pathogenicity and HR induction remains unclear. So far, a contribution of HpaE to type III secretion *in vitro* could not be observed. In contrast, HpaB is involved in the secretion process. HpaB is a small and acidic protein and thus shares typical features of TTS chaperones, which have mainly been described in animal pathogenic bacteria (Bennett and Hughes 2000). TTS chaperones bind to one or two effector proteins and thus promote their secretion by the TTS system. Furthermore, TTS chaperones prevent aggregation and/or degradation of effector proteins in the bacterial cytosol (Aldridge and Hughes 2001; Isberg and Dumenil 2001; Lloyd *et al.* 2001).

In contrast to known TTS chaperones, HpaB from *X. campestris* pv. *vesicatoria* is not essential for the stable expression of effector proteins. However, HpaB is required for the efficient secretion of effector proteins. This observation provides an explanation for the nonpathogenic phenotype of *hpaB* mutants. Interestingly, *hpaB* mutants still secrete the putative translocon protein HrpF (Büttner *et al.* 2002) as well as XopA, a recently identified TTS substrate which is required for full virulence and avirulence of *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Noël *et al.* 2002). Since XopA is dispensable for type III secretion *in vitro*, it might contribute to the type III-dependent translocation of effector proteins.

One possible biochemical function of HpaB is binding of effector proteins to promote their translocation by the TTS system. The putative binding site could be the predicted translocation signal which is located within the first 50-100 amino acids of effector

proteins (Sory *et al.* 1995; Schesser *et al.* 1996; Mudgett *et al.* 2000; Escobar *et al.* 2001). In animal pathogenic bacteria, this protein region provides the binding site for TTS chaperones (Bennett and Hughes 2000). However, PopA (Arlat *et al.* 1994), efficient secretion of which also depends on HpaB, is not predicted to be translocated into the plant cell. PopA belongs the class of harpin proteins that presumably act at the plant surface (Alfano and Collmer 1997; El-Maarouf *et al.* 2001; Lee *et al.* 2001).

Is HpaB an exception or are there other proteins involved in secretion of some but not all TTS substrates? A substrate-specific contribution to the TTS process has already been reported for HpaA which is required for full virulence activity of *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Huguet *et al.* 1998). *hpaA* mutants do no longer secrete the *R. solanacearum* PopA protein, however, secretion of the *Xanthomonas* effector protein AvrBs3 as well as of HrpF is not affected (Rossier *et al.* 2000; U. Bonas *et al.*, unpublished). Taken together, these observations indicate that TTS systems recruit accessory proteins for the export of special protein subsets. This hypothesis is further supported by the finding that efficient *in vitro* secretion of the effector protein AvrBs3, but not of AvrBsT-c-myc, HrpF and XopA, requires ORF1 and *hpaD*, that are encoded downstream of *hpaE*. However, deletion of ORF1 and *hpaD* does not affect the plant interaction indicating that they do not play a major role in the type III-dependent delivery of effector proteins.

The predicted ORF1 gene product is small and acidic and thus resembles TTS chaperones which are usually located adjacent to the respective effector gene. However, protein expression studies revealed that ORF1 is not essential for the stability of HpaD. Given the fact that the predicted ORF1 protein could not be detected under the experimental conditions used, one might speculate that ORF1 acts on the mRNA level. Untranslated mRNAs have been reported to regulate translation of downstream-located genes by formation of secondary structures that inhibit ribosome binding or that provide binding sites for regulatory proteins (Klaff *et al.* 1996; Morris and Geballe 2000). Such a model would explain the fact that HpaD, although being located downstream of a *hrpG*- and *hrpX*-regulated promoter, could not be detected in *hrpG*\* strains of *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Whether the translation of *hpaD* mRNA is activated by environmental conditions remains to be investigated.

When HpaD was overexpressed in *X. campestris* pv. *vesicatoria* and analyzed for type III secretion *in vitro*, the protein was present in the culture supernatant of both the wild-

type strain and a TTS mutant. However, using the SignalP program ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0)), no signal peptide was predicted in HpaD that could target the protein to a type II secretion system. Besides HpaD, also the outer membrane protein HrcC (Wengelnik *et al.* 1996a) was present in the culture supernatant of a TTS mutant. Therefore, we propose that HpaD is associated with the outer membrane. Fractionation studies are needed to clarify this point.

Altogether, this study revealed the presence of new *hpa* genes in the *hrp* gene cluster of *X. campestris* pv. *vesicatoria*. The data presented here indicate that TTS systems recruit accessory proteins like HpaB and HpaD to promote secretion of certain protein subsets. Protein localization studies as well as the analysis of interactions between Hpa and type III-secreted proteins will help to clarify their biochemical functions during the type III secretion process.

## Materials and Methods

### Bacterial strains, growth conditions and plasmids

Bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 2. *Escherichia coli* cells were cultivated at 37°C in Luria-Bertani (LB) or Super medium (Qiagen, Hilden, Germany). *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains were grown at 30°C in NYG medium (Daniels *et al.* 1984) or in minimal medium A (Ausubel *et al.* 1996) supplemented with sucrose (10 mM) and casamino acids (0.3%). Antibiotics were added to the media at the following final concentrations: ampicillin, 100 µg/ml; kanamycin, 25 µg/ml; rifampicin, 100 µg/ml; spectinomycin, 100 µg/ml; tetracycline, 10 µg/ml.

Plasmids were introduced into *E. coli* by electroporation and into *X. campestris* pv. *vesicatoria* by conjugation, using pRK2013 as a helper plasmid in triparental matings (Figurski and Helinski 1979).

### Plant material and plant inoculations

The near-isogenic pepper cultivars Early Cal Wonder (ECW), ECW-10R and ECW-30R (Minsavage *et al.* 1990) were grown and inoculated with *X. campestris* pv. *vesicatoria* as described previously (Bonas *et al.* 1991). Bacteria were hand-infiltrated into the intercellular spaces of fully expanded leaves at concentrations of  $2 \times 10^8$  CFU/ml in 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Reactions were scored over a period of five days. *In planta* growth of bacteria was determined in pepper cultivar ECW as described (Bonas *et al.* 1991). Experiments were repeated at least three times.

### Generation of deletion mutants

To introduce a deletion in *hpaB*, the 3.1-kb *EcoRV/XhoI* fragment spanning the *hrpE* operon was cloned into pBluescript II KS. The resulting construct pBhrpE was digested with *Csp45I* and religated, giving pBΔ*hpaB* which contained a 420-bp in-frame deletion in *hpaB* (resulting in deletion of amino acid 13 to 149). The 2.7-kb *BamHI/XhoI* insert was cloned into the *BamHI/SalI* sites of the suicide plasmid pOK1, giving pOKΔ*hpaB*. Mutant *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains were generated by introduction of pOKΔ*hpaB* into 85-10, 85\* and 82\* as described (Huguet *et al.* 1998).

For the generation of a *hpaE* deletion mutant, the *hpaE* flanking regions were amplified from construct pBhrpE by PCR, using primers *hpaE-EcoRV-for* (5'-CCGATATCCGGCTGCGCAACGTGGAGACA-3') and *hpaE-EcoRI-rev*

(5'-GATGAATTCCGCTGCGGCCGTGATTGACACTTC-3') as well as primers hpaE-EcoRI-for (5'-GCAGAATTCAAGGGCAGGCGCAGACTCAT-3') and hpaE-BamHI-rev (5'-CAAGGATCCGACGCCGTGCATTTCCCGCCTACC-3'). PCR products were digested with *EcoRV/EcoRI* and *EcoRI/BamHI* (restriction sites are underlined in primer sequences) and ligated into the *SmaI/BamHI* sites of pOK1. The resulting construct pOK $\Delta$ hpaE was introduced into strains 85-10, 85\* and 82\*, giving 85-10 $\Delta$ hpaE, 85\* $\Delta$ hpaE and 82\* $\Delta$ hpaE, respectively.

To delete the region spanning ORF1 and *hpaD*, a 7.5-kb *BamHI/EcoRI* fragment containing the *hrpE-hrpF* region was cloned into pUC119, digested with *ClaI* and religated. In the resulting construct pU $\Delta$ EF, 872 bp upstream region, ORF1 and the first 1853 bp of *hpaD* are deleted (see Fig. 1). The 4.6-kb insert of pU $\Delta$ EF was cloned into pOK1 and introduced into strains 85-10, 85\* and 82\*, giving 85-10 $\Delta$ EF, 85\* $\Delta$ EF and 82\* $\Delta$ EF, respectively.

### Construction of promoter-GUS fusions

For construction of promoter-reporter fusions, the *uidA* gene from construct pBGUS (Escobar *et al.* 2001), encoding  $\beta$ -glucuronidase (GUS), was cloned into the *BamHI/HindIII* sites of pUC119, giving pUGUS. A 780-bp *SacI/SmaI* fragment spanning ORF1 and 562-bp upstream region was ligated into pUGUS and the *EcoRI/HindIII* insert of the resulting construct was then cloned into pLAFR6, giving pLP1GUS. For the analysis of a promoter activity in the ORF1 sequence, a 650-bp *PstI* fragment spanning ORF1 and the first 449 bp of *hpaD* was cloned into pBGUS. The resulting *uidA* fusion was cloned into pLAFR6, giving construct pLP2GUS.

### $\beta$ -Glucuronidase assays

$\beta$ -Glucuronidase (GUS) assays were performed with exponentially growing *X. campestris* pv. *vesicatoria* strains as described (Rossier *et al.* 1999). One GUS unit is defined as 1 nmol of 4-methylumbelliferone released per minute per bacterium. Experiments were repeated at least three times.

Table 2. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Source or reference
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>		
85-10	pepper-race 2; wild type; expresses <i>avrBs1</i> and <i>avrBs2</i> ; Rif <sup>r</sup>	(Bonas <i>et al.</i> 1989)
85-10Δ <i>hpaB</i>	85-10 derivative; carries in-frame deletion of <i>hpaB</i>	this study
85-10Δ <i>hpaE</i>	85-10 derivative; carries <i>hpaE</i> deletion	this study
85-10ΔEF	85-10 derivative; carries 2.9-kb deletion of <i>hrpE</i> - <i>hrpF</i> region spanning ORF1 and <i>hpaD</i>	this study
85*	85-10 derivative containing the <i>hrpG</i> * mutation	(Wengelnik <i>et al.</i> 1999)
85*Δ <i>hrcV</i>	<i>hrcV</i> deletion mutant of 85*	(Rossier <i>et al.</i> 2000)
85*Δ <i>hpaB</i>	85* derivative; carries in-frame deletion of <i>hpaB</i>	this study
85*Δ <i>hpaE</i>	85* derivative; carries <i>hpaE</i> deletion	this study
85*ΔEF	ORF1/ <i>hpaD</i> deletion mutant in 85*	this study
82-8	pepper-race 1; wild type; expresses <i>avrBs3</i> ; Rif <sup>r</sup>	(Minsavage <i>et al.</i> 1990)
82*	82-8 derivative containing the <i>hrpG</i> * mutation	(Wengelnik <i>et al.</i> 1999)
82*Δ <i>hpaB</i>	82* derivative; carries in-frame deletion of <i>hpaB</i>	this study
82*Δ <i>hpaE</i>	82* derivative; carries <i>hpaE</i> deletion	this study
82*ΔEF	ORF1/ <i>hpaD</i> deletion mutant in 82*	this study
<i>E. coli</i>		
DH5α	F <sup>-</sup> <i>recA hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>,m<sub>k</sub><sup>+</sup>) Φ80dlacZ ΔM15</i>	Bethesda Research Laboratories, Bethesda, Md.
DH5α λpir	F <sup>-</sup> <i>recA hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>,m<sub>k</sub><sup>+</sup>) Φ80dlacZ ΔM15 [λpir]</i>	(Ménard <i>et al.</i> 1993)
<b>Plasmids</b>		
pBlueskript(II) KS	phagemid, pUC derivative; Ap <sup>r</sup>	Stratagene
pUC119	ColE1 replicon; Ap <sup>r</sup>	(Vieira and Messing 1987)
pC3003	pUC19 plasmid containing a triple c-myc tag; Ap <sup>r</sup>	J. Kämper
pGEX-2TKM	p <sub>tac</sub> GST <i>lacI</i> <sup>q</sup> pBR322 ori; Ap <sup>r</sup> , derivative of pGEX-2TK, polylinker of pDSK604	Stratagene (Escolar <i>et al.</i> 2001)
pDSK602	broad-host-range vector; contains triple lacUV5 promoter; Sm <sup>r</sup>	(Murillo <i>et al.</i> 1994)
pLAFR3	broad-host-range vector; RK2 replicon, Mob <sup>+</sup> Tra <sup>-</sup> ; contains plac; Tc <sup>r</sup>	(Staskawicz <i>et al.</i> 1987)
pLAFR6	pLAFR3 derivative, multiple cloning site flanked by transcriptional terminators; Tc <sup>r</sup>	(Bonas <i>et al.</i> 1989)
pOK1	<i>sacB sacQ mobRK2</i> oriR6K; Sm <sup>r</sup>	(Huguet <i>et al.</i> 1998)
pRK2013	ColE1 replicon, TraRK <sup>+</sup> Mob <sup>+</sup> ; Km <sup>r</sup>	(Figurski and Helinski 1979)
pBGUS	pBlueskript (II) KS carrying the <i>uidA</i> gene	(Escolar <i>et al.</i> 2001)
pDSM100	pDSK602 expressing AvrBs1-c-myc	(Escolar <i>et al.</i> 2001)
pDS300F	pDSK602 expressing AvrBs3; FLAG-tagged	(Van den Ackerveken <i>et al.</i> 1996)
pDSM440	pDSK602 expressing AvrBsT-c-myc under the control of its own promoter	(Escolar <i>et al.</i> 2001)
pLAZ13	pLAFR3 expressing PopA from <i>R. solanacearum</i>	(Rossier <i>et al.</i> 1999)
pDM20	pDSK602 expressing HpaB-c-myc	this study
pDM30	pDSK602 expressing HpaE-c-myc	this study
pLhrpE	pLAFR3 carrying 1.6-kb insert spanning the <i>hrpE</i> operon	this study

pLP1GUS	pLAFR6 containing 562-bp upstream region, ORF1 and a promoterless <i>uidA</i> gene	this study
pLP2GUS	pLAFR6 containing ORF1, the first 449 bp of <i>hpaD</i> and a promoterless <i>uidA</i> gene	this study
pDH10	pDSK602 containing ORF1; His <sub>6</sub> -tagged	this study
pLH10D	pLAFR3 containing ORF1 and <i>hpaD</i>	this study
pLH11D	pLAFR3 containing ORF1 with internal HA epitope and <i>hpaD</i>	this study
pLH12D	pLAFR3 containing ORF1 with internal stop and <i>hpaD</i>	this study
pDD	pDSK602 expressing HpaD	this study

<sup>a</sup> Ap, ampicillin; Km, kanamycin; Rif, rifampicin; Sm, spectinomycin; Tc, tetracycline; r, resistant.

### Construction of *hpaB* and *hpaE* expression plasmids

To construct a C-terminally triple-*c-myc* tagged version of *hpaB*, the gene was amplified by PCR from construct pBhrpE, using primers *hpaB*-for (5'-CGAATTCGTCCATGTCTCACCACAGATC-3') and *hpaB*-rev (5'-CGAGCTCGGCGCGTAACCACAGATAGTT-3') and ligated into the *EcoRI/SacI* sites of pC3003 (kindly provided by J. Kämper), in frame with a triple-*c-myc* epitope. The *c-myc*-tagged *hpaB* was then cloned into pDSK604, giving pDM20.

Similarly, *hpaE* was amplified by PCR, using primers *hpaE*-for (5'-CGAATTCATGGCACACCAACTTGGCTT-3') and *hpaE*-rev (5'-TGAGCTCGCTGCCGTCGCGGGTGT-3'). The PCR product was subcloned into pC3003 and then introduced into pDSK604, giving pDM30.

For complementation studies, a 1.6-kb *ClaI* fragment spanning the *hrpE* operon was subcloned into pBluescript KS and then cloned into pLAFR3, giving pLhrpE.

For overexpression of HpaB and HpaE in *E. coli*, the *hpaB* and *hpaE* PCR products described above were cloned into the *EcoRI/SacI* sites of pGEX-2TKM, giving pG20 and pG30.

### Construction of *hpaD* expression plasmids

For overexpression of HpaD in *E. coli*, *hpaD* was amplified by PCR, using primers *hpaD*-for (5'-TCAGAGAATTCGTGAACTCTCCAGCGAT-3') and *HpaD*-rev (5'-CAATCGAGCTCTCATGCTCGCCC-3'). The PCR product was cloned by *EcoRI/SacI* digestion into pGEX-2TKM, giving pGD.

For *hpaD* expression in *X. campestris* pv. *vesicatoria*, the *EcoRI/SacI* insert of pGD was subcloned into pUC119 and then introduced by *EcoRI/HindIII* digestion into pDSK602, giving pDD. To construct C-terminally His<sub>6</sub>-tagged versions of HpaD, a

2.5-kb *ApaI/SaII* fragment containing 113 bp upstream region of ORF1, ORF1 and *hpaD* was cloned into pUC119, giving pU10D. The 3' end of *hpaD* in this construct was amplified by PCR, using primers hpaD-D (5'-CGATCGCGACCATCGATGCGG-3') and hpaD-E (5'-GCAGCTGAGGATATCTGCTCGCC-3'), and the PCR product was ligated into the *ClaI/EcoRV* sites of pBlueskript (II) KS-His<sub>6</sub>, in frame with a His<sub>6</sub> epitope. The *ClaI/HindIII* insert of this construct was used to replace the 3' end of *hpaD* in pU10D, giving pUH10D. The *EcoRI/HindIII* insert of pUH10D was then cloned into pLAFR3, giving pLH10D.

To analyze the influence of ORF1 on HpaD expression, a stop codon was introduced into the ORF1 sequence in construct pLH10D. For this, 113 bp upstream region of ORF1 and the first six codons of ORF1 were PCR-amplified, using primers ORF1-A (5'-GACCATTCTGGGCCCTGCCGGCATGC-3') and ORF1-B (5'-TGCTCCTGCAGTCACGACAGCAG-3'), thus introducing a stop codon after the fourth codon of ORF1. The PCR product was used to replace the 131-bp *ApaI/PstI* fragment of pUH10D. The *EcoRI/HindIII* insert of the resulting construct was cloned into pLAFR3, giving pLH12D.

### **Construction of ORF1 expression plasmids**

ORF1 was amplified by PCR from construct pLH10D using primers ORF1-for (5'-GTATCGAATTCATTATGGCCTTCCCGGAAGTGATC-3') and ORF1-rev (5'-TGCATGATATCCGAGGCCACCTCCTTGGC-3'). The PCR product was subcloned into the *EcoRI/EcoRV* sites of pBlueskript II KS-His<sub>6</sub>, in frame with a His<sub>6</sub> epitope, and then ligated into the *EcoRI/HindIII* sites of pDSK602, giving pDH10.

To express an epitope-tagged version of ORF1 simultaneously with *hpaD*, a 650-bp *PstI* fragment spanning ORF1 and the 5' end of *hpaD* was amplified from construct pLH10D, using primers ORF1-C (5'-TCGCTGCAGTACCCTTACGATGTTCTGATTACGCAGAGCAACTGC-3'), which contains the coding sequence of the HA epitope, and HpaD-C (5'-GGCCTGCAGGGCCGTCTG-3'). The PCR product was used to replace the 650-bp *PstI* fragment in construct pLH10D, giving pLH11D.

### **Protein expression, purification and antibody production**

For the production of polyclonal antisera, HpaB, HpaE and HpaD were expressed as glutathione S-transferase (GST) fusion proteins, respectively. Bacteria were grown in Super medium (Qiagen) at 37°C. Expression was induced at OD (600 nm) = 0.7 with



IPTG (2 mM final concentration) for 2 h at 37°C. Cells were harvested, broken with a French press and inclusion bodies were pelleted by centrifugation. After extensive washing with PBS, inclusion bodies were resuspended in Laemmli buffer (Laemmli 1970) and the proteins were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie staining. The major protein bands corresponding to HpaB, HpaE and HpaD, respectively, were excised from the gel and used for immunization of rabbits (Eurogentec, Herstal, Belgium).

### **Secretion experiments and protein analysis**

Bacteria were cultivated in minimal medium A overnight and resuspended to a concentration of  $10^8$  CFU/ml in minimal medium A at pH5.4 (acidified by the addition of HCl and containing 100 µg/ml BSA). After 3 h of cultivation, 0.5 ml of total cultures was pelleted by centrifugation (10,000 g for 10 min at 4°C) and resuspended in 1/10th volume of Laemmli buffer. 2 ml of culture supernatants were filtered with a low-protein-binding filter (HT Tuffryn; 0.45 µm; PALL Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI), precipitated with 10% trichloroacetic acid and resuspended in 1/100th volume of Laemmli buffer. 10 µl aliquots of cell extracts and 15 µl aliquots of supernatants, adjusted for equal protein loading, were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. The primary antibodies used were polyclonal antisera against HrpF (Büttner *et al.* 2002), AvrBs3 (Knoop *et al.* 1991), HrcN (Rossier *et al.* 2000), HrcC (Wengelnik *et al.* 1996a), XopA (Noël 2001), HpaD (this study), HpaB (this study), HpaE (this study) and PopA (provided by C. Boucher, Toulouse, France) as well as monoclonal antibodies directed against His<sub>6</sub> (Qiagen) and c-myc epitopes (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany). Horseradish peroxidase-labelled goat anti-rabbit and anti-mouse antibodies (Amersham Pharmacia Biotech) were used as secondary antibodies. Reactions were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech).

**References**

- Aldridge, P. and Hughes, K.T. 2001. How and when are substrates selected for type III secretion? *Trends Microbiol.*, **9**, 209-214.
- 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.
- Arlat, M., Van Gijsegem, F., Huet, J.C., Pernollet, J.C. and Boucher, C.A. 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.
- Astua-Monge, G., Minsavage, G.V., Stall, R.E., Davis, M.J., Bonas, U. and Jones, J.B. 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.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (eds.) 1996. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Ballvora, A., Pierre, M., van den Ackerveken, G., Schornack, S., Rossier, O., Ganal, M., Lahaye, T. and Bonas, U. 2001. Genetic mapping and functional analysis of the tomato *Bs4* locus governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AvrBs4 protein. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **14**, 629-638.
- Bennett, J.C. and Hughes, C. 2000. From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperones. *Trends Microbiol.*, **8**, 202-204.
- Bogdanove, A., 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., 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.
- 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.
- Brown, I., Mansfield, J. and Bonas, U. 1995. *hrp* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* determine ability to suppress papillae deposition in pepper mesophyll cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **8**, 825-836.
- Brown, I.R., Mansfield, J.W., Taira, S., Roine, E. and Romantschuk, M. 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.
- 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.
- Cornelis, G.R. and Van Gijsegem, F. 2000. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**, 735-774.
- Da Silva, A.C., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., *et al.* and Kitajima, J.P. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, **417**, 459-463.

- Daniels, M.J., Barber, C.E., Turner, P.C., Sawczyc, 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.
- El-Maarouf, H., Barny, M.A., Rona, J.P. and Bouteau, F. 2001. Harpin, a hypersensitive response elicitor from *Erwinia amylovora*, regulates ion channel activities in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *FEBS Lett.*, **497**, 82-84.
- Escobar, L., Van den Ackerveken, G., Pieplow, S., Rossier, O. and Bonas, U. 2001. Type III secretion and *in planta* recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. *Mol. Plant Pathol.*, **2**, 287-296.
- Fenselau, S., Balbo, I. and Bonas, U. 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.
- 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. 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.
- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **9**, 275-296.
- He, S.Y. 1998. Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **36**, 363-392.
- Hu, W., Yuan, J., Jin, Q.L., Hart, P. and He, S.Y. 2001. Immunogold labeling of Hrp pili of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* assembled in minimal medium and *in planta*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **14**, 234-241.
- Hueck, C.J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 379-433.
- Huguet, E. and Bonas, U. 1997. *hrpF* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes an 87-kDa protein with homology to NolX of *Rhizobium fredii*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **10**, 488-498.
- 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.
- Isberg, R.R. and Dumenil, G. 2001. Delivering dangerous cargoes. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 1006-1008.
- Jin, Q. and He, S.Y. 2001. Role of the Hrp Pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Science*, **294**, 2556-2558.
- Jin, Q., Hu, W., Brown, I., McGhee, G., Hart, P., Jones, A.L. and He, S.Y. 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.
- Klaff, P., Riesner, D. and Steger, G. 1996. RNA structure and the regulation of gene expression. *Plant Mol. Biol.*, **32**, 89-106.
- Klement, Z. 1982. Hypersensitivity. In Mount, M.S. and Lacy, G.H. (eds.), *Phytopathogenic prokaryotes*. Academic Press, New York, Vol. 2, 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.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lee, J., Klessig, D.F. and Nürnberger, T. 2001. A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene *hin1* independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *Plant Cell*, **13**, 1079-1093.
- Li, C.M., Brown, I., Mansfield, J., Stevens, C., Boureau, T., Romantschuk, M. and Taira, S. 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.
- Lindgren, P.B. 1997. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **35**, 129-152.
- Lloyd, S.A., Forsberg, A., Wolf-Watz, H. and Francis, M.S. 2001. Targeting exported substrates to the *Yersinia* TTSS: different functions for different signals? *Trends Microbiol.*, **9**, 367-371.
- Ménard, 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.
- Morris, D.R. and Geballe, A.P. 2000. Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 8635-8642.
- Mudgett, M.B., Chesnokova, O., Dahlbeck, D., Clark, E.T., Rossier, O., Bonas, U. and Staskawicz, B.J. 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.
- Murillo, J., Shen, H., Gerhold, D., Sharma, A., Cooksey, D.A. and Keen, N.T. 1994. Characterization of pPT23B, the plasmid involved in syringolide production by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* PT23. *Plasmid*, **31**, 275-287.
- Noël, L. 2001. Thesis. Utilisation de la technique de cDNA-AFLP pour l'étude d'un transcriptome procaryote: identification et caractérisation du régulon *hrp* chez *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Université de Paris-Sud, Paris.
- 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., Nennstiel, D. and Bonas, U. 2002. Two novel type III system-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *J. Bacteriol.*, **184**, 1340-1348.
- Rainbow, L., Hart, C.A. and Winstanley, C. 2002. Distribution of type III secretion gene clusters in *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. mallei*. *J. Med. Microbiol.*, **51**, 374-378.
- Roine, E., Saarinen, J., Kalkkinen, N. and Romantschuk, M. 1997. Purified HrpA of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 reassembles into pili. *FEBS Lett.*, **417**, 168-172.

- Romantschuk, M., Roine, E. and Taira, S. 2001. Hrp pilus - reaching through the plant cell wall. *Eur. J. Plant Pathol.*, **107**, 153-160.
- Rossier, O. 1999. Thesis. Étude du système de sécrétion de type III chez la bactérie phytopathogène *Xanthomonas campestris* pathovar *vesicatoria*. Université Paris, Paris.
- 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.
- 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.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, *et al.* and Boucher, C.A. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*, **415**, 497-502.
- Schesser, K., Frithz-Lindsten, E. and Wolf-Watz, H. 1996. Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes. *J. Bacteriol.*, **178**, 7227-7233.
- Sory, M.P., Boland, A., Lambermont, I. and Cornelis, G.R. 1995. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11998-12002.
- Staskawicz, B.J., Dahlbeck, D., Keen, N. and Napoli, C. 1987. Molecular characterization of cloned avirulence genes from race0 and race1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J. Bacteriol.*, **169**, 5789-5794.
- Van den Ackerveken, G., Marois, E. and Bonas, U. 1996. Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell*, **87**, 1307-1316.
- Van Gijsegem, F., Vasse, J., Camus, J.C., Marena, M. and Boucher, C. 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.
- Vieira, J. and Messing, J. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.*, **153**, 3-11.
- Wei, W., Plovianich-Jones, A., Deng, W.L., Jin, Q.L., Collmer, A., Huang, H.C. and He, S.Y. 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.
- 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. 1996a. 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.
- Wengelnik, K., Van den Ackerveken, G. and Bonas, U. 1996b. HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **9**, 704-712.

### 2.2.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Das vorangegangene Manuskript beschreibt die Charakterisierung der Region zwischen *hrpE1* und *hrpF* im *hrp*-Gencluster von *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Durch Analyse von Deletionsmutanten wurde der Einfluß individueller Gene auf die bakterielle Pathogenität sowie auf die Typ-III-abhängige Proteinsekretion *in vitro* analysiert. Phänotypische Analysen zeigten, daß *hpaB* und *hpaE*, zwei Gene im *hrpE*-Operon, für die volle Virulenz- und Avirulenzaktivität von *X. campestris* pv. *vesicatoria* essentiell sind. Durch *in vitro*-Sekretionsanalysen konnte zudem eine Beteiligung von *hpaB* an der Sekretion von Effektorproteinen sowie des heterolog exprimierten PopA-Proteins von *R. solanacearum* nachgewiesen werden. Dagegen war die Sekretion von HrpF und XopA in *hpaB*-Mutanten nicht beeinträchtigt.

Ein ähnlicher Sachverhalt trat in Deletionsmutanten der Region von ORF1 und *hpaD* auf. Durch DNA-Sequenzanalysen wurden ORF1 und *hpaD* als potentielle Gene in der ca. 3,6-kb großen Region zwischen dem *hrpE*-Operon und *hrpF* identifiziert. Die Analyse von Promotor-GUS-Fusionen zeigte, daß ORF1 und *hpaD* stromabwärts eines *hrpG*- und *hrpX*-abhängigen Promotors lokalisiert sind. In Proteinexpressionsstudien wurde HpaD jedoch nur nach Überexpression vom lac-Promotor und nicht unter *hrp*-Gen-induzierenden Bedingungen detektiert. Das potentielle ORF1-Protein konnte immunologisch nicht nachgewiesen werden.

Wie phänotypische Analysen zeigten, sind ORF1/*hpaD*-Mutanten in ihrer Interaktion mit resistenten und suszeptiblen Wirtspflanzen nicht beeinträchtigt. *In vitro* dagegen führte die Deletion von ORF1/*hpaD* zu einer reduzierten Sekretion von AvrBs3, nicht jedoch von HrpF und XopA. Diese Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung von Hpa-Proteinen an der Sekretion von Effektorproteinen hin.

### 3. Diskussion

#### 3.1 Die Typ-III-abhängige Proteintranslokation in tier- und pflanzenpathogenen Bakterien

In dieser Arbeit konnten Einblicke in die möglichen Funktionen nicht-konservierter Hrp-Proteine während der Typ-III-abhängigen Proteinsekretion und –translokation gewonnen werden. Der gerichtete Transport von Effektorproteinen über beide bakterielle Membranen (Sekretion) sowie über die eukaryontische Plasmamembran (Translokation) ist ein grundlegender Prozeß während der Interaktion Gram-negativer bakterieller Pathogene mit ihren Wirtszellen. Die Translokation von Effektorproteinen erfolgt vermutlich mit Hilfe des postulierten bakteriellen Typ-III-Translokons, das in die Wirtszellmembran inseriert. Potentielle Komponenten des Typ-III-Translokons, sogenannte Typ-III-Translokonproteine, wurden in tierpathogenen Bakterien der Spezies *Yersinia*, *P. aeruginosa*, *S. flexneri*, enteropathogene *E. coli* (EPEC) und *Salmonella* identifiziert (Tab. 5). Als Typ-III-Translokonproteine werden hier solche Proteine bezeichnet, die für die Proteintranslokation essentiell sind und in Membranen inserieren können. In pflanzenpathogenen Bakterien ist HrpF das erste bekannte Typ-III-Translokonprotein. HrpF inseriert, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, in Membranen und ist, wie Experimente mit einem AvrBs2-Adenylatcyclase-Reporterkonstrukt kürzlich bestätigten, essentiell für die Proteintranslokation in die Wirtszelle (Casper-Lindley *et al.*, 2002).

Viele der bisher bekannten Typ-III-Translokonproteine weisen untereinander Sequenzhomologien auf (Büttner und Bonas, 2002). Zudem besitzen sie häufig potentielle Transmembran- und/oder „coiled coil“-Regionen (Abb. 8). Dies deutet darauf hin, daß Typ-III-Translokonproteine möglicherweise als Komplex aus mehreren Proteinen in die Wirtszellmembran inserieren, da „coiled coil“-Regionen häufig an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind (Burkhard *et al.*, 2001). In der Tat konnte eine Interaktion von Typ-III-Translokonproteinen untereinander und/oder mit sich selbst in vielen tierpathogenen Bakterien nachgewiesen werden (Tab. 5).

Einige der Typ-III-Translokonproteine werden vermutlich selbst in die Wirtszelle transloziert (Tab. 5). Dieser für Komponenten eines Transmembrankanals überraschende Sachverhalt deutet auf eine duale Funktion dieser Translokonproteine hin. So konnte für IpaC von *S. flexneri* und SipC von *Salmonella* spp. gezeigt werden, daß sie die Polymerisierung von Aktinfilamenten im Wirtszellcytosol initiieren (Nhieu

und Sansonetti, 1999; Hayward und Koronakis, 1999). IpaB und SipB dagegen induzieren die Apoptose von Makrophagen, indem sie an eine cytosolische Protease der Wirtszelle binden (Hilbi *et al.*, 1998; Hersh *et al.*, 1999).

Für HrpF von *X. campestris* pv. *vesicatoria* gibt es bislang keinerlei Hinweise auf eine Translokation über die pflanzliche Zellmembran. So konnte in dieser Arbeit mit Hilfe von HrpF-AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporterkonstrukten kein funktionelles Translokationssignal im N-Terminus von HrpF nachgewiesen werden (s. 2.1.1 und 2.1.2.1). Auch für LcrV und PcrV, die vermutlich den Kanal des Typ-III-Translokons in *Yersinia* spp. bzw. *P. aeruginosa* bilden (Holmström *et al.*, 2001), wurde bisher keine Translokation in die Wirtszelle gezeigt. Möglicherweise sind die kanalbildenden Komponenten des Typ-III-Translokons von einer Translokation ausgeschlossen und bleiben in der eukaryontischen Zellmembran lokalisiert.

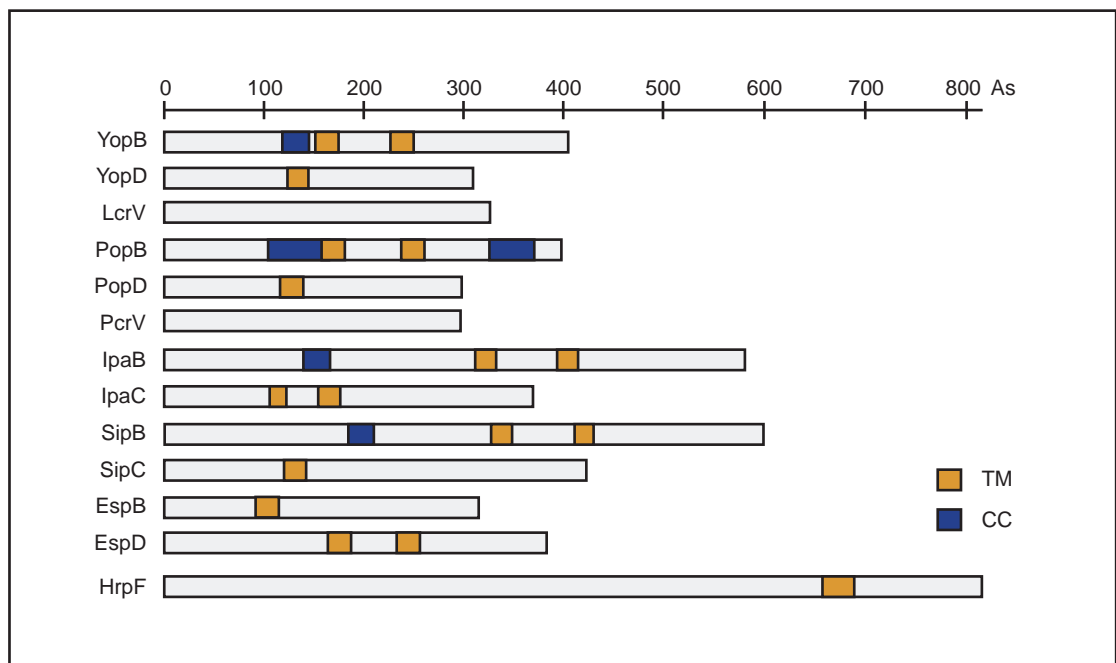


Abbildung 8: Strukturmerkmale von Typ-III-Translokonproteinen.

Potentielle Transmembran (TM)- und „coiled coil“ (CC)-Regionen wurden mit Hilfe des TM-PRED-Programmes ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html); 17-33 Aminosäurereste, Werte über 1000) bzw. mit Hilfe des MULTICOIL-Programmes (<http://nightingale.lcs.mit.edu/cgi-bin/multicoil>; Wahrscheinlichkeiten über 80%) identifiziert (nach Büttner und Bonas, 2002).



Aufgrund der bisher bekannten Eigenschaften von Typ-III-Translokonproteinen tierpathogener Bakterien wurde eine kanalförmige Struktur des Typ-III-Translokons postuliert (s. 1.3.7). Die in dieser Arbeit beschriebenen experimentellen Daten zu HrpF lassen vermuten, daß die Typ-III-abhängige Proteintranslokation auch in pflanzenpathogenen Bakterien durch einen Proteinkanal erfolgt. So deutet der stufenweise Anstieg der Ionenleitfähigkeit in Lipidbilayersystemen nach Zugabe von rekombinanten HrpF-Protein (s. 2.1.1) auf die Bildung von Transmembrankanälen hin. Neben HrpF konnte eine Kanalbildung in künstlichen Membranen durch isolierte Typ-III-Translokonproteine für LcrV und PcrV (s. oben) nachgewiesen werden (Holmström *et al.*, 2001). Dagegen wurde für *S. flexneri* und *E. coli* die Bildung eines kanalförmigen Typ-III-Translokons hauptsächlich aufgrund der bakteriellen lytischen Aktivitäten auf Erythrozyten postuliert (s. 1.3.7). Für *Salmonella* spp. gibt es bislang noch keine Hinweise auf die Bildung eines Translokationskanals in der Wirtszellmembran (Hayward *et al.*, 2000). So induziert *Salmonella* spp. weder die Lyse von Erythrozyten noch konnte für das potentielle Typ-III-Translokonprotein SipB eine porenbildende Aktivität in künstlichen Membranen nachgewiesen werden (Tab. 5; Hayward *et al.*, 2000). Möglicherweise wird die Öffnung des Translokationskanals, die vermutlich reguliert verläuft, um eine Lyse der Wirtszellen zu vermeiden, unter den gegebenen experimentellen Bedingungen inhibiert.

Alternativ könnten jedoch auch andere nicht-kanalförmige Proteinstrukturen an der Typ-III-abhängigen Proteintranslokation durch *Salmonella* spp. beteiligt sein. Nicht-kanalförmige Proteinstrukturen treten beispielsweise vermutlich bei einigen bakteriellen A-B-Toxinen auf. A-B-Toxine bestehen aus zwei Proteindomänen, von denen die B-Domäne in der Zielzellmembran einen Kanal für den Transport der katalytisch aktiven A-Domäne bildet (Falnes und Sandvig, 2000). Es konnte jedoch gezeigt werden, daß der Transport der A-Domäne von Diphtheriatoxin auch unabhängig von der Porenbildung durch die B-Domäne erfolgt (Lanzrein *et al.*, 1996). Es bleibt daher zu klären, ob die mit Hilfe von Lipidbilayersystemen nachgewiesene Porenbildung durch die Typ-III-Translokonproteine HrpF, LcrV und PcrV essentiell für die Translokation von Effektorproteinen *in vivo* ist. Hierfür könnten beispielsweise Aminosäuren in den hydrophoben Proteinbereichen, die möglicherweise an der Kanalbildung beteiligt sind, gezielt mutiert werden und mutante Proteine anschließend auf eine porenbildende Aktivität in künstlichen Membranen sowie auf ihre *in vivo*-Funktionalität analysiert werden.

Interessanterweise inserieren von den Substraten des TTSS vermutlich nicht nur Typ-III-Translokonproteine, sondern auch Harpin-Proteine in die Wirtszellmembran. So konnte PopA von *R. solanacearum* nach transienter Expression in Tabak in der pflanzlichen Plasmamembran lokalisiert werden (s. 1.3.6.1). Desweiteren wurde für HrpZ von *P. syringae* nicht nur eine Membraninsertion, sondern auch eine porenbildende Aktivität in künstlichen Membranen nachgewiesen (Lee *et al.*, 2001b). Die Funktion von PopA und HrpZ ist nicht bekannt. Möglicherweise könnten auch sie an der Translokation von Effektorproteinen in die Wirtszelle beteiligt sein. Im Gegensatz zu Typ-III-Translokonproteinen sind PopA und HrpZ jedoch nicht essentiell für die bakterielle Pathogenität (Arlat *et al.*, 1994; Charkowski *et al.*, 1998; Alfano *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2001b). Vermutlich erfolgt daher in *R. solanacearum* bzw. *P. syringae* die Proteintranslokation in die Wirtszelle noch durch andere Proteine.

Sowohl PopA als auch HrpZ besitzen hydrophobe Aminosäurebereiche, mit deren Hilfe sie möglicherweise in die Wirtszellmembran inserieren. Für HrpZ konnte durch die Analyse verschiedener Deletionsderivate nachgewiesen werden, daß diese Proteinregionen essentiell für die Membraninsertion von HrpZ sind (Lee *et al.*, 2001b). Auch HrpF besitzt hydrophobe Aminosäurebereiche. Diese wurden wie die hydrophoben Proteinregionen anderer potentieller Typ-III-Translokonproteine als Transmembranregionen vorhergesagt (Abb. 8; Huguet und Bonas, 1997) und sind, wie in phänotypischen Komplementationsanalysen gezeigt wurde, von entscheidender Bedeutung für die Proteinfunktion (s. 2.1.1). Für die Interaktion von HrpF mit künstlichen Membranen ist die hydrophobe Proteinregion jedoch nicht essentiell, wie die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Membraninsertionsstudien zeigten.

Bisher wurde eine direkte Beteiligung potentieller Transmembranregionen von Typ-III-Translokonproteinen an der Membraninsertion nur für IpaC von *S. flexneri* und SipB von *Salmonella* spp. nachgewiesen (Picking *et al.*, 2001; McGhie *et al.*, 2002). So konnte für SipB gezeigt werden, daß die hydrophoben Aminosäurebereiche die Membran durchspannen. Dabei lagert sich die C-terminale Proteinregion von SipB an die Membranoberfläche an und ermöglicht dadurch auch in Abwesenheit der Transmembranregionen eine Interaktion des Proteins mit künstlichen Membranen (McGhie *et al.*, 2002).

Tabelle 5: Typ-III-Translokonproteine in Gram-negativen bakteriellen Pathogenen<sup>a</sup>.

Pathogen <sup>b</sup>	Translokonprotein <sup>c</sup>	Porenaktivität <sup>d</sup>		geschätzte Porengröße <sup>f</sup>	Protein-Protein-Interaktionen	Funktion in der Wirtszelle	Literatur
		Erythrozytenlyse <sup>e</sup>	Lipidbilayersystem				
<i>Yersinia</i> spp.	YopB (401)	+	-	1,2-3,5 nm	YopB-YopD	YopD	(Håkansson <i>et al.</i> , 1996; Holmström <i>et al.</i> , 2001; Neyt und Cornelis, 1999a; Neyt und Cornelis, 1999b; Sarker <i>et al.</i> , 1998a; Francis und Wolf-Watz, 1998)
	YopD (306)	+	n.d.	1,6-2,3 nm	LcrV-YopB		
	LcrV (326)	+	+	3 nm	LcrV-YopD		
<i>P.aeruginosa</i>	PopB (390)	+	n.d.	2,8-3,5 nm	n.d.	n.d.	(Holmström <i>et al.</i> , 2001; Dacheux <i>et al.</i> , 2001)
	PopD (295)	+	n.d.	2 nm			
	PcrV (294)	+	+				
<i>S. flexneri</i>	IpaB (580)	+	n.d.	2,5 nm	IpaC-IpaB	IpaB	(Blocker <i>et al.</i> , 1999; Menard <i>et al.</i> , 1996; Davis <i>et al.</i> , 1998)
	IpaC (363)	+	n.d.		IpaC-IpaC		
EPEC	EspD (380)	+	n.d.	3-5 nm	EspD-EspB	EspB	(Ide <i>et al.</i> , 2001; Wolff <i>et al.</i> , 1998; Daniell <i>et al.</i> , 2001)
	EspB (312)	+/-	n.d.		EspD-EspD		
<i>Salmonella</i> spp.	SipB (593)	-	-	n.d.	SipB-SipB	SipB	(Hayward <i>et al.</i> , 2000; Hayward und Koronakis, 1999; Hersh <i>et al.</i> , 1999)
	SipC (409)	-	n.d.		SipC-SipC	SipC	
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	HrpF (806)	n.d.	+	n.d.	n.d.	-	(Büttner <i>et al.</i> , 2002)

<sup>a</sup> Für die Definition von Typ-III-Translokonproteinen siehe Text.

<sup>b</sup> EPEC, enteropathogene *E. coli*.

<sup>c</sup> Die Größe der Translokonproteine ist in Aminosäuren angegeben.

<sup>d</sup> Die hier angegebenen Porenaktivitäten basieren auf bakteriellen lytischen Aktivitäten auf Erythrozyten sowie der Induktion von Stromflüssen in Lipidbilayersystemen durch isolierte Translokonproteine.

<sup>e</sup> +, Protein ist für die bakterielle lytische Aktivität auf Erythrozyten essentiell; n.d., nicht getestet.

<sup>f</sup> In einigen Fällen wurden voneinander abweichende Porengrößen bestimmt und sind angegeben.

Eine Möglichkeit zur Identifizierung membranspannender Proteinregionen bieten Liposomen, die photoaktivierbares 3-(Trifluoromethyl)-3-(m-[<sup>125</sup>I]iodophenyl)diazirin ([<sup>125</sup>I]TID) enthalten. [<sup>125</sup>I]TID lagert sich in die hydrophobe Phase der Liposomenmembran ein und interagiert nach Bestrahlung spezifisch mit den Transmembranregionen inserierter Proteine (Brunner und Semenza, 1981; Brunner, 1989). Auf diese Weise markierte Proteine können dann nach SDS-PAGE und Autoradiographie detektiert werden. Durch eine derartige Analyse verschiedener Deletionsderivate von HrpF könnte eindeutig geklärt werden, welche Proteinregionen in die Membran inserieren.

Die hydrophobe Proteinregion von HrpF könnte auch an der Interaktion von HrpF mit sich selbst und/oder mit anderen Proteinen beteiligt sein, die die *in vivo*-Funktionalität des Typ-III-Translokons entscheidend beeinflussen. Ähnlich wie bei tierpathogenen Bakterien wird das Typ-III-Translokon von *X. campestris* pv. *vesicatoria* vermutlich von mehreren Proteinen gebildet. Eine weitere potentielle Komponente ist möglicherweise XopA, ein sekretiertes Protein, das für die volle Virulenz- und Avirulenzaktivität von *X. campestris* pv. *vesicatoria*, nicht jedoch für die Typ-III-abhängige Proteinsekretion *in vitro* essentiell ist (Noël *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu HrpF können in XopA mit Hilfe des TM-PRED-Programmes ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html); 17-33 Aminosäurereste, Werte über 1000) jedoch keine Transmembranregionen vorhergesagt werden. Zudem konnte in ersten Experimenten keine Interaktion von XopA mit künstlichen Membranen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist XopA daher nicht als membranständige Komponente, sondern als peripher assoziiertes Protein des Typ-III-Translokons am Transportprozeß beteiligt.

In weiteren Experimenten soll daher z.B. mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (Fields und Song, 1989) untersucht werden, ob HrpF mit sich selbst und/oder mit XopA interagiert. Außerdem soll geklärt werden, ob HrpF an das Hrp-Pilusprotein HrpE1 binden kann. Bisher ist nicht bekannt, ob der Hrp-Pilus, der als Transportkanal für sekretierte und translozierte Proteine dient (s. 1.3.3), mit dem Typ-III-Translokon in Kontakt steht.

Diese Experimente könnten jedoch dadurch erschwert werden, daß HrpF auch unspezifische Bindungen mit anderen Proteinen eingeht. Aus diesem Grunde gelang beispielsweise der Nachweis einer HrpF-HrpF-Interaktion in *E. coli* mit Hilfe von *in*

*in vitro* „GST-pull-down“-Experimenten (Smith und Johnson, 1988) bisher nicht. So wurde zwar gezeigt, daß das Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein HrpFGST an rekombinantes His<sub>6</sub>-markiertes HrpF bindet, die Spezifität dieser Interaktion konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es bleibt zu klären, ob ähnliche Probleme bei Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems auftreten. Wäre dies nicht der Fall, könnten nicht nur definierte Protein-Protein-Interaktionen getestet, sondern auch eine genomische Bibliothek von *X. campestris* pv. *vesicatoria* zur Identifizierung von HrpF-Interaktionspartnern gesichtet werden. Diese Analysen würden erste Hinweise auf die Zusammensetzung des Typ-III-Translokons in *X. campestris* pv. *vesicatoria* liefern.

### 3.2 Die Typ-III-abhängige Proteinsekretion – ein komplexer Prozeß

#### 3.2.1 Besitzt *X. campestris* pv. *vesicatoria* Typ-III-Sekretionschaperone?

Die in dieser Arbeit beschriebenen Analysen der *hpa*-Gene in der Region zwischen *hrpE* und *hrpF* deuten darauf hin, daß das TTSS von *X. campestris* pv. *vesicatoria* bestimmte Proteine wie beispielsweise HpaB rekrutiert, um Effektorproteine effizient zu sekretieren.

HpaB ist ein kleines, saures Protein und besitzt damit typische Merkmale von Typ-III-Sekretionschaperonen. Diese wurden bisher überwiegend in tierpathogenen Bakterien identifiziert und sind hier für die Stabilität sowie die Sekretion von Effektorproteinen essentiell (s. 1.3.5; Bennett und Hughes, 2000). In pflanzenpathogenen Bakterien ist DspB von *E. amylovora* bisher das einzige bekannte Typ-III-Sekretionschaperon. DspB interagiert mit dem Virulenzfaktor DspA und ist für dessen Stabilität und/oder Sekretion essentiell (Gaudriault *et al.*, 1997; Gaudriault *et al.*, 2002).

In *X. campestris* pv. *vesicatoria* wurden noch keine Typ-III-Sekretionschaperone identifiziert. Ein möglicher Kandidat ist HpaB, welches ähnlich zu den bisher bekannten Typ-III-Sekretionschaperonen für die effiziente Sekretion von Effektorproteinen essentiell ist. Dabei wird jedoch nicht nur die Sekretion eines, sondern mehrerer Proteine, darunter auch das PopA-Protein von *R. solanacearum*, von HpaB entscheidend beeinflusst. Repräsentiert HpaB demnach eine neue Klasse von Typ-III-Sekretionschaperonen, die sich durch eine geringe Substratspezifität auszeichnet? Die bisher bekannten Chaperone des TTSS interagieren spezifisch nur mit einem oder zwei

Substraten, wobei sie an die N-terminalen 50-100 Aminosäuren binden (Bennett und Hughes, 2000). In Effektorproteinen enthält diese Proteinregion vermutlich das Translokationssignal (Sory *et al.*, 1995; Schesser *et al.*, 1996; Mudgett *et al.*, 2000). Bisher ist nicht bekannt, ob auch HpaB mit Effektorproteinen interagiert. In weiteren Experimenten sollen daher HpaB-Interaktionspartner beispielsweise mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems identifiziert werden.

Neben *hpaB* wurde in dieser Arbeit mit ORF1 und *hpaD* ein weiterer Sequenzabschnitt des *hrp*-Genclusters identifiziert, der möglicherweise an der Typ-III-abhängigen Sekretion von Effektorproteinen beteiligt ist. So ist in ORF1/*hpaD*-Doppelmutanten die Sekretion von AvrBs3, nicht jedoch von HrpF und XopA reduziert. Ob dies auf die Deletion von ORF1 oder *hpaD* zurückzuführen ist, soll in weiteren Experimenten durch die Analyse von Einzelmutanten geklärt werden.

### 3.2.2 Die Kontrolle der Typ-III-abhängigen Proteinsekretion

Die Typ-III-abhängige Proteinsekretion ist kein konstitutiver Prozeß. *In vivo* finden Bildung des Sekretionsapparates und Proteinexport vermutlich erst in der Nähe bzw. nach Kontakt mit der Wirtszelle statt. So werden beispielsweise in *R. solanacearum* die *hrp*-Gene in Gegenwart kultivierter Pflanzenzellen stark induziert (Marenda *et al.*, 1998). Zudem konnte in den tierpathogenen Bakterien *S. flexneri* und *Yersinia* spp. nachgewiesen werden, daß die Sekretion bzw. Translokation von Effektorproteinen erst nach Kontakt der Bakterien zu eukaryontischen Zellen erfolgt (Menard *et al.*, 1994; Rosqvist *et al.*, 1994; Sory und Cornelis, 1994).

In *Yersinia* spp. wird der Sekretionskanal vermutlich durch die Proteine YopN, TyeA und LcrG blockiert, die möglicherweise als Sensoren dienen und die Sekretion von Effektorproteinen erst nach Kontakt der Bakterien zur Wirtszelle freigeben (Cornelis, 1998). So führt die Mutation von *yopN*, *tyeA* oder *lcrG* auch in Abwesenheit von eukaryontischen Zellen zu einer konstitutiven Sekretion von Effektorproteinen in das extrazelluläre Medium (Sarker *et al.*, 1998b; Forsberg *et al.*, 1991; Skrzypek und Straley, 1993; Iriarte *et al.*, 1998).

Ähnlich wie in *Yersinia* spp. wird die Typ-III-abhängige Proteinsekretion vermutlich auch in *S. flexneri* reguliert. Hier führt die Abwesenheit von IpaB, einem Typ-III-Translokonprotein, sowie von IpaD, einem hydrophilen Substrat des TTSS, zu einer

konstitutiven Sekretion von Ipa-Proteinen in das extrazelluläre Medium (Menard *et al.*, 1994; Parsot *et al.*, 1995). Die Hypothese, daß IpaB eine Art „Verschlußkappe“ des TTSS bildet, konnte durch den Nachweis einer Interaktion zwischen IpaB und MxiK, einer Komponente des Sekretionsapparates, unterstützt werden (Page *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zu IpaB ist HrpF, das Typ-III-Translokonprotein von *X. campestris* pv. *vesicatoria*, nicht an der Kontrolle der Sekretion beteiligt, wie in dieser und vorangegangenen (Rossier *et al.*, 2000) Arbeiten gezeigt wurde. Neben HrpF scheint unter den bisher analysierten Produkten des *hrp*-Genclusters von *X. campestris* pv. *vesicatoria* nur noch HpaE (s. 2.2.1) keinen Einfluß auf die Typ-III-abhängige Proteinsekretion *in vitro* auszuüben. Die Mehrzahl der Hrp-Proteine ist dagegen entweder für die Sekretion *in vitro* essentiell oder aber, wie *hpaA* (Rossier *et al.*, 2000),

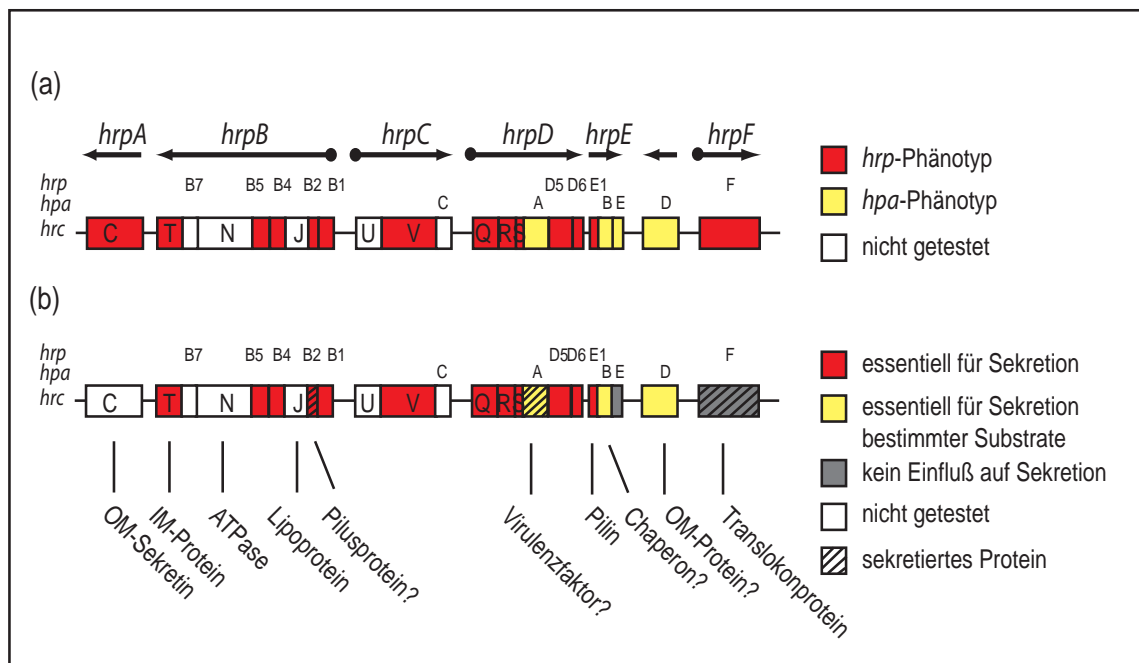


Abbildung 9: Zusammenfassung der im *hrp*-Gencluster von *X. campestris* pv. *vesicatoria* kodierten Funktionen.

(a) Einfluß einzelner Gene auf die Symptomausbildung in suszeptiblen und resistenten Wirtspflanzen. Als „*hpa*“ werden alle Gene bezeichnet, deren Mutation nicht zu einem vollständigen Verlust der bakteriellen Pathogenität führt.

(b) Einfluß individueller Gene auf die Typ-III-abhängige Proteinsekretion *in vitro*. Charakteristika sowie mögliche Funktionen einzelner Genprodukte sind aufgeführt. Die Angaben erfolgten nach (Rossier *et al.*, 2000; Rossier, 1999) sowie basierend auf Ergebnissen dieser Arbeit.

*hpaB* und vermutlich *hpaD* (s. 2.2.1), an der Sekretion bestimmter Substrate des TTSS beteiligt (Abb. 9). Proteine, deren Mutation ähnlich wie in *S. flexneri ipaB*- und *ipaD*-Mutanten oder in *Yersinia* spp. *yopN*-, *tyeA*- oder *lcrG*-Mutanten zu einer konstitutiven Sekretion von Effektorproteinen *in vitro* führt, wurden unter den Produkten des *hrp*-Genclusters noch nicht identifiziert. Bisher sind jedoch noch nicht alle Hrp-Proteine hinsichtlich ihres Einflusses auf die Typ-III-abhängige Proteinsekretion analysiert worden (Abb. 9). Die Analyse von nicht-polaren *hrpB7*- und *hpaC*-Mutanten steht beispielsweise noch aus.

### 3.2.3 Ein Modell zur hierarchischen Sekretion unterschiedlicher Substrate des TTSS

Unter den an der Typ-III-abhängigen Proteinsekretion *in vitro* beteiligten Proteinen von *X. campestris* pv. *vesicatoria* befindet sich HrpB2, welches essentiell für die Sekretion von Effektorproteinen ist, jedoch selbst auch sekretiert wird (Abb. 9). Dies deutet auf eine hierarchische Abfolge der Proteinsekretion hin (Rossier *et al.*, 2000). So werden nach Interaktion mit der Wirtszelle vermutlich zunächst solche Proteine sekretiert, die für die Sekretion und Translokation von Effektorproteinen essentiell sind.

Möglicherweise könnte die zeitliche Abfolge der Sekretion dabei durch eine unterschiedliche Expression der verschiedenen TTSS-Substrate kontrolliert werden. So wird beispielsweise in *X. campestris* pv. *vesicatoria* das *hrpE*-Operon, welches das potentielle Pilusprotein HrpE1 kodiert, im Gegensatz zu anderen *hrp*-Transkriptionseinheiten auch unter nicht-induzierenden Bedingungen basal exprimiert (Wengelnik und Bonas, 1996). HrpE1 könnte damit schon bei Bildung des TTSS in vergleichsweise großen Mengen im Cytosol vorliegen und daher bevorzugt sekretiert werden (Abb. 10, Phase I und II). In *X. campestris* pv. *vesicatoria* werden aber auch viele Effektorproteine konstitutiv exprimiert (s. Tab. 2) und liegen daher bei Bildung des TTSS ebenfalls im Cytosol vor. HrpE1 ist jedoch für die Sekretion von Effektorproteinen essentiell (Rossier, 1999) und wird daher vermutlich zu Beginn der Interaktion mit der Wirtspflanze mit höherer Priorität als Effektorproteine sekretiert. Durch welche Faktoren die Sekretion von HrpE1 und Effektorproteinen koordiniert wird, ist nicht bekannt.

Die hierarchische Abfolge der Typ-III-abhängigen Proteinsekretion wurde intensiv in Flagellumexportapparaten von *Salmonella* spp. untersucht. Das Flagellum besteht aus einem membranspannenden Basalapparat, der mit dem Haken („hook“) sowie dem



flagellären Filament verbunden ist. Die Expression der sogenannten „späten“ Genprodukte, d.h. der Komponenten des Flagellumfilamentes, wird hier vom Sigma-Faktor  $\sigma^{28}$  aktiviert. Während der Bildung des Flagellumbasalköpers wird  $\sigma^{28}$  jedoch durch den anti- $\sigma^{28}$ -Faktor FlgM inhibiert. FlgM wird erst nach Fertigstellung des Flagellumhakens sekretiert und ermöglicht dadurch die Expression der Proteine des Filamentes (Aldridge und Hughes, 2002). Die Sekretion von FlgM findet nur während der Translation des Proteins statt (Karlinsky *et al.*, 2000). Vermutlich wird das *flgM*-Transkript entsprechend der von Schneewind *et al.* postulierten mRNA-Hypothese (s. 1.3.4; Anderson und Schneewind, 1997) durch ein Signal im 5'-Bereich der mRNA zum TTSS geleitet und FlgM anschließend cotranslational sekretiert.

Damit ergibt sich eine weitere Möglichkeit zur Regulation der Typ-III-abhängigen Proteinsekretion. Nach einem Modell von Aldridge und Hughes erfolgt die Sekretion von „frühen“ Substraten des TTSS - wie beispielsweise FlgM im Flagellumexportapparat – möglicherweise cotranslational (Aldridge und Hughes, 2001). Dabei könnten die Ribosomen gleichzeitig den Zugang anderer Proteine zum TTSS blockieren (Abb. 10, Phase III) und diesen erst nach Fertigstellung des Sekretionsapparates freigeben (Aldridge und Hughes, 2001).

Bisher ist nicht bekannt, welche Substrate des TTSS cotranslational sekretiert werden. Es ist jedoch anzunehmen, daß dies nur bei wenigen Proteinen der Fall ist, da für die Sekretion von großen Proteinmengen – wie sie beispielsweise für die Bildung des Flagellumfilamentes benötigt werden – die cytosolische Seite des Sekretionsapparates nicht genügend Platz für die erforderlichen Ribosomen bieten würde (Lloyd *et al.*, 2001a). Hinweise auf eine cotranslationale Sekretion in *X. campestris* pv. *vesicatoria* gibt es bislang nicht. In weiteren Experimenten soll daher untersucht werden, ob die „frühen“ Substrate des TTSS, d.h. die extrazellulären Komponenten des Sekretions- und Translokationsapparates wie z.B. HrpB2 oder HrpF auch bei Hemmung der *de novo*-Proteinsynthese (z.B. nach Zugabe von Chloramphenicol) sekretiert werden.

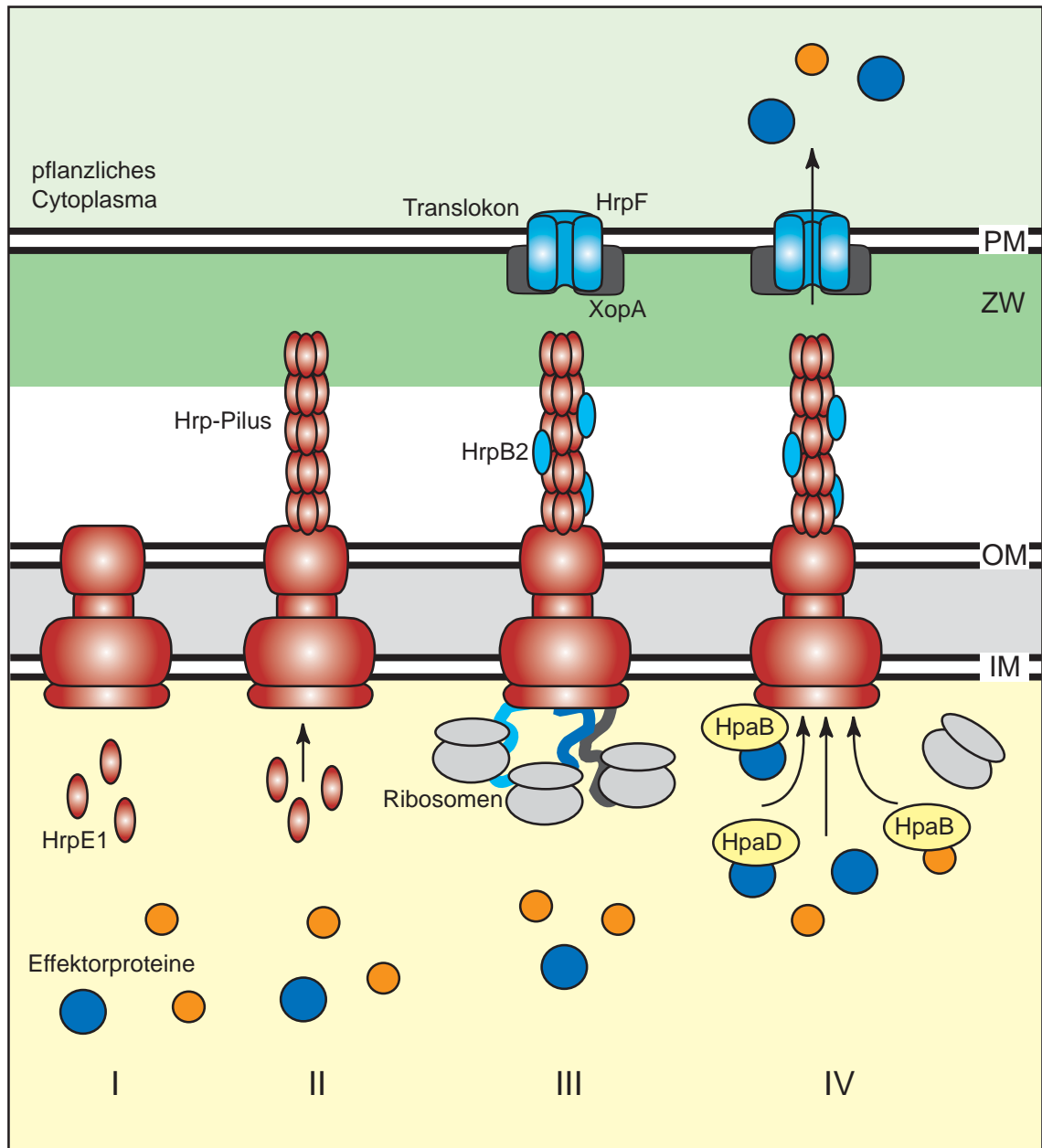


Abbildung 10: Modell der Typ-III-abhängigen Proteinsekretion in *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Nach Bildung des membranständigen Grundgerüsts des TTSS liegt das Hrp-Pilusprotein HrpE1 sowie die konstitutiv exprimierten Effektorproteine bereits in großen Mengen im bakteriellen Cytosol vor (Phase I). HrpE1 wird zu diesem Zeitpunkt jedoch vermutlich mit höherer Priorität als Effektorproteine sekretiert und bildet den Hrp-Pilus (Phase II). In Phase III erfolgt eine möglicherweise cotranslationale Sekretion von extrazellulären Komponenten des Sekretionsapparates wie HrpB2 und Komponenten des Typ-III-Translokons wie HrpF oder XopA. Dabei könnten die Ribosomen gleichzeitig den Zugang von Effektorproteinen zum TTSS blockieren. Nach Insertion des Typ-III-Translokons in die pflanzliche Zellmembran, wobei HrpF den Translokationskanal bildet und XopA vermutlich peripher mit dem Translokon assoziiert, ermöglichen HpaB und HpaD den effizienten Export von Effektorproteinen in die Wirtszelle (Phase IV).

CW, Zellwand; IM, innere Membran; OM, äußere Membran; PM, Plasmamembran.

Nach Sekretion der „frühen“ Substrate und damit nach Fertigstellung des TTSS und Insertion des Typ-III-Translokons in die Wirtszellmembran erfolgt vermutlich die Translokation von Effektorproteinen in die Wirtszelle. In *X. campestris* pv. *vesicatoria* sind Proteine wie HpaB und vermutlich HpaD für den effizienten Export von Effektorproteinen erforderlich (Abb. 10, Phase IV).

Die genauen molekularen Mechanismen, die der Typ-III-abhängigen Proteinsekretion in *X. campestris* pv. *vesicatoria* zugrundeliegen, bedürfen der weiteren Aufklärung. Insbesondere ist wenig über direkte Interaktionen beteiligter Proteine bekannt. Während des Sekretionsprozesses interagieren Komponenten und Substrate des TTSS vermutlich zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit verschiedenen Bindungspartnern. Die Aufklärung dieser Wechselwirkungen würde ein tieferes Verständnis der Typ-III-abhängigen Proteinsekretion ermöglichen.

#### 4 Literaturverzeichnis

- Aizawa, S.I. (2001) Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol. Lett.*, **202**, 157-64.
- Aldon, D., Brito, B., Boucher, C. und Genin, S. (2000) A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO J.*, **19**, 2304-2314.
- Aldridge, P. und Hughes, K.T. (2001) How and when are substrates selected for type III secretion? *Trends Microbiol.*, **9**, 209-214.
- Aldridge, P. und Hughes, K.T. (2002) Regulation of flagellar assembly. *Curr. Opin. Microbiol.*, **5**, 160-165.
- Alfano, J.R., Bauer, D.W., Milos, T.M. und Collmer, A. (1996) Analysis of the role of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HrpZ harpin in elicitation of the hypersensitive response in tobacco using functionally non-polar *hrpZ* deletion mutations, truncated HrpZ fragments, and *hrmA* mutations. *Mol. Microbiol.*, **19**, 715-728.
- Alfano, J.R., Charkowski, A.O., Deng, W.L., Badel, J.L., Petnicki-Ocwieja, T., van Dijk, K., *et al.* (2000) The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 4856-4851.
- Alfano, J.R. und Collmer, A. (1996) Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell*, **8**, 1683-1698.
- Alfano, J.R. und Collmer, A. (1997) The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J. Bacteriol.*, **179**, 5655-5662.
- Anderson, D.M., Fouts, D.E., Collmer, A. und Schneewind, O. (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.
- Anderson, D.M., Ramamurthi, K.S., Tam, C. und Schneewind, O. (2002) YopD and LcrH regulate expression of *Yersinia enterocolitica* YopQ by a posttranscriptional mechanism and bind to *yopQ* RNA. *J. Bacteriol.*, **184**, 1287-1295.
- Anderson, D.M. und Schneewind, O. (1997) A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science*, **278**, 1140-1143.
- Arlat, M., Gough, C.L., Barber, C.E., Boucher, C. und Daniels, M.J. (1991) *Xanthomonas campestris* contains a cluster of *hrp* genes related to the larger *hrp* cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **4**, 593-601.
- Arlat, M., Van Gijsegem, F., Huet, J.C., Pernollet, J.C. und Boucher, C.A. (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.
- Astua-Monge, G., Minsavage, G.V., Stall, R.E., Davis, M.J., Bonas, U. und Jones, J.B. (2000a) 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.
- Astua-Monge, G., Minsavage, G.V., Stall, R.E., Vallejos, C.E., Davis, M.J. und Jones, J.B. (2000b) *Xv4-avrXv4*: A new gene-for-gene interaction identified between *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* race T3 and the wild tomato relative *Lycopersicon pennellii*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **13**, 1346-1355.
- Ballvora, A., Pierre, M., van den Ackerveken, G., Schornack, S., Rossier, O., Ganal, M., *et al.* (2001) Genetic mapping and functional analysis of the tomato Bs4 locus governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AvrBs4 protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **14**, 629-638.
- Barny, M.A. (1995) *Erwinia amylovora hrpN* mutants, blocked in harpin synthesis, express a reduced virulence on host plants and elicit variable hypersensitive reactions on tobacco. *Eur. J. Plant Pathol.*, **101**, 333-340.
- Barny, M.A., Guinebretière, M.H., Marçais, B., Coissac, E., Paulin, J.P. und Laurent, J. (1990) Cloning of a large gene cluster involved in *Erwinia amylovora* CFBP1430 virulence. *Mol. Microbiol.*, **4**, 777-786.
- Bennett, J.C. und Hughes, C. (2000) From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperones. *Trends Microbiol.*, **8**, 202-204.
- Binet, R., Letoffe, S., Ghigo, J.M., Delepelaire, P. und Wandersman, C. (1997) Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters-a review. *Gene*, **192**, 7-11.
- Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiliaux, V., Parsot, C., *et al.* (1999) The tripartite type III secreton of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J. Cell Biol.*, **147**, 683-693.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., *et al.* (2001) Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secreton. *Mol. Microbiol.*, **39**, 652-663.
- Bogdanove, A., Beer, S.V., Bonas, U., Boucher, C.A., Collmer, A., Coplin, D.L., *et al.* (1996) Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.*, **20**, 681-683.
- Boland, A., Sory, M.P., Iriarte, M., Kerbourn, C., Wattiau, P. und Cornelis, G.R. (1996) Status of YopM and YopN in the *Yersinia* Yop virulon: YopM of *Y. enterocolitica* is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *EMBO J.*, **15**, 5191-5201.
- Bonas, U., Conrads-Strauch, J. und Balbo, I. (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.
- Bonas, U., Schulte, R., Fenselau, S., Minsavage, G.V., Staskawicz, B.J. und 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.
- Bonas, U., Stall, R.E. und 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. und Van den Ackerveken, G. (1999) Gene-for-gene interactions: bacterial avirulence proteins specify plant disease resistance. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**, 94-98.
- Boucher, C.A., Van Gijsegem, F., Barberis, P.A., Arlat, M. und Zischek, C. (1987) *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. *J. Bacteriol.*, **169**, 5626-5632.

- Brito, B., Aldon, D., Barberis, P., Boucher, C. und Genin, S. (2002) A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* hrp genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **15**, 109-119.
- Brito, B., Marena, M., Barberis, P., Boucher, C. und Genin, S. (1999) *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.*, **31**, 237-251.
- Brown, I.R., Mansfield, J.W., Taira, S., Roine, E. und Romantschuk, M. (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.
- Brunner, J. (1989) Photochemical labeling of apolar phase of membranes. *Methods Enzymol.*, **172**, 628-687.
- Brunner, J. und Semenza, G. (1981) Selective labeling of the hydrophobic core of membranes with 3- (trifluoromethyl)-3-(m-[125I]iodophenyl)diazirine, a carbene-generating reagent. *Biochemistry*, **20**, 7174-7182.
- Burkhard, P., Stetefeld, J. und Strelkov, S.V. (2001) Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.*, **11**, 82-88.
- Büttner, D. und Bonas, U. (2002) Port of entry - the type III secretion translocon. *Trends Microbiol.*, **10**, 186-192.
- Büttner, D., Nennstiel, D., Klüsener, B. und Bonas, U. (2002) Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.*, **184**, 2389-2398.
- Casper-Lindley, C., Dahlbeck, D., Clark, E.T. und Staskawicz, B. (2002) Direct biochemical evidence for type III secretion-dependent translocation of the AvrBs2 effector protein into plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**, 8336-8341.
- Charkowski, A.O., Alfano, J.R., Preston, G., Yuan, J., He, S.Y. und Collmer, A. (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.
- Ciesiolka, L.D., Hwin, T., Gearlds, J.D., Minsavage, G.V., Saenz, R., Bravo, M., *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.
- Cornelis, G.R. (1998) The *Yersinia* deadly kiss. *J. Bacteriol.*, **180**, 5495-5504.
- Cornelis, G.R. und Van Gijsegem, F. (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**, 735-774.
- Da Silva, A.C., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., *et al.* (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, **417**, 459-463.
- Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y. und Attree, I. (2001) Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol. Microbiol.*, **40**, 76-85.
- Daniell, S.J., Delahay, R.M., Shaw, R.K., Hartland, E.L., Pallen, M.J., Booy, F., *et al.* (2001) Coiled-coil domain of enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted protein EspD is involved in EspA filament-mediated cell attachment and hemolysis. *Infect. Immun.*, **69**, 4055-4064.

- Darwin, K.H. und Miller, V.L. (2000) The putative invasion protein chaperone SicA acts together with InvF to activate the expression of *Salmonella typhimurium* virulence genes. *Mol. Microbiol.*, **35**, 949-960.
- Darwin, K.H. und Miller, V.L. (2001) Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J.*, **20**, 1850-1862.
- Davis, R., Marquart, M.E., Lucius, D. und Picking, W.D. (1998) Protein-protein interactions in the assembly of *Shigella flexneri* invasion plasmid antigens IpaB and IpaC into protein complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1429**, 45-56.
- Driessen, A.J., Fekkes, P. und van der Wolk, J.P. (1998) The Sec system. *Curr. Opin. Microbiol.*, **1**, 216-222.
- Escobar, L., Van den Ackerveken, G., Pieplow, S., Rossier, O. und Bonas, U. (2001) Type III secretion and *in planta* recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. *Mol. Plant Pathol.*, **2**, 287-296.
- Falnes, P.O. und Sandvig, K. (2000) Penetration of protein toxins into cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 407-413.
- Fenselau, S., Balbo, I. und Bonas, U. (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.
- Fenselau, S. und 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.
- Fields, K.A., Nilles, M.L., Cowan, C. und Straley, S.C. (1999) Virulence role of V antigen of *Yersinia pestis* at the bacterial surface. *Infect. Immun.*, **67**, 5395-5408.
- Fields, S. und Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.
- Flor, H.H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **9**, 275-296.
- Forsberg, A., Viitanen, A.M., Skurnik, M. und Wolf-Watz, H. (1991) The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.*, **5**, 977-986.
- Fouts, D.E., Abramovitch, R.B., Alfano, J.R., Baldo, A.M., Buell, C.R., Cartinhour, S., et al. (2002) Genomewide identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**, 2275-2280.
- Francis, M.S., Lloyd, S.A. und Wolf-Watz, H. (2001) The type III secretion chaperone LcrH co-operates with YopD to establish a negative, regulatory loop for control of Yop synthesis in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.*, **42**, 1075-1093.
- Francis, M.S. und Wolf-Watz, H. (1998) YopD of *Yersinia pseudotuberculosis* is translocated into the cytosol of HeLa epithelial cells: evidence of a structural domain necessary for translocation. *Mol. Microbiol.*, **29**, 799-813.
- Gabriel, D.W. (1999) The *Xanthomonas avr/pth* gene family. In Stacey, G. und Keen, N.T. (eds.), *Plant-Microbe Interactions*. APS Press, St Paul, Minnesota, Vol. 4, pp. 39-55.
- Gaudriault, S., Brisset, M.N. und Barny, M.A. (1998) HrpW of *Erwinia amylovora*, a new Hrp-secreted protein. *FEBS Lett.*, **428**, 224-228.

- Gaudriault, S., Malandrin, L., Paulin, J.P. und Barny, M.A. (1997) DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. *Mol. Microbiol.*, **26**, 1057-1069.
- Gaudriault, S., Paulin, J.P. und Barny, M.A. (2002) The DspB/F protein of *Erwinia amylovora* is a type III secretion chaperone ensuring efficient secretion of the DspA/E essential pathogenicity factor. *Mol. Plant Pathol.*, **in press**.
- Genin, S., Gough, C.L., Zischek, C. und Boucher, C.A. (1992) Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Microbiol.*, **6**, 3065-3076.
- Grimm, C., Aufsatz, W. und Panopoulos, N.J. (1995) The *hrpRS* locus of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* constitutes a complex regulatory unit. *Mol. Microbiol.*, **15**, 155-165.
- Guttman, D.S. und Greenberg, J.T. (2001) Functional analysis of the type III effectors AvrRpt2 and AvrRpm1 of *Pseudomonas syringae* with the use of a single-copy genomic integration system. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **14**, 145-155.
- Guttman, D.S., Vinatzer, B.A., Sarkar, S.F., Ranall, M.V., Kettler, G. und Greenberg, J.T. (2002) A Functional Screen for the Type III (Hrp) Secretome of the Plant Pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science*, **295**, 1722-1726.
- Håkansson, S., Schesser, K., Persson, C., Galyov, E.E., Rosqvist, R., Homble, F., *et al.* (1996) The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J.*, **15**, 5812-5823.
- Ham, J.H., Bauer, D.W., Fouts, D.E. und Collmer, A. (1998) A cloned *Erwinia chrysanthemi* Hrp (type III protein secretion) system functions in *Escherichia coli* to deliver *Pseudomonas syringae* Avr signals to plant cells and to secrete Avr proteins in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10206-10211.
- Hayward, R.D. und Koronakis, V. (1999) Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. *EMBO J.*, **18**, 4926-4934.
- Hayward, R.D., McGhie, E.J. und Koronakis, V. (2000) Membrane fusion activity of purified SipB, a *Salmonella* surface protein essential for mammalian cell invasion. *Mol. Microbiol.*, **37**, 727-739.
- He, S.Y. (1998) Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **36**, 363-392.
- He, S.Y., Huang, H.C. und Collmer, A. (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin<sub>PSS</sub>: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell*, **73**, 1255-1266.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F. und Nataro, J.P. (1998) The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.*, **6**, 370-378.
- Hendrickson, E.L., Guevera, P. und Ausubel, F.M. (2000) The alternative sigma factor RpoN is required for *hrp* activity in *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and acts at the level of *hrpL* transcription. *J. Bacteriol.*, **182**, 3508-3516.
- Hersh, D., Monack, D.M., Smith, M.R., Ghori, N., Falkow, S. und Zychlinsky, A. (1999) The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2396-2401.
- Hilbi, H., Moss, J.E., Hersh, D., Chen, Y., Arondel, J., Banerjee, S., *et al.* (1998) *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J. Biol. Chem.*, **273**, 32895-32900.



- Holmström, A., Olsson, J., Cherepanov, P., Maier, E., Nordfelth, R., Pettersson, J., *et al.* (2001) LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of *Yersinia*. *Mol. Microbiol.*, **39**, 620-632.
- Hu, W., Yuan, J., Jin, Q.L., Hart, P. und He, S.Y. (2001) Immunogold labeling of Hrp pili of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* assembled in minimal medium and *in planta*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **14**, 234-241.
- Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 379-433.
- Huguet, E. und Bonas, U. (1997) *hrpF* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes an 87-kDa protein with homology to NolX of *Rhizobium fredii*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **10**, 488-498.
- Huguet, E., Hahn, K., Wengelnik, K. und 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.
- Ide, T., Laarmann, S., Greune, L., Schillers, H., Oberleithner, H. und Schmidt, M.A. (2001) Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.*, **3**, 669-679.
- Innes, R.W., Bent, A.F., Kunkel, B.N., Bisgrove, S.R. und Staskawicz, B.J. (1993) Molecular analysis of avirulence gene *avrRpt2* and identification of a putative regulatory sequence common to all known *Pseudomonas syringae* avirulence genes. *J. Bacteriol.*, **175**, 4859-4869.
- Iriarte, M., Sory, M.P., Boland, A., Boyd, A.P., Mills, S.D., Lambermont, I., *et al.* (1998) TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. *EMBO J.*, **17**, 1907-1918.
- Isberg, R.R. und Dumenil, G. (2001) Delivering dangerous cargoes. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 1006-1008.
- Jin, Q. und He, S.Y. (2001) Role of the Hrp Pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Science*, **294**, 2556-2558.
- Jin, Q., Hu, W., Brown, I., McGhee, G., Hart, P., Jones, A.L., *et al.* (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.
- Karlinsey, J.E., Lonner, J., Brown, K.L. und Hughes, K.T. (2000) Translation/secretion coupling by type III secretion systems. *Cell*, **102**, 487-497.
- Kearney, B. und Staskawicz, B.J. (1990) Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. *Nature*, **346**, 385-386.
- Kim, J.F. und Beer, S.V. (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.
- Kjemtrup, S., Nimchuk, Z. und Dangl, J.L. (2000) Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Curr. Opin. Microbiol.*, **3**, 73-78.
- Klement, Z. (1982) Hypersensitivity. In Mount, M.S. und Lacy, G.H. (eds.), *Phytopathogenic prokaryotes*. Academic Press, New York, Vol. 2, pp. 149-177.
- Knoop, V., Staskawicz, B. und 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.

- Krishnan, H.B. (2002) NolX of *Sinorhizobium fredii* USDA257, a type III-secreted protein involved in host range determination, is localized in the infection threads of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) and soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) nodules. *J. Bacteriol.*, **184**, 831-839.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., *et al.* (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science*, **280**, 602-605.
- Lahaye, T. und Bonas, U. (2001) Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends Plant Sci.*, **6**, 479-485.
- Lanzrein, M., Sand, O. und Olsnes, S. (1996) GPI-anchored diphtheria toxin receptor allows membrane translocation of the toxin without detectable ion channel activity. *EMBO J.*, **15**, 725-734.
- Lee, J., Klessig, D.F. und Nürnberger, T. (2001a) A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene *hinI* independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *Plant Cell*, **13**, 1079-1093.
- Lee, J., Klüsener, B., Tsiamis, G., Stevens, C., Neyt, C., Tampakaki, A.P., *et al.* (2001b) HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> 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.
- Li, C.M., Brown, I., Mansfield, J., Stevens, C., Boureau, T., Romantschuk, M., *et al.* (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.
- Lindgren, P.B. (1997) The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **35**, 129-152.
- Lindgren, P.B., Peet, R.C. und 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.
- Lloyd, S.A., Forsberg, A., Wolf-Watz, H. und Francis, M.S. (2001a) Targeting exported substrates to the Yersinia TTSS: different functions for different signals? *Trends Microbiol.*, **9**, 367-371.
- Lloyd, S.A., Norman, M., Rosqvist, R. und Wolf-Watz, H. (2001b) *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol. Microbiol.*, **39**, 520-532.
- Macnab, R.M. (1999) The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus. *J. Bacteriol.*, **181**, 7149-7153.
- Marenda, M., Brito, B., Callard, D., Genin, S., Barberis, P., Boucher, C., *et al.* (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.
- Marois, E., Van den Ackerveken, G. und Bonas, U. (2002) The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **in press**.
- McGhie, E.J., Hume, P.J., Hayward, R.D., Torres, J. und Koronakis, V. (2002) Topology of the *Salmonella* invasion protein SipB in a model bilayer. *Mol. Microbiol.*, **44**, 1309-1321.
- Menard, R., Prevost, M.C., Gounon, P., Sansonetti, P. und Dehio, C. (1996) The secreted Ipa complex of *Shigella flexneri* promotes entry into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **93**, 1254-1258.

- Menard, R., Sansonetti, P. und Parsot, C. (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.
- Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R., Ruyschaert, J.M. und Cornelis, G. (1990) Secretion of Yop proteins by *Yersiniae*. *Infect. Immun.*, **58**, 2840-2849.
- Mudgett, M.B., Chesnokova, O., Dahlbeck, D., Clark, E.T., Rossier, O., Bonas, U., *et al.* (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.
- Mudgett, M.B. und Staskawicz, B.J. (1998) Protein signalling via type III secretion pathways in phytopathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, **1**, 109-115.
- Mudgett, M.B. und Staskawicz, B.J. (1999) Characterization of the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* AvrRpt2 protein: demonstration of secretion and processing during bacterial pathogenesis. *Mol. Microbiol.*, **32**, 927-941.
- Neyt, C. und Cornelis, G.R. (1999a) Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol. Microbiol.*, **33**, 971-981.
- Neyt, C. und Cornelis, G.R. (1999b) Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Mol. Microbiol.*, **31**, 143-156.
- Nhieu, G.T. und Sansonetti, P.J. (1999) Mechanism of *Shigella* entry into epithelial cells. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**, 51-55.
- Niebold, F., Anderson, D. und Mills, D. (1985) Cloning determinants of pathogenesis from *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 406-410.
- Nimchuk, Z., Marois, E., Kjemtrup, S., Leister, R.T., Katagiri, F. und Dangl, J.L. (2000) Eukaryotic fatty acylation drives plasma membrane targeting and enhances function of several type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*. *Cell*, **101**, 353-363.
- Noël, L. (2001) Utilisation de la technique de cDNA-AFLP pour l'étude d'un transcriptome procaryote: identification et caractérisation du régulon *hrp* chez *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Université de Paris-Sud, Paris.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D. und 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., Nennstiel, D. und Bonas, U. (2002) Two novel type III system-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *J. Bacteriol.*, **184**, 1340-1348.
- Nunn, D. (1999) Bacterial type II protein export and pilus biogenesis: more than just homologies? *Trends Cell Biol.*, **9**, 402-408.
- Orth, K., Xu, Z., Mudgett, M.B., Bao, Z.Q., Palmer, L.E., Bliska, J.B., *et al.* (2000) Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, ubiquitin-like protein protease. *Science*, **290**, 1594-1597.
- Page, A.L., Fromont-Racine, M., Sansonetti, P., Legrain, P. und Parsot, C. (2001) Characterization of the interaction partners of secreted proteins and chaperones of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.*, **42**, 1133-1145.
- Parsot, C., Ménard, R., Gounon, P. und Sansonetti, P.J. (1995) Enhanced secretion through the *Shigella flexneri* Mxi-Spa translocon leads to assembly of extracellular proteins into macromolecular structures. *Mol. Microbiol.*, **16**, 291-300.

- Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D.J., Tam, V.C., Chancey, S.T., Shan, L., Jamir, Y., *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. U S A*, **99**, 7652-7657.
- Pettersson, J., Holmstrom, A., Hill, J., Leary, S., Frithz-Lindsten, E., von Euler-Matell, A., *et al.* (1999) The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol. Microbiol.*, **32**, 961-976.
- Picking, W.L., Coye, L., Osiecki, J.C., Barnoski Serfis, A., Schaper, E. und Picking, W.D. (2001) Identification of functional regions within invasion plasmid antigen C (IpaC) of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.*, **39**, 100-111.
- Pierre, M., Noël, L., Lahaye, T., Ballvora, A., Veuskens, J., Ganal, M., *et al.* (2000) High-resolution genetic mapping of the pepper resistance locus *Bs3* governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AvrBs3 protein. *Theor. Appl. Genet.*, **101**, 255-263.
- Rainbow, L., Hart, C.A. und Winstanley, C. (2002) Distribution of type III secretion gene clusters in *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. mallei*. *J. Med. Microbiol.*, **51**, 374-378.
- Ritter, C. und Dangl, J.L. (1995) The *avrRpm1* gene of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* is required for virulence on Arabidopsis. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **8**, 444-453.
- Roine, E., Saarinen, J., Kalkkinen, N. und Romantschuk, M. (1997) Purified HrpA of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 reassembles into pili. *FEBS Lett.*, **417**, 168-172.
- Romantschuk, M., Roine, E. und Taira, S. (2001) Hrp pilus - reaching through the plant cell wall. *Eur. J. Plant Pathol.*, **107**, 153-160.
- Ronald, P.C. und Staskawicz, B.J. (1988) The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes a 50-kDa protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **1**, 191-198.
- Rosqvist, R., Magnusson, K.E. und Wolf-Watz, H. (1994) Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J.*, **1390**, 964-972.
- Rossier, O. (1999) Étude du système de sécrétion de type III chez la bactérie phytopathogène *Xanthomonas campestris* pathovar *vesicatoria*. Université Paris, Paris.
- Rossier, O., Van den Ackerveken, G. und 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.
- Rossier, O., Wengelnik, K., Hahn, K. und Bonas, U. (1999) The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9368-9373.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., *et al.* (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*, **415**, 497-502.
- Sandkvist, M. (2001) Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol.*, **40**, 271-283.
- Sarker, M.R., Neyt, C., Stainier, I. und Cornelis, G.R. (1998a) The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J. Bacteriol.*, **180**, 1207-1214.

- Sarker, M.R., Sory, M.P., Boyd, A.P., Iriarte, M. und Cornelis, G.R. (1998b) LcrG is required for efficient translocation of *Yersinia* Yop effector proteins into eukaryotic cells. *Infect. Immun.*, **66**, 2976-2979.
- Schesser, K., Frithz-Lindsten, E. und Wolf-Watz, H. (1996) Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes. *J. Bacteriol.*, **178**, 7227-7233.
- Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C. und Abe, A. (2001) Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **98**, 11638-11643.
- Shan, L., Thara, V.K., Martin, G.B., Zhou, J.-M. und Tang, X. (2000) The *Pseudomonas* AvrPto protein is differentially recognized by tomato and tobacco and is localized to the plant plasma membrane. *Plant Cell*, **12**, 2323-2337.
- Skryzpek, E. und Straley, S.C. (1993) LcrG, a secreted protein involved in negative regulation of the low-calcium response in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.*, **175**, 3520-3528.
- Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, **67**, 31-40.
- Sory, M.P., Boland, A., Lambermont, I. und Cornelis, G.R. (1995) Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11998-12002.
- Sory, M.P. und Cornelis, G.R. (1994) Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol. Microbiol.*, **14**, 583-594.
- Steinberger, E.M. und Beer, S.V. (1988) Creation and complementation of pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **1**, 135-144.
- Swords, K.M., Dahlbeck, D., Kearney, B., Roy, M. und Staskawicz, B.J. (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.
- Szurek, B., Marois, E., Bonas, U. und Van den Ackerveken, G. (2001) Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J.*, **26**, 523-534.
- Szurek, B., Rossier, O., Hause, G. und Bonas, U. (2002) Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol. Microbiol.*, **in press**.
- Tamano, K., Aizawa, S., Katayama, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwae, A., *et al.* (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.
- Tardy, F., Homble, F., Neyt, C., Wattiez, R., Cornelis, G.R., Ruyschaert, J.M., *et al.* (1999) *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. *EMBO J.*, **18**, 6793-6799.
- Thanassi, D.G. und Hultgren, S.J. (2000) Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 420-430.

- Thanassi, D.G., Saulino, E.T. und Hultgren, S.J. (1998) The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. *Curr. Opin. Microbiol.*, **1**, 223-231.
- Tucker, S.C. und Galan, J.E. (2000) Complex function for SicA, a *Salmonella enterica* serovar typhimurium type III secretion-associated chaperone. *J. Bacteriol.*, **182**, 2262-2268.
- Van den Ackerveken, G., Marois, E. und Bonas, U. (1996) Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell*, **87**, 1307-1316.
- van Dijk, K., Fouts, D.E., Rehm, A.H., Hill, A.R., Collmer, A. und Alfano, J.R. (1999) The Avr (effector) proteins HrmA (HopPsyA) and AvrPto are secreted in culture from *Pseudomonas syringae* pathovars via the Hrp (type III) protein secretion system in a temperature- and pH-sensitive manner. *J. Bacteriol.*, **181**, 4790-4797.
- Van Gijsegem, F., Vasse, J., Camus, J.C., Marena, M. und Boucher, C. (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.
- Van Gijsegem, F., Vasse, J., De Rycke, R., Castello, P. und 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.
- Vauterin, L., Rademaker, J. und Swings, J. (2000) Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathol.*, **90**, 677-682.
- Viprey, V., Del Greco, A., Golinowski, W., Broughton, W.J. und Perret, X. (1998) Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol. Microbiol.*, **28**, 1381-1389.
- Vivian, A. und Arnold, D.L. (2000) Bacterial effector genes and their role in host pathogen interactions. *J. Plant Pathol.*, **82**, 163-178.
- Warawa, J., Finlay, B.B. und Kenny, B. (1999) Type III secretion-dependent hemolytic activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **67**, 5538-40.
- Wei, W., Plovianich-Jones, A., Deng, W.L., Jin, Q.L., Collmer, A., Huang, H.C., *et al.* (2000a) 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.
- Wei, Z., Kim, J.F. und Beer, S.V. (2000b) Regulation of hrp genes and type III protein secretion in *Erwinia amylovora* by HrpX/HrpY, a novel two-component system, and HrpS. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **13**, 1251-1262.
- Wei, Z.-M. und Beer, S.V. (1995) hrpL activates *Erwinia amylovora* hrp gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. *J. Bacteriol.*, **177**, 6201-6210.
- Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A., *et al.* (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, **257**, 85-88.
- Wengelnik, K. und 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. und Bonas, U. (1996a) 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. und 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.
- Wengelnik, K., Van den Ackerveken, G. und Bonas, U. (1996b) HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **9**, 704-712.
- Wolff, C., Nisan, I., Hanski, E., Frankel, G. und Rosenshine, I. (1998) Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **28**, 143-155.
- Xiao, Y., Heu, S., Yi, J., Lu, Y. und Hutcheson, S.W. (1994) Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. *J. Bacteriol.*, **176**, 1025-1036.
- Xiao, Y. und Hutcheson, S.W. (1994) A single promoter sequence recognized by a newly identified alternate sigma factor directs expression of pathogenicity and host range determinants in *Pseudomonas syringae* [published erratum appears in *J. Bacteriol.* 176:6158]. *J. Bacteriol.*, **176**, 3089-3091.
- Young, B.M. und Young, G.M. (2002) YplA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.*, **184**, 1324-1334.

## Lebenslauf

Name: Daniela Büttner  
Wohnort: Emil-Abderhaldenstr. 40  
06108 Halle (Saale)  
Geburtsdatum: 4.8.1974  
Geburtsort: Leverkusen

### Schulausbildung:

1980 - 1984 Grundschule Pulheim  
1984 - 1993 Geschwister-Scholl-Gymnasium Pulheim  
Abschluß: Abitur

### Studium:

1993 - 1997 Immatrikulation an der Universität zu Köln im Studienfach Biologie  
1997 - 1998 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln  
Abschluß: Diplom

### Promotion:

seit 1998 Promotionsarbeit am Institut für Genetik an der Martin-Luther-Universität in Halle  
zunächst Stipendium der Graduiertenförderung der Martin-Luther-Universität.  
von April 1999 bis April 2001 Stipendium des Fonds der Chemischen Industrie  
Thema der Arbeit ist die "Funktionelle Charakterisierung der Region von *hrpE* bis *hrpF* in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*".



## Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt habe.

Die Co-Autoren der beigefügten Publikation sowie des Manuskriptes waren an den Experimenten wie folgt beteiligt:

B. Klüsener (Ruhr-Universität Bochum):

- Messung der Porenaktivität von rekombinanten HrpF-Protein in Lipidbilayer-Systemen

L. Noël (Institut für Genetik, Martin-Luther-Universität Halle/ jetzige Adresse: Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln):

- Konstruktion der *hpaB*- und *hpaE*-Deletionsmutanten in *X. campestris* pv. *vesicatoria*
- Konstruktion der Plasmide pDM20 und pDM30 zur Expression von HpaB-c-myc und HpaE-c-myc

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

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

Halle, den 18.10.02

Daniela Büttner