

**Das Effektorprotein HrpZ1 aus dem  
phytopathogenen Bakterium *Pseudomonas  
syringae* pv. *phaseolicola* - Studien zur  
funktionellen und molekularen Charakterisierung**

**D I S S E R T A T I O N**

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2007

vorgelegt von  
Stefan Engelhardt

Tag der mündlichen Prüfung:

29. November 2007

Dekan:

Prof. Dr. L. Wesemann

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. T. Nürnberger

2. Berichterstatter:

Dr. H. Keller

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Grundlagen pflanzlicher Pathogenresistenz	2
1.1.1 PAMPs als Auslöser pflanzlicher Immunabwehr	4
1.1.2 Perzeption von PAMPs und Effektoren	5
1.1.3 Intrazelluläre Signaltransduktion in der pflanzlichen Pathogenabwehr	7
1.2 Interaktion zwischen Pflanze und bakteriellem Pathogen	9
1.2.1 Typ-III-Sekretionssystem	11
1.2.1.1 Typ-III-Sekretionssystem tierischer Pathogene	12
1.2.1.2 Typ-III-Sekretionssystem pflanzlicher Pathogene am Beispiel von <i>Pseudomonas syringae</i>	13
1.2.2 Das Effektorprotein HrpZ1 phytopathogener <i>Pseudomonas syringae</i> -Spezies	16
1.3 Ziele der Arbeit	18
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1 Chemikalien, Enzyme, Bioreagenzien und Verbrauchsmaterialien	19
2.2 Medien und Stammlösungen	19
2.3 Kultivierung und Behandlung von Petersiliezellkulturen	20
2.3.1 Kultivierung	20
2.3.2 Elicitierung	20
2.3.3 Vitalitätsbestimmung der Petersiliezellen	21
2.3.4 Bestimmung des pH-Wertes von Kulturmedien	21
2.3.5 Untersuchung des NO-Bursts in Petersiliezellen	21
2.3.6 Bestimmung der Phytoalexinakkumulation in Kulturmedien	22
2.3.7 Immunkomplex-MBP-Kinase-Tests	22
2.4 Molekularbiologische Methoden	23
2.4.1 Bakterienstämme und Plasmide	23
2.4.2 Präparation von Plasmid-DNA und Verdau mit Restriktionsenzymen	23
2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese	23
2.4.4 Isolierung von Fragmenten aus Agarosegelen	24
2.4.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)	24

2.4.6	Klonierung von PCR-Produkten	25
2.4.6.1	Dephosphorylierung	25
2.4.6.2	Ligation	25
2.4.6.3	Herstellung kompetenter Zellen	25
2.4.6.4	Transformation kompetenter Bakterien	26
2.4.6.5	Blau/Weiß-Selektion mittels pBluescript-Vektor	26
2.4.6.6	Ansetzen von Glycerinkulturen	26
2.4.7	Bakterielle Expression von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> und HrpW1 <sub>P<sub>sph</sub></sub>	26
2.4.7.1	Präparative Expression	27
2.4.7.2	Vorreinigung von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> (mit His <sub>10</sub> -Tag) und Aufreinigung von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub>	27
2.4.7.3	Affinitätsreinigung der Expressionprodukte mittels Ni-NTA-Agarose	27
2.4.7.4	Faktor Xa-Verdau	28
2.5	Proteinanalytische Methoden	29
2.5.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	29
2.5.2	Chemische Quervernetzung	29
2.5.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
2.5.4	Detektion von Proteinen nach SDS-PAGE	30
2.5.4.1	Silberfärbung	30
2.5.4.2	Coomassiefärbung von Proteinen	30
2.5.4.3	Immunologischer Nachweis von Proteinen	31
2.5.5	BlueNative-PAGE (BN-PAGE)	32
2.5.6	Calcium-Overlay-Assay	33
2.5.7	Analytische Gelfiltration	34
2.5.8	CD-Spektroskopische Untersuchungen	34
2.5.9	Interaktionsstudien mittels des Hefe-Dihybrid-Systems	34
2.5.9.1	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pJ69-4A	36
2.5.9.2	oNPG-Assay	37
2.5.10	Kristallisation	38
2.5.11	Elektronenmikroskopie	39
2.6	Untersuchung der Porenbildungsaktivität	39
2.6.1	Calcein-Release-Assay	39
2.6.2	Untersuchungen an Oozyten des Krallenfrosches <i>Xenopus laevis</i>	40
2.6.3	Liposomenassay mit Sodium Green <sup>TM</sup>	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
3.1	HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> als Auslöser pflanzlicher Abwehrreaktionen in Petersilie	42
3.1.1	Alkalisierung des Mediums nach HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Applikation	42
3.1.2	MAPK-Aktivierung nach HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Behandlung	43
3.1.3	NO-Burst nach HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Applikation	44
3.1.4	Phytoalexinakkumulation im Kulturmedium nach HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Behandlung	45
3.1.5	Bedeutung von NO für die elicitorinduzierte Phytoalexinakkumulation	46
3.1.6	Simultane LPS- und HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Applikation bewirken eine synergistische Phytoalexinproduktion	47
3.2	Bildung von ionenleitenden Poren durch HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub>	49
3.2.1	Assayentwicklung zur Detektion porenbildender Aktivität	49

3.2.2	Ionenporenbildung von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> in Eizellen von <i>Xenopus laevis</i>	51
3.2.3	Ionenporenbildung von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> in Asolectin-Liposomen	52
3.3	Abwehraktivierung vs. Porenbildung	53
3.4	Studien zur Oligomerisierung von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub>	56
3.4.1	Untersuchung der HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Oligomerstabilität	57
3.4.2	Einfluß von Calcium auf die HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Oligomerstabilität	59
3.4.2.1	Untersuchung der Calciumbindung von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub>	59
3.4.2.2	Einfluß von Calcium auf die HrpZ <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Oligomerstabilität	60
3.4.3	Untersuchung der HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Oligomerisierung mittels Gelfiltration	62
3.4.4	Untersuchung der HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Oligomerisierung mittels BlueNative-PAGE	64
3.4.5	<i>In vivo</i> -Interaktionsstudien von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> mit Hefe-2-Hybrid-System	67
3.4.6	Studien zur Heterooligomerisierung zwischen HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> und HrpA1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> bzw. HrpW1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> mittels Hefe-2-Hybrid-System	68
3.4.7	Interaktionsstudien zwischen HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> und HrpW1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> mittels Gelfiltration	70
3.5	Untersuchungen der HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Struktur mittels Elektronenmikroskopie	72
3.6	Kristallisation von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub>	72
3.7	Untersuchung der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie	73
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>75</b>
4.1	HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> als Auslöser pflanzlicher Immunreaktionen	75
4.2	HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> als membranintegrierendes und ionenporenbildendes Protein	80
4.3	Ionenporenbildung und pflanzliche Immunabwehr	88
4.4	Schlußfolgerungen	89
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>112</b>

Abkürzungsverzeichnis

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
Å	Ångström
Ade	Adenin
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Avr	Avirulenz
BCA	Bicinchinonsäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BS <sup>3</sup>	Bis(sulfosuccinimidyl)suberat
BSA	Rinderserumalbumin
BN-PAGE	BlueNative-PAGE
°C	Grad Celcius
C	Cytosin
Cam <sup>r</sup>	Chloramphenicolresistenz
CD	Zirkulardichroismus
CEL	konservierter Effektorlokus
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
cPTIO	2-4-Carboxyphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
DAF-2	4,5-Diaminofluorescein
DAF-2-DA	4,5-Diaminofluorescein-diazetat
DAF-2T	DAF-2-Triazol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPPG	Dipalmitoylglycerophosphoglycerol
Ea	<i>Erwinia amylovora</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EEL	austauschbarer Effektorlokus
ETI	Effektor-ausgelöste Immunität
ETS	Effektor-ausgelöste Suszeptibilität
FDA	Fluoresceindiazetat
FPLC	„Fast Protein Liquid Chromatography“
G	Guanin
g	Gramm
GAL4	Hefetranskriptionsfaktor
GAL4-AD	GAL4-Aktivierungsdomäne
GAL4-BD	GAL4-Bindedomäne
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA	modifiziertes Gamborg's B5-Medium (Petersiliezellen)
HA-Tag	Hämagglutinin-Tag
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HR	Hypersensitive Reaktion
Hrc	„Hypersensitive response and conserved“

Hrp	„Hypersensitive response and pathogenicity“
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
ISR	Induzierte systemische Resistenz
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium (Bakterien)
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leuzin-reiche Wiederholung
M	Mol/L
mA	Milliampere
MAMP	Mikrobe-assoziiertes molekulares Muster
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPK-Kinase-Kinase
MBP	„Myelin basic protein“
MBq	Megabecquerel
mCi	Millicurie
MCS	„Multiple cloning site“
MDP	Muramyl-dipeptid
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
$\mu$ g	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
mM	Millimol/Liter
$\mu$ M	Mikromol/Liter
mm	Millimeter
mRNA	Boten-RNA
mV	Millivolt
NB	Nukleotid-bindend
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nM	Nanomol/Liter
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
oNPG	ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	PBS-Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFT	Porenbildende Toxine
pH	pondus Hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POPC	Palmitoyl-oleoylglycerphosphocholin

PTI	PAMP-ausgelöste Immunität
PR	„Pathogenesis-related“
Psph	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
Pss	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Resistenz
RLK	Rezeptor-ähnliche Kinase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SAR	Systemisch erworbene Resistenz
SD-LW	Leuzin/Tryptophanmangelmedium (Hefe)
SD-LWA	Leuzin/Tryptophan/Adenin-Mangelmedium (Hefe)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIPK	Salizylsäure-induzierte Proteinkinase
ss	einzelsträngig
T	Thymin
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet <sup>r</sup>	Tetracyclinresistenz
TLR	Toll-ähnliche Rezeptoren
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
V <sub>0</sub>	Totvolumen
WIPK	Wundinduzierte Proteinkinase
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
YPD	Hefeextrakt/Pepton/Dextrose-Medium (Hefe)

### Abkürzungen für Aminosäuren

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

## Abbildungverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	
1.1	Übersicht über die verschiedenen Formen der pflanzlichen Pathogenresistenz (Nürnberger <i>et al.</i> 2004; Jones and Dangl 2006)	3
1.2	Schematische Darstellung des Typ-III-Sekretionssystems am Beispiel tierischer ( <i>Salmonella</i> , <i>E.coli</i> ) und phytopathogener ( <i>Pseudomonas syringae</i> ) Bakterien (He <i>et al.</i> 2004)	12
1.3	Genomische Anordnung des aus <i>Pseudomonas syringae</i> stammenden Typ-III-Sekretionssystem-kodierenden <i>hrp</i> -Genclusters	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	
2.1	Schema der NO-Detektion mittels DAF-2-DA	22
2.2	Affinitätsaufreinigung von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> und HrpW1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> mittels Ni-NTA-Agarose	28
2.3	Faktor Xa-vermittelte proteolytische Abspaltung des His <sub>10</sub> -Tags von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub>	28
2.4	Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS <sup>3</sup> ) ( <a href="http://www.piercenet.com">www.piercenet.com</a> )	29
2.5	Schematische Darstellung des Hefe-Dihybrid-Systems	35
2.6	Schema des oNPG-Assays	37
2.7	Schema des Liposomenassays	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	
3.1	Alkalisierung des Kulturmediums von Petersiliezellen nach Behandlung mit HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub>	43
3.2	Immunkomplex-MBP-Kinase Test	44
3.3	NO-Burst in Petersiliezellen nach Applikation von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub>	45
3.4	Dosis-Wirkungs-Kurve der Phytoalexinproduktion in Petersiliezell-Suspensionen nach HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Behandlung	46
3.5	Einfluß von cPTIO (NO-scavenger) auf die Dosis-Wirkung-Beziehung von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Konzentration und Phytoalexinproduktion	47
3.6	Synergistische Phytoalexinproduktion in Petersiliezellkultur nach Applikation von LPS und HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub>	48
3.7	Konzentrationsabhängige Ionenporenbildung durch HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> in synthetischen Liposomen	50
3.8	Ionenporenbildung durch HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> in synthetischen Liposomen	51
3.9	Ionenporenbildende Aktivität von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> in Eizellen von <i>Xenopus laevis</i>	52
3.10	Ionenporenbildende Aktivität von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> in Calcein-enthaltenden Asolectin-Liposomen	53
3.11	Position der Deletionen von 7 verschiedenen HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Konstrukten	54
3.12	Phytoalexinproduktion in Petersiliezellensuspensionen nach 24 h Behandlung mit HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Deletionskonstrukten	56
3.13	Einfluß der Inkubationszeit bei 95°C auf die HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Oligomerstabilität	57
3.14	Stabilisierung der HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Oligomere durch den chemischen Crosslinker BS <sup>3</sup>	59
3.15	<sup>45</sup> Calcium-Bindung durch HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub>	60
3.16	Einfluß von Calcium auf die HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Oligomerstabilität	
3.16a		61
3.16b		61

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

3.17	Elutionsprofil von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> nach einem Gelfiltrationslauf über eine Superdex 200	63
3.18	Elutionsprofil von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> nach dem einem Gelfiltrationslauf über eine Superdex 75	64
3.19	Untersuchung der HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Homooligomerisierung in lipophilem Milieu (Digitonin) mittels BlueNative-PAGE	66
3.20	Untersuchung der HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Homooligomerisierung in lipophilem Milieu (Dodecyl-β-D-maltosid, Octyl-β-D-glucopyranosid, Triton X-100) mittels BlueNative-PAGE	66
3.21	Interaktion von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> im Hefe-2-Hybrid-System	68
3.22	Interaktionsuntersuchung von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> und HrpA1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> im Hefe-2-Hybrid-System	69
3.23	Interaktionsuntersuchung von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> und HrpW1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> im Hefe-2-Hybrid-System	70
3.24	Elutionsprofil von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> , HrpW1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> nach dem Gelfiltrationslauf über eine Superdex 200	71
3.25	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung von HrpZ <sub>P<sub>sph</sub></sub>	72
3.26	HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Sekundärstrukturanteile bei unterschiedlicher Detergenzkonzentration	74

### Tabellenverzeichnis

#### 2 Material und Methoden

2.1	verwendete Bakterienstämme	23
2.2	verwendete Vektoren	23
2.3	Mengenangabe von Bestandteilen, die für ein einzelnes Mini-SDS-PAGE-Gel (8, 10 oder 12 %ig) notwendig sind	30
2.4	Mengenangaben der Bestandteile für ein BN-Gradientengel	33

#### 3 Ergebnisse

3.1	Vergleich der Fähigkeiten von HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> - Homologen und HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> - Mutanten hinsichtlich Abwehrinduktion/Porenbildung	53
3.2	Porenbildungsfähigkeit der HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Deletionskonstrukte ZΔ1 - ZΔ7 im Vergleich zum zum "full-length Protein", untersucht mit Hilfe des Liposomenassays	55

# 1 Einleitung

Ein für die Menschheit immer ernst zu nehmenderes Ernährungsproblem wird durch die rasch ansteigende Weltbevölkerung verursacht. Der Landwirtschaft kommt dabei die zentrale Rolle zu, diesem Problem durch einen intensiveren Anbau von Grundnahrungsgütern entgegenzuwirken. Aber schon seit den Anfängen der Landwirtschaft sah man sich mit Ernteverlusten, ausgelöst durch Schädlingsbefall, konfrontiert. Daneben birgt der Verzehr von mit mikrobiellen Allergenen, Toxinen oder Cancerogenen durchsetztem Pflanzenmaterial ein für den menschlichen Organismus nicht zu unterschätzendes Gesundheitsrisiko. Neben einer Ertragssteigerung wurde dementsprechend auch eine Eindämmung des Pflanzenbefalls durch Viren, Bakterien, Pilzen, Oomyceten oder Insekten verfolgt. Zu den herkömmlichen Methoden, Pflanzen vor Schädlingsbefall zu schützen, zählen die Züchtung pathogenresistenter Sorten und die Anwendung von Pestiziden, Fungiziden bzw. Insektiziden. Der Einsatz dieser chemischen Pflanzenschutzmittel resultiert aber nur in einem kurzfristigen Erfolg. Auch wenn vorerst eine Eindämmung des Pathogenbefalls zu verzeichnen ist, so stellt sich diese Methode langfristig doch als sehr problematisch dar, da deren Produktion und Anwendung einen immens störenden Einfluß auf das ökologische Gleichgewicht hat und sich darüberhinaus bei Pathogenen neue Resistenzen zeigen.

Die gezielte Züchtung pathogenresistenter Kulturpflanzen kann einen Einsatz sowie die Entwicklung dieser chemischen Mittel von vornherein vermeiden, auch wenn sich durch Kreuzung und Rückkreuzung diese Methode ähnlich zeit- und kostenintensiv darstellt. Allerdings gibt es auch Probleme bei einem großflächigen Anbau solcher Monokulturen. Pathogene unterliegen darin einem erhöhten Selektionsdruck und können nach Überwindung der Resistenzbarrieren Krankheitsepidemien verursachen, was durch die genetische Invariabilität dieser Monokulturen noch begünstigt wird. Aus diesem Grund ist die Erforschung der pflanzlichen Signalmechanismen nach einem Pathogenbefall, welche letztendlich in der Aktivierung von Abwehrreaktionen resultieren, essentiell wichtig. Darüberhinaus können durch molekularbiologische bzw. biotechnologische Verfahren gezielt Merkmale in Form von Genen zwischen Pflanzen transferriert werden. Eine schnellere Züchtung resistenter Kulturpflanzen sowie neue Vorgehensweisen zur Resistenzvermeidung sollen durch das Zusammenwirken von Forschung und Gentechnik erreicht werden. Ferner hilft zusätzlich das Verständnis der molekularen Grundlagen der mikrobiellen Infektion, um neue Ansatzpunkte für phytotherapeutische Interventionen mit dem Pathogenmetabolismus zu identifizieren.

## 1.1 Grundlagen pflanzlicher Pathogenresistenz

Die Schädigung zahlreicher ökonomisch bedeutender Kulturpflanzen wird neben vielfältigen existenzbedrohenden Umwelteinflüssen wie Trockenheit, Überflutungen, extremen Temperaturen, Salzstreß oder UV-Strahlung besonders durch phytopathogene Viren, Bakterien, Pilzen, Oomyceten und parasitierenden Insekten und Nematoden verursacht. Jedoch ist ein Krankheitsausbruch ein relativ seltenes Phänomen in Pflanzen. Die überwiegende Mehrheit, obwohl nahezu ständig den pathogenen Angriffen ausgesetzt, ist in ihrer natürlichen Umgebung resistent gegenüber den meisten potentiell pathogenen Mikroorganismen (Dangl and Jones 2001; Nürnberger and Lipka 2005). Mit der Nichtwirtsresistenz, auch als Basisresistenz oder Basisinkompatibilität bekannt (siehe Abbildung 1.1A), wird die Fähigkeit ganzer Pflanzenspezies bezeichnet, sich einer Infektion durch eine mikrobielle Spezies zu erwehren (Heath 2000; Kamoun 2001; Thordal-Christensen 2003). Diese vorherrschende Form der pflanzlichen Pathogenresistenz ist gekennzeichnet durch eine relativ hohe genetische Stabilität und dementsprechend selten vorkommenden Veränderungen im Wirtsspektrum von Phytopathogenen (Heath 2000; Kamoun 2001; Nürnberger and Brunner 2002; Nürnberger and Lipka 2005). Dabei bilden verschiedene Schutzmechanismen ein Netzwerk, welches aus konstitutiven Barrieren und induzierbaren Reaktionen besteht (Heath 2000; Kamoun 2001; Thordal-Christensen 2003; Jones and Takemoto 2004), so daß häufig eine Erschließung der Pflanze als Nährstoffquelle nicht unterstützt wird und die Vermehrung des Pathogens ausbleibt. Zu den konstitutiv auf der Pflanzenoberfläche vorhandenen strukturellen Barrieren (Hammond-Kosack and Jones 1996), welche ein Eindringen des Pathogens verhindern, zählen neben der wachshaltigen Kutikula auch durch Lignineinlagerungen verstärkte Zellwände (Ride 1983), antimikrobielle Enzyme oder Sekundärmetabolite wie Phenolderivate, Saponine, cyanogene Glykoside und Acetophenone (Bohlmann 1994; Elstner *et al.* 1996; Osbourn 1996a; Osbourn 1996b; Filippone *et al.* 1999). Sind Mikroorganismen nicht in der Lage, die pflanzlichen Abschlußgewebe zu überwinden und konstitutiv vorhandene Abwehrstoffe zu tolerieren, findet keine Erkennung durch die Pflanze statt, weswegen dementsprechend auch keine induzierbaren Abwehrreaktionen aktiviert werden.

Sollte jedoch das Pathogen diese konstitutiven Schutzmechanismen überwinden, sei es durch enzymatischen Abbau der Zellwände oder der antimikrobiellen Sekundärmetabolite, so kann es an der pflanzlichen Plasmamembran erkannt werden. Hierbei spielt die Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ eine grundlegende Rolle bei der Aktivierung von Antworten der angeborenen Immunität (Nürnberger *et al.* 2004). In natürlichen Pflanze-Mikrobe-Interaktionen werden solche Immunantworten durch eine Vielzahl von Pathogen-assoziierten Oberflächenstrukturen, (PAMPs), bzw. Mikrobe-assoziierten Oberflächenstrukturen (MAMPs) (siehe 1.1.1),

ausgelöst (Nürnberger and Scheel 2001; Gomez-Gomez and Boller 2002; Parker 2003), welche die weitere Ausbreitung des Pathogens verhindern helfen und als PAMP-ausgelöste Immunität (PTI, „PAMP-triggered immunity“; siehe Abbildung 1.1B) die ersten aktiven pflanzlichen Reaktionen auf mikrobielle Perzeption darstellen (Nürnberger *et al.* 2004; Chisholm *et al.* 2006)

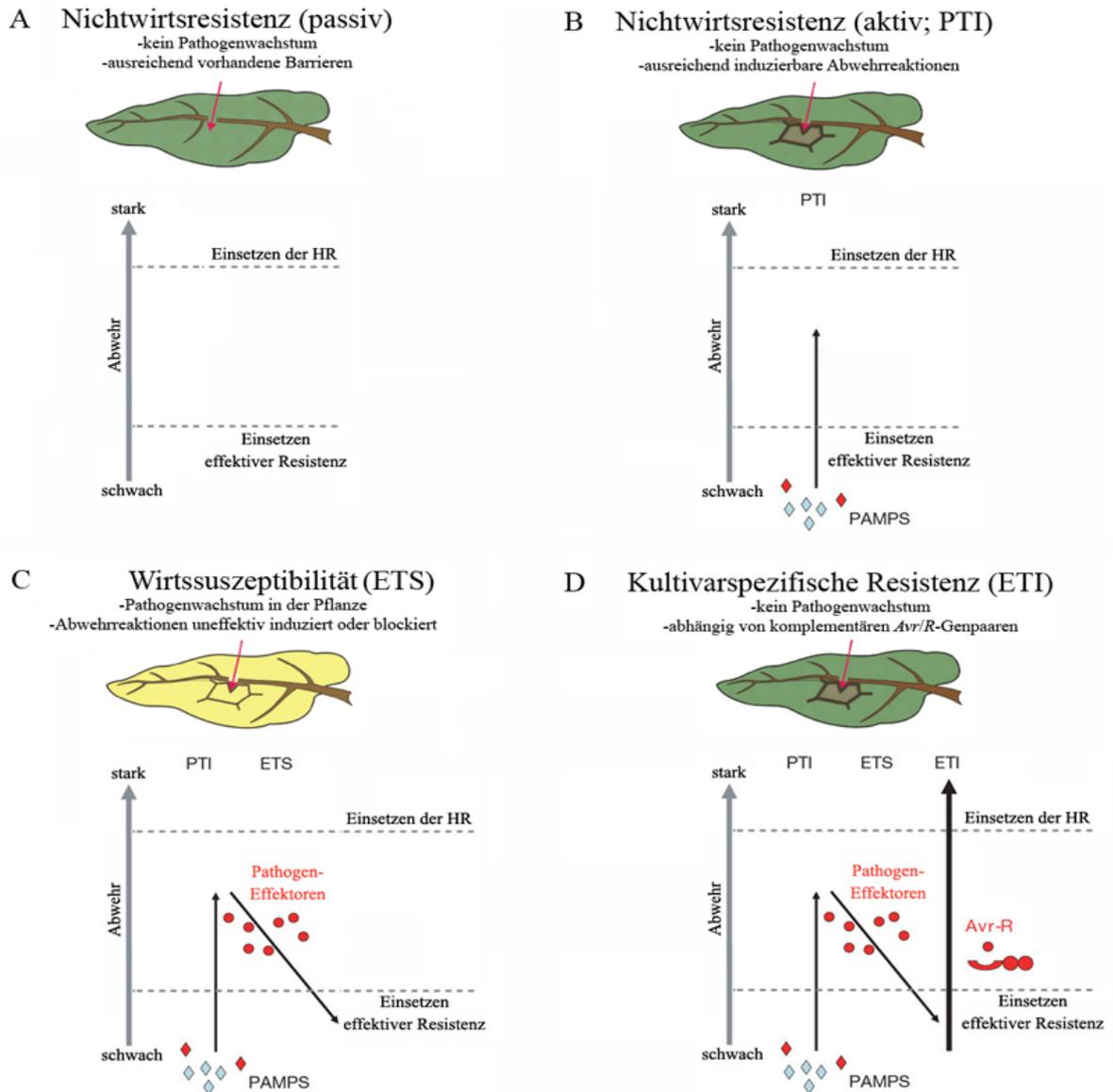


Abb.1.1: Übersicht über die verschiedenen Formen der pflanzlichen Pathogenresistenz (Nürnberger *et al.* 2004; Jones and Dangl 2006)

Die pflanzliche Krankheitsresistenz vollzieht sich aber nicht nur auf der Speziesebene, sondern zusätzlich auch bei einzelnen Kultivaren. Im Verlauf der Evolution konnten einzelne erfolgreiche phytopathogene Arten die pflanzliche Basisresistenz durch den Erwerb von Virulenzfaktoren bzw. Effektorproteinen überwinden, welche sie in die Lage versetzen, die Abwehrreaktionen entweder zu umgehen oder gar komplett zu unterdrücken (Heath 2000; Cohn *et al.* 2001; Dangl and Jones 2001; Nürnberger and Brunner 2002; Thordal-Christensen 2003; Jones and Dangl 2006). Diese

Wirtssuszeptibilität bzw. Basiskompatibilität (ETS, „effector-triggered susceptibility“; siehe Abbildung 1.1C) beschreibt die Interaktion zwischen nunmehr virulenten Pathogenen und suszeptiblen Pflanzenspezies, welche als Wirtspflanzen von Pathogenen kolonisiert werden und Krankheitssymptome aufweisen. Jedoch erfolgte in einer Art Koevolution aufgrund des auf den Wirtspflanzen einwirkenden Selektionsdrucks die Entwicklung von Resistenzgenen, welche spezifisch pathogenassoziierte Effektoren oder deren Aktivität erkennen. Diese sogenannte kultivarspezifische Wirtsresistenz oder auch inkompatible Pflanze/Pathogen-Interaktion (Takken and Joosten 2000; Bonas and Lahaye 2002; Holt *et al.* 2003) ist abhängig von komplementären Paaren pathogenkodierter Avirulenzgene (*avr*) und pflanzlichen Resistenzgenen (*R*) („Gen-für-Gen-Hypothese“ nach Flor 1955; Flor 1971; De Wit 1996; Bergelson *et al.* 2001). Dabei führt die Erkennung des Avirulenzgenkodierten Effektorproteins oder dessen Wirkung durch das pflanzliche Resistenzprotein zur Aktivierung von Abwehrreaktionen der Effektor-induzierten Immunität (ETI, „effector-triggered immunity“; siehe Abbildung 1.1D) (Van Der Biezen and Jones 1998; Takken and Joosten 2000; Dangl and Jones 2001; Schneider 2002; Bonas and Lahaye 2002; Collmer *et al.* 2002; Jones and Dangl 2006), während der Verlust eines der beiden Gene oder der Erwerb neuer Effektoren durch das Pathogen die effektorstimulierte Resistenz verhindert (Jones and Dangl 2006) und zur Erkrankung der infizierten Pflanze führt.

Beide Resistenzen nutzen ein auffallend ähnliches Spektrum von induzierbaren pflanzlichen Abwehrreaktionen, auch wenn die ETI aufgrund der HR (siehe 1.1.3) eine verstärkte und beschleunigte Form der PTI darstellt (Boller 1995; Yang *et al.* 1997; Ebel and Scheel 1997; Scheel 1998; Heath 2000; Dangl and Jones 2001; Nürnberger and Scheel 2001; Jones and Dangl 2006). Das deutet darauf hin, daß in der Nichtwirtsresistenz das Wachstum des Pathogens erfolgreich kontrolliert wird, während in suszeptiblen Wirtspflanzen Abwehrreaktionen nur sehr ineffektiv induziert werden können oder vom Pathogen unterdrückt werden (Ingle *et al.* 2006).

### 1.1.1 PAMPs als Auslöser pflanzlicher Immunabwehr

Die Grundvoraussetzung für die Induktion pflanzlicher Abwehrreaktionen ist unabhängig von der Art der Immunität die Fähigkeit "Selbst" von "Nicht-Selbst" zu unterscheiden. In der Nichtwirtsresistenz und in suszeptiblen Wirtspflanzen werden Abwehrreaktionen durch die Erkennung von PAMPs induziert. Zum Verständnis, weswegen Pflanzen diese "antigenen" Epitope der Pathogenoberflächen erkennen und daraufhin das Abwehrsystem aktivieren können, trug in den letzten Jahren die Untersuchung der angeborenen Immunität ("innate immunity") im tierischen System bei. Im Jahr 1997 wurde erstmals ein Modell über die Komponenten der angeborenen Immunität in Säugern beschrieben (Medzhitov and Janeway 1997). Laut diesem Modell sind die von den Pathogenen stammenden charakteristischen Strukturen Pathogenassoziierte molekulare Muster ("pathogen-associated molecular pattern", PAMP), die an

spezielle Rezeptoren ("pattern recognition receptor") binden und dadurch die Synthese antimikrobieller Substanzen auslösen (Aderem and Ulevitch 2000; Underhill and Ozinsky 2002; Medzhitov and Janeway 2002; Zasloff 2002; McGuinness *et al.* 2003). Einheitliche Merkmale von PAMPs sind ihre hochkonservierte Struktur, ihr ausschließliches Vorkommen in Mikroben und das völlige Fehlen in potentiellen Wirtsorganismen; außerdem sind sie für den Lebenszyklus des Pathogens funktionell wichtig, was auch für die von Pflanzen erkannten PAMPs zutrifft (Brunner *et al.* 2002, Felix and Boller 2003). Pflanzen scheinen demnach vornehmlich solche Strukturmerkmale des Pathogens zu erkennen, welche das Pathogen durch Mutation nicht ohne Verlust der physiologischen Funktionalität verändern kann. Erstaunlicherweise gibt es eine Reihe von Molekülen, welche sowohl im tierischen als auch im pflanzlichen System Abwehrreaktionen auslösen (Darvill and Albersheim 1984; Boller 1995; Ebel and Scheel 1997; Nürnberger and Brunner 2002, Zipfel and Felix 2005). Dazu gehören beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) Gram-negativer Bakterien (Dow *et al.* 2000; Meyer *et al.* 2001; Coventry and Dubery 2001; Newman *et al.* 2002) oder flg22, ein im N-terminalen Bereich des Flagellins hochkonserviertes Peptid (Felix *et al.* 1999). Die Erkennung identischer Pathogenoberflächenstrukturen durch Pflanze und Tier mit anschließender Auslösung von Abwehrreaktionen deutet auf eine evolutionäre Konservierung der angeborenen Immunität hin.

### 1.1.2 Perzeption von PAMPs und Effektoren

Die strukturelle Diversität der PAMPs läßt vermuten, daß Pflanzen über eine Vielzahl an molekularen Perzeptionskapazitäten verfügen. Im Gegensatz zu Säugern besitzen Pflanzen keine mobilen Abwehrzellen, geschweige denn ein somatisches adaptives Immunsystem (Jones and Dangl 2006). Ihr Verteidigungsrepertoire beruht auf der angeborenen Immunität jeder einzelnen Zelle sowie auf systemischen Signalen, die von der Infektionsstelle ausstrahlen und zur Ausprägung systemischer Abwehrreaktionen führen (Dangl and Jones 2001; Ausubel 2005; Chisholm *et al.* 2006).

Die Erkennung von hochkonservierten und sich evolutionär kaum verändernden PAMPs trägt zur PAMP-induzierten Immunität bei (PTI, siehe 1.1). Aufgrund der enormen strukturellen PAMP-Variabilität, mit denen Pflanzenzellen bei der Interaktion mit Pathogenen konfrontiert sind, wobei PAMPs Abwehrreaktionen in nanomolaren Konzentrationsbereichen mit hoher Spezifität auslösen, ging man von der Existenz von plasmamembranständigen PAMP-Rezeptoren aus. Obwohl eine Vielzahl an PAMPs identifiziert und charakterisiert worden sind, gab es dagegen vergleichsweise wenig Hinweise auf die Natur entsprechender Rezeptoren (Ingle *et al.* 2006). Die Charakterisierung der PAMP-Bindungsproteine vollzog sich hauptsächlich auf kinetischem und biochemischem Weg. So konnten beispielsweise durch Quervernetzungsversuche in Petersiliemembranen Bindungsproteine für ein 13 Aminosäure-umfassendes PAMP aus

einer Transglutaminase aus *Pythophthora sojae* (Pep13, Nürnberger *et al.* 1994) von 100 kDa und 145 kDa (Nennstiel *et al.* 1998) sowie in Tabak Cryptogein-Bindungsproteine mit einem Molekulargewicht von 162 kDa und 50 kDa identifiziert werden (Bourque *et al.* 1999). Jedoch ist die Isolation der Rezeptoren aus pflanzlichen Membranpräparationen sowie die Klonierung jener Rezeptor-kodierenden Gene sehr problematisch (Ebel and Scheel 1997; Nürnberger and Scheel 2001).

Für einige PAMPs konnte dennoch eine Identifikation der Rezeptoren erreicht werden. Ein durch Ligandenaffinitätschromatographie aufgereinigtes lösliches Protein aus Sojabohne enthält eine Glukanhydrolase- sowie eine  $\beta$ -Glukan-bindende Domäne und scheint aufgrund fehlender Domänen für die Signalübertragung über die Plasmamembran Teil eines Multikomponentenrezeptorkomplexes zu sein (Mithöfer *et al.* 2000; Fliegmann *et al.* 2004). Der Rezeptor des pilzlichen Elicitors Xylanase in Tomate ist ein Transmembranprotein und weist Leuzinzipper- und extrazelluläre LRR-Domänen (LRR, „Leucin-rich-repeat“) auf. Unter allen pflanzlichen PAMP-Rezeptoren ist der Flagellinrezeptor FLS2 („flagellin sensitive 2“) der wohl am intensivsten charakterisierte. Seine Identifikation erfolgte mittels eines Forward-Genetic-Screens nach Flagellin-insensitiven Mutanten (Gomez-Gomez and Boller 2000). *FLS2* kodiert eine 120 kDa LRR-Rezeptorkinase (LRR-RLK; „Leucine-rich-repeat-Receptor-like kinase“) und bindet das flg22-Epitop aus bakteriellem Flagellin (Chinchilla *et al.* 2006). Im *Arabidopsis*-Genom sind mehr als 600 RLK-ähnliche Sequenzen vorhanden, von denen solche mit einer extrazellulären LRR-Domäne die zahlenmäßig größte Gruppe ausmacht. Ein weiteres dieser Gruppe zugehörige Mitglied wurde kürzlich als Rezeptor des bakteriellen Elongationsfaktors EF-Tu identifiziert (Zipfel *et al.* 2006). Wie wichtig die Erkennung dieses PAMPs im Hinblick auf die pflanzliche Abwehr ist, zeigt die erhöhte Transformationseffizienz von *Arabidopsis efr-* (EF-Tu-Rezeptor) Mutanten durch *Agrobacterium tumefaciens* sowie die erhöhte Anfälligkeit von *fls2*-Mutanten gegen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Zipfel *et al.* 2004). In Säugern fungiert eine Familie von konservierten transmembranen Toll-like Rezeptoren (TLR) entweder direkt oder indirekt als PAMP-Rezeptoren (Underhill and Ozinsky 2002; Akira 2003; Akira *et al.* 2003; Akira and Takeda 2004). Da nur eine geringe Sequenzhomologie besteht zwischen TLRs und pflanzlichen PAMP-Rezeptoren und darüberhinaus FLS2 und TLR5 verschiedene Flagellinepitope erkennen (Donnelly and Steiner 2002; Smith *et al.* 2003), ist es wahrscheinlich, daß beide Flagellinperzeptionssysteme das Ergebnis konvergenter Evolution sind (Ausubel 2005; Zipfel and Felix 2005).

Pflanzliche Immunität kann darüberhinaus auch auf einer anderen Ebene von Perzeptionssystemen erreicht werden (Jones and Dangl 2006). Rezeptoren des zweiten Systems fungieren hauptsächlich innerhalb der Pflanzenzelle und tragen als *R*-Gen-kodierte NB-LRR-Proteine zur Erkennung von *Avr*-Genprodukten bzw. Effektoren und damit zur Effektor-induzierten Immunität (ETI, siehe 1.1) bei. NB-LRR-Proteine sind

benannt nach ihrer in Domänen eingeteilten Struktur, welche Nukleotid-bindende Regionen (NB, „nucleotide-binding“) enthält sowie Bereiche, die reich an Leuzin sind (Belkhadir *et al.* 2004a). Viele NB-LRR-Proteine erkennen die Effektorproteine indirekt durch ihre Wirkung auf spezielle Wirtsziele. Entscheidendes Kriterium dieser „Guard Hypothese“ (Dangl and Jones 2001) ist die biochemische Manipulation oder Veränderung des Wirtszielmoleküls durch den Effektor in suszeptiblen Wirtspflanzen, das zu einer pathogeninduzierten Modifikation der eigenen molekularen Muster führt (verändertes „Selbst“). Dadurch wiederum wird das korrespondierende NB-LRR-Protein aktiviert und die effektorinduzierte Immunität wird aktiviert. Ein erstklassiges Beispiel bietet das 211 Aminosäure umfassende, acylierte und in der Plasmamembran lokalisierte *Arabidopsis* RIN4-Protein (Kim *et al.* 2005). RIN4 stellt das Virulenzzielprotein der Typ-III-Effektoren AvrRPM1, AvrB und AvrRpt2 aus *Pseudomonas syringae*-Pathovaren dar, trägt aber selber nicht zur Resistenz bei. Die Interaktion von AvrRPM1 und AvrB mit RIN4 und die daraufhin induzierte Phosphorylierung von RIN4 aktiviert das NB-LRR-Protein RPM1. AvrRpt2, eine in der Wirtszelle aktivierte (Coaker *et al.* 2005) Cysteinprotease (Axtell *et al.* 2003), eliminiert RIN4 durch eine an zwei Peptidbindungen stattfindende Hydrolyse (Kim *et al.* 2005; Chisholm *et al.* 2005), wodurch ein weiteres NB-LRR-Protein, RPS2, aktiviert wird (Mackey *et al.* 2003; Axtell and Staskawicz 2003).

### 1.1.3 Intrazelluläre Signaltransduktion in der pflanzlichen Pathogenabwehr

Die wohl bekannteste pflanzliche Abwehrreaktion, die durch die Perzeption von PAMPs bzw. Effektoren und der daraufhin stattfindenden Signaltransduktion eingeleitet wird, ist die häufige, aber nicht immer beobachtete hypersensitive Zelltodreaktion (HR), welche durch ein schnelles und lokal begrenztes Absterben pflanzlicher Zellen in unmittelbarer Umgebung vom Infektionsort gekennzeichnet ist (Dangl *et al.* 1996; Yang *et al.* 1997; Greenberg 1997; Alvarez 2000). Aufgrund der fehlenden Nährstoffgrundlage und dem gleichzeitigen Freisetzen antimikrobieller Substanzen wird das Wachstum biotropher Pathogene eingeschränkt. Die HR zeigt zellbiologisch betrachtet Mechanismen, die an apoptotischen bzw. programmierten Zelltod tierischer Zellen erinnern (Lam *et al.* 2001). Pflanzliche Abwehrreaktionen schließen ebenfalls die transkriptionelle Aktivierung sogenannter "pathogenesis-related genes" (PR-Gene) ein (Kombrink and Somssich 1997). Diese kodieren u.a. für lytische Enzyme wie Chitinasen, Glukanasen und Proteasen, die ihre antimikrobielle Wirkung durch den Abbau bakterieller oder pilzlicher Zellwände zeigen. Weiterhin werden Gene von Enzymen des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels aktiviert, welcher Ausgangsverbindungen antimikrobieller Sekundärmetabolite (Phytoalexine) bereitstellt. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, "reactive oxygen species") haben nicht nur durch ihre direkte antimikrobielle Wirkung Bedeutung. Sie sind auch als Signalmoleküle zur Aktivierung von Immunreaktionen wie beispielsweise der hypersensitiven Zelltodreaktion und an der Verstärkung der Zellwand durch oxidative

Quervernetzung von prolin- und hydroxyprolinreichen Glykoproteinen beteiligt, darüberhinaus an der Ligninpolymerisierung und der Kalloseeinlagerung an der Infektionsstelle (Doke 1983; Yang *et al.* 1997; Lamb and Dixon 1997; Piedras *et al.* 1998; Scheel 1998; Alvarez 2000; Bolwell *et al.* 2002; Neill *et al.* 2002).

Während die beschriebenen Abwehrreaktionen im den Infektionsort umgebenden Gewebe aktiviert werden, kommt es überdies in vielen Pflanzen zur Ausbildung einer systemisch erworbenen Resistenz ("systemic acquired resistance", SAR) in nichtinfizierten Bereichen der Pflanze (Dong 2001), wobei die Produktion von Salizylsäure für die Ausbildung dieser Resistenz notwendig ist (Dong 1998). Die SAR schützt die Pflanze für längere Zeit gegen nachfolgende Infektionen verschiedener Pathogene (Alvarez *et al.* 1998; Pieterse and van Loon 1999). Nichtpathogene Bodenbakterien wie *Pseudomonas fluorescens* verursachen dagegen die Aktivierung einer anderen Form der systemischen Resistenz, die induzierte systemische Resistenz (ISR). Dabei scheinen die Pflanzenhormone Ethylen und Jasmonsäure eine zentrale Rolle zu spielen (Dong 1998; Pieterse and van Loon 1999).

Die Verbindung zwischen PAMP- bzw. Effektorperzeption und der Auslösung von Abwehrreaktionen wird durch intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden hergestellt. Die wichtigsten Erkenntnisse der Forschungen der letzten Jahre dokumentieren eine bedeutende Übereinstimmung zwischen Signaltransduktionskomponenten ausgelöst durch PAMP-Erkennung und jenen, die an der Effektor-induzierten Immunität beteiligt sind. Das erinnert an das ähnliche Muster induzierter Abwehrreaktionen in Nichtwirts- und Wirtsresistenz (Yang *et al.* 1997; Nürnberger and Scheel 2001). Ein einzelner Erkennungsvorgang löst aber nur ganz charakteristische Signalkaskaden sowie die Aktivierung ganz bestimmter Abwehrreaktionen aus. Interessanterweise sind viele Bestandteile der pflanzlichen Signalkaskaden ebenso im tierischen System von zentraler Bedeutung bei der Auslösung angeborener Immunreaktionen (Barton and Medzhitov 2003).

Zu den schnellsten messbaren Reaktionen der Pflanzenzelle nach einem Pathogenkontakt oder auf eine PAMP-Behandlung zählen Veränderungen der Ionenpermeabilität der Plasmamembran, die sich in einem Ausstrom von  $K^+$  und  $Cl^-$  sowie einem Einstrom von  $H^+$  und  $Ca^{2+}$  äußern (Atkinson *et al.* 1996; Gelli *et al.* 1997; Jabs *et al.* 1997; Zimmermann *et al.* 1997; Blatt *et al.* 1999; Klüsener and Weiler 1999). So ruft die Anwendung von Pep13 in Petersiliezellensuspensionen eine extrazelluläre pH-Wert-Zunahme hervor (Jabs *et al.* 1997).

Eine weitere wichtige Komponente bei der Auslösung pflanzlicher Abwehrreaktionen ist Stickstoffmonoxid (NO; Delledonne *et al.* 1998; Klessig *et al.* 2000; Wendehenne *et al.* 2001). Während NO selbst keine antimikrobielle Wirkung besitzt, ist das Reaktionsprodukt von NO mit Sauerstoff, das Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ), toxisch für Mikroorganismen. Nach einer Pathogeninfektion ist ein erhöhter NO-Spiegel in den Pflanzenzellen ebenso nachweisbar wie nach einer PAMP-Behandlung. So erfolgt in einer

Nichtwirtsinteraktion in Tabak eine erhöhte NO-Produktion nach *Pseudomonas syringae*-Infektion (Mur *et al.* 2005). Ferner resultiert die Infektion von *Arabidopsis* mit avirulenten *Pseudomonas syringae*-Bakterien in einem erhöhten NO-Spiegel, dessen Inhibierung während der Infektion zu einer Reduktion der HR und der Expression der Abwehrgene führt (Zeier *et al.* 2004).

Mitogen-aktivierte Proteinkinasekaskaden (MAPK-Kaskaden) sind weitere zentrale Elemente in der pflanzlichen Streßsignaltransduktion (Zhang and Klessig 2001; Jonak *et al.* 2002). MAP-Kinasen sind die terminalen Bestandteile dieser Kaskaden, deren einzelne Module (MAPKKK, MAPKK, MAPK) posttranslational reversibel durch Transphosphorylierungen aktiviert werden. Eine allgemeine Beteiligung von MAP-Kinasen in PAMP- als auch in Effektor-vermittelter Immunität wurde postuliert, da die Aktivierung zweier MAP-Kinasen aus Tabak (SIPK und WIPK) durch Elicitierung mit dem Tabakmosaikvirus, einigen R-Proteinen, Flagellin und PAMPs der pilzlichen Zellwand beobachtet wurde (Romeis *et al.* 1999; Zhang and Klessig 2001). Weiterhin ist MPK6 aus *Arabidopsis* für die Aktivierung von PTI und ETI notwendig (Menke *et al.* 2004).

Die Ähnlichkeit der in PAMP-induzierter Immunität und Effektor-induzierter Immunität auftretenden Muster legt die Vermutung nahe, daß jegliche Resistenz bei Pflanze/Pathogen-Interaktion auf der Signalperzeptionsebene festgelegt ist. Jedoch sollte man nicht vergessen, daß funktionell ähnliche Module in verschiedenen eukaryotischen Systemen nicht notwendigerweise eine hohe Konservierung des komplexen Signalnetzwerks bedeutet und selbst zwischen verschiedenen Pflanzenspezies Unterschiede erwartet werden können (Nürnberger *et al.* 2004).

### **1.2 Interaktion zwischen Pflanze und bakteriellen Pathogenen**

Viele Gram-negative Bakterien nutzen ein Sekretionssystem, um Effektoren entweder direkt in die Wirtszelle zu translozieren oder in den extrazytoplasmatischen Raum zu sekretieren. Generell kann man zwei verschiedene Kategorien der Proteinsekretion unterscheiden. Auf der einen Seite charakterisiert die indirekte Strategie die Sekretion von Proteintoxinen in das extrazelluläre Medium, wohingegen die kontaktabhängige Translokation den direkten Transport von Virulenzfaktoren in das Wirtszytosol vermittelt. Für die indirekte Sekretion stehen dem Pathogen drei verschiedene Sekretionssysteme (I, II und V) zur Verfügung, um Proteintoxine zwecks Assoziation mit der Wirtszelle aus dem Bakterium zu entlassen (Thanabalu *et al.* 1998; Henderson *et al.* 2004; Cianciotto 2005). Als Paradebeispiel für Typ-I-Exporter dient die Sekretion von  $\alpha$ -Hämolysin aus *E.coli* (Thanabalu *et al.* 1998). Mittels des Typ-I-Sekretionsweges werden Proteine direkt aus dem bakteriellen Zytosol über die äußere Membran ohne periplasmatisches Intermediat sekretiert. Substrate dieses Systems weisen keine

abspaltbare N-terminale Signalsequenz auf, dafür enthalten sie ein etwa 60 Aminosäurelanges C-terminales Sekretionssignal, welches während der Sekretion nicht abgespalten wird (Binet *et al.* 1997). Das Typ-II-Sekretionssystem ist verantwortlich für die Sekretion extrazellulärer Enzyme und Toxine durch eine Vielzahl Gram-negativer Bakterien (Pugsley *et al.* 1997; Russel 1998; Stathopoulos *et al.* 2000). Auch als Sekretion-abhängiger Weg bekannt, vollzieht sich dieses Sekretionssystem in einem Zweistufenprozess. Zu sekretierende Proteine werden als Sec-Substrate über die innere Membran unter Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz und nachfolgender Proteinfaltung in das Periplasma transferiert. Anschließend erfolgt nach einer möglicherweise extrem kurzen Zeitdauer der Transport vom Periplasma in das extrazelluläre Medium durch ein in der äußeren Membran lokalisiertes Sekretin (Voulhoux *et al.* 2001; Desvaux *et al.* 2004; Filloux 2004; Rossier and Cianciotto 2005). Zu den wahrscheinlich einfachsten Proteinsekretionsmechanismen zählen die unter dem Typ-V-Sekretionssystem zusammengefassten Systeme, mit denen Proteine entweder durch ein Autotransportersystem (Va), einem Zweikomponentensekretionsweg (Vb) oder durch ein kürzlich beschriebenes Vc-System sekretiert werden (Desvaux *et al.* 2003; Desvaux *et al.* 2004).

Im Gegensatz zur indirekten Sekretionsstrategie repräsentiert die kontaktabhängige Translokation von Virulenzfaktoren bzw. Effektorproteinen vom Bakterium in den Wirt einen weiteren Mechanismus. Lösliche Proteine werden ohne extrazelluläres Intermediat durch beide bakterielle Membranen sowie die eukaryotische Wirtsmembran transportiert (Rosqvist *et al.* 1994). Die kontaktabhängige Translokation von Effektorproteinen wird durch zwei verschiedene Sekretionssysteme, das Typ-III-Sekretionssystem und das Typ-IV-Sekretionssystem, vermittelt (Cascales and Christie 2003; Ghosh 2004). Das Typ-III-Sekretionssystem teilt mit dem Flagellumsekretionssystem einen gemeinsamen Ursprung, da das Zusammenfügen des Nadelkomplexes analog der geordneten Sekretion und des Aufbaus des Flagellenfilaments verläuft (Kubori *et al.* 2000; Macnab 2003; Blocker *et al.* 2003). Es wird angenommen, daß mittels Porenbildung eines auf der distalen Spitze der Nadelstruktur befindlichen Translokator-Komplexes die Wirtszellmembran durchdrungen wird (Blocker *et al.* 1999; Mueller *et al.* 2005). Das Translokon humanpathogener *Yersinia* spp. beispielsweise wird von einem Komplex bestehend aus YopB, YopD und LrcV gebildet (Sarker *et al.* 1998, Cornelis 2006). Dabei bewirkt der enge Kontakt des Typ-III-Sekretionssystems mit der Wirtszelle ein Umschalten von der Sekretion von Strukturkomponenten zur Translokation von Effektorproteinen (Pettersson *et al.* 1996; Cornelis 2006). Der Transport dieser Effektorproteine resultiert in der biochemischen Veränderung von Wirtszellprozessen mit dem Ziel, die bakteriellen Überlebens- und Vermehrungsbedingungen zu fördern. Neben dem Transport von Effektormolekülen in eukaryotische Zielzellen wird das Typ-IV-Sekretionssystem auch für den Austausch von genetischem Material in Form des Konjugationssystems genutzt (Bundock *et al.* 1995; Bates *et al.* 1998; Zhu *et al.* 2000; Waters 2001; Lawley *et al.* 2003; Cascales and Christie

2003) Mit dem Typ-III-Sekretionssystem tierischer und pflanzlicher Pathogene wird sich im Folgenden ausführlich auseinandergesetzt.

### 1.2.1 Typ-III-Sekretionssystem

Mit Hilfe des Typ-III-Sekretionssystems injizieren an der Wirtszelloberfläche anhaftende oder sich innerhalb von Vakuolen im Inneren des Wirtes befindliche Gram-negative bakterielle Pathogene Effektorproteine in das Wirtszytosol ausschließlich zu dem Zweck, durch Untergrabung der Wirtsabwehr die inter- oder intrazellulären Bedingungen im Hinblick auf Wachstum und Vermehrung des Pathogens zu optimieren (Rosqvist *et al.* 1994; Sory and Cornelis 1994; Cornelis and Wolf-Watz 1997; Hueck 1998; Galan 1999; Cornelis and van Gijsegem 2000; He *et al.* 2004; Troisfontaines and Cornelis 2005; Grant *et al.* 2006). Der Typ-III-Sekretionsapparat oder „Injektisom“ besteht aus zwei die beiden bakteriellen Membranen überspannenden und durch einen Stab miteinander verbundenen Ringpaaren und einer außerhalb des Bakteriums hervorstehenden Nadelstruktur (siehe Abbildung 1.2; Kubori *et al.* 1998; Kimbrough and Miller 2000; Blocker *et al.* 2001; He *et al.* 2004). Die Länge der Nadel ist genetisch kontrolliert (Journet *et al.* 2003) und der Länge der sich auf der bakteriellen und Wirtszelloberfläche befindlichen Makromoleküle angepasst (Mota *et al.* 2005). Für den Injektionsprozess sind porenbildende Translokatorproteine notwendig, jedoch ist nicht geklärt, ob diese Translokatoren bereits vor dem Kontakt mit der Zielmembran an der Nadelspitze vorhanden sind (Håkansson *et al.* 1996; Tardy *et al.* 1999; Blocker *et al.* 1999; De Geyter *et al.* 2000; Rossier *et al.* 2000; Ide *et al.* 2001; Büttner and Bonas 2002; Büttner *et al.* 2002). Somit scheint die Primärfunktion der Nadelstruktur nicht im Durchbohren der Zielmembran zu liegen, sondern eher in einer Kontaktaufnahme zu jenen Membranen (Mota *et al.* 2005).

Normalerweise ist das Injektisom auf einem einzelnen Gencluster einer mobilen genetischen Einheit, sei es Plasmid oder ein sogenanntes „pathogenicity island“ (Hacker and Kaper 1999), kodiert, welches im Genom verwandter nichtpathogener Bakterien fehlt. Kürzlich durchgeführte Sequenzierungen ergaben ein generelles Vorkommen des Typ-III-Sekretionssystems in Proteobakterien und *Chlamydiae*-Spezies (Pallen *et al.* 2005). Wie bereits erwähnt, weist das Injektisom einen mit dem bakteriellen Flagellum gemeinsamen evolutionären Ursprung auf (Cornelis 2006). Das wird besonders deutlich, wenn man sich die Basalkörper und beteiligte Proteine beider Systeme näher anschaut. Darüberhinaus zeugen spezifische Chaperone (Wattiau and Cornelis 1993; Auvray *et al.* 2001; Feldman and Cornelis 2003; Parsot *et al.* 2003; Ramamurthi and Schneewind 2003) und für die Regulation der Größe der extrazellulären Fortsätze zuständige Systeme (Minamino and Pugsley 2005) von funktionellen Ähnlichkeiten. Das für die Bewegung des Bakteriums verantwortliche Flagellum stellt eigentlich einen Sekretionsapparat dar, der, analog zum Export von Nadeluntereinheiten des Typ-III-Sekretionssystems, Filamentuntereinheiten exportiert (Young and Young 2002; Konkel *et al.* 2004; Lee and Galan 2004).

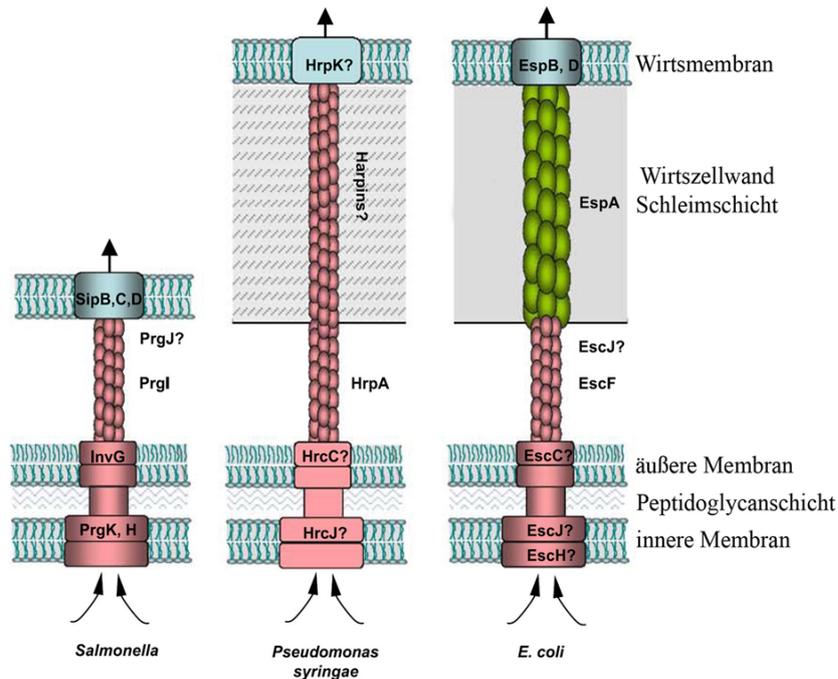


Abb.1.2: Schematische Darstellung (nicht maßstabsgetreu) des Typ-III-Sekretionssystems am Beispiel tierischer (*Salmonella*, *E. coli*) und phytopathogener (*Pseudomonas syringae*) Bakterien (He *et al.* 2004).

### 1.2.1.1 Typ-III-Sekretionssystem tierischer Pathogene

Mit einem Typ-III-Sekretionssystem ausgestattete tierische Pathogene translozieren im Allgemeinen zwischen sechs bis mehr als 20 verschiedene Effektoren in die Wirtszelle, wo sie durch ihre intrinsische biochemische Aktivität die regulierende Funktion entscheidender Wirtsmoleküle verändern. Zu diesen Zielmolekülen zählen neben kleinen GTP-bindenden Proteinen und MAP-Kinasen auch Phosphoinositide (Mota and Cornelis 2005, Cornelis 2006). Beispielsweise fungiert der Typ-III-Effektor SopE aus *Salmonella* als ein Guaninnukleotidaustauschfaktor und aktiviert die kleinen GTP-bindenden Proteine Cdc42 und Rac1, die wiederum die Aktinpolymerisation und den Umbau des Zytoskeletts regulieren (Hardt *et al.* 1998). Resultierend daraus werden Salmonellen durch normalerweise nichtphagozytierende Zellen in Vakuolen aufgenommen, in welcher sich die Bakterien vermehren. Im Gegensatz dazu wird die Phagozytose von *Yersinia* durch Makrophagen verhindert, wenn Isoprenylgruppen von Rho-GTPasen abgespalten werden, wodurch diese GTPasen sich von ihrer Plasmamembranlokalisation lösen. Diese Isoprenylabspaltung wird durch den als Cysteinprotease fungierenden *Yersinia* Typ-III-Effektor YopT katalysiert (Ruckdeschel *et al.* 2001; Shao *et al.* 2002).

Durch phylogenetische Untersuchungen konnten sieben verschiedene Injektisomfamilien identifiziert werden (Gophna *et al.* 2003; Pallen *et al.* 2005; Troisfontaines and Cornelis 2005), wobei drei von ihnen in tierischen Pathogenen wie *Yersinia* spp., *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* oder *Escherichia coli* vorkommen. Während für den Aufbau des Injektisoms etwa 25 Proteine notwendig sind,

besteht der Kern des Systems aus höchstens neun Proteinen, deren Sequenz hochkonserviert ist (Cornelis 2006). Eines dieser konservierten und für das Injektisom essentiellen Proteine, die ATPase YscN, speist den Exportprozess mit Energie und ist auch für das Abtrennen der zytoplasmatischen Chaperone von den Typ-III-Sekretionssubstraten verantwortlich (Woestyn *et al.* 1994; Akeda and Galan 2005). Die Injektisomnadel, eine ungefähr 60 nm lange gerade Röhre mit einem Innendurchmesser von etwa 25 Å, stellt eine helikale Polymerisation von 100 – 150 Molekülen der YscF-Familie dar (Kubori *et al.* 2000; Hoiczky and Blobel 2001). Ein aktives Injektisom endet nach dem Kontakt mit der Zielzelle mit einer in deren Plasmamembran insertierten Pore (Håkansson *et al.* 1996; Neyt and Cornelis 1999; Blocker *et al.* 1999, Goure *et al.* 2005), deren Proteine, sogenannte Translokatoren, ebenfalls Typ-III-sekretierte Substrate sind (Rosqvist *et al.* 1994; Sory and Cornelis 1994; Boland *et al.* 1996; Pettersson *et al.* 1999; Blocker *et al.* 1999). Generell gibt es in jedem Typ-III-Sekretionssystem drei Translokatoren, von denen jeweils zwei von ihnen hydrophobe Domänen (YopB und YopD in *Yersinia* spp., IpaB und IpaC in *Shigella* spp., SipB und SipC in *Salmonella* spp., PopB und PopD in *Pseudomonas* spp.) aufweisen und der dritte ein eher hydrophiles Protein darstellt (LcrV in *Yersinia* spp., IpaD in *Shigella* spp., SipD in *Salmonella* spp., PcrV in *Pseudomonas* spp.). In einer Vielzahl von experimentellen Ansätzen konnte nicht nur eine Interaktion der drei Proteine untereinander, sondern auch die Interaktion der hydrophoben Translokatoren mit synthetischen Membranen sowie eine bei bestimmten Bedingungen stattfindende Porenbildung gezeigt werden (Menard *et al.* 1994; Sarker *et al.* 1998; Cornelis 2002; Hume *et al.* 2003; Schoehn *et al.* 2003; Mueller *et al.* 2005; Mota and Cornelis 2005; Goure *et al.* 2005; Faudry *et al.* 2006; Harrington *et al.* 2006). Eine in Erythrocyten durch Bakterien vermittelte Porenbildung war allerdings vom Vorhandensein aller drei Translokatorproteine notwendig (Rosqvist *et al.* 1994; Sory and Cornelis 1994; Boland *et al.* 1996; Pettersson *et al.* 1999; Fields *et al.* 1999; Marenne *et al.* 2003). Momentan geht man davon aus, daß LcrV eine Mikrostruktur auf der Spitze der Injektisomnadel bildet, welche als Gerüst die Porenbildung durch YopB und YopD erleichtert (Mueller *et al.* 2005). Die Tatsache, daß der Translokator oder gar Effektorproteine nicht vor dem Kontakt mit der Zielzelle an der Nadelspitze sekretiert werden, stützt die Ansicht eines ähnlich dem Flagellum stattfindenden sequentiellen Aufbaus des Injektisoms (Cornelis 2006).

### 1.2.1.2 Typ-III-Sekretionssystem pflanzlicher Pathogene am Beispiel von *Pseudomonas syringae*

Wenn *Pseudomonas syringae*-Bakterien über Wunden oder Stomata den Weg in die Pflanze finden, ist die Kolonisierung der Interzellularen sowie der eigentliche Lebenszyklus wie der vieler Gram-negativer phytopathogener Bakterien abhängig vom Typ-III-Effektortransport in das Wirtszytosol. Das Typ-III-Sekretionssystem pflanzlicher Pathogene besteht aus einer nadelähnlichen Struktur, die analog zu dem System tierischer Pathogene in der inneren und äußeren bakteriellen Membran durch Ringstrukturen

verankert ist und ein als Hrp-Pilus bezeichnetes herausragendes Filament enthält (siehe Abbildung 1.2; Roine *et al.* 1997a; Van Gijsegem *et al.* 2000; Weber *et al.* 2005). Dieser Hrp-Pilus dient der Translokation von Effektorproteinen in das Wirtszytosol, wie beispielsweise Immunogoldmarkierungsversuche gezeigt haben (Jin and He 2001; Li *et al.* 2002). Im Gegensatz zum Nadelfilament tierischer Pathogene zeigt sich der Pilus als flexible Struktur von mehreren Mikrometern Länge und einem geringeren Durchmesser von etwa 6 - 8 nm. Diese Variation ist für die Penetration der polysaccharidreichen Wirtszellwand notwendig (Roine *et al.* 1997a; Roine *et al.* 1997b; Van Gijsegem *et al.* 2000; Jin *et al.* 2001; Büttner and Bonas 2002; Van Gijsegem *et al.* 2002; Cornelis 2006; Grant *et al.* 2006).

Das Typ-III-Sekretionssystem ist innerhalb eines in mehreren Operons angeordneten Clusters von etwa 20 *hrp/hrc*-Genen entweder auf dem Bakterienchromosom oder einem extrachromosomalen Plasmid kodiert (siehe Abbildung 1.3; Arnold *et al.* 2003, Guttman *et al.* 2006). Die *hrp*-Gen-Bezeichnung („Hypersensitive response [HR] and pathogenicity“) geht auf Mutanten zurück, welche keine Virulenz aufwiesen und ebenso die Fähigkeit einbüßten, eine HR zu elicitieren (Lam *et al.* 2001). Zwischen phytopathogenen Bakterien hochkonservierte *hrc*-Gene („HR and conserved“) kodieren für strukturelle Elemente des Typ-III-Sekretionssystems. Auf beiden Seiten ist dieses Gencluster flankiert von einem CEL („conserved effector locus“) und einem EEL („exchangeable effector locus“). Diese beiden Regionen enthalten eine Reihe von Typ-III-Effektorgenen und andere virulenzzugehörige Gene. Das zentrale Cluster, der CEL und der EEL zeigen zusammen mit angrenzenden tRNA-Genen einen charakteristischen G+C-Gehalt und somit Merkmale eines „pathogenicity islands“ (Alfano *et al.* 2000; Büttner and Bonas 2002; Arnold *et al.* 2003). Darüberhinaus sind zusätzliche Typ-III-Effektorgene mit oft angrenzenden Chaperone-Genen über das gesamte Chromosom oder Plasmid in Clustern oder einzeln verstreut (Jackson *et al.* 2000; Arnold *et al.* 2001; Rohmer *et al.* 2003; Arnold *et al.* 2003; Chang *et al.* 2005). Die Expression der Gene des Typ-III-Sekretionssystems ist koordinativ von vielen Wirts- und Umweltfaktoren reguliert (Arlat *et al.* 1992; Rahme *et al.* 1992; Schulte and Bonas 1992; Wei *et al.* 1992; Xiao *et al.* 1992). Auf den Kontakt mit der Wirtszelle folgend, aber auch in *hrp*-induzierenden Bedingungen (Nährstoffmangelmedien; Xiao *et al.* 1994; Chatterjee *et al.* 2002; Merighi *et al.* 2003) erfolgt die Induktion von HrpL, einem alternativen Sigmafaktor der ECF-Familie (Xiao *et al.* 1994; Wei and Beer 1995; Frederick *et al.* 2001). HrpL-Proteine phytopathogener Bakterien sind in ihrer Primärsequenz hochkonserviert und erkennen eine in den Promotoren des *hrp*-Operons und der Typ-III-Effektoren vorhandene, als sogenannte „hrp-Box“ bezeichnete Konsensussequenz (Wei and Beer 1995; Frederick *et al.* 2001; Fouts *et al.* 2002). Die *hrpL*-Induktion ist von den positiven Transkriptionsregulatoren *hrpR* und *hrpS* abhängig (Hutcheson *et al.* 2001). Nachdem HrpL an die Hrp-Boxen gebunden hat, erfolgt die Synthese der *hrp/hrc*-Gen-kodierten Produkte und der Aufbau des Typ-III-Sekretionssystems. Die strukturelle Untereinheit des flexiblen Hrp-Pilus in *Pseudomonas*

*syringae* ist das HrpA1-Protein (Roine *et al.* 1997a; Roine *et al.* 1997b; Taira *et al.* 1999; Brown *et al.* 2001). Das *hrpA1*-Gen ist notwendig, um die mit dem Typ-III-Sekretionssystem in Verbindung gebrachten bakteriell verursachten Wirtsreaktionen wie Krankheit in suszeptiblen Pflanzen und Immunreaktionen in resistenten Pflanzen auszulösen (Roine *et al.* 1997a, Jin and He 2001).

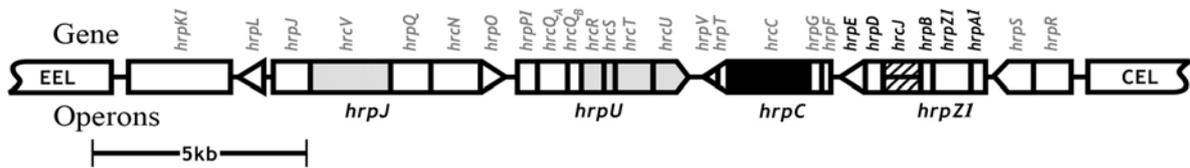


Abb.1.3: Genomische Anordnung des aus *Pseudomonas syringae* stammenden Typ-III-Sekretionssystem-kodierenden *hrp*-Genclusters. Die Namen der Gene sind im oberen Bereich zu sehen, während die verschiedenen Genomregionen unten zu finden sind. Gene des *hrpZ*-Operons sind schwarz hervorgehoben. Genprodukte der schwarzen und grauen Kästchen sind vermutlich an der inneren bzw. äußeren bakteriellen Membran lokalisiert. Das HrcJ-Protein (gestreiftes Kästchen) scheint mit beiden Membranen assoziiert zu sein. EEL, exchangeable effector locus; CEL, conserved effector locus (Alfano *et al.* 2000; Effektornamenklatur aktualisiert nach Lindeberg *et al.* 2006)

Neben Typ-III-Effektoren werden zusätzlich Typ-III-Helferproteine und Harpine (Alfano and Collmer 2004) in das extrazelluläre Medium sekretiert, um einen korrekten Zusammenschluß der Pilus- und Translokationsstruktur zu gewährleisten. HrpW1, HopAK1 und HopAJ1 sind sekretierte, aber anscheinend nicht in das Wirtszytosol translozierte Proteine (Chang *et al.* 2005), von denen HrpW1 und HopAK1 Pektatlyasedomänen und HopAJ1 Homologie zu Transglykosylasen aufweisen und darüberhinaus eine weitere HrpW1-Domäne unabhängig den Zelltod in Tabak auslösen kann (Charkowski *et al.* 1998; Guttman *et al.* 2002). Solche Helferproteine erleichtern möglicherweise durch den lokalen Abbau der Wirtszellwand an der Pilusspitze den Zugang zur Plasmamembran (Grant *et al.* 2006).

Über das Typ-III-Sekretionssystem in das Wirtszytosol eingeführte Effektoren scheinen PAMP-induzierte Immunantworten des Wirtes entweder zu blockieren oder zumindest Teile von ihnen zu unterdrücken. So verhindern die Effektoren AvrPto1 auf Salizylsäure-unabhängige Weise, AvrE1 und HopM1 Salizylsäure-abhängig die Kallosepapillenbildung (Hauck *et al.* 2003; DebRoy *et al.* 2004). Außerdem blockieren AvrPto1 und AvrB die durch mikrobielle Effektoren ausgelöste frühe Abwehrgentranskription sowie MAP-Kinaseaktivierung (He *et al.* 2006). Einige Typ-III-Effektoren beeinträchtigen die durch Resistenzproteine vermittelte ETI, wie beispielsweise HopAB1 (Jackson *et al.* 1999), HopF2 und AvrB2 (Grant *et al.* 2006). Es konnte gezeigt werden, daß die verzögerte Ausbildung der HR in *Nicotiana benthamina* durch HopAO1 von einer aktiven Tyrosinphosphatase im C-terminalen Bereich des Effektors abhängt (Espinosa *et al.* 2003; Bretz *et al.* 2003). Solche für die Virulenz notwendigen enzymatischen Funktionen konnten bisher für einige wenige Effektoren identifiziert werden. So weist beispielsweise HopAR1 Papain-ähnliche Cysteinproteasefähigkeiten auf

(Shao *et al.* 2002; Zhu *et al.* 2004). HopAR1 spaltet in *Arabidopsis* spezifisch PBS1, eine Serin/Threonin-Kinase, deren Funktion aber weitestgehend unbekannt ist (Swiderski and Innes 2001; Shao *et al.* 2003). Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, daß die Unterdrückung der pflanzlichen Immunantwort durch den Typ-III-Effektor HopU1 auf dessen intrinsischer mono-ADP-Ribosyltransferaseaktivität beruht (Fu *et al.* 2007). Das von diesem Effektorenzym modifizierte Zielprotein in *Arabidopsis* ist sehr wahrscheinlich an der Stabilisierung oder Prozessierung von immuninduzierter mRNA beteiligt, weswegen eine Beeinträchtigung seiner Funktion zu reduzierten Immunantworten führt.

### 1.2.2 Das Effektorprotein HrpZ1 phytopathogener *Pseudomonas syringae*-Spezies

Eines der ersten experimentell identifizierten Exportsubstrate des Typ-III-Sekretionssystems phytopathogener *Pseudomonas syringae*-Bakterien war das *hrpZ1*-Genprodukt, auch Harpin genannt (He *et al.* 1993; Preston *et al.* 1995). Das *hrpZ1*-Gen ist im *hrp*-Operon lokalisiert und kodiert für ein hitzestabiles, glycinreiches und cysteinfreies Protein, das in der Lage ist, pflanzliche Immunreaktionen zu stimulieren. So führt die Infiltration von hohen HrpZ1-Konzentrationen in einigen Pflanzen wie Tabak zur Auslösung der HR (He *et al.* 1993; Preston *et al.* 1995; Alfano *et al.* 1996; Lindgren 1997). Neben der Elicitierung von einigen weiteren pflanzlichen Abwehrreaktionen wie z.B. schnell einsetzenden Ionenflüssen, Depolarisation der Plasmamembran, Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und Aktivierung von MAP-Kinasekaskaden (Baker *et al.* 1993; He *et al.* 1994; Desikan *et al.* 1996; Desikan *et al.* 2001), trägt Harpin auch zur Aktivierung der Abwehrgenexpression und der systemischen Resistenz bei (Desikan *et al.* 1998; Dong *et al.* 1999; Galan and Collmer 1999; Li *et al.* 2005). In Tabakplasmamembranen konnte eine HrpZ1-Bindungsstelle identifiziert werden, die möglicherweise jene Immunreaktionen vermittelt (Lee *et al.* 2001a). Hinsichtlich der Perzeption durch einen Rezeptor könnte dabei eine Proteinbindungsstelle im zentralen Bereich der HrpZ1-Primärsequenz (Li *et al.* 2005) eine Rolle spielen. Die Identifizierung des putativen Rezeptors ist jedoch aufgrund der Fähigkeit des Proteins zur Membranintegration schwierig.

Den immunostimulatorischen Eigenschaften des HrpZ1-Effektorproteins steht die eigentliche Virulenzfunktion gegenüber. Es ist bekannt, daß unter Bedingungen, die dem pflanzlichen Apoplasten ähneln, HrpZ1 neben einer Vielzahl anderer Proteine durch *Pseudomonas syringae* sekretiert wird (Roine *et al.* 1997a). Ferner konnte in verschiedenen Experimenten gezeigt werden, daß die Sekretion von Harpin durch den Hrp-Pilus erfolgt, das Protein innerhalb der pflanzlichen Zellwandregion zu finden ist und desweiteren eine Tendenz zur Pilusinteraktion aufweist (Hoyos *et al.* 1996; Brown *et al.* 2001). Jedoch bleibt die Rolle dieses Proteins im gesamten Infektionsprozess bis heute weitgehend ungeklärt. So weisen *hrpZ1*-defiziente *Pseudomonas* spp. keine Beeinträchtigung der Virulenz auf (Alfano *et al.* 1996), da möglicherweise Proteine

redundanter Funktion diesen Verlust komplementieren. Die anscheinend für den Lebenszyklus nichtessentielle Virulenzfunktion verbunden mit der infektionsinduzierten Synthese unterscheidet HrpZ1 und andere Harpine von klassischen PAMPs (siehe 1.1.1).

*In planta*-Expressionsexperimente belegen eine extrazelluläre HrpZ1-Funktion, da Harpin ausschließlich nach Sekretion in den Apoplasten eine HR induziert, nicht aber wenn das Protein im pflanzlichen Zytoplasma akkumuliert (Tampakaki and Panopoulos 2000). Ferner ist HrpZ1 in der Lage ionenleitende Poren zu bilden (Lee *et al.* 2001b; Racape *et al.* 2005), was durch elektrophysiologische Untersuchungen mit planaren Lipiddoppelschichten bzw. mittels synthetischer Liposomen gezeigt werden konnte. Von daher scheint HrpZ1 nach der Sekretion in den Apoplasten die Virulenzfunktion möglicherweise in der Wirtszellmembran wahrzunehmen. Eine Fähigkeit zur Oligomerisierung bis zur Oktamergröße (Chen *et al.* 1998) läßt vermuten, daß HrpZ1 als membranassoziierter Typ-III-Helferproteinkomplex fungiert. Kürzlich erhaltene Resultate lassen vermuten, daß HrpZ1 zusammen mit HrpW1, HopAK1 und HrpK1 an der Translokation von Typ-III-Effektoren in das Wirtszytosol beteiligt sind (Kvitko and Collmer, pers. Mitteilung). Solch ein aus mehreren Proteinen aufgebauter Translokationskomplex ist aus Typ-III-Sekretionssystemen tierischer Pathogene bereits bekannt (Cornelis 2006). Ein Teil der HrpZ1-Sequenz ließ Ähnlichkeiten mit Strukturdomänen des am Translokationskomplex beteiligten Effektorproteins YopB aus humanpathogenen *Yersinia* spp. erkennen. Obwohl *Yersinia*-exprimiertes HrpZ1 durch deren Typ-III-Sekretionssystem korrekt sekretiert wird, konnte eine funktionelle Komplementierung eines *yopB*-defizienten Stammes nicht nachgewiesen werden (Lee *et al.* 2001b). Die vor kurzem erhaltenen Resultate, daß HrpJ-defiziente Bakterien in der HrpZ1-Sekretion sowie der Effektortranslokation in die Wirtszelle beeinträchtigt sind, aber nicht in der Effektorsekretion, stützt die Vermutung einer Beteiligung von HrpZ1 an der Effektortranslokation während der Infektion (Fu *et al.* 2006).

Unter Verwendung von verschiedenen HrpZ1-Deletionen und HrpZ1-Insertionsmutanten konnte belegt werden, daß die immunostimulatorische Eigenschaft des Proteins nicht auf seiner intrinsisch vorhandenen Fähigkeit der Ionenporenbildung beruht (Engelhardt, Diplomarbeit 2003). Für beide Vorgänge werden unterschiedliche Regionen innerhalb des HrpZ1-Proteins benötigt. So ziehen umfangreichere Veränderungen der Proteinstruktur einen kompletten Verlust der porenbildenden Eigenschaften nach sich, während solche poreninaktiven Fragmente mit intaktem C-terminalen Bereich immer noch zur Induktion pflanzlicher Immunabwehr befähigt sind (Lee *et al.* 2001a; Engelhardt, Diplomarbeit 2003).

### 1.3 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte eine umfassende funktionelle sowie molekulare Charakterisierung des Typ-III-sekretierten Effektorproteins HrpZ1 aus *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* erfolgen.

Aufbauend auf ähnlichen in Tabak durchgeführten Arbeiten sollte dabei die immunostimulatorische Aktivität des HrpZ1<sub>PspH</sub>-Effektorproteins in den als Testsystem dienenden Petersiliezellkulturen untersucht werden (Hahlbrock *et al.* 1995).

Weiterführende Untersuchungen, u.a. durch Interaktionsstudien mit verschiedenen Membransystemen, sind notwendig, um die bisherigen Kenntnisse über die als Virulenzfunktion vermutete Ionenporenbildungsfähigkeit des HrpZ1<sub>PspH</sub>-Effektors zu vertiefen.

Porenbildende bakterielle Toxine (Parker and Feil 2005), aber auch Translokationsproteine tierischer bakterieller Pathogene (Schoehn *et al.* 2003; Ryndak *et al.* 2005; Cornelis 2006) weisen eine für die Porenbildung notwendige Oligomerisierung auf. Eine vertiefende Charakterisierung der Homo- bzw. Heterooligomerisierungsfähigkeit sowie die Entschlüsselung der Struktur des HrpZ1<sub>PspH</sub>-Proteins würde wesentlich zum Verständnis der Virulenzfunktion des Proteins beitragen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Chemikalien, Enzyme, Bioreagenzien und Verbrauchsmaterialien**

Die Laborchemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad und wurden, wenn nicht anderweitig aufgeführt, von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Pierce (Rockford, Großbritannien), Molecular Probes (Leiden, Niederlande), Qiagen (Hilden), Invitrogen (Karlsruhe), Formedium (Norwich, Großbritannien), Oxoid (Basingstoke, Hampshire, Großbritannien), Fluka (Buchs, Schweiz) und BD (Sparks, USA) bezogen. Die Firma Schleicher und Schuell (Dassel) lieferte Rundfilter, Promega (Madison, USA) Gelrocknerfolie und die Firma Roth (Karlsruhe) Sterilfilter. Enzyme für molekularbiologische Arbeiten (Restriktionsenzyme, Pfu-DNA-Polymerase, T4-DNA-Ligase) sowie Nukleotide wurden von den Firmen Fermentas (St. Leon-Rot) und NEB (Frankfurt/Main) bezogen. Die Firma Roche (Mannheim) lieferte die Restriktionsprotease Faktor Xa. Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen. Radiochemikalien, speziell Calcium-45, lieferte Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Großbritannien). Antikörper lieferten die Firmen Sigma und Qiagen.

### **2.2 Medien und Stammlösungen**

Zur Herstellung von Medien und Puffern wurde destilliertes, deionisiertes Wasser verwendet. Medien und Puffer wurden 20 min bei 121°C sterilisiert bzw. Lösungen, deren Bestandteile nicht hitzestabil waren, wurden sterilfiltriert.

Medien (1 L), die prozentualen Anteile beziehen sich auf w/v:

LB	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, (1,5% Agar für Platten)
YPD	2% Bacto Proteose Pepton, 2% Glukose, 1% Hefeextrakt, (2% Oxoid-Agar für Platten, pH 6,0 – 6,3)
Hefe-Dropout	0,67% Yeast Nitrogen Base, 2% Glucose, (2% Oxoid-Agar für Platten, pH 6,0 – 6,3) für Leuzin/Tryptophan-Dropout: 1546 mg -Leu,-Trp Kaiser-dropout (Formedium) für Leuzin/Tryptophan/Adenin-Dropout :1452 mg -Ade,-His,-Leu,-Trp Kaiser-dropout, 76 mg L-Histidin (Formedium)

Zur Selektion wurden die entsprechenden Antibiotika dem LB-Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen in folgenden Mengen zugegeben: Ampicillin (bei Flüssigkultur) und Carbenicillin (für Platten) je 100 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml, Tetracyclin 10 µg/ml. Für die Blau/Weiss-Selektion auf LB-Platten waren folgende Endkonzentrationen erforderlich: 0,5 mM IPTG, 40 µg/ml X-Gal, 100 µg/ml Carbenicillin.

Folgende Stammlösungen wurden verwendet:

Ampicillin	100 mg/ml in Wasser
Carbenicillin	100 mg/ml in Wasser
Kanamycin	50 mg/ml in Wasser
Tetracyclin	10 mg/ml in Ethanol
X-Gal	20 mg/ml in N',N'-Dimethylformamid
IPTG	1 M in Wasser
BCIP	50 mg/ml in N',N'-Dimethylformamid
NBT	50 mg/ml in 70% N',N'-Dimethylformamid
PMSF	0,2 M in Ethanol
DAF-2-DA	5 mM in DMSO

### 2.3 Kultivierung und Behandlung von Petersiliezellkulturen

#### 2.3.1 Kultivierung

Zellsuspensionskulturen von Petersilie (*Petroselinum crispum* L.), aus einer Kalluskultur stammend, wurden in modifiziertem Gamborg's B5-Medium (Gamborg *et al.* 1968) mit 171 mg/ml Calciumchlorid und 1 mg/ml 2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) im Dunkeln bei 26°C und 110 rpm geschüttelt. Nach 7 Tagen Kultivierungszeit wurden 9 ml Zellsuspension in 35 ml frisches HA-Medium (Hahlbrock 1975) überführt (Kombrink und Hahlbrock 1986).

#### 2.3.2 Elicitierung

Die Zellen wurden 6 Tage nach dem Überimpfen in einem Büchnertrichter auf Filterpapier abgesaugt, mit frischem, auf 26°C temperierten HA-Medium gewaschen und in frisches HA-Medium zu einer Zelldichte von 10 g Zellen / 100 ml aufgenommen. Je 2 ml der resuspendierten Zellen wurden in Petrischalen (Greiner, Ø = 30 mm) überführt und unter kontinuierlichem Schütteln bei 110 rpm im Dunkeln für mindestens 30 min äquilibriert. Anschließend erfolgte die Zugabe der vorbereiteten Elicitorlösungen. Die Inkubation im Falle der Phytoalexinbestimmung erfolgte für 24 Stunden im Dunkeln bei 26°C und 110 rpm. Zur Kontrolle der Elicitierung wurden die Petersiliezellen mit Pep13 (Nürnberger *et al.* 1994) in einer Endkonzentration von 100 nM behandelt. Als Kontrolle

wurden Zellen mit einer Proteinpräparation aus *E.coli* elicitiert, welche den Expressionsvektor enthielten.

### 2.3.3 Vitalitätsbestimmung der Petersiliezellen

Die Doppelfärbung mit FDA (Fluoresceindiacetat) und PI (Propidiumiodid) (Huang *et al.* 1986) ermöglicht eine zuverlässige Aussage über die Vitalität von Zellen in Suspensionen. Grundlage dieser Methode ist die ausschließlich in lebenden Zellen stattfindende Umsetzung von FDA zu grün fluoreszierendem Fluorescein durch cytosolische Esterasen, während eine rote Fluoreszenz durch PI im Zellkern auf tote oder membrangeschädigte Zellen hinweist, da diese Substanz intakte Membranen nicht passieren kann.

Zu 100 µl elicierter Zellsuspension wurde 1 µl einer ethanolischen FDA-Lösung (5 mg/ml) und 10 µl einer wässrigen PI-Lösung (5 mg/ml) gegeben. Nach einer Inkubation von 5 min konnte die Vitalität mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Nikon Eclipse 80; Badhoevedorp, Niederlande) bestimmt werden.

### 2.3.4 Bestimmung des pH-Wertes von Kulturmedien

Zur Bestimmung des pH-Wertes der Kulturmedien wurden jeweils 1 ml der elicitierten Petersiliezellensuspensionen nach den angegebenen Zeitpunkten abzentrifugiert (1 min bei 13000 rpm) und der pH-Wert der Zellüberstände wurde mit einer pH-Mikroelektrode gemessen.

### 2.3.5 Untersuchung des NO-Bursts in Petersiliezellen

Zur Bestimmung des NO-Bursts wurden je 50 µl elicitierte Petersiliezellen in ein Well einer 96er Mikrotiterplatte (Greiner) aliquotiert. Nach Zugabe von 20 µl 10 µM DAF-2-DA erfolgte die sofortige Aufnahme der Kinetik im Fluoreszenzplattenlesegerät (MWG Sirius HAT Injector, MWG Biotech, Ebersberg) mit dem Anregungsfilter 485/20 nm und dem Emissionsfilter 528/20 nm für die ersten 4 Stunden. Dabei wurde der mittlere Anstieg der mit den einzelnen Messpunkten erhaltenen Kurven in jeder einzelnen Stunde ermittelt.

Die Bestimmung der *in vivo*-Akkumulation von NO erfolgt durch den Fluoreszenzfarbstoff DAF-2-DA (4,5-Diaminofluorescein-Diacetat), welcher von der Zelle aufgenommen wird und durch zytoplasmatische Esterasen zur farblosen Zwischenstufe DAF-2 hydrolysiert wird (siehe Abbildung 2.1). In Anwesenheit von NO wird DAF-2 in das fluoreszierende DAF-2T umgewandelt und kann im Fluoreszenzplattenlesegerät gemessen werden. Ein Vorteil dieser Methode ist die hohe Spezifität von DAF-2-DA für NO.

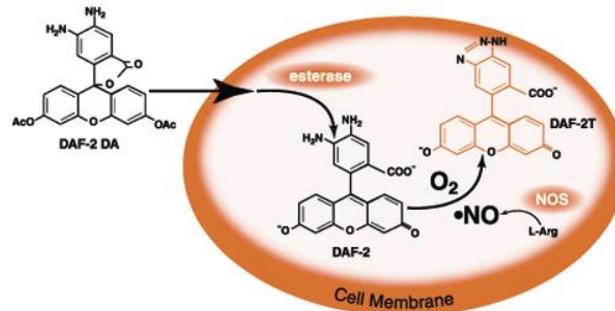


Abb.2.1: Schema der NO-Detektion mittels DAF-2-DA.

### 2.3.6 Bestimmung der Phytolalexinakkumulation in Kulturmedien

Nach einer 24stündigen Elicitorbehandlung der Petersiliezell suspensionen wurde die Aktivität der Elicitoren über die Akkumulation der sekretierten autofluoreszierenden Furanocoumarinphytoalexine im Kulturmedium bestimmt. Dazu wurden je 100 µl möglichst zellfreier Überstand in eine 96 well-Mikrotiterplatte (Greiner; geringe Eigenfluoreszenz) überführt und mit Hilfe eines Fluoreszenzplattenlesegerätes (MWG Sirius HAT Injector, MWG Biotech, Ebersberg) bei 440 nm nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 360 nm detektiert. Die Hintergrundwerte (nach Elicitierung mit Wasser bzw. Puffer) wurden von den Meßwerten abgezogen.

### 2.3.7 Immunkomplex-MBP-Kinase-Tests

Im Zuge einer Kooperation wurden diese Experimente von Dr. Justin Lee (Institut für Pflanzenbiochemie, Halle/Saale) durchgeführt. Spezifische Antikörper gegen die MAP-Kinasen PcMPK3 und PcMPK6 aus Petersilie wurden genutzt um die entsprechenden Proteine aus Extrakten elicitierteter Petersiliezellen zu präzipitieren. MBP ("Myelin basic protein") als Substrat und <sup>32</sup>P-ATP wurde den Kinasen beigefügt, welche an die auf Protein-A-Sepharose immobilisierten Antikörpern gebunden waren. Nach 30 min Inkubation bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von SDS-Ladepuffer gestoppt und mittels SDS-PAGE analysiert. Durch Phosphoimaging wurde die Aktivität der Kinasen beruhend auf den Einbau von <sup>32</sup>P in MBP quantifiziert.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

Standardmethoden, die im Folgenden nicht einzeln erwähnt sind, wurden wie in Sambrook and Russell 2001 durchgeführt.

### 2.4.1 Bakterienstämme und Plasmide

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden folgende Bakterienstämme (siehe Tabelle 2.1) und Vektoren (siehe Tabelle 2.2) genutzt:

<b>Bakterienstamm</b>	<b>Merkmal</b>	<b>Referenz/Herkunft</b>
<i>Escherichia coli</i> XL-1 Blue	Tet <sup>r</sup>	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$		Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> BL21 Star (DE3)	pLysS, Cam <sup>r</sup>	Invitrogen

Tab.2.1: verwendete Bakterienstämme

<b>Vektor</b>	<b>Merkmal</b>	<b>Referenz/Herkunft</b>
pJC40	<i>coIE1ori</i> , MCS, Amp <sup>r</sup> , T7-Promoter, His10	Clos <i>et al.</i> 1994
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO	lacZ, MCS, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , T7-Promoter	Invitrogen
pBluescript II SK-	MCS, Amp <sup>r</sup>	Stratagene
pGADT7	MCS, Amp <sup>r</sup> , GAL4-AD, HA-Tag, T7-Promoter	Clontech Laboratories
pGBKT7	MCS, Kan <sup>r</sup> , GAL4 DNA-BD, Myc-Tag, T7-Promoter	Clontech Laboratories

Tab.2.2: verwendete Vektoren

### 2.4.2 Präparation von Plasmid-DNA und Verdau mit Restriktionsenzymen

Plasmid-DNA wurde aus Bakterien-Übernachtskulturen mit entsprechender Selektion entweder unter Verwendung von „QIAprep“-Säulen der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerprotokollen oder der schnellen alkalischen Extraktion nach Birnboim and Doly (Birnboim and Doly 1979) präpariert.

Die mittels Minipräparation gewonnene Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen in einem Gesamtansatz von 15  $\mu$ l in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern gespalten. Dazu wurden pro  $\mu$ g DNA jeweils 5 Einheiten (5 U) Enzym zugesetzt und 1 h in der Regel bei 37°C inkubiert (bei Doppelverdaus entsprechend länger).

### 2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Plasmid-DNA wurde nach Restriktionsspaltung und Mischen mit 0,2 Volumen 6 x Probenpuffer auf ein 1%iges horizontales Agarosegel (enthielt 0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V 60 - 90 min in 1 x TAE-Puffer. Als Größenstandard dienten 2,5  $\mu$ g des GeneRuler<sup>™</sup> 1 kb DNA Ladder-Markers von

Fermentas. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele auf dem Transilluminator fotografiert.

### 2.4.4 Isolierung von Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung und Reinigung der im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte mit dem "QIAquick gel extraction kit" der Firma Qiagen nach Herstellerangaben, nachdem das gewünschte, mit Ethidiumbromid angefärbte Fragment auf dem Transilluminator ausgeschnitten worden war. Mit PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten wurde analog verfahren.

### 2.4.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die selektive Vervielfältigung von Nucleinsäure-Abschnitten einer definierten Länge und bekannter Teilsequenz mittels DNA-Polymerase. Oligonukleotide (Primer) bestimmen Anfang und Ende der zu amplifizierenden Sequenz.

Für DNA-Fragmente, die für eine Klonierung amplifiziert werden mussten, wurde Pfu-Polymerase verwendet, für alle anderen Reaktionen Taq-Polymerase. Die Fehlerrate bei Pfu-Polymerase ist aufgrund der „proof-reading-activity“ geringer als bei Taq-Polymerase, und das PCR-Produkt erhält blunt ends, d.h. es hat keine Überhänge und kann in EcoRV-geschnittene Vektoren kloniert werden.

Mit Hilfe entsprechend kreierter Überhänge an der Primersequenz können dem PCR-Produkt Restriktionsenzym-Schnittstellen am Anfang und am Ende hinzugefügt werden. Die Oligonukleotidsequenzen sind im Anhang zusammengefasst.

Folgender Ansatz wurde pipettiert:

10 - 100 ng	DNA-Template (oder eine Kolonie)
je 1 µl	Oligonukleotid-Primer (10 µM)
2 µl	PCR-Puffer (10 x)
2 µl	dNTP-Stammlösung (2,5 mM)
2 - 10 U	Polymerase (Pfu/Taq)
	H <sub>2</sub> O ad 20 µl

Nach einem anfänglichen Denaturierungsschritt ( 2 min bei 94°C) wurde die DNA mit 30 Zyklen bei folgenden Temperaturschritten amplifiziert:

Denaturierung	94°C	30 sec
Annealing	T <sub>m</sub>	30 sec
Elongation	72°C	pro 1 kb 1 min (Taq) bzw. 2 min (Pfu)

Am Ende wurde die Polymerisation für weitere 10 min bei 72°C fortgesetzt und anschließend bei 12°C abgestoppt.

### 2.4.6 Klonierung von PCR-Produkten

#### 2.4.6.1 Dephosphorylierung

Zur Verhinderung der Selbstligation gespaltener Vektoren wurden diese direkt nach der Restriktionsspaltung mit „Antarctic Phosphatase“ der Firma NEB nach Herstellerangaben behandelt.

#### 2.4.6.2 Ligation

Bei einer Ligation werden DNA-Fragmente über eine enzymatische Reaktion miteinander verbunden. Bei einer blunt-end-Ligation in ein Plasmid besteht die Möglichkeit, dass das Insert sowohl in „Sense“- wie auch in „Antisense“-Richtung eingebaut wird. Der Einbau von DNA in „Antisense“-Richtung führt jedoch zur Transkription einer falschen mRNA und folglich zu einem falschen Protein. Um das Insert nur in „Sense“-Richtung in den Vektor zu ligieren, sollte es am Anfang und am Ende mit unterschiedlichen Enzymschnittstellen versehen werden; dies ermöglicht eine gerichtete Klonierung.

Zum Zwecke der Sequenzierung wurden die PCR-Produkte adenyliert, um sie anschließend in den EcoRV-geschnittenen pBluescript-Vektor zu ligieren, welcher durch die Taq-Polymerase thymidylt worden war. Aufgrund der geringen Größe des pBluescript-Vektors eignete er sich sehr gut als Sequenzierungsvektor. Sollte das Insert bei korrekter Sequenz in einen anderen Vektor kloniert werden, so wurde es in einem Doppelverdau wieder aus dem Vektor ausgeschnitten und über ein präparatives Gel isoliert.

Folgender Ligationsansatz wurde pipettiert:

50 - 100 ng	dephosphorylierte Vektor-DNA
150 - 200 ng	Insert-DNA
2 µl	Ligase-Puffer (10 x)
2 µl	T <sub>4</sub> -Ligase
1 µl	ATP (10 mM)
	H <sub>2</sub> O ad 20 µl

Die DNA-Moleküle hybridisieren über kompatible einzelsträngige Bereiche und werden durch die T<sub>4</sub>-DNA-Ligase kovalent verbunden. Diese Reaktion erfolgte über Nacht bei 12°C. Anschließend erfolgte bei 65°C für 10 min ein Abstoppen der Ligation.

#### 2.4.6.3 Herstellung kompetenter Zellen

Sofern nicht die in einem Kit (z.B. "TOPO TA Cloning<sup>®</sup>" Kit; Invitrogen) mitgelieferten kompetenten Zellen zur Transformation verwendet wurden, sind *E. coli*-Zellen des Stamms XL-1 Blue und BL21 Star (DE3) mit Hilfe der Calciumchlorid-Methode (Sambrook and Russell 2001) kompetent gemacht worden, aliquotiert (250 µl), sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.4.6.4 Transformation kompetenter Bakterien

Zur Transformation von Bakterien wurden die aliquotierten kompetenten Zellen 10 min auf Eis aufgetaut, 30 min mit der Plasmid-DNA auf Eis inkubiert (etwa 10 ng DNA auf 30  $\mu$ l Zellen), 90 s im Wasserbad auf 42°C erhitzt und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l auf Raumtemperatur vorgewärmtem LB-Medium wurde 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert und anschließend auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C.

### 2.4.6.5 Blau/Weiss-Selektion mittels pBluescript-Vektor

Der pBluescript-Vektor enthält das LacZ-Gen, welches für das N-terminale  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galaktosidase kodiert, aber alleine keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität besitzt. Die Blau/Weiss-Selektion beruht auf einer Unterbrechung jenes LacZ-Gens. Erst bei Zusammenbringen mit dem ebenfalls inaktiven C-terminalen  $\omega$ -Fragment der Galaktosidase, das von dem transformierten Bakterienstamm kommt, wird die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase hergestellt. Dies wird als  $\alpha$ -Komplementierung bezeichnet; es wachsen blaue Kolonien bei Vorbehandlung der Platten mit IPTG und X-Gal. Ist das LacZ-Gen durch ein DNA-Insert unterbrochen, findet keine  $\alpha$ -Komplementierung und keine Blaufärbung statt. Weisse Kolonien tragen somit ein Insert.

### 2.4.6.6 Ansetzen von Glycerinkulturen

Von positiven Klonen wurden Dauerkulturen angelegt, indem 200  $\mu$ l steriles 80 %iges Glycerin mit 750  $\mu$ l einer Bakterienkultur gemischt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert wurde.

## 2.4.7 Bakterielle Expression von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> und HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub>

Zur bakteriellen Expression von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> und HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub> wurde der Vektor pJC40 (Histidin<sub>10</sub>-Fusion, Clos *et al.* 1994) verwendet. Die Expressionsprodukte ließen sich deshalb durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose (Qiagen) aufreinigen.

Eine Klonierung in den Expressionsvektor war für HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> aufgrund früherer Arbeiten nicht notwendig (Lee *et al.* 2001a). Mittels Kolonie-PCR auf *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* wurde der offene Leserahmen des HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Gens zur Einführung geeigneter Spaltstellen (NdeI/HindIII) amplifiziert und in den Vektor pBluescript kloniert. Von weißen Kolonien wurde Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Das Fragment mit korrekter Sequenz wurde in pJC40 umkloniert. Die Suche nach positiven Kolonien erfolgte unter Einsatz genspezifischer Primer. Deren Plasmid-DNA wurde isoliert und einer Restriktionsanalyse unterzogen. Das Plasmid mit der korrekten Sequenz wurde in *E.coli* BL21 (Star) DE3 transformiert und Einzelkolonien zur Expression eingesetzt.

### 2.4.7.1 Präparative Expression

Übernachtskulturen der Bakterien wurden 50-fach in LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) verdünnt und unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 vermehrt (ca. 3 - 5 h). Zur Induktion der Proteinbiosynthese wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt. Anschließend wurde weitere 5 h bei 28°C unter geringerem Schütteln (150 rpm) inkubiert. Danach wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet (30 min, 5000 rpm, 4°C) und entweder weiter bearbeitet oder bei -20°C über Nacht eingefroren.

### 2.4.7.2 Vorreinigung von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> (mit His<sub>10</sub>-Tag) und Aufreinigung von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>

Bakterienpellets von 100 ml Kultur wurden in 10 ml Extraktionspuffer (50 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM PMSF frisch) resuspendiert. Durch Zugabe von Lysozym (0,1 µg/µl), mehreren Zyklen des Einfrierens in Stickstoff und Auftauens sowie einer Ultraschallbehandlung (4 x 10 s, zwischendurch auf Eis) wurden die Zellen lysiert. Bei einer anschließenden Inkubation der Proben für 15 min im Wasserbad bei 100°C macht man sich die Hitzestabilität von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> zunutze. Die Zelltrümmer und präzipitierte Proteine werden in einem folgenden Zentrifugationsschritt (10 min bei 14000 rpm) pelletiert. Den klaren Überstand unterwirft man einer 40 %igen Ammoniumsulfatfällung (langsame Zugabe) auf Eis. Nach weiteren 15 min Rühren auf Eis erfolgt eine Zentrifugation 10 min bei 14000 rpm. Das Pellet wird in 5 mM Tris pH 8,0 aufgenommen und gegen den gleichen Puffer über Nacht bei 4°C dialysiert. Danach konnte im Falle des His<sub>10</sub>-Tag-fusionierten HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie durchgeführt werden. Für Kontrollexperimente dient die analoge Proteinaufreinigung von *E.coli* BL21 (Star) DE3-Zellen, die mit dem Expressionsvektor pJC40 transformiert wurden.

### 2.4.7.3. Affinitätsreinigung der Expressionsprodukte mittels Ni-NTA-Agarose

Die Bakterienpellets (100 ml Kultur) wurden in 10 ml Lysepuffer (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM KCl, 10 mM Imidazol pH 8,0) resuspendiert. Durch Zugabe von PMSF (Endkonzentration 1mM) wurde proteolytischer Abbau verhindert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von Lysozym (Endkonzentration 0,1 µg/µl) sowie durch Ultraschallbehandlung (4 x 10 s, zwischendurch auf Eis). Anschließend wurden die Zellfragmente durch Zentrifugation (30 min bei 5000 rpm) abgetrennt. Die Überstände wurden über eine Ni-NTA-Säule gegeben und unspezifisch gebundene Proteine durch 2 Waschschrte mit Waschpuffer (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM KCl, 20 mM Imidazol pH 8,0) entfernt. Eluiert wurde das Protein in 5 Schritten mit Elutionspuffer (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM KCl, 250 mM Imidazol pH 8,0). Nach dem Strippen der Säule (Lysepuffer + 50 mM EDTA) und anschließendem Waschen mit Wasser konnte die NTA - Agarose erneut eingesetzt werden. Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt (siehe Abbildung 2.2) wurden vereinigt und über Nacht bei 4°C gegen 5 mM MES pH 5,5 dialysiert (ZelluTrans der Firma Roth,

MWCO 8 - 10 kDa). Nach der Entsalzung und der Bestimmung des Proteingehaltes konnten die Proteine für biologische Tests oder biochemische Analysen eingesetzt werden.

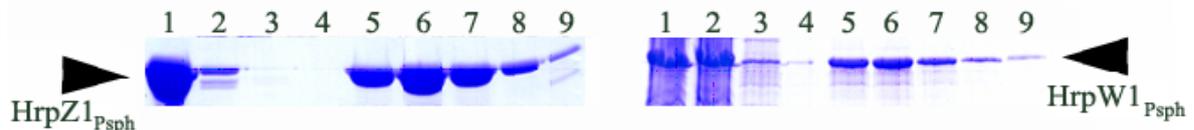


Abb.2.2: Affinitätsaufreinigung von HrpZ1<sub>Psph</sub> und HrpW1<sub>Psph</sub> mittels Ni-NTA-Agarose.

Dargestellt ist Lysat vor (1) und nach (2) Fluß über Ni-NTA-Säule, (3) und (4) zeigt Durchfluß nach Waschschritten und (5) - (9) die Elutionsfraktionen mittels eines Coomassie-gefärbten 10 %igen SDS-Gels.

Für die Kristallisation wurde HrpZ1<sub>Psph</sub> gegen 5 mM Tris pH 8,0 über Nacht dialysiert zwecks anschließender His<sub>10</sub>-Tag-Abspaltung durch Faktor Xa.

#### 2.4.7.4 Faktor Xa-Verdau

Da Tags die Gesamtstruktur eines Proteins beeinflussen und/oder die natürliche Faltung extrem beeinträchtigen können, musste der His<sub>10</sub>-Tag von HrpZ1<sub>Psph</sub> abgespalten werden. Das erfolgte mittels des "Restriction Protease Factor Xa Cleavage and Removal Kit I" der Firma Roche. Der Verdau erfolgte laut Herstellerangaben mit einem Konzentrationsverhältnis von HrpZ1<sub>Psph</sub> : Factor Xa mit 40 : 1 in 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 M NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> unter Schütteln bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde die Biotin-gelabelte Protease mittels des mitgelieferten Streptavidin-Gels entfernt. Unverdautes HrpZ1<sub>Psph</sub> wurde unter Zuhilfenahme der Ni-NTA-Agarose von verdaulichem Protein getrennt (siehe 2.4.7.3). Das verdaute Protein konnte im Durchfluß aufgefangen werden und wurde anschließend gegen 5 mM Tris-HCl pH 8,0 über Nacht bei 4°C dialysiert. Mit dem entsalzten Protein konnten danach die Kristallisationsansätze vorbereitet werden (siehe Abbildung 2.3 Bahn 5).

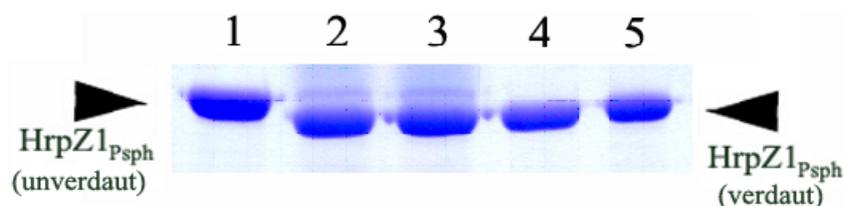


Abb.2.3: Faktor Xa-vermittelte proteolytische Abspaltung des His<sub>10</sub>-Tags von HrpZ1<sub>Psph</sub>. Affinitätschromatographie-aufgereinigtes HrpZ1<sub>Psph</sub> (1) wurde mit Faktor Xa inkubiert. Nach 24 h Inkubation (2) erfolgte die Abtrennung der Protease durch Streptavidin-Gel (3). Der Durchfluß durch die Ni-NTA-Säule (4) erbrachte eine Abtrennung von unverdaulichem Protein. (5) zeigt dialysiertes verdautes Protein, welches zur Kristallisation eingesetzt werden konnte. Die Abbildung zeigt ein Coomassie-gefärbtes 10 %iges SDS-Gel.

## 2.5 Proteinanalytische Methoden

### 2.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationsbestimmungen erfolgten mit dem BCA-Proteinassay-Reagenz der Firma Pierce, dem beiliegenden Protokoll folgend. Aufgrund des geringen Gehalts an aromatischen Resten im HrpZ1<sub>PspH</sub>-Protein war eine Nutzung des Bradford-Assays nicht vorteilhaft. Der Proteingehalt wurde anhand einer mit BSA (0 - 20 µg) erstellten Eichkurve ermittelt.

### 2.5.2 Chemische Quervernetzung

Mit Hilfe chemischer Crosslinker können nichtkovalente Oligomere in Lösung kovalent stabilisiert werden. Im Falle des homobifunktionellen, wasserlöslichen Crosslinkers BS<sup>3</sup> (Bis(sulfosuccinimidyl)suberat, siehe Abbildung 2.4) können primäre Amine von Lysinseitenketten oder des N-Terminus stabile Amidbindungen mit dem N-hydroxysulfosuccinimidester eingehen, wobei als Produkt N-hydroxysuccinimid entsteht.

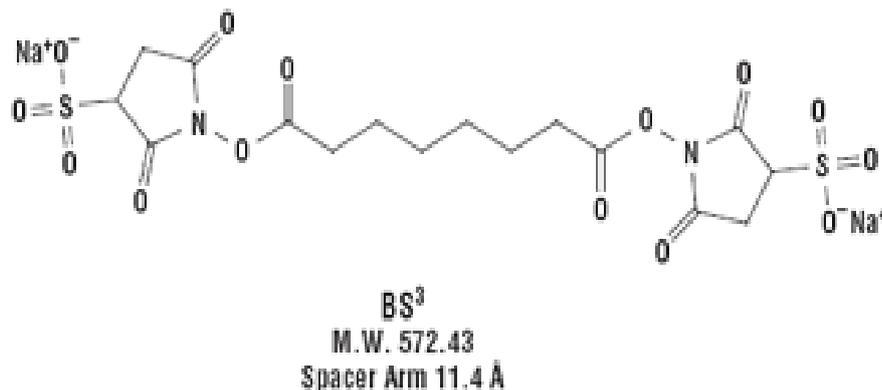


Abb.2.4: Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS<sup>3</sup>) ([www.piercenet.com](http://www.piercenet.com))

Eine BS<sup>3</sup>-Stocklösung (50 mM) wurde vor jedem Experiment frisch hergestellt. In einem Gesamtreaktionsvolumen von 100 µl wurde eine Proteinkonzentration von 0,5 µg/µl sowie eine Crosslinkerkonzentration von 3 mM eingestellt. Die Reaktionszeit betrug nach einem kurzem Mischen 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 Volumen 2 x SDS-Probenpuffer abgestoppt (durch Zugabe eines Überschusses an primären Aminen) und nach dem SDS-PAGE-Protokoll (siehe 2.5.3) weiterverfahren.

### 2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

In Minigelapparaturen der Firma Biorad (München) wurden 8 - 12 %ige Polyacrylamidgele vorbereitet (siehe Tabelle 2.3), die nach Protokollen von Laemmli (Laemmli 1970) hergestellt wurden. Die präparierten Proteinextrakte wurden mit 0,5 Volumen 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Nach

elektrophoretischer Auftrennung der Proteine bei 150 V wurden die Gele entweder gefärbt oder auf Nitrocellulose-Membranen (Sartorius, Göttingen) transferiert.

2 x SDS-Probenpuffer: 100 mM Tris-HCl pH 6,8  
2 % Mercaptoethanol  
4 % SDS  
0,2 % Bromphenolblau  
20 % Glycerin

Acrylamidgele:

	8 % Trenngel	10 % Trenngel	12 % Trenngel	5 % Sammelgel
H <sub>2</sub> O	2,3 ml	1,9 ml	1,6 ml	0,68 ml
30 % Acrylamidmix	1,3 ml	1,7 ml	2,0 ml	0,17 ml
1,5 M Tris pH 8,8	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	
1 M Tris pH 6,8				0,13 ml
10 % SDS	50 µl	50 µl	50 µl	10 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	10 µl
TEMED	3 µl	2 µl	2 µl	1 µl

Tab.2.3: Mengenangabe von Bestandteilen, die für ein einzelnes Mini-SDS-PAGE-Gel (8,10 oder 12 %ig) notwendig sind.

Elektrophoresepuffer (1 x): 25 mM Tris  
250 mM Glycine pH 8,3  
0,1 % SDS

### 2.5.4 Detektion von Proteinen nach SDS-PAGE

#### 2.5.4.1 Silberfärbung

Zur Färbung der Proteinbanden mit Silbernitrat (Blum *et al.* 1987) wurden die Polyacrylamidgele für 30 min in Fixierer (50% Methanol, 12 % Essigsäure, 0,05 % Formaldehyd) inkubiert und anschließend für je 30 min in 50 %igem, 25 %igem und letztlich 10 %igem Ethanol neutralisiert. Es folgte eine einminütige Inkubation mit 0,02 % Natriumthiosulfat. Nach kurzem Waschen mit Wasser (3 x 20 s) wurde für 20 min mit Silbernitratlösung (2 mg/ml AgNO<sub>3</sub>, 0,1 % Formaldehyd) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Wasser wurde das Gel mit Entwickler (60 mg/ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,05 % Formaldehyd) nach Bedarf gefärbt und die Farbreaktion wurde letztendlich durch Ansäuern mittels Zugabe von Fixierer beendet.

#### 2.5.4.2 Coomassiefärbung von Proteinen

Zur Färbung wurden die Polyacrylamidgele mit "Coomassie Blue R250"-Lösung (0,05 % Coomassie Brilliant Blue R250, 30 % Methanol, 10 % Essigsäure) für mindestens

30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Entfärbung erfolgte mittels 5 %iger Essigsäure durch mehrmaliges Erhitzen in der Mikrowelle.

Zur Aufbewahrung wurden die Gele in 30 % Methanol, 5 % Glycerin inkubiert und in Cellophanblättern (Promega) getrocknet.

### 2.5.4.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die Proteine wurden nach der Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel mittels eines elektrischen "Semi-Dry"-Transfers mit einer Apparatur von PeqLab (Erlangen) auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Der Transfer erfolgte nach Burnette (Burnette 1981) bei einer Stromstärke von  $1 \text{ mA/cm}^2$  Membran über 1,5 h. Von der Anode zur Kathode wurde der Blot folgendermaßen aufgebaut: 3 Lagen dickes Filterpapier, Nitrocellulose-Membran, vom Sammelgel befreites Proteingel sowie 3 Lagen dickes Filterpapier, wobei Membran und Filterpapier auf Gelgröße zurechtgeschnitten waren. Filterpapier, Membran und Gel waren vorher in 1 x Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol) äquilibriert worden. Durch die Nutzung gefärbter Markerproteine (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) konnte der Transfer kontrolliert werden. Die Membranen wurden nach dem Transfer in 3 % fettfreier Trockenmilch in 1 x PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,3) für mindestens 30 min unter Schütteln geblockt. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem entsprechenden Antiserum in Blocklösung zuzüglich 0,025 % Tween bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$ ). Nach intensivem Waschen (mindestens 3 x 10 min in 1 x PBS-T (PBS + 0,025 % Tween)) erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (mit alkalischer Phosphatase AP oder Meerrettich-Peroxidase als Konjugat) ebenfalls in Blocklösung zuzüglich 0,025 % Tween für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln (oder über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$ ), es sei denn, der primäre Antikörper war bereits mit einem der beiden Enzyme fusioniert. Im Anschluss wurde erneut mindestens 4 x 5 min mit 1 x PBS-T gewaschen. Für die Reaktion der alkalischen Phosphatase wurde die Membran für 2 min in AP-Reaktionspuffer (150 mM Tris-HCl pH 9,5, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM NaCl) äquilibriert. Anschließend wurde die Membran mit frisch zubereiteter Substratlösung (jeweils 50  $\mu\text{l}$  der Stammlösungen von BCIP und NBT in 10 ml AP-Reaktionspuffer) überschichtet und unter leichtem Schütteln je nach Bedarf mehrere Minuten inkubiert. Gestoppt wurde diese Reaktion durch Zugabe von Wasser. Für die Detektion mittels Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörpers wurde der "ECL Plus Kit" der Firma Amersham Biosciences verwendet, wobei nach Herstellerangaben verfahren wurde. Durch Chemilumineszenz konnten die entsprechenden Proteinbanden auf Röntgenfilmen detektiert werden.

### 2.5.5 BlueNative-PAGE (BN-PAGE)

Zur Analyse der HrpZ1<sub>psph</sub>-Oligomerisierung wurde die BlueNative-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Schägger und von Jagow (Schägger and von Jagow 1991) genutzt. Diese Methode ist besonders geeignet für die Untersuchung nativ vorkommender Proteinkomplexe.

Folgende Stocklösungen wurden hergestellt:

Acrylamid:	49,5 % T, 3 % C
	24 g Acrylamid, 0,75 g Bisacrylamid, ad 50 ml H <sub>2</sub> O
3 x Gelpuffer:	150 mM BisTris-HCl
	1,5 M 6-Aminocaprinsäure pH 7,0 (mit HCl)
10 x Kathodenpuffer:	0,5 M Tricin
	150 mM BisTris
5 x Anodenpuffer:	0,25 M BisTris-HCl pH 7,0 (mit HCl)
2 x BisTrisACA:	200 mM BisTris-HCl
	1 M 6-Aminocaprinsäure pH 7,0 (mit HCl)
50BTH40G:	<u>50</u> mM <u>BisTris-HCl</u>
	<u>40</u> % (w/v) <u>Glycerin</u> pH 7,0 (mit HCl)

Folgende Arbeitslösungen wurden hergestellt:

1 x Kathodenpuffer	
1 x Kathodenpuffer + 0,01 % Coomassie Brilliant Blue G250	
1 x Anodenpuffer	
BN - Probenpuffer:	50 mg Coomassie Brilliant Blue G250
	500 $\mu$ l 2 X BisTrisACA
	400 $\mu$ l 75 % Saccharose
	100 $\mu$ l H <sub>2</sub> O

Lösungspuffer:	100 $\mu$ l 50BTH40G
	40 $\mu$ l 10 % Detergenz*
	60 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
	*eingesetzte Detergenzien: Digitonin, Triton X-100, Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid, Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid

%	6	16,5	Sammelgel
3 x Gelpuffer	5 ml	5 ml	2,5 ml
Acrylamid	1,783 ml	5,083 ml	0,6 ml
Glycerin	-	3 ml	-
10 % APS	63,3 µl	50 µl	30 µl
TEMED	6,33 µl	5 µl	3 µl
H <sub>2</sub> O	8,147 ml	1,862 ml	4,367 ml

Tab.2.4: Mengenangaben der Bestandteile für ein BN-Gradientengel

Proteinlösungen:     7,5 µl Protein (5 mg/ml)  
                           7,5 µl H<sub>2</sub>O  
                           15 µl Lösungspuffer  
                           3 µl BN - Probenpuffer

Als Markerproteine wurden Ferritin (Dimer 880 kDa, Monomer 440 kDa), Thyroglobulin (670 kDa) und BSA (Dimer 134 kDa, Monomer 67 kDa) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte in einer SE Ruby 600-Apparatur von Hoefer mit 3 L 1 x Anodenpuffer und 500 ml 1 x Kathodenpuffer (+ Coomassie). Während des Laufs durch das Sammelgel wurde eine Spannung von 100 V angelegt, danach auf 200 V erhöht. Nachdem der Coomassie-enthaltende Kathodenpuffer die Hälfte des Gels erreicht hat, wurde er gegen einen Kathodenpuffer ohne Farbstoff ausgetauscht. Die gesamte Elektrophorese wurde im Kühlraum durchgeführt. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel mittels 5 %iger Essigsäure und Erhitzen in der Mikrowelle weiter entfärbt.

### 2.5.6 Calcium-Overlay-Assay

Die calciumbindende Fähigkeit von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> und einigen Deletionskonstrukten wurde nach der von Maruyama *et al.* 1984 beschriebenen Methode untersucht. Dazu wurden auf denaturierenden SDS-PAGE-Gelen (10 %ig) aufgetrennte Proteine (je 2 µg aufgetragen) auf PVDF Membranen (Amersham Biosciences) geblottet und anschließend in Ca<sup>2+</sup>-Overlay-Puffer (10 mM MES pH 6,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 60 mM KCl) 3 x 20 min gewaschen. Danach erfolgte eine 20-minütige Inkubation im gleichen Puffer, welcher 20 µl <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> (37 MBq / L, 1 mCi, Amersham Biosciences) enthielt (die Endkonzentration an Ca<sup>2+</sup> lag etwa bei 0,2 µg/ml). Nach einem kurzem Waschschrift ( 2 x 2 min in 50 % Ethanol) wurde die Membran an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Ein PhosphoImager-Screen wurde für mindestens 8 Tage von der Membran belichtet. Die Auswertung erfolgte am PhosphoImager "Storm 860" (Molecular Dynamics, GE Healthcare, Uppsala, Schweden).

### 2.5.7 Analytische Gelfiltration

Die Gelfiltration wurde bei 4°C in 5 mM MES pH 5,5, 150 mM NaCl (sterilfiltriert) an der FPLC "Äkta Explorer" der Firma Amersham Biosciences durchgeführt. Es wurde ein Volumen von 500 µl der jeweiligen 0,5 µg/µl Proteinlösung (vorher filtriert durch 0,22µm-Spritzenfilter der Firma Roth) aufgetragen. Der Lauf erfolgte entweder über eine Chromatographie-Säule des Typs Superdex 75 (10 / 300 GL) oder Superdex 200 (10 / 300 GL). Bei den Laufbedingungen für die jeweilige Säule wurde anhand der Anweisungen des Herstellers verfahren. In der Regel wurde jeglicher Durchfluß in 250 µl-Fractionen für Western-Analysen aufgefangen. Als Standardproteine wurde Ferritin (Dimer 880 kDa, Monomer 440 kDa), Thyroglobulin (670 kDa), BSA (Dimer 134 kDa, Monomer 67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) und RNase A (13 kDa) verwendet und als Gemisch in einer jeweiligen Proteinkonzentration von 0,1 µg/µl aufgetragen. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mittels der Unicorn<sup>TM</sup>-Software (Amersham Biosciences). Es wurde bei einer UV-Wellenlänge von 214 nm gearbeitet, da HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> aufgrund des nahezu völligen Fehlens von aromatischen Resten bei 280 nm kaum absorbiert.

### 2.5.8 CD-Spektroskopische Untersuchungen

Sekundärstrukturbereiche eines Proteins zeigen unterschiedliche Eigenschaften beim Absorbieren von zirkular polarisiertem Licht. Diese Eigenschaft ist die Grundlage der CD-spektroskopischen Untersuchung von Proteinen. Die Messungen wurden in einem CD-Spektrometer (J-720 Spectropolarimeter, Jasco, Gross-Umstadt) von 250 nm bis 190 nm unter Stickstoffatmosphäre aufgenommen, da Luftsauerstoff in Bereichen  $\lambda < 220$  nm absorbiert. Alle Spektren wurden mit Proteinkonzentrationen von 1 mg/ml sowie Detergenzkonzentrationen von 0 - 1,5 % bei Raumtemperatur aufgenommen. Die molare Elliptizität war innerhalb eines 5 %igen Fehlers reproduzierbar, welcher hauptsächlich durch Rauschen und geringen Abweichungen des Lichtwegs zustande kam. Die Spektren wurden mittels der "Secondary Structure Estimation"-Software (Jasco) ausgewertet.

### 2.5.9 Interaktionsstudien mittels des Hefe-Dihybrid-Systems

Das Hefe-Dihybrid-System eignet sich zur Analyse von möglichen Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen. Dabei nutzt man die Tatsache, dass viele Proteine eine modulare Struktur aufweisen, d.h. sie bestehen häufig aus separierbaren Domänen, welche unterschiedliche Funktionen separat ausfüllen. Diese Sachverhalt gilt auch für den in diesem System verwendeten Hefe-GAL4-Transkriptionsfaktor, da dieser aus einer DNA-Bindedomäne (GAL4BD) und einer Transkriptionsaktivierungsdomäne (GAL4AD) besteht, die getrennt voneinander exprimiert werden können. GAL-Promotoren werden von der Bindedomäne erkannt, während die Transkriptionsaktivierungsdomäne die Interaktion positiv wirkender Transkriptionsfaktoren mit den RNA-Polymerase-Komplexen vermittelt, wodurch ein Ablesen des kodierenden Bereichs der Zielgene erst

möglich wird. Die DNA der zu analysierenden Proteine wird in zwei verschiedene Vektoren kloniert, von denen einer (pGBKT7) außerdem für die GAL4BD kodiert, der andere (pGADT7) für GAL4AD. Nach der Transformation in Hefe werden die zu analysierenden Proteine als GAL4BD- bzw. GAL4AD-Fusionen exprimiert (siehe Abbildung 2.5)

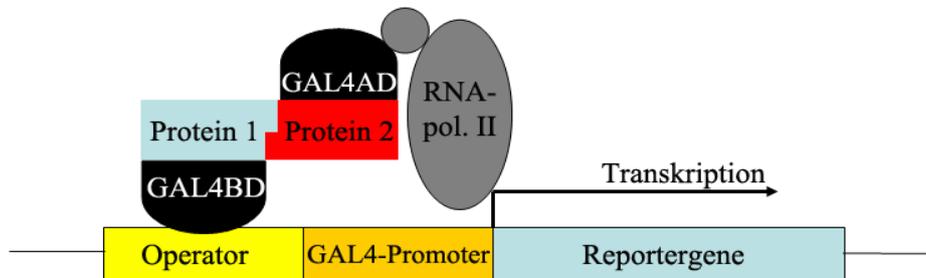


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Hefe-Di-Hybrid-Systems. Die Expression der Fusionsproteine GAL4BD-Protein 1 und GAL4AD-Protein 2 führt bei einer Interaktion von Protein 1 und Protein 2 zur Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors und somit zur Expression der Reportergene.

In dieser Arbeit wurde der *Saccharomyces cerevisiae*-Hefestamm pJ69-4A verwendet, welcher auxotroph für Leuzin und Tryptophan ist, so daß mittels Mangelmedien auf die Hefen selektioniert werden kann, die die entsprechenden Plasmide mit komplementierenden Genen tragen (pGADT7 kodiert für Leuzin-, pGBKT7 für Tryptophanbiosyntheseenzyme). PJ69-4A trägt im Genom drei Reportergene, die von verschiedenen GAL-Promotoren reguliert werden. Der GAL1-Promoter kontrolliert das *his3*-Gen, durch dessen Produkt ein Defekt in der Histidinbiosynthese komplementiert werden kann. Das *ade2*-Gen wird von dem GAL2-Promoter reguliert, durch dessen Aktivierung ein Defekt in der Adeninbiosynthese komplementiert werden kann. Desweiteren befindet sich das für die  $\beta$ -Galaktosidase kodierende *lacZ*-Gen unter der Kontrolle des GAL7-Promoters. Da pJ69-4A außer für Leuzin und Tryptophan auch für Histidin und Adenin auxotroph ist, kann mittels Adenin- und Histidinmangelmedien auf Interaktion selektioniert werden. In dieser Arbeit wurde aber nur auf Adenin selektioniert.

Die DNA von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>, HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub> und HrpA1<sub>P<sub>sph</sub></sub> wurde mittels PCR amplifiziert und als EcoRI/BamHI-Fragmente in pGADT7 und pGBKT7 durch Restriktion und anschließende Ligation kloniert (siehe 2.4.5 und 2.4.6). PJ69-4A wurde mit beiden Vektoren transformiert (siehe 2.5.9.1) und auf SD-LW-Agar (synthetic dropout medium ohne Leuzin und Tryptophan) ausplattiert. Je 3 Kolonien wurden in 5 ml SD-LW-Flüssigmedium über Nacht bei 30 °C angezogen. Je 7,5  $\mu$ l einer 1:1-, 1:10-, 1:100- und 1:1000-Verdünnung wurde auf SD-LW- und SD-LWA-Agar (synthetic dropout ohne Leuzin, Tryptophan und Adenin) getropft, eintrocknen gelassen und für mindestens 3 Tage bei 30°C inkubiert. Zur Kontrolle der Funktionalität des Systems wurden parallel die Kontrollvektoren pGADT7-T und pGBKT7-53 in pJ69-4A-Zellen transformiert. Von pGBKT7-53 wird das Maus-Tumorsuppressorgen p53 als Fusion mit GAL4BD und von pGADT7-T das Gen des großen T-Antigens des SV40-Tumorvirus als Fusion mit

GAL4AD kodiert. P53 und T-Antigen können wegen ihrer Interaktionsfähigkeit als Kontrolle verwendet werden (Li und Fields 1993).

### 2.5.9.1 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* pJ69-4A

Benötigte Stammlösungen:

PEG 3000 (sterilfiltriert)	50 % (w/v)
10 x TE (sterilfiltriert)	0,1 M Tris/HCl pH 7,5 10 mM EDTA
10 x Lithiumacetat (sterilfiltriert)	1 M LiAcetat pH 7,5 (mit HAc eingestellt)
ss DNA (autoklaviert)	10 mg/ml Lachssperma-DNA (ultraschallbehandelt, 10 min bei 99°C)
Glucoselösung (sterilfiltriert)	2 %

Es wurde ein nach Gietz *et al.* 1995 modifiziertes Protokoll verwendet. Eine 5 ml Übernachtkultur des Hefestammes pJ69-4A in YPD-Medium (2 % Bacto Pepton, 2 % Glucose, 1 % Hefeextrakt; für Platten 2 % Bactoagar pH 5) wurde bei 30°C und 180 rpm angezogen und in 100 ml YPD-Medium (auf 30°C vorgewärmt) inokuliert. Diese Kultur wurde dann bei 30°C und 180 rpm für ca. 4 h bis zu einer OD<sub>600</sub> von ungefähr 0,6 - 0,8 geschüttelt (eine OD<sub>600</sub> von 0,1 entspricht 1 x 10<sup>6</sup> Zellen). Die Zellsuspension wurde in ein steriles 50 ml-Falcon überführt und die Hefen bei 4000 rpm für 3 min pelletiert. Die Pellets wurden durch sanftes Schwenken in 25 ml sterilem Wasser resuspendiert und erneut bei 4000 rpm für 3 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml 1 x Lithiumacetat aufgenommen und erneut 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 600 µl 1 x Lithiumacetat aufgenommen und für 30 min bei 30°C inkubiert. Der Transformationsmix bestehend aus 70 µl PEG3000, 3 µl 10 x TE, 10,5 µl 10 x Lithiumacetat, 1,5 µl ssDNA und 15 µl der bei 30°C inkubierten Hefezellen wurde zu 15 µl vorbereiteter DNA-Lösung (je 1 µl Plasmid der Konzentration 1 µg/µl; 10 µl ssDNA; 3 µl 1 x TE) gegeben. Diese Suspension wurde nach Mischen weitere 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend erfolgte die eigentliche Transformation durch 20minütigen Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad. Nachdem die Hefen für 10 min bei 2000 rpm pelletiert wurden, erfolgte ein Resuspendieren in 100 µl sterilem Wasser. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 min wurden die Hefen in 150 µl Glucoselösung resuspendiert, auf SD-LW-Agar ausplattiert und für ca. 3 Tage bei 30°C inkubiert.

### 2.5.9.2 oNPG-Assay

Eine Interaktion im Hefe-Dihybrid-System kann man neben Selektionsmedien auch feststellen, indem man die Aktivität eines der Reporterproteine, speziell die der  $\beta$ -Galaktosidase, in einem einfachen Assay untersucht. ONPG (ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) wird durch das Enzym in Galaktose und o-Nitrophenol gespalten (siehe Abbildung 2.6). Letzteres verursacht eine gelbe Verfärbung des Ansatzes bei positivem Testergebnis. Diese Gelbfärbung kann spektrophotometrisch leicht quantifiziert werden.

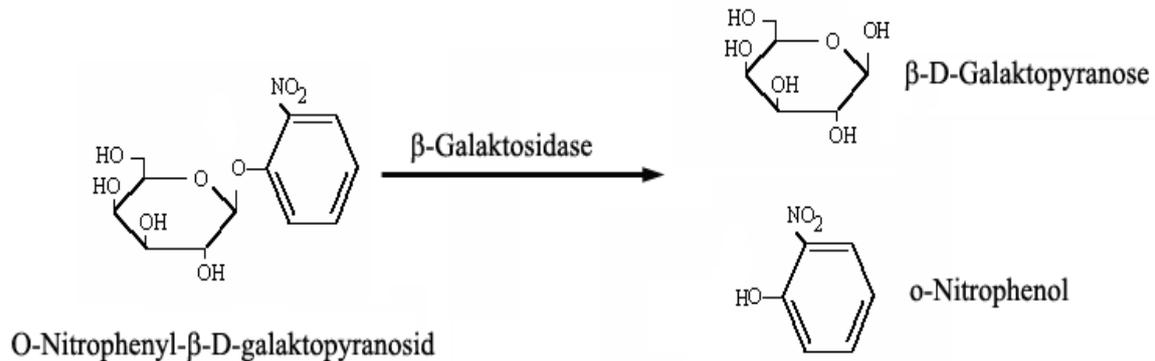


Abb. 2.6: Schema des oNPG-Assays.  $\beta$ -Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse von oNPG zu  $\beta$ -D-Galaktopyranose und o-Nitrophenol.

Für eine Messung werden je 3 Kolonien transformierter Hefe in 2 ml SD-LW-Flüssigmedium über Nacht bei 30°C angezogen. Idealerweise sollten alle Proben die gleiche OD<sub>600</sub> von ungefähr 0,4 anzeigen, ansonsten wurde eine Anpassung vorgenommen.

Benötigte Stammlösungen:

H-Puffer	100 mM HEPES/KOH pH 7,0
	150 mM NaCl
	2 mM MgCl <sub>2</sub>
	1 % (w/v) BSA (Fraktion V)
Chloroform	
SDS-Lösung	0,1 % (w/v) SDS
oNPG-Lösung	4 mg oNPG pro ml H-Puffer
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -Lösung	1 M

2 ml der Hefezellsuspension wurden bei 13000 rpm für 2 min zentrifugiert und die Pellets unmittelbar anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Ein langsames Auftauen und darauffolgendes Resuspendieren erfolgte durch Zugabe von 650  $\mu$ l H-Puffer. Die Lyse der Hefezellen wurde erreicht durch Zugabe von 50  $\mu$ l Chloroform und 50  $\mu$ l SDS-Lösung. Die Proben wurden ca. 1 min gevortext. Nach dem Hinzufügen von 125  $\mu$ l oNPG-Lösung wurden die Proben für mindestens 20 min bei 30°C inkubiert, je nachdem

wie schnell sich eine Gelbfärbung einstellte. Die Reaktion wurde abgestoppt durch Zugabe von 400 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm für 5 min wurden die Überstände in Küvetten umpipettiert und die OD<sub>420</sub> aller Proben gemessen. Der Hintergrundwert (eine Probe ohne Hefepellet, identisch behandelt) wurde von allen Ansätzen subtrahiert.

Die Aktivität der β-Galaktosidase errechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität [rel. Einheiten]} = \frac{1000 \times \text{OD}_{420}}{V \times T \times \text{OD}_{600}}$$

V = Volumen (hier 2 ml)

T = Reaktionszeit (in min)

### 2.5.10 Kristallisation

Kristalle biologischer Makromoleküle entstehen aus wässrigen Lösungen durch Erreichen einer Übersättigung. Die hohe Ordnung des Kristallgitters bedingt nach optischen Gesetzmäßigkeiten konstruktive Interferenz einfallender Röntgenwellen, aus der sich mittels Röntgenstrukturanalyse der Aufbau errechnen läßt. Die Struktur läßt Rückschlüsse auf die biologische Funktion zu.

Die Kristalle wurden im „Hängenden Tropfen“ angesetzt. Bei dieser Kristallisationsmethode ist die Proteinlösung im Tropfen und die Reservoirolösung durch eine Dampfphase räumlich getrennt. Aufgrund unterschiedlicher Konzentrationen des Fällungsmittels im Tropfen und im Reservoir baut sich ein Konzentrationsgradient auf, der durch Dampfdiffusion einen Gleichgewichtszustand anstrebt. Indem das Lösungsmittel Wasser aus dem vergleichsweise kleinen Tropfenvolumen diffundiert, wird die Proteinlösung aufkonzentriert, und die Probe kristallisiert im Idealfall.

Für die Kristallisation fanden Linbro®-Schalen aus der Zellkultur Verwendung. 1 µl der zu kristallisierenden Proteinprobe (5 mg/ml) wurde mit 1 µl Kristallisationslösung auf einem silikonisierten Deckgläschen (Ø = 22 mm) gemischt. Als Reservoir dienten 500 µl Kristallisationslösung im Well. Um ein geschlossenes System während des Äquilibrierungsvorgangs zu garantieren, war der Rand des Reservoir-Wells mit viskoser Silikonpaste eingefettet, bevor das Deckgläschen umgekehrt darüber gelegt und angedrückt wurde. Durch die Verdünnung im Tropfen bestand ein Konzentrationsgradient zwischen dem Fällungsmittel im Tropfen und im Reservoir. Die Kristallisationslösungen variierten in Bezug auf Puffer, pH, Art und Konzentration mono-/divalenter Ionen, Fällungsmittel und Polyamin. Es wurden die kommerziellen Screens der Firma Hampton Research benutzt (Crystal Screen™ HR2-110 und Crystal Screen™2 HR 2-112). Die Kristallisation

erfolgte bei 20°C und 37°C. Das Verhalten der Tropfen wurde mittels Mikroskop, Kamera und Videodokumentationseinrichtung verfolgt.

Die Weiterbearbeitung des Kristalls sowie die Untersuchung mittels Röntgenstrukturanalyse erfolgte freundlicherweise durch Mitarbeiter des IFIB (Interfakultäres Institut für Biochemie Tübingen) aus der Arbeitsgruppe Stehle, in der auch die Kristallisationen durchgeführt wurden.

### Röntgenstrukturanalyse-Geräte:

Cryosystem X-Stream	Rigaku/MSK (The Woodlands, USA)
Detektor Mar 345 dtb	Mar research (Hamburg)
Drehanode Micromax 007 HF	Rigaku/MSK (The Woodlands, USA)
Mikroskop, digital mit Polarisationsfilter MZ16	Leica (Wetzlar)
Optik Varimax HF	Rigaku/MSK (The Woodlands, USA)

### Röntgenstrukturanalyse-Software:

CCP4	Collaborative Computational Project, number 4 (1994)
CNSsolve	Brünger <i>et al.</i> 1998
Coot	Emsley and Cowtan 2004
HKL-2000	HKL research, Inc. (Charlottesville, USA)
mar345dtb	Marresearch GmbH (Hamburg)
RAVE	Uppsala Software Factory (Uppsala, Schweden)
O	Jones <i>et al.</i> 1991
PyMOL	DeLano 2002
WHAT IF	Vriend 1990

### 2.5.11 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Untersuchungen des HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Proteins in Lösung wurden in Kooperation mit York Stierhoff (ZMBP, Universität Tübingen) am Transmissionselektronenmikroskop LEO 906 (Carl Zeiss, Oberkochen) nach einer Uranylacetat-Negativfärbung (Van Bruggen *et al.* 1960) durchgeführt.

## 2.6 Untersuchung der Porenbildungsaktivität

### 2.6.1 Calcein-Release-Assay

Untersuchungen mit Calcein-enthaltenden Asolectin-Liposomen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Mauro Dalla Serra (Centro di Fisica degli Stati Aggregati, Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto Trentino di Cultura, I-38050 Povo (Trento), Italy) nach Kayalar *et al.* 1986 durchgeführt.

### 2.6.2 Untersuchungen an Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis*

Diese Experimente wurden ebenfalls in Kooperation mit Benoit Lacombe (Unité Mixte de Recherches Biochimie et Physiologie Moleculaire des Plantes, AgroM-CNRS-INRA-UMII, 2 Place Viala, 34060 Montpellier, France) nach Véry *et al.* 1995 (Präparation von Oozyten) und Stühmer 1992 ("Two-electrode voltage-clamp technique") durchgeführt.

### 2.6.3 Liposomenassay mit Sodium Green™

Mittels eines neu etablierten Liposomenassays sollte die Porenbildung von Proteinen in synthetischen Lipidmembranen ermittelt werden. Die Liposomen wurden freundlicherweise von der Firma Novosom AG (Halle/Saale) in einem Verhältnis von 90 % POPC (Palmitoyl-oleoylglycerphosphocholine) zu 10 % DPPG (Dipalmitoylglycerophosphoglycerol) hergestellt. Dabei erfolgte die Beladung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sodium Green™ (Molecular Probes), welcher bei Interaktion mit einwertigen Kationen, speziell Natriumionen, fluoresziert. Die Abbildung 2.7 veranschaulicht den theoretischen Hintergrund des Liposomenassays. Fluoreszenzfarbstoff-enthaltende Liposomen wurden in einer natriumionenfrien Lösung hergestellt. Bei simultaner Zugabe eines porenbildenden Proteins und Natriumionen zeigt die ansteigende Fluoreszenz eine Aktivierung des Farbstoffs durch Interaktion mit Natriumionen an, die wiederum nur durch den Einstrom durch eine Membranpore hervorgerufen worden sein konnte.

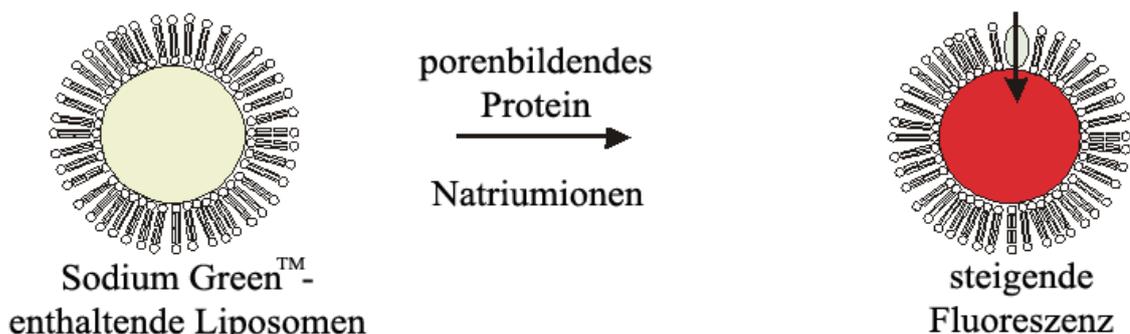


Abb. 2.7: Schema des Liposomenassays

Folgende Lösungen werden für dieses Experiment benötigt:

10 x HEPES            100 mM HEPES pH 7,0  
1,5 M KCl

50 mM NaCl  
10 % Triton X-100

In einer 96 well-Mikrotiterplatte (Greiner) wurden 50  $\mu$ l, bestehend aus 10  $\mu$ l 10 x HEPES, 5  $\mu$ l Liposomenlösung, a  $\mu$ l Protein sowie b  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (b = 50-10-5-a) vorpipettiert. Die Proteinkonzentration betrug, wenn nicht anders angegeben, jeweils 2  $\mu$ M. Nach Zugabe von 50  $\mu$ l der NaCl-Lösung wurde die Messung gestartet und die Fluoreszenz über einen Zeitraum von mindestens 10 min verfolgt. Die Messung wurde am Fluoreszenzplattenlesegerät (MWG Sirius HAT Injector, MWG Biotech, Ebersberg) mit dem Anregungsfilter 485/20 nm und dem Emissionsfilter 528/20 nm durchgeführt. Nach jeder Messung wurde durch Zugabe von 5  $\mu$ l Triton die Integrität der Liposomen während des Experiments festgestellt. Dabei sollte die Fluoreszenz auf ein Vielfaches aufgrund der vollständigen Freisetzung der Farbstoffmoleküle ansteigen. Werte der Kontrollmessung wurden von den eigentlichen Daten abgezogen.

### 3 Ergebnisse

HrpZ1 aus dem bakteriellen Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ruft in Pflanzen Immunreaktionen hervor und besitzt darüberhinaus die Fähigkeit, sich in synthetische Lipiddoppelschichten unter Bildung einer ionenleitenden Membranpore einzulagern. Durch frühere Arbeiten (Engelhardt 2003) unter Benutzung von Harpin-homologen Proteinen, HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Deletions- und HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Insertionsmutanten konnte gezeigt werden, daß die Porenbildung physiologisch die Abwehrinduktion sehr wahrscheinlich nicht verursacht, sondern die Virulenzfunktion des Proteins darstellt. Die Studien zur Abwehrinduktion in Petersilie als auch die Porenbildung sollten vertieft werden. Darüberhinaus sollten proteinbiochemische Experimente Hinweise über den molekularen Aufbau des Proteins in Lösung, aber auch in lipophiler Umgebung liefern, um Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins während der bakteriellen Infektion von Pflanzen ziehen zu können.

#### 3.1 *HrpZ1*<sub>P<sub>sph</sub></sub> als Auslöser pflanzlicher Abwehrreaktionen in Petersilie

Signaltransduktionsprozesse der pflanzlichen Abwehr und biochemische Reaktionsmechanismen können in Zellsuspensionskulturen besser als in Ganzpflanzen untersucht werden. Solche als Modell eingesetzten Systeme sind notwendig, da in intaktem Pflanzengewebe die Abwehrreaktionen meist nur auf wenige Zellen beschränkt sind. Die Mehrzahl der durch Pathogenbefall induzierten Abwehrreaktionen ist in intakten Pflanzen identisch mit den von PAMPs hervorgerufenen Reaktionen in Zellkulturen. Pep13 beispielsweise, ein 13-Aminosäure-Oligopeptid, welches sich von einem 42 kDa-Glycoprotein aus *Phytophthora sojae* ableitet, ist notwendig und hinreichend, um die Mehrheit der Abwehrreaktionen in Zellsuspensionen zu induzieren, wie sie auch nach Behandlung von Blättern mit Sporen von *Phytophthora sojae* beobachtet werden (Nürnberger *et al.* 1994; Hahlbrock *et al.* 1995). Petersiliezellsuspensionen (*Petroselinum crispum* L.) haben als robustes System zur Untersuchung von Abwehrsignaltransduktionswegen in Pflanzen eine lange Geschichte (Hahlbrock *et al.* 1995).

##### 3.1.1 Alkalisierung des Mediums nach HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Applikation

Die Stimulierung von Ionenflüssen durch eine Veränderung der Plasmamembranpermeabilität gehört zu den frühen Pflanzenzellreaktionen nach der Behandlung mit PAMPs (Atkinson *et al.* 1996; Gelli *et al.* 1997; Jabs *et al.* 1997; Zimmermann *et al.* 1997; Blatt *et al.* 1999; Klüsener and Weiler 1999). So rufen phytopathogene Bakterien einen rapiden K<sup>+</sup>-Ausstrom und damit einhergehend eine

Mediumalkalisierung in Tabaksuspensionskulturen hervor (Atkinson *et al.* 1996), und in Petersiliezellkulturen sind  $H^+/Ca^{2+}$ -Einströme sowie  $K^+/Cl^-$ -Ausströme nach Applikation von Pep13 beobachtet worden (Nürnberger *et al.* 1994). Aufgrund dieser Befunde wurde mit Hilfe einer pH-Minierelektrode die  $H^+$ -Konzentrationsveränderung im Kulturmedium HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-behandelter Zellen gemessen. Wie Abbildung 3.1 zeigt, bewirkte die Zugabe von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> eine Abnahme der extrazellulären  $H^+$ -Konzentration. Die pH-Wert-Zunahme (ca. 0,6 Einheiten) erreichte nach 30 min Elicitorbehandlung ihr Maximum und weist somit ähnliche Merkmale auf wie der durch phytopathogene Bakterien bzw. Pep13 hervorgerufene pH-shift (Atkinson *et al.* 1996; Jabs *et al.* 1997; Klüsener and Weiler 1999).

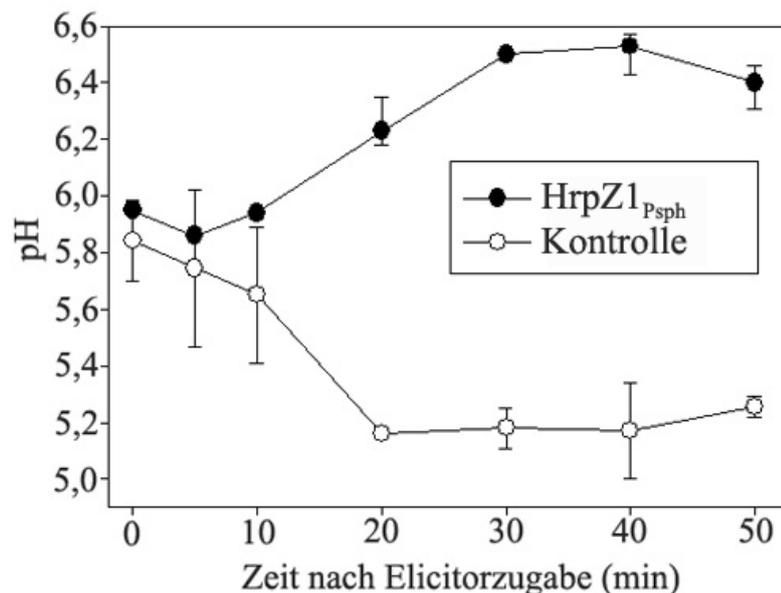


Abb.3.1: Alkalisierung des Kulturmediums von Petersiliezellen nach Behandlung mit HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>. 6 Tage alte Zellen wurden mit frischem HA-Medium gewaschen und darin aufgenommen. Die Petersiliezellen wurden zum Zeitpunkt t = 0 min mit 2  $\mu$ M HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> behandelt. Nach den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Zentrifugation von 2 ml Kultur und eine anschließende pH-Wert-Messung des Überstandes. Als Kontrolle diente eine Proteinpräparation aus *E.coli*, welche den Expressionsvektor enthielten. Dargestellt sind die Standardabweichungen von zwei unabhängigen Messungen.

### 3.1.2 MAPK-Aktivierung nach HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Behandlung

Eine wichtige Signalkomponente zur Auslösung von Abwehrreaktionen in elicitierten Pflanzenzellen sind die zellulären Phosphorylierungsvorgänge, von denen die MAP-Kinase-Kaskade die bekannteste ist (Ligterink *et al.* 1997). Die Kinaseaktivität von PcMPK3 und PcMPK6, die den PAMP-aktivierten MAP-Kinasen aus *Arabidopsis thaliana* entsprechenden Kinasen aus Petersilie, werden durch Pep13 stimuliert, wie durch Immunopräzipitation mit MAPK-spezifischen Antikörpern gezeigt werden konnte (Kroj *et al.* 2003). In Kooperation mit Justin Lee (IPB, Halle/Saale) wurden Experimente, die darauf abzielten zu untersuchen, ob die HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Behandlung von Petersiliezellen ebenfalls die MAP-Kinase-Aktivierung induzieren kann, mit Hilfe dieser spezifischen Antikörper durchgeführt. Immunkomplexe, welche die gebundenen MAP-Kinasen

enthielten, wurden in einem *in vitro*-Kinase-Test mit MBP ("Myelin basic protein") als Substrat analysiert. Wie aus Abbildung 3.2 ersichtlich ist, induziert HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> eine Aktivierung beider Kinasen, wobei PcMPK6 stärker induziert zu sein scheint.

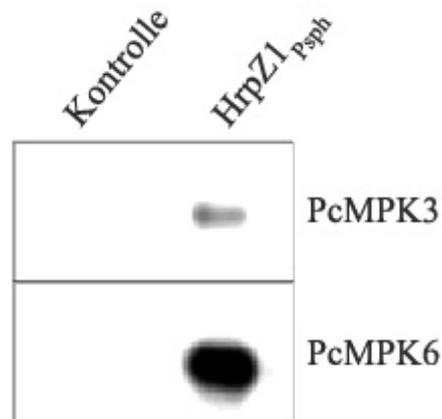


Abb.3.2: Immunkomplex-MBP-Kinase-Test zur Analyse der Aktivierung von PcMPK3 und PcMPK6 nach Behandlung mit HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>. Proteine von Zellextrakten elicierter Petersiliezellen wurden mit anti-PcMPK3 und anti-PcMPK6 präzipitiert, die Präzipitate anschließend in einer SDS-PAGE aufgetrennt und nachfolgend einem in-gel-MAPK-Assay unterzogen.

### 3.1.3 NO-Burst nach HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Applikation

Stickstoffmonoxid (NO) spielt als inter- und intrazellulärer Botenstoff im tierischen und pflanzlichen Stoffwechsel eine große Rolle (Wendehenne *et al.* 2001; Wendehenne *et al.* 2004; Lamattina *et al.* 2003; Neill *et al.* 2003; del Rio *et al.* 2004; Romero-Puertas *et al.* 2004; Crawford and Guo 2005; Delledonne 2005; Lamotte *et al.* 2005). Zu den unzähligen physiologischen Prozessen in Säugetieren, in denen NO involviert ist, zählen die Entspannung glatter Muskulatur, die Hemmung der Blutplättchenaggregation, neuronale Kommunikation, aber auch immunoregulatorische Vorgänge (Schmidt and Walter 1994). In Pflanzen hat NO Einfluß auf die Regulation von hormonellen, Wund- und Abwehrreaktionen, Wurzel- und Xylementwicklung, Eisenhaushalt, aber auch auf den Zelltod (Lamattina *et al.* 2003; Neill *et al.* 2003; Wendehenne *et al.* 2004; Crawford and Guo 2005; Delledonne 2005; Lamotte *et al.* 2005). Die Quelle von NO in Pflanzen ist entweder Arginin oder Nitrit (Nishimura *et al.* 1986; Cueto *et al.* 1996; Barroso *et al.* 1999; Yamasaki and Sakihama 2000; Guo and Crawford 2005). Neben der eigentlichen Funktion als Signalmolekül kann es auch schon durch Reaktion mit Sauerstoff zu dem für Mikroorganismen toxischen Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) reagieren.

Da NO Zelltod und Abwehrreaktionen reguliert, sollte mit Hilfe der Esterase-katalysierten Umsetzung von DAF-2-DA zu DAF-2 untersucht werden, inwiefern bei Behandlung mit HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> in den Petersiliezellen eine gesteigerte NO-Produktion zu beobachten ist.

In der ersten Stunde nach Elicitierung zeigte sich noch keine Zunahme der NO-Produktion, wie die ähnlichen Fluoreszenzlevel von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-elicitierten und kontrollbehandelten Zellen verdeutlichen (siehe Abbildung 3.3). Nach der 2. Stunde war

ein Ansteigen der NO-Produktion zu erkennen, welcher nach 3 Stunden maximal wurde (größte Differenz zu Vektorkontrollwerten). Nach 4 Stunden gibt es kaum noch Unterschiede zur Kontrollmessung. Der Verlauf der Kinetik deutet auf einen NO-Burst hin, der sein Maximum nach 3 Stunden erreicht. Wie die Abbildung belegt, sind die NO-Kontrollspiegel relativ hoch, was ein Indiz für den Streßzustand der Zellen sein kann.

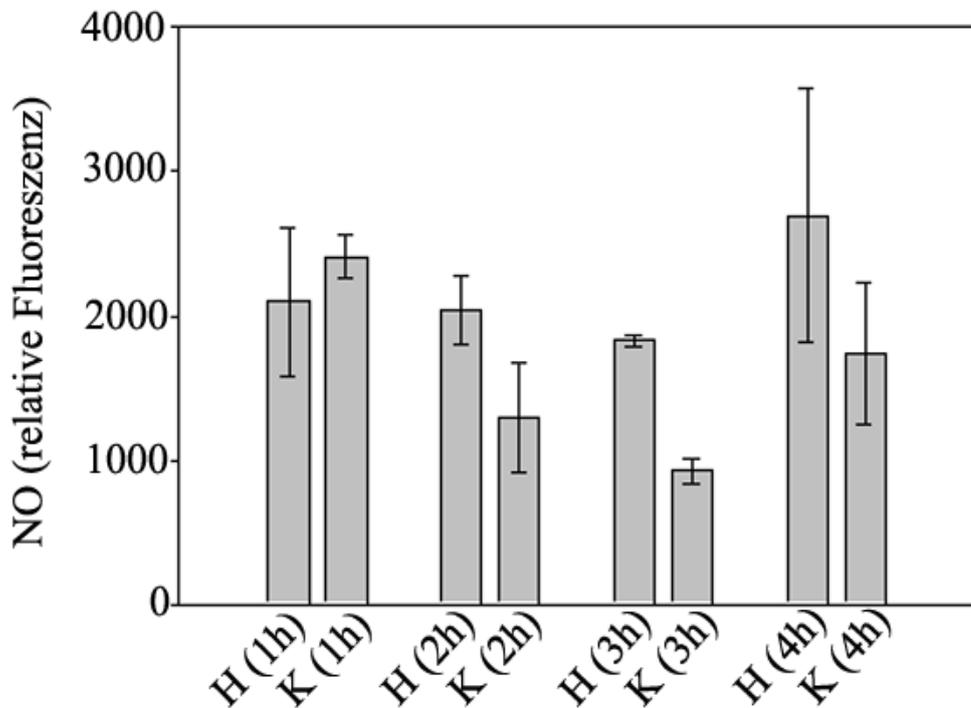


Abb.3.3: NO-Burst in Petersiliezzellen nach Applikation von HrpZ1<sub>PspH</sub>. 6 Tage alte Zellen wurden nach Aufnahme in frischem HA-Medium mit 2  $\mu$ M HrpZ1<sub>PspH</sub> behandelt. 50  $\mu$ l elicierter Zellsuspension wurden mit 20  $\mu$ l 10  $\mu$ M DAF-2-DA inkubiert und die jeweilige Fluoreszenzkinetik in den ersten vier Stunden gemessen. Das Diagramm zeigt die Standardabweichungen der Anstiege der einzelnen Kinetiken von HrpZ1<sub>PspH</sub> (H)- und Vektorkontroll (K)-behandelten Petersiliezzellen von drei unabhängigen Messungen.

### 3.1.4 Phytoalexinakkumulation im Kulturmedium nach HrpZ1<sub>PspH</sub>-Behandlung

Die Akkumulation von antimikrobiellen Phytoalexinen an der Infektionsstelle ist eine lokale, auf spezifischer Genaktivierung beruhende pflanzliche Abwehrreaktion nach einer Infektion durch Pathogene. Die Elicitierung von Zellkulturen mit PAMPs führt zu einer ähnlichen, leicht quantifizierbaren Abwehrreaktion.

Aufgereinigtes rekombinantes HrpZ1<sub>PspH</sub> wurde den Petersiliezzellen zugesetzt und nach einer Inkubationszeit von 24 h im Dunklen wurde die Phytoalexinsynthese quantifiziert. HrpZ1<sub>PspH</sub> induzierte reproduzierbar bei einer Proteinkonzentration von 1  $\mu$ M die höchste Phytoalexinproduktion (siehe Abbildung 3.4). Je nach Vitalität der Zellen betrug die Menge dieser produzierten Sekundärmetabolite etwa 70 - 100 % der durch 200 nM Pep13 induzierten Phytoalexinmenge, welches als Induktionskontrolle bei jedem Experiment eingesetzt wurde. Der EC<sub>50</sub>-Wert der Induktion, welcher der Konzentration bei halbmaximaler Aktivität entspricht, wurde anhand von Dosis-Wirkungs-Kurven bei etwa 100 nM ermittelt (siehe Abbildung 3.4). Die Elicitierung mit einer Proteinpräparation aus

*E.coli*, welche mit dem Expressionsvektor transformiert waren, führte zu keiner erheblichen Phytoalexinproduktion.

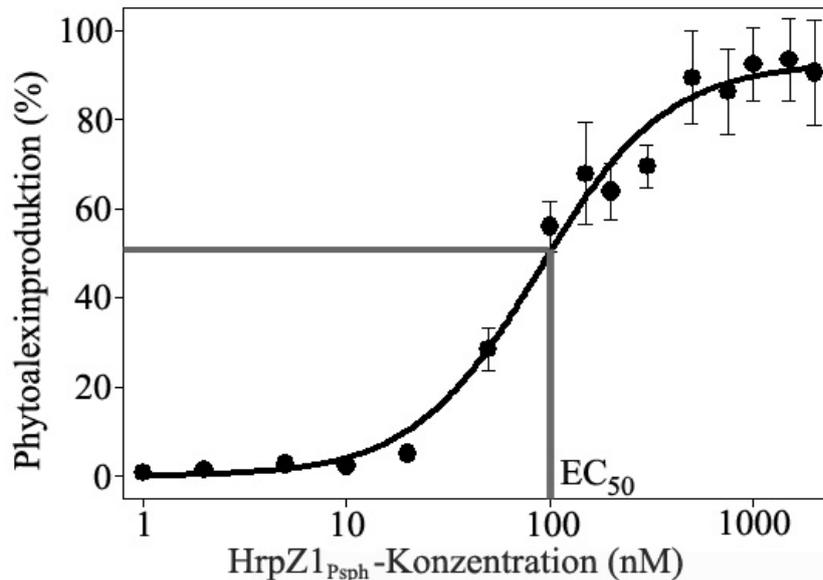


Abb.3.4: Dosis-Wirkungs-Kurve der Phytoalexinproduktion in Petersiliezellensuspensionen nach HrpZ1<sub>Psph</sub>-Behandlung. 6 Tage alte Zellen wurden nach Aufnahme in frischem HA-Medium mit HrpZ1<sub>Psph</sub> in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Furanocoumarinakkumulation im Kulturmedium erfolgte fluorezenzspektrometrisch nach 24 h Inkubation. Die maximale Produktion, erreicht durch 200 nM Pep13, wurde als 100 % definiert. Dargestellt sind die Standardabweichungen von vier unabhängigen Messungen abzüglich der Vektorkontrollwerte .

### 3.1.5 Bedeutung von NO für die elicitorinduzierte Phytoalexinakkumulation

Aufgrund der Befunde, daß bei der Elicitierung von Petersiliezellen mit HrpZ1<sub>Psph</sub> eine erhöhte NO-Produktion nachgewiesen werden konnte (siehe 3.1.3), wurde untersucht, ob die artifizielle Unterbindung eines hohen NO-Spiegels eine Veränderung der Abwehrreaktionen, speziell der Phytoalexinakkumulation bewirkt. Die elicitorkonzentrationsabhängige Phytoalexinproduktion in HrpZ1<sub>Psph</sub>-elicitierten Petersiliezellen wurde verglichen mit der von Zellen, die zusätzlich dem NO-Scavenger cPTIO ausgesetzt waren. Dabei zeigte sich in Zellsuspensionen mit künstlich niedrig gehaltenem NO-Level eine deutlich verringerte Phytoalexinproduktion (siehe Abbildung 3.5). Je höher die Konzentration von cPTIO, desto geringer ist die Menge der produzierten Phytoalexine, obwohl die Elicitor- bzw. HrpZ1<sub>Psph</sub>-Konzentrationen unverändert bleiben. Bei 100 µM cPTIO wurde die Phytoalexinproduktion um 50% gehemmt, bei 400 µM cPTIO sogar um 70%. Die Wirkung des NO-scavengers deutet auf eine Beteiligung von NO an intrazellulären, elicitorspezifischen Signaltransduktionsprozessen hin. Aufgrund von Vitalitätsuntersuchungen mit FDA und PI konnte ausgeschlossen werden, daß die Anwendung von cPTIO in den Zellsuspensionen zu einem gegenüber unbehandelten Zellkulturen überhöhten Zelltod führt.

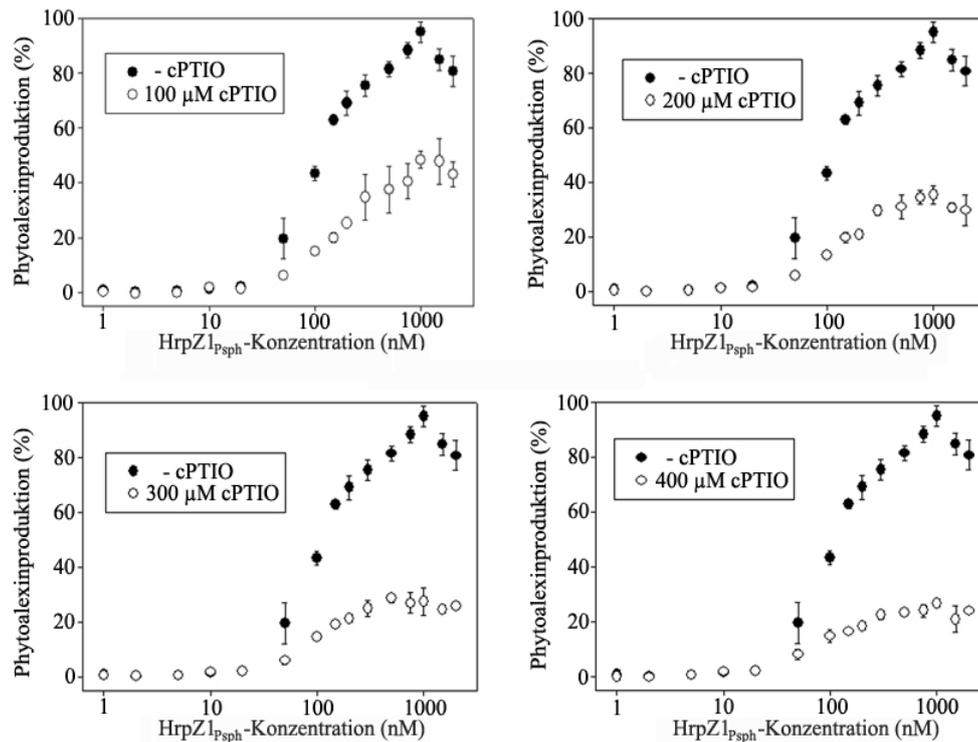


Abb.3.5: Einfluß von cPTIO (NO-scavenger) auf die Dosis-Wirkung-Beziehung von HrpZ1<sub>PspH</sub>-Konzentration und Phytoalexinproduktion. 6 Tage alte Zellen wurden in frischem HA-Medium aufgenommen. Die Petersiliezellen wurden mit cPTIO in den angegebenen Konzentrationen 10 min vor der Elicitierung mit den angegebenen HrpZ1<sub>PspH</sub>-Konzentrationen vorinkubiert. Nach 24 h Inkubation erfolgte die Quantifizierung der Phytoalexine. Dargestellt sind die Standardabweichungen von vier unabhängigen Messungen abzüglich der Vektorkontrollwerte. Die maximale Phytoalexinproduktion, erreicht durch Applikation von 200 nM Pep13, wurde als 100 % definiert.

### 3.1.6 Simultane LPS- und HrpZ1<sub>PspH</sub>-Applikation bewirken eine synergistische Phytoalexinproduktion

Es ist lebenswichtig für alle höheren pflanzlichen und tierischen Organismen, auf eine Attacke durch Pathogene möglichst schnell zu reagieren. Bei einer Infektion kommen die Zellen des Wirtes in engen Kontakt zu molekularen Strukturen des Pathogens. Im tierischen System ist bekannt, daß der Ligand für TLR4, Lipopolysaccharid (LPS) und der Ligand für TLR2, Muramyl-dipeptid (MDP), einen synergistischen Effekt auf die Freisetzung des Tumornekrosefaktors TNF- $\alpha$  ausüben (Beutler *et al.* 2001; Wolfert *et al.* 2002). Von Synergie spricht man, wenn die Wirkung zweier simultan angewandter Effektoren größer ist als die Summe der Einzelwirkungen. Dieser Synergieeffekt bewirkt eine Potenzierung der Abwehrreaktion, obwohl niedrige Konzentrationen verschiedener PAMPs eine schwächere Pathogenpräsenz anzeigen. Auch wenn im pflanzlichen System die Perzeptionsmechanismen von HrpZ1<sub>PspH</sub> und LPS unbekannt sind, stellte sich die Frage, ob bei Anwendung geringer Konzentrationen beider Moleküle ein ähnlich synergistischer Effekt beobachtet werden kann. LPS als Bestandteil der bakteriellen Zellwand ist eines der ersten Moleküle, mit dem die Wirtszelle in Kontakt kommt. Auf der

anderen Seite ist auch HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> aufgrund der Sekretion in den Apoplasten (Roine *et al.* 1997a) ein für die Pflanze relativ früh perzipierbares Molekül.

Eine möglicherweise stattfindende Synergie sollte mittels der Phytoalexinakkumulation im Kulturmedium der Petersiliezellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen mit sehr geringen Konzentrationen von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> sowie LPS aus *Pseudomonas syringae* elicitiert. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  min wurde ein Elicitor appliziert und nach den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Zugabe des 2. Elicitors, beide in einer Konzentration, die für sich alleine kaum eine Phytoalexinproduktion induziert (siehe Abbildung 3.6).

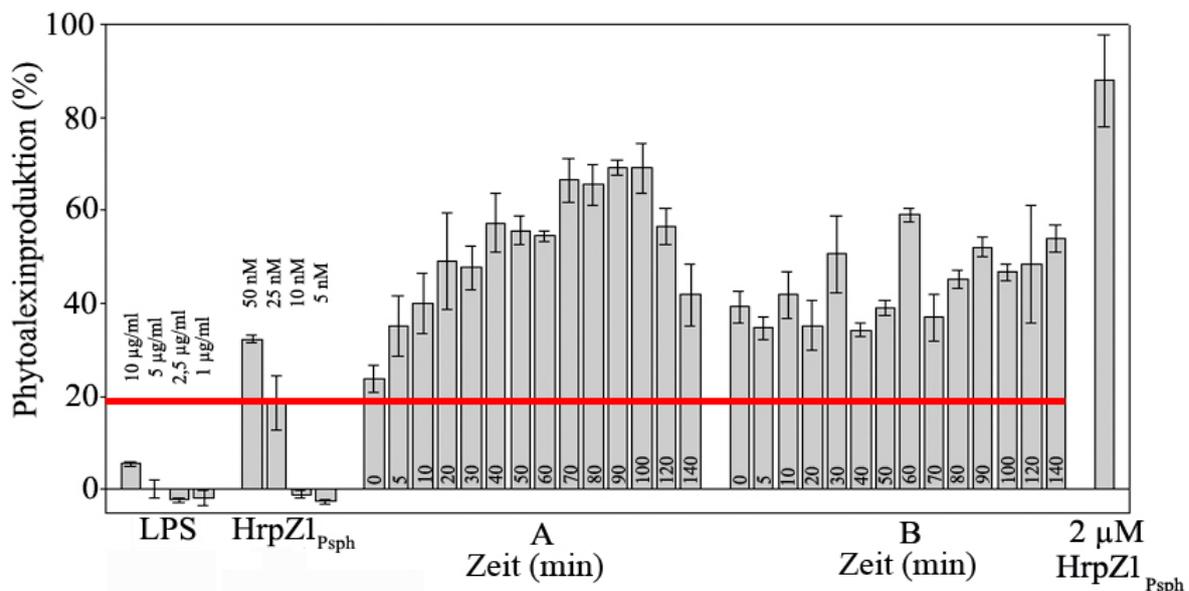


Abb.3.6: Synergistische Phytoalexinproduktion in Petersiliezellkultur nach Applikation von LPS und HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>. 6 Tage alte Zellen wurden in frisches Medium aufgenommen. Nach Zugabe der Elicitoren erfolgte eine 24-stündige Inkubation. In (A) wurden die Zellen zum Zeitpunkt  $t = 0$  min mit 5 µg/ml LPS elicitiert und nach den angegebenen Zeitpunkten  $t = \dots$ min erfolgte die Elicitierung mit 25 nM HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>. In (B) wurden die Zellen zum Zeitpunkt  $t = 0$  min mit 25 nM HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> elicitiert und nach den angegebenen Zeitpunkten  $t = \dots$ min erfolgte die Elicitierung mit 5 µg/ml LPS. Die rote Linie kennzeichnet die Summe der einzelnen Phytoalexinproduktionen (5 µg/ml LPS und 25 nM HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>). Dargestellt sind die Standardabweichungen von vier unabhängigen Messungen. Die maximale Phytoalexinproduktion, erreicht durch Applikation von 200 nM Pep13, wurde als 100 % definiert.

Wie aus der Abbildung deutlich zu entnehmen ist, führt die Elicitierung von Petersiliezellen mit geringen Konzentrationen zweier strukturell völlig verschiedener Moleküle zu einer synergistischen Phytoalexinproduktion, unabhängig davon, in welcher Reihenfolge die Applikation erfolgte. Wurde zuerst 5 µg/ml LPS appliziert und nach den angegebenen Zeitpunkten 25 nM HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>, so scheint der Synergieeffekt mit fortschreitender zeitlicher Distanz der Zugabe beider Elicitoren anzusteigen, bis er den Maximalwert bei ungefähr 90 min HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Zugabe nach LPS-Zugabe erreicht (siehe Abbildung 3.6 A). Dabei ist der Maximalwert ungefähr fast 250 % höher als die Summe der von den beiden Elicitoren in der angewandten Konzentration einzeln induzierten

Phytoalexinmenge (rote Linie in Abbildung 3.6). Dieser Verlauf ist nicht zu beobachten, wenn eine Vorinkubation mit 25 nM HrpZ1<sub>PspH</sub> mit anschließender Zugabe von 5 µg/ml LPS nach den angegebenen Zeitpunkten erfolgte. Trotzdem war eine synergistische Phytoalexinproduktion zu sehen, deren Verlauf bei zunehmender zeitlicher Distanz der Zugabe beider PAMPs sehr schwankte und einen Maximalwert nach 60 min erreichte (siehe Abbildung 3.6 B), der etwa 200 % höher liegt als die Summe der einzeln induzierten Phytoalexinproduktion. Somit sind Pflanzen in der Lage, bei Auftreten von geringsten Konzentrationen mehrerer PAMPs mit einer verstärkten Abwehr zu reagieren, da eine größere Anzahl von unterschiedlichen mikrobiellen Strukturelementen, und sei es auch nur in winzigsten Mengen, eine Pathogenpräsenz anzeigt.

### 3.2 *Bildung von ionenleitenden Poren durch HrpZ1<sub>PspH</sub>*

Die nach HrpZ1<sub>PspH</sub>-Behandlung in den Petersiliezellkulturen stattfindende Mediumalkalisierung verbunden mit der Produktion von Stickstoffoxid und der Aktivierung von MAPK-Kinasen sowie die Synthese antimikrobieller Phytoalexine dokumentieren dessen immunostimulatorische Eigenschaft. Allerdings kann es nicht im Sinne des Bakteriums liegen, daß ein in großen Mengen sekretiertes Protein (Roine *et al.* 1997a) die Existenz des Pathogens preisgibt und dadurch pflanzliche Abwehrreaktionen auslöst. Es muß also eine für den Infektionsprozess relevante Virulenzfunktion besitzen. In früheren elektrophysiologischen Studien mit Hilfe planarer Lipiddoppelschichten konnte gezeigt werden, daß HrpZ1<sub>PspH</sub> eine ionenkanalbildende Aktivität besitzt (Lee *et al.* 2001a). Die in jenen Experimenten genutzte komplizierte Technologie sollte durch einen Assay ersetzt werden, welcher mit geringem Aufwand routinemäßig eingesetzt werden konnte. Verschiedene experimentelle Ansätze wurden daher genutzt, um die durch HrpZ1<sub>PspH</sub> verursachte Ionenporenbildung in synthetischen, aber auch natürlichen Membranen weiter zu untersuchen und zu charakterisieren.

#### 3.2.1 *Assayentwicklung zur Detektion porenbildender Aktivität*

Das Prinzip dieses Test, mit einem Fluoreszenzfarbstoff beladene unilamellare Liposomen, ist in Abbildung 2.7 dargestellt. Da vorausgegangene Studien eine Kationenspezifität der HrpZ1<sub>PspH</sub>-Pore angedeutet hatten (Lee *et al.* 2001b), wurde ein Natrium-sensitiver Farbstoff (Sodium Green<sup>TM</sup>) in die Liposomen verpackt, welche in Natrium-freien Lösungen präpariert wurden. Nach Zugabe von porenbildenden Substanzen und Natrium-Ionen zu Liposomen zeigt ein Anstieg der Fluoreszenz den Einstrom von Natrium-Ionen durch Poren mit anschließender Farbstoffaktivierung an. Die Zugabe von HrpZ1<sub>PspH</sub> führte zu einem raschen Anstieg der Fluoreszenz, wie in der Abbildung 3.7 zu sehen ist. Dabei erfolgt die Fluoreszenzzunahme in einer proteinkonzentrationsabhängigen

Art und Weise. Eine Konzentration von  $0,05 \mu\text{M}$  HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> zeigt innerhalb der ersten Minuten keine Porenbildung an, während nach 6 Minuten ein nur sehr geringer Anstieg der Fluoreszenz zu verzeichnen ist. Erhöht man die Konzentration um das Zehnfache, steigt die Fluoreszenz sehr schnell an und gelangt nach 10 min an ein Plateau. Ein schnelleres Erreichen dieses Plateaus wird auch bei höheren Proteinkonzentrationen nicht erreicht.

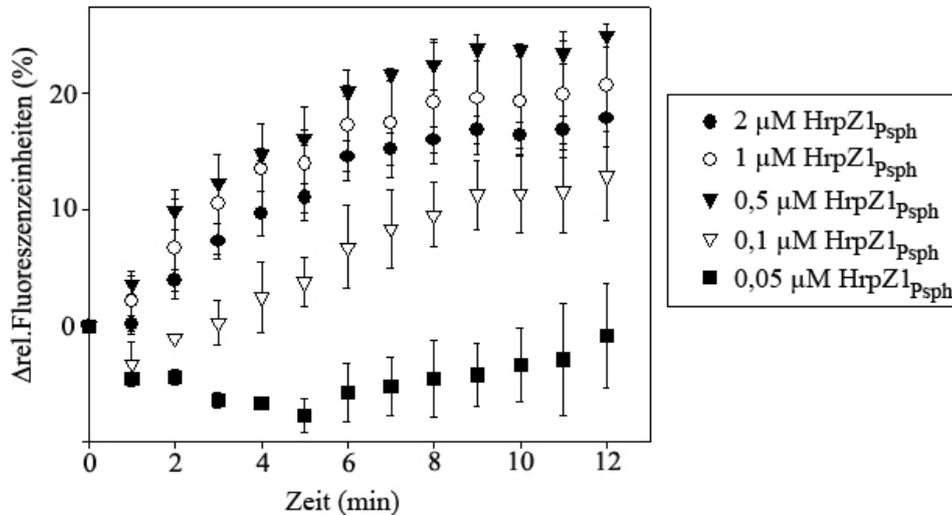


Abb.3.7: Konzentrationsabhängige Ionenporenbildung durch HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> in synthetischen Liposomen. Synthetische, unilamellare Liposomen, beladen mit dem Natrium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Sodium Green<sup>TM</sup>, wurden zusammen mit HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Der Start der Kinetik erfolgte durch Zugabe von Natriumchlorid. Dargestellt sind die Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen. Die Kontrollwerte (Liposomen inkubiert mit einer Proteinpräparation aus *E.coli*, welche mit dem Expressionsvektor transformiert wurden) wurden von den Messdaten abgezogen. Die maximale Fluoreszenz, erreicht durch Lyse der Liposomen mit Triton X-100, wurde als 100 % definiert.

Bei Inkubation der Liposomen mit einer Proteinpräparation aus *E.coli*, welche mit dem Expressionsvektor transformiert wurden, ergab die Zugabe von Natriumchlorid eine Abnahme der Fluoreszenz (siehe Abbildung 3.8). Diese ist möglicherweise auf ein intermolekulares Selbstlöschen der Fluoreszenz des Farbstoffs durch ein Schrumpfen der Liposomen zurückzuführen, hervorgerufen durch die plötzliche Änderung der osmotischen Verhältnisse nach Natriumchloridzugabe. Dieses Ergebnis zeigt jedoch, daß keine ionenporenbildende Kontaminante in der HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-freien *E.coli*-Proteinlösung vorhanden ist. Anhand der Abbildung 3.8 kann man ebenfalls die Ermittlung der Maximalfluoreszenz durch Zugabe von Triton X-100 erkennen, welche in der Lyse der Liposomen und dem Freisetzen des Farbstoffes resultierte. Somit konnte die Integrität der Liposomen während des Experiments verifiziert werden. Der Liposomenassay stellt einen leicht durchführbaren experimentellen Ansatz zur Untersuchung der möglichen Ionenporenbildung von Proteinen oder anderen Substanzen dar. Jedoch ist es mit dem Assay nicht möglich, minimale Unterschiede der Anfangskinetik innerhalb der ersten Mikrosekunden festzustellen, die für die Charakterisierung eines porenbildenden Moleküls massgeblich sind. Darüberhinaus läßt er auch noch keine Aussage über die Porenbildung in natürlichen Membranen zu, da

den Liposomen Bestandteile von solchen Membranen wie Glycolipide und Glykoproteine, aber auch "lipid rafts" (hochgeordnete Lipidbereiche spezifischer Zusammensetzung; Bhat and Panstruga 2005), fehlen.

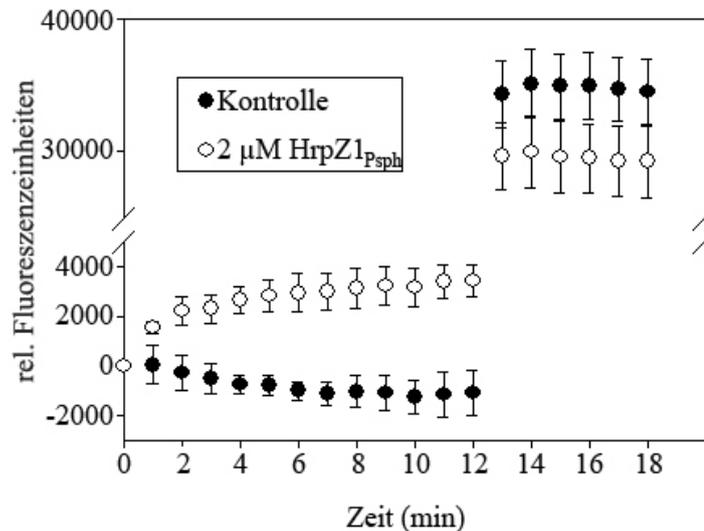


Abb.3.8: Ionenporenbildung durch HrpZ1<sub>Psph</sub> in synthetischen Liposomen. Synthetische, unilamellare Liposomen, beladen mit dem Natrium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Sodium Green<sup>TM</sup>, wurden zusammen mit HrpZ1<sub>Psph</sub> und einer HrpZ1<sub>Psph</sub>-freien *E.coli*-Proteinlösung inkubiert. Der Start der Kinetik erfolgte durch Zugabe von Natriumchlorid. Dargestellt sind die Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen. Die Maximalfluoreszenz der Liposomenlösung wurde nach 12 min durch Zugabe von 10 % Triton X-100 ermittelt.

### 3.2.2 Ionenporenbildung von HrpZ1<sub>Psph</sub> in Eizellen von *Xenopus laevis*

Bislang erfolgten alle Untersuchungen der Ionenporenbildenden Aktivität von HrpZ1<sub>Psph</sub> nur in synthetischen Membranen beziehungsweise in nicht-lebenden Systemen. Für eine Analyse von Änderungen der Membranpermabilität durch porenbildende Moleküle in biologischen Membranen wird z.B. die "Two-Electrode Voltage-Clamp"-Technik in Eizellen des Krallenfrosches *Xenopus laevis* angewandt (Goudet *et al.* 1998; Charnet *et al.* 2003). Diese Versuche wurden mit aufgereinigtem rekombinantem HrpZ1<sub>Psph</sub> durchgeführt (siehe Abbildung 3.9).

Der stationäre Stromfluß einer unbehandelten Eizelle befindet sich zwischen -150 mV und +50 mV auf einem niedrigen Niveau (weiße Dreiecke in Abbildung 3.9). HrpZ1<sub>Psph</sub> hingegen induziert Änderungen des Stromfensters in Abhängigkeit der angelegten Spannung, da exogene makroskopische Ströme nach Proteinzugabe beobachtbar waren (schwarze Quadrate in Abbildung 3.9). Diese Ströme wiesen keinerlei Ähnlichkeiten zu endogenen Strömen von *Xenopus*-Eizellen auf (Weber 1999, Racape *et al.* 2005), daher ist mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, daß es sich um HrpZ1<sub>Psph</sub>-gebildete Poren handelt und nicht um die Stimulierung endogener Ionenkanäle durch HrpZ1<sub>Psph</sub>. Ein weiterer Hinweis für diese Annahme war das Verschwinden dieser exogenen Ströme nach dem Entfernen des Proteins durch Waschen der Eizellen, wonach sie ihre Anfangswerte wiedererlangten (weiße Kreise in Abbildung 3.9). Das

Umkehrpotential der Ströme von etwa -15 mV erinnert an jenes von PopA, einem strukturell ähnlichen Effektor aus *Ralstonia solanacearum* (Racape *et al.* 2005).

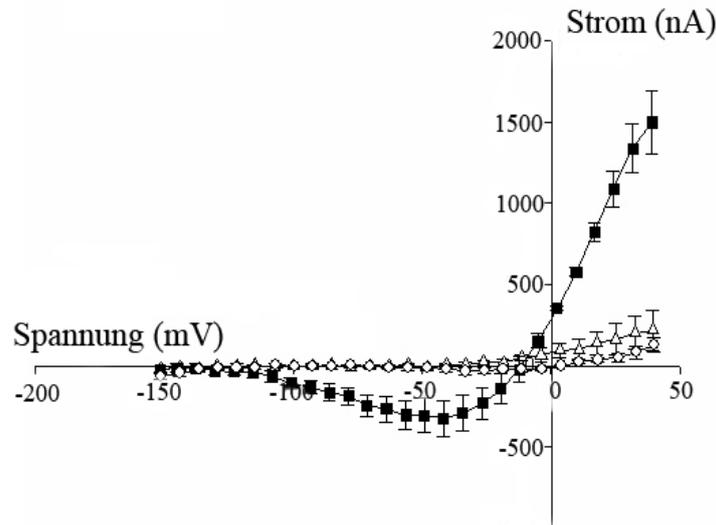


Abb.3.9: Ionenporenbildende Aktivität von HrpZ1<sub>Psph</sub> in Eizellen von *Xenopus laevis* mittels "Two-Electrode Voltage-Clamp"-Technik mit aufgereinigtem rekombinantem Protein. Strom/Spannung-Diagramm von Aufzeichnungen vor Zugabe von 2  $\mu$ M HrpZ1<sub>Psph</sub> (weiße Dreiecke), während der Zugabe von 2  $\mu$ M HrpZ1<sub>Psph</sub> (schwarze Quadrate) und nach Auswaschen von HrpZ1<sub>Psph</sub> (weiße Kreise). Alle Daten zeigen Standardabweichungen von Experimenten mit drei verschiedenen Eizellen.

### 3.2.3 Ionenporenbildung von HrpZ1<sub>Psph</sub> in Asolectin-Liposomen

HrpZ1<sub>Psph</sub> ist in der Lage, in biologischen und damit lebenden Membranen ionenleitende Poren bilden. *Xenopus*-Eizellen als tierisches System lassen aber keine direkten Rückschlüsse zu, ob dies auch in pflanzlichen Membranen gilt. Daher wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, der auf der Nutzung von unilamellaren Asolectin-Liposomen beruht, welche aus einer Mischung von natürlich vorkommenden Sojabohnen-Phospholipiden bestehen. Diese Liposomen waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein gefüllt. Durch Selbstlösen der eingeschlossenen Calceinmoleküle wird eine hohe Fluoreszenz verhindert und erst durch Freisetzung des Calceins, hervorgerufen durch Änderungen der Membranpermeabilität, wird ein Anstieg der Fluoreszenz erreicht. Durchgeführt wurden diese Experimente (siehe Abbildung 3.10) mit aufgereinigtem rekombinantem HrpZ1<sub>Psph</sub>. Wie Abbildung 3.10 verdeutlicht, verursacht die Behandlung dieser Calcein-beladenen Asolectin-Liposomen mit HrpZ1<sub>Psph</sub> eine proteinkonzentrationsabhängige Zunahme der Fluoreszenz durch Freisetzung des Calceins aus den Liposomen. Bei einer Konzentration von 10 nM HrpZ1<sub>Psph</sub> wird 5 % des eingeschlossenen Calceins freigesetzt, d.h. eine Konzentration, bei der noch keine Phytoalexinproduktion beobachtbar ist (siehe Abbildung 3.4), sind Veränderungen der Membranpermeabilität messbar. Die Applikation der Negativkontrolle, bestehend aus der HrpZ1<sub>Psph</sub>-freien Proteinpräparation von *E.coli*, welche mit dem Expressionsvektor transformiert wurden, resultiert im Gegensatz dazu nicht in einer Calceinfreisetzung.

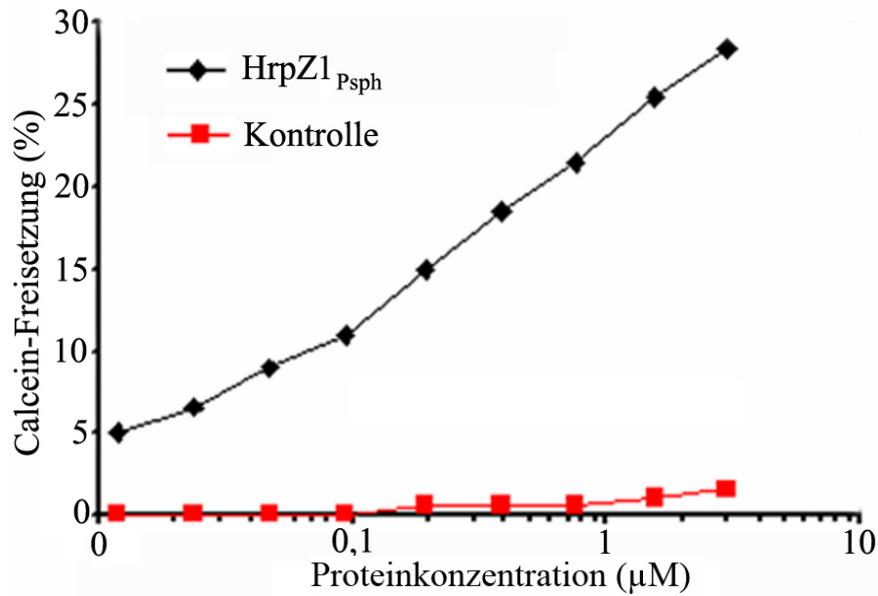


Abb.3.10: Ionenporenbildende Aktivität von HrpZ1<sub>Psph</sub> in Calcein-enthaltenden Asolectin-Liposomen. Die Vesikel wurden mit den Proteinlösungen der angegebenen Konzentrationen versetzt und die Freisetzung des Calceins erfolgte fluoreszenzspektrometrisch.

### 3.3 Abwehraktivierung vs. Porenbildung

Membranaktive Substanzen wie z.B. das Polyantibiotikum Amphotericin B sind in der Lage, Ionenflüsse zu induzieren, die zur Auslösung von pflanzlichen Immunreaktionen führen (Jabs *et al.* 1997; Yang *et al.* 1997; Scheel 1998). Um zu testen, ob die PAMP-Aktivität von HrpZ1<sub>Psph</sub> auf der Fähigkeit beruhte, Ionenporen in Membranen zu bilden wurden, wie in Vorarbeiten beschrieben (Engelhardt 2003), HrpZ1<sub>Psph</sub>-homologe Proteine, HrpZ1<sub>Psph</sub>-Deletionen und HrpZ1<sub>Psph</sub>-Insertionsmutanten hinsichtlich dieser beiden Gesichtspunkte untersucht (siehe Tabelle 3.1). Das Studium der Ionenporenbildung erfolgte unter Zuhilfenahme synthetischer Liposomen (siehe 2.6.3). Anhand der Synthese antimikrobieller Phytoalexine in Petersiliezellensuspensionen (*Petroselinum crispum* L.) wurde die immunostimulatorische Aktivität analysiert.

	Abwehrinduktion in Pflanzen (speziell Petersilie)	Porenbildung in Liposomen (siehe 3.2.1)
HrpZ1 <sub>Psph</sub> -Homologe	nur HrpZ1 <sub>Psph</sub>	aktiv
HrpZ1 <sub>Psph</sub> -Deletionen	nur C-terminales Fragment	inaktiv
HrpZ1 <sub>Psph</sub> -Insertionsmutanten	z.T. reduziert	aktiv

Tab.3.1: Vergleich der Fähigkeiten von HrpZ1<sub>Psph</sub>-Homologen und HrpZ1<sub>Psph</sub>-Mutanten hinsichtlich Abwehrinduktion/Porenbildung.

Strukturell ähnliche Harpine zeigen in ihrer Gesamtheit die Fähigkeit, kationenleitende Poren in synthetischen Liposomen zu bilden, während lediglich das Harpin HrpZ1 aus *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* die Phytoalexinsynthese auslöst. Größere Fragmente des Proteins, die die N-terminalen 85 Aminosäuren, die zentralen 100 Aminosäuren und die C-terminalen 145 Aminosäuren umfassen, sind ionenporenbildungsaktiv, jedoch induziert das C-terminale Fragment pflanzliche Immunreaktionen. Zufällige Insertionen von fünf Aminosäuren im HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Protein verursachen keine Funktionsbeeinträchtigung im Hinblick auf die Ionenporenbildung, jedoch werden einige mutierte Proteine in ihrer Phytoalexininduktionsfähigkeit eingeschränkt. Aufgrund dieser Untersuchungen kann man schlußfolgern, daß es sich bei Ionenporenbildung und der Stimulation pflanzlicher Immunabwehr um zwei voneinander unabhängige Vorgänge handelt., d.h. die Bildung ionenleitender Kanäle in Membranen erklärt nicht die Induktion pflanzlicher Abwehrreaktionen. Darüberhinaus scheint der C-terminale Bereich des Proteins für die Perzeption durch die Pflanze essentielle Strukturmerkmale zu besitzen.

In weiterführenden Studien sollte diese Annahme vertieft werden. Dazu wurden analoge Experimente mit verschiedenen HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Deletionsmutanten ausgeführt. Dabei handelte es sich um Deletionen von etwa 10 - 50 Aminosäuren, welche über das gesamte Protein verteilt waren (siehe Abbildung 3.11).



Abb.3.11: Position der Deletionen von 7 verschiedenen HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Konstrukten (ZΔ1 - ZΔ7). Zahlen markieren deletierte Aminosäurebereiche im 345 Aminosäure-umfassenden HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Gesamtprotein.

Diese Deletionskonstrukte wurden als aufgereinigte rekombinante Proteine im Liposomenassay (siehe 3.2.1) auf ihre Fähigkeit, Poren zu bilden, getestet. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst:

HrpZ1 <sub>P<sub>sph</sub></sub> -Deletionskonstrukt	Ionenporenbildung
ZΔ1	+++
ZΔ2	+++
ZΔ3	+++
ZΔ4	+++/>++
ZΔ5	+++/>++
ZΔ6	+/-
ZΔ7	+++/>++

Tab.3.2: Porenbildungsfähigkeit der HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Deletionskonstrukte ZΔ1 - ZΔ7 im Vergleich zum "full-length Protein" (+++), untersucht mit Hilfe des Liposomenassays (siehe 3.2.1). Dargestellt sind die Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Messungen.

Wie mit diesem Ergebnis gezeigt werden kann, bewirken die Deletionen der Mutanten 1 - 5 und 7 keine Beeinträchtigung im Hinblick auf die Ionenporenbildungsaktivität. Das HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Protein scheint über einen sehr flexiblen Aufbau zu verfügen, der es ihm ermöglicht, Veränderungen der Primärstruktur bis zu einem gewissen Grad ohne Verlust der Ionenporenbildungsfähigkeit zu tolerieren. Lediglich Mutante 6 zeigte ein gegenüber dem "full-length"-Protein beeinträchtigtes Ionenporenbildungsverhalten. Da die Deletion im hydrophoben C-terminalen Bereich zu finden ist, könnte der entfernte Proteinabschnitt eine wichtige Rolle bei der Membranintegration spielen.

Mit Hilfe der Petersiliezellensuspensionskultur wurden alle Deletionskonstrukte im Hinblick auf ihre Fähigkeit, die Phytoalexinbiosynthese zu induzieren, untersucht. Wie die Ergebnisse in Abbildung 3.12 zeigen, weisen nicht alle HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Deletionsproteine das gleiche Phytoalexininduktionspotential auf wie das "full-length"-Protein. Die Mutanten 1 - 5 zeigen keine Beeinträchtigung. Den Mutanten 6 und 7 wurden durch die Deletionen offenbar Bereiche entfernt, die für die Perzeption notwendig sind, da sich die Phytoalexinproduktion nach Applikation mit diesen mutierten Proteinen deutlich unter dem Niveau des "full-length"-HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> befindet. Da die Deletionen der Mutanten 6 und 7 im C-terminalen Bereich des Proteins liegen, stimmt dieses Verhalten mit Resultaten früherer Arbeiten überein (Engelhardt 2003), die zeigen konnten, daß im C-terminalen Bereich das elicitoraktive Motiv zu finden ist (Lee *et al.* 2001a).

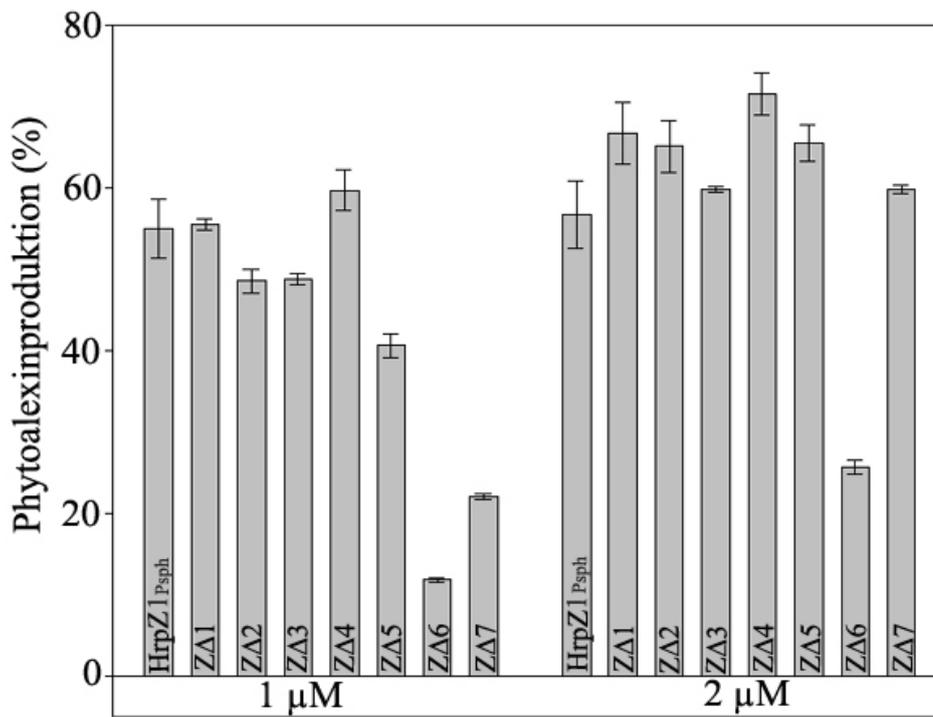


Abb.3.12: Phytoalexinproduktion in Petersilie zellsuspension nach 24 h Behandlung mit HrpZ1<sub>PspH</sub>-Deletionskonstrukten. 6 Tage alte Zellen wurden nach Aufnahme in frischem HA-Medium mit HrpZ1<sub>PspH</sub> bzw. HrpZ1<sub>PspH</sub>-Deletionskonstrukten in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Furanocoumarinakkumulation im Kulturmedium erfolgte fluorenszenzspektrometrisch nach 24 h Inkubation. Dargestellt sind die Standardabweichungen von mindestens vier unabhängigen Messungen abzüglich der Vektorkontrollwerte. Die maximale Phytoalexinproduktion, erreicht durch Applikation von 200 nM Pep13, wurde als 100 % definiert.

### 3.4 Studien zur Oligomerisierung von HrpZ1<sub>PspH</sub>

Die vorangegangenen Experimente dokumentieren die duale Rolle des HrpZ1<sub>PspH</sub>-Proteins während des Infektionsprozesses, welche sich einerseits in der Fähigkeit zur Bildung ionenleitender Poren und auf der anderen Seite in der immunostimulatorischen Aktivität äußert. Beide Proteineigenschaften können strukturell separiert werden. Versuche mit HrpZ1<sub>PspH</sub>-Mutanten legen die Vermutung nahe, daß die strukturellen Ansprüche für die Porenbildung eher gering sind, was geringere Veränderungen der Primärstruktur angeht, wohingegen eine Region nahe des C-Terminus für die Induktion pflanzlicher Abwehrreaktionen ausreicht. Die Fähigkeit zur Einlagerung in Lipiddoppelmembranen und die dort durch HrpZ1<sub>PspH</sub> vermittelte Bildung ionenleitender Kanäle stellt vermutlich die Virulenzfunktion des Proteins dar. *In planta*-Expressionsversuche lassen eine Funktion in der Wirtsplasmamembran vermuten, da lediglich extrazellulär vorhandenes HrpZ1<sub>PspH</sub> im Gegensatz zu im Wirtszytosol akkumulierendes Protein in der Lage ist, pflanzliche Immunreaktionen auszulösen (Tampakaki and Panopoulos 2000). Bestimmte bakterielle porenbildende Toxine treten als höhere Oligomere auf (Parker and Feil 2005; Eifler *et al.* 2006). Ferner wird der in der Membran tierischer Zellen gebildete *Yersinia*-Typ-III-

Translokationskomplex durch mehrere Proteine, YopB, YopD und LcrV, gebildet (Mueller *et al.* 2005; Mota and Cornelis 2005, Goure *et al.* 2005). Es ist daher möglich, daß auch HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> einen für den Infektionsprozess wichtigen membranassoziierten Homo- oder Hetero-Komplex bildet. Aus diesem Grund sollte die Oligomerisierungsfähigkeit des HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Proteins näher studiert werden.

### 3.4.1 Untersuchung der HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Oligomerstabilität

Im Anschluß an die Aufreinigung von rekombinantem HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> zeigte sich nach Auftrennung im SDS-Gel generell eine zusätzliche Bande bei ca. 80 kDa. Verstärkte man die denaturierenden Bedingungen durch Erhöhung der Inkubationszeit der Proben bei 95°C vor dem Auftragen auf das Gel im SDS- und β-Mercaptoethanol-enthaltenden Ladepuffer, so führte dies nicht zu einem Verschwinden der Bande (siehe Abbildung 3.13). Durch massenspektrometrische Prüfung sowie Western-Analyse mit einem anti-HrpZ1-Antikörper konnte diese Bande als HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Oligomer identifiziert werden. Entsprechend der Größe der Bande würde es sich hierbei um ein Dimer handeln, da das HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Monomer bei einer Größe von 35,2 kDa ein im SDS-Gel aberrantes Laufverhalten zeigt und als 42 kDa-Bande auftritt.

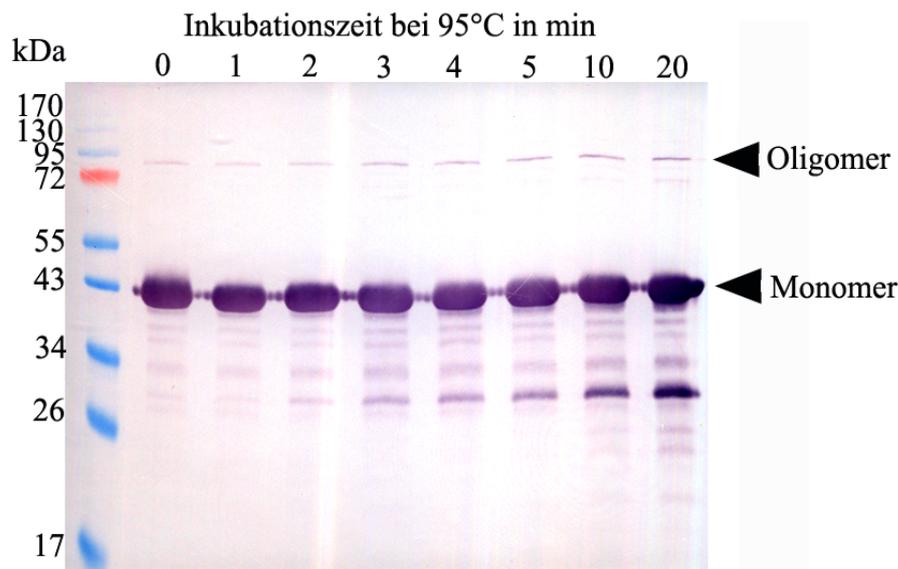


Abb.3.13: Einfluß der Inkubationszeit bei 95°C auf die HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Oligomerstabilität. 5 µg Protein wurden im SDS-Probenpuffer (enthält SDS und β-Mercaptoethanol) für die angegebene Dauer bei 95°C inkubiert und auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Detektion mittels anti-HrpZ1-Antikörper als primärem Antikörper sowie anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt) als sekundärem Antikörper. Die Größe der Molekulargewichtsmarker ist links vom Gel angegeben.

Aufgrund fehlender Cysteinreste im HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Protein werden diese Oligomere höchstwahrscheinlich nicht kovalent stabilisiert, sondern durch andere intermolekulare Wechselwirkungen, die erstaunlich Detergenz- und Hitze-resistent sind. Auffallend ist, daß

bei zunehmender Dauer der Inkubation bei 95°C die Intensität der Fragmentbanden (Banden kleiner als 42 kDa) durch Abbauprozesse deutlich zunimmt, während das Oligomer offensichtlich erhalten bleibt. Die Beständigkeit dieser Oligomerbande kann ein Indiz für die Hitzestabilität von Harpinen (He *et al.* 1993) sein. Es lassen sich aber keine Aussagen darüber machen, in welchem Verhältnis Monomer und Oligomer zueinander in Lösung vorliegen, da davon ausgegangen werden muß, daß ein gewisser Anteil der Oligomere unter den gegebenen Trennbedingungen zu Monomeren zerfällt.

Um die Fähigkeit des HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Proteins, in Lösung Homooligomere zu bilden, näher zu analysieren, wurde der chemische Crosslinker BS<sup>3</sup> zur Stabilisierung der Oligomere genutzt. Desweiteren sollte festgestellt werden, ob auch höhermolekulare Komplexe gebildet werden. BS<sup>3</sup>, ein wasserlöslicher, homobifunktionaler N-Hydroxysuccinimidester (siehe Abbildung 2.4), verknüpft kovalent inter- und intramolekulare primäre Amine, wie sie am N-Terminus oder in Lysinseitenketten von Proteinen anzutreffen sind. Dabei erfolgt diese Verknüpfung nicht wahllos mit sämtlichen in Lösung befindlichen Molekülen, sondern nur mit Proteinbereichen, die von vornherein in enger räumlicher Nähe vorliegen, wie sie intramolekular aufgrund einer speziellen Faltung oder intermolekular bei Protein-Protein-Interaktionen anzutreffen sind. Da das Crosslinking häufig quantitativ unvollständig ist, wird das Abschätzen des Mengenverhältnis verschiedener Oligomerspezies zueinander allerdings schwierig.

2 µg rekombinantes und affinitätschromatographisch aufgereinigtes HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> wurde für eine Stunde mit dem Crosslinker inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Immunoblot (mit anti-HrpZ1-Antikörper als primärer Antikörper) analysiert. Aus Unterschieden zwischen BS<sup>3</sup>-behandelten und unbehandelten Proteinproben, wie in Abbildung 3.14 dargestellt, kann geschlossen werden, daß in Lösung deutlich mehr Protein in oligomerer Form vorliegt als Abbildung 3.13 dokumentiert. Während ohne Crosslinker nur ein verschwindend geringer Teil der Oligomere bei denaturierenden Bedingungen erfasst werden kann, zeigen sich 2 relativ starke Banden nach Behandlung mit BS<sup>3</sup>, welche anhand des Vergleichs mit den Markerproteinen (siehe Abbildung 3.14B) sowie nach Berücksichtigung des aberranten Laufverhalten des Proteins einem HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Dimer sowie HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Trimer entsprechen. Die Intensität der Monomerbande ändert sich trotz Behandlung mit dem Crosslinker nicht. Variationen der Protein- als auch der Crosslinkerkonzentration ergaben keine Änderung der Bandenintensitätsverhältnisse (nicht dargestellt). In der Abbildung 3.14 zeigt sich ohne Crosslinker eine im Vergleich zu Abbildung 3.13 schwächere Dimerbande, die aber durch eine im Experiment eingesetzte geringere Proteinmenge zu erklären ist.

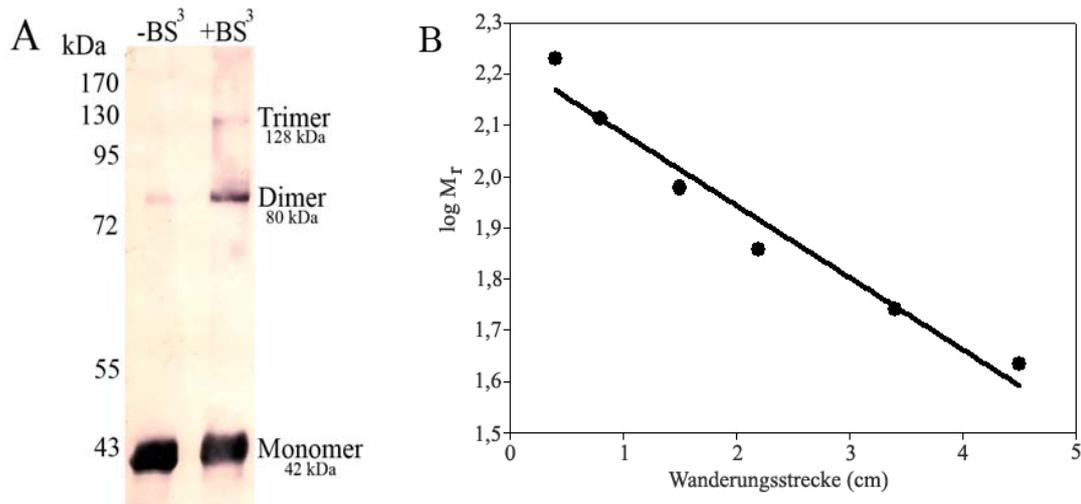


Abb.3.14: Stabilisierung der HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Oligomere durch den chemischen Crosslinker BS<sup>3</sup>. A) 2 µg Protein wurden für 60 min bei Raumtemperatur ohne (-BS<sup>3</sup>) und mit (+BS<sup>3</sup>) 3 mM Crosslinker inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE (10%) und anschließendem Immunoblot mit anti-HrpZ1-Antikörper als primärem und anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase) als sekundärem Antikörper. Die Größe der Molekulargewichtsmarker ist links vom Gel angegeben. Die Ermittlung der Molekulargewichte der einzelnen Oligomere erfolgte anhand der in B) dargestellten Graphik durch Auftragen der dekadischen Logarithmen der einzelnen Molekulargewichtsmarker aus A) gegen ihre jeweilige Wanderungsstrecke.

### 3.4.2 Einfluß von Calcium auf die HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Oligomerstabilität

#### 3.4.2.1 Untersuchung der Calcium-Bindung von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>

Für lipidbindende Proteine ist Calcium oftmals z.B. für eine korrekte Faltung notwendig (Creutz *et al.* 1998; Gerke and Moss 2002). Da die Calciumkonzentration im pflanzlichen Apoplasten hoch ist und HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> in den apoplastidären Raum sekretiert wird (Roine *et al.* 1997a; Tampakaki and Panopoulos 2000), besteht die Möglichkeit, daß Calcium die HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Lipidintegration und anschließende Porenbildung beeinflusst. Die Calciumbindung durch das HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-homologe Protein PopA aus *Ralstonia solanacearum*, welches ähnliche Membranporen wie HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> bildet, konnte durch Racape *et al.* 2005 gezeigt werden. Um festzustellen, ob HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> über ähnliche Calciumbindende Eigenschaften verfügt, wurde ein <sup>45</sup>Calcium-Überlagerungs-Test durchgeführt. Darüberhinaus sollten calciumbindende Regionen innerhalb des Proteins lokalisiert werden. Deshalb wurde dieses Experiment auch mit den Deletionskonstrukten aus Abbildung 3.11 ausgeführt. Jeweils 2 µg aufgereinigtes rekombinantes Protein wurden im Anschluß an eine 10 %ige SDS-PAGE auf Nitrocellulose- bzw. PVDF-Membran transferiert. Der Transfer wurde durch anschließende Ponceau S-Färbung überprüft. Im Anschluß erfolgte als Kontrolle der Immunoblot bzw. der Calcium-Überlagerungs-Test. Als Negativkontrolle wurde BSA eingesetzt, welches Calcium nicht bindet. In Abbildung 3.15 ist klar zu erkennen, daß HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> die Fähigkeit besitzt, Calcium zu binden. Die Gesamtheit der Deletionsproteine besitzt ebenso mehr oder weniger diese Eigenschaft,

jedoch unterscheiden sie sich quantitativ. Die Mutanten 2 und 3 zeigen, verglichen mit dem "full-length"-Protein eine etwas schwächere Bandenintensität. Trotzdem die Deletionen nahezu das gesamte Protein abdecken, gibt es keine Mutante, die durch einen kompletten Verlust der Calcium-Bindungsfähigkeit gekennzeichnet ist. Daraus läßt sich schließen, daß es mehrere Calcium-Bindestellen im HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Protein gibt, von denen eine durch die Deletion in den Mutanten 2 und 3 entfernt wurde. Die Negativkontrolle BSA beweist, daß in diesem experimentellen Ansatz nicht jedes Protein die Fähigkeit hat, Calcium zu binden.

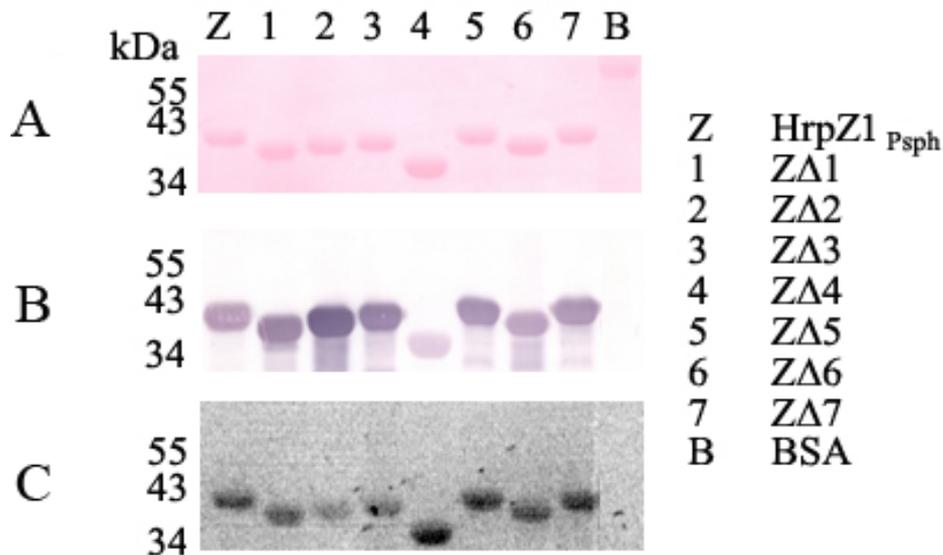


Abb.3.15: <sup>45</sup>Calcium-Bindung durch HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>. Jeweils 2 µg Protein wurden nach einer 10 %igen SDS-PAGE auf Nitrocellulosemembran transferriert, wobei der Erfolg mittels Ponceau S (A) überprüft wurde. B) Die Analyse erfolgte anschließend durch Immunoblot (Detektion mit primärem anti-HrpZ1-Antikörper und sekundärem Alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG-Antikörper) bzw. C) durch <sup>45</sup>Calcium-Überlagerungs-Test (20-minütige Inkubation in Überlagerungspuffer, welcher 20 µl <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> (37 MBq / L, 1 mCi, Amersham Biosciences) enthielt; die Endkonzentration an Ca<sup>2+</sup> lag etwa bei 0,2 µg/ml), wobei die Detektion mittels Belichtung eines PhosphoImager-Screens erfolgte. Die Größe der Molekulargewichtsmarker ist links vom Gel angegeben.

### 3.4.2.2 Einfluß von Calcium auf die HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Oligomerstabilität

Da HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> über Calcium-bindende Fähigkeiten verfügt und es nicht nur eine Calcium-bindende Region im Protein zu geben scheint, lag es nahe zu testen, inwiefern Calcium die Bildung von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Oligomeren begünstigt. Diese Oligomerstabilisierung durch Ca<sup>2+</sup> konnte für PopA, einem strukturell ähnlichen Protein aus *Ralstonia solanacearum*, bereits gezeigt werden (Racape *et al.* 2005). Um diesen Ca<sup>2+</sup>-Einfluß zu untersuchen, wurde HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> vor Zugabe des Crosslinkers BS<sup>3</sup> mit steigenden Konzentrationen von Calciumchlorid vorinkubiert. Außerdem wurde durch Nutzung des Calciumchelators EGTA der Einfluß von Calciumspuren im Puffer analysiert. Im Anschluß an eine 10 %ige SDS-PAGE und dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Detektion von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> mittels spezifischem anti-HrpZ1-Antikörper.

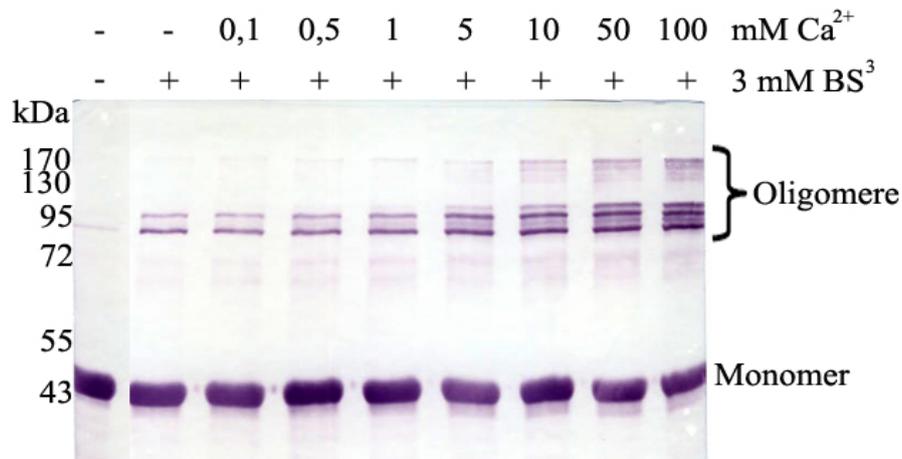


Abb.3.16a: Einfluß von Calcium auf die HrpZ1<sub>PspH</sub>-Oligomerstabilität. Jeweils 5 µg Protein wurde eine Stunde vor der 60minütigen Inkubation mit 3 mM Crosslinker BS<sup>3</sup> mit den angegebenen Konzentrationen Ca<sup>2+</sup> (als CaCl<sub>2</sub>) vorinkubiert. Im Anschluß an eine 10 %ige SDS-PAGE und dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Detektion mit primärem anti-HrpZ1-Antikörper und sekundärem anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (gekoppelt an Alkalische Phosphatase). Die Größe der Molekulargewichtsmarker ist links vom Gel angegeben.

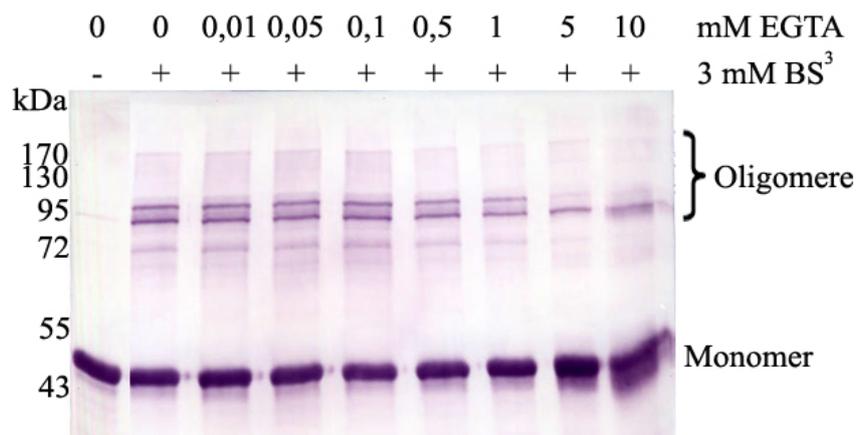


Abb.3.16b: Einfluß von Calcium auf die HrpZ1<sub>PspH</sub>-Oligomerstabilität. Jeweils 5 µg Protein wurde eine Stunde vor der 60minütigen Inkubation mit 3 mM Crosslinker BS<sup>3</sup> mit den angegebenen Konzentrationen EGTA vorinkubiert. Im Anschluß an eine 10 %ige SDS-PAGE und dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Detektion mit primärem anti-HrpZ1-Antikörper und sekundärem anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (gekoppelt an Alkalische Phosphatase). Die Größe der Molekulargewichtsmarker ist links vom Gel angegeben.

Wie der Abbildung 3.16a zu entnehmen ist, nimmt die Intensität der HrpZ1<sub>PspH</sub>-Oligomerbandenstärke mit zunehmenden Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen zu, woraus zu schließen ist, daß erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen die Bildung von HrpZ1<sub>PspH</sub>-Oligomeren begünstigen. Dabei scheint der Konzentrationsschwellenwert, ab der es zu einer detektierbaren Stabilisierung kommt, bei etwa 1 mM Ca<sup>2+</sup> angesiedelt zu sein. Dieses Ergebnis unterstützend zeigt auch die Abbildung 3.16b, bei der mit zunehmenden EGTA-Konzentrationen die Oligomerbandenstärke deutlich abnimmt. Eine merkliche Destabilisierung der Oligomere erfolgt bei 0,5 mM EGTA, jedoch scheinen nur höherwertige Oligomere eine Calcium-abhängige Stabilität aufzuweisen, da eine bei etwa

80 kDa vorhandene Bande die Intensität auch bei höchsten EGTA-Konzentrationen nicht einbüsst. Darüberhinaus ist diese Bande bereits bei  $\text{Ca}^{2+}$ -unbehandelten Proben detektierbar (siehe auch Abbildung 3.13). Die Ergebnisse zeigen, daß die HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Oligomerbildung von Calcium begünstigt wird, aber zumindest die Dimerbildung nicht von Calcium abhängig ist.

### 3.4.3 Untersuchung der HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Oligomerisierung mittels Gelfiltration

Gelfiltrationen sind für eine exakte Bestimmung der Molekulargewichte von Proteinen bzw. Proteinkomplexen durch Vergleich mit Retentionszeiten oder Retentionsvolumen von Markerproteinen geeignet. Die Gelfiltration von rekombinant aufgereinigtem HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> sollte Aufschluß geben über möglicherweise dominant auftretende Oligomere, das native Molekulargewicht der auftretenden Oligomere sowie deren Stabilität. 250 µg aufgereinigtes, rekombinantes Protein wurden jeweils mit einer Flussrate von 0,3 ml / min auf eine vorher mit MES/NaCl (5 mM MES pH 5,5; 150 mM NaCl) äquilibrierte Superdex 200- und Superdex 75-Säule aufgetragen, wobei die Säulen unterschiedliche Auftrennungskapazitäten haben (Superdex 75 trennt in einem Bereich zwischen 3 und 70 kDa, Superdex 200 in einem Bereich zwischen 10 und 600).

Betrachtet man das Elutionsprofil nach einem Lauf über die Superdex 200 (siehe Abbildung 3.17 A), so sind zwei Peaks erkennbar, die bei Vergleich mit den Retentionsvolumen der Markerproteine einem Molekulargewicht von etwa 650 kDa und 70 kDa und damit einem 18mer bzw. einem Dimer entsprechen. HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> scheint demnach in Lösung in der Mehrheit als Dimer vorzuliegen und zu einem geringen Teil als höherwertiges Oligomer. Allerdings erscheint der erste Peak unmittelbar nach dem Totvolumen, so daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß die Größe dieses Komplexes um einiges höher ist als die ermittelten 650 kDa, was bei unspezifischen Proteinaggregationen zutreffen würde. Durch eine Immunoblotanalyse aufgefangener Fraktionen konnte bestätigt werden, daß beide Peaks auf HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> zurückzuführen sind. Aufgrund des doch sehr breiten 70 kDa-Peaks läßt es sich nicht ausschließen, daß auch HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Tetramere in Lösung vorhanden sein können. Um nun zu untersuchen, ob die Homooligomere stabil sind oder in einem Gleichgewicht stehen, wurden Dimerfraktionen (die etwa bei 70 kDa eluiert wurden) erneut aufgetragen (siehe Abbildung 3.17 B). Da die Proteinmenge bedeutend geringer war, war auch die Absorption reduziert, was sich in einer kleineren Peakhöhe niederschlug. Der beim ersten Lauf detektierte Peak bei 650 kDa war im Gegensatz zum 70 kDa-Peak nicht mehr nachweisbar. Die Schlußfolgerung, daß das HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Dimer stabil ist und nicht im Gleichgewicht mit höherwertigen Oligomeren steht, kann aufgrund der geringen Proteinkonzentration nicht gezogen werden. Die eventuell gebildeten Oligomere befinden sich möglicherweise unterhalb der Detektionsgrenze. Jedoch sind auch hier keine HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Monomere detektierbar, was die Dimerstabilität belegt. Das konnte auch durch eine Immunoblotanalyse der gesammelten Fraktionen nachgewiesen werden.

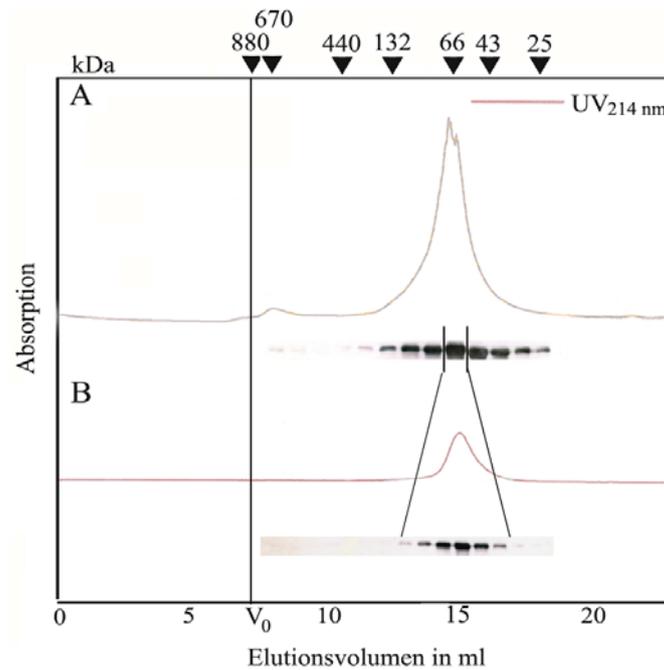


Abb.3.17: Elutionsprofil von HrpZ1<sub>PspH</sub> nach einem Gelfiltrationslauf über eine Superdex 200. A) 250 µg aufgereinigtes rekombinantes Protein wurde auf die Säule aufgetragen (mit Laufpuffer 5 mM MES pH 5,5; 150 mM NaCl) und bei einer Flußrate von 0,3 ml /min aufgetrennt. Die Detektion erfolgte bei 214 nm. Das Eluat wurde in 250 µl-Fractionen gesammelt. In B) erfolgte die Auftragung von drei vereinigten Fractionen aus A) (aufeinanderfolgende Fractionen bei etwa 70 kDa-Elution) bei gleichen Laufbedingungen. Die Immunoblotanalyse der Fractionen wurde nach 10 %iger SDS-PAGE und Transfer auf Nitrocellulose mit primärem anti-HrpZ1-Antikörper und sekundärem anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (gekoppelt an Alkalische Phosphatase) durchgeführt. Pfeile am oberen Bildrand markieren Retentionsvolumen der Markerproteine (siehe 2.5.7).  $V_0$ , Totvolumen.

Um in einem weiteren Experiment zu untersuchen, ob neben HrpZ1<sub>PspH</sub>-Dimere auch Monomere vorkommen, wurde ebenfalls ein Lauf über eine Superdex 75 durchgeführt (siehe Abbildung 3.18), da die Möglicheit bestand, daß die Trennschärfe einer Superdex 200-Säule im Bereich des Dimerpeaks nicht gegeben war. Da diese Säule Proteine größer als 70 kDa nicht mehr auftrennen kann, eluierten die höherwertigen Oligomere unmittelbar nach dem Totvolumen, weswegen eine Aussage über die Häufigkeitsverteilung der Oligomere mit dieser Säule nicht möglich war. Wie man deutlich erkennt, ist nur ein Peak detektierbar, der ebenfalls bei etwa 70 kDa eluiert und einem HrpZ1<sub>PspH</sub>-Dimer entspricht. Ein Peak bei dem Monomerelutionsvolumen von 35 kDa ist nicht detektierbar, was den Schluß zuläßt, daß HrpZ1<sub>PspH</sub> in Lösung zum größten Teil Dimere und in geringerem Ausmaß, höherwertige Oligomere bildet.

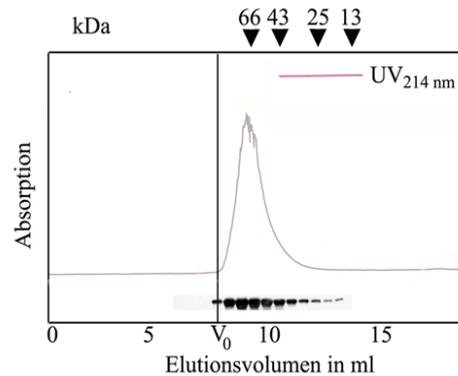


Abb.3.18: Elutionsprofil von HrpZ1<sub>Psph</sub> nach einem Gelfiltrationslauf über eine Superdex 75. 250 µg aufgereinigtes rekombinantes Protein wurde auf die Säule aufgetragen (mit Laufpuffer 5 mM MES pH 5,5; 150 mM NaCl) und bei einer Flußrate von 0,3 ml /min aufgetrennt. Die Detektion erfolgte bei 214 nm. Das Eluat wurde in 250 µl-Fractionen gesammelt. Die Immunoblotanalyse der Fractionen wurde nach 10 %iger SDS-PAGE und Transfer auf Nitrocellulose mit primärem anti-HrpZ1-Antikörper und sekundärem anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (gekoppelt an Alkalische Phosphatase) durchgeführt. Pfeile am oberen Bildrand markieren Retentionsvolumen der Markerproteine (siehe 2.5.7).  $V_0$ , Totvolumen.

Für das porenbildende Cytotoxin ClyA aus *Escherichia coli* konnte eine Detergenz-induzierte Oligomerisierung nachgewiesen werden (Eifler *et al.* 2006). Monomeres ClyA inseriert in einer Detergenzmizelle und aggregiert über verschiedene Intermediate mit zunehmender Dauer der Detergenzexposition zu einem definierten oligomeren Komplex. Daher sollte untersucht werden, inwiefern auch HrpZ1<sub>Psph</sub> in der Lage ist, mit zunehmender Inkubationszeit in einem Detergenz die vorherrschende Dimerform zu verlieren und höhere Oligomere zu stabilisieren. Zu diesem Zweck wurden 250 µg Protein bei 15°C für 0 min, 2 min, 10 min, 20 min und 2 h mit 1 % Detergenz (Octyl-β-D-glucopyranosid) inkubiert und anschließend auf die Superdex 200 aufgetragen. Allerdings zeigte sich keine Peakverschiebung zu höheren Oligomeren (nicht gezeigt). Das Elutionsprofil nach den angegebenen Inkubationszeiten war identisch mit dem Profil, welches von HrpZ1<sub>Psph</sub> in Lösung ohne Detergenz erhalten wurde (siehe Abbildung 3.17 A), möglicherweise hervorgerufen durch Milieuänderung bei Eintritt in die wäßrige Phase der Säule.

#### 3.4.4 Untersuchung der HrpZ1<sub>Psph</sub>-Oligomerisierung mittels BlueNative-PAGE

Die bisherigen Resultate verdeutlichen die Fähigkeit von HrpZ1<sub>Psph</sub>, Oligomere in Lösung zu bilden. Um genauere Aussagen über die native HrpZ1<sub>Psph</sub>-Homooligomerisierung in hydrophober, membranähnlicher Umgebung bzw. Aussagen über das Auftreten höherer Oligomere und deren Mengenverhältnis zueinander treffen zu können, wurde die Technik der BlueNative-PAGE angewandt. Dieses Protokoll der BlueNative-PAGE wurde ursprünglich von Schägger und von Jagow entwickelt, um die Komplexe der Atmungskette in den Mitochondrien zu analysieren (Schägger and von Jagow 1991; Schägger *et al.* 1994) und ist besonders geeignet für die native Analyse von

membrangebundenen Proteinen. Lösliche Proteine können jedoch ebenfalls mit dieser Elektrophorese gut aufgelöst werden. Das Prinzip der BlueNative-Elektrophorese ist das Ersetzen des proteingebundenen Detergenz (im Lösungspuffer, als Membranersatz, siehe 2.5.5) durch den negativ geladenen Coomassie-Farbstoff, wobei der Proteinkomplex dadurch nach außen negativ geladen wird. Der Komplex liegt zwar nicht mehr in einer Detergenzmizelle vor, bleibt aber gelöst. So kann man durch Vergleich mit Markerproteinen das Molekulargewicht des Membranproteinkomplexes abschätzen. Die BlueNative-Elektrophorese wurde in einem 6 - 16,5 %igen Gradientengel durchgeführt. Da es sich um die Untersuchung nativer Proteinkomplexe handelt, wurde eine Hitzedenaturierung bei 95°C nicht durchgeführt. Nur als Kontrolle wurde eine Probe 5 min bei 95°C inkubiert. Die Abbildung 3.19 zeigt, daß HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> in einem Digitonin-enthaltenden Lösungspuffer eine Reihe von Oligomeren bildet, von denen, den Größen der Markerproteine Ferritin, Thyroglobulin und BSA entsprechend, das Dimer und Tetramer die mengenmäßig größte Fraktion bilden (zwischen Markergrößen 66 und 132). Daneben treten aber auch das Monomer (Bande bei einer Größe geringer als 66 kDa) und höherwertige Oligomere auf, die einem Hexa- bzw. Oktamer entsprechen würden. Ihre Bandenintensität ist aber deutlich schwächer. Reduziert sich die aufgetragene Proteinmenge, zeigt sich übereinstimmend zu Ergebnissen der Gelfiltration (siehe 3.4.3), daß höchstwahrscheinlich das Dimer die vorherrschende Oligomerform darstellt (Bahn 6). Leider weist HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> ein sehr verschmiertes Laufverhalten auf, welches auch durch Detergenzänderung (siehe Abbildung 3.20) im Laufpuffer nicht vermieden werden kann und eine eindeutige Identifizierung der Oligomerbandengröße erschwert. Darüberhinaus weist das HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Dimer, wenn es laut den Gelfiltrationsresultaten aus 3.4.3 das vorwiegend vorhandene Oligomer ist, ein entsprechend seiner Größe (etwa 70 kDa) verändertes Laufverhalten auf (unterhalb 66 kDa), wenn Digitonin im Probenpuffer durch andere Detergenzien ersetzt wird (siehe Abbildung 3.20). Diese Veränderung der Probenpufferbedingungen könnte aber auch eine Dimerisierung behindern, so daß die in Abbildung 3.20 beobachtbare Bande ein HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Monomer darstellt. Interessanterweise verhindert eine Vorinkubation bei 95°C lediglich, daß sich höherwertige Oligomere bilden (siehe Bahn 1 in Abbildung 3.19). Die Intensität des Dimer- bis Tetramerbandenbereichs zeigt sich unverändert. Es ist allerdings möglich, daß sich höherwertige Oligomere nach der Hitzebehandlung wieder bilden. Schlußfolgernd bleibt festzuhalten, daß die Tendenz, HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Homooligomere zu bilden, in Lösung, aber auch in lipophiler Umgebung, sehr groß ist. Diese Oligomere sind, zumindest bis zu der Größe eines Tetramers, äußerst stabil.

In der Bahn 2 der Abbildung 3.19 erkennt man eine Bande, die einer Größe von über 880 kDa entsprechen müsste. Ob es sich dabei um einen nativen Komplex handelt oder um unspezifische Proteinaggregationen, ist nicht feststellbar. Diese Bande ist auch nach dem Detergenzaustausch des Laufpuffers noch detektierbar (Bahn 1 in Abbildung 3.20) und könnte für den in der Gelfiltration detektierten 650 kDa-Peak (siehe Abbildung 3.17) verantwortlich sein.

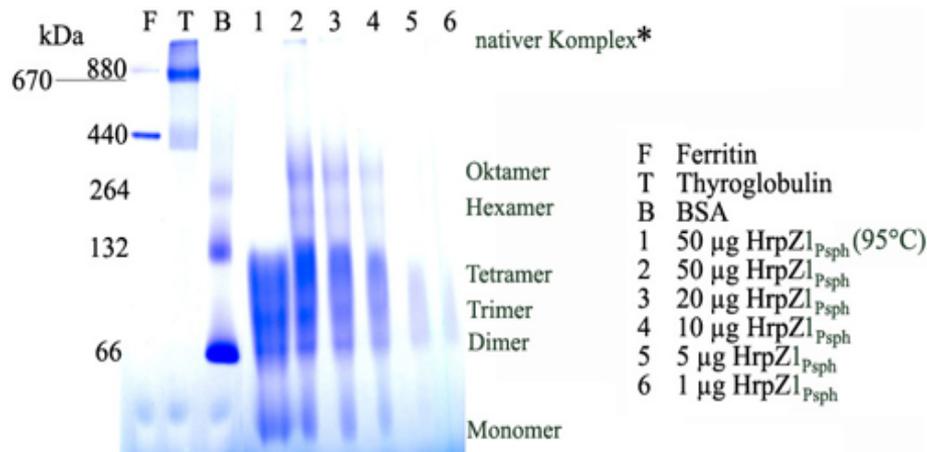


Abb. 3.19: Untersuchung der HrpZ1<sub>Psph</sub>-Homooligomerisierung in lipophilem Milieu (Digitonin) mittels BlueNative-PAGE. Aufgereinigtes, rekombinantes HrpZ1<sub>Psph</sub> wurde mit Lösungspuffer (enthält Digitonin) vorinkubiert und, wenn angegeben, vor dem Auftragen auf ein 6 - 16,5 %iges Gradientengel, einer 95°C-Hitzebehandlung für 5 min unterworfen. Coomassie-enthaltender Kathodenpuffer wurde nach Hälfte des Laufs gegen farbstofffreien Kathodenpuffer ausgetauscht. Nach dem Lauf erfolgte die Entfärbung mit 5 % Essigsäure. Die Größe der Molekulargewichtsmarker ist links vom Gel angegeben: 880 kDa - Ferritindimer, 670 kDa - Thyroglobulin, 440 kDa - Ferritinmonomer, 264 kDa - BSA-Tetramer, 132 kDa - BSA-Dimer, 66 kDa - BSA-Monomer. \*nicht eindeutig verifizierbar.

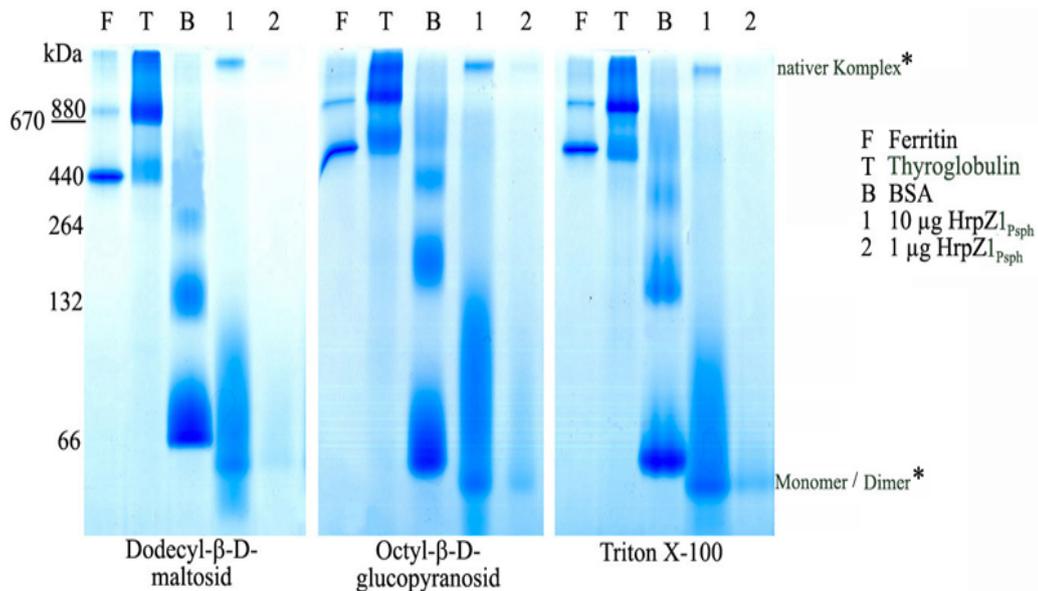


Abb. 3.20: Untersuchung der HrpZ1<sub>Psph</sub>-Homooligomerisierung in lipophilem Milieu (Dodecyl-β-D-maltosid, Octyl-β-D-glucopyranosid, Triton X-100) mittels BlueNative-PAGE. Aufgereinigtes rekombinantes HrpZ1<sub>Psph</sub> wurde mit Lösungspuffer (enthält Dodecyl-β-D-maltosid, Octyl-β-D-glucopyranosid, Triton X-100) vorinkubiert und auf ein 6 - 16,5 %iges Gradientengel aufgetragen. Coomassie-enthaltender Kathodenpuffer wurde nach Hälfte des Laufs gegen farbstofffreien Kathodenpuffer ausgetauscht. Nach dem Lauf erfolgte die Entfärbung mit 5 % Essigsäure. Die Größe der Molekulargewichtsmarker ist links vom Gel angegeben: 880 kDa - Ferritindimer, 670 kDa - Thyroglobulin, 440 kDa - Ferritinmonomer, 264 kDa - BSA-Tetramer, 132 kDa - BSA-Dimer, 66 kDa - BSA-Monomer. \*nicht eindeutig verifizierbar.

### 3.4.5 *In vivo*-Interaktionsstudien von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> mit Hefe-2-Hybrid-System

Als weitere Methode, um unter nativen Bedingungen die Dimerisierung von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> nachzuweisen, wurde das Hefe-2-Hybrid-System (Yeast-2-Hybrid) gewählt (Fields and Song 1989). Dieses System basiert auf der Fähigkeit zweier Hybridproteine, von denen eines (bait: engl. Köder) die GAL4-DNA-Bindungsdomäne (BD) und das andere (prey: engl. Beute) die GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) enthält, miteinander zu interagieren und somit die Transkription der durch den Transkriptionsfaktor GAL4 regulierten Reportergene zu induzieren (siehe 2.5.9). Für diese Studie wurde HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> als Köder- und Beuteprotein verwendet, um die Homodimerisierung *in vivo* zu untersuchen. Das *hrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-Gen wurde aus dem Vektor pJC40 als NdeI/HindIII-Fragment ausgeschnitten und in den pGBKT7-Vektor (Selektionsmarker Tryptophan, W) und pGADT7-Vektor (Selektionsmarker Leuzin, L) umkloniert. Physische Interaktion zwischen den HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-AD- und HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-BD-Fusionsproteinen führt zur Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors und somit zur Transkriptionsaktivierung der unter Kontrolle der *gal*-Promotoren stehenden Reportergene *Ade2*, *His3* und *LacZ* im Hefestamm pJ69-4A. Das *ade2*-Gen komplementiert einen Defekt in der Adeninbiosynthese und das *lacZ*-Gen kodiert das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase. Das dritte Reportergen, *his3*, wurde in dieser Arbeit nicht einbezogen. (James *et al.* 1996; Criekinge and Beyaert 1999).

Die Abbildung 3.21 verdeutlicht die HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Interaktion im Hefe-2-Hybrid-System. Auf SD-LWA-Medium (Leuzin/Tryptophan/Adenin-Mangelmedium) wachsen nur Hefeklonen, bei denen eine Transkriptionsaktivierung des Reportergens *ade2* stattgefunden hat, welche den Defekt in der Adeninbiosynthese komplementiert. Ein Wachstum ist nur bei Hefen festzustellen, welche die HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-AD- und HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-BD-Fusionsproteine exprimieren. Eine Autoaktivierung durch HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-AD bzw. HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-BD alleine kann nicht beobachtet werden. Außerdem scheint die intermolekulare Wechselwirkung der HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Proteine spezifisch zu sein, da ein Fremdprotein (hier AIP7, eine Lipase aus *Arabidopsis thaliana*, Christopher Grefen, pers. Mitteilung), aufgrund der fehlenden Aktivierung der Reportergene nicht mit HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> zu interagieren scheint. Hefen, die lediglich die unfusionierten Aktivierungs- und Bindedomänen exprimieren, zeigen ebenfalls keine Reportergentranskription an. Das Wachstum auf SD-LW-Medium (Leuzin/Tryptophan-Mangelmedium) beweist das Vorhandensein beider Vektoren. Um den Wachstumstest auf SD-LWA-Medium zu bestätigen, wurde der oNPG-Assay eingesetzt, welcher sich die Transkriptionsaktivierung des *lacZ*-Reportergens und damit die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase zunutze macht. Eine hohe  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist nur in solchen Hefen feststellbar, welche die HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-AD- und HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-BD-Fusionsproteine exprimieren. Als Positivkontrolle diente die Interaktion zwischen dem Maus-Tumorsuppressorgen p53 und dem großen T-Antigen des SV40-Tumovirus (Li und Fields 1993). Um sicherzustellen, dass die Hefen die

Fusionsproteine exprimieren, wurde ein Immunoblot mit Proteinextrakten aus den Hefen durchgeführt (nicht gezeigt). Die Fusionsproteine wurden mit monospezifischem anti-HrpZ1-Antikörper nachgewiesen. Die Western-Analysen zeigten, dass beide Fusionsproteine exprimiert wurden. Jedoch schien die Menge an exprimierten HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-AD-Fusionsprotein bedeutend geringer zu sein als die des BD-Fusionsprodukt, was das schwache Wachstum aller Hefestämme erklären könnte, welche das *hrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>*-Gen im pGADT7-Vektor enthielten. Möglicherweise ruft dieses Fusionsprodukt eine für die Hefe leicht toxische Wirkung hervor.

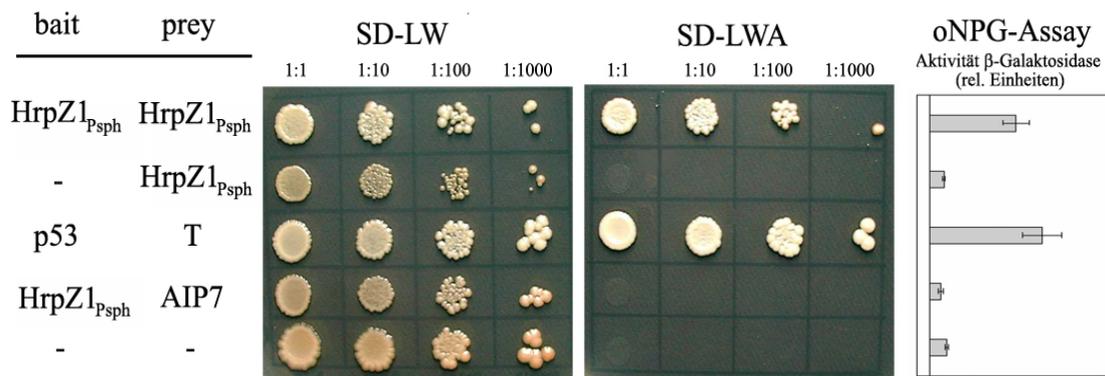


Abb.3.21: Interaktion von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> im Hefe-2-Hybrid-System. Bait-Vektor (pGBKT7) und prey-Vektor (pGADT7), welche die angezeigten Gene enthalten, wurden in den Hefestamm pJ69-4A transformiert und auf SD-LW ausplattiert. 7,5  $\mu$ l einer 1:1-, 1:10-, 1:100- und 1:1000-Verdünnung einer Hefetransformantenzellsuspension ( $OD_{600} = 0,3$ ) wurden auf SD-LW und SD-LWA getropft und vier Tage vor dem Photographieren bei 30°C inkubiert. Eine positive Interaktion resultiert in Hefezellwachstum unabhängig vom Vorhandensein von Adenin. Für den oNPG-Assay wurden 2 ml Hefetransformantenzellsuspension eingesetzt und wie in 2.5.9.2 beschrieben verfahren. Dargestellt sind die Standardabweichungen von vier unabhängigen Messungen.

### 3.4.6 Studien zur Heterooligomerisierung zwischen HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>, HrpA1<sub>P<sub>sph</sub></sub> und HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub> mittels Hefe-2-Hybrid-System

Phytopathogene Bakterien nutzen den Hrp-Pilus zur Sekretion von Harpinen sowie zur Injektion von Typ-III-Effektorproteinen in das Wirtszytosol (Grant *et al.* 2006). Der Hrp-Pilus selber stellt dabei ein Riesenpolymer bestehend aus HrpA1-Untereinheiten dar (Roine *et al.* 1997a). Durch verschiedene Experimente konnte gezeigt werden, daß HrpZ1 und HrpW1 durch diesen Pilus sekretiert werden und speziell HrpW1, aber auch HrpZ1 mit dem Pilus interagieren (Jin and He 2001, Brown *et al.* 2001). Mit Hilfe der Hefe-2-Hybrid-Methode sollte nun die mögliche *in vivo*-Interaktion von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> mit HrpA1<sub>P<sub>sph</sub></sub> bzw. HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub> untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Gensequenz von HrpA1<sub>P<sub>sph</sub></sub> und HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub> als EcoRI/BamHI-Fragmente PCR-amplifiziert und in die Vektoren pGADT7 und pGBKT7 kloniert. Die Herstellung der bait- und prey-Vektoren, welche das HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Insert enthielten, wurde schon in 3.4.5 beschrieben. Der Hefe-2-Hybrid wurde für jede Interaktionsstudie dreimal durchgeführt, wobei die beobachteten Ergebnisse identisch waren.

Wie anhand der Abbildung 3.22 zu erkennen ist, zeigt sich im Hefe-*in vivo*-System keine Interaktion zwischen HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> und HrpA1<sub>P<sub>sph</sub></sub>, unabhängig von der Vektorkombination. Ein Wachstum auf SD-LWA sowie eine hohe Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase ist nur in solchen Hefen festzustellen, welche einerseits das HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-AD- und HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-BD-Fusionsprotein und andererseits als Positivkontrolle das Maus-Tumorsuppressorgen p53 und das große T-Antigen des SV40-Tumorvirus als Fusionsproteine (Li und Fields 1993) exprimierten. Auch eine Autoaktivierung durch das HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-AD-, HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-BD-, HrpA1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-AD- oder HrpA1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-BD-Fusionsprotein konnte nicht beobachtet werden. Interessanterweise konnte auch keine Homodimerisierung zwischen HrpA1<sub>P<sub>sph</sub></sub> detektiert werden. Dieses Resultat ist erstaunlich, ist doch bekannt, daß HrpA1 als Pilusprotein ähnlich dem Flagellin des bakteriellen Flagellums über die Fähigkeit zur intermolekularen Homooligomerisierung verfügen müsste (Roine *et al.* 1997b). Möglicherweise ist diese „Verpackung“ des HrpA1<sub>P<sub>sph</sub></sub> in eine Pilusstruktur ein hochregulierter Mechanismus, an dem weitere bakterielle Proteine, beispielsweise Chaperone, beteiligt sind. Diese Voraussetzungen sind im Hefesystem aber nicht gegeben, weswegen eine HrpA1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Interaktion nicht beobachtet werden konnte. Als Kontrolle der Expression der Fusionsproteine wurde ein Immunoblot mit spezifischen Antikörpern durchgeführt (nicht dargestellt).

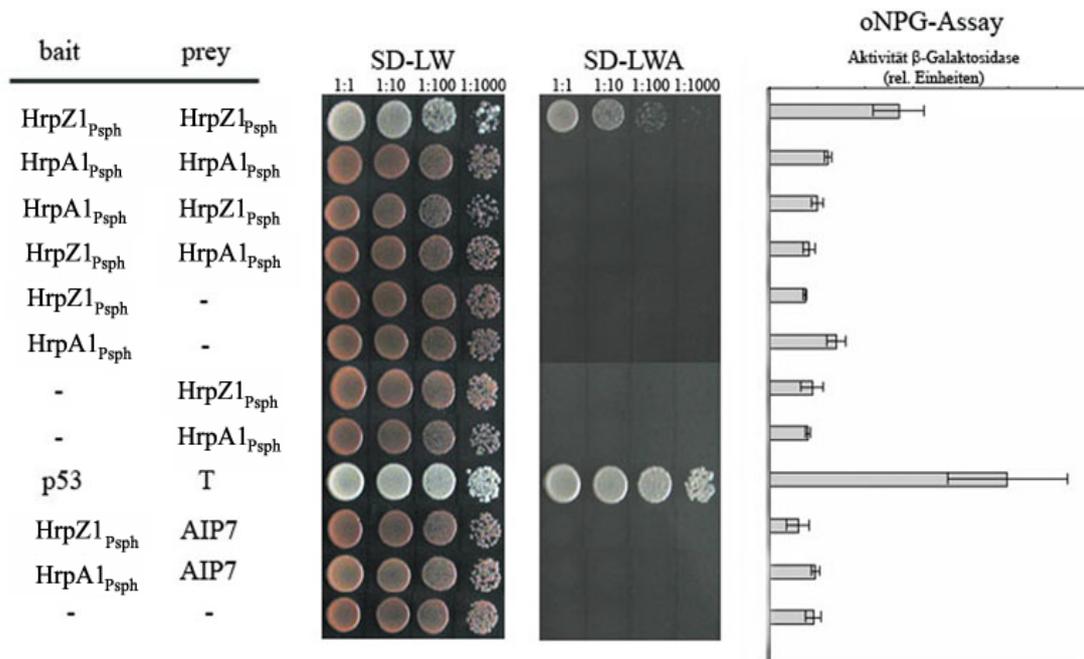


Abb. 3.22: Interaktionsuntersuchung von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> und HrpA1<sub>P<sub>sph</sub></sub> im Hefe-2-Hybrid-System. Bait-Vektor (pGBKT7) und prey-Vektor (pGADT7), welche die angezeigten Gene enthalten, wurden in den Hefestamm pJ69-4A transformiert und auf SD-LW ausplattiert. 7,5  $\mu$ l einer 1:1-, 1:10-, 1:100- und 1:1000-Verdünnung einer Hefetransformantenzellsuspension ( $OD_{600} = 0,3$ ) wurden auf SD-LW und SD-LWA getropft und vier Tage vor dem Photographieren bei 30°C inkubiert. Eine positive Interaktion resultiert in Hefezellwachstum unabhängig vom Vorhandensein von Adenin. Für den oNPG-Assay wurden 2 ml Hefetransformantenzellsuspension eingesetzt und wie in 2.5.9.2 beschrieben verfahren. Dargestellt sind die Standardabweichungen von vier unabhängigen Messungen.

Wie in Abbildung 3.23 zu erkennen ist, war auch keine Heterooligomerisierung zwischen HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> und HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub>, unabhängig von der Fusionskombination, und auch keine HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Homooligomerisierung feststellbar. Analog zur HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-HrpA1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Interaktionsstudie (siehe Abbildung 3.22) war ein Wachstum auf Adeninmangelmedium sowie eine vom Hintergrund deutlich unterscheidbare β-Galaktosidaseaktivität nur in solchen Hefezellen nachweisbar, welche die Positivkontrollvektoren enthielten bzw. beide HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Fusionsproteine exprimierten. Autoaktivierende Eigenschaften besaß keines der Fusionsproteine. Der Expressionsnachweis erfolgte auch hierbei wieder mit Hilfe eines Immunoblots (nicht dargestellt).

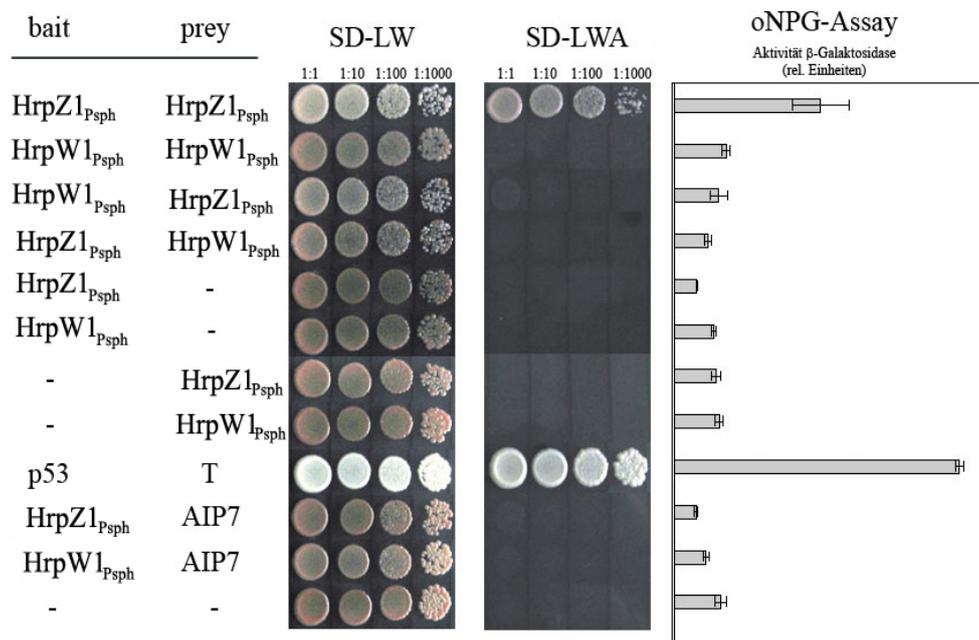


Abb.3.23: Interaktionsuntersuchung von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> und HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub> im Hefe-2-Hybrid-System. Bait-Vektor (pGBKT7) und prey-Vektor (pGADT7), welche die angezeigten Gene enthalten, wurden in den Hefestamm pJ69-4A transformiert und auf SD-LW ausplattiert. 7,5 µl einer 1:1-, 1:10-, 1:100- und 1:1000-Verdünnung einer Hefetransformantenzellsuspension (OD<sub>600</sub> = 0,3) wurden auf SD-LW und SD-LWA getropft und vier Tage vor dem Photographieren bei 30°C inkubiert. Eine positive Interaktion resultiert in Hefezellwachstum unabhängig vom Vorhandensein von Adenin. Für den oNPG-Assay wurden 2 ml Hefetransformantenzellsuspension eingesetzt und wie in 2.5.9.2 beschrieben verfahren. Dargestellt sind die Standardabweichungen von vier unabhängigen Messungen.

### 3.4.7 Interaktionsstudien zwischen HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> und HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub> mittels Gelfiltration

Die Milieubedingungen des Hefesystem könnten als entscheidendes Kriterium eine Interaktion zwischen HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> und HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub> verhindern. Um zu analysieren, ob beide Harpine *in vitro* miteinander interagieren können, wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden beide Proteine in hochreinem Zustand hergestellt (über Ni-NTA, siehe Abbildung 2.2). 250 µg jedes Proteins wurde jeweils mit einer Flußrate von 0,3 ml / min auf eine vorher mit MES/NaCl (5 mM MES pH 5,5; 150 mM NaCl) äquilibrierte Superdex 200-Säule aufgetragen, welche in einem Molekulargewichtsbereich

von 10 kDa bis 600 kDa die größte Trennkapazität aufweist. Betrachtet man die jeweiligen Elutionsprofile in Abbildung 3.24, so zeigen sich einmal zwei Peaks nach dem Durchlauf mit HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>, wie sie schon vorher beobachtet wurden (siehe Abbildung 3.17) und einem Dimer sowie einem hochwertigen Oligomer entsprechen. Nach einem Lauf mit HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub> ist nur ein Peak detektierbar, welcher einem sehr hohen Molekulargewicht entsprechen müsste. HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub> scheint in Lösung die Fähigkeit zur Homooligomerisierung zu besitzen, ein Ergebnis, welches dem Hefe-2-Hybrid-Resultat widerspricht. Andererseits enthält dieses HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub> aber immer noch den HisTag, welcher für eine intermolekulare Aggregation verantwortlich sein kann und deswegen dieser in der Gelfiltration beobachtete Peak eine unspezifische Agglomeration anzeigt anstelle einer spezifischen Oligomerisierung. Werden beide Proteine zusammen aufgetragen, ergibt sich ein kombiniertes Elutionsprofil. Es zeigten sich keine zusätzlichen Peaks zwischen dem HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Dimerpeak (etwa bei 70 kDa) und dem Oligomerpeak (über 800 kDa). Mittels Immunoblotanalyse konnte die Zugehörigkeit der beiden Proteine bestätigt werden. Ein gegen HrpZ1 gebildeter monospezifischer Antikörper detektierte HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> im unteren Elutionsprofil der Abbildung 3.24 in beiden Peaks, während ein gegen einen HisTag entwickelter Antikörper das HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub> nur im Peak des höheren Molekulargewichts detektierte. Es läßt sich nicht bestimmen, ob das Vorhandensein beider Proteine im 800 kDa-Peak auf eine Heterooligomerisierung zurückzuführen ist oder auf die jeweiligen Proteineigenschaften, welche eine Homooligomerisierung dieser Größe verursacht.

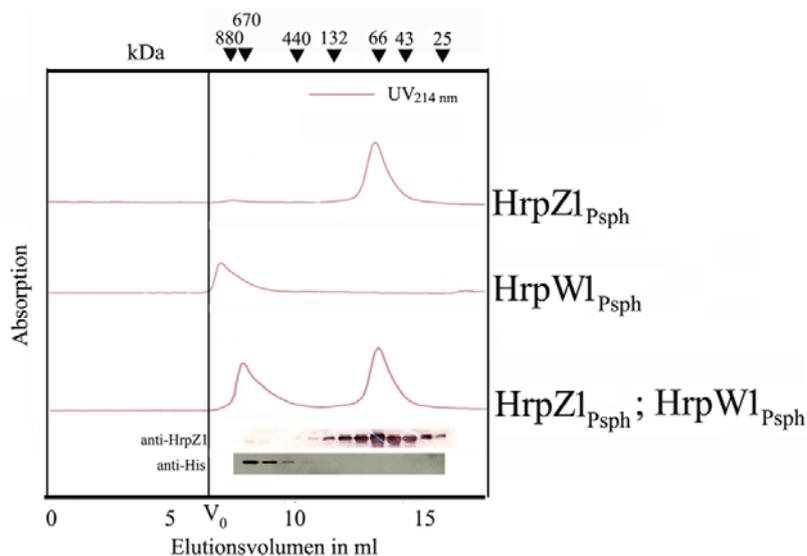


Abb.3.24: Elutionsprofil von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> und HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub> nach dem Gelfiltrationslauf über eine Superdex 200. Jeweils 250 µg aufgereinigtes rekombinantes Protein wurde auf die Säule aufgetragen (mit Laufpuffer 5 mM MES pH 5,5; 150 mM NaCl) und bei einer Flußrate von 0,3 ml /min aufgetrennt. Die Detektion erfolgte bei 214 nm. Die Größe der Molekulargewichtsmarker ist oben angegeben. Das Eluat wurde in 250 µl-Fractionen gesammelt. Die Immunoblotanalyse der Fraktionen nach 10 %iger SDS-PAGE und Transfer auf Nitrocellulose wurde für HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> mit primärem anti-HrpZ1-Antikörper und sekundärem anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (gekoppelt an Alkalische Phosphatase) sowie für HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub> mit anti-His<sub>6</sub>-Antikörper (gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase) durchgeführt. V<sub>0</sub>, Totvolumen.

### 3.5 Untersuchungen der HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Struktur mittels Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Untersuchungen verschiedener bakterieller Toxine wie Perfringolysin O (PFO, Dang *et al.* 2005), Pneumolysin (Tilley *et al.* 2005) oder Equinatoxin II (Bonev *et al.* 2003) konnten deren Porenbildung in Lösung nachweisen. Daher stellte sich die Frage, ob das porenbildende HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> in Lösung ebenfalls schon porenähnliche Strukturen erkennen läßt. Zu diesem Zweck wurden elektronenmikroskopisch verschiedene HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Proben in einer Konzentration von 1 mg/ml nach einer Uranylacetat-Negativfärbung (Van Bruggen *et al.* 1960) analysiert. Repräsentative Photographien dieser Untersuchung zeigt die Abbildung 3.25. Wie deutlich zu erkennen ist, ist keine eindeutige Porenstruktur zu beobachten. Vielmehr waren nur sehr wenige größere Objekte detektierbar, welche eine fädige, filamenartige Struktur aufwiesen. Außerdem ist die Auflösung auch nicht groß genug, um die in Lösung eindeutig dominant auftretenden HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Dimere (siehe Abbildung 3.17) sichtbar zu machen.

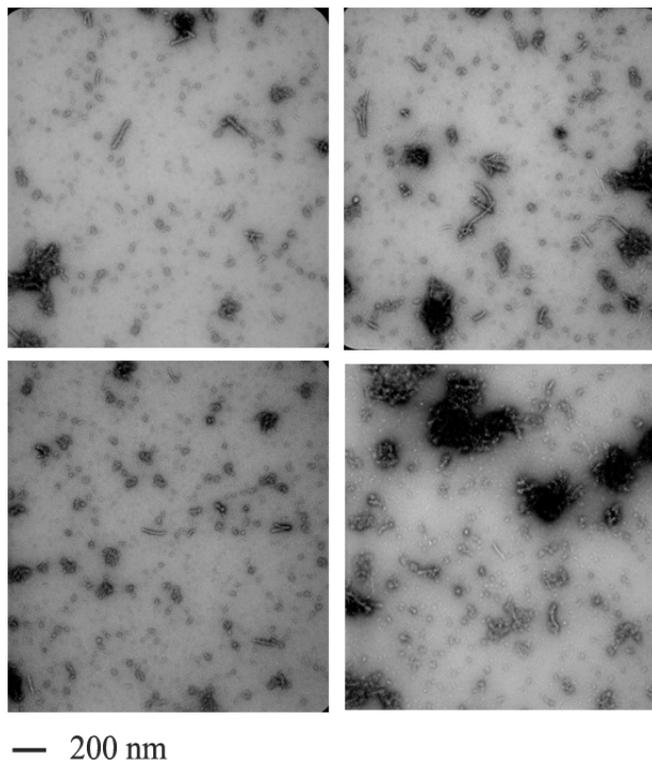


Abb.3.25: Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>. Dargestellt sind vier repräsentative Bilder der TEM-Analyse von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> (1 mg/ml) nach Uranylacetat-Negativfärbung.

### 3.6 Kristallisation von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>

Bis zur Auflösung der 3D-Struktur des porenbildenden Translokons pflanzlicher Pathogene kann über den Mechanismus der Effektortranslokation nur spekuliert werden.

HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> nimmt darin aufgrund der Fähigkeit zur Homooligomerisierung sowie der gezeigten Porenbildung in artifiziellen, aber auch in natürlichen Lipidmembranen, möglicherweise eine nicht unbedeutende Rolle ein. Voraussetzung für die Auflösung der 3D-Struktur eines Proteins ist das Vorhandensein eines Kristalls mit periodisch geordneter dreidimensionaler Struktur.

HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> wurde affinitätschromatographisch mittels Ni-NTA aufgereinigt und anschließend, um negative Einflüsse während der Kristallisation zu verhindern, erfolgte die Abspaltung des HisTags mittels der Restriktionsprotease Faktor Xa. Die Homogenität der Präparation wurde durch eine SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 2.3). Im Falle der Kristallisationsexperimente von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> wurde die Dampf-Diffusions-Methode mit „hängenden Tropfen“ angewandt. Die Kristallisationstemperaturen betragen für HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> 20°C und 37°C. Jeweils zwei Tropfen pro Ansatz, bestehend aus 1 µl Proteinlösung und 1 µl Mutterlösung, wurden vorbereitet, von denen einer zusätzlich 15 mM EDTA enthielt, um die Bildung höherwertiger Oligomere zu vermeiden (siehe Abbildung 3.16b). Dabei konnte beobachtet werden, daß die Anzahl der Tropfen mit sofortiger Präzipitation um bis zu 15 % geringer war, wenn zusätzlich EDTA vorhanden war. Nach einem Zeitraum von 10 Wochen zeigten sich in nahezu 99 % der Tropfen Präzipitate, unabhängig vom Vorhandensein von EDTA. Nach 10 Wochen hatte sich lediglich ein Kristall gebildet, welcher anschließend mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht wurde. Jedoch zeigt das Röntgenbeugungsmuster das typische Bild eines Salzkristalls. Somit konnte bisher noch kein HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Kristall gezüchtet werden, um eine Analyse der dreidimensionalen Struktur des Proteins in Lösung vorzunehmen. Ob eine solche Struktur allerdings diejenige widerspiegelt, die das Protein in der Membran einnimmt, bleibt abzuwarten, jedoch sollten Hinweise darauf möglich sein. Darüberhinaus besteht auch die methodisch schwierigere Alternative, HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> mittels Detergenzien zu kristallisieren. Erhielte man auf diese Weise einen Kristall mit einer guten Auflösung, würde eine Analyse der Porengröße machbar sein.

### **3.7 Untersuchung der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie**

Beim Übergang eines Proteins von der wäßrigen in eine Lipidphase ist es energetisch günstig, wenn zuvor im Proteininneren abgeschirmte hydrophobe Strukturbereiche an die Oberfläche des Proteins gelangen, um hydrophobe Wechselwirkungen mit den Lipidmolekülen einzugehen. Membranaktive Proteine wie z.B. porenbildende Toxine unterliegen beim Übergang in eine lipophile Phase charakteristischen Änderungen ihrer Konformation (Song *et al.* 1996; Zakharov and Cramer 2002; Czajkowsky *et al.* 2004; Tilley *et al.* 2005; Eifler *et al.* 2006). Einen Hinweis auf eine Konformationsänderung liefert die CD-spektroskopische Untersuchung der Sekundärstruktur, da zirkular polarisiertes Licht beim Durchtritt durch ein optisch

aktives Medium unterschiedlich absorbiert wird. Diese Absorption ist abhängig von der Umgebung dieses optisch aktiven Mediums, weswegen verschiedene Sekundärstrukturen unterschiedliche Absorptionseigenschaften des gleichen chiralen Zentrums hervorrufen. Um eine mögliche Konformationsänderung von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> beim Übergang in ein lipophiles Milieu zu analysieren, wurde das Protein (1 mg/ml) mit steigenden Konzentrationen von Octyl-β-D-Glucopyranosid inkubiert (10 min). Im Anschluß daran erfolgte die Aufnahme der CD-Spektren in einem Wellenlängenbereich zwischen 250 und 190 nm. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.26 zusammengefasst. In Lösung (bei 0 % Detergenz) weist HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> einen α-Helixanteil von etwa 20 % und einen etwa doppelt so hohen β-Faltblattanteil auf, während das Protein etwa 30 % zufällig gefaltet ist ("random coil"). Bei zunehmender Detergenzkonzentration nimmt der Anteil des zufällig gefalteten Bereichs nur unwesentlich zu (von etwa 28 % auf 36 %). Im Gegensatz dazu sieht man eine deutliche Zunahme des α-Helixanteils von 20 % auf etwa 40 % und eine Abnahme des β-Faltblattanteils von etwa 40 % auf 20 %. Die in wäßriger Lösung vorhandenen β-Schleifen ("Turn") sind bei 0,5 % Detergenz nur noch marginal detektierbar und verschwinden ganz bei höheren Detergenzkonzentrationen. Dieses Verhalten dokumentiert eine umfassende und spezifische Konformationsänderung des Proteins. Die starke Zunahme des α-Helixanteils scheint darauf hinzudeuten, daß HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> durch eine Umfaltung bestimmte Proteinbereiche freilegt, welche in Form dieser Helices mit Lipidmembranen interagieren können. Solch eine Konformationsänderung wäre eine Voraussetzung für ein amphipatisches porenbildendes Molekül, welches löslich ist, die Funktion aber in einer Lipidmembran wahrnimmt.

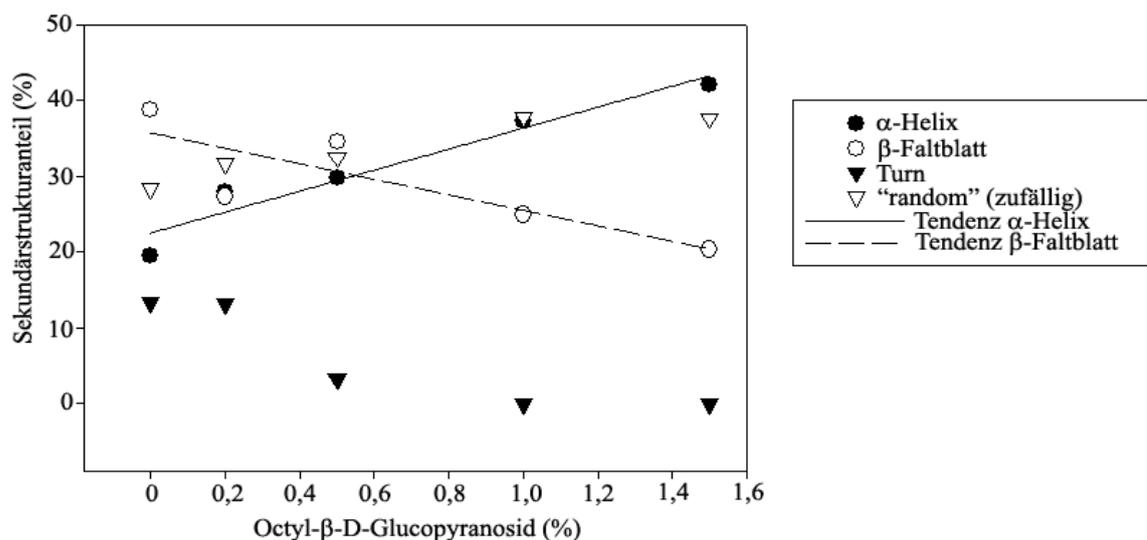


Abb.3.26: HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Sekundärstrukturanteile bei unterschiedlicher Detergenzkonzentration. Aufgereinigtes rekombinantes Protein (1 mg/ml) wurde mit den angegebenen Detergenzkonzentrationen 10 min inkubiert. Im Anschluß daran erfolgte die Aufnahme der CD-Spektren zwischen 190 und 250 nm.

## 4 Diskussion

Das Typ-III-Sekretionssystem einer Vielzahl Gram-negativer Bakterien dient der Translokation von Effektorproteinen in das Wirtszytosol (Galan and Collmer 1999) mit dem vorrangigen Ziel, die PAMP- als auch Effektor-induzierte Immunität zu inaktivieren (Jones and Dangl 2006, Grant *et al.* 2006, He *et al.* 2006). Eine besondere Rolle spielen dabei die von phytopathogenen Bakterien in den pflanzlichen Apoplasten sekretierten und ebenfalls als Effektorproteine bezeichneten Harpine. Diese Proteine weisen neben ihrer während des Infektionsprozesses ausgeführten Virulenzfunktion die Eigenschaft auf, pflanzliche Immunreaktionen auszulösen (Alfano *et al.* 2000; Guttman *et al.* 2006; Grant *et al.* 2006). Das HrpZ1-Protein phytopathogener *Pseudomonas syringae*-Pathovaren stellt einen Vertreter jener in apoplastidären Milieubedingungen massiv produzierten und Typ-III-sekretierten Harpine dar (Roine *et al.* 1997a; Alfano *et al.* 2000; Guttman *et al.* 2006). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung des HrpZ1<sub>PspH</sub>-Effektorproteins hinsichtlich beider Aspekte, der Virulenzfunktion sowie der immunostimulatorischen Aktivität in Pflanzen.

### 4.1 *HrpZ1<sub>PspH</sub> als Auslöser pflanzlicher Immunreaktionen*

Für die Auslösung von Antworten der angeborenen Immunität spielt die Fähigkeit der Unterscheidung zwischen "Selbst" und "Nichtselbst" eine entscheidende Rolle (Nürnberg *et al.* 2004). Charakteristische molekulare Strukturen, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs), aber auch vom Pathogen ins Wirtszytosol translozierte Effektoren sind für die Aktivierung von Immunreaktionen in Tieren und Pflanzen verantwortlich (Medzhitov and Janeway 2002; Akira and Takeda 2004; Nürnberg *et al.* 2004; Jones and Dangl 2006). Allgemeine Merkmale der PAMPs umfassen ihre hochkonservierte Struktur, die funktionelle Bedeutung für den Lebenszyklus des Mikroorganismus sowie ihre Präsenz in zahlreichen mikrobiellen Spezies (Brunner *et al.* 2002). Zu den von Pflanzen erkannten PAMPs zählen charakteristische Oomycetenstrukturen wie beispielsweise das innerhalb der Zellwand vorkommende  $\beta$ -Glukan, das in Zellwandtransglutaminasen konservierte Pep13-Epitop sowie sekretierte Elicatine und NPP1 (Fellbrich *et al.* 2002; Nürnberg *et al.* 2004). Darüberhinaus wahrnehmen Pflanzen auch Chitin und Ergosterol der echten Pilze. In ähnlicher Weise nehmen Pflanzen aber auch typisch bakterielle Strukturen wie LPS, Kälteschockproteine, Peptidoglykan, Flagellin und EF-Tu wahr (Felix and Boller 2003; Kunze *et al.* 2004; Nürnberg *et al.* 2004, Zipfel and Felix 2005; Chinchilla *et al.* 2006; Gust *et al.* 2007). Die Erkennung von PAMPs durch den pflanzlichen Wirt resultiert letztendlich in der PAMP-induzierten Immunität (PTI, siehe Abbildung 1.1B; Jones and Dangl 2006),

während in das Wirtszytosol translozierte Effektoren in resistenten Pflanzenkultivaren für die Ausbildung der Effektor-induzierten Immunität (ETI, siehe Abbildung 1.1D; Jones and Dangl 2006) verantwortlich sind.

Eine Reihe von Proteinen Gram-negativer Bakterien, die mittels des Typ-III-Sekretionssystems in den pflanzlichen Apoplasten sekretiert werden, lösen ebenso eine Vielzahl von Immunantworten aus. Dabei konnte die immunostimulatorische Aktivität des HrpZ1-Proteins aus *Pseudomonas syringae*-Pathovaren, die sich beispielsweise in der Ausbildung der HR, der Aktivierung von MAP-Kinasekaskaden, der Transkription von PR-Genen oder der Aktivierung der systemisch erworbenen Resistenz äußert, in vielen Pflanzen belegt werden (He *et al.* 1993; Preston *et al.* 1995; Alfano *et al.* 1996; Lindgren 1997; Lee *et al.* 2001b; Alfano and Collmer 2004, He *et al.* 2006). Um Kenntnisse der abwehrinduzierenden Aktivität des HrpZ1-Proteins aus *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, die u.a. im Tabaksystem gewonnen wurden, zu vertiefen, wurden ähnliche Untersuchungen mit Hilfe von Petersiliezellkulturen durchgeführt. Dieser experimentelle Ansatz bietet den Vorteil, daß speziell schnell einsetzende Abwehrreaktionen, die nicht wie meist in intaktem Pflanzengewebe nur auf wenige Zellen beschränkt sind, routinemäßig in großem Durchsatz erfasst und quantifiziert werden können. Außerdem entfällt in Zellsuspensionen die Gefahr der Wundinfektion, die aufgrund der Überlagerung mit Elicitor-induzierten Reaktionen zu Fehlinterpretationen führen kann.

Von den in dieser Arbeit untersuchten Komponenten der pflanzlichen Abwehrsignaltransduktion, die nach einer PAMP-Behandlung wie beispielsweise Pep13 aktiviert werden, zählt die extrazelluläre Alkalisierung zu den schnellsten messbaren Reaktionen (Nürnberger *et al.* 1994; Atkinson *et al.* 1996; Jabs *et al.* 1997). Eine Behandlung von Petersiliezellen mit HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> resultierte innerhalb eines Zeitraumes von nur 30 min ebenfalls in einer Zunahme des extrazellulären pH-Wertes um etwa 0,6 Einheiten (siehe Abbildung 3.1).

Weiterhin konnte mit Hilfe spezifischer Antikörper die MAP-Kinaseaktivierung in Petersiliezellen nach HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Behandlung gezeigt werden (siehe Abbildung 3.2). PcMPK3 und PcMPK6, die den MAP-Kinasen AtMPK3 und AtMPK6 aus *Arabidopsis thaliana* entsprechenden Kinasen aus Petersilie, werden ebenso durch Pep13 aktiviert (Ligterink *et al.* 1997; Kroj *et al.* 2003). AtMPK3 und AtMPK6 sind Bestandteile einer kürzlich entschlüsselten Signalkaskade, welche durch das bakterielle PAMP flg22 aktiviert wird und in allgemeinen Abwehrreaktionen, allerdings nicht in einer HR resultiert (Gomez-Gomez and Boller 2000; Asai *et al.* 2002). Da die Infiltration von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> in Petersilie ebenfalls keine HR induziert (nicht gezeigt), sind die aktivierten MAP-Kinasen neben der HR höchstwahrscheinlich auch an der Ausbildung weiterer Abwehrreaktionen beteiligt, da loss-of-function-Experimente die grundsätzlich essentielle Bedeutung der AtMPK6 für die PAMP-, aber auch Effektor-induzierte Immunität belegen (Menke *et al.* 2004).

Zu den frühen Reaktionen der Pflanzen nach einem Pathogenbefall, die von Ionenflüssen durch die Plasmamembran abhängen, zählt ebenfalls die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid (NO) (Dangl *et al.* 1996; Neill *et al.* 2002), die neben einer direkt toxischen Wirkung auch eine Signalfunktion haben. Dieser „Oxidative Burst“ konnte beispielsweise durch die Applikation von Pep13 in Petersiliesuspensionskulturen stimuliert werden (Nürnberger *et al.* 1994). Ein transientser NO-Anstieg in Petersilie zeigt ebenso einen oxidativen Burst nach HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Behandlung an (siehe Abbildung 3.3). Der zeitliche Verlauf dieser Akkumulation von Stickstoffmonoxid mit einem Maximum nach etwa drei Stunden ähnelt der NO-Produktion anderer PAMP- oder bakteriell behandelter Zellen (Lamotte *et al.* 2004; Yamamoto *et al.* 2004).

Aus dem umfangreichen Spektrum der pflanzlichen Abwehrreaktionen erfolgte in den Petersiliezellkulturen die Analyse der Synthese antimikrobieller Phytoalexine. Die Behandlung dieser Zellen mit HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> induzierte die elicitor-konzentrationsabhängige Synthese und Sekretion von autofluoreszierenden Phytoalexinen (siehe Abbildung 3.4), wie sie gleichermaßen nach Applikation von Pep13 beobachtet werden konnte (Nürnberger *et al.* 1994). Die Reduktion der HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-elicitierten Phytoalexinproduktion von Petersiliezellen durch zunehmende Konzentrationen des NO-Radikalfängers cPTIO (2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-Tetramethylimidazolin-1-Oxyl-3-Oxid) (siehe Abbildung 3.5) scheint eine Beteiligung des NO im intrazellulären Signaltransduktionsweg, der letztendlich zur Synthese von Phytoalexinen in Petersilie führt, zu bestätigen. Es kann aber hier nicht ausgeschlossen werden, daß cPTIO auch mit anderen zellulären Prozessen interferiert und beispielsweise durch Reaktion mit den Phytoalexinen deren Fluoreszenz blockiert.

Die simultane Anwendung von niedrigen LPS- und HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Konzentrationen, die individuell eine sehr geringe Phytoalexinakkumulation zur Folge hatten, führte zu einer synergistischen Abwehrantwort (siehe Abbildung 3.6). Aufgrund der strukturellen Verschiedenheit beider Moleküle kann man davon ausgehen, daß in Pflanzen verschiedene Systeme für die Perzeption von LPS und HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> notwendig sind. Im Apoplasten kommt die Pflanze zuerst mit dem LPS der Bakterienzellwand in Kontakt und erst nach dem Aufbau des bakteriellen Typ-III-Sekretionsapparats kann eine Perzeption von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> erfolgen. Die Erkennung von LPS führt demnach zu einem „Priming“ der Pflanze, die auf die nachfolgende Infektion mit einer verstärkten Abwehrantwort reagieren kann (Newman *et al.* 2007). Die natürliche zeitliche Perzeptionsreihenfolge im Apoplasten ist wahrscheinlich auch der Grund, weshalb ein solches „Priming“ zwar auch durch HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> induziert werden kann (siehe Abbildung 3.6B), der zeitliche Verlauf der resultierenden Phytoalexinproduktion jedoch dabei keine Ähnlichkeit zum LPS-induzierten „Priming“ zeigt.

Anhand der Ausführungen läßt sich erkennen, daß Pflanzen in der Lage sind, nicht nur die klassischen PAMPs als "Nichtselbst" zu perzipieren, sondern auch in den

Apoplasten sekretierte Effektoren. HrpZ1<sub>PspH</sub> weist im Hinblick auf die Stimulation pflanzlicher Immunantworten und speziell der PTI PAMP-ähnliche Eigenschaften auf, was darüberhinaus auch mit dem nahezu identischen Muster der durch cDNA-AFLP identifizierten transkriptionellen Genaktivierung in Petersilie nach Pep13- und HrpZ1<sub>PspH</sub>-Behandlung verdeutlicht wird (Yvonne Gäbler, pers. Mitteilung). HrpZ1 ist darüberhinaus in allen *Pseudomonas syringae*-Pathovaren relativ stark konserviert, ein für PAMPs zutreffendes Merkmal. Jedoch sind offensichtliche Unterschiede zu den Eigenschaften der klassischen PAMPs vorhanden (Brunner *et al.* 2002), was eine Zuordnung des HrpZ1<sub>PspH</sub>-Proteins zu dieser Gruppe erschwert. Während PAMPs essentielle Funktionen im Lebenszyklus des Mikroorganismus haben, sind *hrpZ1*-mutierte Pseudomonaden in ihrer Virulenz unbeeinträchtigt (Alfano and Collmer 2004). Die Eliminierung eines klassischen PAMPs führt dagegen entweder zum völligen Verlust der Enzymfunktion, aus dem es stammt oder zur Unfähigkeit des Mikroorganismus den Lebenszyklus zu vollenden. Auch wenn momentan die Bedeutung einer *Phytophthora sojae*-Transglutaminase für den Infektionsprozess nicht bekannt ist, so bewirken Punktmutationen im Pep13-Epitop, die zu Aminosäuresubstitutionen führen, beispielsweise den Ausfall der Transglutaminaseaktivität (Nürnberg *et al.* 1994; Brunner *et al.* 2002). Ein besseres Beispiel für die essentielle Bedeutung von PAMPs für den mikrobiellen Lebenszyklus bietet LPS, daß für die geringe Permeabilität der äußeren bakteriellen Membran verantwortlich ist, außerdem dient es im Hinblick auf die bakterielle Infektion von Pflanzen zum Ausschluß konstitutiver oder induzierter antimikrobieller Substanzen pflanzlicher Herkunft (Erbs and Newman 2003). EF-Tu, daß Aminoacyl-tRNAs bindet und den Transport der Aminosäuren zur im Ribosom naszierenden Peptidkette katalysiert, ist das in der bakteriellen Zelle am häufigsten vorkommende Protein (Kunze *et al.* 2004). Nicht zuletzt stellt die durch Flagellen vermittelte Motilität eine lebensnotwendige und grundlegende Voraussetzung bei der Infektion der Pflanze durch bakterielle Phytopathogene dar (Robatzek 2007).

Der Tatsache, daß die Applikation von HrpZ1 in einigen Pflanzen in einer HR resultiert (He *et al.* 1993, Preston *et al.* 1995; Alfano *et al.* 1996; Lindgren 1997), könnte auch eine Effektor-induzierte Immunität (ETI) zugrundeliegen, die laut Definition eine verstärkte Form der PAMP-induzierten Immunität darstellt, bei der es im Gegensatz zur ETI nicht zur Ausbildung der HR kommt (Jones and Dangl 2006). Harpine und speziell HrpZ1 sind im Gegensatz zu klassischen PAMPs nicht konstitutiv vorhanden, sondern werden ähnlich den Avirulenzfaktoren bzw. Effektoren bei beginnender Infektion produziert, d.h. erst pflanzliche apoplastidäre Milieubedingungen induzieren die transkriptionelle Aktivierung der im *hrp*-Operon kodierten Gene (Roine *et al.* 1997a; Guttman *et al.* 2006; Tang *et al.* 2006), zu denen auch die Avirulenzgene gehören. Die ETI wird meist durch Perzeption des Effektors oder dessen Wirkung im Wirtszytosol ausgelöst (Dangl and Jones 2001; Grant *et al.* 2006). Ein klassisches Beispiel für eine extrazytoplasmatisch hervorgerufene R-Gen- bzw. Effektor-spezifische Immunität bietet

die Cf-9/Avr9-Interaktion (van der Hoorn *et al.* 2005; Rivas and Thomas 2005), die zur Resistenz von Tomate gegenüber *Cladosporium fulvum* führt (de Wit *et al.* 2002). Da HrpZ1 ausschließlich apoplastidär die HR stimuliert, wäre somit eine HrpZ1-ausgelöste ETI vorstellbar (Tampakaki and Panopoulos 2000).

Zusammenfassend weisen Harpine und speziell HrpZ1 immunostimulatorische Ähnlichkeiten zu klassischen PAMPs als auch zu Effektoren auf. Das Vorkommen eines bestimmten Avirulenzgens ist jedoch meistens auf ein Pathovar einer bakteriellen Spezies beschränkt, von daher spricht die weite Verbreitung des *hrpZ1*-Gens in einer Vielzahl von *Pseudomonas syringae*-Pathovaren gegen die Theorie einer durch HrpZ1 ausgelösten ETI. Da sie auch in Nichtwirtspflanzen wie Petersilie Abwehrreaktionen induzieren können, sind Harpine ähnlich PAMPs bestimmende Faktoren der Nichtselbst-Erkennung und tragen dadurch möglicherweise zur Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae*-Pathovaren bei. Wahrscheinlich basiert die HrpZ1-vermittelte Stimulation der Immunabwehr auf einer im Vergleich zur PAMP-Perzeption ähnlichen Art und Weise. Die Erkennung von hochkonservierten PAMP-Strukturen erfolgt in Pflanzen durch Mustererkennungsrezeptoren (PRR; "pattern-recognition-receptor"), wie sie für heptaglukan aus Oomyceten (Umemoto *et al.* 1997), pilzlicher Xylanase (Ron and Avni 2004), bakterielles Flagellin (Gomez-Gomez and Boller 2000; Chinchilla *et al.* 2006) und EF-Tu (Zipfel *et al.* 2006) bereits identifiziert werden konnten. Ein solcher Rezeptor ist für HrpZ1 momentan noch unbekannt, jedoch konnte eine pflanzliche hochaffine HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Bindungsstelle, die an der Expression von *PR*-Genen beteiligt ist, identifiziert werden (Lee *et al.* 2001). Die Charakteristik der Bindungsstelle verbunden mit der in dieser Arbeit dokumentierten Sättigungskinetik der HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-elicitierten Phytoalexinbiosynthese, die in nanomolaren Konzentrationen ausgelöst werden kann, läßt auf eine rezeptorvermittelte HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Perzeption schließen.

Momentan ist noch kein Minimalmotiv innerhalb des HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Proteins bekannt, welches hinreichend und notwendig für die Induktion pflanzlicher Immunreaktionen ist, auch wenn zwei Peptide bestehend aus 24 bzw. 44 Aminosäuren des C-terminalen HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Bereiches in Tabak die HR auslösen können (Minna Haapalainen, pers. Mitteilung). Solche Minimalmotive sind beispielsweise von einer Transglutaminase aus *Phytophthora sojae* (Pep13; Nürnberger *et al.* 1994), Flagellin (flg22; Felix *et al.* 1999), EF-Tu (elf18; Kunze *et al.* 2004) oder HpaG aus *Xanthomonas* spp. (Kim *et al.* 2004) identifiziert worden. Ob es sich um eine Proteinrezeptor-vermittelte Aktivierung der Immunreaktionen handelt, kann auch durch den Hitze- und Protease-resistenten Charakter der Bindungsstelle nicht ausgeschlossen werden (Justin Lee, pers. Mitteilung), wenn sich dieser für Proteasen unzugänglich innerhalb der Lipidphase befindet. Es kann sich jedoch bei diesem putativen Rezeptor auch um Lipidkomponenten handeln, die in speziellen Regionen der Membran, sogenannten Lipid-Rafts (Bhat and Panstruga 2005), lokalisiert sind.

#### 4.2 *HrpZ1<sub>PspH</sub> als membranintegrierendes und ionenporenbildendes Protein*

Für eine erfolgreiche Kolonisation eukaryotischer Wirte durch bakterielle Pathogene ist die Unterdrückung von Immunantworten von ausschlaggebender Bedeutung. Dabei spielt die Translokation von Effektorproteinen in das Wirtszytosol eine entscheidende Rolle (Jones and Dangl 2006; He *et al.* 2006; Cornelis 2006). Solche Effektoren dienen in erster Linie der Suppression der Immunabwehr, indem sie durch Interaktion mit Wirtsproteinen die Ausbildung von Abwehrreaktionen beeinträchtigen und dadurch die Versorgung der Bakterien mit Nährstoffen erleichtern. Diese Optimierung der Bedingungen ermöglicht erfolgreich angepassten Bakterien die interzelluläre bzw. im tierischen System vorkommende intrazelluläre Vermehrung (Rosqvist *et al.* 1994; Sory and Cornelis 1994; Cornelis and Wolf-Watz 1997; Hueck 1998; Galan 1999; Cornelis and van Gijsegem 2000; He *et al.* 2004; Troisfontaines and Cornelis 2005; Grant *et al.* 2006). Strukturelle Voraussetzung für die in das Wirtszytosol stattfindende Effektorproteintranslokation ist das bakterielle Typ-III-Sekretionssystem, welches für die Infektion tierischer als auch pflanzlicher Zellen essentiell ist. Dieses Sekretionssystem bzw. Injektisom weist mit dem bakteriellen Flagellum einen gemeinsamen evolutionären Ursprung auf (Cornelis 2006) und ist auf einem "pathogenicity island", einem mobilen genetischen Abschnitt, kodiert, welches im Genom verwandter nichtpathogener Arten fehlt (Hacker and Kaper 1999). Eine hochkonservierte Basalstruktur verankert das Injektisom innerhalb der Bakterienmembranen (Kubori *et al.* 1998; Kimbrough and Miller 2000; Blocker *et al.* 2001; He *et al.* 2004). Ausgehend von dieser Verankerung hat der Pilus phytopathogener Bakterien im Gegensatz zum Nadelfilament tierischer Pathogene eine flexible Struktur mit einem geringeren Durchmesser, ein entscheidendes Kriterium bei der Durchdringung der polysaccharidreichen Pflanzenzellwand (Roine *et al.* 1997a; Roine *et al.* 1997b; Van Gijsegem *et al.* 2000; Troisfontaines and Cornelis 2000; Jin *et al.* 2001; Büttner and Bonas 2002; Van Gijsegem *et al.* 2002; Cornelis 2006; Grant *et al.* 2006). Der Hrp-Pilus phytopathogener *Pseudomonas syringae*-Pathovaren stellt ein Homooligomer aus HrpA1-Untereinheiten dar (Roine *et al.* 1997a; Roine *et al.* 1997b; Taira *et al.* 1999; Brown *et al.* 2001) und dient der Translokation von Effektorproteinen in das Wirtszytosol (Jin and He 2001; Li *et al.* 2001) mit Hilfe von ebenfalls pilussekretierten porenbildenden Translokationsproteinen (Håkansson *et al.* 1996; Tardy *et al.* 1999; Blocker *et al.* 1999; De Geyter *et al.* 2000; Rossier *et al.* 2000; Ide *et al.* 2001; Büttner and Bonas 2002; Büttner *et al.* 2002). Während des Aufbaus des HrpA1-Pilus erfolgt neben der Sekretion der Pilusuntereinheiten auch die Freisetzung von Typ-III-Helferproteinen und Harpinen, unter ihnen HrpZ1 (Alfano and Collmer 2004). Einige dieser Harpine weisen Pektatlyasedomänen auf und erleichtern entweder durch lokalen Abbau der Wirtszellwand den Zugang des Pilus zur Wirtsmembran oder sie stabilisieren den Pilus durch Interaktion

mit den Polysacchariden der Zellwand (Charkowski *et al.* 1998; Grant *et al.* 2006). Während im System tierischer Pathogene alles für eine sequentielle Sekretion spricht, d.h. erst bei Kontakt mit der Wirtsmembran werden Translokatorproteine sekretiert (Cornelis 2006), kann man diese Aussage (noch) nicht definitiv für Phytopathogene treffen, da das porenbildende Translokon momentan unbekannt ist. Sollten Harpine jedoch jene am Translokon beteiligten Proteine sein, so scheint ein sequentieller Aufbau des Sekretionsapparats nicht stattzufinden, da sie schon vor dem Piluskontakt mit der Wirtsmembran in großer Menge in das extrazelluläre Medium sekretiert werden (Roine *et al.* 1997a; Alfano and Collmer 2004). Jedoch konnte einem Typ-III-sekretierten Harpin, HrpJ, eine wichtige Rolle während des Infektionsprozesses zugeschrieben werden, welche anscheinend in der Kontrolle der Typ-III-Sekretion weiterer Effektorproteine wie HrpZ1 besteht (Fu *et al.* 2006) und somit die mögliche Theorie einer aufeinanderfolgenden Sekretion von Pilus-, Translokon- und Effektorproteinen stützt. Durch kürzlich durchgeführte Mutationsstudien konnte gezeigt werden, daß HrpZ1, HrpW1, HopAK1 und HrpK1 wahrscheinlich zusammen für die Translokation von Effektorproteinen verantwortlich sind (Kvitko and Collmer, pers. Mitteilung), wobei der Verlust eines jener Harpine durch funktionelle Redundanz der anderen komplementiert werden kann (Alfano *et al.* 1996; Charkowski *et al.* 1998). Erst die Inaktivierung jedes dieser vier Harpine führt zum vollständigen Ausfall der Effektortranslokation in das Wirtszytosol.

Auch wenn bis heute die exakte Virulenzfunktion des HrpZ1-Effektorproteins nicht bekannt ist, so deuten *in planta*-Expressionsversuche auf eine extrazelluläre Funktion hin (Tampakaki and Panopoulos 2000). Da ausschließlich apoplastidär lokalisiertes HrpZ1 die HR auslösen kann, treten auch die pflanzlichen HrpZ1-Perzeptionssysteme nur extrazellulär auf und demnach muß sich HrpZ1 während des Infektionsprozesses außerhalb der Pflanzenzelle befinden. Ferner konnte die Fähigkeit, daß HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> in synthetischen Lipidmembranen Kationen-selektive Ionenkanäle bilden kann, schon vor einiger Zeit identifiziert werden (Lee *et al.* 2001b). Diese Fähigkeit stellt aller Wahrscheinlichkeit nach die für den Infektionsprozess relevante Virulenzfunktion des Proteins dar. Für die strukturell homologen Effektorproteine PopA aus *Ralstonia solanacearum* (Racape *et al.* 2005), HrpF aus *Xanthomonas campestris* (Büttner *et al.* 2002) und HrpN aus *Erwinia amylovora* (El-Maarouf *et al.* 2001) konnte ebenfalls eine Porenbildung in synthetischen Lipidmembranen nachgewiesen werden, so daß anscheinend pathovarübergreifend diese Eigenschaft die eigentliche Virulenzfunktion jener Proteine darstellt.

Die Porenbildungsfähigkeit wurde in Vorarbeiten (Engelhardt 2003), aber auch in dieser Arbeit unter Zuhilfenahme eines neu etablierten Liposomenassays näher untersucht (siehe Abbildung 2.7). Weitere Hinweise konnten durch Experimente mit aus lebenden Systemen stammenden Membranen gewonnen werden. Auch wenn die Verwendung von aus synthetischen Lipiden bestehenden Membranvesikeln in vielerlei Hinsicht vorteilhaft ist, kann es aufgrund von im Vergleich zu Lipidmembranen lebender Zellen fehlenden Oberflächenstrukturen zum Auftreten artifizieller Aktivitäten kommen. Im Fall von

HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> konnte jedoch eine mit synthetischen Liposomen identifizierte Porenbildung auch durch Patch-Clamp-Analysen mit *Xenopus laevis*-Oozyten (siehe Abbildung 3.9) sowie Experimenten zur Calcein-Freisetzung aus Asolectin-Liposomen (siehe Abbildung 3.10) festgestellt werden.

In synthetischen Liposomen, die mit Natrium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffmolekülen beladen sind, induziert die Applikation von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> bei einer gegebenen Liposomenmenge einen konzentrationsabhängigen Ionenfluß durch die Lipidschicht (siehe Abbildung 3.7). Da durch Zugabe von Detergenzien die resultierende Maximalfluoreszenz durch vollständiges Freisetzen des Farbstoffes um ein Vielfaches höher ist als die durch HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Zugabe hervorgerufene Fluoreszenzintensität während der Plateauphase (siehe Abbildung 3.8), ist zwingend davon auszugehen, daß die Natriumionen, welche die Fluoreszenz durch Interaktion mit dem Farbstoff auslösen, durch eine HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-gebildete Pore in die Liposomen einströmen. Die durch höhere HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Konzentrationen nicht weiter ansteigende Fluoreszenz läßt die Vermutung zu, daß sich nur eine bestimmte Anzahl an Proteinen in solch ein Lipidvesikel integrieren kann, ohne es dabei zur Lyse zu bringen. Auf der anderen Seite kann ein durch die hohe lokale Farbstoffkonzentration innerhalb der Liposomen auftretendes intermolekulares Selbstlöschen der Fluoreszenz für jenen Plateauwert verantwortlich sein, welches erst durch die Detergenz-vermittelte Lyse der Liposomen aufgehoben wird (siehe Abbildung 3.8).

Nach Behandlung von Carboxyfluoreszein-enthaltenden Liposomen mit HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> konnte kein Anstieg der Fluoreszenz verzeichnet werden (Justin Lee, persönliche Mitteilung), welcher zu beobachten gewesen wäre, wenn das durch hohe lokale Konzentrationen von negativ geladenem Carboxyfluoreszein verursachte Selbstlöschen der Fluoreszenz innerhalb der Liposomen durch Ausströmen der Farbstoffmoleküle aufgehoben werden würde. Ferner lassen Experimente mit anionenspezifischen Fluoreszeinderivaten, bei denen ebenfalls kein Effekt zu beobachten war (Justin Lee, persönliche Mitteilung), den Schluß zu, daß neben der Ladung des Porenlumens auch die Größenpermeabilität der HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Pore einen limitierenden Faktor darstellt. Ein einfacher Test unter Zuhilfenahme von Erythrozyten zur Ermittlung des Porendurchmessers (Tejuca *et al.* 2001) konnte jedoch nicht angewendet werden, da HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> eine für diesen experimentellen Ansatz notwendige hämolytische Eigenschaft nicht aufweist.

Im Gegensatz zu HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> resultierte die Applikation von PopA zu Carboxyfluoreszein-enthaltenden Liposomen in einem Fluoreszenzanstieg (Racape *et al.* 2005). Dieser Unterschied zu den HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Ergebnissen wurde entweder durch die Lyse der Liposomen während des Experiments verursacht oder beide Proteine, PopA und HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>, weisen trotz strukturellen Ähnlichkeiten Unterschiede in Ionenselektivität und/oder Porendurchmesser der durch sie gebildeten Pore auf. Es zeigten sich jedoch offensichtliche Ähnlichkeiten der HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-induzierten Membranströme in *Xenopus*-Eizellen zu PopA-induzierten Strömen (Racape *et al.* 2005) sowie zwischen den

Porenbildungen beider Effektoren in Asolectinliposomen, was auf eine funktionelle Analogie hindeutet.

Die durch HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> induzierte Porenbildung in den Eizellen ist reversibel, wobei die beobachteten Ströme keinerlei Übereinstimmung zu endogenen Strömen solcher *Xenopus*-Oozyten aufweisen (Weber 1999). Auch wenn daher eine Bestimmung der Ionenselektivität dieser Pore nicht möglich war, so kann man aber aufgrund der durch frühere elektrophysiologische Untersuchungen identifizierten Anionenimpermeabilität der HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Pore auf einen Kationenstrom schließen (Lee *et al.* 2001b).

Asolectin-Liposomen bestehen aus einem Gemisch natürlich vorkommender Phospholipide aus der Sojabohne (*Glycine max*) und stellen dementsprechend Membranen aus biologischen Systemen, speziell pflanzlichen Zellen dar. In früheren Versuchen konnte bereits eine Interaktion von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> mit diesen Membranen identifiziert werden (Lee *et al.* 2001b). HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> zeigte darüberhinaus eine mit der Proteinkonzentration zunehmende Membranpermeabilisierung für in solchen Asolectinliposomen enthaltendem Calcein (siehe Abbildung 3.10). Da Calcein ein Fluoresceinderivat ist und der Lumendurchmesser ein Ausströmen des Calceins zu verhindern scheint (siehe oben), erfolgte das Freisetzen des Farbstoffes aller Wahrscheinlichkeit nach durch porenvermittelten osmotischen Wassereintritt in die Liposomen gefolgt von der Lyse der Vesikel.

Nicht nur am Injektisom bzw. Translokon beteiligte Proteine, sondern auch bakterielle Toxine besitzen die Fähigkeit, in Membranen reversibel Poren zu bilden (Bender *et al.* 1999; Parker and Feil 2005). Die Natur porenbildender Proteintoxine ist extrem faszinierend, da sie als wasserlösliche Moleküle produziert und sekretiert werden, ihren physiologisch aktiven Status aber erst nach einer umfassenden Konformationsänderung erreichen, welche letztendlich zur Insertion in die Wirtszellmembran führt (Parker and Feil 2005). Von einer Reihe porenbildender Toxine sind solche Konformationsänderungen analysiert worden, beispielsweise Aerolysin aus *Aeromonas hydrophila* (Abrami *et al.* 2000),  $\alpha$ -Toxin von *Staphylococcus aureus* (Menestrina *et al.* 2003) und ClyA virulenter *Escherichia coli*- und *Salmonella enterica*-Stämme (Eifler *et al.* 2006). Durch zunehmende Konzentration eines membranimitierenden Detergenz, Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid, konnte für HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> mittels CD-Spektroskopie ebenfalls eine solche Konformationsänderung festgestellt werden (siehe Abbildung 3.26). Es zeigt sich deutlich, daß der  $\alpha$ -helikale Anteil in der Lipidphase dominiert, während HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> im wäßrigen Milieu zum größten Teil aus  $\beta$ -Faltblättern besteht. Da der zufällig gefaltete Sekundärstrukturanteil konstant bleibt, kann man davon ausgehen, daß es sich bei dieser Konformationsänderung um eine intrinsisch vorhandene Proteineigenschaft handelt und nicht um eine Denaturierung. Inwiefern die  $\beta$ -Faltblattanteile direkt in  $\alpha$ -helikale Bereiche übergehen läßt sich nicht belegen. Jedoch ist diese dokumentierte spezifische Konformationsänderung ein klarer Hinweis darauf, daß HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> ein amphipathisches Molekül darstellt, eine Funktion in einer Membran haben

könnte und darüberhinaus die durch HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> gebildete Pore ähnlich jenen von  $\alpha$ -PFTs wahrscheinlich durch  $\alpha$ -Helices stabilisiert wird (Gouaux 1997). Ein HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-ähnliches Protein, HpaG aus *Xanthomonas* spp., zeigt eine solche Konformationsänderung nach einer mehrtägigen Inkubation bereits in wässrigem Milieu (Oh *et al.* 2007). Ob es sich hierbei jedoch um eine spezifische und für die Funktion des Proteins essentielle Konformationsänderung handelt, ist jedoch fraglich, da diese Proteine aufgrund des hohen Anteils an hydrophoben Proteinregionen in hohen Konzentrationen den Hang zur unspezifischen Aggregation zeigen, wobei ebenso eine Veränderung der Konformation eintritt.

Für PopA aus *Ralstonia solanacearum* konnte eine lipidbindende Aktivität verstärkt bei Vorhandensein von Cholesterin und Sphingolipiden beobachtet werden (Racape *et al.* 2005). Cholesterin ist ebenso für die Porenbildung des bakteriellen Toxins A aus *Clostridium difficile* notwendig (Giesemann *et al.* 2006). Einige porenbildende Toxine erkennen Lipide (Cholesterin), Lipidderivate (Ganglioside) oder GPI-verankerte, in Lipidmikrodomänen ("lipid rafts"; Bhat and Panstruga 2005) lokalisierte Proteine als Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Diese Mikrodomänen sind bedeutende Regulationsstellen für eine Vielzahl von zellulären Prozessen in Pflanzen und Tieren (Simons and Ikonen 1997; Brown and London 2000), so beispielsweise Signaltransduktion, polarisierte Sekretion, Membrantransport, Organisation des Zytoskeletts, Apoptose, Ausbildung der Zellpolarität (Oliferenko *et al.* 1999; Simons and Toomre 2000; Rosenberger *et al.* 2000; Bagnat and Simons 2002). Inwiefern HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> bei der Integration in pflanzliche Membranen preferentielle Regionen besitzt bzw. solche „lipid rafts“ die Orte der HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Einlagerung und –Porenbildung darstellen, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht geschlossen werden, auch wenn die in dieser Arbeit genutzten Membransysteme in ihrer Komposition deutlich unterschiedlichen Charakter aufweisen und eine Porenbildung in allen Systemen nachweisbar war. HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> kann allerdings verstärkt mit negativ geladenen Phosphoglyzerolipiden und Phosphatidylethanolamin-enthaltenden Lipidmembranen assoziieren (Lee *et al.* 2001b), die beide Bestandteile pflanzlicher Plasmamembranen sind (Staehelin and Newcomb 2000).

Ein Schlüsselereignis während der Konformationsänderung bei Eintritt von Proteintoxinen in die lipophile Phase ist neben der Freilegung von hydrophoben Oberflächen die Assoziation in multimere Strukturen. So initiiert erst eine membranabhängige Konformationsänderung die Cholesterin-abhängige Cytolysin-Oligomerisation und anschließende Porenbildung (Ramachandran *et al.* 2004). Für viele weitere porenbildende bakterielle Toxine konnte gezeigt werden, daß der in der Zielmembran vorhandene Kanal aus mehreren Untereinheiten des gleichen Monomers besteht (Tilley *et al.* 2005; Parker and Feil 2005; Valeva *et al.* 2006) und daß eine Assoziation in oligomere Strukturen Voraussetzung für die Insertion in Zielmembranen ist (Parker and Feil 2005). Pneumolysin beispielsweise, ein porenbildendes Toxin aus

*Streptococcus pneumoniae*, besteht in seiner oligomeren Form aus bis zu 44 Untereinheiten (Tilley *et al.* 2005). Wie wichtig Homooligomerisierungen für die Virulenz sein können, zeigen Beispiele verschiedener porenbildender bakterieller Toxine, bei denen Mutationen, die die Toxinoligomerisation beeinflussten, einen starken Rückgang der Toxizität zur Folge hatten (Walker and Bayley 1995; Abdel Ghani *et al.* 1999; Baba Moussa *et al.* 2006; Genisset *et al.* 2006; Melton-Witt *et al.* 2006). Es sollte daher geprüft werden, ob HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> ebenfalls homooligomerisieren kann. Aufgrund fehlender Cysteinreste würde die Stabilisierung eines HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Oligomers nur mittels intermolekularer hydrophober Wechselwirkungen gewährleistet sein.

Die Fähigkeit der HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Homooligomerisierung konnte in verschiedenen experimentellen Ansätzen wie Gelfiltration, BlueNative-PAGE und chemischem Quervernetzen nicht nur *in vitro*, sondern mittels des Hefe-2-Hybrid-Systems auch *in vivo* dokumentiert werden. Außerdem begünstigt die Calciumbindung die Bildung höhermolekularer HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Komplexe, während die Dimerisierung Calcium-unabhängig stattfindet (siehe Abbildung 3.16a und Abbildung 3.16b). Ein weiteres Indiz für die hohe Stabilität der HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Dimerisierung war das Vorhandensein einer Dimerbande nach Auftrennung in einer denaturierenden SDS-PAGE (siehe Abbildung 3.13).

Somit scheint in wäßrigen Apoplastbedingungen HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> aufgrund der erhaltenen Resultate überwiegend als Dimer vorzuliegen (siehe u.a. Abbildung 3.17 und Abb.3.18), während ein höhermolekulares Oligomer in verhältnismäßig geringer Konzentration auftritt. Auch wenn eine verstärkte Bildung solcher Komplexe in Lösung erst bei höheren Calciumionen-Konzentrationen beobachtet werden kann, ist eine gewisse physiologische Bedeutung der Calciumbindung durch im Apoplasten lokal vorkommende höhere Ionenkonzentrationen vorstellbar. Für lipidbindende Proteine ist Calcium oftmals z.B. für eine korrekte Faltung notwendig (Creutz *et al.* 1998; Gerke and Moss 2002). Wie aus Experimenten mit dem strukturhomologen Effektorprotein PopA aus *Ralstonia solanacearum* ferner ersichtlich ist, vollzieht sich die Lipidinteraktion auf eine Calcium-abhängige Art und Weise (Racape *et al.* 2005). Außerdem wird die PopA-Homooligomerisierung durch Calcium unterstützt. HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> bindet das bivalente Kation nach einem bislang unbekanntem Mechanismus, da die Deletion der nahe des C-Terminus gelegenen Sequenz „GxGT-[37 Reste]-D“ nicht zum Verlust der Calciumbindung führt, wie die unveränderte Bandenintensität der Mutanten 6 und 7 im Autoradiogramm belegt (siehe Abbildung 3.15). Die nahezu identische und evolutionär hochkonservierte Sequenz „GxGT-[38 Reste]-D/E“ ist in membranbindenden Annexinen für die Calciumbindung verantwortlich (Moss and Morgan 2004). Um die Bedeutung von Calcium für die HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Homooligomerisierung in lipophilen Bedingungen abzuschätzen, müssten weiterführende Experimente durchgeführt werden. Anhand der Ergebnisse der BlueNative-PAGE kann man vermuten, daß HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> nach Eintritt in die lipophile Phase einer Membran nicht mehr nur überwiegend als Dimer vorliegt, sondern sich auch höhermolekulare Oligomere bilden können (siehe Abbildung 3.19). Im Gegensatz dazu

konnten Gelfiltrationsversuche mit HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>, das in unterschiedlichen Zeiträumen mit Octyl-β-D-Glucopyranosid, einem membranimitierenden Detergenz, inkubiert wurde, eine solche Detergenz-induzierte Oligomerisierung nicht belegen, wie sie beispielsweise für ClyA, einem porenbildenden Toxin virulenter *Escherichia coli*- und *Salmonella enterica*-Stämme, beobachtet wurde (Eifler *et al.* 2006). Es muß aber erwähnt werden, daß lediglich die Vorinkubation in Detergenz-enthaltendem Medium erfolgte, der Lauf über die Gelfiltrationssäule war detergenzfrei, so daß dieses erhaltene Ergebnis, ein konstant dominanter Dimerpeak, möglicherweise durch das in der Säule vorhandene wäßrige Milieu hervorgerufen wurde.

Elektronenmikroskopische Analysen sollten Aufschluß geben über eine bereits in wäßriger Lösung feststellbare Porenstruktur, wie sie beispielsweise für porenbildende Toxine wie Perfringolysin O (PFO, Dang *et al.* 2005), Pneumolysin (Tilley *et al.* 2005), Equinatoxin II (Bonev *et al.* 2003) oder ClyA (Eifler *et al.* 2006) gezeigt wurden. Allerdings konnten ähnliche, von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> gebildete Strukturen nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 3.25). Da in Lösung das Dimer überwiegt, war die Vergrößerung zu gering, um Strukturen solch geringer Größe sichtbar zu machen. Deutlich erkennbar waren lediglich an Präzipitate erinnernde Anordnungen sowie filamentähnliche Strukturen, wie sie auch durch Oh *et al.* 2007 gezeigt wurden und möglicherweise jenen im Vergleich zum Dimer mengenmäßig geringer auftretenden hochwertigen Komplex darstellen, welcher in Gelfiltrationsexperimenten und im BlueNative-Verfahren beobachtet wurde. Solche Fibrillen werden ebenso durch HrpN aus *Erwinia* spp. sowie HpaG aus *Xanthomonas* spp. zeitlich abhängig gebildet (Oh *et al.* 2007). Auch wenn eine biologische Bedeutung jener Fibrillenbildung für die Funktion jener Proteine postuliert wird, so darf man im Falle von HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> die bei hohen Konzentrationen auftretende unspezifische Aggregation nicht außer acht lassen. So stellen diese im EM beobachteten Filamente wohl eher durch den hohen Anteil an hydrophoben Strukturbereichen hervorgerufene unspezifische HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Konglomerate dar. Darüberhinaus wurden diese Strukturen erst innerhalb von 48 Stunden sichtbar, eine für den Aufbau des Typ-III-Sekretionssystems während der Infektion der Pflanze irrelevante Zeitspanne. Außerdem ist es vorstellbar, daß eine porenähnliche Struktur erst nach Interaktion mit Lipidkomponenten gebildet wird, was umfangreiche Konformationsänderungen des Proteins nach Inkubation in lipidähnlichen Bedingungen vermuten lassen (siehe oben), und daher in wäßriger Lösung nicht sichtbar ist.

Zusammenfassend stellt sich das HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Effektorprotein als ein zur Dimerisierung befähigter Ionenporenbildner dar, welcher nach Eintritt in eine lipophile Phase einer spezifischen Konformationsänderung unterliegt, welche wahrscheinlich für den strukturellen Aufbau der Pore notwendig ist. Frühere Annahmen einer in der pflanzlichen Plasmamembran lokalisierten Virulenzfunktion werden durch die HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-vermittelte Porenbildung in Asolectinliposomen gestützt. Im Moment können noch keine definitiven Aussagen getroffen werden, inwiefern eine Homooligomerisierung von

HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> für die bakterielle Infektion von Bedeutung ist. Da *hrpZ1*-defiziente Bakterien keine Beeinträchtigung der Virulenz zeigen (Alfano *et al.* 1996), ist eine HrpZ1-Homooligomerisation scheinbar für den Infektionsprozeß nicht essentiell, solange Harpine redundanter Funktion diesen Verlust komplementieren (HrpK, HrpW1, HopAK1, Kvitko and Collmer, pers. Mitteilung). Es scheint jedoch, daß Deletionen im Gesamtprotein, die einen blockierenden Einfluß auf die Oligomerisierung haben, auch die als Virulenzfunktion vermutete Membranpermeabilisierung beeinträchtigen. So weist die Mutante 6 (siehe Abbildung 3.11) neben der stark verminderten Porenbildung (siehe Tabelle 3.2) auch die Unfähigkeit zur Homooligomerisierung auf (Haapalainen, pers. Mitteilung). Höchstwahrscheinlich ist die Homooligomerisierung ähnlich porenbildenden Toxinen (Parker and Feil 2005) eine grundlegende Voraussetzung für die HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Virulenzfunktion. Die sich in der pflanzlichen Plasmamembran befindliche HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Pore wird höchstwahrscheinlich nicht von einem einzigen Proteinmolekül gebildet.

Frühere Studien verdeutlichten die Fähigkeit der hydrophoben N- und C-terminalen HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Abschnitte, mit Lipiden zu assoziieren (Lee *et al.* 2001b). Auch für YopB, einem Typ-III-sekretierten und am Translokon beteiligten Protein aus *Yersinia* spp. (Håkansson *et al.* 1996; Neyt and Cornelis 1999), welches darüberhinaus über strukturelle Ähnlichkeiten zu HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> verfügt, konnten Domänen verantwortlich für unterschiedliche Prozesse wie Sekretion, Porenbildung oder Translokation identifiziert werden (Ryndak *et al.* 2005). Ein weiteres Typ-III-sekretiertes Effektorprotein, Tir aus enteropathogenen *Escherichia coli*-Bakterien, weist eine membraninsertierende Domäne sowie eine Domäne zur Interaktion mit bakteriellem Intimin auf, wobei beide Vorgänge sich als essentiell für die Virulenz darstellen (Race *et al.* 2006). Wahrscheinlich ist auch HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> ein in mehrere funktionelle Domänen gegliedertes Protein. Die hydrophile zentrale HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Region bildet aller Wahrscheinlichkeit nach das Porenlumen, während die beiden angrenzenden Bereiche u.a. die Insertion in die Membran vermitteln und im Falle des C-terminalen Abschnitts möglicherweise die Homooligomerisierung vermitteln. Werden durch Deletionen Teile des C-terminalen Abschnitts wie in der Mutante 6 entfernt, so wird möglicherweise 1. die Dimerisierung beeinträchtigt, die anscheinend für die Porenbildung notwendig ist und kann 2. eine korrekte Membraninsertion nicht mehr erfolgen, da ein großer hydrophober Bereich für die Stabilisierung in der Lipidphase fehlt. Zusätzliche Bereiche des Proteins, die bis jetzt noch unbekannt sind, könnten an der Interaktion mit den an der Effektortranslokation beteiligten Harpinen beteiligt sind (Kvitko and Collmer, pers. Mitteilung).

### 4.3 Ionenporenbildung und pflanzliche Immunabwehr

Durch die bisherigen Ausführungen wurde die duale Rolle der Harpine und speziell HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> während des Infektionsprozesses deutlich. Der Ionenporenbildung in der pflanzlichen Plasmamembran, welche vermutlich die eigentliche Virulenzfunktion darstellt, steht die Induktion pflanzlicher Immunreaktionen gegenüber. Im Gegensatz zu Polyantibiotika wie Amphotericin B (Jabs *et al.* 1997), bestimmten natürlichen Elicitoren (Klüsener and Weiler 1999) oder bakteriellen Toxinen (Bender *et al.* 1999), deren porenbildende Aktivität zur Stimulation der pflanzlichen Immunreaktionen führt, werden die durch HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> induzierten pflanzlichen Abwehrreaktionen nicht durch dessen Ionenkanalbildung in der Plasmamembran verursacht. Für beide Vorgänge sind unterschiedliche strukturelle Voraussetzungen notwendig, wie durch Untersuchungen mit verschiedenen HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Deletions- bzw. -Insertionskonstrukten sowie orthologen Proteinen anderer phytopathogener Bakterien nachvollzogen werden konnte (Lee *et al.* 2001a; Engelhardt 2003; diese Arbeit). Während die zu HrpZ1 strukturell orthologen Proteine HrpN aus *Erwinia amylovora*, PopA aus *Ralstonia solanacearum* und HreX aus *Xanthomonas campestris* in HrpZ1-ähnlichen Konzentrationsbereichen Ionenporen bilden konnten, war nur HrpZ1 in der Lage die Phytoalexinproduktion in Petersiliezellensuspensionen zu induzieren. Außerdem rufen limitierte Variationen der HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Primärstruktur, wie sie durch pentamere Aminosäureinsertionen verursacht werden (Engelhardt 2003), z.T. aber auch Deletionen von enormer Größe keine Beeinträchtigungen der Virulenzfunktion hervor. Jedoch schwächen Insertionen von 5 Aminosäuren im C-terminalen Bereich die immunostimulatorische Aktivität. Anscheinend kann das Protein Veränderungen der Struktur ohne Verlust der porenbildenden Eigenschaften tolerieren. Werden allerdings speziell im C-terminalen Bereich umfangreiche Proteinabschnitte deletiert, ist diese porenbildende Virulenzfunktion nicht mehr beobachtbar (siehe Tabelle 3.2), möglicherweise aufgrund der beeinträchtigten Fähigkeit zur Oligomerisation (siehe 4.2; Haapalainen, pers. Mitteilung). Ferner weisen porenbildungsinactive, C-terminale Fragmente immunostimulatorische Fähigkeiten auf (Lee *et al.* 2001a; Engelhardt 2003) und belegen dadurch ebenfalls die strukturelle Separierung von Virulenzfunktion und Abwehrinduktion. Bedenkt man die Bedeutung des C-terminalen Abschnitts für die abwehrinduzierende Aktivität des HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Effektors (siehe auch 4.1), perzipieren Pflanzen also präferentiell jene für die Ausführung der Virulenzfunktion essentielle Region des Proteins. Diese Erkennung von Strukturbereichen, deren Verlust zur Inaktivierung der Gesamtfunktion führt, wird beispielsweise auch durch die Perzeption des Pep13-Epitops einer Oomyceten-Transglutaminase verdeutlicht, auch wenn die Bedeutung des Enzyms für den Infektionsprozeß noch unklar ist (Nürnberger *et al.* 1994; Brunner *et al.* 2002). Jede Veränderung dieses Epitops, die eine geringere Perzeption durch die Pflanze zur Folge hat, bewirkt ebenso einen umfassenden

Aktivitätsrückgang der Transglutaminaseaktivität. Der durch HrpZ1<sub>PspH</sub>-Applikation in den Apoplasten mancher Pflanzen hervorgerufene Zelltod konnte durch Inhibitoren der RNA- und Proteinsynthese sowie durch Ionenkanalantagonisten vollständig verhindert werden (He *et al.* 1993; Charkowski *et al.* 1998), was zusätzlich verdeutlicht, daß die Zelltodreaktion auf pflanzlichem Stoffwechsel beruht und nicht auf einer toxischen Wirkung verursacht durch die HrpZ1<sub>PspH</sub>-vermittelte Membranpermeabilisierung. Die immunostimulatorische Aktivität basiert auf der Nichtselbst-Perzeption bestimmter Bereiche des Proteins, die Ähnlichkeit zur PAMP-Erkennung durch Wirtsrezeptoren aufweist.

### 4.4 *Schlußfolgerungen*

Auf der Grundlage der bisherigen Kenntnisse sind verschiedene Szenarien der HrpZ1<sub>PspH</sub>-Virulenzfunktion während der Infektion durch phytopathogene *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*-Bakterien denkbar. In jedem Fall liegt das unter apoplastidären Bedingungen massiv produzierte und Typ-III-sekretierte HrpZ1<sub>PspH</sub>-Protein (Roine *et al.* 1997a; Alfano *et al.* 2000; Guttman *et al.* 2006) innerhalb der Zellwandregion vorwiegend als Dimer vor und unterliegt nach dem Eintritt in die lipophile Phase der pflanzlichen Plasmamembran einer umfassenden spezifischen Konformationsänderung, die zu einer Porenbildung führt.

Zum einen kann diese Porenbildung an der Effektortranslokation in das Wirtszytosol beteiligt sein. Einzelne Proteine des Typ-III-Translokons tierischer Pathogene wie beispielsweise YopB weisen porenbildenden Charakter auf (Håkansson *et al.* 1996), jedoch ist für die Virulenz die Interaktion aller am Translokon beteiligten Proteine, YopB, YopD und LcrV, notwendig (Tardy *et al.* 1999). Die bereits erwähnten Resultate von Kvitko und Collmer (pers. Mitteilung) lassen daher vermuten, daß HrpZ1<sub>PspH</sub> im Falle einer Beteiligung an der Effektortranslokation während des Prozesses mit HrpK1, HrpW1 oder HopAK1 interagiert, wobei eines dieser Proteine mit dem HrpA1-Pilus die Verbindung zum Sekretionsapparat herstellen muß. Laut Brown *et al.* 2001 zeigt HrpZ1<sub>PspH</sub> eine Assoziation mit dem Hrp-Pilus, allerdings konnte im Hefe-2-Hybrid-System eine Interaktion zwischen HrpZ1<sub>PspH</sub> und HrpA1<sub>PspH</sub>, dem Pilusprotein, nicht festgestellt werden (siehe Abbildung 3.22). Darüberhinaus war auch keine Interaktion der HrpA1-Proteine untereinander festzustellen. Ursache für diese unerwartete Beobachtung, da der Hrp-Pilus eigentlich ein HrpA1-Oligomer darstellt (Roine *et al.* 1997b), könnten einmal fehlende Regulationselemente wie Chaperone im Hefesystem sein, die im Bakterium inkorrekte Interaktionen vermeiden. Ein weiterer Grund für die ebenfalls nicht festgestellte HrpZ1<sub>PspH</sub>-HrpA1<sub>PspH</sub>-Interaktion könnte ein zusätzliches HrpA1<sub>PspH</sub>-Pilusbindeprotein sein, mit welchem HrpZ1<sub>PspH</sub> interagiert. Ein solcher Kandidat könnte das HrpW1<sub>PspH</sub>-Protein sein,

welches eine Harpin- sowie eine Pektinbindungsdomäne enthält (Charkowski *et al.* 1998) und dessen Pilusinteraktion bereits gezeigt wurde (Jin and He 2001). Jedoch konnte ebenso hier eine HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Interaktion nicht detektiert werden (siehe Abbildung 3.23), genauso blieb die gezeigte HrpW1-HrpA1-Interaktion (Jin and He 2001) nichtdetektierbar, trotzdem alle Proteine exprimiert wurden (nicht gezeigt). Zusätzlich zu fehlenden Regulationsmodulen im Hefesystem könnte diesmal auch die Membranständigkeit der Harpine die Ursache sein, weswegen eine Interaktion nicht beobachtet werden konnte. Darüberhinaus könnte es sich bei den durch Brown *et al.* 2001 und Jin and He (2001) mittels Immunogoldmarkierungsversuche gezeigten HrpZ1- und HrpW1-Interaktionen mit dem HrpA1-Pilus um Experimentartefakte handeln. Sollte HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub> ein Teil des Translokons sein, welches für die Injektion der Effektorproteine in das Wirtszytosol verantwortlich ist, so wäre eine Interaktion mit HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub> vorstellbar, da HrpW1 durch Kvitko und Collmer (pers. Mitteilung) ebenfalls eine Translokationsfunktion zugeschrieben wird. Somit können HrpA1<sub>P<sub>sph</sub></sub> und HrpW1<sub>P<sub>sph</sub></sub>, ohne zusätzliche Experimente wie beispielsweise das für membranständige Proteine besser geeignete Split-Ubiquitin-System heranzuziehen, als mögliche HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Interaktoren nicht ausgeschlossen werden. Ob HrpK1, für das die Funktion als Translokator in früheren Studien bereits postuliert wurde (Petnicki-Ocwieja *et al.* 2005; Kvitko and Collmer, pers. Mitteilung), ein HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Interaktor ist, müssen ebenfalls künftige Experimente zeigen. Ferner könnte versucht werden, die durch Kvitko und Collmer genutzten Vierfach-Knockout-Mutanten ( $\Delta hrpZ1$ ,  $\Delta hrpW1$ ,  $\Delta hrpK1$ ,  $\Delta hopAK$ ), die keine Fähigkeit zur Effektortranslokation besitzen, durch porenbildungsinaktive HrpZ1-Konstrukte zu komplementieren, um eine Beteiligung der HrpZ1-vermittelten Porenbildung für die Effektortranslokation abzuschätzen.

Die HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Pore kann aber alternativ auch für die Ernährung der apoplastidär lebenden Bakterien sorgen, indem aus dem pflanzlichen Zytoplasma aufgrund einer möglichen porenbildenden Toxinwirkung von HrpZ1 Nährstoffe freigesetzt werden. Bei dieser Variante kann sehr wahrscheinlich auch ein höherwertiges HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Homooligomer diese Aufgabe erfüllen.

Zusätzlich zu seiner Funktion als Virulenzfaktor determiniert eine Region nahe des C-Terminus die immunostimulatorische Aktivität des HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Effektorproteins. Die Aktivierung von PAMP-responsiven Ionenkanälen und MAP-Kinasekaskaden, die Sättigungskinetik der Phytoalexinproduktion, die saturierbare, hochaffine HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Bindungsstelle in Tabak (Lee *et al.* 2001a) sowie die Peptidbindungsstelle innerhalb des HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Proteins (Li *et al.* 2005) lassen einen in der pflanzlichen Plasmamembran lokalisierten Rezeptor vermuten.

### 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die duale Rolle des Typ-III-Effektors HrpZ1 aus dem Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* während des Infektionsprozesses näher charakterisiert werden, welche einmal in seiner immunostimulatorischen Aktivität und zum anderen in der eigentlichen Virulenzfunktion besteht. Die Verwendung von Petersiliezellkulturen ermöglichte die Detektion und Analyse der durch HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Applikation induzierten pflanzlichen Signal- und Abwehrreaktionen wie beispielsweise Mediumalkalisierung, MAP-Kinaseaktivierung, Synthese reaktiver Sauerstoffspezies und antimikrobieller Phytoalexine. Es zeigten sich dabei auffallende Ähnlichkeiten zu PAMP-ausgelösten Immunreaktionen. Auch wenn HrpZ1 im Gegensatz zu PAMPs nicht konstitutiv vorhanden ist und auch der Verlust dieses Effektors den mikrobiellen Lebenszyklus nicht beeinträchtigt, so ist HrpZ1 ähnlich den klassischen PAMPs ein bestimmender Faktor der Nichtselbsterkennung in Pflanzen und trägt dadurch zur Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae*-Pathovaren bei.

Anhand verschiedener experimenteller Ansätze, die auf synthetischen Liposomen, aber auch auf biologischen Membranen basierten, kann eine in früheren Arbeiten identifizierte Ionenporenbildung nicht nur bestätigt werden, sondern es läßt sich auch der Schluß ziehen, daß die Porenbildung in pflanzlichen Membranen die Virulenzfunktion des Proteins darstellt. Die spezifische Konformationsänderung des Proteins nach Inkubation in zunehmend lipophilerer Umgebung, wie sie mittels CD-spektroskopischer Analyse festgestellt wurde, stützt die Annahme einer membrangebundenen Funktion. Außerdem weist HrpZ1 die Fähigkeit zur Homooligomerisierung auf, deren Notwendigkeit für die Porenbildung mit Hilfe von Deletionskonstrukten nachgewiesen werden konnte. Durch Calcium, das von HrpZ1 gebunden werden kann, wird zumindest die Oligomerisierung zu höheren Komplexen begünstigt, die Dimerisierung erfolgt Calcium-unabhängig. Inwiefern das Protein an der Effektortranslokation beteiligt ist, was jüngste Mutationsstudien vermuten lassen (Kvitko and Collmer, pers. Mitteilung), kann noch nicht belegt werden, da eine Interaktion weder mit dem Pilusprotein, HrpA1, noch mit einem putativen Translokationsprotein, HrpW1, im Hefe-2-Hybrid-System nachzuweisen waren.

Die HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-vermittelte Porenbildung ist jedoch nicht die Ursache für dessen immunostimulatorische Aktivität, d.h. beide Prozesse, Porenbildung und Abwehrinduktion, laufen unabhängig voneinander ab. Unter Zuhilfenahme verschiedener HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Deletionskonstrukte konnte festgestellt werden, daß für die Ionenporenbildung mehr oder weniger das Gesamtprotein notwendig ist, während die Induktion pflanzlicher Abwehrreaktionen durch Perzeption einer nahe des C-Terminus des Proteins gelegenen Region verursacht wird. Diese strukturelle Separierung verdeutlicht die Dualität des Proteins während des Infektionsprozesses.

Die Entschlüsselung der dreidimensionalen Struktur des Proteins könnte es ermöglichen, daß exaktere Aussagen über die wirkliche Virulenzfunktion sowie mögliche Interaktionspartner getroffen werden könnten. Daher ist eine Optimierung der Kristallisationsbedingungen erstrebenswert.

Ein weiterer interessanter Aspekt wäre die Erforschung des möglichen Rezeptors, welcher an der HrpZ1-induzierten Stimulation pflanzlicher Abwehrreaktionen beteiligt ist. Ein solches Rezeptormolekül könnte aufgrund der Hitze- und Proteaseresistenz einer bislang unbekanntem Rezeptorklasse angehören und möglicherweise Glykolipidcharakter haben.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abdel Ghani, E.M., Weis, S., Walev, I., Kehoe, M., Bhakdi, S. and Palmer, S.** (1999). Streptolysin O: inhibition of the conformational change during membrane binding of the monomer prevents oligomerization and pore formation. *Biochemistry* **38**, 15204-15211.
- Abrami, L., Fivaz, M. and van der Goot, F.G.** (2000). Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface. *Trends Microbiol.* **8**, 168-172.
- Aderem, A. and Ulevitch, R.** (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**, 782-787.
- Akeda, Y. and Galan, J.E.** (2005). Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**, 911-915.
- Akira, S.** (2003). Toll-like receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 38105-38108.
- Akira, S. and Takeda, K.** (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Rev. Immunol.* **4**, 499-511.
- Akira, S., Yamamoto, M. and Takeda, K.** (2003). Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem. Society Transactions* **31**, 637-642.
- Alfano, J.R. and Collmer, A.** (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**, 385-414.
- Alfano, J.R., Bauer, D.W., Milos, T.M. and 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. and Collmer, A.** (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**, 4856-4861.
- Alvarez, M.E.** (2000). Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol. Biol.* **44**, 429-442.
- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A. and Lamb, C.** (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**, 773-784.
- Arlat, M., Gough, C.L., Zischek, C., Barberis, P.A., Trigalet, A. and Boucher, C.** (1992). Transcriptional organization and expression of the large *hrp* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe. Interact.* **5**, 187-193.
- Arnold, D.L., Jackson, R.W., Fillingham, A.J., Goss, S.C., Taylor, J.D., Mansfield, J.W. and Vivian, A.** (2001). Highly conserved sequences flank avirulence genes: isolation of novel avirulence genes from *Pseudomonas syringae* pv. *lisi*. *Microbiology* **147**, 1171-1182.
- Arnold, D.L., Pitman, A. and Jackson, R.W.** (2003). Pathogenicity and other genomic islands in plant pathogenic bacteria. *Mol. Plant Pathol.* **4**, 407-420.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M. and Sheen, J.** (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.
- Atkinson, M.M., Midland, S.L., Sims, J.J. and Keen, N.T.** (1996). Syringolide 1 triggers Ca<sup>2+</sup> influx, K<sup>+</sup> efflux, and extracellular alkalization in soybean cells carrying the disease resistance gene *Rpg4*. *Plant Physiol.* **112**, 297-302.

- Ausubel, F.M.** (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat. Immunol.* **6**, 973-979.
- Auvray, F., Thomas, J., Fraser, G.M. and Hughes, C.** (2001). Flagellin polymerisation control by a cytosolic export chaperone. *J. Mol. Biol.* **308**, 221-229.
- Axtell, M.J. and Staskawicz, B.J.** (2003). Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* **112**, 369-377.
- Axtell, M.J., Chisholm, S.T., Dahlbeck, D. and Staskawicz, B.J.** (2003). Genetic and molecular evidence that the *Pseudomonas syringae* type III effector protein AvrRpt2 is a cysteine protease. *Mol. Microbiol.* **49**, 1537-1546.
- Baba Moussa, L., Werner, S., Coraiola, M., Colin, D.A., Keller, D., Sanni, A., Dalla Serra, M., Monteil, H. and Prevost, G.** (2006). Site-directed mutagenesis to assess the binding capacity of class S protein of *Staphylococcus aureus* leucotoxins to the surface of polymorphonuclear cells. *J. Biomed. Biotechnol.* **2006**, 1-8.
- Bagnat, M. and Simons, K.** (2002). Cell surface polarization during yeast mating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14183-14188.
- Baker, C.J., Orlandi, E.W. and Mock, N.M.** (1993). Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiol.* **102**, 1341-1344.
- Barroso, J.B., Corpas, F.J., Carreras, A., Sandalio, L.M., Valderrama, R., Palma, J.M., Lupiáñez, J.A. and del Rio, L.A.** (1999). Localization of nitric oxide synthase in plant peroxisomes. *J. Biol. Chem.* **274**, 36729-36733.
- Barton, G.M. and Medzhitov, R.** (2003). Toll-like receptor signalling pathways. *Science* **300**, 1524-1525.
- Bates, S., Cashmore, A.M. and Wilkins, B.M.** (1998). IncP plasmids are unusually effective in mediating conjugation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the Tra2 mating system. *J. Bacteriol.* **180**, 6538-6543.
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R. and Dangl, J.L.** (2004a). Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **7**, 391-399.
- Bender, C.L., Alarcon-Chaidez, F. and Gross, D.C.** (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 266-292.
- Bergelson, J., Kreitman, M., Stahl, E. and Tian, D.** (2001). Evolutionary dynamics of R-genes. *Science* **292**, 2281-2285.
- Beutler, E., Gelbart, T. and West, C.** (2001). Synergy between TLR2 and TLR4: a safety mechanism. *Blood Cells Mol. Dis.* **27**, 728-730.
- Bhat, R.A. and Panstruga, R.** (2005). Lipid rafts in plants. *Planta* **223**, 5-19.
- Binet, R., Letoffe, S., Ghigo, J.M., Delepelaire, P. and Wandersman, C.** (1997). Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters – a review. *Gene* **192**, 7-11.
- Birnboim, H.C. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Blatt, M.R., Grabov, A., Brearley, J., Hammond-Kosack, K. and Jones, J.D.G.** (1999). K<sup>+</sup> channels of *Cf-9* transgenic tobacco plants as targets for *Cladosporium fulvum* Avr9 elicitor-dependent signal transduction. *Plant J.* **19**, 453-462.

- Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiaux, V., Parsot, C. and Sansonetti, P.** (1999). The tripartite type III secretin of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J. Cell Biol.* **147**, 683-693.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, E., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P. and Allaoui, A.** (2001). Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretin. *Mol. Microbiol.* **39**, 652-663.
- Blocker, A., Komoriya, K. and Aizawa, S.I.** (2003). Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 3027-3030.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J.** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Bohlmann, H.** (1994). The role of thionins in plant protection. *Crit. Rev.Plant Sci.* **13**, 1-16.
- Boland, A., Sory, M.P., Iriarte, M., Kerbouch, C., Wattiau, P. and 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. *EMBP J.* **15**, 5191-5201.
- Boller, T.** (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 189-214.
- Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C. and Minibayeva, F.** (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.* **53**, 1367-1376.
- Bonas, U. and Lahaye, T.** (2002). Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 44-50.
- Bonev, B.B., Lam, Y.H., Anderluh, G., Watts, A., Norton, R.S. and Separovic, F.** (2003). Effects of the eukaryotic pore-forming cytolysin Equinatoxin II on lipid membranes and the role of sphingomyelin. *Biophys. J.* **84**, 2382-2392.
- Bourque, S., Binet, M.-N., Ponchet, M., Pugin, A. and Lebrun-Garcia, A.** (1999). Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. *J. Biol. Chem.* **274**, 34699-34705.
- Bretz, J.R., Mock, N.M., Charity, J.C., Zeyad, S., Baker, C.J. and Hutcheson, S.W.** (2003). A translocated protein tyrosine phosphatase of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 modulates plant defense response to infection. *Mol. Microbiol.* **49**, 389-400.
- Brown, D.A. and London, E.** (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **275**, 17221-17224.
- 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.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. and Warren, H.L.** (1998). Crystallography & NMR System: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crys. D* **54**, 905-921.
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J.J., Geiler, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D. and Nürnberger, T.** (2002). Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *EMBO J.* **21**, 6681-6688.
- Bundock, P., den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A. and Hooykaas, P.J.J.** (1995). Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14**, 3206-3214.

- Burnette, W.N.** (1981). "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.
- Büttner, D. and Bonas, U.** (2002). Getting across – bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J.* **21**, 5313-5322.
- 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.
- Cascales, E. and Christie, P.J.** (2003). The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 137-149.
- Chang, J.H., Urbach, J.M., Law, T.F., Arnold, L.W., Hu, A., Gombar, S., Grant, S.R., Ausubel, F.M. and Dangel, J.L.** (2005). A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 2549-2554.
- Charkowski, A.O., Alfano, J.R., Preston, G., Yuan, J., He, S.Y. and 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.
- Charnet, P., Molle, G., Marion, D., Rousset, M. and Lullien-Pellerin, V.** (2003). Puroindolines from ion channels in biological membranes. *Biophys. J.* **84**, 2416-2426.
- Chatterjee, A., Cui, Y. and Chatterjee, A.K.** (2002). Regulation of *Erwinia carotovora* hrpL (Ecc) ( $\sigma$ -L(Ecc)), which encodes an extracytoplasmic function subfamily of sigma factor required for expression of the HRP regulon. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**, 971-980.
- Chen, C.-H., Lin, H.-J. and Feng, T.-Y.** (1998). An amphipathic protein from sweet pepper can dissociate harpin<sub>PSS</sub> multimeric forms and intensify the harpin<sub>PSS</sub>-mediated hypersensitive response. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* **52**, 139-149.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T. and Felix, G.** (2006). The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**, 465-476.
- Chisholm, S.T., Dahlbeck, D., Krishnamurthy, N., Day, B., Sjolander, K. and Staskawicz, B.J.** (2005). Molecular characterization of proteolytic cleavage sites of the *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 2087-2092.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz, B.J.** (2006). Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**, 803-814.
- Cianciotto, N.P.** (2005). Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol.* **13**, 581-588.
- Clos, J. and Brandau, S.** (1994). pJC20 and pJC40 - two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **5**, 133-137.
- Coaker, G., Falick, A. and Staskawicz, B.** (2005). Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin. *Science* **308**, 548-550.
- Cohn, J., Sessa, G. and Martin, G.B.** (2001). Innate immunity in plants. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 55-62.
- Collmer, A., Lindeberg, M., Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D.J. and Alfano, J.R.** (2002). Genomic mining type type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors. *Trends Microbiol.* **10**, 462-469.
- Cornelis, G.R.** (2002). The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 742-752.
- Cornelis, G.R.** (2006). The type III secretion injectisome. *Nature Rev. Microbiol.* **4**, 811-825.

- Cornelis, G.R. and Wolf-Watz, H.** (1997). The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* **23**, 861-867.
- Cornelis, G.R. and van Gijsegem, F.** (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 735-774.
- Coventry, H.S. and Dubery, I.A.** (2001). Lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia* contribute to an enhanced defensive capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in *Nicotiana tabacum*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* **58**, 149-158.
- Crawford, N.M. and Guo, F.Q.** (2005). New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci.* **10**, 195-200.
- Creutz, C.E., Tomsig, J.L., Snyder, S.L., Gautier, M.C., Skouri, F., Beisson, J. and Cohen, J.** (1998). The copines a novel class of C2 domain-containing calcium-dependent phospholipid binding proteins conserved from *Paramecium* to humans. *J. Biol. Chem.* **273**, 1393-1402.
- Criekinge W.V. and Beyaert, R.** (1999). Yeast two-hybrid: State of art. *Biol. Procedures online* **2**; 1-38.
- Cueto, M., Hernandez-Perera, O., Martin, R., Bentura, M.L., Rodrigo, J., Lamas, S. and Golvano, M.P.** (1996). Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett.* **398**, 159-164.
- Czajkowsky, D.M., Hotze, E.M., Shao, Z. and Tweten, R.K.** (2004). Vertical collapse of a cytolysin prepore moves its transmembrane beta-hairpins to the membrane. *EMBO J.* **23**, 3206-3215.
- Dacheaux, D., Attree, I., Schneider, C. and Toussaint, B.** (1999). Cell death of human PMNs induced by a *Pseudomonas aeruginosa* CF isolate requires a functional type III secretion system. *Infect. Immun.* **67**, 6164-6167.
- Dang, T.X., Hotze, E.M., Rouiller, I., Tweten, R.K. and Wilson-Kubalek, E.M.** (2005). Prepore to pore transition of a cholesterol-dependent cytolysin visualized by electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **150**, 100-108.
- Dangl, J.L. and Jones, J.D.G.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.
- Dangl, J.L., Dietrich, R.A. and Richberg, M.H.** (1996). Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**, 1793-1807.
- Darvill, A.G. and Albersheim, P.** (1984). Phytoalexins and their elicitors – a defense against microbial infection in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **35**, 243-275.
- De Geyter, C., Wattiez, R., Sansonetti, P., Falmagne, P., Ruyschaert, J.M., Parsot, C. and Cabiaux, V.** (2000). Characterization of the interaction of IpaB and IpaD, proteins required for entry of *Shigella flexneri* into epithelial cells, with a lipid membrane. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5769-5776.
- De Wit, P.J.G.M.** (1996). Unraveling the gene for gene hypothesis and its relevance to phytopathology. *Phytoparasitica* **24**, 183-187.
- De Wit, P.J., Brandwagt, B.F., van den Burg, H.A., Cai, X., van der Hoorn, R.A., de Jong, C.F., van Klooster, J., de Kock, M.J., Kruijt, M., Lindhout, W.H., Luderer, R., Takken, F.L., Westerink, N., Vervoort, J.J. and Joosten, M.H.** (2002). The molecular basis of co-evolution between *Cladosporium fulvum* and tomato. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**, 409-412.
- DeRoy, S., Thilmony, R., Kwack, Y.B., Nomura, K. and He, S.Y.** (2004). A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 9927-9932.
- del Rio, L.A., Corpas, F.J. and Barroso, J.B.** (2004). Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* **65**, 783-792.

- DeLano, W.L.** (2002). Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 14-20.
- Delledonne, M.** (2005). NO news is good news for plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 1-7.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A. and Lamb, C.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.
- Desikan, R., Hancock, J.T., Coffey, M.J. and Neill, S.J.** (1996). Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Lett.* **382**, 213-217.
- Desikan, R., Reynolds, A., Hancock, J.T. and Neill, S.J.** (1998). Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defense gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem. J.* **330**, 115-120.
- Desikan, R., Hancock, J.T., Ichimura, K., Shiozaki, K. and Neill, S.J.** (2001). Harpin induces activation of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol.* **126**, 1579-1587.
- Desvaux, M., Parham, N.J. and Henderson, I.R.** (2003). Le système de sécrétion de type V chez les bactéries Gram-négatives. *Biofutur.* **237**, 34-37.
- Desvaux, M., Parham, N.J., Scott-Tucker, A. and Henderson, I.R.** (2004). The general secretory pathway: a general misnomer. *Trends Microbiol.* **12**, 306-309.
- Doke, N.** (1983). Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiol. Plant. Pathol.* **23**, 345-357.
- Dong, X.** (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 316-323.
- Dong, X.** (2001). Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 309-314.
- Dong, H., Delaney, T.P., Bauer, D.W. and Beer, S.V.** (1999). Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the *NIM1* gene. *Plant J.* **20**, 207-215.
- Donnelly, M.A. and Steiner, T.S.** (2002). Two nonadjacent regions in enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin are required for activation of toll-like receptor 5. *J. Biol. Chem.* **277**, 40456-40461.
- Dow, M., Newman, M.-A. and von Roepenack, E.** (2000). The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Phytopathol.* **38**, 241-261.
- Ebel, J. and Scheel, D.** (1997). Signals in host-parasite interactions. In *The Mycota. Plant Relationships*, Part A, G.C. Carroll and P. Tudzynski, eds. (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 85-105.
- Eifler, N., Vetsch, M., Gregorini, M., Ringler, P., Chami, M., Philippsen, A., Fritz, A., Müller, S.A., Glockshuber, R., Engel, A. and Grauschopf, U.** (2006). Cytotoxin ClyA from *Escherichia coli* assembles to a 13-meric pore independent of its redox-state. *EMBO. J.* **25**, 2652-2661.
- 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.
- Elstner, E.F., Oßwald, W. und Schneider, I.** (1996). *Phytopathologie: Allgemeine und Biochemische Grundlagen*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Emsley, P. and Cowtan, K.** (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst.* **D60**, 2126-2132.
- Engelhardt, S.** 2003. Struktur- und Funktionsanalyse des bakteriellen Effektorproteins HrpZ aus *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Diplomarbeit

- Erbs, G. and Newman, M.-A.** (2003). The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence responses. *Mol. Plant Pathol.* **4**, 421-425.
- Espinosa, A., Guo, M., Tam, V.C., Fu, Z.Q., Alfano, J.R.** (2003). The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. *Mol. Microbiol.* **49**, 377-387.
- Faudry, E., Vernier, G., Neumann, E., Forge, V. and Attree, I.** (2006). Synergistic pore formation by type III toxin translocators of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **45**, 8117-8123.
- Feldman, M.F. and Cornelis, G.R.** (2003). The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**, 151-158.
- Felix, G. and Boller, T.** (2003). Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J. Biol. Chem.* **278**, 6201-6208.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S. and Boller, T.** (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* **18**, 265-276.
- Fellbrich, G., Romanski, A., Varet, A., Blume, B., Brunner, F., Engelhardt, S., Felix, G., Kemmerling, B., Krzymowska, M. and Nürnberger, T.** (2002). NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. *Plant J.* **32**, 375-390.
- Fields, S. and Song, O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Fields., K.A., Nilles, M.L., Cowan, C. and Straley, S.C.** (1999). Virulence role of V antigen of *Yersinia pestis* at the bacterial surface. *Infect. Immun.* **67**, 5395-5408.
- Filippone, M.P., Diaz Ricci, J., Mamani de Marchese, A., Farias, R.N. and Castagnaro, A.** (1999). Isolation and purification of a 316 Da preformed compound from strawberry (*Fragaria ananassa*) leaves active against plant pathogens. *FEBS Lett.* **459**, 115-118.
- Filloux, A.** (2004). The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**, 163-179.
- Fliegmann, J., Mithöfer, A., Wanner, G. and Ebel, J.** (2004). An ancient enzyme domain hidden in the putative  $\beta$ -glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *J. Biol. Chem.* **279**, 1132-1140.
- Flor, H.H.** (1955). Host-parasite interactions in flax rust – Its genetics and other implications. *Phytopathology* **45**, 680-685.
- Flor, H.H.** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**, 275-296.
- Fouts, D.E., Abramovitch, R.B., Alfano, J.R., Baldo, A.M., Buell, C.R., Cartinhour, S., Chatterjee, A.K., D'Ascenzo, M., Gwinn, M.L., Lazarowitz, S.G., Lin, N.C., Martin, G.B., Rehm, A.H., Schneider, D.J., van Dijk, K., Tang, X. and Collmer, A.** (2002). Genomwide identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 2275-2280.
- Frederick, R.D., Ahmad, M., Majerczak, D.R., Arroyo-Rodriguez, A.S., Manulis, S. and Coplin, D.L.** (2001). Genetic organization of the *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* *hrp* gene cluster and sequence analysis of the *hrpA*, *hrpC*, *hrpN*, and *wtsE* operons. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**, 1213-1222.
- Fu, Z.Q., Guo, M. and Alfano, J.R.** (2006). *Pseudomonas syringae* HrpJ is a type III secreted protein that is required for plant pathogenesis, injection of effectors, and secretion of the HrpZ1 harpin. *J. Bacteriol.* **188**, 6060-6069.
- Fu, Z.Q., Guo, M., Jeong, B.R., Tian, F., Elthon, T.E., Cerny, R.L., Staiger, D. and Alfano, J.R.** (2007). A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature* **447**, 284-288.

- Galan, J.E.** (1999). Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 46-50.
- Galan, J.E. and Collmer, A.** (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**, 1322-1328.
- Galan, J.E. and Wolf-Watz, H.** (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**, 567-573.
- Gamborg, O.L., Miller, R.O. and Ojima, K.** (1968). Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**, 151-158.
- Gelli, A., Higgins, V.J. and Blumwald, E.** (1997). Activation of plant plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiol.* **113**, 269-279.
- Genisset, C., Galeotti, C.L., Lupetti, P., Mercati, D., Skibinski, D.A., Barone, S., Battistutta, R., de Bernard, M. and Telford, J.L.** (2006). A *Helicobacter pylori* vacuolating toxin mutant that fails to oligomerize has a dominant negative phenotype. *Infect. Immun.* **74**, 1786-1794.
- Gerke, V. and Moss, S.E.** (2002). Annexins: from structure to function. *Physiol. Rev.* **82**, 331-371.
- Ghosh, P.** (2004). Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 771-795.
- Giesemann, T., Jank, T., Gerhard, R., Maier, E., Just, I., Benz, R. and Aktories, K.** (2006). Cholesterol-dependent pore formation of *Clostridium difficile* toxin A. *J. Biol. Chem.* **281**, 10808-10815.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. and Woods, R.A.** (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**, 355-360.
- Gomez-Gomez, L. and Boller, T.** (2000). FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* **5**, 1003-1011.
- Gomez-Gomez, L. and Boller, T.** (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* **7**, 251-256.
- Gophna, U., Ron, E.Z. and Graur, D.** (2003). Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* **312**, 151-163.
- Gouaux, E.** (1997). Channel-forming toxins: Tales of transformation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 566-573.
- Goudet, C., Véry, A.A., Milat, M.L., Ildfonse, M., Thibaud, J.B., Senteanc, H. and Blein, J.P.** (1998). Magnesium ions promote assembly of a channel-like structure from Beticolin 0 a non-peptide fungal toxin purified from *Cercospora beticola*. *Plant J.* **14**, 359-364.
- Goure, J., Broz, P., Attree, O., Cornelis, G.R. and Attree, I.** (2005). Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes. *J. Infect. Dis.* **192**, 218-225.
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A. and Mansfield, J.** (2000). The *RPM1* plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J.* **23**, 441-450.
- Grant, S.R., Fisher, E.J., Chang, J.H., Mole, B.M. and Dangl, J.L.** (2006). Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 425-449.
- Greenberg, J.T.** (1997). Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **48**, 525-545.
- Guo, F.Q. and Crawford, N.M.** (2005). *Arabidopsis* nitric oxide synthase 1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* **17**, 3436-3450.

- Gust , A.A., Biswas, R., Lenz, H.D., Rauhut, T., Ranf, S., Kemmerling, B., Götz, F., Glawischnig, E., Lee, J., Felix, G. and Nürnberger, T.** (2007). Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* (accepted).
- Guttman, D.S., Vinatzer, B.A., Sarkar, S.F., Ranall, M.V., Kettler, G. and Greenberg, J.T.** (2002). A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science* **295**, 1722-1726.
- Guttman, D.S., Gropp, S.J., Morgan, R.L. and Wang, P.W.** (2006). Diversifying selection drives the evolution of the type III secretion system pilus of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Biol. Evol.* **23**, 2342-2354.
- Hacker, J. and Kaper, J.B.** (1999). The concept of pathogenicity islands. In: Pathogenicity islands and other mobile virulence elements, edited by Kaper, J.B.. Washington, DC:Am. Soc. Microbiol., p. 1-12.
- Hahlbrock, K.** (1975). Further studies on the relationship between the rates of nitrate uptake, growth and conductivity changes in the medium of plant suspension cultures. *Planta* **124**, 311-318.
- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nürnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W.R. and Schmelzer, E.** (1995). Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4150-4157.
- Håkansson, S., Schesser, K., Persson, C., Galyov, E.E., Rosqvist, R., Homble, F. and Wolf-Watz, H.** (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.
- Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G.** (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**, 1773-1791.
- Hardt, W.D., Chen, L.M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R. and Galan, J.E.S.** (1998). *Typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in hosts cells. *Cell* **93**, 815-826.
- Harrington, A., Darboe, N., Kenjale, R., Picking, W.L., Middaugh, C.R., Birket, S. and Picking, W.L.** (2006). Characterization of the interaction of single tryptophan containing mutants of IpaC from *Shigella flexneri* with phospholipid membranes. *Biochemistry* **45**, 626-636.
- Hauck, P., Thilmony, R. and He, S.Y.** (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8577-8582.
- He, S.Y., Huang, H.C. and 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.
- He, S.Y., Bauer, D.W., Collmer, A. and Beer, S.V.** (1994). Hypersensitive response elicited by *Erwinia amylovora* harpin requires active plant metabolism. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**, 289-292.
- He, S.Y., Nomura, K. and Whittam, T.S.** (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**, 181-206.
- He, P., Shan, L., Lin, N.C., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nürnberger, T. and Sheen, J.** (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* **125**, 563-575.
- Heath, M.** (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 315-319.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C. and Ala'Aldeen, D.** (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 692-744.
- Hoiczyk, E. and Blobel, G.** (2001). Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4669-4674.

- Holt, B.F.III, Hubert, D.A. and Dangl, J.L.** (2003). Resistance gene signaling in plants – complex similarities to animal innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 20-25.
- Hoyos, M.E., Stanley, C.M., He, S.Y., Pike, S., Pu, X.-A. and Novacky, A.** (1996). The interaction of harpin<sub>PSS</sub> with plant cell walls. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**, 608-616.
- Huang, C.-N., Cornejo, M.J., Bush, D.S. and Jones, R.L.** (1986). Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining. *Protoplasma* **135**, 80-87.
- Hueck, C.J.** (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 379-433.
- Hume, P.J., McGhie, E.J., Hayward, R.D. and Koronakis, V.** (2003). The purified *Shigella* IpaB and *Salmonella* SipB translocators share biochemical properties and membrane topology. *Mol. Microbiol.* **49**, 425-439.
- Hutcheson, S.W., Bretz, J., Sussan, T., Jin, S. and Pak, K.** (2001). Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate hrp-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. *J. Bacteriol.* **183**, 5589-5598.
- Ide, T., Laarmann, S., Greune, L., Schillers, H., Oberleithner, H. and 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.
- Ingle, R.A., Carstens, M. and Denby, K.J.** (2006). PAMP recognition and the plant-pathogen arms race. *BioEssays* **28**, 880-889.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K. and Scheel, D.** (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O<sub>2</sub><sup>-</sup> from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4800-4805.
- Jackson, R.W., Athanassopoulos, E., Tsiamis, G., Mansfield, J.W., Sesma, A., Arnold, D.L., Gibbon, M.J., Murillo, J., Taylor, J.D. and Vivian, A.** (1999). Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10875-10880.
- Jackson, R.W., Mansfield, J.W., Arnold, D.L., Sesma, A., Paynter, C.D., Murillo, J., Taylor, J.D. and Vivian, A.** (2000). Excision from tRNA genes of a large chromosomal region, carrying *avrPphB*, associated with race change in the bean pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Mol. Microbiol.* **38**, 186-197.
- James, P., Halladay, J. and Craig, E.A.** (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.
- 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.
- Jonak, C., Okresz, L., Bögre, L. and Hirt, H.** (2002). Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signaling. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **5**, 415-424.
- Jones, D.A. and Takemoto, D.** (2004). Plant innate immunity – direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 48-62.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Jones, T.A., Zou, J.-Y., Cowan, S.W. and Kjeldgaard, M.** (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst.* **A47**, 110-119.

- Journet, L., Agrain, C., Broz, P. and Cornelis, G.R.** (2003). The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* **302**, 1757-1760.
- Kamoun, S.** (2001). Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 295-300.
- Kayalar, C. and Düzgünes, N.** (1986). Membrane action of colicin E1: detection by the release of carboxyfluorescein and calcein from liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **860**, 51-56.
- Kim, J.-G., Joen, E., Oh, J., Moon, J.S. and Hwang, I.** (2004). Mutational analysis of *Xanthomonas* harpin HpaG identifies a key functional region that elicits the hypersensitive response in nonhost plants. *J. Bacteriol.* **186**, 6239-6247.
- Kim, H.S., Desveaux, D., Singer, A.U., Patel, P., Sondek, J. and Dangl, J.L.** (2005). The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves the C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 6496-6501.
- Kimbrough, T.G. and Miller, S.I.** (2000). Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11008-11013.
- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E. and Silva, H.** (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8849-8855.
- Klüsener, B. and Weiler, E.W.** (1999). Pore-forming properties of elicitors of plant defense reactions and cellulolytic enzymes. *FEBS Lett.* **459**, 263-269.
- Kombrink, E. and Hahlbrock, K.** (1986). Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. *Plant Physiol.* **81**, 216-221.
- Kombrink, E. and Somssich, I.** (1997). Pathogenesis-related proteins and plant defense. In: *The Mycota. Plant Relationships, Part A* (G.C. Carroll and P. Tudzynski, eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Vol. V, 107-128.
- Konkel, M.E., Klena, J.D., Rivera-Amill, V., Monteville, M.R., Biswas, D., Raphael, B. and Mickelson, J.** (2004). Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J. Bacteriol.* **186**, 3296-3303.
- Kroj, T., Rudd, J.J., Nürnberger, T., Gäbler, Y., Lee, J. and Scheel, D.** (2003). Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J. Biol. Chem.* **278**, 2256-2264.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J.E. and Aizawa, S.I.** (1998). Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**, 602-605.
- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S.I. and Galan, J.E.** (2000). Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10225-10230.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lam, E., Kato, N. and Lawton, M.** (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**, 848-853.
- Lamattina, L., Garcia-Mate, C., Graziano, M. and Pagnussat, G.** (2003). Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 109-136.
- Lamb, C.J. and Dixon, R.A.** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 251-275.

- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebun-Garcia, A., Durner, J., Pugin, A. and Wendehenne, D.** (2004). Analysis of nitric oxide signalling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* **135**, 516-529.
- Lamotte, O., Courtois, C., Barnavon, L., Pugin, A. and Wendehenne, D.** (2005). Nitric oxide in plants: The biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *Planta* **221**, 1-4.
- Lawley, T., Gilmour, M., Gunton, J., Tracz, D. and Taylor, D.** (2003). Functional and mutational analysis of conjugative transfer region 2 (Tra2) from the IncH11 plasmid R27. *J. Bacteriol.* **185**, 581-591.
- Lee, S.H. and Galan, J.E.** (2004). *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol. Microbiol.* **51**, 483-495.
- Lee, J., Klessig, D.F. and Nürnberger, T.** (2001a). 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.
- Lee, J., Klüsener, B., Tsiamis, G., Stevens, C., Neyt, C., Tampakaki, A.P., Panopoulos, N.J., Nöller, J., Weiler, E.W., Cornelis, G.R., Mansfield, J.W. and Nürnberger, T.** (2001b). HrpZ<sub>PspH</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, B. and Fields, S.** (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast-two-hybrid system. *FASEB J.* **7**, 957-963.
- 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.
- Li, C.-M., Haapalainen, M., Lee, J., Nürnberger, T., Romantschuk, M. and Taira, S.** (2005). Harpin of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* harbors a protein binding site. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**; 60-66.
- Ligterink, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H. and Scheel, D.** (1997). Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* **276**, 2054-2057.
- Lindeberg, M., Cartinhour, S., Myers, C.R., Schechter, L.M., Schneider, D.J. and Collmer, A.** (2006). Closing the circle on the discovery of genes encoding Hrp regulon members and type III secretion effectors in the genomes of three model *Pseudomonas syringae* strains. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 1151-1158.
- Lindgren, P.B.** (1997). The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**, 129-152.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R. and Dang, J.L.** (2003). *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**, 379-389.
- Macnab, R.M.** (2003). How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 77-100.
- Marenne, M.N., Journet, L., Mota, L.J. and Cornelis, G.R.** (2003). Genetic analysis of the formation of the Ysc-Yop translocation pore in macrophages by *Yersinia enterocolitica*: role of LcrV, yscF and YopN. *Microb. Pathogen.* **35**, 243-258.
- Maruyama, K., Mikawa, T. and Ebashi, S.** (1984). Detection of calcium binding proteins by <sup>45</sup>Ca autoradiography on nitrocellulose membrane after sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *J. Biochem. (Tokyo)* **95**, 511-519.
- McGuinness, D.H., Dehal, P.K. and Pleass, R.J.** (2003). Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. *Trends Parasitol.* **19**, 312-219.
- Medzhitov, R. and Janeway, C.A.** (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295-298.

- Medzhitov, R. and Janeway Jr., C.A.** (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* **296**, 298-300.
- Melton-Witt, J.A., Bentsen, L.M. and Tweten, R.K.** (2006). Identification of functional domains of *Clostridium septicum* alpha toxin. *Biochemistry* **5**, 14347-14357.
- Menard, R., Sansonetti, P., Parsot, C. and Vasselon, T.** (1994). Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell* **79**, 515-525.
- Menestrina, G., Dalla Serra, M., Comai, M., Coraiola, M., Viero, G., Werner, S., Colin, D.A., Monteil, H. and Prevost, G.** (2003). Ion channels and bacterial infection: the case of beta-barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.* **522**, 54-60.
- Menke, L.H., van Pelt, J.A., Pieterse, C.M.J. and Klessig, D.F.** (2004). Silencing of mitogen-activated protein kinase MPK6 comprises disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 897-907.
- Merighi, M., Majerczak, D.R., Stover, E.H. and Coplin, D.L.** (2003). The HrpX/HrpY two-component system activates hrpS expression, the first step in the regulatory cascade controlling the Hrp regulon in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**, 238-248.
- Meyer, A., Pühler, A. and Niehaus, K.** (2001). The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* **213**, 214-222.
- Minamino, T. and Pugsley, A.P.** (2005). Measure for measure in the control of type III secretion hook and needle length. *Mol. Microbiol.* **56**, 303-308.
- Mithöfer, A., Fliegmann, J., Neuhaus-Url, G., Schwarz, H. and Ebel, J.** (2000). The hepta-beta-glucoside elicitor-binding proteins from legumes represent a putative receptor family. *Biol. Chem.* **381**, 705-713.
- Moss, S.E. and Morgan, R.O.** (2004). The annexins. *Genome Biol.* **5**, 1-8.
- Mota, L.J. and Gornelis, G.R.** (2005). The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Ann. Med.* **37**, 234-249.
- Mota, L.J., Journet, L., Sorg, I., Agrain, C. and Cornelis, G.R.** (2005). Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science* **307**, 1278.
- Mueller, C.A., Broz, P., Müller, S.A., Ringler, P., Erne-Brand, F., Sorg, I., Kuhn, M., Engel, A. and Cornelis, G.R.** (2005). The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science* **310**, 674-676.
- Mur, L.A., Santosa, I.E., Laarhoven, L.J., Holton, N.J., Harren, F.J. and Smith, A.R.** (2005). Laser photoacoustic detection allows in planta detection of nitric oxide in tobacco following challenge with avirulent and virulent *Pseudomonas syringae* pathovars. *Plant Physiol.* **138**, 1247-1258.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D. and Hancock, J.T.** (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Botany* **53**, 1237-1247.
- Neill, S.J., Desikan, R. and Hancock, J.T.** (2003). Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol.* **159**, 11-35.
- Nennstiel, D., Scheel, D. and Nürnberger, T.** (1998). Characterization and partial purification of an oligopeptide elicitor receptor from parsley (*Petroselinum crispum*). *FEBS Lett.* **431**, 405-410.
- Newman, M.-A., von Roepenack-Lahaye, E., Parr, A., Daniels, M.J. and Dow, J.M.** (2002). Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *Plant J.* **29**, 487-495.
- Newman, M.-A., Dow, J.M., Molinaro, A. and Parrilli, M.** (2007). Priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides. *J. Endotoxin Res.* **13**, 69-84.

- Neyt, C. and Cornelis, G.R.** (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.
- Nishimura, H., Hayamizu, T. and Yanagisawa, Y.** (1986). Reduction of NO<sub>2</sub> to NO by rush and other plants. *Environmental Science and Technology* **20**, 413-416.
- Nürnberg, T. and Brunner, F.** (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 318-324.
- Nürnberg, T. and Lipka, V.** (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol. Plant Pathol.* **6**, 335-345.
- Nürnberg, T. and Scheel, D.** (2001). Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.* **6**, 372-379.
- Nürnberg, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K. and Scheel, D.** (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**, 449-460.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B. and Piater, L.** (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* **198**, 249-266.
- Oh, J., Kim, J.-G., Jeon, E., Yoo, C.-H., Moon, J.S., Rhee, S. and Hwang, I.** (2007). Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria. *J. Biol. Chem.* **282**, 13601-13609.
- Oliferenko, S., Paiha, K., Harder, T., Gerke, V., Schwarzler, C., Schwarz, H., Beug, H., Gunthert, U. and Huber, L.A.** (1999). Analysis of CD44-containing lipid-rafts: recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *J. Cell. Biol.* **146**, 843-854.
- Osborn, A.E.** (1996a). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**, 1821-1831.
- Osborn, A.E.** (1996b). Saponins and plant defence – A soap story. *Trends Plant Sci.* **1**, 4-9.
- Pallen, M.J., Beatson, S.A. and Bailey, C.M.** (2005). Bioinformatics, genomics and evolution of nonflagellar type III-secretion systems: a Darwinian perspective. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 201-229.
- Parker, J.E.** (2003). Plant recognition of microbial patterns. *Trends Plant Sci.* **8**, 245-247.
- Parker, M.W. and Feil, S.C.** (2005). Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **88**, 91-142.
- Parsot, C., Hamiaux, C. and Page, A.L.** (2003). The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 7-14.
- Petnicki-Ocwieja, T., van Dijk, K. and Alfano, J.R.** (2005). The *hrpK* operon of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 encodes two proteins secreted by the type III (Hrp) protein secretion system: HopB1 and HrpK, a putative type III translocator. *J. Bacteriol.* **187**, 649-663.
- Pettersson, J., Nordfelth, R., Dubinina, E., Bergman, T., Gustafsson, M., Magnusson, K.E. and Wolf-Watz, H.** (1996). Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science* **273**, 1231-1233.
- Pettersson, J., Holmström, A., Hill, J., Leary, S., Frithz-Lindsten, E., von Euler-Matell, A., Carlsson, E., Titball, R., Forsberg, A. and Wolf-Watz, H.** (1999). The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol. Microbiol.* **32**, 961-976.
- Piedras, P., Hammond-Kosack, K.E., Harrison, K. and Jones, J.D.G.** (1998). A rapid *Cf-9* and *Avr9*-dependent production of active oxygen species in tobacco suspension cultures. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 1155-1168.

- Pieterse, C.M. and van Loon, L.C.** (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* **4**, 52-58.
- Preston, G., Huang, H.-C., He, S.Y. and Collmer, A.** (1995). The HrpZ proteins of *Pseudomonas syringae* pvs. *syringae*, *glycinea*, and *tomato* are encoded by an operon containing *Yersinia ysc* homologs and elicit the hypersensitive response in tomato but not soybean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 717-732.
- Pugsley, A.P., Francetic, O., Possot, O.M., Sauvonnnet, N. and Hardie, K.R.** (1997). Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria – a review. *Gene* **192**, 13-19.
- Racapé, J., Belbahri, L., Engelhardt, S., Lacombe, B., Lee, J., Lochman, J., Marais, A., Nicole, M., Nürnberger, T., Parlange, F., Puverel, S. and Keller, H.** (2005). Ca<sup>2+</sup>-dependent lipid binding and membrane integration of PopA, a harpin-like elicitor of the hypersensitive response in tobacco. *Mol. Microbiol.* **58**, 1406-1420.
- Race, P.R., Lakey, J.H. and Banfield, M.J.** (2006). Insertion of the enteropathogenic *Escherichia coli* Tir virulence protein into membranes *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **281**, 7842-7849.
- Rahme, L.G., Mindrinos, M.N. and Panopoulos, N.J.** (1992). Plant and environmental sensory signals control the expression of hrp genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* **174**, 3499-3507.
- Ramachandran, R., Tweten, R.K. and Johnson, A.E.** (2004). Membrane-dependent conformational changes initiate cholesterol-dependent cytolysin oligomerization and intersubunit  $\beta$ -strand alignment. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 697-705.
- Ramamurthi, K.S. and Schneewind, O.** (2003). Substrate recognition by the *Yersinia* type III protein secretion machinery. *Mol. Microbiol.* **50**, 1095-1102.
- Ride, J.P.** (1983). Cell walls and other structural barriers in defense. In: *Biochemical Plant Pathology* (J.A. Callow, ed.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, 215-236.
- Rivas, S. and Thomas, C.M.** (2005). Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 395-436.
- Robatzek, S.** (2007). Vesicle trafficking in plant immune responses. *Cell. Microbiol.* **9**, 1-8.
- Rohmer, L., Kjemtrup, S., Marchesini, P. and Dangl, J.L.** (2003). Nucleotide sequence, functional characterization and evolution of pFKN, a virulence plasmid in *Pseudomonas syringae* pathovar *maculicola*. *Mol. Microbiol.* **47**, 1545-1562.
- Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiaho-Lassila, E.-L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M. and He, S.Y.** (1997a). Hrp pilus: An hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3459-3464.
- Roine, E., Saarinen, J., Kalkkinen, N. and Romantschuk, M.** (1997b). Purified HrpA of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 reassembles into pili. *FEBS Lett.* **417**, 168-172.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H. and Jones, J.D.** (1999). Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* **11**, 273-287.
- Romero-Puertas, M.C., Perazzolli, M., Zago, E.D. and Delledonne, M.** (2004). Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* **6**, 795-803.
- Ron, M. and Aveni, A.** (2004). The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell* **16**, 1604-1615.
- Rosenberger, C.M., Brumell, J.H. and Finlay, B.B.** (2000). Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. *Curr. Biol.* **10**, R823-R825.

- Rosqvist, R., Magnusson, K.E. and Wolf-Watz, H.** (1994). Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J.* **13**, 964-972.
- Rossier, O. and Cianciotto, N.P.** (2005). The *Legionella pneumophila* *tatB* gene facilitates secretion of phospholipase C, growth under iron-limiting conditions, and intracellular infection. *Infect. Immun.* **73**, 2020-2032.
- 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.
- Ruckdeschel, K., Richter, K., Mannel, O. and Heesemann, J.** (2001). Arginine-143 of *Yersinia enterocolitica* YopP crucially determines isotype-related NF-kappaB suppression and apoptosis induction in macrophages. *Infect. Immun.* **69**, 7652-7662.
- Russel, M.** (1998). Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. *J. Mol. Biol.* **15**, 5804-5811.
- Ryndak, M.B., Chung, H., London, E. and Bliska, J.B.** (2005). Role of predicted transmembrane domains for type III translocation, pore formation, and signaling by the *Yersinia pseudotuberculosis* YopB protein. *Infect. Immun.* **73**, 2433-2443.
- Sambrook, J., and Russell, D.W.** (2001) *Molecular cloning - A laboratory manual*, 3. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sarker, M.R., Neyt, C., Stainier, I. and Cornelis, G.R.** (1998). The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J. Bacteriol.* **180**, 1207-1214.
- Schägger, H. and von Jagow, G.** (1991). Blue Native Electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-231.
- Schägger, H., Cramer, W.A. and von Jagow, G.** (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**, 220-230.
- Scheel, D.** (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 305-310.
- Schmidt, H.H.H.W. and Walter, U.** (1994). NO at work. *Cell* **78**, 919-925.
- Schneider, D.S.** (2002). Plant immunity and film Noir: what gumshoe detectives can teach us about plant-pathogen interactions. *Cell* **109**, 537-540.
- Schoehn, G., Di Guilmi, A.M., Lemaire, D., Attree, I., Weissenhorn, W. and Dessen, A.** (2003). Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *EMBO J.* **22**, 4957-4967.
- Schulte, R. and Bonas, U.** (1992). Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *J. Bacteriol.* **174**, 815-823.
- Shao, F., Merritt, P.M., Bao, Z., Innes, R.W. and Dixon, J.E.,** (2002). *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* **109**, 575-588.
- Shao, F., Golstein, S., Ade, J., Stoutemeyer, M., Dixon, J.E. and Innes, R.W.** (2003). Cleavage of *Arabidopsis* PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* **301**, 1230-1233.
- Simons, K. and Ikonen, E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.
- Simons, K. and Toomre, D.** (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**, 31-39.

- Smith, K., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M., Barrett, S., Cookson, B. and Aderem, A.** (2003). Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat. Immunol.* **4**, 1247-1253.
- Sory, M.P. and Cornelis, G. R.** (1994). Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol Microbiol.* **14**, 583-594.
- Stachelin, L.A. and Newcomb, E.H.** (2000). Membrane structure and membraneous organelles. In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R., eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists, 358-410.
- Stathopoulos, C., Hendrixson, D.R., Thanassi, D.G., Hultgren, S.J., St Geme, J.W., 3<sup>rd</sup> and Curtiss, R., 3<sup>rd</sup>** (2000). Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in gram-negative pathogens: an evolving story. *Microbes Infect.* **2**, 1061-1072.
- Stühmer, W.** (1992). Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol.* **207**, 319-339.
- Swiderski, M.R. and Innes, R.W.** (2001). The *Arabidopsis PBS1* resistance gene encodes a member of a novel protein kinase subfamily. *Plant J.* **26**, 101-112.
- Taira, S., Tuimala, J., Roine, E., Nurmiaho-Lassila, E.L., Savilahti, H. and Romantschuk, M.** (1999). Mutational analysis of the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* *hrpA* gene encoding Hrp pilus subunit. *Mol. Microbiol.* **34**, 736-744.
- Takken, F.L.W. and Joosten, M.H.A.J.** (2000). Plant resistance genes: their structure, function and evolution. *Eur. J. Plant Pathol.* **106**, 699-713.
- Tampakaki, A.P. and Panopoulos, N.J.** (2000). Elicitation of hypersensitive cell death by extracellularly targeted HrpZ<sub>PspH</sub> produced in planta. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 1366-1374.
- Tang, X., Xiao, Y. and Zhou, J.M.** (2006). Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 1159-1166.
- Tardy, F., Homble, F., Neyt, C., Wattiez, R., Cornelis, G.R., Ruyschaert, J.M. and Cabiliaux, V.** (1999). *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation system: channel formation by secreted Yops. *EMBO J.* **18**, 6793-6799.
- Tejuca, M., Dalla Serra, M., Potrich, C., Alvarez, C. and Menestrina, G.** (2001). Sizing the radius of the pore formed in erythrocytes and lipid vesicles by the toxin Sticholysin I from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *J. Membrane Biol.* **183**, 125-135.
- Thanabalu, T., Koronakis, E., Hughes, C. and Koronakis, V.** (1998). Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E. coli*: Reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *EMBO J.* **17**, 6487-6496.
- Thordal-Christensen, H.** (2003). Fresh insights into processes of non-host resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 351-357.
- Tilley, S.J., Orlova, E.V., Gilbert, R.J.C., Andrew, P.W. and Saibil, H.R.** (2005). Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell* **121**, 247-256.
- Troisfontaines, P. and Cornelis, G.R.** (2005). Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda)* **20**, 326-339.
- Umamoto, N., Kakitani, M., Iwamatsu, A., Yoshikawa, M., Yamaoka, N. and Ishida, I.** (1997). The structure and function of a soybean beta-glucan-elicitor-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1029-1034.
- Underhill, D.M. and Ozinsky, A.** (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 103-110.

- Valeva, A., Hellmann, N., Walev, I., Strand, D., Plate, M., Boukhallouk, F., Brack, A., Hanada, K., Decker, H. and Bhakdi, S. (2006). Evidence that clustered phosphocholine head groups serve as sites for binding and assembly of an oligomeric protein pore. *J. Biol. Chem.* **281**, 26014-26021.
- van Bruggen, E.F.J., Wiebenger, E.H. and Gruber, M. (1960). Negative-staining electron microscopy of proteins at pH values below their isoelectric points. Its application to hemocyanin. *Biochim. Biophys. Acta.* **42**, 171-172.
- van der Biezen, E.A. and Jones, J.D.G. (1998). Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 454-456.
- van der Hoorn, R.A., Wulff, B.B., Rivas, S., Durrant, M.C., van der Ploeg, A., de Wit, P.J. and Jones, J.D. (2005). Structure-function analysis of Cf-9, a receptor-like protein with extracytoplasmic leucine-rich repeats. *Plant Cell* **17**, 1000-1015.
- van Gijsegem, F., Vasse, J., Camus, J.C., Marends, 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.
- van Gijsegem, F., Vasse, J., De Rycke, R., Castello, P. and Boucher, C. (2002). Genetic dissection of the *Ralstonia solanacearum* hrp gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for the Hrp pilus assembly. *Mol. Microbiol.* **44**, 935-946.
- Véry, A.A., Gaymard, F., Bosseux, C., Sentenac, H. and Thibaud, J.B. (1995). Expression of a cloned plant K<sup>+</sup> channel in *Xenopus* oocytes: analysis of macroscopic currents. *Plant J.* **7**, 321-332.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M.L., Lazdunski, A., Wu, L.F. and Filloux, A. (2001). Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J.* **20**, 6735-6741.
- Vriend, G. (1990). WHAT IF: A molecular modelling and drug design program. *J. Mol. Graph.* **8**, 52-56.
- Walker, B. and Bayley, H. (1995). Key residues for membrane binding, oligomerization, and pore forming activity of staphylococcal alpha-hemolysin identified by cysteine scanning mutagenesis and targeted chemical modification. *J. Biol. Chem.* **270**, 23065-23071.
- Waters, V.L. (2001). Conjugation between bacterial and mammalian cells. *Nat. Genet.* **29**, 375-376.
- Wattiau, P. and Cornelis, G.R. (1993). SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in the secretion of YopE. *Mol. Microbiol.* **8**, 123-131.
- Weber, W.M. (1999). Endogenous ion channels in oocytes of *Xenopus laevis*: recent developments. *J. Membrane Biol.* **170**, 1-12.
- Weber, E., Ojanen-Reuhs, T., Huguet, E., Hause, G., Romantschuk, M., Korhonen, T.K., Bonas, U. and Koebnik, R. (2005). The type III-dependent Hrp-pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with pepper host plants. *J. Bacteriol.* **187**, 2458-2468.
- Wei, Z.M. and 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., Sneath, B.J. and Beer, S.V. (1992). Expression of *Erwinia amylovora* *hrp* genes in response to environmental stimuli. *J. Bacteriol.* **174**, 1875-1882.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D.F. and Durner, J. (2001). Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**, 177-183.
- Wendehenne, D., Durner, J. and Klessig, D.F. (2004). Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 449-455.
- Woestyn, S., Allaoui, A., Wattiau, P. and Cornelis, G.R. (1994). YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J. Bacteriol.* **176**, 1561-1569.

- Wolfert, M.A., Murray, T.F., Boons, G.-J. and Moore, J.N.** (2002). The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* **277**, 39179-39186.
- Xiao, Y., Lu, Y., Heu, S. and Hutcheson, S.W.** (1992). Organization and environmental regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 hrp cluster. *J. Bacteriol.* **174**, 1734-1741.
- Xiao, Y., Heu, S., Yi, J., Lu, Y. and Hutcheson, S.** (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.
- Yamamoto, A., Katou, S., Yoshioka, H., Doke, N. and Kawakita, K.** (2004). Involvement of nitric oxide generation in hypersensitive cell death induced by elicitor in tobacco cell suspension culture. *J. Gen. Plant Pathol.* **70**, 85-92.
- Yamasaki, H. and Sakihama, Y.** (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.* **468**, 89-92.
- Yang, Y., Shah, J. and Klessig, D.F.** (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* **11**, 1621-1639.
- Young, B.M. and Young, G.M.** (2002). YpIA is exported by the Ysc, Ysa and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* **184**, 1324-1334.
- Zakharov, S.D. and Cramer, W.A.** (2002). Colicin crystal structures: pathways and mechanisms for colicin insertion into membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1565**, 333-346.
- Zasloff, M.** (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395.
- Zeier, J., Delledonne, M., Mishina, T., Severi, E., Sonoda, M. and Lamb, C.** (2004). Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiol.* **136**, 2875-2886.
- Zhang, S. and Klessig, D.F.** (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* **6**, 520-527.
- Zhu, J., Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J., Farrand, S.K. and Winans, S.C.** (2000). The bases of crown gall tumorigenesis. *J. Bacteriol.* **182**, 3885-3895.
- Zhu, M. Shao, F., Innes, R.W., Dixon, J.E. and Xu, Z.** (2004). The crystal structure of *Pseudomonas* avirulence protein AvrPphB: a papain-like fold with a distinct substrate-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 302-307.
- Zimmermann, S., Nürnbergger, T., Frachisse, J.-M., Wirtz, W., Guern, J. Hedrich, R. and Scheel, D.** (1997). Receptor-mediated activation of a plant Ca<sup>2+</sup>-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2751-2755.
- Zipfel, C. and Felix, G.** (2005). Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 353-360.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D., Felix, G. and Boller, T.** (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* **428**, 764-767.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T. and Felix, G.** (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**, 749-760.

## 7 Anhang

## Primersequenzen

Name	Sequenz	Bemerkung
Y2HT7Seq.for	5'-taatacgaactcactatagggc-3'	Sequenzierungsprimer für pGADT7 und pGBKT7
pGADT73?ADSeq.rev	5'-agatgggtgcacgatgcacag-3'	Sequenzierungsprimer für pGADT7
pGBKT73?DNA-BDSeq.re	5'-taagagtcactttaaattgtat-3'	Sequenzierungsprimer für pGBKT7
uni-f	5'-ggtttcccagtcacgacgttg-3'	Sequenzierungsprimer für pBluescript und pJC40
uni-r	5'-caggaaacgctatgacc-3'	Sequenzierungsprimer für pBluescript und pJC40
EcoRI-W-Psph-for	5'-aattgaattcatgacatcggtatcacc-3'	für Klonierung des 5'-Bereiches von HrpW1 <sub>Psph</sub>
NdeI-W-Psph-for	5'-aatcatatgacatcggtatcaccccc-3'	für Klonierung des 5'-Bereiches von HrpW1 <sub>Psph</sub>
HindIII-W-Psph-rev	5'-aataagcttcaaagctctgtgtgtggg-3'	für Klonierung des 3'-Bereiches von HrpW1 <sub>Psph</sub>
BamHI-W-Psph-rev	5'-aattggatcctcaaagctctgtgtgtgggtcg-3'	für Klonierung des 3'-Bereiches von HrpW1 <sub>Psph</sub>
EcoRI-A-Psph-for	5'-aattgaattcatgaacatcatgattctctg-3'	für Klonierung des 5'- Bereiches von HrpA1 <sub>Psph</sub>
BamHI-A-Psph-rev	5'-aattggatcctcagaactggacgaccgag-3'	für Klonierung des 3'- Bereiches von HrpA1 <sub>Psph</sub>

## DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde in der Zeit von September 2003 bis Dezember 2003 in der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle/Saale und von Januar 2004 bis April 2007 in der Abteilung Pflanzenbiochemie des Zentrums für Molekularbiologie der Pflanzen an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter wissenschaftlicher Anleitung von Herrn Prof. Dr. Thorsten Nürnberger angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen herzlichst bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Thorsten Nürnberger für die Ausarbeitung und Überlassung des Themas, das mir geschenkte Vertrauen, die Gewährung optimaler Arbeitsbedingungen bei der Anfertigung meiner Promotionsarbeit und dafür, daß er mich durch seine fachliche Beratung stets hilfreich unterstützt hat. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Justin Lee vom Institut für Pflanzenbiochemie Halle/Saale, der in der ersten Zeit meiner Arbeit als direkter Betreuer dazu beigetragen hat, diese Arbeit auf den richtigen Weg zu bringen.

Bei Frau Dr. Andrea Gust und Herrn Dr. Frederick Brunner bedanke ich mich für die stete Diskussionsbereitschaft und die Anregungen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Darüberhinaus danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Pflanzenbiochemie am ZMBP der Universität Tübingen für die schöne Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Minna Haapalainen (General Microbiology, Department of Biological and Environmental Sciences, University of Helsinki, Helsinki, Finland) für die Bereitstellung der HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Insertionsmutanten sowie HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Deletionsmutanten.

Bei der Arbeitsgruppe Mauro Dalla Serra (Centro di Fisica degli Stati Aggregati, Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto Trentino di Cultura, I-38050 Povo (Trento), Italy) möchte ich mich für die Durchführung der Porenbildungsanalysen in Calcein-beladenen Asolectinliposomen bedanken.

Bei Herrn Dr. Benoit Lacombe (Unité Mixte de Recherches Biochimie et Physiologie Moleculaire des Plantes, AgroM-CNRS-INRA-UMII, 2 Place Viala, 34060 Montpellier, France) bedanke ich mich für die Analyse der Porenbildung in *Xenopus*-Oozyten mittels "Two-electrode voltage-clamp technique".

Der Firma Novosom AG (Halle/Saale) danke ich für die Bereitstellung der Natrium Green-beladenen Liposomen.

Frau Petra Badorf vom ZMMK Bioanalytik der Universität Köln danke ich für die massenspektroskopischen Analysen der HrpZ1<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Oligomere.

Bei der Arbeitsgruppe Stehle des Interfakultären Instituts für Biochemie Tübingen und insbesondere bei Herrn Dr. Christoph Schall und Frau Miriam Fecker möchte ich mich für die hilfreiche Einweisung in die Proteinkristallisationstechnik und CD-Spektroskopie sowie die ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Dr. York Stierhoff (ZMBP, Uni Tübingen) danke ich sehr herzlich für die elektronenmikroskopische Analyse.

Bedanken möchte ich mich bei Christopher Grefen, der mich nicht nur in die Geheimnisse des Yeast-2-Hybrid eingeführt hat, sondern mich auch mit seiner Freundschaft und den unvergesslichen Lake-District-Erlebnissen sehr motiviert hat.

Meinen lieben Eltern, meinem Bruder sowie meinen Großeltern danke ich für alles, besonders für die immer währende Hilfe und Unterstützung. Ohne Euch wäre ich nicht so weit gekommen.

Und nicht zuletzt danke ich Patricia, die immer für mich da war und mich in schweren Zeiten trotz eigener Arbeit immens unterstützt hat. TQM.

## Lebenslauf

Name	Stefan Engelhardt
Geburtsdatum und -ort	20. Juli 1978 in Wittenberg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

### Schulbesuch

09/1985 - 08/1991	Pestalozzi-Oberschule in Zschornweitz
09/1991 - 07/1997	Paul-Gerhardt-Gymnasium in Gräfenhainichen
07/1997	Abitur und Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

### Tätigkeit vor dem Studium

09/1997 - 06/1998	10-monatiger Pflichtwehrdienst (Leichte Flugabwehrlehrbatterie 610 in Lütjenburg, Schleswig-Holstein)
-------------------	---

### Studium

10/1998 - 07/2003	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (MLU)
06-07/2002	mündliche Diplomprüfungen in Allgemeiner Biochemie, Organischer Chemie, Ökologischer Biochemie, Enzymologie, Pflanzenphysiologie
10/2002 - 06/2003	Diplomarbeit unter wissenschaftlicher Anleitung von Herrn Dr. Thorsten Nürnberger am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle/Saale zum Thema: Struktur- und Funktionsanalyse des bakteriellen Effektorproteins HrpZ aus <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
07/2003	Abschluß des Studiums als Diplombiochemiker
09/2003 - 12/2003	Doktorand am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle/Saale unter wissenschaftlicher Anleitung von Herrn Prof. Dr. Thorsten Nürnberger zum Thema: Das Effektorprotein HrpZ1 aus dem phytopathogenen Bakterium <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> - Studien zur funktionellen und molekularen Charakterisierung.
seit 01/2004	Fortsetzung der Promotion am Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Meine akademischen Lehrer waren:

Bonas, Breunig, Dorn, Dräger, Hübner, Gattermann, Humbeck, Ihl, Klösgen, Krauß, Kutchan-Zenk, Lindau, Mathiszik, Menge, Neef, Neubert, Nies, Nürnberger, Reuter, Rudolph, Scheel, Schmidt, Schneider, Ulbrich-Hofmann, Wahle, Wasternack, Weinandy, Weissflog