

**Untersuchungen zur Proteinsekretion in *Bradyrhizobium japonicum*
unter besonderer Berücksichtigung des Typ III- Sekretionssystems
und Charakterisierung der „metal ion-inducible autocleavage“
Effektordomäne**

Habilitationsschrift

vorgelegt

dem Bereich Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Dresden

von

Dr. rer. nat. Susanne Zehner

geboren am 19. Januar 1975 in Suhl

Eingereicht am: 31. Mai 2019

Tag des Abschlusses und Probevorlesung: 26. Mai 2020

Die Habilitationsschrift wurde in der Zeit von Januar 2014 bis Dezember
2015 im Institut für Genetik angefertigt.

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Michael Göttfert
2. Prof. Dr. Anke Becker
3. Prof. Dr. Hans-Martin-Fischer

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	4
Rhizobien-Leguminosen-Interaktion	4
Proteinsekretionssysteme	6
Typ I-Sekretionssysteme.....	6
Typ II-Sekretionssysteme.....	8
Typ III-Sekretionssysteme.....	9
Typ IV-Sekretionssysteme	12
Typ V-Sekretionssysteme	13
Typ VI Sekretionssysteme.....	13
Weitere Sekretionssysteme	14
Zusammenfassung der Forschungsergebnisse.....	15
1. Untersuchung der Expression des Typ III-Sekretionssystems in Knöllchen und Analyse des <i>tts</i> - Box-Promotors	15
2. Identifizierung sekretierter Proteine von <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	20
3. Untersuchung der sekretierten Proteine NopE1 und NopE2.....	27
4. Untersuchung von konservierten MIIA-Domänen	33
Diskussion.....	36
Zusammenfassung.....	46
Literaturverzeichnis.....	48
Anhang	64
Tabellen zu Datenanalysen (unveröffentlichte Daten)	64
Publikationsliste	74
Erklärung über den persönlichen Anteil an den wissenschaftlichen Publikationen zur Habilitationsthematik.....	75
Gesamtverzeichnis der wissenschaftlichen Veröffentlichungen	76
Lebenslauf	78
Eidesstattliche Erklärung	79
Danksagung	80
Publikationen.....	81

Einleitung

Rhizobien-Leguminosen-Interaktion

Rhizobien sind gram-negative Bodenbakterien, die eine enge Interaktion mit Pflanzen eingehen können. Sie besitzen die Fähigkeit, Luftstickstoff zu reduzieren und der Pflanze als Nährstoff verfügbar zu machen. Als Gegenleistung werden Sie von der Pflanze mit Kohlenstoffverbindungen versorgt. Dieser Prozess findet in einer mutualistischen Interaktion, der Symbiose, statt. Als Endosymbionten leben die Rhizobien in pflanzlichen Zellen, innerhalb spezifischer Pflanzenorgane, den Wurzelknöllchen.

Viele Vertreter der Rhizobien gehören zu den α -Proteobakterien. Dabei wurden für die α -Rhizobien die Genera *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Neorhizobium*, *Rhizobium* und *Sinorhizobium/Ensifer* beschrieben (MacLean et al. 2007; Gyaneshwar et al. 2011; Mousavi et al. 2014).

Die Wirtspflanzen für α -Rhizobien sind Vertreter der Familie Leguminosae (Unterfamilien: Papilionoideae, Cesalpinioideae und Mimosoideae) und *Parasponia* aus der Familie der Ulmaceae (Deakin & Broughton 2009). In den vergangenen Jahren wurden zunehmend auch Bakterien identifiziert, die die Knöllchenbildung bei Leguminosen induzieren, aber bisher nicht den Rhizobien zugeordnet wurden. Darunter sind Vertreter der α -Proteobakterien, z.B. *Ochrobacterium*, *Devosia* und *Methylobacterium* (Sy et al. 2001; Rivas et al. 2002; Jourand et al. 2004; Trujillo et al. 2005). Auch in der Gruppe der β -Proteobakterien wurden knöllchenbildende und Stickstoff-fixierende Endosymbionten identifiziert. Diese wurden als Vertreter der Gattungen *Ralstonia*, *Cupriavidus* oder *Burkholderia* Spezies charakterisiert (Moulin et al. 2001; Chen et al. 2003). Diese β -Rhizobien gehen vor allem mit Leguminosen der Unterfamilie Mimosoideae Symbiose ein (Gyaneshwar et al. 2011). Vertreter der Actinomyceten (*Frankia* sp.) induzieren Wurzelknöllchen an Pflanzen der Gattung *Alnus* (Pawlowski & Sirrenberg 2003).

Das Wirtsspektrum der Rhizobien ist meist sehr eng auf eine oder wenige charakteristische Wirtspflanzen begrenzt. Beispiele hierfür sind die Interaktionen von *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* mit Weissklee und *Mesorhizobium loti* mit Hornklee. Einzelne Vertreter der Rhizobien können aber auch ein extrem breites Wirtsspektrum aufweisen, z.B. *Sinorhizobium fredii* NGR234 mit über 100 verschiedenen Wirtspflanzen (Pueppke & Broughton 1999). *Bradyrhizobium japonicum* besitzt ein relativ enges Wirtsspektrum. Neben der landwirtschaftlich bedeutenden Interaktion mit Soja (*Glycine max*), kann *Bradyrhizobium japonicum* mit Kuhbohne (*Vigna unguiculata*), Mungbohne (*Vigna radiata*) und Purpurbuschbohne (*Macroptilium atropurpureum*) eine funktionelle Knöllchensymbiose eingehen.

Die Wirtsspezifität ist in einem molekularen Signalaustausch zwischen Bakterien und Pflanzen begründet, der die Erkennung der Symbiosepartner, die Besiedelung des Wirts, die bakterielle Differenzierung und die pflanzliche Abwehr beeinflusst (Downie 2010).

Symbiose: Stadien, Funktion, Differenzierung

Ein komplexer Prozess mit engem Signalaustausch zwischen den Interaktionspartnern führt zur Ausbildung der Symbiose. Dieser Prozess durchläuft mehrere Phasen. Die Erkennung der Symbiosepartner erfolgt in mehrere Stufen. Eine Reihe verschiedener Verbindungen werden von der Pflanze in den Boden abgegeben. Chemorezeptoren an der Oberfläche der Rhizobien erkennen einzelne Verbindungen und induzieren Chemotaxis (Meier et al. 2007; Webb et al. 2014). Vor allem Dicarbonsäuren und Aminosäuren agieren als Lockstoffe für Rhizobien (Armitage et al. 1988; Barbour et al. 1991; Brencic & Winans 2005). Für die Anlagerung der Rhizobien an die Wurzeloberfläche ist vor allem die Fähigkeit zur Bildung eines Biofilms von Bedeutung (Downie 2010). Pflanzliche Lectine sowie rhizobielle Oberflächenpolysaccharide, Adhesine und Flp-Pili spielen dabei eine Rolle (Laus et al. 2006; Rodriguez-Navarro et al. 2007; De Hoff et al. 2009; Downie 2010; Mongiardini et al. 2016).

Bei der Erkennung der Symbiosepartner werden spezifische Signale ausgetauscht. Die Pflanzen sekretieren Flavonoide, die sich abhängig von der Pflanzenspezies in ihrer Struktur, im Sättigungsgrad und in ihrem Hydroxylierungsmuster unterscheiden. Die Flavonoide der Wirtspflanze werden von den Rhizobien erkannt. Dafür sind in Rhizobien verschiedene Regulatorproteine, wie NodD, NodV-NodW und SyrM, verantwortlich. Rhizobien produzieren und sekretieren daraufhin spezifische Nod-Faktoren (Göttfert 1993; Schultze & Kondorosi 1998). Das sind Lipo-Chito-Oligosaccharide, die von den Pflanzen durch Nod-Faktorrezeptoren erkannt werden (Radutoiu et al. 2007). Dieser Signalaustausch löst in den Interaktionspartnern komplexe Regulationsmechanismen aus, welche die Infektion und Kolonisierung von Zellen des Wurzelcortex erlauben und zur Bildung von funktionellen Knöllchen mit stickstofffixierenden Bakteroiden führen (Popp & Ott 2011; Oldroyd 2013). Eine Vielzahl weiterer Signalmoleküle ist notwendig um in diesem Prozess die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanzen und die Differenzierung der Bakterien zu Bakteroiden zu regulieren. Dazu gehören die verschiedenen von Rhizobien produzierten Polysaccharide (Becker et al. 2005; Downie 2010). Exopolysaccharide (EPS) und kapsuläre Polysaccharide (KPS) sind in frühen Infektionsstadien, vor allem bei der Erkennung der Symbiosepartner und der Anheftung der Bakterien an die Wurzelhaarzellen wichtig (Janczarek et al. 2015). Die Lipopolysaccharide (LPS) sind in späteren Stadien der Symbiose involviert (Becker et al. 2005; Janczarek & Rachwał 2013; Janczarek et al. 2015).

Neben den Polysacchariden sekretieren Rhizobien eine Vielzahl von Proteinen, welche die Interaktion mit ihren Wirtspflanzen beeinflussen.

Proteinsekretionssysteme

Proteinsekretionssysteme spielen eine wichtige Rolle in der Interaktion von Bakterien mit ihrer Umwelt. Sie transportieren Proteine aus dem Cytosol in den extrazellulären Raum, in einigen Fällen auch bis in Wirtszellen. Für gram-negative Bakterien wurden mindestens 9 verschiedene Sekretionssysteme (T1SS-T9SS) für Proteine beschrieben (Desvaux et al. 2009; Glew et al. 2012). Dabei kann zwischen einstufigen und zweistufigen Transport unterschieden werden. Einstufige Sekretionssysteme transportieren die Proteine direkt aus dem Cytosol in den Überstand, und geben ihre Substrate nicht im Periplasma frei. Dieser einstufige Transport wird durch die Sekretionssysteme vom Typ-I, Typ-III, Typ-IV und Typ-VI vollzogen (Chagnot et al. 2013). Die Typ III-, Typ IV- und Typ VI-Sekretionssysteme sind in der Lage die Proteine durch extrazelluläre Strukturen (Nadel, Pili) bis in eine eukaryotische Wirtszelle einzuschleusen.

Beim zweistufigen Transport werden die Proteine zunächst durch das Sec- oder Tat-System ins Periplasma transportiert. Erst im zweiten Schritt werden sie durch ein Sekretionssystem (T2SS, T5SS, T7SS, oder T8SS) in den Überstand transportiert. Die Substrate für den zweistufigen Transport tragen N-terminale Sekretionssignale für die Erkennung durch das Sec- bzw. Tat-System (Desvaux et al. 2009; Chagnot et al. 2013).

Typ I-Sekretionssysteme

Aufbau und Funktion der T1SS

Typ I-Sekretionssysteme (T1SS) sind Sec-unabhängige Systeme. Sie transportieren Proteine in einem Schritt aus dem Cytoplasma in den extrazellulären Raum. Das erste untersuchte T1SS ist das Sekretionssystem für α -Hämolyisin (HlyA) aus *E. coli*. Typ I-Sekretionssysteme bestehen aus drei Proteinen in der Zellhülle des Bakteriums. In der inneren Membran befindet sich ein ATP-bindendes Protein (ABC-Protein). In der äußeren Membran bildet ein Membranprotein (TolC-Trimer) eine Proteinpore (Koronakis et al. 2000). Die dritte Komponente ist ein Membranfusionsprotein (MFP). Dieses Protein ist auf der periplasmatischen Seite der inneren Membran lokalisiert. Während des Transports verknüpft es die Membrankomponenten des Sekretionsapparates (Lenders et al. 2013; Thomas et al. 2014). Die Energie für den Transport wird durch die Hydrolyse von ATP am ABC-Protein auf der cytoplasmatischen Seite der Membran geliefert. Dafür ist die Interaktion des Substrats mit dem ABC-Protein notwendig.

Substrate des T1SS

Die Substrate der Typ I-Sekretionssysteme tragen ein C-terminales Sekretionssignal, das nicht abgespalten wird. Dieses Signal ist eher ein Strukturmotiv als eine konservierte Sequenz (Thomas et al. 2014). Der Transport der Substrate erfolgt posttranslational und ungefaltet (Debarbieux &

Wandersman 2001; Fernandez & de Lorenzo 2001). Untersuchungen haben gezeigt, dass der C-Terminus der Proteine zuerst an der Oberfläche der Zelle erscheint (Lenders et al. 2015). Typ I-Sekretionssysteme sind vor allem bei pathogenen Bakterien weit verbreitet. Typische Substrate für T1SS sind Adenylatzyklen, Lipasen, Proteasen und Toxine. Dabei kann die Größe der Substrate deutlich variieren, von 19 kDa bei HasA aus *Serratia marcescens* bis zu mehreren hundert kDa bei MARTX- und RTX-Proteinen (Letoffe et al. 1994; Hinsä et al. 2003; Satchell 2011; Holland et al. 2016). Typische Substrate für das T1SS sind RTX-Proteine. Viele dieser Proteine sind wichtige Pathogenitätsfaktoren, da sie in Wirtszellen Ionenkanäle ausbilden können, und dadurch den Zelltod provozieren (Benz 2016). Ein Merkmal für diese Proteine sind Sequenzwiederholungen, die sogenannten „repeats“. Besonders das Sequenzmotiv GGXGDXXX tritt in wenigen bis zu über 50 Wiederholungen in Substraten des T1SS auf (Delepelaire 2004; Linhartova et al. 2010; Thomas et al. 2014).

T1SS in Rhizobien

Als eines der ersten sekretierten Proteine wurde NodO aus *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* identifiziert (de Maagd et al. 1989). NodO zeigt Sequenzähnlichkeit zu RTX-Proteinen und besitzt eine C-terminale nichtspaltbare Signalsequenz. Der Transport des Proteins erfolgt durch ein Typ I-Sekretionssystem (Economou et al. 1990; Scheu et al. 1992; Sutton et al. 1996; Finnie et al. 1997). NodO kann *in vitro* Kationen-selektive Kanäle in Lipiddoppelschichten bilden und ist ein Calcium-bindendes Protein (Sutton et al. 1994). Für die Induktion der Knöllchenbildung an *Vicia hirsuta* wird NodO in *R. leguminosarum* bv. *viciae* essentiell, wenn die Gene *nodEF*¹ fehlen (Downie & Surin 1990). Detaillierte Studien zeigten, dass NodO für die Entwicklung funktioneller Infektionsschläuche von Bedeutung ist (Walker & Downie 2000).

In Rhizobien wurden mehrere Vertreter der T1SSe näher untersucht. Dazu gehören das PrsD/PrsE-System und das ExpD1/ExpD2-System (Finnie et al. 1997; Krol & Skorupska 1997; York & Walker 1997; Finnie et al. 1998; Moreira et al. 2000; Russo et al. 2006; Krehenbrink & Downie 2008). Eine Reihe von Proteinen, z.B. ExpE1, die Adhesine RapA1, RapA2, und RapC sowie Polysaccharid-modifizierenden Proteine, z.B. ExoK, ExsH, und die Polysaccharidlyasen PlyA und PlyB sind als Substrate für diese T1SSe in verschiedenen Rhizobien identifiziert worden (Finnie et al. 1998; Moreira et al. 2000; Ausmees et al. 2001; Russo et al. 2006; Fauvart & Michiels 2008; Krehenbrink & Downie 2008).

¹ NodE und NodF sind für die Fettsäuremodifizierung der Nod-Faktoren verantwortlich.

Typ II-Sekretionssysteme

Aufbau und Funktion

Typ II-Sekretionssysteme sind komplizierte Multiproteinkomplexe, die sowohl bei pathogenen als auch nichtpathogenen gram-negativen Bakterien verbreitet sind. Substrate des T2SS sind im allgemeinen Enzyme, wie Proteasen, Lipasen, Phosphatasen und Kohlenhydrat-modifizierende Enzyme.

T2SS bestehen aus 12-15 verschiedenen Proteinen, die vier Struktureinheiten ausbilden: einen periplasmatischen Pseudopilus, die Pore in der äußeren Membran, den Komplex der inneren Membran und die ATPase (Korotkov et al. 2012). Die Bestandteile des periplasmatischen Pseudopilus sind durch *gspG*, *gspH*, *gspI*, *gspJ* und *gspK* codiert. Die Aspartatpeptidase GspO prozessiert die Komponenten des Pseudopilus (Strom et al. 1993; Korotkov et al. 2012). Die Pore in der äußeren Membran wird durch das Sekretin GspD gebildet, das unter Vermittlung von GspS in die Membran eingebaut wird (Hardie et al. 1996; Koo et al. 2012). Der Komplex in der inneren Membran wird durch die Proteine GspC, GspL, GspM und GspF gebildet, die sich in enger Assoziation mit der cytoplasmatischen ATPase GspE befinden (Korotkov et al. 2012). Die Interaktion der Untereinheiten erfolgt während des Transportes vermutlich dynamisch (Korotkov et al. 2012).

Die Proteine gelangen über das Sec- oder Tat-System aus dem Cytoplasma ins Periplasma (Voulhoux et al. 2001; Korotkov et al. 2012; Putker et al. 2013). Die Substrate besitzen zur Erkennung im Cytoplasma die typische Signalsequenz am N-Terminus. Diese Signalsequenz wird nach dem Export durch das Sec-System im Periplasma abgespalten (Lee & Schneewind 2001). Die Substraterkennung durch das T2SS erfolgt im Periplasma. Bisher konnte keine konservierte Sequenz als Sekretionssignal identifiziert werden. Es sind vermutlich strukturelle Signale für die Erkennung verantwortlich. Eine wichtige Voraussetzung für den Transport ist die Faltung der Proteine in den „Sekretions-kompetenten“ Zustand. Die Energie für den Transport erhält das T2SS durch Hydrolyse von ATP durch die ATPase auf der cytoplasmatischen Seite der inneren Membran. Ein komplexer Übertragungsmechanismus ermöglicht die Energieübertragung für den Transport der Substrate vom Periplasma durch die äußere Membran (Camberg & Sandkvist 2005; Korotkov & Sandkvist 2019).

T2SS in Rhizobien

Einige Rhizobien besitzen Gene, die für potentielle T2SS codieren. Bisher wurden keine eindeutigen Nachweise für den Transport von Proteinen durch T2SS in Rhizobien beschrieben. *Sinorhizobium fredii* NGR234 besitzt ein Gencluster mit 13 ORFs, die für ein T2SS codieren könnten (Schmeisser et al. 2009). In *S. fredii* HH103 und *M. loti* wurden jeweils 11 ORFs in einem sehr ähnlichem Gencluster detektiert (Schmeisser et al. 2009; Vinardell et al. 2015). *B. japonicum* USDA110 besitzt ein trunkiertes Cluster mit nur 8 ORFs (Kaneko et al. 2002; Schmeisser et al. 2009). In *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 und *S. meliloti* 1021 wurden keine Gene für ein T2SS detektiert (Kreihenbrink & Downie 2008; Schmeisser et al. 2009).

In *S. fredii* NGR234 und SfHH103 wurden einzelne Proteine als potentielle Substrate für den Transport durch das T2SS beschrieben. Die codierenden Gene sind gemeinsam mit den konservierten Komponenten des Sekretionssystems im T2SS-Gencluster lokalisiert (Schmeisser et al. 2009; Vinardell et al. 2015).

Typ III-Sekretionssysteme

Aufbau und Funktion

Typ III-Sekretionssysteme (T3SS) sind komplizierte Proteinkomplexe, die den Transport bakterieller Proteine aus dem Cytoplasma bis in die eukaryotische Zelle vermitteln. Der Transport der Proteine durch das T3SS erfolgt in einem Schritt ohne Zwischenstufen und ohne Beteiligung des Sec-Systems. In pathogenen Bakterien sind die Funktion des T3SS und die sekretierten Proteine zumeist von entscheidender Bedeutung für die Interaktion mit dem Wirtsorganismus (Mudgett 2005). Auch nichtpathogene Bakterien nutzen T3SS in der Interaktion mit eukaryotischen Organismen (Viprey et al. 1998; Cusano et al. 2011; Barret et al. 2013). In Mikroorganismen sind die Bestandteile des T3SS hochkonserviert, im Gegensatz dazu sind die sekretierten Proteine in den einzelnen Spezies sehr verschieden (Cornelis 2006; Galan & Wolf-Watz 2006; Galan 2009; Diepold & Wagner 2014).

Durch röntgenkristallographische Untersuchungen, Kernmagnetresonanzspektroskopie und Kryoelektronenmikroskopie konnten Sekretionsapparate von pathogenen Bakterien, wie *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* und enteropathogenen *Escherichia coli* (EPEC), bis zur molekularen Auflösung dargestellt werden (Kubori et al. 1998; Tamano et al. 2000; Blocker et al. 2001; Sekiya et al. 2001; Yip et al. 2005; Zarivach et al. 2007; Abrusci et al. 2014; Portaliou et al. 2016; Hu et al. 2018; Majewski et al. 2019). Das Sekretionssystem kann in drei große strukturelle Bausteine unterteilt werden: den Basalkörper, der beide bakteriellen Membranen durchspannt; das extrazelluläre Segment; und die cytoplasmatischen Komponenten, die mit der inneren Membran assoziiert sind (Portaliou et al. 2016, Hu et al. 2017).

Der **Basalkörper** besteht aus mehreren Ringstrukturen und ist das Kernstück des Sekretionsapparates. Er bildet einen kontinuierlichen Tunnel durch die innere Membran, das Periplasma und die äußere Membran (Marlovits et al. 2004; Schraidt & Marlovits 2011; Radics et al. 2014).

Die **extrazellulären Strukturen** der T3SS unterscheiden sich bei pflanzenpathogenen und tierpathogenen Bakterien (Roine et al. 1997; He & Jin 2003; Weber & Koebnik 2005). Bei Pflanzenpathogenen wird sie als Hrp-Pilus (*hypersensitive response pathogenicity*) bezeichnet. Der Hrp-Pilus ist hohl, lang, dünn und scheinbar flexibel. Im Gegensatz dazu ist die Nadelstruktur, die bei tierpathogenen Bakterien beobachtet wurde, starr, kürzer und besitzt einen größeren Durchmesser (Roine et al. 1997; Daniell et al. 2001; Van Gijsegem et al. 2002; Ghosh 2004; Weber & Koebnik 2005; Lara-Tejero & Galan 2019). Die Funktion der extrazellulären Strukturen ist bei Nadel und Hrp-Pili gleich. Sie durchspannen den extrazellulären Raum bis zur Wirtszellmembran und bilden einen Kanal für die Effektorproteine (Roine et al. 1997; Brown et al. 2001; Büttner & Bonas 2002; Lara-Tejero & Galan 2019). An der Spitze der Nadel bzw. des Pilus befinden sich die Translocatorproteine, welche eine Pore in der Wirtszellmembran bilden (Blocker et al. 1999; Rossier et al. 2000; Scherer et al. 2000; Chatterjee et al. 2013; Myeni et al. 2013; Park et al. 2018). Auf der **cytoplasmatischen Seite** des Transportapparates befindet sich der ATPase-Komplex. Die ATPase ist über den C-Ring und weitere Helferproteine an den Transportapparat assoziiert (Jackson & Plano 2000; Blaylock et al. 2006; Diepold & Wagner 2014). Die ATPase ist essentiell für den Transport von Proteinen durch das T3SS. Es wurde gezeigt, dass sie Ähnlichkeit zu den ringförmigen AAA+ ATPase-Maschinen beim Proteinabbau besitzt. Sie könnte an der Ablösung und Entfaltung der Transportsubstrate von den Chaperonen beteiligt sein (Akeda & Galan 2004; Lorenz & Büttner 2009; Majewski et al. 2019).

Für den Aufbau eines funktionellen Sekretionssystems werden mehr als 20 Proteine benötigt, wovon mindestens 15 Proteine feste Bestandteile des Systems sind (Cornelis 2006; Büttner 2012). T3SSe sind evolutionär mit dem Flagellarapparat verwandt (Gophna et al. 2003; Diepold & Armitage 2015). Strukturelle Gemeinsamkeiten von Flagellarapparat und T3SS wurden vor allem im Basalkörper und im cytoplasmatischen ATPase-Komplex gefunden (Blocker et al. 2003; Diepold & Armitage 2015; Portaliou et al. 2016).

Substrate des T3SS

Durch das T3SS werden verschiedene Arten von Proteinen sekretiert. Dazu gehören Helferproteine, Strukturproteine, die am Aufbau des Sekretionsapparates beteiligt sind, und Effektoren, die in die Wirtszelle injiziert werden. Zu den sekretierten Strukturproteinen gehören die Untereinheiten des Pilus bzw. der Nadel und die Komponenten des Translokons. Helferproteine sind z.B. Zellwand-degradierende Enzyme, die den Einbau des Translokons in die Wirtszellmembran begünstigen. Effektorproteine greifen in wichtige Funktionen der Wirtszelle

ein, um die Infektion des Wirtsorganismus zu ermöglichen. Sie beeinflussen die Abwehrreaktionen, greifen in Signalwege ein, binden, modifizieren oder inhibieren Schlüsselmoleküle, sie modulieren die Genexpression oder verändern die Stabilität von Proteinen (Deslandes & Rivas 2012; Feng & Zhou 2012). Für eine Reihe von Effektoren konnten verschiedene Enzymaktivitäten, z.B. als Ubiquitinligase, Acetyl- und Ribosyltransferase, Protease und Phosphatase gezeigt werden (Grant et al. 2006).

Für die Substraterkennung durch das T3SS wurden verschiedene Signale beschrieben. Die Signale können in Aminosäuresequenzen, mRNA und Chaperon-Interaktionen begründet sein. Mehrere Signale in einem Effektor können die Effizienz der Sekretion steigern (Galan & Wolf-Watz 2006). Für viele Effektoren wurde das Sekretionssignal als Peptidsequenz am N-Terminus der Proteine identifiziert. Dabei scheint keine konservierte Sequenz in den verschiedenen Effektoren zu existieren (Mudgett et al. 2000; Schechter et al. 2004; Galan & Wolf-Watz 2006). Viele Jahre wurde ein mRNA-codiertes Signal kontrovers diskutiert (Sorg et al. 2005). Einzelne Arbeiten zeigen jetzt die Translokation von Proteinen in Abhängigkeit von 5'-untranslatierten RNA-Sequenzen unter Beteiligung von Hfq (Niemann et al. 2013). Andere Effektoren werden mit der Hilfe eines Chaperons zum Sekretionsapparat geführt (Lohou et al. 2013). Es scheint jedoch ein Unterschied im Signal für das Targeting zum T3SS und für die Sekretion zu existieren (Chen et al. 2013).

T3SS in Rhizobien

In verschiedenen Rhizobien, z.B. *Sinorhizobium fredii* NGR234, *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, *B. elkanii* USDA61, *Mesorhizobium loti* MAFF303099, *S. fredii* USDA257, *S. fredii* HH103 und *Rhizobium etli* CFN42 wurden funktionelle T3SS nachgewiesen (Viprey et al. 1998; Gonzalez et al. 2003; Krishnan et al. 2003; de Lyra Mdo et al. 2006; Süß et al. 2006; Rodrigues et al. 2007; Lopez-Baena et al. 2008; Okazaki et al. 2009; Sanchez et al. 2009). In vielen weiteren Spezies wurden Gencluster, die für Typ III-Sekretionssysteme codieren, identifiziert (Tampakaki 2014). Im Gegensatz dazu besitzen *Sinorhizobium meliloti* 1021 und *Mesorhizobium loti* R7A keine Typ III-Sekretionssysteme (Galibert et al. 2001; Sullivan et al. 2002).

Die Gene für die T3SS sind in Rhizobien in Genclustern (*tts*-Cluster) angeordnet, die in symbiontischen Genregionen oder auf symbiontischen Plasmiden lokalisiert sind (Marie et al. 2001; Tampakaki 2014). Einige Rhizobien besitzen zwei unabhängige Gencluster für Typ III-Sekretionssysteme (Tampakaki 2014). Für diese Stämme wurde die Aktivität und Funktion des Proteinsekretionssystems nur für eines der beiden Cluster (T3SS-I) nachgewiesen (Schuldes et al. 2012; Tampakaki 2014). Die funktionellen *tts*-Gencluster enthalten 10 ORFs die signifikante Ähnlichkeiten zu *hrc*- bzw. *ysc*-Genen von T3SS pathogener Bakterien aufweisen (Hueck 1998; Marie et al. 2001). Die konservierten Proteine in Rhizobien wurden darum mit Rhc (*rhizobium conserved*) in Analogie zu Hrc bzw. Sct der pathogenen Systeme bezeichnet (Bogdanove et al. 1996; Hueck 1998; Viprey et al. 1998; Marie et al. 2001).

Neben den konservierten *rhc*-Genen findet man weitere ORFs, z.B. *nopA* und *ttsI*, die spezifisch für rhizobielle T3SS sind. Effektoren sind nur teilweise in den *tts*-Genclustern codiert. So wurden die Gene von Effektoren auch in anderen Regionen der rhizobiellen Genome gefunden (Süß et al. 2006; Kimbrel et al. 2013; Vinardell et al. 2015).

Typ IV-Sekretionssysteme

Die Typ IV-Sekretionssysteme (T4SS) sind funktionell sehr vielfältig. Sie können DNA, Proteine und DNA-Proteinkomplexe bei direktem Zell-Zellkontakt in prokaryotische und eukaryotische Zellen transportieren. Die T4SS werden in drei große Unterfamilien eingeteilt: die Konjugationssysteme, die Protein-Transportsysteme und die „DNA uptake/release“ Systeme (Souza et al. 2012; Christie et al. 2014). Die Konjugationssysteme transferieren DNA von einer bakteriellen Zelle in eine andere, die Proteintransportsysteme sind verantwortlich für den Transport von Effektorproteinen in eukaryotische Wirtszellen. Das VirB/VirD4-System von *Agrobacterium tumefaciens* wird meist als Referenz für T4SS betrachtet. Die „DNA uptake/release“ Systeme transportieren DNA aus oder ins extrazelluläre Medium (Christie et al. 2017; Hofreuter et al. 2001).

T4SS sind Multiproteinkomplexe, der aus 12 und mehr verschiedenen Proteinen aufgebaut wird. Das Sekretionssystem ist aus vier funktionellen Substrukturen aufgebaut: der ATPase-Einheit, dem Innermembran-Komplex, dem Periplasma-durchspannenden Komplex in der äußeren Membran und dem extrazellulären Pilus (Fronzes et al. 2009; Christie et al. 2014).

Die Substrate des T4SS tragen ein Sekretionssignal am C-Terminus. Die bekannten Signale besitzen keine Sequenzkonservierung, tragen aber vermehrt positiv geladene (Arginin) und hydrophobe Aminosäuren (Vergunst et al. 2005). Es gibt weitere Hinweise auf zusätzliche interne Motive bei den Effektoren, die als Signal für die Sekretion dienen. Bei der Erkennung sind oftmals auch Chaperone und Helferproteine beteiligt (Christie et al. 2014). Der Transport der Effektorproteine erfolgt zumeist Sec-unabhängig aus dem bakteriellen Cytosol in die Zielzelle. Für einzelne Beispiele wurde aber auch die Beteiligung des Sec-Systems beschrieben.

Typ IV in Rhizobien

Gene für T4SS wurden in verschiedenen Rhizobien nachgewiesen. Bei *Mesorhizobium loti* R7A wurde gezeigt, dass wenigstens zwei Proteine durch das T4SS in Pflanzenzellen transportiert werden können. Die Funktion des T4SS in *M. loti* R7A hat deutlichen Einfluss auf die Symbiose mit bestimmten Wirtspflanzen (Hubber et al. 2004).

In weiteren Rhizobien wurden Gene, die für potentielle T4SS codieren, identifiziert, z.B. in *Sinorhizobium meliloti* 1021, *S. fredii* HH103, *B. japonicum* USDA110 und *Rhizobium leguminosarum* (Kaneko et al. 2002; Jones et al. 2007; Krehenbrink & Downie 2008; Vinardell et al. 2015).

Typ V-Sekretionssysteme

Die Typ V-Sekretionssysteme sind die vermutlich einfachsten Transportsysteme für den zweistufigen Export von Adhesinen, Enzymen, Toxinen und Virulenzfaktoren (Henderson et al. 2004). Es existieren mehrere Untergruppen für T5SS, die Autotransporter (Desvaux et al. 2004; Bernstein 2019), die „Zwei- Partner-Transporter“ (Clantin et al. 2007), trimere Autotransporter (Cotter et al. 2005), „Fusionierte Zwei-Partner-Systeme“ (Salacha et al. 2010, Leo et al. 2012) und invertierte Autotransporter (Leo et al. 2012, Gawarzewski et al. 2013). Die Autotransporter bestehen aus einem einzelnen Protein, das zwei funktionelle Domänen vereint: eine Passengedomäne (α) und eine Translokationsdomäne (β). Bei den Zwei-Partner-Transportern sind diese Domänen auf zwei Proteine verteilt. Die Proteine werden mit einem N-terminalen Sec-Signal im Cytoplasma gebildet und durch das Sec-System ins Periplasma transportiert. Dort lagert sich die Translokationsdomäne bzw. das Membranprotein in die äußere Membran ein und vermittelt den Transport der Passengedomäne bzw. Substratproteins nach außen. Der Einbau der Passengedomäne in die Membran könnte durch den Bam-Komplex (*barrel assembly machinery*) vermittelt sein (Sauri et al. 2009; Bernstein 2019). Bei den Autotransportern kann es nach dem Transport durch die äußere Membran zu einer Abspaltung und Freisetzung der Passengedomäne durch eine Peptidase kommen (Jacob-Dubuisson et al. 2004; Thanassi et al. 2005; Wells et al. 2007; Jacob-Dubuisson et al. 2013).

Die Identifikation der T5SS ist auf der Grundlage der Sequenz relativ unsicher. In *Rhizobium leguminosarum* wurden 5 Autotransporter-Proteine postuliert (Krehenbrink & Downie 2008).

Typ VI Sekretionssysteme

Aufbau und Funktion

Die Typ VI-Sekretionssysteme (T6SS) sind in Bakterien weit verbreitet. Sie sind in großen variablen Genclustern codiert. Es gibt zwei Untergruppen von T6SS, die antibakteriellen Systeme und die anti-eukaryotischen Systeme (Ma et al. 2009; Hood et al. 2010; Sana et al. 2016). Die Sekretionssysteme reichen durch die bakterielle Zellhülle vom bakteriellen Cytoplasma, durch die innere Membran, das Periplasma, die äußere Membran bis in die Zielzelle. Die Komponenten des Sekretionsapparates sind eine Phagen-ähnliche Grundplatte mit Spitze, ein langer starrer innerer Kanal und ein kontraktiler Schaft (Filloux et al. 2008; Coulthurst 2013; Basler 2015; Coulthurst 2019). Der Transport der Proteine erfolgt in einem Schritt ohne Beteiligung des Sec- oder Tat-Apparates.

Die sekretierten Effektoren der T6SSe sind sehr variabel. Es wurden Effektoren beschrieben, die in ihrer Wirkung auf die Zellwand, die Membran oder die Nukleinsäuren zielen (Durand et al. 2014; Russell et al. 2014).

T6SS in Rhizobien

In *Rhizobium leguminosarum* wurde ein Gencluster identifiziert, das für die Begrenzung des Wirtsspektrums verantwortlich gemacht wurde (Roest et al. 1997; Bladergroen et al. 2003). Das Cluster besteht aus 14 Genen, die als *imp* (impaired in nodulation) bezeichnet wurden. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Cluster für die Sekretion von Proteinen verantwortlich ist. Später stellte man fest, dass es sich dabei vermutlich um ein Gencluster für ein T6SS handelt. Inzwischen wurden in einigen Rhizobien-Genomen Gene für T6SSe identifiziert (Sugawara et al. 2013).

Weitere Sekretionssysteme

Es wurden weitere spezifische Sekretionssysteme beschrieben, wie chaperon-usher-Transport, Typ-VII, Typ-VIII und Typ IX-Systeme (Abdallah et al. 2007; Kharade & McBride 2015). Im weiteren Sinne könnte man auch die Vorgänge bei der Biogenese von Typ IV-Pili Proteinsekretion betrachten. Auf diese Systeme wird hier nicht weiter eingegangen.

Zusammenfassung der Forschungsergebnisse

1. Untersuchung der Expression des Typ III-Sekretionssystems in Knöllchen und Analyse des *tts*-Box-Promotors

Zehner, S., Schober, G., Wenzel, M., Lang, K., Göttfert, M. 2008. Expression of the *Bradyrhizobium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated *tts* box promoter. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21, 1087-1093.

Die Gene, die für das Typ III-Sekretionssystem in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110* (*Bja110*) codieren, sind in einem Gencluster in der symbiontischen Region auf dem Chromosom lokalisiert (Göttfert et al. 2001; Kaneko et al. 2002). Das *tts*-Gencluster ist von zahlreichen Insertionssequenzen durchsetzt und umgeben, die auf den Erwerb der Gene durch horizontalen Gentransfer hindeuten. Im Gencluster sind sowohl die konservierten *rhc* gene als auch einzelne Gene für sekretierte Proteine (*nop*; *nodulation outer proteins*) codiert. Zusätzlich sind einige Gene unbekannter Funktion enthalten. Als Regulator der konservierten Gene des *tts* Clusters wurde TtsI identifiziert. TtsI ist im Gencluster codiert und wird durch eine *nod*-Box reguliert (Krause et al. 2002). Damit ist die Expression des Regulators TtsI in *B. japonicum* abhängig von Flavonoiden, NodD1 und NodV/NodW. Die Sequenz von TtsI besitzt Homologie zu Regulatoren der Zwei-Komponenten-Regulationssysteme. Diese bakteriellen Regulationssysteme bestehen aus einer Sensorkinase und einem Regulatorprotein (Keener & Kustu 1988). Die Sensorkinase wird durch ein externes Signal aktiviert und an einem Histidin autophosphoryliert. Durch Interaktion mit dem Regulatorprotein wird die Phosphatgruppe vom Sensorprotein auf ein Aspartat des Regulators übertragen. Der so aktivierte Regulator bindet an konservierte Sequenzabschnitte der DNA und reguliert damit die Transkription der nachfolgenden Gene. Die vermutete Sensorkinase, die mit TtsI interagieren könnte, wurde in Rhizobien bisher nicht identifiziert. In den nicht-translatierten Intergensequenzen des *tts* Genclusters wurde eine konservierte Promotersequenz, die *tts*-box identifiziert (Krause et al. 2002). Diese Sequenz wurde auch in anderen rhizobiellen *tts*-Genclustern nachgewiesen (Marie et al. 2004; Lopez-Baena et al. 2008; Okazaki et al. 2009). In verschiedenen Studien an Rhizobien konnte gezeigt werden, dass TtsI die Expression der Gene des *tts*-Genclusters in Abhängigkeit von NodD1 und Flavonoiden reguliert (Viprey et al. 1998; Krause et al. 2002; Lopez-Baena et al. 2008).

Zusammenfassung der Publikation und eigener Beitrag

Die Idee und Planung der Experimente stammen von Susanne Zehner (S.Z.) und Michael Göttfert (M.G.). Die Studentinnen Grit Schober (G.S.) und Mandy Wenzel (M.W.) arbeiteten unter Anleitung von Susanne Zehner. Die Experimente mit RNA wurden von Kathrin Lang (K.L.) und Susanne Zehner durchgeführt. Die Auswertung und Interpretation der Daten, sowie das Schreiben der Veröffentlichung erfolgte durch Susanne Zehner.

Die Arbeit „Expression of the *Bradyrhizobium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated *tts* box promoter“ beschäftigt sich mit der Aktivität der TtsI-regulierten Gene und der Rolle der *tts*-Box für die Expression der downstream codierten Gene in *B. japonicum*. Frühere Untersuchungen legten nahe, dass die identifizierte *tts*-Box-Sequenz Teil der Promotorregion der TtsI-regulierten Gene in Rhizobien darstellt (Krause et al. 2002). Nicht nur die konservierten *rhc* Gene des *tts*-Clusters besitzen eine *tts*-Box, auch für *nop*-

* *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 wurde umbenannt in *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 (Delamuta et al. 2013). In dieser Arbeit wird durchgehend die Bezeichnung *B. japonicum* verwendet.

Gene wurde diese Sequenz in der Intergenregion identifiziert (Viprey et al. 1998; Krause et al. 2002; Marie et al. 2004; Süß et al. 2006; Lopez-Baena et al. 2008; Okazaki et al. 2009).

Eine genomweite Analyse zur Identifizierung von *tts*-Box-Motiven in *B. japonicum* wurde durchgeführt (M.G., S.Z.). Im gesamten Genom wurden 39 *tts*-Box-Sequenzen detektiert, wovon 31 in der symbiontischen Region lokalisiert sind. Die in 3'-Richtung der *tts*-Boxen liegenden Gene wurden auf ihre Homologie mit Einträgen in den Sequenzdatenbanken analysiert (Tab. 1).

Tab. 1: Identifizierte *tts*-Box-Sequenzen im Genom von *B. japonicum* USDA110 und die Analyse der Leserahmen in 3'-Leserichtung (aus Süß et al. 2006, aktualisiert).

<i>tts</i>-Box Sequenz	Erstes Gen in Lese-richtung	Proteinbezeichnung, Alias, Charakteristika der Proteine	
TTGTCGTCAGCTTTTCGACAGGTGCTGCAGGTAGAGTC	<i>blr1649</i>	NopE2 ⁽²⁾	sekret. Effektor
TCTTAGTCAGCTTTTCGCAAGCTGCTCCTGCTAGCATG	<i>bs11652</i>		hypothet. Protein
AGCTCGTCAGCTTCTCGAAAGCCAACCTTCCTAGCATT	<i>gunA2</i>	GunA2 ⁽¹⁾	sekret. Protein
CGCTCGTCAGCTCGACGTAAGCTAAATGTCTTAGAGGC	<i>blr1676</i>	NopM1 ^(4,5,10)	put. Effektor
CCTACGTCAGCTACTCGTCAGCCAGCCAGTCTATGCAG	<i>blr1704</i>		unbekannt
CTTAGGTCAGGTTGTGGTCAGTTAGGTTGTATATTATG	<i>blr1752, nopP</i>	NopP1 ⁽²⁾	sekret. Protein
ACTGCGTCAGGTTATCGACAGGTGGCGCTCGTATCATG	<i>blr1787</i>	NopBA ⁽¹⁰⁾	hypothet. Protein
TTAGCGTCAGCTTGCCGACAGCTAGGCTTACTATGAGC	<i>b111798</i>	NopP2 ⁽⁹⁾ NopAH ⁽¹⁰⁾	similar to NopP
GGCTCGTCAGCTTTTCGAAAGCTAGCGCCCTAGCATG	<i>b111804</i>	NopH ⁽²⁾	sekret. Protein
TCATCGTCAGCTTTTCGACAGGTGTTCCGGCTACCGTA	<i>blr1806</i>	NopE1 ⁽²⁾	sekret. Effektor
TCTTCGTCAGCTTCTTGCAAGCTGCCCTGCTAGCACG	<i>bs11808</i>	NopC ^(8,9)	unbekannt, put. Pilusbaustein
CGATCGTCAGCTTTTCGAAAGCTAAAGCCCCAGCATG	<i>blr1810, nopL</i>	NopL ⁽⁷⁾	put. sekretiert
TCTCCGTCAGGTTTCGTCAGCTCGGCAGCCTATGAAC	<i>blr1812, nopB</i>	NopB ⁽²⁾	sekret. Protein
GTCTCGTCAGCTTTCAGTAAGCCAGCCCGGATACAGAG	<i>bsr1831</i>		unbekannt
GCGATGTCAGGTTTTCGAAAGCAAACGTGAGTAGCGAA	<i>b111840</i>	NopAR ⁽¹⁰⁾	unbekannt
GGTCTGTCAGCTGTTTCGACAGCTAGGCTTCTAGCATA	<i>b111848</i>	NopAJ ⁽¹⁰⁾	unbekannt
TCTTGTCAGCTAGTCGTCAGCCAGTCGGCCTATCCAG	<i>blr1854</i>		unbekannt
GCTTTGTCAGCTTCTGTCAGCTCGTCCAAATAGTAGC	<i>b111862a</i>	NopF ⁽²⁾	sekret. Protein
TCGGCGTCAGCTTACGGACAGCTAAGCTGCTTATCTGC	<i>b111862b</i>		sekret. Protein
CCTTTGTCAGCTTCTCGAAAGCCAGCCTCTCTAACACT	<i>blr1869</i>	NopAB ⁽¹⁰⁾	unbekannt
AGCACGTCAGCTTGTGACAGCTGATCCTAATAGAGTG	<i>b111877</i>		unbekannt
CATTCGTCAGCTTATCGACAGGTAGGCTGCTAAGGGC	<i>blr1904</i>	NopM2 ⁽⁵⁾	sekret. Protein
GCCTCGTCAGCTTCTCGAAAGCTTCCCGAATACTCAC	<i>blr1993, pgl</i>	Pgl ⁽¹⁾	sekret. Protein
GCTTCGTCAGCTTCTCGAAAGCTAGCTTTCACATAACG	<i>blr2052</i>		hypothet. Protein
TGGTGGCCAGCTCCTCGTCAGTTTGCCGCGATATCGGT	<i>blr2058</i>	NopT2 ^(3,4,6)	Cysteinprotease ⁽³⁾
TGTCCGTCAGCTCGCCATCAGCTTGTCCGGGTATCCTC	<i>blr2140</i>	NopT1 ^(2,3,4,6)	Cysteinprotease ⁽³⁾ ,
CTTTGTCAGGTTACAGGACATCTCCTTTCGAGAACAGA	<i>bsr3674</i>		unbekannt
GGTCTGTCAGCTTCGCGTCAGGTAAGCCTTCGAGATCG	<i>blr4695</i>	NopAP ⁽¹⁰⁾	put. K ⁺ -Transport Protein

CGCCCAACAGCTTGACGAAAGCTTAACGCCCTAGGCTT	<i>flgB</i>		put. Flagellarprotein
TTGAAGTCAGTTTGTCTGAGTTGTCCCGGTAGCGCT	<i>blr7131</i>		hypothet. Protein
GCTTTGTCAGCTTCTCTGTCAGCTCGTCCAAATAGTAGC	<i>bll8201</i>	NopAG ⁽¹⁰⁾	sekret. Protein
TCGTCAATCAGGTTCTCGACAGCTTCCCCATTTAAGTTT	<i>bll8244</i>		put. Effektor ⁽¹¹⁾ , Protease, XopD-ähnlich
GTCTCGTCAGCTTTCAGTAAGCTAGTCCCAATAATTGG	1798864r	-	
GACTCGTCAGCTTCTCGAAAGGTAGCGCGCCTAGCGTG	1806041r	-	
ATCTCGTCAGCTTCTCGAAAGCTGCGCCTGCAACAAT	2000571r	-	
ATCTCGTCAGCTTCTTGAAAGGTTGCGGCTACAACAAT	2154581f	-	
GGTTCGTCAGCTTTTGGACAGCTATTCCGGTGTACAATG	2220599r	-	
GGCTTGTAGGCTGTCTGTAAGCTCAGCCCGCTAGGGTC	6329127f	-	
TCTTTGTCAGCTTTTGGAAAGCTAGCCCGAATACTCAG	9101960f	-	

(1) Caldelari Baumberger et al. 2003; (2) Hempel et al. 2009; (3) Fotiadis et al. 2012; (4) Kambara et al. 2009 (5) Xin et al. 2012; (6) Dai et al. 2008; (7) Krause et al. 2002; (8) Okazaki et al. 2009; (9) Tsukui et al. 2013; (10) Kimbrel et al. 2013; (11) Tsurumaru et al. 2015

Es wurden mehrere Gene identifiziert, die für Proteine mit Ähnlichkeit zu Effektoren pathogener Mikroorganismen codieren. Dazu gehören die Gene *bll8244*, *blr2140* (*nopT1*), *blr2058* (*nopT2*) und *blr1904*. Für eine größere Zahl von Genprodukten konnte keine Funktion auf Grundlage von Sequenzhomologien vorhergesagt werden. Sie sind als hypothetische oder unbekannte Gene klassifiziert. Sieben putative *tts*-Box-Sequenzen konnten keinem offensichtlichen ORF zugeordnet werden.

Durch Sequenzvergleich der identifizierten *tts*-Boxen konnten drei konservierte Regionen, die in einem festen Abstand zueinander liegen, definiert werden (GTCAGcT-N₄-GacAG-N₁₁-A). Für die *tts*-Box aus der Promotorregion von *nopB* wurden Varianten erzeugt und die Promotoraktivität anschließend durch eine Reportergenfusion mit *lacZ* quantifiziert (G.S.). Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte die Konsensus-Sequenz der *tts*-Box näher beschrieben werden. Weiterhin konnte auch experimentell gezeigt werden, dass die *tts*-Box ein zentraler Bestandteil der Promotorregion von *nopB* ist. Diese Schlussfolgerung sollte auf andere Gene, die in ihrer Promotorregion eine *tts*-Box aufweisen, übertragbar sein.

Die transkriptionelle Aktivität der Gene downstream der identifizierten *tts*-Boxen wurde durch semiquantitative *reverse transcription*-PCR analysiert (S.Z.). Es wurde Total-RNA aus Flavonoid-induzierten Kulturen 8 h nach der Induktion mit Genistein isoliert (S.Z., K.L.). Durch die Amplifikation von cDNA aus den downstream Regionen der *tts*-Boxen, konnte transkriptionelle Aktivität bei 34 *tts*-Boxen nachgewiesen werden. Weiterhin wurde die Position des transkriptionellen Starts von drei *tts*-Genen (*nopB*, *nopL*, *gunA2*) mittels 5'RACE (rapid amplification of RNA ends) bestimmt (M.W. & S.Z.). Die Aktivität ausgewählter Gene des *tts*-Genclusters von *B. japonicum* wurde auch während verschiedener Phasen der Interaktion mit

Macrottilium atropurpureum untersucht. Es wurden Reportergenfusionen (*lacZ*, *uidA*) mit einem Gen, welches für eine Komponente des Transportapparates codiert (*rhcV*) und mehreren *nop* Genen (*nopB*, *nopL*, *blr1806*, *gunA2*) für die Analyse in Symbiose konstruiert. Damit wurde die Expression der Gene während der Infektion in Wurzelhaaren und in reifen Knöllchen von *M. atropurpureum* nachgewiesen (S.Z.). Auch in Symbiose ist die Expression der untersuchten Gene von TtsI abhängig. Die Reportergenfusionen in einer *ttsI*-Mutante zeigen im Gegensatz zu den Fusionen im Wildtyp-Hintergrund keine Reporteraktivität. Diese Untersuchungen zeigen erstmals, dass die Gene des Typ III-Sekretionssystems nicht nur in initialen Phasen der Interaktion, sondern noch in reifen Knöllchen aktiv sind.

2. Identifizierung sekretierter Proteine von *Bradyrhizobium japonicum*

Süß, C., Hempel, J., **Zehner, S.**, Krause, A., Patschkowski, T., Göttfert, M. **2006.** Identification of genistein-inducible and type III secreted proteins of *Bradyrhizobium japonicum*. J. Biotechnol. 126, 69-77.

Hempel, J., **Zehner, S.**, Göttfert, M., Patschkowski, T. **2009.** Analysis of the secretome of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. J. Biotechnol. 140, 51-58.

Genomweite Sequenzanalysen und Bewertungen für potentiell sekretierte Proteine in *B. japonicum* (unveröffentlicht)

Für die Interaktion der Zellen mit ihrer Umgebung sind Proteine von großer Bedeutung. Die gram-negativen Zellen haben eine Reihe von Strategien und Transportmechanismen, um komplexe hydrophile Moleküle durch die hydrophobe Lipiddoppelschicht der Zellhülle zu transportieren, entwickelt. Die Mehrzahl der Proteine wird durch Sekretionssysteme transportiert. Aber auch der Transport von Proteinen durch Vesikel ist möglich.

In Rhizobien ist das Typ III-Sekretionssystem das bisher am besten untersuchte System. Die ersten Hinweise auf Flavonoid-induzierbare Gene, die das Wirtsspektrum von *S. fredii* USDA257 beeinflussen, wurden schon 1993 publiziert (Meinhardt et al. 1993). Kurz darauf erkannte man, dass diese Gene eine wichtige Rolle für die Sekretion von Proteinen spielen (Krishnan et al. 1995). Freiberg et al. 1997 beschrieben das erste vollständige Gencluster für ein Typ III-Sekretionssystem in *Sinorhizobium fredii* NGR234 (früher *Rhizobium* sp.). Die Funktion von Typ III-Sekretionssystemen wurden kurz darauf, z.B. in *Sinorhizobium fredii* NGR234 (früher *Rhizobium* sp., Viprey et al. 1998) und *S. fredii* USDA257 (Krishnan et al. 2003) nachgewiesen.

Gencluster für T3SS wurden in einer Vielzahl, jedoch nicht allen, Rhizobienarten identifiziert (Tampakaki 2014). *Sinorhizobium meliloti* 1021 und *Mesorhizobium loti* R7A besitzen kein T3SS. In der symbiontischen Genregion von *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 wurde ein *tts*-Gencluster mit mehr als 20 Genen nachgewiesen (Göttfert et al. 2001). Darunter befinden sich zehn Gene, die hohe Sequenzübereinstimmung mit den konservierten Genen für T3SSe besitzen. Diese Gene werden als *rhc*-Gene (engl. *rhizobium conserved*) bezeichnet (Viprey et al. 1998).

In *B. japonicum* USDA110, *Sinorhizobium fredii* NR234 und *S. fredii* USDA257 werden die Gene des Transportsystems durch pflanzliche Flavonoide induziert (Meinhardt et al. 1993; Krause et al. 2002; Marie et al. 2004). In einem Modell von Krause et al. (2002) wurde die Flavonoid-abhängige Regulation der Gene im *tts*-Gencluster in *Bradyrhizobium japonicum* beschrieben. In Gegenwart von Flavonoiden aktivieren die Regulatoren NodD1 und das Zweikomponenten-Regulatorsystem NodV-NodW die Expression von *nod*-box kontrollierten Genen. Im *tts*-Gencluster befindet sich eine *nod*-Box in der Intergenregion des Operons *ttsI-rhcC2-bll1841*. Dabei codiert das Gen *ttsI* für ein Protein, welches Ähnlichkeit zur Regulatorkomponente von Zwei-Komponenten-Regulationssystemen besitzt. Krause et al. (2002) konnten zeigen, dass die Flavonoid-abhängige Expression der Gene im *tts*-Gencluster auch von TtsI abhängt.

Im Gencluster von *B. japonicum* sind neben den konservierten Genen für den Sekretionsapparat einige Gene vorhanden, die Ähnlichkeit zu Genen anderer Rhizobien besitzen und potentielle Substrate des T3SS darstellen.

Zusammenfassung der Publikationen und eigene Arbeiten

Die Idee und Planung der Experimente stammen von Susanne Zehner (S.Z.) und Michael Göttfert (M.G.). Die Studentin Christin Süß (C.S.) führte die Experimente zur Identifizierung genisteinabhängiger sekretierter Proteine unter Anleitung von Michael Göttfert und Susanne Zehner durch. Jana Hempel untersuchte im Rahmen ihrer Promotion das Sekretom mittels 2 D-Gel-Elektrophorese. Die zugehörigen MS-Analysen wurden von Thomas Patschkowski durchgeführt. Die Proben für die Proteomanalyse mittels ESI-MS und nano-LC-MS/MS wurde von Susanne Zehner präpariert und anschließend die Daten ausgewertet.

Die Arbeit "Identification of genistein-inducible and type III secreted proteins of *Bradyrhizobium japonicum*" beschäftigt sich mit dem Nachweis sekretierter Proteine in Gegenwart des Pflanzensignals Genistein und eines funktionellen Typ III-Sekretionssystems.

Die Proteine der Kulturüberstände von Kulturen von *B. japonicum*, mit und ohne Genistein-Induktion, wurden mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese analysiert.

In ersten Analysen wurden die Flagelline (codiert durch *bll6865* und *bll6866*) als Hauptkomponenten im Überstand von *B. japonicum* identifiziert. In Anwesenheit dieser Proteine war die gelbasierte Analyse weniger abundanter Proteine im Überstand deutlich erschwert. Durch gezielte Mutagenese wurden diese Flagellin-Gene durch ein Resistenzgen im Genom ersetzt. Bei diesem Stamm (*B. japonicum* BJDΔ283) konnten über 100 Proteinspots im konzentrierten Überstand nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Proteine im Überstand induzierter und nicht-induzierter Kulturen konnten deutlich mehr Proteinspots in den induzierten Überständen detektiert werden. Um nachzuweisen, dass diese Proteinspots auf die Aktivität des T3SS zurückzuführen sind, wurden zwei Doppelmutanten verwendet. Diese Doppelmutanten tragen neben der Mutation der Flagellin-Gene eine Deletion in *ttsI*, dem Regulatorgen des *tts*-Genclusters (BJDΔ139-289), bzw. eine Deletion im Operon des *tts* Genclusters *nolB-rhcJ-nolUV-rhcN* (BJDΔ132-289). In diesen Mutanten wird das T3SS nicht exprimiert (BJDΔ139-289) bzw. ist nicht funktionell (BJDΔ132-289), da essentielle Komponenten des Transportsystems nicht gebildet werden. Der Vergleich der Proteine der Überstände von diesen Doppelmutanten mit der Flagellin-Mutante zeigte 22 Proteinspots, die nur in Gegenwart von Genistein, dem Regulatorprotein TtsI und einem funktionellen T3SS sekretiert werden. Davon konnten 8 Proteine eindeutig identifiziert werden. Drei Proteinspots ergaben keine auswertbaren Daten. Bei den identifizierten Proteinen handelt es sich um mehrere hypothetische Proteine (Blr1649, Blr1806, Bll1862/Bll8201), ein Protein (Blr1752) mit Ähnlichkeit zu NopP aus *Sinorhizobium fredii* NGR234, eine Endoglucanase (GunA2) und drei Proteine mit Ähnlichkeit zu Komponenten des Flagellenapparates (Bll6856, Bll6857, Blr6884). Ein Protein (NopF) ist im Genom durch zwei identische Gene (*bll8201* und *bll1862*) codiert. Des Weiteren wurden einige Proteine in mehreren Spots detektiert. Das Protein Blr1649/NopE2 wurde in drei Spots,

Blr1806/NopE1 wurde in acht Proteinspots nachgewiesen. Dabei zeigten die Spots im zweidimensionalen Gel ein deutlich geringeres Molekulargewicht als für diese Proteine erwartet wurde. Im Vergleich der Gelbilder fällt auf, dass die Genistein-induzierbaren Proteine sowohl in den Überständen der Mutante des Regulators TtsI als auch der Mutante des Sekretionsapparates fehlen. Das deutet daraufhin, dass diese Proteine durch TtsI reguliert werden. In früheren Untersuchungen (Kapitel 1) wurde in der Promotorregion von TtsI-regulierten Genen ein konserviertes Motiv, die *tts*-Box, identifiziert. Dieses Motiv wurde in den „upstream“-Regionen von sechs Genen der identifizierten Proteine gefunden. In den „upstream“-Intergenregion der Gene *bll6856*, *bll6857*, *blr6884*, die für Proteine mit Ähnlichkeit zum Flagellenapparat codieren, konnte keine *tts*-Box identifiziert werden. Bei einer Analyse des Genoms auf das konservierte *tts*-Box-Motiv wurden 39 Motive detektiert. Eine große Zahl dieser Sequenzen liegt in der symbiontischen Region oberhalb von annotierten Genen. Diese Gene sind vermutlich Bestandteile des TtsI-Regulons. Es wird vermutet, dass einige dieser Gene für weitere potentielle Typ III-sekretierte Proteine codieren.

In der Arbeit „Analysis of the secretome of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*“ wurde die Gesamtheit der extrazellulären Proteine im Kulturüberstand von *B. japonicum* mittels Gel-basierter Methoden analysiert. Die extrazellulären Proteine wurden aus der Kultur einer Flagellinmutante (BJDΔ283) von *B. japonicum* isoliert und mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese untersucht. Von den über 100 detektierten Proteinspots wurden 68 Proteine mittels MALDI-TOF/MS identifiziert. Mindestens 15 Proteine wurden in mehreren Spots identifiziert, was auf post-translationale Modifikationen oder Proteindegradation hinweist. Die identifizierten Proteine wurden nach ihrer annotierten Funktion in sieben Gruppen geordnet: (a) Transport und Substratbindung (24), (b) Energiemetabolismus und metabolische Enzyme (9), (c) Transkription, Translation und Proteinreifung (6), (d) Mobilität (10), (e) Zellwand (3), (f) unklassifizierte, konservierte und hypothetische Proteine (10), und (g) Typ III-abhängige sekretierte Proteine bzw. *nodulation outer proteins* (6).

Die Proteine des Überstandes von induzierten und nicht-induzierten Kulturen wurden zusätzlich aus dem SDS-Polyacrylamidgel durch nanoLC-MS/MS Analyse untersucht. In diesen Analysen wurden weit mehr Proteine in den Überständen identifiziert (772 hits). Dabei konnten alle in der 2D-PAGE identifizierten Proteine, mit den Ausnahmen Blr3918 und Bll0333, verifiziert werden. Ein große Zahl der im Überstand identifizierten Proteine sollte aufgrund ihrer vermeintlichen Funktion im Inneren der Zelle lokalisiert sein. Der Vergleich der Daten mit Analysen des zellulären Proteoms zeigte, dass viele der identifizierten Proteine auch im Zellinhalt nachweisbar sind (Sarma & Emerich 2006).

In der 2D-PAGE wurden 18 Proteinspots detektiert, die im Überstand der Kulturen nur nach Induktion mit Genistein auftraten. In früheren Analysen konnten bereits 5 Proteine davon identifiziert werden (Süß et al. 2006). Bisher konnten aber nicht alle vorhergesagten potentiell

sekretierten Proteine, z.B. NopL und NopB, detektiert werden. Durch die Analyse mittels LC-MS/MS wurden in der induzierten Probe drei weitere Nops identifiziert, NopB, NopH und NopT1. Diese Proteine wurden nur in der induzierten Probe nachgewiesen. NopB besitzt 57% Ähnlichkeit zu den gleichnamigen sekretierten Proteinen aus *Sinorhizobium fredii* NGR234, USDA257, HH103 und 59% mit NopB aus *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (Lorio et al. 2004; Saad et al. 2005; Rodrigues et al. 2007; Okazaki et al. 2010). NopH wurde bisher nicht in anderen Rhizobien detektiert. NopT1 zeigt die höchste Sequenzübereinstimmung (58%) mit dem sekretierten Protein NopT aus *Sinorhizobium fredii* NGR234 (Dai et al. 2008). Über kürzere Sequenzabschnitte (~170 Aminosäuren) zeigt NopT1 auch Ähnlichkeit zu Effektoren der YopT-Familie (Shao et al. 2002).

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Flavonoiden auf die Expression von Genen des TtsI-Regulons. Zur Analyse der Expression und Sekretion wurde das Gen *gunA2* mit der Sequenz des *myc*-tags fusioniert. Dieses Gen besitzt eine *tts*-Box in seinem upstream Bereich und wurde als Typ III-sekretiertes Protein identifiziert (Kapitel 1, Süß et al. 2006). Damit ist dieses Fusionsprotein ein geeigneter Reporter für die Flavonoid-abhängige Expression und Sekretion. Die Bildung des Fusionsproteins wurde in Zellinhalt und im Überstand nach Zugabe von Genistein, Daidzein oder Coumestrol verfolgt. Die stärkste Expression wurde mit Genistein induziert, während mit Coumestrol keine Proteinproduktion nachweisbar war.

Genomweite Sequenzanalysen auf weitere potentiell sekretierte Proteine in *B. japonicum* 110 (unveröffentlicht)

Im Genom von *Bja110* wurden Gene für Typ I-, Typ II-, Typ III-, Typ IV, Typ V- und Typ VI-Sekretionssysteme identifiziert (Tab. 1).

So verschieden wie die für den Proteintransport verwendeten Sekretionssysteme sind auch die sekretierten Proteine bei Rhizobien. In unseren Analysen wurden über 100 Proteine im Überstand von *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 identifiziert. Eine Vielzahl dieser Proteine besitzen eine Signalsequenz oder wurden durch PsortB und Smart als extrazelluläre Proteine von *Bja110* vorhergesagt (Hempel et al. 2009). Für die Sekretion der Proteine nutzt *Bja110* verschiedene Sekretionssysteme, aber auch passiver Transport ist möglich.

Tabelle 1: Bezeichnung der Gene die potentiell für Sekretionssysteme in *Bja110* codieren.

Sekretionssystem	Gene	Referenz
Typ I (HlyA, HlyB, TolC)	<i>bll3035, blr4473</i> <i>bll6292- bll6293</i>	
Typ II (Gsp)	<i>bll6014-bll6015- bll6016-</i> <i>bll6017- bll6018- bll6019-</i> <i>bll6020- bll6021, blr6022</i> <i>GspS, GspC, GspI, GspO: n.d.</i>	
Typ III (Rhc)	<i>bll1811-bll1842-blr1813-</i> <i>blr1815-blr1816-blr1818-</i> <i>blr1819-bsr1820-blr1821-</i> <i>blr1822-bll1800</i>	Kaneko et al. 2002
Typ IV (VirB)	<i>bsl7141-bll1440-bll1439-</i> <i>bll1437-bll1436-bll1435-</i> <i>bll1434, bsl6587</i>	Kaneko et al. 2002
Typ V (autotransporter, TPT)	<i>blr6013, bll7882, blr5538,</i> <i>blr4129, blr4056, blr3865,</i> <i>blr1361, blr0772, bll7792</i>	Kaneko et al. 2002
Typ VI	<i>bll3587, bll3592, blr3596,</i> <i>blr3600, blr3601</i>	

n.d. anhand von Sequenzanalysen nicht detektiert

Typ I-sekretierte Proteine

In *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 wurden die Komponenten des Typ I-Sekretionssystems durch Sequenzähnlichkeit mit TolC (Protein der äußeren Membran *bll3035* und *blr4473*), HlyD (Membranfusionsprotein, *bll6292*) und HlyB (ABC-Protein *bll6293*) identifiziert (KEGG Datenbank).

Substrate des T1SS besitzen ein C-terminales Sekretionssignal. Dieses Signal besitzt keine konservierte Sequenz, sondern wird eher durch eine bestimmte Struktur bestimmt (Thomas et al. 2014). Viele Substrate von T1SS in anderen Organismen sind RTX-Proteine, die zusätzlich an Sequenzwiederholungen eines Glycin-reichen Motivs erkennbar sind (Linhartova et al. 2010 Thomas et al. 2014 Delepelaire 2004). In früheren Sequenzanalysen wurden im Genom von *Bja110* neun Proteine mit diesen Glycin-reichen Sequenzwiederholungen (GG repeats) identifiziert. Diese Proteine sind potentielle Substrate für das T1SS: *blr0135, bll3109, bll3563, bll3714, bll5471, blr5821, bll6207, bll6035, und bll7792* (Delepelaire 2004). Eigene Analysen mit dem Programm MOTIF search (www.genome.jp) ergaben 52 Kandidaten mit mindestens einmaligem Auftreten des Sequenzmotivs GGxGxDxxx im Proteom von *Bj110* (Tabelle A1, Anhang). In einer anschließenden PSortB 3.0-Analyse kann für 11 dieser Proteine mit GG-repeats eine extrazelluläre Lokalisierung vorhergesagt werden (*blr1364, bll3109^{a)}, bll3563^{a)}, bll3714^{a)}, bll4090, blr4 200, blr5821^{a)}, bll6027^{a)}, bll6035^{a)}, blr6969, bll7673*). Zusammen mit den früheren Analysen sind diese 14 Proteine potentielle Substrate für ein T1SS in *Bj110*. In den Sekretom-Analysen von *Bj110* konnte bisher jedoch keines dieser vorhergesagten Typ I-Substrate detektiert

^{a)} Proteine, die in zwei unabhängigen bioinformatischen Analysen identifiziert wurden (Delepelaire 2014; diese Arbeit).

Typ II-Sekretion

Das Typ II-Sekretionssystem (T2SS) ist ein Proteinkomplex der von Gram-negativen Bakterien zum Transport gefalteter Proteine aus dem Periplasma in den extrazellulären Raum genutzt wird. Die Substrate des T2SS gelangen durch das Sec- bzw. das Tat-System ins Periplasma und besitzen eine N-terminale Signalsequenz. Im Genom von *Bja110* wurde ein trunkiertes Gencluster bestehend aus 9 konservierten Genen für ein Typ II-Sekretionssystem detektiert. Die Gene für die Komponenten *gspS*, *gspC*, *gspL* und *gspO* konnten anhand von Sequenzvergleichen nicht identifiziert werden. Untersuchungen zur Funktion des T2SS in *Bja110* wurden bisher nicht berichtet. Die am häufigsten identifizierten Substrate für T2SS sind extrazelluläre degradierende Enzyme, die am Abbau von Biopolymeren beteiligt sind, wie z.B. Cellulasen und Proteasen (Nivaskumar & Francetic 2014). Im Überstand von *Bja110* wurden nur die Endoglucanasen Pgl und GunA2 identifiziert. Diese Proteine wurden jedoch erst nach Zusatz von Flavonoiden und in Abhängigkeit vom T3SS sekretiert. Hinweise auf die Funktionalität des T2SS in *Bja110* konnten in dieser Arbeit nicht gefunden werden.

Typ IV- und Typ V-Sekretion

Im Genom von *Bja110* wurde nur ein trunkiertes Typ IV-Sekretionssystem identifiziert, welches vermutlich nicht funktionell ist (Kaneko et al. 2002).

In einer Publikation (Schmeisser et al. 2009) wurde über zwei ORFs für potentielle Autotransporter (Typ V) im Genom von *Bja110* berichtet, jedoch wurden keine Namen/locus-tags angegeben. Eine Recherche in der Genomdatenbank ergab die Gene *blr6013*, *bll7882*, *blr5538*, *blr4129*, *blr4056*, *blr3865*, *blr1361*, *blr0772*, *bll7792*, welche Ähnlichkeit zu Typ V-Transportern aufweisen. Diese besitzen typische Motive für Autotransporter bzw. Two-partner-Transportsysteme (smart00869, TIGR02602, pfam13229, pfam03797, pfam12951, cd12820, TIGR04415). Aufgrund der Sequenzlänge können davon sicher einige Kandidaten (z.B. *blr1361*, *blr3865*) ausgeschlossen werden. In den Sekretomdaten von *Bja110* wurde allerdings keines der vorhergesagten Proteine identifiziert.

3. Untersuchung der sekretierten Proteine NopE1 und NopE2

Wenzel, M., Friedrich, L., Göttfert, M., **Zehner, S.** 2010. The type III-secreted protein NopE1 affects symbiosis and exhibits a calcium-dependent autocleavage activity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23, 124-129.

Schirrmeister, J., Friedrich, L., Wenzel, M., Hoppe, M., Wolf, C., Göttfert, M., **Zehner, S.** 2011. Characterization of the self-cleaving effector protein NopE1 of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 193, 3733-3739.

In einer Reihe von Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Funktion des Typ III-Sekretionssystems die Wirtsspezifität und die Interaktion von Rhizobien mit ihren Wirtspflanzen beeinflusst (Viprey et al. 1998 Marie et al. 2003 Okazaki et al. 2013). In den meisten Stämmen wurde durch die Mutation des T3SS die Interaktion mit spezifischen Wirtspflanzen entweder positiv oder negativ beeinflusst (Stahelin & Krishnan 2015). In Anlehnung an die Erkenntnisse von pflanzenpathogenen Bakterien wurde vermutet, dass einzelne sekretierte Proteine für diesen Effekt verantwortlich sind (Deakin & Broughton 2009). Der Einfluss des Typ III-Sekretionssystems auf die Interaktion ist die Summe der Wirkung der einzelnen Nops. Dabei können sich positive und negative Wirkung der Effektoren kompensieren (Deakin & Broughton 2009 Skorpil et al. 2005 Kambara et al. 2009 Sanchez et al. 2012). Die Funktion von Effektoren ist bisher nur in wenigen Fällen untersucht. Dabei wurde die Aktivität der rhizobiellen Effektoren in den meisten Fällen dank ihrer Homologie zu pathogenen Effektoren detektiert.

Zusammenfassung der Publikationen und eigene Arbeiten

Aus vorangegangenen Arbeiten gab es deutliche Hinweise, dass das Protein NopE1 eine Rolle in der Interaktion mit der Wirtspflanze spielt. Das Gen *nopE1* ist innerhalb des Genclusters für essentielle Gene des Typ III-Sekretionssystems codiert. Im „upstream“-Bereich von *nopE1* wurde ein konserviertes Promotorelement, die *tts*-Box, identifiziert. Es wurde gezeigt, dass die Expression des Gens *nopE1* (früher *id205*) vom Pflanzensignal Genistein und den Regulatoren NodD1, NodVW und TtsI abhängig ist (Krause et al. 2002). Weiterhin zeigte eine Reportergenfusion (*nopE1-lacZ*) Aktivität in reifen Knöllchen von *Macrotium atropurpureum* an (Kapitel 1 Zehner et al. 2008). Es wurde postuliert, dass es sich um ein neues rhizobielles Effektorprotein handelt, da das Protein im Überstand Genistein-induzierter Kulturen nachgewiesen wurde. Die Sekretion ist zudem abhängig von einem funktionellen T3SS (Süß et al. 2006 Hempel et al. 2009). Das Protein NopE1 wurde in den Gel-basierten Analysen der Kulturüberstände in mehreren Fragmenten, jedoch nicht mit seinem theoretischen Molekulargewicht von 51 kDa detektiert. Das deutet auf eine Prozessierung des Proteins hin (Süß et al. 2006). *B. japonicum* besitzt ein homologes Protein, NopE2, das ebenfalls in Abhängigkeit von Genistein und dem T3SS in den Überstand sekretiert wird und ebenfalls nie in der erwarteten Größe im Überstand nachgewiesen werden konnte.

In der Arbeit „The type III-secreted protein NopE1 affects symbiosis and exhibits calcium-dependent autocleavage activity“ wurden die sekretierten Proteine NopE1 und NopE2 von *Bradyrhizobium japonicum* näher untersucht.

Die Idee und Planung der Experimente stammen von Susanne Zehner (S.Z.) und Michael Göttfert (M.G.). Die StudentInnen Mandy Wenzel, Liane Flor, Christine Wolf, Lars Friedrich, Markus Hoppe und Jana Schirrmeister arbeiteten unter Anleitung von Susanne Zehner. Eigene experimentelle Arbeiten im Labor von S.Z. waren die Etablierung des Reportersystem für die Translokation in

Bja110, die Herstellung der benötigten Mutanten und Reporterstämme, die Durchführung der Translokationsexperimente und die Pflanzentests mit *Vigna radiata* KPS2. Die Auswertung und Interpretation der Daten, sowie das Schreiben der Veröffentlichungen erfolgte durch S.Z.

Allgemein wird angenommen, dass Effektoren durch das T3SS bis in die eukaryotischen Zellen transportiert werden. Durch die Verwendung eines Reportersystems, basierend auf der Calmodulin-abhängigen Adenylatzyklase *cya* von *Bordetella pertussis*, gelang der Nachweis der Translokation von Effektoren in eukaryotische Zellen in pathogenen Systemen (Subtil et al. 2005). In dieser Arbeit wurde erstmalig dieses Reportersystem auch für rhizobielle Systeme erfolgreich eingesetzt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Proteine NopE1 und NopE2 durch das T3SS von *B. japonicum* in die Pflanzenzelle transportiert werden. Dafür wurden das Reporterogen *cya* an verschiedenen Stellen in die Gensequenzen von NopE1 und NopE2 ins Genom von *B. japonicum* integriert. Die Aktivität des Reporters wurde 14 Tage nach Inokulation in Knöllchen von *M. atropurpureum* gemessen. Weiterhin wurde gezeigt, dass der N-Terminus der Proteine das Signal für die Sekretion über das T3SS enthält.

Der Einfluss der Proteine NopE1 und NopE2 auf die Knöllchenbildung wurde an verschiedenen Wirtspflanzen getestet. Durch die Deletion und Mutation der codierenden Gene wurden verschiedene Stämme erzeugt, in denen nur jeweils ein Gen betroffen ist (BJD718 für $\Delta nopE1$ und BJD215 für $nopE2^-$), sowie Stämme in denen beide Gene (BJD Δ 718-BJD215 und BJD Δ 718- Δ 644) defekt sind. Diese Stämme wurden in Pflanzentests mit Soja (*Glycine max*), Mungbohne (*Vigna radiata*) und *Macroptilium atropurpureum* eingesetzt. Beim Vergleich der Pflanzen, die mit Wildtyp bzw. mit den Einzelmutanten beimpft waren, wurde kein Einfluss auf die Knöllchenentwicklung beobachtet. Eine deutliche Verringerung der Knöllchenzahlen wurde hingegen beobachtet, wenn Soja oder *Macroptilium atropurpureum* mit einer Doppelmutante mit Defekten in beiden Genen (*nopE1*, *nopE2*) inokuliert wurde. Diese Beobachtung deutet auf eine positive Wirkung der Proteine für die Interaktion hin. Die Experimente mit Mungbohne zeigen einen gegenteiligen Effekt. Der Wildtypstamm *B. japonicum* und die Einzelmutanten für *nopE1* bzw. *nopE2* erwiesen sich als schlechte Interaktionspartner für die verwendete Mungbohnenvarietät (*V. radiata* KPS2). Die Doppelmutanten mit Defekten in beiden Genen (BJD Δ 718-BJD215 und BJD Δ 718- Δ 644) besitzen im Gegensatz dazu eine sehr gute Nodulationseffizienz auf der Mungbohnenvarietät KPS2. Sie sind in der Lage an 86-91 % der getesteten Pflanzen Knöllchen zu induzieren. Diese Nodulationseffizienz ist vergleichbar mit der des Bakterienstammes Δ 132 (96 % auf *V. radiata* KPS2), der durch eine Gendeletion nicht in der Lage ist, Proteine über das T3SS zu sekretieren. Die Interaktion von *B. japonicum* mit der Mungbohnenvarietät KPS2 wird demnach stark durch die sekretierten Proteine, im Besonderen von NopE1 und NopE2, beeinflusst. Es zeigt auch, dass die Sekretion der Proteine NopE1 und NopE2 durch das T3SS essentiell für ihre Wirkung als Effektoren ist.

Die Proteine NopE1 und NopE2 wurden in früheren Arbeiten stets in definierten Fragmenten detektiert (Süß et al. 2006). Um diese Fragmentierung genauer zu untersuchen, wurde NopE1 als Fusionsprotein mit Glutathion-S-transferase (GST) heterolog in *E. coli* exprimiert. Das Protein wurde in *E. coli* in seiner vollen Größe produziert. Die Fragmentierung des gereinigten Vollängenproteins kann durch die Zugabe von 25 mM Calciumchlorid induziert werden. Dabei entstehen drei Fragmente mit den Größen 15 kDa, 23 kDa und 13 kDa. In weiteren Versuchen wurde gezeigt, dass die Fragmentierung durch EDTA und EGTA inhibiert werden kann, jedoch nicht durch andere Proteaseinhibitoren. Es war unklar, ob die Fragmentierung ein autoproteolytischer Prozess ist, oder eine bisher unbekannte Protease die Spaltung des Proteins vollzieht. Da das heterolog exprimierte und gereinigte Protein auch die Fragmentierung zeigt, deutet das auf einen autokatalytischen Spaltprozess hin. Die N-Termini der internen Fragmente wurden durch Edman-Abbau bestimmt, und ergaben für beide Fragmente die Sequenz PHVDA. Diese Sequenz befindet sich intern in zwei konservierten Domänen (DUF1521) von NopE1. Eine Protease mit einer Erkennungssequenz GD'PH ist bisher nicht beschrieben (MEROPS peptidase database). Durch spezifische Mutagenese wurden die umliegenden 8 Aminosäurereste (IKGD'PHVD) an der C-terminalen Spaltstelle von NopE1 einzeln gegen Alanin ausgetauscht. Nur der Austausch der unmittelbar zur Spaltstelle benachbarten Aminosäuren Asparaginsäure (D359) und Prolin (P360) führte zur Inhibierung der Spaltung an dieser Position. Der Austausch beider Asparaginsäurereste an den Spaltstellen (D147 und D359) gegen Alanin führte zur Bildung eines nichtspaltbaren Proteins. Ein Stamm der nur diese nichtspaltbare NopE1-Proteinvariante bildet, zeigte in Pflanzentests, dass die Fragmentierung des Effektors NopE1 von großer Bedeutung für seine Funktion in der Symbiose ist.

In der Arbeit „Characterization of the self-cleaving effector protein NopE1 of *Bradyrhizobium japonicum*“ wurde das Protein NopE1 und seine Fragmentierung weiter untersucht. Für NopE1 wurden in der Datenbank zwei konservierte Domänen unbekannter Funktion (DUF1521) zugeordnet. Über diese Domänen ist keine Funktion, Struktur oder Aktivität bekannt. In dieser Arbeit wurde das Protein NopE1 und seine Varianten als GST-Fusionsproteine in *E. coli* produziert. Durch Verkürzung der Domänen vom N- und C-Terminus wurde gezeigt, dass die Fragmentierung von NopE1 sehr wahrscheinlich eine autokatalytische Reaktion ist. Dabei sind die Domänen essentiell für die Selbstspaltungsaktivität des Proteins. Für die effiziente Spaltung sind mindestens 140 Aminosäuren der Domänen notwendig, wobei mindestens 40 Aminosäuren vor, und 100 Aminosäuren nach der Spaltstelle vorhanden sein müssen. Die Spaltaktivität ist dabei lokal auf die jeweilige Domäne begrenzt. Eine intakte Domäne konnte keine Spaltung in einer defekten (verkürzten) Domäne erzeugen, obwohl diese eine vollständige Spaltstelle enthielt. Unter nativen Bedingungen bildet das Protein NopE1 Oligomere. Auch die Fragmente liegen nach der Spaltung assoziiert vor. Die Spaltaktivität von NopE1 ist in einem breiten pH- und Temperaturbereich stabil. Sogar das Erhitzen des Proteins auf 90 °C für 20 min führte nur

kurzzeitig zu einem Aktivitätsverlust. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur konnte erneut Selbstspaltungsaktivität beobachtet werden. Die Aktivität konnte bisher nur durch Calciumionen induziert werden. Weitere zweiwertige Kationen wurden in der Konzentration von 25 mM getestet (CdCl_2 , CoCl_2 , CuCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 , NiCl_2 , ZnSO_4). Dabei wurde keine Spaltaktivität für NopE1 detektiert. Aufgrund der Calciumabhängigkeit der Reaktion kann die Spaltung von NopE1 durch die Chelatoren EDTA und EGTA inhibiert werden. Andere Proteaseinhibitoren (Aprotinin, Leupeptin, AEBSF, Pepstatin A, 1,10-Phenanthrolin) und auch ein kommerzieller Proteaseinhibitor-Mix haben keinen Einfluss auf die Spaltaktivität von NopE1.

Eine autoproteolytische Spaltung an den Aminosäuren Aspartat und Prolin könnte über ein zyklisches Zwischenprodukt, z.B. Succinat, erfolgen. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde die Aminosäure Aspartat (D147) an der Spaltstelle gegen Glutaminsäure und Asparagin ausgetauscht. Interessanterweise ist das Protein mit dem Austausch unter Erhalt der Säurefunktion (D147E) weiterhin spaltbar, während der Austausch gegen Asparagin zu Inhibierung der Spaltaktivität führt. Das ist in Hinblick auf die Rolle von Calcium an der Spaltung interessant. Das Kation könnte über die Säurefunktion an der Spaltstelle koordinieren, während die Koordination an der Seitenkette mit Säureamid-Funktion (Asparagin) diese Koordination nicht stattfinden kann. In der Primärsequenz von NopE1 wurde weiterhin ein Calcium-Bindemotiv ähnlich dem einer EF-hand direkt benachbart zur Spaltstelle postuliert. Um zu untersuchen, ob dieses Motiv für die Spaltung essentiell ist, wurden ebenfalls gezielte Aminosäureaustausche an den konservierten Positionen eingeführt. Nur eine der vier postulierten Koordinationsstellen für Calcium wurde als essentiell für die Spaltung identifiziert. Damit konnte das postulierte Calcium-Bindemotiv nicht bestätigt werden. Weiterhin muss geklärt werden, durch welche Aminosäuren Calcium an das Protein gebunden wird und in die Selbstspaltung eingreift.

In den öffentlichen Sequenzdatenbanken konnten einige wenige Proteinsequenzen identifiziert werden, die Ähnlichkeit zu den beschriebenen Proteinen NopE1 und NopE2 aufweisen. Dabei ist die signifikante Übereinstimmung auf die konservierte DUF1521 Domäne beschränkt. Die identifizierten Proteine stammen aus Proteobakterien verschiedener Klassen. Sie besitzen nur eine DUF1521 Domäne. Die Länge der Domäne und die Sequenz der putativen Spaltstelle (GDPH) sind in allen Proteinen konserviert. Experimentelle Daten sind für diese Proteine zum Zeitpunkt der Veröffentlichung nicht verfügbar. In zwei Bakterienstämmen, *Burkholderia phytofirmans* PsJN und *Vibrio coralliilyticus* ATCC-BAA450 sind die Proteine innerhalb des Genclusters für Komponenten des Typ III-Sekretionssystems codiert. Beide Bakterien sind bekannt für ihre Interaktion mit Eukaryoten. *B. phytofirmans* ist ein Betaproteobakterium, welches als Epiphyt und Endophyt mit verschiedenen Pflanzen interagiert (Compant et al. 2008). *V. coralliilyticus* ist ein pathogenes Gammaproteobakterium, welches als der Verursacher der Korallenbleiche identifiziert wurde (Ben-Haim et al. 2003). Die DUF1521-Domänen sind möglicherweise typisch

für Effektorproteine. Im Genus *Bradyrhizobium* sind eine Reihe von sehr ähnlichen Proteinen detektiert worden (Tsukui et al. 2013; Duran et al. 2018).

4. Untersuchung von konservierten MIIA-Domänen

Schirrmeister, J., Zocher, S., Flor, L., Göttfert, M., **Zehner, S.** (2013) The domain of unknown function DUF1521 exhibits metal ion-inducible autocleavage activity – a novel example from a putative effector protein of *Vibrio coralliilyticus* ATCC BAA-450. FEMS Microbiol. Lett. 343, 177-182.

Zwei sekretierte Proteinen, NopE1 und NopE2, von *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 tragen jeweils zwei Domänen unbekannter Funktion (DUF1521). Diese Domänen wurden auch in Proteinen anderer Mikroorganismen identifiziert (Wenzel et al. 2010 Schirrmeister et al. 2011). Untersuchungen zur Funktion dieser Domänen führten zu ersten Erkenntnissen über einen ungewöhnlichen Spaltmechanismus (Kapitel 3). In *Vibrio coralliilyticus* ATCC-BAA450 (*Vc450*) wurde das Protein VIC_001052 identifiziert, welches eine DUF1521 Domäne enthält. Dieses Protein ist in unmittelbarer Nachbarschaft zu Genen für ein potentielles Typ III-Sekretionssystem auf einem Megaplasmid von *Vc450* codiert. Das Bakterium *Vc450* wurde als Verursacher der Korallenbleiche von *Pocilla damicornis* identifiziert (Ben-Haim et al. 2003). Diese Krankheit wird durch den Abbau und den Verlust der endosymbiontischen Mikroalgen verursacht (Hayes & Bush 1990 Rosenberg et al. 2009 Vidal-Dupiol et al. 2011). Im Extremfall führt der Verlust der photosynthetisch aktiven Endosymbionten zum Absterben der Koralle. In Laboruntersuchungen wurde gezeigt, dass die Infektion der Koralle mit *Vc450* nur bei erhöhter Temperatur zur Ausbildung von Krankheitssymptomen führt (Ben-Haim et al. 2003; Vidal-Dupiol et al. 2011). Das wurde mit der Beeinträchtigung der natürlichen Immunabwehr der Koralle bei erhöhter Umgebungstemperatur und damit verstärkter Anfälligkeit für die Infektion mit *Vibrio* begründet (Vidal-Dupiol et al. 2011; Vidal-Dupiol et al. 2014). In einer Proteomstudie an *Vc450* wurde eine Reihe von Proteinen identifiziert, die bei erhöhter Temperatur vermehrt gebildet werden (Kimes et al. 2012). Die Rolle der einzelnen identifizierten Virulenzfaktoren wird noch untersucht. Die Proteine des Typ III- Sekretionssystems wurden in dieser Studie allerdings nicht durch die Veränderung der Umgebungstemperatur beeinflusst.

In der Arbeit „The domain of unknown function DUF1521 exhibits metal ion-inducible autocleavage activity – a novel example from a putative effector protein of *Vibrio coralliilyticus* ATCC-BAA 450“ wurde die konservierte Domäne DUF1521 des Proteins VIC_001052 auf ihre potentielle Selbstspaltungsaktivität untersucht.

Die Idee und Planung der Experimente stammen von Susanne Zehner (S.Z.) und Michael Göttfert. Die StudentInnen Jana Schirrmeister, Sara Zocher und Liane Flor arbeiteten unter Anleitung von Susanne Zehner. Die Auswertung und Interpretation der Daten, sowie das Schreiben der Veröffentlichung erfolgte durch Susanne Zehner.

Das hypothetische Protein VIC_001052 besitzt eine DUF1521-Domäne, die mittig im Protein liegt. Es zeigt das konservierte Spaltmotiv GD'PH an Position 115-118. In der Sequenzanalyse wurden zwei unterschiedliche Programme für die Vorhersage der Ausdehnung der Domäne verwendet. RPS-Blast definiert eine partielle Domäne mit einer Länge von 120 Aminosäuren (73-192 aa). MotifScan schlägt eine Ausdehnung der Domäne von Aminosäure 73 bis 246 vor. Beide Varianten wurden in *E. coli* als MalE-Fusionsproteine erzeugt. Die gereinigten Fusionsproteine wurden mit Calciumionen (25 mM) inkubiert und auf ihre Spaltaktivität untersucht. Das Fusionsprotein mit der partiellen Domäne (MVic73-192) zeigt keine Fragmentierung bei Inkubation mit

Calciumionen. Das Fusionsprotein mit dem längeren Sequenzabschnitt (MVic73-246) aus VIC_001052 zeigt nach Inkubation mit Calciumionen zwei Fragmente. Im SDS-Gel konnte für beide Fusionsproteine als auch für das vermutliche C-terminale Fragment ein verzögertes Laufverhalten beobachtet werden. Die apparente Molekülgröße für die Fusionsproteine (60 kDa und 71 kDa) weicht deutlich von der berechneten Molekülgröße für die Fusionsproteine (48 kDa und 62 kDa) ab. Für die Spaltung des Fusionsproteins am potentiellen Spaltmotiv GD'PH werden Fragmente mit einem Molekulargewicht von 48 kDa für das N-terminale Fragment und 14 kDa für das C-terminale Fragment erwartet. Das potentielle C-terminale Fragment wurde bei einer Molekülgröße von ca. 22 kDa beobachtet. Daraufhin wurde dieses Fragment durch Edman Sequenzierung analysiert. Die N-terminalen Aminosäuren wurden mit PxFD bestimmt. Diese Sequenz tritt im Fusionsprotein nur einmal am postulierten Spaltmotiv GD'PHFD auf. Durch einen gezielten Aminosäureaustausch (D116A) konnte die Spaltstelle bestätigt werden. Diese Proteinvariante wird in Gegenwart von Calciumionen nicht mehr fragmentiert. Damit konnte bestätigt werden, dass diese Aminosäureposition essentiell für die Spaltaktivität ist.

In weiteren Untersuchungen wurde getestet, welchen Einfluss die Temperatur und unterschiedliche Metallionen auf die Spaltaktivität der DUF1521 Domäne besitzen. Das spaltbare Fusionsprotein MVic73-246 wurde bei 0 bis 30 °C mit und ohne Calciumlösung inkubiert. Bei allen getesteten Temperaturen konnte Spaltaktivität in den Proben, die mit Calciumlösung versetzt waren, beobachtet werden. Die Spaltung des Fusionsproteins war bei allen getesteten Temperaturen nahezu vollständig. Demnach konnte kein Einfluss der Temperatur auf die Spaltaktivität beobachtet werden. Die Spaltung des Fusionsproteins wurde bisher nur in Gegenwart von Calciumionen untersucht. Verschiedene zweiwertige Metallionen (Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) wurden getestet, ob diese die Spaltung des Fusionsproteins induzieren können. Die Untersuchungen in MOPS-Puffer zeigten nahezu vollständige Spaltung des Fusionsproteins nach der Inkubation mit Mn^{2+} . Mit Cd^{2+} und Co^{2+} konnte ebenfalls eine Spaltung beobachtet werden, die jedoch unvollständig ist. Eine teilweise Spaltung wurde auch durch Ni^{2+} induziert. Mit den Ionen Mg^{2+} , Zn^{2+} und Cu^{2+} wurden sehr schwache Banden für das N-terminale Spaltprodukt detektiert, die allerdings auch bei der Proteinprobe ohne Metallionenzusatz auftreten. Diese Banden könnten auf eine beginnende Fragmentierung des Fusionsproteins während der Aufreinigung zurückzuführen sein. Deshalb wird vermutet, dass die Ionen Mg^{2+} , Zn^{2+} und Cu^{2+} keine Spaltung in der DUF1521 Domäne induzieren können. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die DUF1521 Domäne aus *V. coralliilyticus* eine Metallionen-abhängige Spaltaktivität besitzt.

Diskussion

Sekretionssysteme und ihre Funktion in Symbiose

Rhizobielle extrazelluläre Proteine sind zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt. Seit der Entdeckung von NodO (de Maagd et al. 1989) vermehrten sich die Hinweise auf die Bedeutung der sekretierten Proteine in der Rhizobien-Leguminosen-Interaktion. Am Beispiel von NodO wurde gezeigt, dass *Rhizobium leguminosarum* bei Abwesenheit von NodO eine verringerte Infektionsrate auf spezifischen Wirtspflanzen besitzt. Eine Vielzahl weiterer Proteine wurde identifiziert und ihre Funktion in der Symbiose gezeigt. Rhizobien verwenden verschiedene Sekretionssysteme, um Proteine in den extrazellulären Raum bzw. in die Wirtszellen zu transportieren. Proteinsekretionssysteme von Typ I bis Typ VI sind in den verschiedenen Rhizobien nachgewiesen worden, wobei nicht jede Spezies das komplette Spektrum an Sekretionssystemen besitzt (Fauvart & Michiels 2008; Krehenbrink & Downie 2008; Downie 2010). Die Sekretion von Proteinen über das T3SS ist in Rhizobien weit verbreitet. Die Rolle des T3SS in der Symbiose wird vor allem in der Kompatibilität von Wirt und Rhizobium gesehen (Deakin & Broughton 2009). Es wurde an vielen Beispielen gezeigt, dass die Funktion des Typ III-Sekretionssystems den Wirtsbereich deutlich beeinflusst (Viprey et al. 1998; Marie et al. 2003 Krishnan 2002; Lopez-Baena et al. 2008; Xin et al. 2012; Sanchez et al. 2012; Okazaki et al. 2010; Okazaki et al. 2013; Nguyen et al. 2017; Faruque et al. 2015).

In unseren Arbeiten konnte der deutliche Einfluss der Effektoren NopE1/NopE2 auf die Interaktion von *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 mit *Vigna radiata* KPS2 beobachtet werden. In Anwesenheit beider Effektoren kann *Bj110* mit *Vigna radiata* KPS2 eine funktionelle Symbiose eingehen, während bei Anwesenheit nur eines der beiden oder beider Proteine die Knöllchenbildung signifikant gestört ist. Somit haben diese Effektoren einen negativen Einfluss auf die Interaktion mit dieser Wirtspflanze. In *Sinorhizobium fredii* NGR234 können Defekte in einzelnen Effektoren, z.B. NopL, NopM oder NopT, die Interaktion mit bestimmten Wirtspflanzen sowohl positiv als auch negativ beeinflussen (Marie et al. 2003 Zhang et al. 2011 Kambara et al. 2009 Dai et al. 2008 Xin et al. 2012). Andere Effektoren zeigen synergistische Effekte, z.B. NopP und NopL (Skorpil et al. 2005 Sanchez et al. 2012 Kambara et al. 2009; Jimenez-Guerrero et al. 2017). In *Mesorhizobium loti* MAFF303099 wurde Mlr6361 als ein starker negativer Effektor für die Interaktion mit *Lotus halophilus* identifiziert (Okazaki et al. 2010). In der Arbeit von Okazaki et al. 2013 wurde eine weitere Funktion des T3SS eindrücklich gezeigt. *Bradyrhizobium elkanii* konnte mit Hilfe der sekretierten Effektoren den Signalweg für die Knöllchenbildung in Wirtspflanzen aktivieren. Dafür waren weder Nod-Faktoren noch Nod-Faktorrezeptoren notwendig. Die Infektion des Pflanzengewebes durch Rhizobien muss für die Ausbildung von Knöllchen jedoch über den wenig effizienten Weg des „crack-entry“ an Seitenwurzelansätzen

erfolgen, da der Prozess der Wurzelhaarinfektion Nod-Faktor-abhängig ist (Okazaki et al. 2013; Okazaki et al. 2016).

Regulation der Typ III-Sekretionssysteme in Rhizobien

Die Gene der T3SS in Rhizobien sind konserviert und besitzen hohe Ähnlichkeit zu den Komponenten der pathogenen Systeme (Marie et al. 2001). Die Regulation der Gene des T3SS Genclusters in *B. japonicum* USDA110 wurde von Krause et al. 2002 beschrieben. TtsI ist der Regulator der Gene des *tts*-Genclusters. Er besitzt Homologie zu Regulatorproteinen der Zwei-Komponenten-Regulationssysteme. Das *ttsI*-Gen ist im *tts*-Gencluster lokalisiert und besitzt eine *nod*-Box im Promotorbereich. Dadurch ist die Expression des Regulators TtsI durch die Regulatoren NodD1 und NodV/NodW in Anwesenheit der pflanzlichen Flavonoide induziert (Krause et al. 2002). Das Protein besitzt eine N-terminalen Empfängerdomäne und eine C-terminalen DNA-Bindedomäne. In der Regulationskaskade wird angenommen, dass durch die Aktivierung der *nod*-Box vor *ttsI* der Regulator produziert wird (Krause et al. 2002 Marie et al. 2004). Der Regulator soll dann an die *tts*-Boxen binden und diese aktivieren (Marie et al. 2004 Wassem et al. 2008). Bei Zwei-Komponenten-Regulationssystemen wird der Regulator durch eine Sensor kinase an einem konservierten Aspartatrest phosphoryliert, woraufhin eine Konformationsänderung, Dimerisierung und DNA-Bindung des Regulators induziert wird (Yamamoto et al. 2005 Okamura et al. 2000 Gao & Stock 2010 Hong et al. 2007). Eine mögliche Sensor kinase, die mit TtsI interagieren könnte, wurde bisher nicht beschrieben. Weiterhin besitzt TtsI aus *Bja110* und weiteren Rhizobien an der vermeintlichen Phosphorylierungsstelle ein Glutamat. In älteren Arbeiten wurde gezeigt, dass Regulatorproteine, z.B. in NtrC aus *Salmonella typhimurium*, bei einem Austausch des Aspartats gegen Glutamat konstitutiv aktiv sind (Klose et al. 1993). Inzwischen ist eine Vielzahl sogenannter „pseudo-receiver domains“ oder „aspartate less receiver domains“ bekannt. Diese besitzen Sequenzmodifikationen in den konservierten Phosphorylierungs- und Interaktionsstellen typischer Empfängerdomänen. Sie adaptieren Phosphorylierungs-unabhängige Mechanismen zur Aktivierung, die bisher aber noch wenig verstanden sind (Bourret 2010; Maule et al. 2015). Ein Beispiel ist FrzS aus *Myxococcus xanthus*, welches in der Empfängerdomäne keinen Aspartatrest an der konservierten Phosphorylierungsstelle besitzt, aber voll funktionsfähig ist (Fraser et al. 2007). In Untersuchungen zur Proteinstruktur des OmpR/PhoB-homologen Proteins *hp1043* (HD-RR) aus *Helicobacter pylori* wurde gezeigt, dass die Struktur des unphosphorylierten Regulators HD-RR große Ähnlichkeit mit der Struktur des aktiven, phosphorylierten PhoB besitzt (Hong et al. 2007). Interessanterweise konnten Wassem et al. 2008 die Bindung von heterolog exprimiertem TtsI an die Promotorregion von *nopB* von *S. fredii* NGR234 zeigen. Im Gegensatz dazu ist es bisher nicht gelungen, durch Überexpression von TtsI in Rhizobien eine konstitutive Aktivierung des T3SS zu erzielen (unveröffentlichte Arbeiten). Die Induktion der *tts*-Gene kann somit nicht allein auf

Expression des Regulatorgens *ttsI* zurückgeführt werden. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass auch die Umgebungstemperatur einen Einfluss auf die Wirtssignal-abhängige Induktion der Gene des T3SS in *Bradyrhizobium japonicum* hat (Wei et al. 2008; Wei et al. 2010; Shiro et al. 2016).

In pflanzenpathogenen Bakterien sind die Gene des T3SS streng reguliert. Die Expression konnte nur in bestimmten Minimalmedien bzw. im Wirtsorganismus beobachtet werden (Tang et al. 2006; Mole et al. 2007). In *Xanthomonas* sp. ist ein AraC-Typ Regulator (HrpX) für die Expression der *hrc/hrp*-Gene verantwortlich (Alfano & Collmer 1996; Li et al. 2014). Ein Zwei-Komponenten-Regulationssystem ist dem übergeordnet. Der OmpR-Typ Antwortregulator HrpG ist für die Induktion von HrpX verantwortlich und damit für die Expression der *hrc/hrp* Gene (Wengelnik et al. 1996). Im Genlocus für den Antwortregulator HrpG in *Xanthomonas campestris* ist keine funktionell gekoppelte Sensorkinase vorhanden. Sensorkinasen aus anderen Zwei-Komponenten-Regulationssystemen, z.B. HpaS / HpaR2 könnten den Antwortregulator HrpG aktivieren (Li et al. 2014). Über Cross-talk mit unterschiedlichen Sensorkinasen könnten mehrere Signale auf die Regulation der *hrc/hrp*-Gene wirken. Des Weiteren wurde kürzlich nachgewiesen, dass die Lon-Protease in *Xanthomonas citri* die Expression der *hrc/hrp*-Gene reguliert, indem sie in Abwesenheit eines Wirtssignals den Regulator HrpG abbaut. Im Wirtsorganismus wird die Protease phosphoryliert und stabilisiert den Regulator (Zhou et al. 2018). Eine Reihe weiterer Mechanismen wurde in pflanzenpathogenen Mikroorganismen untersucht, z.B. quorum sensing, Proteindegradation und post-transkriptionelle Regulation, die neben dem Wirtssignal an der Regulation der *hrc/hrp*-Gene beteiligt sind (Andrade et al. 2014; Schulmeyer & Yahr 2017; Zhou et al. 2018; Ancona et al. 2015).

Die Bedeutung der *tts*-Box in der Promotorregion wurde durch gezielte Analysen gezeigt. In unseren Arbeiten wurden in *Bja110* die Transkriptionsstarts 12 bp (*nopB*), 11 bp (*nopL*) und 10 bp (*gunA2*) downstream der *tts*-Box-Sequenzen bestimmt. Damit ist die *tts*-Box in der Region für die transkriptionelle Kontrolle dieser Gene lokalisiert. Der Transkriptionsstart der Gene *nopX* und *nopB* (früher *nolX* und *nolB*) in *S. fredii* USDA257 liegt 11 bp bzw. 10 bp downstream der heute bekannten *tts*-Boxen (Kovacs et al. 1995). Eine Deletion im Promotorbereich, die in die *tts*-Box von *nopB* reicht, führt zum Verlust der Promotoraktivität (Gu et al. 1997). Durch gezielte Sequenzmodifikationen in der *tts*-Box-Sequenz vor *nopB-lacZ* wurde das Promotorelement in *Bja110* genauer charakterisiert (Zehner et al. 2008). Die *tts*-Box besitzt eine dreiteilige Struktur und könnte einen neuartigen Promortyp darstellen. Sie zeigt keine Ähnlichkeit mit bekannten Promotormotiven, weder mit dem -35/-10-Promotormotiv aus *Bja110*, noch mit dem RpoN-abhängigen -24/-12-Promotormotiv (Fischer 1994; Beck et al. 1997). Die *tts*-Box konnte nicht in der genomweiten Promotorkartierung für RpoD- und RpoN-abhängige Promotoren in *Bja110* identifiziert werden (Cuklina et al. 2016). Die Deletion des *tts*-Box-Motivs führte zum

vollständigen Verlust der Reporteraktivität, die Modifikation von zwei bis drei Nukleotiden in den konservierten Regionen der *tts*-Box reduzierte die Reporteraktivität deutlich. In *S. fredii* NGR234 wurde durch den Austausch von 3 Nukleotiden in Region 1 der *tts*-Box ein vollständiger Funktionsverlust des Promotors beobachtet (Wassem et al. 2008).

Ein konserviertes Promotormotiv speziell für die Regulation *hrc/hrp*-Gene kann man auch in pflanzenpathogenen Mikroorganismen finden. Das konservierte Sequenzmotiv (TTTCGC-N₁₅-TTTCGC) wurde in den Promotorregionen für Gene des HrpX-Regulons in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* identifiziert und wurde „*plant-inducible promoter box*“- kurz PIP Box genannt (Noel et al. 2001; Noel et al. 2002; Noel et al. 2003). In DNA-Bindungsstudien konnte auch die spezifische Bindung von HrpX an die PIP-Box gezeigt werden (Koebnik et al. 2006). Dieses Promotormotiv ist auch in anderen verwandten Pflanzenpathogenen, wie z.B. *Burkholderia* und *Ralstonia solanacearum* konserviert (Cunnac et al. 2004; Koebnik et al. 2006). Durch den direkten Zusammenhang dieses Promotormotivs mit dem T3SS wurde es u.a. in *Ralstonia solanacearum* erfolgreich zur genetischen Identifizierung neuer potentieller Effektoren verwendet (Cunnac et al. 2004; Jiang et al. 2009). Dieser Zusammenhang zwischen Promotor und Effektorgenen besteht auch in Rhizobien.

In Sequenzanalysen mit *S. fredii* NGR234, USDA257 und HH103 wurden insgesamt 13, 24 und 18 *tts*-Boxen identifiziert (Marie et al. 2004; Kimbrel et al. 2013; Vinardell et al. 2015). Im Genom von *Mesorhizobium loti* MAFF303099 wurden 27 *tts*-Boxen detektiert, davon sind 7 *tts*-Boxen in der 25 kb Region des *tts*-Genclusters lokalisiert (Sanchez et al. 2009; Okazaki et al. 2010). In *B. elkanii* USDA61 wurden 9 *tts*-Box-Sequenzen in der 47 kb-Region, die ein *tts*-Gencluster enthält, identifiziert (Okazaki et al. 2009). In unseren Arbeiten wurden im Genom von *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 durch eine Sequenzmotiv-Suche eine deutlich größere Zahl an *tts*-Boxen (39) detektiert (Zehner et al. 2008). In nachfolgenden Arbeiten führte die Verwendung eines trainierten Hidden-Markov-Algorithmus zur Identifizierung von 52 *tts*-Box-Sequenzen im Genom von *Bj110* (Kimbrel et al. 2013). Viele der „downstream“ angeordneten Gene codieren entweder für Bestandteile des T3SS oder für potentielle Effektoren. Einige dieser Kandidaten wurden durch das Reportersystem AvrRpt2 als Effektorgene identifiziert (Kimbrel et al. 2013).

Als Ausnahme ist zu erwähnen, dass in *S. fredii* NGR234 einige *tts*-Box-Sequenzen nicht in direktem Zusammenhang mit dem T3SS stehen. Sie befinden sich in einem Gencluster für die Biosynthese eines Rhamnose-reichen Lipopolysaccharids (Marie et al. 2004).

Expression des T3SS in frühen und reifen Symbiosestadien

In Flüssigkulturen konnte mittels Reporterfusionen die Induktion von vier Genen aus dem *tts*-Gencluster (*rhcV*, *nollu*, *nopE*, *nopL*) durch Genistein nachgewiesen werden (Krause et al. 2002). Diese Gene besitzen alle eine *tts*-Box im Promotorbereich. In Transkriptomanalysen mittels Microarray wurde nur für 6 Gene downstream einer *tts*-Box eine schwache Induktion durch

Genistein detektiert (*gunA2*, *blr1676/nopM*, *bsl1808/nopC*, *nopB*, *pgl*, *blr2140/nopT1*; Lang et al. 2008). In unseren Arbeiten wurde 8 h nach Genistein-Induktion die transkriptionelle Aktivität von 34 der 39 *tts*-Boxen durch semi-quantitative RT-PCR nachgewiesen (Zehner et al. 2008). Auch in anderen Rhizobien wurde die Flavonoid-abhängige Expression von Genen, die eine *tts*-Box im Promotorbereich besitzen, beobachtet. In *S. fredii* NGR234 wurde in Flüssigkultur nach Daidzein-Induktion die Aktivität der Gene des *tts*-Genclusters detektiert (Perret et al. 1999). Detaillierte Analysen zeigten, dass 10 *tts*-Boxen von 11 getesteten Promotorregionen in Abhängigkeit von Flavonoiden und TtsI in *S. fredii* NGR234 aktiviert werden (Wassem et al. 2008). In *S. fredii* HH103 wurde exemplarisch für die Gene des *tts*-Genclusters die Expression der Gene *nopX*, *rhcJ*, *rhcQ* und *nopA* in Abhängigkeit von Flavonoiden, NodD1 und TtsI gezeigt (Lopez-Baena et al. 2008). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass in rhizobiellen T3SS die Regulationskaskade aus Flavonoiden, NodD, TtsI und *tts*-Box konserviert ist.

In *B. elkanii* SEMIA wurde ebenfalls die Expression der Gene in Abhängigkeit von TtsI, der *tts*-Box und von Flavonoiden gezeigt (de Campos et al. 2011). Als Sonderfall sollte das T3SS von *B. elkanii* USDA61 aufgeführt werden. Es besitzt neun *tts*-Boxen in der Promotorregion essentieller Gene sowie das Gen des Regulators TtsI. Interessanterweise scheint die Sekretion der Proteine in *B. elkanii* USDA61 allerdings unabhängig von der Gegenwart von Flavonoiden zu sein. Typ III-sekretierte Proteine wurden im Überstand der Kulturen auch ohne Zusatz von Genistein nachgewiesen (Okazaki et al. 2009). Für *M. loti* MAFF303099 ist der Induktor/Flavonoid für NodD noch nicht identifiziert. Im Wildtyp konnte deshalb noch keine Sekretion der Typ III-abhängigen Proteine beobachtet werden. Die Expression des heterologen NodD1 aus *R. leguminosarum* in *M. loti* ermöglichte aber die Flavonoid-induzierte, TtsI- und *tts*-box abhängige Expression von Genen des *tts*-Genclusters (Sanchez et al. 2009; Okazaki et al. 2010).

Die Aktivität des Typ III-Sekretionssystems in verschiedenen Symbiosestadien wurde in dieser Arbeit gezeigt. Mittels Reportergenfusionen wurde die Aktivität von *nopB* aus *Bj110* in frühen Stadien der Interaktion, d.h. in Wurzelhaaren von *Macroptilium atropurpureum*, nachgewiesen (Zehner et al. 2008). Das Typ III-sekretierte Protein NopX (früher NolX) aus *S. fredii* USDA257 wurde zuvor durch Immunohistologie in Infektionsschläuchen von Soja und *Vigna unguiculata* nachgewiesen (Krishnan 2002). Mehrere Gene von *Bja110*, die eine *tts*-Box in ihrem Promotorbereich besitzen (*gunA2*, *nopB*, *rhcV*, *nopL*, *nopE1* (früher *blr1806*), werden auch in reifen Knöllchen von *Macroptilium atropurpureum* translatiert. Die Aktivierung der *tts*-Box-Reportergenfusionen ist auch in Knöllchen von TtsI abhängig (Zehner et al. 2008). In Proteom-Studien mit 4 Wochen alten Knöllchen von *Glycine max* konnten im Gegensatz dazu keine Hinweise auf Typ III-sekretierte Proteine von *Bja110* gefunden werden (Sarma & Emerich 2006). Die Symbiose von *Bradyrhizobium japonicum* mit Soja und *Macroptilium atropurpureum* wird scheinbar durch das T3SS in unterschiedlichem Maße beeinflusst. Während im Pflanzentest mit

Soja die Wirkung des T3SS nur in den initialen Stadien der Symbiose nachweisbar ist, scheint das T3SS in *Macropodium atropurpureum* auch in reifen Knöllchen von Bedeutung für die Interaktion zu sein (Krause et al. 2002; Zehner et al. 2008). Transkriptomanalysen von *B. japonicum* in Symbiose mit Soja bestätigen diese Beobachtungen (Chang et al. 2007; Pessi et al. 2007). Im Vergleich mit freilebenden Rhizobien ist die Expression der *tts*-Gene in Bacteroiden 4 Wochen nach der Inokulation von Soja bis zu 10-fach reduziert (Chang et al. 2007). In detaillierten Analysen konnte ein Anstieg der Expression der *tts*-Gene in Sojawurzeln mit einem Maximum bei 13 dpi beobachtet werden. Anschließend sinkt die Expression der *tts*-Gene deutlich ab (Pessi et al. 2007 GEO accession GSE8478). In Transkriptionsanalysen für Gene des T3SS von *S. fredii* NGR234 wurde erhöhte Aktivität in frühen und reifen Knöllchen von *Cajanus cajan*, *Leucaena leucocephala* und *Vigna unguiculata* gegenüber den frei-lebenden Bakterien beobachtet (Perret et al. 1999, Li et al. 2013). Die Genregion des T3SS in *Mesorhizobium loti* MAFF303099 ist in Symbiose mit *Lotus japonicus* deutlich niedriger exprimiert als in Flüssigkulturen (Uchiumi et al. 2004). In den verschiedenen Rhizobien ist die Aktivität der Gene des T3SS in Symbiose offensichtlich auch von den Wirtspflanzen abhängig. Die Wirtsfaktoren, die hierauf Einfluss nehmen, sind allerdings noch unbekannt.

Sekretomanalyse und Typ III-sekretierte Proteine

Funktionelle Typ III-Sekretionssysteme und die Sekretion von Effektoren wurde bei Rhizobien vor allem in den Genera *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Mesorhizobium* und *Bradyrhizobium* nachgewiesen (Deakin & Broughton 2009; Staehelin & Krishnan 2015). Dafür wurden verschiedene Methoden eingesetzt: der immunologische Nachweis, die Charakterisierung des extrazellulären Proteoms mittels Massenspektrometrie, die Verwendung eines Adenylatzyklase-Reporters und eines heterologen AvrRpt2-Reportersystems, Mikrosequenzierung, Radioaktivmarkierung und die „*phage-display*“-Analyse (Staehelin & Krishnan 2015).

In unserer Analyse des extrazellulären Proteoms wurde neben den sekretierten Proteinen auch eine Reihe von Proteinen detektiert, deren Lokalisierung im Cytosol, im Periplasma oder der Membran erwartet wird. Dazu gehören unter anderem Proteine aus den Cluster orthologer Gruppen (COGs) von „Transport und Substratbindepoteinen“, „Energiemetabolismus“, „Transkription, Translation und Proteinfaltung“ und „Motilität“. In Sekretomanalysen von Mikroorganismen, z.B. *Erwinia chrysanthemum*, *R. leguminosarum* 3841, *Rhizobium etli* CE3, *Helicobacter pylori* und *Xanthomonas campestris* pv *campestris* wurden ebenfalls Proteine, aus diesen COGs in den Kulturüberständen detektiert (Bumann et al. 2002; Kazemi-Pour et al. 2004; Watt et al. 2005; Krehenbrink & Downie 2008; Meneses et al. 2010). Einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass spontane Zellyse nicht die alleinige Erklärung für die Detektion dieser Proteine im Überstand ist (Watt et al. 2005; Krehenbrink & Downie 2008; Meneses et al. 2010). Es wird vermutet, dass durch die Ausbildung von Membranvesikeln Proteine gezielt in den

Überstand sekretiert werden (McBroom & Kuehn 2007; Hempel et al. 2009; Kharade & McBride 2015; Kim et al. 2015).

Proteine von *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, die nur in Gegenwart eines funktionellen T3SS in den Überstand sekretiert werden, konnten durch direkten Nachweis und in Sekretomanalysen identifiziert werden. Es wurden 12 Proteine (NopA, NopB, NopE1, NopE2, NopF, NopH, NopM, NopP, NopT1, NopT2, GunA2, Pgl) nachgewiesen, (Krause et al. 2002; Süß et al. 2006; Zehner et al. 2008; Hempel et al. 2009). Durch ein $\Delta 79\text{AvrRpt2}$ -basiertes Reportersystem in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 wurde die Translokation der Effektoren aus *Bja110* bestätigt und eine Reihe neuer potentielle Effektoren (Insgesamt 36) gezeigt (Kimbrel et al. 2013). Mit dieser Analyse wurden alle zuvor in unseren Arbeiten durch Massenspektrometrie identifizierte Effektoren bestätigt. Bemerkenswert ist, dass im Überstand von *Bja110* deutlich weniger sekretierte Proteine nach Flavonoid-Induktion detektiert werden, als Gene für Effektoren im Genom durch das heterologe Reportersystem postuliert wurden. Das deutet auf eine zusätzliche Kontrolle der Sekretion und Translokation hin. In pathogenen Bakterien wurden Proteine identifiziert, welche die Sekretionsreihenfolge durch spezielle Schalterproteine regulieren (Takaya et al. 2019 Deng et al. 2005 Agrain et al. 2005). In *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* unterscheidet das Schalterprotein HpaC zwischen frühen und späten Substraten des Sekretionssystems ((Lohou et al. 2014, Büttner & Bonas 2006; Lorenz et al. 2008). Es interagiert mit HrpU einer Komponente des Sekretionsapparates und steuert darüber die Reihenfolge der Sekretion (Büttner et al. 2006 Lorenz et al. 2008). Weitere Proteine, z.B. HrpJ aus *Erwinia amylovora*, beeinflussen die Sekretion/Translokation von Effektoren durch direkte Interaktion (Bocsanczy et al. 2008; Lohou et al. 2014). Kürzlich wurde über die Kopplung von Transkription und Sekretion in den T3SS von *Erwinia amylovora* und *Pseudomonas syringae* berichtet (Charova et al. 2018). Dabei sind die Transkriptionsregulatoren HrpG und HrpV in einem ternären Komplex mit HrpJ an die Zellmembran gebunden. Das führt zu einer dynamischen Steuerung zwischen Transkription und Sekretion (Charova et al. 2018). In Rhizobien ist bisher wenig bekannt, wie die Sekretionsreihenfolge der Proteine gesteuert wird, jedoch ist es wahrscheinlich, dass es neben der transkriptionellen Regulation weitere Kontrollmechanismen gibt.

Die Zahl der in dieser Arbeit identifizierten Typ-III-sekretierten Effektoren in *Bja110* ist mit der Zahl an Effektoren in anderen Rhizobien vergleichbar. Im Gegensatz dazu sekretieren pathogene Bakterien deutlich mehr Effektoren, z.B. zwischen 24 und 37 Effektoren in *Xanthomonas* sp. und 15-35 in *Pseudomonas* sp. (Büttner & Bonas 2010; Block & Alfano 2011).

Die sekretierten Proteine NopA und NopB sind Bestandteile des Pilus des Sekretionssystems in NGR234 und USDA257 (Krishnan et al. 2003; Marie et al. 2003; Saad et al. 2005). Die Effektoren NopM, NopP und NopT besitzen Ähnlichkeit zu Effektoren pathogener Bakterien und wurden unter anderem im Überstand von NGR234, HH103, USDA257 und USDA110 nachgewiesen (Marie

et al. 2003; Rodrigues et al. 2007; Dai et al. 2008; Kambara et al. 2009; Xin et al. 2012; Staehelin & Krishnan 2015; Süß et al. 2006; Hempel et al. 2009). Die Proteine GunA2 und Pgl wurden zuerst in *Bja110* als sekretiert nachgewiesen (Hempel et al. 2009; Süß et al. 2006). Homologe Proteine wurden später auch in anderen Rhizobien sp. identifiziert (Tsukui et al. 2013; Staehelin & Krishnan 2015). Im Anhang Tab. A2-25 sind die in *Bja110* detektierten Effektoren und deren Sequenzhomologien mit anderen Proteinen aufgeführt. Das Gen *nopL* ist im *tts*-Gencluster kodiert und besitzt in seiner Promotorregion eine *tts*-Box. Es wird auch durch die Anwesenheit von Flavonoiden induziert, was auf einen potentiellen Effektor hindeutet (Krause et al. 2002). Bisher wurde es jedoch nicht im Überstand von *Bradyrhizobium* sp. USDA110 und USDA122 detektiert (Hempel et al. 2009; Tsukui et al. 2013). Das homologe Protein NopL/Y4xL wurde in *Sinorhizobium* sp. NGR234 und *S. fredii* HH103 als sekretierter Effektor identifiziert (Viprey et al. 1998; Bartsev et al. 2004; Lopez-Baena et al. 2008). Es ist mit 338 Aminosäuren im Vergleich zu NopL aus *Bradyrhizobium* sp. USDA110, USDA122, BJ6^T (167 aa) etwa doppelt so groß.

Das Protein Bll8244 ist ein weiterer Kandidat für ein Effektorprotein in *Bja110*. Das kodierende Gen verfügt in seinem Promotorbereich über eine *tts*-Box und die Proteinsequenz zeigt Ähnlichkeit zu Proteinen der C48 Proteasefamilie aus pathogenen Effektoren. In Transkriptionsanalysen konnte für dieses Gen in Flavonoid-induzierten Kulturen kein Transkript nachgewiesen werden. Auch das Protein Bll8244 konnte bisher nicht in *Bja110* detektiert werden (Zehner et al. 2008). Interessanterweise wurde in phänotypischen Untersuchungen zur Interaktion von Bj IS-34 mit *Rj₄* Sojapflanzen das *bll8244*-homologe Protein MA20_12780 als Auslöser für die Inkompatibilität dieses Rhizobien-Leguminosen-Paars identifiziert (Tsurumaru et al. 2015). Dabei kann eine Deletionsmutante in MA20_12780 die eingeschränkte Nodulationsfähigkeit des Stammes auf *Rj₄* Sojapflanzen aufheben.

Die Effektorproteine NopE1, NopE2, NopF und NopH wurden innerhalb der Rhizobiacea nur im Genus *Bradyrhizobium* detektiert. NopH ist ein kleines Protein mit nur 102 Aminosäuren, welches einen niedrigen theoretischen pI (~5,4) aufweist. Diese Eigenschaften deuten auf eine Funktion als Chaperon hin (Feldman & Cornelis 2003; Parsot et al. 2003). In pathogenen Bakterien, z.B. *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora* und *Salmonella* sp. wurden spezifische Chaperone, die an der Sekretion einzelner Effektoren beteiligt sind, beschrieben (Lohou et al. 2013; Castiblanco et al. 2018). In Rhizobien konnten bisher keine spezifischen Chaperone für die Typ-III-Sekretion identifiziert werden.

Die Effektoren NopE1 und NopE2 wurden im Überstand von Flavonoid-induzierten Kulturen von *Bja110* und USDA122 nachgewiesen (Süß et al. 2006; Hempel et al. 2009; Tsukui et al. 2013). Die Primärsequenz der Proteine NopE1 und NopE2 besitzt keine Homologie zu charakterisierten Proteinen in den Datenbanken. Innerhalb der Sequenz wurden zwei Domänen unbekannter Funktion (DUF1521) identifiziert. Diese Domäne ist auch in einer Reihe von Genen anderer *Bradyrhizobium* sp. identifiziert worden (Duran et al. 2018). Innerhalb der Familie der

Rhizobiaceae ist das Auftreten der Domäne auf den Genus *Bradyrhizobium* beschränkt. Aber auch in anderen Proteobakterien z.B. in *Vibrio*, *Burkholderia*, *Sphingomonas* und *Myxococcus* sp. sind Sequenzen mit dieser Domäne präsent (Schirromeister et al. 2011). Für die Effektoren NopE1 und NopE2 wurde eine autokatalytische Selbstspaltung nachgewiesen (Wenzel et al. 2010; Schirromeister et al. 2011). Die Modifikation und Prozessierung von Effektoren ist ein verbreiteter Mechanismus für Typ III-sekretierte Proteine (Popa et al. 2016). Dabei erfolgt eine Modifikation zumeist in der Wirtszelle. Das Effektorprotein AvrRPS4 aus *Pseudomonas syringae* wird in der Wirtszelle spezifisch in zwei Fragmente zerlegt. Beide Fragmente zeigen unabhängige Aktivität als Effektoren *in planta* (Sohn et al. 2009; Halane et al. 2018). Die rhizobiellen Effektoren, z.B. NopT1 und NopT2 zeigen Ähnlichkeit zu Cystein-Proteasen und besitzen autokatalytische Proteaseaktivität (Fotiadis et al. 2012).

Für NopE1 wurde durch Komplementation der Δ NopE1- Δ NopE2-Mutante mit einer nichtspaltbaren NopE1-Variante gezeigt, dass die Spaltung des Proteins essentiell für seine Effektorfunktion im Wirtsorganismus ist (Wenzel et al. 2010). Weitere Beispiele für Typ-III sekretierte Proteine, die durch eine autokatalytische Spaltung aktiviert werden, sind HopAR1 aus *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Puri et al. 1997; Shao et al. 2002; Shao et al. 2003) und AvrRpt2 aus *Pseudomonas syringae* DC3000 pv. *tomato* (Mudgett & Staskawicz 1999; Coaker et al. 2005; Coaker et al. 2006). Diese Proteine besitzen Ähnlichkeit zu Proteinen der Cystein-Protease-Familie. Im Gegensatz dazu besitzen NopE1 und NopE2 keine Sequenzähnlichkeit zu bekannten Protease-Familien. Die Spaltung erfolgt am Sequenzmotiv GDPH, zwischen den Aminosäuren Aspartat und Prolin. Die Selbstspaltung wird durch die Anwesenheit von Calcium-Ionen induziert. Die Spaltung könnte auf der chemischen Instabilität der Aspartat-Prolin-Bindung beruhen. Die Induzierbarkeit der Spaltung und die physiologische Bedeutung in der Interaktion deuten jedoch auf einen gezielten, neuartigen Prozessierungsmechanismus dieser Effektoren hin. Das Protein HrcU ist Bestandteil des T3SS in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* und wird autokatalytisch an einem konservierten NPTH-Motiv gespalten (Lorenz et al. 2008). Die autokatalytische Spaltung ist in der Proteinfamilie FhlB/YscU konserviert und essentiell (Ferris et al. 2005; Bjornfot et al. 2009; Lavander et al. 2002). Auch bei dieser Proteinfamilie spielt Calcium scheinbar eine wichtige Rolle für die Funktion und Dissoziation der Untereinheiten der Proteine (Frost et al. 2012).

Einige Proteine aus Eukaryoten werden, wie NopE1, an einer Aspartat-Prolin-Bindung im GDPH Motiv gespalten, z.B. die Mucin-Proteine MUC2 und MUC5AC, sowie der MUC4/Sialomucin Komplex (Sheng et al. 1990; Lidell et al. 2003; Lidell & Hansson 2006; Soto et al. 2006). Bei diesen Proteinen verläuft die Spaltung relativ langsam und hauptsächlich in saurem Milieu, was auf die chemische Sensibilität der Aspartat-Prolin Bindung zurückgeführt wird (Voorter et al. 1988; Lidell et al. 2003). Die Selbstspaltung des Proteins FrpC aus *Neisseria meningitidis* wird, wie bei NopE1, durch Calcium induziert und ist ein sehr schneller Prozess. FrpC ist ein Protein der RTX-

Toxin-Familie und besitzt keine signifikante Sequenzähnlichkeit mit NopE1. Die Bedingungen für die Selbstspaltung beider Proteine sind jedoch sehr ähnlich. Beide Proteine zeigen in ihrer Selbstspaltungsaktivität besondere Stabilität gegenüber Hitze und einen breiten pH-Bereich, sowie hohe Spezifität für Calciumionen. In Gegenwart von Calciumionen erfolgt bei FrpC eine autokatalytische „clip-and-link“ Prozessierung an einer Aspartat-Prolin-Bindung im YDPLA Motiv (Osicka et al. 2004). Dabei kommt es zu einer intermolekularen Verknüpfung des Aspartat-Restes mit einer Lysinseitenkette, verbunden mit der Bildung höhermolekularer Produkte (Osicka et al. 2004). Diese Polymerisierung kann unter reduzierenden Bedingungen deutlich zurückgedrängt werden (Sadilkova et al. 2008). Für NopE1 wurden keine höhermolekularen Produkte nach der Spaltung beobachtet.

Das Sequenzmotiv GDPH von NopE1 ist nicht ausreichend für die Selbstspaltung des Proteins. Es wird nahezu die gesamte DUF1521-Domäne für die Autoprozessierung benötigt. Eine Datenbankanalyse erlaubte die Identifizierung von weiteren DUF1521-Domänen in anderen Proteobakterien. Die Untersuchung von DUF1521 Domänen verschiedener Herkunft haben gezeigt, dass die Eigenschaften der Metallionen-induzierten Selbstspaltung der DUF1521-Domänen konserviert sind (Schirrmeister et al. 2011; Duran et al. 2018). Daraufhin wurde diese Domäne als MIIA- (*metal ion-inducible autocleavage*) Domäne bezeichnet.

Die Spezifität für die Aktivierung von NopE1 durch Calciumionen ist bemerkenswert. NopE1 und NopE2 sind Proteine mit strikter Calciumionen-Selektivität. Calcium stellt in der Interaktion mit der Wirtspflanze ein wichtiges Signal dar. In den Anfangsstadien der Interaktion oszilliert die Calciumkonzentration in den Wurzelhaarzellen besonders stark (Oldroyd & Downie 2004). Die Selektivität für Calcium könnte bei NopE1 einen Mechanismus zum Schutz vor ungesteuerter Selbstspaltung außerhalb oder eine spezifische Aktivierung in der Wirtszelle darstellen.

Für die Bindung von Calcium ist in eukaryotischen Proteinen die sogenannte EF-Hand Faltung verbreitet (Gifford et al. 2007). In den Sequenzen der MIIA-Domänen von NopE1 und VIC_001052 wurden Motive mit Ähnlichkeit zu EF-Hand-Calciumbindestellen identifiziert. Die MIIA-Domäne des Proteins VIC_001052 aus *Vibrio coralliilyticus* ATCC-BAA450 wurde bezüglich der Metallbindung näher charakterisiert. Die biophysikalischen Daten weisen nicht auf eine kanonische Calciumkoordination durch eine EF-Hand-Struktur, sondern vielmehr auf eine globale Umfaltung der Proteine bei Calciumbindung, hin (Hoyer et al. 2019).

Die MIIA-Domäne wurde in Proteinen verschiedener Proteobakterien identifiziert und besitzen das konservierte Sequenzmotiv GDPH (Schirrmeister et al. 2011, 2013, Duran et al. 2018). Die MIIA-Domänen aus vorhergesagten Proteinen von *Burkholderia phytofirmans* PsJN, *Sphingomonas* sp. SK58 und *Photobacterium* sp. AK15 wurden heterolog in *E. coli* produziert und gereinigt (unveröffentlichte Daten). Auch diese heterolog produzierten MIIA-Domänen besitzen Selbstspaltungsaktivität. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Selbstspaltung eine konservierte Funktion der MIIA-Domänen darstellt.

Zusammenfassung

Die Sekretion von Proteinen spielt eine bedeutende Rolle in der Interaktion von Bakterien mit Eukaryoten. In pathogenen Interaktionen werden wichtige Virulenzfaktoren von Bakterien sekretiert, welche die Infektion des Wirtsorganismus ermöglichen. Ohne die Fähigkeit, die Proteine zu sekretieren oder in die Wirtszellen zu injizieren, verlieren viele Pathogene ihre Virulenz. In der symbiotischen Interaktion von Rhizobien mit Leguminosen sind sekretierte Proteine nicht essentiell, jedoch haben sie für die Breite des Wirtsbereiches große Bedeutung. Für den Transport der Proteine aus dem Cytoplasma der Bakterien in den extrazellulären Raum und ins Cytosol der Wirtszellen, nutzen Bakterien sehr verschiedene Sekretionssysteme.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand das Typ III-Sekretionssystem (T3SS) bei *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. Die Aktivierung des Typ III-Sekretionssystems in Rhizobien ist von der Anwesenheit der Wirtspflanze abhängig. Die Sojapflanze ist der typische Wirt von *B. japonicum* USDA110. Über die Wurzeln scheiden Sojapflanzen verschiedene Flavonoide wie Coumestrol und Genistein aus. Diese Substanzen induzieren in *B. japonicum* die Gene der Biosynthese der Nod-Faktoren und des Typ III-Sekretionssystems. Die Aktivierung der Gene des Typ III-Sekretionssystems erfolgt in Abhängigkeit der Regulatoren NodD1, NodVW und TtsI.

In dieser Arbeit wurde die *tts*-Box, als neuartige Promotorsequenz für die Gene des T3SS und sekretierter Proteine charakterisiert. Um die Anwesenheit der Wirtspflanze zu imitieren, wurden im experimentellen Ansatz Flüssigkulturen von *Bradyrhizobium japonicum* mit dem Flavonoid Genistein versetzt. Die Bedeutung der *tts*-Box für die Transkription der 3'-seitigen Gene wurde mittels Reportergenfusionen untersucht. Durch gezielte Sequenzmodifikationen wurde ein Konsensus-Motiv für die funktionelle *tts*-Box definiert. Mit diesem Motiv konnten im Genom von *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 insgesamt 39 *tts*-Boxen identifiziert werden, wobei für 34 Genregionen 3'-seitig zur *tts*-Box transkriptionelle Aktivität nachgewiesen wurde. Durch Reportergenfusionen konnte zudem gezeigt werden, dass verschiedene *tts*-Box-kontrollierte Gene in frühen und späten Phasen der Symbiose exprimiert werden.

Die identifizierten *tts*-Boxen sind auch außerhalb des *tts*-Genclusters im gesamten Genom von *B. japonicum* verteilt zu finden (Kapitel 1). Das bedeutet, dass nicht nur die Gene für den Typ III-Sekretionsapparat (*rhc*-Gene), sondern auch die Gene für die potentielle Substrate des Sekretionssystems, sogenannte *nodulation outer proteins* (Nop), unter der Kontrolle dieses Promotors stehen. Die Aufgabe bestand nun darin, diese postulierten Proteine und deren Transport durch das Typ III-Sekretionssystem nachzuweisen (Kapitel 2).

Dafür wurde das Sekretom von *B. japonicum* analysiert. Mehr als 100 Proteine wurden im Kulturüberstand detektiert. Davon konnten 68 Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Diese Proteine können über verschiedene Wege in den Überstand der Kulturen gelangen. Die möglichen Transportsysteme dafür wurden diskutiert. Um die Rolle des

Typ III-Sekretionssystem (T3SS) zu untersuchen, wurden Überstände verschiedener Mutanten und Genistein-induzierter Kulturen analysiert. Es wurden 12 Proteine als Substrate des T3SS identifiziert. Darunter sind zwei vermutliche Proteasen (NopT1, NopT2), die Ähnlichkeit mit pathogenen Effektoren aufweisen, zwei vermeintliche zellwandabbauende Proteine (GunA2, Pgl), mehrere hypothetische Proteine, die einzigartig für *Bradyrhizobium* sind, und die homologen Proteine NopE1 und NopE2. Weitere Kandidaten wurden aufgrund von bioinformatischen Untersuchungen postuliert, konnten im Kulturüberstand jedoch nicht nachgewiesen werden (Kapitel 2).

Die sekretierten Proteine NopE1 und NopE2 sind bona-fide Typ III-Effektoren, da sie von *B. japonicum* bis in das pflanzliche Cytosol übertragen werden. Die Interaktion mit Soja wird durch die Effektoren NopE1 und NopE2 nicht gestört. Die Mungbohnenvarietät *Vigna radiata* KPS2 ist dagegen nicht in der Lage, in Gegenwart von NopE1 und NopE2 funktionelle Knöllchen zu bilden. Die gereinigten rekombinanten Proteine NopE1 und NopE2 weisen eine spezifische Selbstspaltungsaktivität in Gegenwart von Calcium auf. Die Spaltung erfolgt autokatalytisch und verläuft in einem weiten pH- und Temperaturbereich ungestört. Die Selbstspaltungsaktivität konnte auf einen Abschnitt der unbekannt Proteindomäne DUF1521 eingegrenzt werden. Im Pflanzentest wurde gezeigt, dass die Selbstspaltung von NopE1 essentiell für die Funktion als Effektor ist (Kapitel 3).

Homologe Proteine, welche die konservierte DUF1521-Domäne enthalten, sind auch in α -, β -, γ - und δ -Proteobakterien kodiert, z.B. im Endophyten *Burkholderia phytofirmans* PsJN und im Korallenpathogen *Vibrio coralliilyticus* ATCC-BAA450. Das rekombinant produzierte Protein VIC_001052 aus *V. coralliilyticus* wurde biochemisch charakterisiert. Es besitzt *in vitro* ebenfalls eine Calcium-induzierte Selbstspaltungsaktivität. Die DUF1521-Domäne dieses Proteins zeigt sehr ähnliche Eigenschaften wie diese Domänen aus NopE1. Aufgrund der konservierten Selbstspaltungsfunktion wurde die DUF1521-Domäne in *metal-ion inducible autocleavage*- (MIIA)- Domäne umbenannt (Kapitel 4).

In weiterführenden Arbeiten wurde die MIIA-Domäne aus VIC_001052 für die Anwendung als spaltbarer Linker für die Reinigung rekombinanter Proteine entwickelt (Ibe et al. 2015). Die biophysikalische Charakterisierung der Domäne, insbesondere die Bindung von Metallionen wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung Biophysik vom Helmholtz-Zentrum Dresden durchgeführt (Hoyer et al. 2019). In Kooperation mit dem Zentrum für Biotechnologie und Pflanzengenomik der Polytechnischen Universität Madrid wurde die Aktivität für ein weiteres Effektorprotein (MdcE) mit einer MIIA-Domäne aus *Bradyrhizobium* sp. LmjC charakterisiert (Duran et al. 2018).

Literaturverzeichnis

- Abdallah, A. M., Gey van Pittius, N. C., Champion, P. A., Cox, J., Luirink, J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Appelmelk, B. J., Bitter, W. (2007). Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* 5: 883-891.
- Abrusci, P., McDowell, M. A., Lea, S. M., Johnson, S. (2014). Building a secreting nanomachine: a structural overview of the T3SS. *Curr Opin Struct Biol* 25C: 111-117.
- Agrain, C., Sorg, I., Paroz, C., Cornelis, G. R. (2005). Secretion of YscP from *Yersinia enterocolitica* is essential to control the length of the injectisome needle but not to change the type III secretion substrate specificity. *Mol Microbiol* 57: 1415-1427.
- Akeda, Y., Galan, J. E. (2004). Genetic analysis of the *Salmonella enterica* type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains. *J Bacteriol* 186: 2402-2412.
- Alfano, J. R., Collmer, A. (1996). Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell* 8: 1683-1698.
- Ancona, V., Lee, J. H., Chatnaparat, T., Oh, J., Hong, J. I., Zhao, Y. (2015). The bacterial alarmone (p)ppGpp activates the type III secretion system in *Erwinia amylovora*. *J Bacteriol* 197: 1433-1443.
- Andrade, M. O., Farah, C. S., Wang, N. (2014). The post-transcriptional regulator *rsmA/csrA* activates T3SS by stabilizing the 5' UTR of *hrpG*, the master regulator of *hrp/hrc* genes, in *Xanthomonas*. *PLoS pathogens* 10: e1003945.
- Armitage, J. P., Gallagher, A., Johnston, A. W. (1988). Comparison of the chemotactic behaviour of *Rhizobium leguminosarum* with and without the nodulation plasmid. *Mol Microbiol* 2: 743-748.
- Ausmees, N., Jacobsson, K., Lindberg, M. (2001). A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin, RapA, belongs to a family of *Rhizobium*-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Microbiology* 147: 549-559.
- Barbour, W. M., Hattermann, D. R., Stacey, G. (1991). Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Appl Environ Microbiol* 57: 2635-2639.
- Barret, M., Egan, F., Moynihan, J., Morrissey, J. P., Lesouhaitier, O., O'Gara, F. (2013). Characterization of the SPI-1 and Rsp type three secretion systems in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Environ Microbiol Rep* 5: 377-386.
- Bartsev, A. V., Deakin, W. J., Boukli, N. M., McAlvin, C. B., Stacey, G., Malnoe, P., Broughton, W. J., Staehelin, C. (2004). NopL, an effector protein of *Rhizobium* sp. NGR234, thwarts activation of plant defense reactions. *Plant Physiol* 134: 871-879.
- Basler, M. (2015). Type VI secretion system: secretion by a contractile nanomachine. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370.
- Beck, C., Marty, R., Klausli, S., Hennecke, H., Göttfert, M. (1997). Dissection of the transcription machinery for housekeeping genes of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 179: 364-369.
- Becker, A., Fraysse, N., Sharypova, L. (2005). Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 899-905.
- Ben-Haim, Y., Thompson, F. L., Thompson, C. C., Cnockaert, M. C., Hoste, B., Swings, J., Rosenberg, E. (2003). *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 309-315.
- Ben-Haim, Y., Zicherman-Keren, M., Rosenberg, E. (2003). Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Appl Environ Microbiol* 69: 4236-4242.
- Benz, R. (2016). Channel formation by RTX-toxins of pathogenic bacteria: Basis of their biological activity. *Biochim Biophys Acta* 1858: 526-537.
- Bernstein, H. D. (2019). Type V secretion in gram-negative bacteria. *EcoSal Plus* 8: ; doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0031-2018.

- Bjornfot, A. C., Lavander, M., Forsberg, A., Wolf-Watz, H. (2009). Autoproteolysis of YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* is important for regulation of expression and secretion of Yop proteins. *J Bacteriol* 191: 4259-4267.
- Bladergroen, M. R., Badelt, K., Spaink, H. P. (2003). Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 53-64.
- Blaylock, B., Riordan, K. E., Missiakas, D. M., Schneewind, O. (2006). Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. *J Bacteriol* 188: 3525-3534.
- Block, A., Alfano, J. R. (2011). Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr Opin Microbiol* 14: 39-46.
- Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiaux, V., Parsot, C., Sansonetti, P. (1999). The tripartite type III secretion of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J Cell Biol* 147: 683-693.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P., Allaoui, A. (2001). Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretion. *Mol Microbiol* 39: 652-663.
- Blocker, A., Komoriya, K., Aizawa, S. (2003). Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3027-3030.
- Bocsanczy, A. M., Nissinen, R. M., Oh, C. S., Beer, S. V. (2008). HrpN of *Erwinia amylovora* functions in the translocation of DspA/E into plant cells. *Mol Plant Pathol* 9: 425-434.
- Bogdanove, A. J., Beer, S. V., Bonas, U., Boucher, C. A., Collmer, A., Coplin, D. L., Cornelis, G. R., Huang, H. C., Hutcheson, S. W., Panopoulos, N. J., Van Gijsegem, F. (1996). Unified nomenclature for broadly conserved hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Mol Microbiol* 20: 681-683.
- Bourret, R. B. (2010). Receiver domain structure and function in response regulator proteins. *Curr Opin Microbiol* 13: 142-149.
- Brenic, A., Winans, S. C. (2005). Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 155-194.
- Brown, I. R., Mansfield, J. W., Taira, S., Roine, E., 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.
- Bumann, D., Aksu, S., Wendland, M., Janek, K., Zimny-Arndt, U., Sabarth, N., Meyer, T. F., Jungblut, P. R. (2002). Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 70: 3396-3403.
- Büttner, D. (2012). Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 76: 262-310.
- Büttner, D., Bonas, U. (2002). Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J* 21: 5313-5322.
- Büttner, D., Bonas, U. (2006). Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr Opin Microbiol* 9: 193-200.
- Büttner, D., Bonas, U. (2010). Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* 34: 107-133.
- Büttner, D., Lorenz, C., Weber, E., Bonas, U. (2006). Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol* 59: 513-527.
- Caldelari Baumberger, I., Fraefel, N., Göttfert, M., Hennecke, H. (2003). New NodW- or NifA-regulated *Bradyrhizobium japonicum* genes. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 342-351.
- Camberg, J. L., Sandkvist, M. (2005). Molecular analysis of the *Vibrio cholerae* type II secretion ATPase EpsE. *J Bacteriol* 187: 249-256.
- Castiblanco, L. F., Triplett, L. R., Sundin, G. W. (2018). Regulation of effector delivery by type III secretion chaperone proteins in *Erwinia amylovora*. *Front Microbiol* 9: 146.

- Chagnot, C., Zorgani, M. A., Astruc, T., Desvaux, M. (2013). Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Front Microbiol* 4: 303.
- Chang, W. S., Franck, W. L., Cytryn, E., Jeong, S., Joshi, T., Emerich, D. W., Sadowsky, M. J., Xu, D., Stacey, G. (2007). An oligonucleotide microarray resource for transcriptional profiling of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant Microbe Interact.* 20: 1298-1307.
- Charova, S. N., Gazi, A. D., Mylonas, E., Pozidis, C., Sabarit, B., Anagnostou, D., Psatha, K., Aivaliotis, M., Beuzon, C. R., Panopoulos, N. J., Kokkinidis, M. (2018). Migration of type III secretion system transcriptional regulators links gene expression to secretion. *MBio* 9.
- Chatterjee, S., Chaudhury, S., McShan, A. C., Kaur, K., De Guzman, R. N. (2013). Structure and biophysics of type III secretion in bacteria. *Biochemistry* 52: 2508-2517.
- Chen, L., Ai, X., Portaliou, A. G., Minetti, C. A., Remeta, D. P., Economou, A., Kalodimos, C. G. (2013). Substrate-activated conformational switch on chaperones encodes a targeting signal in type III secretion. *Cell Rep* 3: 709-715.
- Chen, W. M., Moulin, L., Bontemps, C., Vandamme, P., Bena, G., Boivin-Masson, C. (2003). Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. *J Bacteriol* 185: 7266-7272.
- Christie, P. J., Gomez Valero, L., Buchrieser, C. (2017). Biological diversity and evolution of type IV secretion systems. *Curr Top Microbiol Immunol* 413: 1-30.
- Christie, P. J., Whitaker, N., Gonzalez-Rivera, C. (2014). Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochim Biophys Acta* 1843: 1578-1591.
- Clantin, B., Delattre, A. S., Rucktooa, P., Saint, N., Meli, A. C., Loch, C., Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V. (2007). Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily. *Science* 317: 957-961.
- Coaker, G., Falick, A., Staskawicz, B. (2005). Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin. *Science* 308: 548-550.
- Coaker, G., Zhu, G., Ding, Z., Van Doren, S. R., Staskawicz, B. (2006). Eukaryotic cyclophilin as a molecular switch for effector activation. *Mol Microbiol* 61: 1485-1496.
- Compant, S., Kaplan, H., Sessitsch, A., Nowak, J., Ait Barka, E., Clement, C. (2008). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS Microbiol Ecol* 63: 84-93.
- Cornelis, G. R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4: 811-825.
- Cotter, S. E., Surana, N. K., St Geme, J. W., 3rd (2005). Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends Microbiol* 13: 199-205.
- Coulthurst, S. (2019). The Type VI secretion system: a versatile bacterial weapon. *Microbiology* 165: 503-515.
- Coulthurst, S. J. (2013). The Type VI secretion system - a widespread and versatile cell targeting system. *Res Microbiol* 164: 640-654.
- Cuklina, J., Hahn, J., Imakaev, M., Omasits, U., Forstner, K. U., Ljubimov, N., Goebel, M., Pessi, G., Fischer, H. M., Ahrens, C. H., Gelfand, M. S., Evgenieva-Hackenberg, E. (2016). Genome-wide transcription start site mapping of *Bradyrhizobium japonicum* grown free-living or in symbiosis - a rich resource to identify new transcripts, proteins and to study gene regulation. *BMC Genomics* 17: 302.
- Cunnac, S., Boucher, C., Genin, S. (2004). Characterization of the cis-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* 186: 2309-2318.
- Cusano, A. M., Burlinson, P., Deveau, A., Vion, P., Uroz, S., Preston, G. M., Frey-Klett, P. (2011). *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 type III secretion mutants no longer promote ectomycorrhizal symbiosis. *Environ Microbiol Rep* 3: 203-210.
- Dai, W. J., Zeng, Y., Xie, Z. P., Staehelin, C. (2008). Symbiosis-promoting and deleterious effects of NopT, a novel type 3 effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J Bacteriol* 190: 5101-5110.

- Daniell, S. J., Takahashi, N., Wilson, R., Friedberg, D., Rosenshine, I., Booy, F. P., Shaw, R. K., Knutton, S., Frankel, G., Aizawa, S. (2001). The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 3: 865-871.
- de Campos, S. B., Deakin, W. J., Broughton, W. J., Passaglia, L. M. (2011). Roles of flavonoids and the transcriptional regulator TtsI in the activation of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587. *Microbiology* 157: 627-635.
- De Hoff, P. L., Brill, L. M., Hirsch, A. M. (2009). Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Mol Gen Genet* 282: 1-15.
- de Lyra Mdo, C., Lopez-Baena, F. J., Madinabeitia, N., Vinardell, J. M., Espuny Mdel, R., Cubo, M. T., Belloguin, R. A., Ruiz-Sainz, J. E., Ollero, F. J. (2006). Inactivation of the *Sinorhizobium fredii* HH103 *rhcJ* gene abolishes nodulation outer proteins (Nops) secretion and decreases the symbiotic capacity with soybean. *Int Microbiol* 9: 125-133.
- de Maagd, R. A., Wijffjes, A. H., Spaink, H. P., Ruiz-Sainz, J. E., Wijffelman, C. A., Okker, R. J., Lugtenberg, B. J. (1989). *nodO*, a new nod gene of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* sym plasmid pRL1J1, encodes a secreted protein. *J Bacteriol* 171: 6764-6770.
- Deakin, W. J., Broughton, W. J. (2009). Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 7: 312-320.
- Debarbieux, L., Wandersman, C. (2001). Folded HasA inhibits its own secretion through its ABC exporter. *Embo J* 20: 4657-4663.
- Delamuta, J. R., Ribeiro, R. A., Ormeno-Orrillo, E., Melo, I. S., Martinez-Romero, E., Hungria, M. (2013). Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 63: 3342-3351.
- Delepelaire, P. (2004). Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1694: 149-161.
- Deng, W., Li, Y., Hardwidge, P. R., Frey, E. A., Pfuetzner, R. A., Lee, S., Gruenheid, S., Strynacka, N. C., Puente, J. L., Finlay, B. B. (2005). Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens. *Infect Immun* 73: 2135-2146.
- Deslandes, L., Rivas, S. (2012). Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends Plant Sci* 17: 644-655.
- Desvaux, M., Hebraud, M., Talon, R., Henderson, I. R. (2009). Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol* 17: 139-145.
- Desvaux, M., Parham, N. J., Henderson, I. R. (2004). The autotransporter secretion system. *Res Microbiol* 155: 53-60.
- Diepold, A., Armitage, J. P. (2015). Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370.
- Diepold, A., Wagner, S. (2014). Assembly of the bacterial type III secretion machinery. *FEMS Microbiol Rev*.
- Downie, J. A. (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol Rev* 34: 150-170.
- Downie, J. A., Surin, B. P. (1990). Either of two *nod* gene loci can complement the nodulation defect of a *nod* deletion mutant of *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*. *Mol Gen Genet* 222: 81-86.
- Duran, D., Imperial, J., Palacios, J., Ruiz-Argueso, T., Göttfert, M., Zehner, S., Rey, L. (2018). Characterization of a novel MIIA domain-containing protein (MdcE) in *Bradyrhizobium* spp. *FEMS Microbiol Lett* 365.
- Durand, E., Cambillau, C., Cascales, E., Journet, L. (2014). VgrG, Tae, Tle, and beyond: the versatile arsenal of type VI secretion effectors. *Trends Microbiol* 22: 498-507.
- Economou, A., Hamilton, W. D., Johnston, A. W., Downie, J. A. (1990). The *Rhizobium* nodulation gene *nodO* encodes a Ca²⁺(+)-binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to haemolysin and related proteins. *EMBO J* 9: 349-354.
- Faruque, O. M., Miwa, H., Yasuda, M., Fujii, Y., Kaneko, T., Sato, S., Okazaki, S. (2015). Identification of *Bradyrhizobium elkanii* genes involved in incompatibility with soybean plants carrying the Rj4 allele. *Appl Environ Microbiol* 81: 6710-6717.

- Fauvart, M., Michiels, J. (2008). Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium-legume symbiosis. *FEMS Microbiol Lett* 285: 1-9.
- Feldman, M. F., Cornelis, G. R. (2003). The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol Lett* 219: 151-158.
- Feng, F., Zhou, J. M. (2012). Plant-bacterial pathogen interactions mediated by type III effectors. *Curr Opin Plant Biol* 15: 469-476.
- Fernandez, L. A., de Lorenzo, V. (2001). Formation of disulphide bonds during secretion of proteins through the periplasmic-independent type I pathway. *Mol Microbiol* 40: 332-346.
- Ferris, H. U., Furukawa, Y., Minamino, T., Kroetz, M. B., Kihara, M., Namba, K., Macnab, R. M. (2005). FlhB regulates ordered export of flagellar components via autocleavage mechanism. *J Biol Chem* 280: 41236-41242.
- Filloux, A., Hachani, A., Bleves, S. (2008). The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* 154: 1570-1583.
- Finnie, C., Hartley, N. M., Findlay, K. C., Downie, J. A. (1997). The *Rhizobium leguminosarum* *prsDE* genes are required for secretion of several proteins, some of which influence nodulation, symbiotic nitrogen fixation and exopolysaccharide modification. *Mol Microbiol* 25: 135-146.
- Finnie, C., Zorreguieta, A., Hartley, N. M., Downie, J. A. (1998). Characterization of *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide glycanases that are secreted via a type I exporter and have a novel heptapeptide repeat motif. *J Bacteriol* 180: 1691-1699.
- Fischer, H. M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev* 58: 352-386.
- Fotiadis, C. T., Dimou, M., Georgakopoulos, D. G., Katinakis, P., Tampakaki, A. P. (2012). Functional characterization of NopT1 and NopT2, two type III effectors of *Bradyrhizobium japonicum*. *FEMS Microbiol Lett* 327: 66-77.
- Fraser, J. S., Merlie, J. P., Jr., Echols, N., Weisfield, S. R., Mignot, T., Wemmer, D. E., Zusman, D. R., Alber, T. (2007). An atypical receiver domain controls the dynamic polar localization of the *Myxococcus xanthus* social motility protein FrzS. *Mol Microbiol* 65: 319-332.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A., Perret, X. (1997). Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387: 394-401.
- Fronzes, R., Christie, P. J., Waksman, G. (2009). The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 7: 703-714.
- Frost, S., Ho, O., Login, F. H., Weise, C. F., Wolf-Watz, H., Wolf-Watz, M. (2012). Autoproteolysis and intramolecular dissociation of *Yersinia* YscU precedes secretion of its C-terminal polypeptide YscU(CC). *PLoS One* 7: e49349.
- Galan, J. E. (2009). Common themes in the design and function of bacterial effectors. *Cell Host Microbe* 5: 571-579.
- Galan, J. E., Wolf-Watz, H. (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 444: 567-573.
- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dreano, S., Federspiel, N. A., Fisher, R. F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenbol, M., Vorholter, F. J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K. C., Batut, J. (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293: 668-672.
- Gao, R., Stock, A. M. (2010). Molecular strategies for phosphorylation-mediated regulation of response regulator activity. *Curr Opin Microbiol* 13: 160-167.
- Ghosh, P. (2004). Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 771-795.
- Gifford, J. L., Walsh, M. P., Vogel, H. J. (2007). Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem J* 405: 199-221.

- Glew, M. D., Veith, P. D., Peng, B., Chen, Y.-Y., Gorasia, D. G., Yang, Q., Slakeski, N., Chen, D., Moore, C., Crawford, S., Reynolds, E. C. (2012). PG0026 is the C-terminal signal peptidase of a novel secretion system of *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* 287: 24605-24617.
- Gonzalez, V., Bustos, P., Ramirez-Romero, M. A., Medrano-Soto, A., Salgado, H., Hernandez-Gonzalez, I., Hernandez-Celis, J. C., Quintero, V., Moreno-Hagelsieb, G., Girard, L., Rodriguez, O., Flores, M., Cevallos, M. A., Collado-Vides, J., Romero, D., Davila, G. (2003). The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome Biol* 4: R36.
- Gophna, U., Ron, E. Z., Graur, D. (2003). Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* 312: 151-163.
- Göttfert, M. (1993). Regulation and function of rhizobial nodulation genes. *FEMS Microbiol Rev* 10: 39-63.
- Göttfert, M., Röthlisberger, S., Kundig, C., Beck, C., Marty, R., Hennecke, H. (2001). Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *J Bacteriol* 183: 1405-1412.
- Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M., Dangl, J. L. (2006). Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60: 425-449.
- Gu, J., Balatti, P. A., Krishnan, H. B., Pueppke, S. G. (1997). Characterization of the overlapping promoters of *noIB* and *noIW*, two soybean cultivar specificity genes from *Rhizobium fredii* strain USDA257. *Mol Plant Microbe Interact* 10: 138-141.
- Gyaneshwar, P., Hirsch, A. M., Moulin, L., Chen, W. M., Elliott, G. N., Bontemps, C., Estrada-de Los Santos, P., Gross, E., Dos Reis, F. B., Sprent, J. I., Young, J. P., James, E. K. (2011). Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Mol Plant Microbe Interact* 24: 1276-1288.
- Halane, M. K., Kim, S. H., Spears, B. J., Garner, C. M., Rogan, C. J., Okafor, E. C., Su, J., Bhattacharjee, S., Gassmann, W. (2018). The bacterial type III-secreted protein AvrRps4 is a bipartite effector. *PLoS Pathog* 14: e1006984.
- Hardie, K. R., Lory, S., Pugsley, A. P. (1996). Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. *EMBO J* 15: 978-988.
- Hayes, R. L., Bush, P. G. (1990). Microscopic observations of recovery in the reef-building scleractinian coral, *Montastrea annularis*, after bleaching on a Cayman reef. *Coral Reefs* 8: 203-209.
- He, S. Y., Jin, Q. (2003). The Hrp pilus: learning from flagella. *Curr Opin Microbiol* 6: 15-19.
- Hempel, J., Zehner, S., Göttfert, M., Patschkowski, T. (2009). Analysis of the secretome of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. *J Biotechnol* 140: 51-58.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C., Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 692-744.
- Hinsa, S. M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J. L., O'Toole, G. A. (2003). Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol Microbiol* 49: 905-918.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S., Haas, R. (2001). Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol Microbiol* 41: 379-391.
- Holland, I. B., Peherstorfer, S., Kanonenberg, K., Lenders, M., Reimann, S., Schmitt, L. (2016). Type I protein secretion-deceptively simple yet with a wide range of mechanistic variability across the family. *EcoSal Plus* 7.
- Hong, E., Lee, H. M., Ko, H., Kim, D. U., Jeon, B. Y., Jung, J., Shin, J., Lee, S. A., Kim, Y., Jeon, Y. H., Cheong, C., Cho, H. S., Lee, W. (2007). Structure of an atypical orphan response regulator protein supports a new phosphorylation-independent regulatory mechanism. *J Biol Chem* 282: 20667-20675.
- Hood, R. D., Singh, P., Hsu, F., Guvener, T., Carl, M. A., Trinidad, R. R., Silverman, J. M., Ohlson, B. B., Hicks, K. G., Plemel, R. L., Li, M., Schwarz, S., Wang, W. Y., Merz, A. J., Goodlett, D. R., Mougous, J. D. (2010). A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe* 7: 25-37.
- Hoyer, E., Knöppel, J., Liebmann, M., Steppert, M., Raiwa, M., Herczynski, O., Hanspach, E., Zehner, S., Göttfert, M., Tsushima, S., Fahmy, K., Oertel, J. (2019). Calcium binding to a disordered domain of

- a type III-secreted protein from a coral pathogen promotes secondary structure formation and catalytic activity. *Sci Rep* 9: 7115.
- Hu, B., Lara-Tejero, M., Kong, Q., Galan, J. E., Liu, J. (2017). In Situ molecular architecture of the *Salmonella* Type III secretion machine. *Cell* 168: 1065-1074.e1010.
- Hu, J., Worrall, L. J., Hong, C., Vuckovic, M., Atkinson, C. E., Caveney, N., Yu, Z., Strynadka, N. C. J. (2018). Cryo-EM analysis of the T3S injectisome reveals the structure of the needle and open secretin. *Nat Commun* 9: 3840.
- Hubber, A., Vergunst, A. C., Sullivan, J. T., Hooykaas, P. J., Ronson, C. W. (2004). Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Mol Microbiol* 54: 561-574.
- Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 379-433.
- Jackson, M. W., Plano, G. V. (2000). Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. *FEMS Microbiol Lett* 186: 85-90.
- Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R., Coutte, L. (2004). Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim Biophys Acta* 1694: 235-257.
- Jacob-Dubuisson, F., Guerin, J., Baelen, S., Clantin, B. (2013). Two-partner secretion: as simple as it sounds? *Res Microbiol* 164: 583-595.
- Janczarek, M., Rachwał, K. (2013). Mutation in the *psaA* gene involved in exopolysaccharide synthesis leads to several physiological and symbiotic defects in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Int J Mol Sci* 14: 23711-23735.
- Janczarek, M., Rachwał, K., Marzec, A., Grządziel, J., Palusińska-Szys, M. (2015). Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–rhizobium interactions. *Applied Soil Ecology* 85: 94-113.
- Jiang, W., Jiang, B. L., Xu, R. Q., Huang, J. D., Wei, H. Y., Jiang, G. F., Cen, W. J., Liu, J., Ge, Y. Y., Li, G. H., Su, L. L., Hang, X. H., Tang, D. J., Lu, G. T., Feng, J. X., He, Y. Q., Tang, J. L. (2009). Identification of six type III effector genes with the PIP box in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and five of them contribute individually to full pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 1401-1411.
- Jimenez-Guerrero, I., Perez-Montano, F., Medina, C., Ollero, F. J., Lopez-Baena, F. J. (2017). The *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 nodulation outer protein Nopl is a determinant for efficient nodulation of soybean and cowpea plants. *Appl Environ Microbiol* 83.
- Jones, K. M., Lloret, J., Daniele, J. R., Walker, G. C. (2007). The type IV secretion system of *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 is required for conjugation but not for intracellular symbiosis. *J Bacteriol* 189: 2133-2138.
- Jourand, P., Giraud, E., Bena, G., Sy, A., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B., de Lajudie, P. (2004). *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 2269-2273.
- Kambara, K., Ardisson, S., Kobayashi, H., Saad, M. M., Schumpp, O., Broughton, W. J., Deakin, W. J. (2009). Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis. *Mol Microbiol* 71: 92-106.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M., Tabata, S. (2002). Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* 9: 189-197.
- Kazemi-Pour, N., Condemine, G., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (2004). The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Proteomics* 4: 3177-3186.
- Keener, J., Kustu, S. (1988). Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 4976-4980.
- Kharade, S. S., McBride, M. J. (2015). *Flavobacterium johnsoniae* PorV is required for secretion of a subset of proteins targeted to the type IX secretion system. *J Bacteriol* 197: 147-158.
- Kim, J. H., Lee, J., Park, J., Ghoo, Y. S. (2015). Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles. *Semin Cell Dev Biol* 40: 97-104.

- Kimbrel, J. A., Thomas, W. J., Jiang, Y., Creason, A. L., Thireault, C. A., Sachs, J. L., Chang, J. H. (2013). Mutualistic co-evolution of type III effector genes in *Sinorhizobium fredii* and *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS Pathog* 9: e1003204.
- Kimes, N. E., Grim, C. J., Johnson, W. R., Hasan, N. A., Tall, B. D., Kothary, M. H., Kiss, H., Munk, A. C., Tapia, R., Green, L., Detter, C., Bruce, D. C., Brettin, T. S., Colwell, R. R., Morris, P. J. (2012). Temperature regulation of virulence factors in the pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *ISME J* 6: 835-846.
- Klose, K. E., Weiss, D. S., Kustu, S. (1993). Glutamate at the site of phosphorylation of nitrogen-regulatory protein NTRC mimics aspartyl-phosphate and activates the protein. *J Mol Biol* 232: 67-78.
- Koebnik, R., Kruger, A., Thieme, F., Urban, A., Bonas, U. (2006). Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes. *J Bacteriol* 188: 7652-7660.
- Koo, J., Burrows, L. L., Howell, P. L. (2012). Decoding the roles of pilotins and accessory proteins in secretin escort services. *FEMS Microbiol Lett* 328: 1-12.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405: 914-919.
- Korotkov, K. V., Sandkvist, M. (2019). Architecture, function, and substrates of the type II secretion system. *EcoSal Plus* 8.
- Korotkov, K. V., Sandkvist, M., Hol, W. G. (2012). The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol* 10: 336-351.
- Kovacs, L. G., Balatti, P. A., Krishnan, H. B., Pueppke, S. G. (1995). Transcriptional organization and expression of *noIXWBTUV*, a locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *Mol Microbiol* 17: 923-933.
- Krause, A., Doerfel, A., Göttfert, M. (2002). Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 1228-1235.
- Krause, A., Doerfel, A., Schmid, C., Hennecke, H., Krishnan, H., Göttfert, M., Eds. (2002). The type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum* 110spc4. Nitrogen Fixation: Global Perspectives. Wallingford, UK, CABI Publishing, CAB International.
- Krehenbrink, M., Downie, J. A. (2008). Identification of protein secretion systems and novel secreted proteins in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *BMC Genomics* 9: 55.
- Krishnan, H. B. (2002). NoIX of *Sinorhizobium fredii* USDA257, a type III-secreted protein involved in host range determination, is localized in the infection threads of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) and soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) nodules. *J Bacteriol* 184: 831-839.
- Krishnan, H. B., Chen-Ian, K., Pueppke, S. G. (1995). Elaboration of flavonoid-induced proteins by the nitrogen-fixing soybean symbiont *Rhizobium fredii* is regulated by both *nodD1* and *nodD2*, and is dependent on the cultivar-specificity locus, *noIXWBTUV*. *Microbiology* 141: 2245-2251.
- Krishnan, H. B., Lorio, J., Kim, W. S., Jiang, G., Kim, K. Y., DeBoer, M., Pueppke, S. G. (2003). Extracellular proteins involved in soybean cultivar-specific nodulation are associated with pilus-like surface appendages and exported by a type III protein secretion system in *Sinorhizobium fredii* USDA257. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 617-625.
- Krol, J., Skorupska, A. (1997). Identification of genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* whose products are homologues to a family of ATP-binding proteins. *Microbiology* 143 (Pt 4): 1389-1394.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J. E., Aizawa, S. I. (1998). Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 280: 602-605.
- Lara-Tejero, M., Galan, J. E. (2019). The injectisome, a complex nanomachine for protein injection into mammalian cells. *EcoSal Plus* 8.
- Laus, M. C., Logman, T. J., Lamers, G. E., Van Brussel, A. A., Carlson, R. W., Kijne, J. W. (2006). A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Mol Microbiol* 59: 1704-1713.

- Lavander, M., Sundberg, L., Edqvist, P. J., Lloyd, S. A., Wolf-Watz, H., Forsberg, A. (2002). Proteolytic cleavage of the FlhB homologue YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for bacterial survival but not for type III secretion. *J Bacteriol* 184: 4500-4509.
- Lee, V. T., Schneewind, O. (2001). Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Dev* 15: 1725-1752.
- Lenders, M. H., Reimann, S., Smits, S. H., Schmitt, L. (2013). Molecular insights into type I secretion systems. *Biol Chem* 394: 1371-1384.
- Lenders, M. H., Weidtkamp-Peters, S., Kleinschrodt, D., Jaeger, K. E., Smits, S. H., Schmitt, L. (2015). Directionality of substrate translocation of the hemolysin A Type I secretion system. *Sci Rep* 5: 12470.
- Letoffe, S., Ghigo, J. M., Wandersman, C. (1994). Secretion of the *Serratia marcescens* HasA protein by an ABC transporter. *J Bacteriol* 176: 5372-5377.
- Li, R. F., Lu, G. T., Li, L., Su, H. Z., Feng, G. F., Chen, Y., He, Y. Q., Jiang, B. L., Tang, D. J., Tang, J. L. (2014). Identification of a putative cognate sensor kinase for the two-component response regulator HrpG, a key regulator controlling the expression of the hrp genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Environ Microbiol* 16: 2053-2071.
- Lidell, M. E., Hansson, G. C. (2006). Cleavage in the GDPH sequence of the C-terminal cysteine-rich part of the human MUC5AC mucin. *Biochem J* 399: 121-129.
- Lidell, M. E., Johansson, M. E., Hansson, G. C. (2003). An autocatalytic cleavage in the C-terminus of the human MUC2 mucin occurs at the low pH of the late secretory pathway. *J Biol Chem* 278: 13944-13951.
- Linhartova, I., Bumba, L., Masin, J., Basler, M., Osicka, R., Kamanova, J., Prochazkova, K., Adkins, I., Hejnova-Holubova, J., Sadilkova, L., Morova, J., Sebo, P. (2010). RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol Rev* 34: 1076-1112.
- Lohou, D., Lonjon, F., Genin, S., Vailliau, F. (2013). Type III chaperones & Co in bacterial plant pathogens: a set of specialized bodyguards mediating effector delivery. *Front Plant Sci* 4: 435.
- Lohou, D., Turner, M., Lonjon, F., Cazale, A. C., Peeters, N., Genin, S., Vailliau, F. (2014). HpaP modulates type III effector secretion in *Ralstonia solanacearum* and harbours a substrate specificity switch domain essential for virulence. *Mol Plant Pathol* 15: 601-614.
- Lopez-Baena, F. J., Vinardell, J. M., Perez-Montano, F., Crespo-Rivas, J. C., Bellogin, R. A., Espuny Mdel, R., Ollero, F. J. (2008). Regulation and symbiotic significance of nodulation outer proteins secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103. *Microbiology* 154: 1825-1836.
- Lorenz, C., Büttner, D. (2009). Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* 191: 1414-1428.
- Lorenz, C., Schulz, S., Wolsch, T., Rossier, O., Bonas, U., Büttner, D. (2008). HpaC controls substrate specificity of the *Xanthomonas* type III secretion system. *PLoS Pathog* 4: e1000094.
- Lorio, J. C., Kim, W. S., Krishnan, H. B. (2004). NopB, a soybean cultivar-specificity protein from *Sinorhizobium fredii* USDA257, is a type III secreted protein. *Mol Plant Microbe Interact.* 17: 1259-1268.
- Ma, A. T., McAuley, S., Pukatzki, S., Mekalanos, J. J. (2009). Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell Host Microbe* 5: 234-243.
- MacLean, A. M., Finan, T. M., Sadowsky, M. J. (2007). Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. *Plant Physiol* 144: 615-622.
- Majewski, D. D., Worrall, L. J., Hong, C., Atkinson, C. E., Vuckovic, M., Watanabe, N., Yu, Z., Strynadka, N. C. J. (2019). Cryo-EM structure of the homohexameric T3SS ATPase-central stalk complex reveals rotary ATPase-like asymmetry. *Nat Commun* 10: 626.
- Marie, C., Broughton, W. J., Deakin, W. J. (2001). Rhizobium type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Curr Opin Plant Biol.* 4: 336-342.
- Marie, C., Deakin, W. J., Ojanen-Reuhs, T., Diallo, E., Reuhs, B., Broughton, W. J., Perret, X. (2004). TtsI, a key regulator of *Rhizobium* species NGR234 is required for type III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 958-966.

- Marie, C., Deakin, W. J., Viprey, V., Kopcinska, J., Golinowski, W., Krishnan, H. B., Perret, X., Broughton, W. J. (2003). Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. *Mol Plant Microbe Interact.* 16: 743-751.
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D. R., Galan, J. E., Unger, V. M. (2004). Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* 306: 1040-1042.
- Maule, A. F., Wright, D. P., Weiner, J. J., Han, L., Peterson, F. C., Volkman, B. F., Silvaggi, N. R., Ulijasz, A. T. (2015). The aspartate-less receiver (ALR) domains: distribution, structure and function. *PLoS Pathog* 11: e1004795.
- McBroom, A. J., Kuehn, M. J. (2007). Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol Microbiol* 63: 545-558.
- Meier, V. M., Muschler, P., Scharf, B. E. (2007). Functional analysis of nine putative chemoreceptor proteins in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 189: 1816-1826.
- Meinhardt, L. W., Krishnan, H. B., Balatti, P. A., Pueppke, S. G. (1993). Molecular cloning and characterization of a sym plasmid locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *Mol Microbiol.* 9: 17-29.
- Meneses, N., Mendoza-Hernandez, G., Encarnacion, S. (2010). The extracellular proteome of *Rhizobium etli* CE3 in exponential and stationary growth phase. *Proteome Sci* 8: 51.
- Mole, B. M., Baltrus, D. A., Dangl, J. L., Grant, S. R. (2007). Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. *Trends Microbiol* 15: 363-371.
- Mongiardini, E. J., Parisi, G. D., Quelas, J. I., Lodeiro, A. R. (2016). The tight-adhesion proteins TadGEF of *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 are involved in cell adhesion and infectivity on soybean roots. *Microbiol Res* 182: 80-88.
- Moreira, L. M., Becker, J. D., Pühler, A., Becker, A. (2000). The *Sinorhizobium meliloti* ExpE1 protein secreted by a type I secretion system involving ExpD1 and ExpD2 is required for biosynthesis or secretion of the exopolysaccharide galactoglucan. *Microbiology* 146 (Pt 9): 2237-2248.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* 411: 948-950.
- Mousavi, S. A., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., Paulin, L., de Lajudie, P., Lindström, K. (2014). Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Syst Appl Microbiol* 37: 208-215.
- Mudgett, M. B. (2005). New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu Rev Plant Biol* 56: 509-531.
- Mudgett, M. B., Chesnokova, O., Dahlbeck, D., Clark, E. T., Rossier, O., Bonas, U., Staskawicz, B. J. (2000). Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13324-13329.
- Mudgett, M. B., Staskawicz, B. J. (1999). Characterization of the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* AvrRpt2 protein: demonstration of secretion and processing during bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol.* 32: 927-941.
- Myeni, S. K., Wang, L., Zhou, D. (2013). SipB-SipC complex is essential for translocon formation. *PLoS One* 8: e60499.
- Nguyen, H. P., Miwa, H., Kaneko, T., Sato, S., Okazaki, S. (2017). Identification of *Bradyrhizobium elkanii* genes involved in incompatibility with *Vigna radiata*. *Genes* 8.
- Niemann, G. S., Brown, R. N., Mushamiri, I. T., Nguyen, N. T., Taiwo, R., Stufkens, A., Smith, R. D., Adkins, J. N., McDermott, J. E., Heffron, F. (2013). RNA type III secretion signals that require Hfq. *J Bacteriol* 195: 2119-2125.
- Nivaskumar, M., Francetic, O. (2014). Type II secretion system: a magic beanstalk or a protein escalator. *Biochim Biophys Acta* 1843: 1568-1577.
- Noel, L., Thieme, F., Gabler, J., Büttner, D., Bonas, U. (2003). XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* 185: 7092-7102.
- Noel, L., Thieme, F., Nennstiel, D., Bonas, U. (2001). cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol* 41: 1271-1281.

- Noel, L., Thieme, F., Nennstiel, D., Bonas, U. (2002). Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. *J Bacteriol* 184: 1340-1348.
- Okamura, H., Hanaoka, S., Nagadoi, A., Makino, K., Nishimura, Y. (2000). Structural comparison of the PhoB and OmpR DNA-binding/transactivation domains and the arrangement of PhoB molecules on the phosphate box. *J Mol Biol* 295: 1225-1236.
- Okazaki, S., Kaneko, T., Sato, S., Saeki, K. (2013). Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 17131-17136.
- Okazaki, S., Okabe, S., Higashi, M., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S., Hashiguchi, M., Akashi, R., Gottfert, M., Saeki, K. (2010). Identification and functional analysis of type III effector proteins in *Mesorhizobium loti*. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 223-234.
- Okazaki, S., Tittabutr, P., Teulet, A., Thouin, J., Fardoux, J., Chaintreuil, C., Gully, D., Arrighi, J. F., Furuta, N., Miwa, H., Yasuda, M., Nouwen, N., Teumroong, N., Giraud, E. (2016). Rhizobium-legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS. *ISME J* 10: 64-74.
- Okazaki, S., Zehner, S., Hempel, J., Lang, K., Göttfert, M. (2009). Genetic organization and functional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii*. *FEMS Microbiol Lett* 295: 88-95.
- Oldroyd, G. E. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* 11: 252-263.
- Oldroyd, G. E., Downie, J. A. (2004). Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 566-576.
- Osicka, R., Prochazkova, K., Sulc, M., Linhartova, I., Havlicek, V., Sebo, P. (2004). A novel "clip-and-link" activity of repeat in toxin (RTX) proteins from gram-negative pathogens. Covalent protein cross-linking by an Asp-Lys isopeptide bond upon calcium-dependent processing at an Asp-Pro bond. *J Biol Chem* 279: 24944-24956.
- Park, D., Lara-Tejero, M., Waxham, M. N., Li, W., Hu, B., Galan, J. E., Liu, J. (2018). Visualization of the type III secretion mediated *Salmonella*-host cell interface using cryo-electron tomography. *Elife* 7.
- Parsot, C., Hamiaux, C., Page, A. L. (2003). The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol* 6: 7-14.
- Pawlowski, K., Sirrenberg, A. (2003). Symbiosis between *Frankia* and actinorhizal plants: root nodules of non-legumes. *Indian J Exp Biol* 41: 1165-1183.
- Perret, X., Freiberg, C., Rosenthal, A., Broughton, W. J., Fellay, R. (1999). High-resolution transcriptional analysis of the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol Microbiol* 32: 415-425.
- Pessi, G., Ahrens, C. H., Rehrauer, H., Lindemann, A., Hauser, F., Fischer, H. M., Hennecke, H. (2007). Genome-wide transcript analysis of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids in soybean root nodules. *Mol Plant Microbe Interact* 20: 1353-1363.
- Popa, C. M., Tabuchi, M., Valls, M. (2016). Modification of bacterial effector proteins inside eukaryotic host cells. *Front Cell Infect Microbiol* 6: 73.
- Popp, C., Ott, T. (2011). Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* 14: 458-467.
- Portaliou, A. G., Tsolis, K. C., Loos, M. S., Zorzini, V., Economou, A. (2016). Type III secretion: building and operating a remarkable nanomachine. *Trends Biochem Sci* 41: 175-189.
- Pueppke, S. G., Broughton, W. J. (1999). *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol Plant Microbe Interact* 12: 293-318.
- Puri, N., Jenner, C., Bennett, M., Stewart, R., Mansfield, J., Lyons, N., Taylor, J. (1997). Expression of *avrPphB*, an avirulence gene from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, and the delivery of signals causing the hypersensitive reaction in bean. *Mol Plant Microbe Interact*. 10: 247-256.
- Putker, F., Tommassen-van Boxtel, R., Stork, M., Rodriguez-Herva, J. J., Koster, M., Tommassen, J. (2013). The type II secretion system (Xcp) of *Pseudomonas putida* is active and involved in the secretion of phosphatases. *Environ Microbiol* 15: 2658-2671.
- Radics, J., Konigsmaier, L., Marlovits, T. C. (2014). Structure of a pathogenic type 3 secretion system in action. *Nat Struct Mol Biol* 21: 82-87.

- Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Jurkiewicz, A., Fukai, E., Quistgaard, E. M., Albrektsen, A. S., James, E. K., Thirup, S., Stougaard, J. (2007). LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. *EMBO J* 26: 3923-3935.
- Rivas, R., Velazquez, E., Willems, A., Vizcaino, N., Subba-Rao, N. S., Mateos, P. F., Gillis, M., Dazzo, F. B., Martinez-Molina, E. (2002). A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) druce. *Appl Environ Microbiol* 68: 5217-5222.
- Rodrigues, J. A., Lopez-Baena, F. J., Ollero, F. J., Vinardell, J. M., Espuny Mdel, R., Bellogin, R. A., Ruiz-Sainz, J. E., Thomas, J. R., Sumpton, D., Ault, J., Thomas-Oates, J. (2007). NopM and NopD are rhizobial nodulation outer proteins: identification using LC-MALDI and LC-ESI with a monolithic capillary column. *J Proteome Res.* 6: 1029-1037. Epub 2007 Jan 1024.
- Rodriguez-Navarro, D. N., Dardanelli, M. S., Ruiz-Sainz, J. E. (2007). Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol Lett* 272: 127-136.
- Roest, H. P., Mulders, I. H., Spaik, H. P., Wijffelman, C. A., Lugtenberg, B. J. (1997). A *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* locus not localized on the sym plasmid hinders effective nodulation on plants of the pea cross-inoculation group. *Mol Plant Microbe Interact* 10: 938-941.
- Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiho-Lassila, E. L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M., He, S. Y. (1997). Hrp pilus: an *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3459-3464.
- Rosenberg, E., Kushmaro, A., Kramarsky-Winter, E., Banin, E., Yossi, L. (2009). The role of microorganisms in coral bleaching. *ISME J* 3: 139-146.
- Rossier, O., Van den Ackerveken, G., Bonas, U. (2000). HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Mol Microbiol* 38: 828-838.
- Russell, A. B., Peterson, S. B., Mougous, J. D. (2014). Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nat Rev Microbiol* 12: 137-148.
- Russo, D. M., Williams, A., Edwards, A., Posadas, D. M., Finnie, C., Dankert, M., Downie, J. A., Zorreguieta, A. (2006). Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* 188: 4474-4486.
- Saad, M. M., Kobayashi, H., Marie, C., Brown, I. R., Mansfield, J. W., Broughton, W. J., Deakin, W. J. (2005). NopB, a type III secreted protein of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is associated with pilus-like surface appendages. *J Bacteriol.* 187: 1173-1181.
- Sadilkova, L., Osicka, R., Sulc, M., Linhartova, I., Novak, P., Sebo, P. (2008). Single-step affinity purification of recombinant proteins using a self-excising module from *Neisseria meningitidis* FrpC. *Protein Sci* 17: 1834-1843.
- Sana, T. G., Berni, B., Bleves, S. (2016). The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 and their effectors: Beyond bacterial-cell targeting. *Front Cell Infect Microbiol* 6: 61.
- Sanchez, C., Iannino, F., Deakin, W. J., Ugalde, R. A., Lepek, V. C. (2009). Characterization of the *Mesorhizobium loti* MAFF303099 type-three protein secretion system. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 519-528.
- Sanchez, C., Mercante, V., Babuin, M. F., Lepek, V. C. (2012). Dual effect of *Mesorhizobium loti* T3SS functionality on the symbiotic process. *FEMS Microbiol Lett* 330: 148-156.
- Sarma, A. D., Emerich, D. W. (2006). A comparative proteomic evaluation of culture grown vs nodule isolated *Bradyrhizobium japonicum*. *Proteomics* 6: 3008-3028.
- Satchell, K. J. (2011). Structure and function of MARTX toxins and other large repetitive RTX proteins. *Annu Rev Microbiol* 65: 71-90.
- Sauri, A., Soprova, Z., Wickstrom, D., de Gier, J. W., Van der Schors, R. C., Smit, A. B., Jong, W. S., Luirink, J. (2009). The Bam (Omp85) complex is involved in secretion of the autotransporter haemoglobin protease. *Microbiology* 155: 3982-3991.
- Schechter, L. M., Roberts, K. A., Jamir, Y., Alfano, J. R., Collmer, A. (2004). *Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a Cya translocation reporter. *J Bacteriol* 186: 543-555.

- Scherer, C. A., Cooper, E., Miller, S. I. (2000). The *Salmonella* type III secretion translocon protein SspC is inserted into the epithelial cell plasma membrane upon infection. *Mol Microbiol* 37: 1133-1145.
- Scheu, A. K., Economou, A., Hong, G. F., Ghelani, S., Johnston, A. W., Downie, J. A. (1992). Secretion of the *Rhizobium leguminosarum* nodulation protein NodO by haemolysin-type systems. *Mol Microbiol* 6: 231-238.
- Schirrmeister, J., Friedrich, L., Wenzel, M., Hoppe, M., Wolf, C., Göttfert, M., Zehner, S. (2011). Characterization of the self-cleaving effector protein NopE1 of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 193: 3733-3739.
- Schmeisser, C., Liesegang, H., Krysciak, D., Bakkou, N., Le Quere, A., Wollherr, A., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Pommerening-Roser, A., Flores, M., Palacios, R., Brenner, S., Gottschalk, G., Schmitz, R. A., Broughton, W. J., Perret, X., Strittmatter, A. W., Streit, W. R. (2009). *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. *Appl Environ Microbiol* 75: 4035-4045.
- Schraidt, O., Marlovits, T. C. (2011). Three-dimensional model of Salmonella's needle complex at subnanometer resolution. *Science* 331: 1192-1195.
- Schuldes, J., Rodriguez Orbegoso, M., Schmeisser, C., Krishnan, H. B., Daniel, R., Streit, W. R. (2012). Complete genome sequence of the broad-host-range strain *Sinorhizobium fredii* USDA257. *J Bacteriol* 194: 4483.
- Schulmeyer, K. H., Yahr, T. L. (2017). Post-transcriptional regulation of type III secretion in plant and animal pathogens. *Curr Opin Microbiol* 36: 30-36.
- Schultze, M., Kondorosi, A. (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet* 32: 33-57.
- Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C., Abe, A. (2001). Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11638-11643.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J. E., Innes, R. W. (2003). Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* 301: 1230-1233.
- Shao, F., Merritt, P. M., Bao, Z., Innes, R. W., Dixon, J. E. (2002). A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* 109: 575-588.
- Sheng, Z. Q., Hull, S. R., Carraway, K. L. (1990). Biosynthesis of the cell surface sialomucin complex of ascites 13762 rat mammary adenocarcinoma cells from a high molecular weight precursor. *J Biol Chem* 265: 8505-8510.
- Shiro, S., Kuranaga, C., Yamamoto, A., Sameshima-Saito, R., Saeki, Y. (2016). Temperature-dependent expression of NodC and community structure of soybean-nodulating Bradyrhizobia. *Microbes Environ* 31: 27-32.
- Skorpil, P., Saad, M. M., Boukli, N. M., Kobayashi, H., Ares-Orpel, F., Broughton, W. J., Deakin, W. J. (2005). NopP, a phosphorylated effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii*. *Mol Microbiol* 57: 1304-1317.
- Sohn, K. H., Zhang, Y., Jones, J. D. G. (2009). The *Pseudomonas syringae* effector protein, AvrRPS4, requires in planta processing and the KRVY domain to function. *Plant J* 57: 1079-1091.
- Sorg, J. A., Miller, N. C., Schneewind, O. (2005). Substrate recognition of type III secretion machines--testing the RNA signal hypothesis. *Cell Microbiol* 7: 1217-1225.
- Soto, P., Zhang, J., Carraway, K. L. (2006). Enzymatic cleavage as a processing step in the maturation of Muc4/sialomucin complex. *J Cell Biochem* 97: 1267-1274.
- Souza, R. C., del Rosario Quispe Saji, G., Costa, M. O., Netto, D. S., Lima, N. C., Klein, C. C., Vasconcelos, A. T., Nicolas, M. F. (2012). AtlasT4SS: a curated database for type IV secretion systems. *BMC Microbiol* 12: 172.
- Staehelein, C., Krishnan, H. B. (2015). Nodulation outer proteins: double-edged swords of symbiotic rhizobia. *Biochem J* 470: 263-274.

- Strom, M. S., Nunn, D. N., Lory, S. (1993). A single bifunctional enzyme, PilD, catalyzes cleavage and N-methylation of proteins belonging to the type IV pilin family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2404-2408.
- Subtil, A., Delevoye, C., Balana, M. E., Tastevin, L., Perrinet, S., Dautry-Varsat, A. (2005). A directed screen for chlamydial proteins secreted by a type III mechanism identifies a translocated protein and numerous other new candidates. *Mol Microbiol* 56: 1636-1647.
- Sugawara, M., Epstein, B., Badgley, B. D., Unno, T., Xu, L., Reese, J., Gyaneshwar, P., Denny, R., Mudge, J., Bharti, A. K., Farmer, A. D., May, G. D., Woodward, J. E., Medigue, C., Vallenet, D., Lajus, A., Rouy, Z., Martinez-Vaz, B., Tiffin, P., Young, N. D., Sadowsky, M. J. (2013). Comparative genomics of the core and accessory genomes of 48 *Sinorhizobium* strains comprising five genospecies. *Genome Biol* 14: R17.
- Sullivan, J. T., Trzebiatowski, J. R., Cruickshank, R. W., Gouzy, J., Brown, S. D., Elliot, R. M., Fleetwood, D. J., McCallum, N. G., Rossbach, U., Stuart, G. S., Weaver, J. E., Webby, R. J., De Bruijn, F. J., Ronson, C. W. (2002). Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J Bacteriol* 184: 3086-3095.
- Süß, C., Hempel, J., Zehner, S., Krause, A., Patschkowski, T., Göttfert, M. (2006). Identification of genistein-inducible and type III-secreted proteins of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Biotechnol* 126: 69-77.
- Sutton, J. M., Lea, E. J., Downie, J. A. (1994). The nodulation-signaling protein NodO from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* forms ion channels in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91: 9990-9994.
- Sutton, J. M., Peart, J., Dean, G., Downie, J. A. (1996). Analysis of the C-terminal secretion signal of the *Rhizobium leguminosarum* nodulation protein NodO; a potential system for the secretion of heterologous proteins during nodule invasion. *Mol Plant Microbe Interact* 9: 671-680.
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., de Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., Dreyfus, B. (2001). Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J Bacteriol* 183: 214-220.
- Takaya, A., Takeda, H., Tashiro, S., Kawashima, H., Yamamoto, T. (2019). Chaperone-mediated secretion switching from early to middle substrates in the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Biol Chem* 294: 3783-3793.
- Tamano, K., Aizawa, S., Katayama, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwae, A., Nagai, S., Sasakawa, C. (2000). Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *Embo J* 19: 3876-3887.
- Tampakaki, A. P. (2014). Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria. *Front Plant Sci* 5: 114.
- Tang, X., Xiao, Y., Zhou, J. M. (2006). Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 1159-1166.
- Thanassi, D. G., Stathopoulos, C., Karkal, A., Li, H. (2005). Protein secretion in the absence of ATP: the autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of gram-negative bacteria *Mol Membr Biol* 22: 63-72.
- Thomas, S., Holland, I. B., Schmitt, L. (2014). The Type 1 secretion pathway - the hemolysin system and beyond. *Biochim Biophys Acta* 1843: 1629-1641.
- Trujillo, M. E., Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A. M., Rivas, R., Ludena, D., Mateos, P. F., Martinez-Molina, E., Velazquez, E. (2005). Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 71: 1318-1327.
- Tsukui, T., Eda, S., Kaneko, T., Sato, S., Okazaki, S., Kakizaki-Chiba, K., Itakura, M., Mitsui, H., Yamashita, A., Terasawa, K., Minamisawa, K. (2013). The type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum* USDA122 mediates symbiotic incompatibility with Rj2 soybean plants. *Appl Environ Microbiol* 79: 1048-1051.
- Tsurumaru, H., Hashimoto, S., Okizaki, K., Kanesaki, Y., Yoshikawa, H., Yamakawa, T. (2015). A putative type III secretion system effector encoded by the *ma20_12780* gene in *Bradyrhizobium japonicum* Is-34 causes incompatibility with Rj4 genotype soybeans. *Appl Environ Microbiol* 81: 5812-5819.

- Uchiumi, T., Ohwada, T., Itakura, M., Mitsui, H., Nukui, N., Dawadi, P., Kaneko, T., Tabata, S., Yokoyama, T., Tejima, K., Saeki, K., Omori, H., Hayashi, M., Maekawa, T., Sriprang, R., Murooka, Y., Tajima, S., Simomura, K., Nomura, M., Suzuki, A., Shimoda, Y., Sioya, K., Abe, M., Minamisawa, K. (2004). Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome. *J Bacteriol* 186: 2439-2448.
- Van Gijsegem, F., Vasse, J., De Rycke, R., Castello, P., Boucher, C. (2002). Genetic dissection of *Ralstonia solanacearum* hrp gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for Hrp pilus assembly. *Mol Microbiol* 44: 935-946.
- Vergunst, A. C., van Lier, M. C., den Dulk-Ras, A., Stuve, T. A., Ouwehand, A., Hooykaas, P. J. (2005). Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 832-837.
- Vidal-Dupiol, J., Dheilly, N. M., Rondon, R., Grunau, C., Cosseau, C., Smith, K. M., Freitag, M., Adjeroud, M., Mitta, G. (2014). Thermal stress triggers broad *Pocillopora damicornis* transcriptomic remodeling, while *Vibrio coralliilyticus* infection induces a more targeted immuno-suppression response. *PLoS One* 9: e107672.
- Vidal-Dupiol, J., Ladriere, O., Meistertzheim, A. L., Foure, L., Adjeroud, M., Mitta, G. (2011). Physiological responses of the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* to bacterial stress from *Vibrio coralliilyticus*. *J Exp Biol* 214: 1533-1545.
- Vinardell, J. M., Acosta-Jurado, S., Zehner, S., Gottfert, M., Becker, A., Baena, I., Blom, J., Crespo-Rivas, J. C., Goesmann, A., Jaenicke, S., Krol, E., McIntosh, M., Margaret, I., Perez-Montano, F., Schneiker-Bekel, S., Serrania, J., Szczepanowski, R., Buendia, A. M., Lloret, J., Bonilla, I., Puhler, A., Ruiz-Sainz, J. E., Weidner, S. (2015). The *Sinorhizobium fredii* HH103 Genome: A Comparative Analysis With *S. fredii* Strains Differing in Their Symbiotic Behavior With Soybean. *Mol Plant Microbe Interact* 28: 811-824.
- Vinardell, J. M., Acosta-Jurado, S., Zehner, S., Göttfert, M., Becker, A., Baena, I., Blom, J., Crespo-Rivas, J. C., Goesmann, A., Jaenicke, S., Krol, E., McIntosh, M., Margaret, I., Perez-Montano, F., Schneiker-Bekel, S., Serrania, J., Szczepanowski, R., Buendia, A. M., Lloret, J., Bonilla, I., Pühler, A., Ruiz-Sainz, J. E., Weidner, S. (2015). The *Sinorhizobium fredii* HH103 genome: A comparative analysis with *S. fredii* Strains differing in their symbiotic behavior with soybean. *Mol Plant Microbe Interact* 28: 811-824.
- Viprey, V., Del Greco, A., Golinowski, W., Broughton, W. J., Perret, X. (1998). Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol Microbiol* 28: 1381-1389.
- Voorter, C. E., de Haard-Hoekman, W. A., van den Oetelaar, P. J., Bloemendal, H., de Jong, W. W. (1988). Spontaneous peptide bond cleavage in aging alpha-crystallin through a succinimide intermediate. *J Biol Chem* 263: 19020-19003.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L. F., Filloux, A. (2001). Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *Embo J* 20: 6735-6741.
- Walker, S. A., Downie, J. A. (2000). Entry of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* into root hairs requires minimal Nod factor specificity, but subsequent infection thread growth requires *nodO* or *nodE*. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 754-762.
- Wassem, R., Kobayashi, H., Kambara, K., Le Quere, A., Walker, G. C., Broughton, W. J., Deakin, W. J. (2008). TtsI regulates symbiotic genes in *Rhizobium* species NGR234 by binding to tts boxes. *Mol Microbiol* 68: 736-748.
- Watt, S. A., Wilke, A., Patschkowski, T., Niehaus, K. (2005). Comprehensive analysis of the extracellular proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100. *Proteomics* 5: 153-167.
- Webb, B. A., Hildreth, S., Helm, R. F., Scharf, B. E. (2014). *Sinorhizobium meliloti* chemoreceptor McpU mediates chemotaxis toward host plant exudates through direct proline sensing. *Appl Environ Microbiol* 80: 3404-3415.
- Weber, E., Koebnik, R. (2005). Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Bacteriol* 187: 6175-6186.
- Wei, M., Takeshima, K., Yokoyama, T., Minamisawa, K., Mitsui, H., Itakura, M., Kaneko, T., Tabata, S., Saeki, K., Omori, H., Tajima, S., Uchiumi, T., Abe, M., Ishii, S., Ohwada, T. (2010). Temperature-

- dependent expression of type III secretion system genes and its regulation in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 628-637.
- Wei, M., Yokoyama, T., Minamisawa, K., Mitsui, H., Itakura, M., Kaneko, T., Tabata, S., Saeki, K., Omori, H., Tajima, S., Uchiumi, T., Abe, M., Ohwada, T. (2008). Soybean seed extracts preferentially express genomic loci of *Bradyrhizobium japonicum* in the initial interaction with soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *DNA Res* 15: 201-214.
- Wells, T. J., Tree, J. J., Ulett, G. C., Schembri, M. A. (2007). Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface. *FEMS Microbiol Lett* 274: 163-172.
- Wengelnik, K., Van den Ackerveken, G., Bonas, U. (1996). HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol Plant Microbe Interact* 9: 704-712.
- Wenzel, M., Friedrich, L., Göttfert, M., Zehner, S. (2010). The type III-secreted protein NopE1 affects symbiosis and exhibits a calcium-dependent autocleavage activity. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 124-129.
- Xin, D. W., Liao, S., Xie, Z. P., Hann, D. R., Steinle, L., Boller, T., Staehelin, C. (2012). Functional analysis of NopM, a novel E3 ubiquitin ligase (NEL) domain effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *PLoS Pathog* 8: e1002707.
- Yamamoto, K., Hirao, K., Oshima, T., Aiba, H., Utsumi, R., Ishihama, A. (2005). Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 280: 1448-1456.
- Yip, C. K., Kimbrough, T. G., Felise, H. B., Vuckovic, M., Thomas, N. A., Pfuetzner, R. A., Frey, E. A., Finlay, B. B., Miller, S. I., Strynadka, N. C. (2005). Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature* 435: 702-707.
- York, G. M., Walker, G. C. (1997). The *Rhizobium meliloti* *exoK* gene and *prsD/prsE/exsH* genes are components of independent degradative pathways which contribute to production of low-molecular-weight succinoglycan. *Mol Microbiol* 25: 117-134.
- Zarivach, R., Vuckovic, M., Deng, W., Finlay, B. B., Strynadka, N. C. (2007). Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol* 14: 131-137.
- Zehner, S., Schober, G., Wenzel, M., Lang, K., Göttfert, M. (2008). Expression of the *Bradyrhizobium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated *tts* box promoter. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 1087-1093.
- Zhang, L., Chen, X. J., Lu, H. B., Xie, Z. P., Staehelin, C. (2011). Functional analysis of the type 3 effector nodulation outer protein L (NopL) from *Rhizobium* sp. NGR234: symbiotic effects, phosphorylation, and interference with mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 286: 32178-32187.
- Zhou, X., Teper, D., Andrade, M. O., Zhang, T., Chen, S., Song, W. Y., Wang, N. (2018). A phosphorylation switch on lon protease regulates bacterial type III secretion system in host. *MBio* 9.

Anhang

Tabellen zu Datenanalysen (unveröffentlichte Daten)

Tabelle A1: Analyse des Genoms von *Bja110* mit MOTIF search (www.genome.jp). Aufgeführt sind die putativen Proteine, die mindestens einmal das Sequenzmotiv GGxGxDxxx besitzen.

Name	vermutete Funktion	PSortB Ergebnis
Blr0274	hypothetical protein	Signalpeptid
Blr0528	oxidoreductase	
Bll0735	organic hydroperoxide resistance protein	
Bll0766	2-hydroxyacid dehydrogenase	
Blr0944	hypothetical protein	Signalpeptid
Blr0982	acyl-CoA dehydrogenase	
Blr1364	endo-1,3-1,4-Beta-glycanase	Signalpeptid
Bll2373	hypothetical protein	
Bll2599	two-component hybrid sensor and regulator	
Blr2626	dnaJ; chaperone protein	
Blr3004	shc; squalene-hopene cyclase	
Bll3109	Ca binding protein	extrazellulär
Blr3166	gcl; glyoxylate carboligase (EC:4.1.1.47)	
Blr3168	oxidoreductase	
Blr3226	ribitol kinase	
Bll3299	acyl-CoA dehydrogenase	
Bll3563	hypothetical protein	extrazellulär
Bll3714	hypothetical protein	extrazellulär
Blr3812	hypothetical protein	
Blr3815	cation-transporting ATPase (EC:3.6.3.-)	
Blr4068	hypothetical protein	Signalpeptid
Blr4088	gmk; guanylate kinase (EC:2.7.4.8)	
Bll4090	hypothetical protein	extrazellulär
Blr4125	garS; phosphoribosylaminoimidazole synthetase (EC:6.3.3.1)	
Bll4200	esterase	extrazellulär
Bll4251	MFS permease	
Bll4571	nirA; ferredoxin-nitrite reductase (EC:1.7.7.1)	
Blr4727	gid; tRNA (uracil-5-)-methyltransferase Gid	
Bll4757	arginyl-tRNA synthetase	
Bll4991	isomerase	
Bll5026	hppA; membrane-bound proton-translocating pyrophosphatase	
Bll5461	hypothetical protein	
Bll5471	hypothetical protein	
Bll5566	sorbitol dehydrogenase (EC:1.1.1.14)	
Blr5680	rpe; ribulose-phosphate 3-epimerase	
Bll5710	hypothetical protein	
Blr5821	hypothetical protein	extrazellulär
Blr5895	hypothetical protein	
Blr6022	general secretion pathway protein D	
Bll6027	protease	extrazellulär
Bll6035	hypothetical protein	extrazellulär
Bll6506	DO-like serine protease	Signalpeptid
Blr6554	hypothetical protein	Signalpeptid
Blr6969	hypothetical protein	extrazellulär
Blr7003	two-component response regulator	
Bll7673	hypothetical protein	extrazellulär
Bll7882	hypothetical protein	
Bll7952	selenium-binding protein	
Blr7980	hypothetical protein	
Bll8013	phosphoribosylanthranilate isomerase (EC:5.3.1.24)	
Bll8036	hypothetical protein	
Bll8212	hypothetical protein	

Tabelle A2: Sequenzhomologie zu NopA aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
NopA <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	63	-	-	MAVDNVGGNGGAAGAQQTGDGSGFQNMMAEFERSQK VQAQAVAMRRITTELSSEKKVADERVQ
NopA <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	63	100 %	100 %	ref WP_014497948.1
NopA2 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	63	87 %	92 %	ref WP_014498042.1
NopA <i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM1743	63	98 %	100 %	ref WP_027571392.1
NopA <i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 285	63	92 %	100%	ref WP_006615058.1
NopA <i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 61	77	49 %	63 %	emb CAQ57567.1
NopA <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	71	49 %	68 %	ref WP_010875096.1
NopA <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	71	49 %	68 %	gb AAV54250.1
NopA2 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110	63	87 %	92 %	MAVNSVGGNGAAPATQQTQDAGFQNMMAEFERSQK VQAQAVAMRRITTELSSEKKVADERVQ

Tabelle A3: Sequenzhomologie zu NopB aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
NopB (Blr1812) <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	170	-	-	MTHSMLLGATPIPPSSAGCSGACSPAAAGEQARFEQSL AQVAPNQGSAFPTANPPAATPPILEVQRTNVLASPPGD RILQTLGSIYQGRAVSPAIAPAVNVGVQPGPAAQPLPA DNAGANAAVKPVGADFESMMTNLRDVKDQVQVSLVS KGTSAVSSSLNKLISAG
NopB <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	170 101	100 99	100 100	gb AGH09934.1 ref WP_014497941.1
NopB <i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM1743	166	79	84	ref WP_027571383.1
NopB <i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 61	172	65	75	emb CAQ57551.1
NopB <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	164	42	57	ref NP_444157.1
NopB <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	95 164	47 43	62 57	emb CCE98792.1 gb AAU85365.1
NoIB <i>Sinorhizobium fredii</i> USDA 257	164	43	57	ref YP_006529150.1
NopB (mlr8763) <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	167	42	59	dbj BAB52648.1

Tabelle A4: Sequenzhomologie zu NopC aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
<i>B. japonicum</i> USDA 110 Bsl1808	67 (trunc)	-	-	ref NP_768448.1 MDTGAADIAATAPDAGTNTDNAANGGDNASHAALLQRA FEKALVAVATQVISDTQSDMDDAMSELDDG gb AAG60792.1 AF322012_97
id211	91	-	-	MQAAPASTKGIGHLAAPLSEFYDMDTGAADIAATAPD AGTNTDNAANGGDNASHAALLQRAFEKALVAVATQVIS DTQSDMDDAMSELDDG ref NP_768292.1
Bsl1652	67	72 %	83 %	ref NP_768292.1
NopC <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	67	100	100	ref YP_005612849.1
	67	72	83%	ref YP_005613005.1
NopC <i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM1743	67	87	89	ref WP_027571389.1
NopC <i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 61	95	43 %	60 %	emb CAQ57566.1 MRISSSAAGHLSDSLHATGGGKGRAPGEHDDHGQS HGAGAPLNGGASGPDADSQAAMQAFNVALGAVAM QFVSSAMGRFDDAMAETEEDS
NopC <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	98	44	63	ref YP_003097668.1
NopC <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	98	44	63	gb AAY33494.1
NoIC <i>Sinorhizobium fredii</i> USDA 257	98	44	63	ref YP_006529165.1

Tabelle A5: Sequenzhomologie zu NopD (Blr1693) aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
NopD (Blr1693) <i>B. japonicum</i> USDA 110	1716	-	-	BAC46958.1 ref NP_768333.1
Blr8244	1441	90 %	92 %	dbj BAC53509.1
Blr1705	1441	60 %	67 %	ref NP_768345.1
NopD (BJ6T_88360) <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	1441	90 %	92 %	ref YP_005613666.1
(BJ6T_81260)	919	99 %	99 %	ref YP_005612960.1
NopD <i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM1743	292	53 %	63 %	ref WP_027577712.1
NopD <i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 61	1595	97 %	97 %	ref WP_018273905.1
hypothetical <i>B. japonicum</i> ORS285	339	58 %	69 %	ref WP_006612273.1 emb CCD86932.1
BRAO285_2120003	1200			emb CCD86954.1
NopD (SFHH103_04358) (psfHH103d_287) <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	1318	84 %	86 %	ref YP_006575379.1
Mlr6316 <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	1748	50 % partial 250 aa of the C-terminus	60 % partial	ref NP_106844.1
Msi059 <i>Mesorhizobium loti</i> R7A	1798	51 % partial 250 aa of the C-terminus	60 % partial	emb CAD31464.1
XopD <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (Canonne et al. 2012)	801	29 % partial of 120 C- terminal AA	44 % partial	gb AEU04524.1
XopD <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 85-10	760	33 % partial of 102 C- terminal aa	46 % partial	DAA34040.1

Tabelle A6: Sequenzhomologie zu Blr8244 aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
Blr8244 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	1441	-	-	ref NP_774884.1
Blr1693	1716	90 % (1402 aa)	92 %	ref NP_768333.1
BJ6T_88360 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	1441	100	100	ref YP_005613666.1
hypothetical protein <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1595	85 % (1072)	88 %	ref WP_018273905.1
SFHH103_04358 <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	1318	82 % (916 aa)	85 %	ref YP_006575379.1
BJ6T_81260 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	931	68 % (724 aa)	77 %	ref YP_005612960.1
Blr1705 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	1441	60 % (509 aa)	67 %	ref NP_768345.1
BJ6T_81140 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	1225	56 % (542 aa)	63 %	ref YP_005612948.1

Tabelle A7: Sequenzhomologie zu Blr1705 aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
Blr1705 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	1441	-	-	ref NP_768345.1
BlI8244 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	1441	60 % (508 aa)	67	ref NP_774884.1
Blr1693 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	1716	60 % (508 aa)	67 %	ref NP_768333.1
BJ6T_88360 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	1441	60 % (508 aa)	67 %	ref YP_005613666.1
SFHH103_04358 <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	1318	51 % (760 aa)	57 %	ref YP_006575379.1
BJ6T_81140 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	1225	90 % (1034)	90 %	ref YP_005612948.1
USDA257_c24300 <i>Sinorhizobium fredii</i> USDA 257	2562	30 % (73 aa)	38 %	ref YP_006397763.1
deaminase <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	441	31 % (81 aa)	37 %	ref YP_002823278.1

Tabelle A8: Sequenzhomologie zu NopE1 aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
NopE1 <i>B. japonicum</i> USDA 110	484	-	-	BAC47071.1
NopE2 <i>B. japonicum</i> USDA 110	512	76	81	ref NP_768289.1
BJ6T_80170 <i>B. japonicum</i> USDA 6	484	99	99	dbj BAL13263.1
BJ6T_81740	512	76	81	ref YP_005613007.1
hypothetical protein <i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM1743	471	86	89	ref WP_027571390.1
hypothetical protein <i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 285	482	79	87	emb CCD88705.1
hypothetical protein <i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 61	475	66	74	ref WP_028350680.1
MdcE <i>Bradyrhizobium</i> sp. LMJC	427	43 (51/119)	57	ANU04584

Tabelle A9: Sequenzhomologie zu NopF aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
NopF (bII1862) <i>B. japonicum</i> USDA 110	180	-	-	ref WP_011084668.1
NopAG (bII8244)				
NopAG <i>B. japonicum</i> USDA 6	180	100	100	gb AGH09963.1
BJ6T_88790	179	100	100	ref YP_005613709.1
HopBG1 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> str. ES4326	144	44	65	gb ADQ74901.1
PMA4326_30242 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> str. ES4326	102	48	67	gb EGH63103.1
acetyltransferase GNAT family <i>Bacillus subtilis</i> E1	159	26	50	emb CCU60898.1

Tabelle A10: Sequenzhomologie zu NopH aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
NopH (bl1804= id199) <i>B. japonicum</i> USDA110	102	-	-	BAC47069.1
BJ6T_80190 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	102	100	100	ref YP_005612853.1
NopH <i>B.japonicum</i> USDA122	102	100	100	dbj BAM84095.1
hypothetical protein <i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM1743	102	87	93	ref WP_027571391.1
hypothetical protein <i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 285	102	69	74	ref WP_006615059.1
hypothetical protein <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	95	49	63	ref WP_028350679.1
DnaJ-like protein DjIA endosymbiont of <i>Riftia pachyptila</i> (vent Ph05)	267	40 over N-terminal 50 aa	54	gb EGV52336.1
DnaJ like chaperone protein endosymbiont of unidentified scaly snail isolate Monju	269	41	50	dbj BAN69984.1
DnaJ domain protein <i>Bizonia argentinensis</i> JUB59	254	51 over N-terminal 35 aa	62	gb EGV43820.1
Rleg10DRAFT_4125 <i>Rhizobium leguminosarum</i>	175	57 only N-terminal 18 aa	67	ref WP_003568763.1

Tabelle A11: Sequenzhomologie zu NopL aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
NopL / Bl1810 id213 <i>B. japonicum</i> USDA110	167	-	-	ref WP_011084618.1
BJ6T_80130 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	167	99 %	99 %	ref YP_005612847.1
NopL <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	249	47 % (171 aa)	55 %	emb CAQ57553.1
NopL <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	338	36 % (168 aa)	48 %	ref YP_006575344.1
NopL <i>Sinorhizobium fredii</i> USDA 257	338	36 % (168 aa)	48 %	ref YP_006529139.1
Y4xL <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	338	36 % (168 aa)	48 %	gb AAL98685.1

Tabelle A12: Sequenzhomologie zu NopM aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
Blr1676 <i>B. japonicum</i> USDA110	620	-	-	ref NP_768316.1
Blr1904	585	48 % (574 aa)	61 %	ref NP_768544.1
ID431	581	48 % (574 aa)	61 %	gb AAG60884.1 AF322013.3
NopM1-2	357	58 % (372 aa)	72 %	gb AGH10028.1
y4fR-like protein <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110	229	97 %	97 %	gb AAM12357.1
BJ6T_81450 /nopM1 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	620	100 %	100 %	ref YP_005612979.1
NopM <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	610	48 %	58 %	emb CAQ57580.1
conserved hypothetical protein <i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS285	812	47 % (633 aa)	58 %	emb CCD89724.1
SFHH103_04792 <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	581	45 % (630 aa)	58 %	ref YP_006575801.1
putative E3 ubiquitin-protein ligase <i>Sinorhizobium fredii</i> USDA 257	581	45 % (630 aa)	58 %	ref YP_006529325.1
BJ6T_78970 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	581	48 % (574 aa)	61 %	ref YP_005612731.1
NopM <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	546	48 % (552 aa)	59 %	ref NP_443862.1
E3 ubiquitin--protein ligase <i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM1743	581	46 % (627 aa)	58 %	ref WP_027577618.1
conserved hypothetical protein similar to y4fR <i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 285	340	55 % (355 aa)	70 %	emb CCD89713.1
ipaH3, SlrP <i>Yersinia pestis</i>	565	41 % (552 aa)	53 %	ref WP_002414724.1 ref WP_002379993.1
YopM	618	41 % (552 aa)	53 %	gb EDR50659.1 ref WP_002211637.1

<i>Yersinia pestis</i> biovar <i>Antiqua</i> str. B42003004	626			
invasion plasmid antigen <i>Shigella flexneri</i>	565	37 % (588 aa)	54 %	ref WP_010921637.1

Tabelle A13: Sequenzhomologie zu NopM2 aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
Blr1904 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	585	-	-	ref NP_768544.1
Blr1676	620	47 %	60 %	ref NP_768316.1
NopM1-2	357	51 % (350 aa)	67 %	gb AGH10028.1
BJ6T_78970 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	581	99 %	99 %	ref YP_005612731.1
BJ6T_81450 /nopM1 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	620	47 %	60 %	ref YP_005612979.1
E3 ubiquitin--protein ligase <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	579	88 %	92 %	ref WP_028350662.1
NopM <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	610	53 %	66 %	emb CAQ57580.1
SFHH103_04792 <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	581	93 %	96 %	ref YP_006575801.1
putative E3 ubiquitin-protein ligase <i>Sinorhizobium fredii</i> USDA 257	581	93 %	96 %	ref YP_006529325.1
NopM <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	546	55 % (460 aa)	66 %	ref NP_443862.1
E3 ubiquitin--protein ligase <i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM1743	581	88 %	92 %	ref WP_027577618.1
Leucine-rich repeat protein <i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 285	812	47 % (602 aa)	60 %	emb CCD89724.1
YopM, SlrP <i>Yersinia pestis</i>	618	38 % (587 aa)	52 %	gb EDR50659.1 ref WP_002211637.1 ref WP_029791963.1
SlrP <i>Salmonella enterica</i>	509	37 % (509 aa)	50 %	ref WP_023206969.1

Tabelle A14: Sequenzhomologie zu NopP1 aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
Blr1752 /id84 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	244	-	-	dbj BAC47017.1
BJ6T_80680 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	244	99 %	99 %	ref YP_005612902.1
hypothetical protein <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	287	63 % (252 aa)	76 %	ref WP_028336719.1
RHECNPAF_715002 <i>Rhizobium etli</i> CNPAF512	295	54 % 241	68 %	gb EGE56318.1
RHECIAT_PB0000238 <i>Rhizobium etli</i> CIAT 652	295	54 % (241 aa)	66 %	ref YP_001984497.1
hypothetical protein <i>Rhizobium leguminosarum</i>	295	54 % (241 aa)	66 %	ref WP_029875558.1
NopP <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	285	50 % (235 aa)	64 %	ref YP_005191420.1
ORF3 <i>Rhizobium leguminosarum</i>	295	51 % (241 aa)	63 %	gb AAB47010.1
NopP <i>Mesorhizobium ciceri</i>	269	51 % (206 aa)	67 %	ref WP_027038898.1
NopP <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	271	48 % (231 aa)	63 %	ref NP_444168.1
SFHH103_04301 <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	236	48 % (231 aa)	61 %	ref YP_006575322.1
NopP <i>Sinorhizobium fredii</i> USDA 257	270	47 % (231 aa)	62 %	ref YP_006529162.1
NopP <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	275	46 % (227 aa)	59 %	ref WP_028338116.1

Tabelle A15: Sequenzhomologie zu NopP2 aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
Bll1797 /ID185 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	140	-	-	ref NP_768437.1
BJ6T_80270 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	140	100 %	100 %	ref YP_005612861.1
hypothetical protein <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	294	64 % (145 aa)	74 %	ref WP_028168943.1
hypothetical protein <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	285	62 % (144)	74 %	ref WP_028350672.1
hypothetical protein <i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM1743	295	63 % (128 aa)	76 %	ref WP_027576993.1
hypothetical protein <i>Rhizobium etli</i>	285	56 % (140)	68 %	ref WP_020923440.1
NopP <i>Sinorhizobium fredii</i> USDA 257	270	59 % (115 aa)	70 %	ref YP_006529162.1
NopP <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	271	59 % (115 aa)	70 %	ref NP_444168.1
SFHH103_04301 <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	236	58 % (115 aa)	70 %	ref YP_006575322.1
NopP <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	270	58 % (115 aa)	70 %	gb AA33495.1
RHECNPAF_715002 <i>Rhizobium etli</i> CNPAF512	295	60 % (108 aa)	72 %	gb EGE56318.1
hypothetical protein <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	287	52 % (137 aa)	67 %	ref WP_028350658.1
Y4yP <i>Sinorhizobium fredii</i> USDA257	270	56 % (115 aa)	66 %	gb AAL98702.1
NopP <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	275	50 % (131 aa)	63 %	ref WP_028338116.1
NopP <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	285	49 % (122 aa)	66 %	ref YP_005191420.1
MULTISPECIES: hypothetical protein <i>Bradyrhizobium</i> Bll1858 /id322 (USDA110) BJ6T_79670 (USDA 6)	127	47 %	62 %	ref WP_011084664.1
blr1752 / id84 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	244	50 % (113 aa)	67 %	dbj BAC47017.1 gb AAG60738.1 AF322012_43
BJ6T_80680 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	244	50 % (113 aa)	67 %	ref WP_014497970.1 ref YP_005612902.1

Tabelle A16: Sequenzhomologie zu Bll1858 aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
Bll1858 /id322 <i>B. japonicum</i> USDA110	127	-	-	BAC47123.1
Blr1752 / id84	277	46	60 %	gb AAG60738.1 AF322012_43
BJ6T_79670 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	127	100 %	100 %	ref YP_005612801.1
NopP <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	275	61 % (133 %)	70 %	ref WP_028338116.1
NopP <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	271	59 % 111 aa	67 %	ref NP_444168.1
NopP <i>Sinorhizobium fredii</i> USDA257	270	59 % 111 aa	67 %	ref YP_006529162.1
SFHH103_04301 <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	236	58 % 111 aa	67 %	ref YP_006575322.1
NopP <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	285	50 % 105 aa	65 %	ref YP_005191420.1
RHECNPAF_715002 <i>Rhizobium etli</i> CNPAF512	295	56 % 123 aa	65 %	gb EGE56318.1
RHECIAT_PB0000238 <i>Rhizobium etli</i> CIAT 652	295	55 126 aa	63 %	ref YP_001984497.1
hypothetical protein <i>Rhizobium</i> <i>leguminosarum</i>	295	55 % 126 aa	62 %	ref WP_029875558.1
MULTISPECIES <i>Bradyrhizobium</i> Bll1797, id185, BJ6T_80270	140	47 % 131 aa	62 %	ref WP_011084606.1

Tabelle A17: Sequenzhomologie zu Bll1798 aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
Bll1798 / id186 <i>B. japonicum</i> USDA110	140	-	-	gi 27350051 dbj BAC47063.1
id84	277	33 % (139 aa)	44 %	gb AAG60738.1 AF322012_43
BJ6T_80260 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	140	100 %	100 %	ref YP_005612860.1
NopAH <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA123	140	99 %	99 %	gb AGH10021.1
hypothetical protein <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	294	43 % 127 aa	57 %	ref WP_028168943.1
hypothetical protein <i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM1743	295	32 125	49	ref WP_027576993.1
NopP <i>Sinorhizobium fredii</i> USDA 257	270	33 % 112	48 %	ref YP_006529162.1
NopP <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	271	32 112 aa	48	ref NP_444168.1
NopP <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	270	33 % 112	48 %	gb AA33495.1
NopP <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	285	30 % (80 aa)	51 %	ref YP_005191420.1

Tabelle A18: Sequenzhomologie zu NopT aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
NopT Blr2140 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110	271	-	-	BAC47405.1
Blr2058 / id797	298	48 % 282aa	62 %	ref NP_768698.1
BJ6T_77100 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	271	100 %	100 %	ref YP_005612543.1
peptidase C58 <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	292	63 % 296 aa	71 %	ref WP_028167598.1
NopT <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	261	59 % 270 aa	71 %	ref NP_444174.1
yopT-like y4zC <i>Sinorhizobium fredii</i> USDA 257	205	66 % 200 aa	79 %	ref YP_006529176.1
SFHH103_04285 <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	150	63 % 152 aa	78 %	ref YP_006575308.1
AvrPphB putative peptidase <i>Acidovorax</i> <i>citrulli</i> AAC00-1	188	50 % 191 aa	68 %	gb ABM30699.1
BJ6T_77970 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	171	50 % 155 aa	68 %	ref YP_005612630.1
AvrPphB <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	188	33 % 172 aa	49 %	pdb 1UKF A
AvrPphB/ AvrPph3 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	267	32 % 183 aa	49 %	sp Q52430.1 AVRP3_PSESH
HopAW1 <i>Pseudomonas avellanae</i> BPIC 631	218	25 % 166	45 %	gb EKG33615.1
MULTISPECIES: HopAW1 <i>Pseudomonas syringae</i> group	218	25 % 166 aa	45 %	ref WP_004666980.1
RipT <i>Ralstonia solanacearum</i>	228	27 % (176 aa)	40 %	ref WP_013210582.1

Tabelle A19: Sequenzhomologie zu NopT2 aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
Blr2058 /id797 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	298	-	-	ref NP_768698.1
Blr2140	271	49 % 282 aa	63 %	ref NP_768780.1
BJ6T_77970 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	171	100 %	100 %	ref YP_005612630.1
peptidase C58 <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	276	60 %	71 %	ref WP_028337442.1
BJ6T_77100 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	271	49 % 282 aa	63 %	dbj BAL12955.1
NopT <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	261	40 % 283	57 %	ref NP_444174.1
YopT-like Y4zC <i>Sinorhizobium fredii</i> USDA 257	205	48 % 197 aa	65 %	ref YP_006529176.1
SFHH103_04285 <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	150	43 % 152 aa	65 %	ref YP_006575308.1
AvrPphB <i>Acidovorax citrulli</i> AAC00-1	188	39 % 188	55 %	gb ABM30699.1
AvrPphB <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	188	31	47 %	pdb 1UKF A

Tabelle A20: Sequenzhomologie zu BlI8201 aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
BlI8201 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	180	-	-	dbj BAC53466.1
BlI1862	180	100 %	100 %	ref NP_768502.1
ID328 <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	180	100 %	100 %	gb AAG60844.1 AF322012_149
NopAG <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	180	100 %	100 %	gb AGH09963.1
BJ6T_88790 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	179	100 %	100 %	ref YP_005613709.1
HopBG1 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> str. ES4326	144	44 % 126 aa	65 %	gb ADQ74901.1

Tabelle A21: Sequenzhomologie zu Blr1993 / pgl aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
ID636 / Blr1993 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	510	-	-	gb AAG60962.1 AF322013_81 dbj BAC47258.1
NopAC <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA123	509	99	99	gb AGH10024.1
BJ6T_78570 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	432	100 % (432 aa)	100 %	ref YP_005612691.1
Polygalacturonase <i>Rhizobium leguminosarum</i>	467	57 % (424 aa)	70 %	ref WP_026154653.1
Polygalacturonase <i>Erwinia carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i>	376	40 %	60 %	pdb 1BHE A
Polygalacturonase <i>Ralstonia solanacearum</i>	530	38 % (412 aa)	54 %	ref WP_013209885.1

Tabelle A22: Sequenzhomologie zu Blr1656 aus *Bja110* (BlastP search)

Name	Amino acid	Identity	Similarity	Protein
Blr1656 / GunA2 <i>B. japonicum</i> USDA110	268			BAC46921.1
Blr1964 / Id568	263	72 % (259 aa)	82 %	ref NP_768604.1
NopAA <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	268	100	100	dbj BAL13413.1 ref WP_011084471.1
SFHH103_04355 <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	268	93 %	95 %	ref YP_006575376.1
NopAA <i>Sinorhizobium fredii</i> USDA207	268	93 %	95 %	gb AGH09914.1
putative glycosyl hydrolase <i>Sinorhizobium meliloti</i>	616	94 % 250 aa	95 %	ref YP_003329349.1
hypothetical protein <i>Sinorhizobium meliloti</i> SM11	160	86 %	89 %	ref YP_001965569.1
hypothetical protein <i>Rhizobium leguminosarum</i>	263	75 %	81 %	ref WP_028744346.1
glycosyl hydrolase <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	266	79 %	86 %	ref WP_026192366.1
glycosyl hydrolase <i>Cupriavidus taiwanensis</i> LMG 19424	260	45 %	64 %	ref YP_001796129.1

Publikationsliste

Der Habilitationsschrift zugrunde liegende Veröffentlichungen (2003-2013)

- Schirrmeister, J., Zocher, S., Flor, L., Göttfert, M., **Zehner, S. 2013.** The domain of unknown function DUF1521 exhibits metal ion-inducible autocleavage activity – a novel example from a putative effector protein of *Vibrio coralliilyticus* ATCC BAA-450. FEMS Microbiol. Lett. 343, 177-182.
- Schirrmeister, J., Friedrich, L., Wenzel, M., Hoppe, M., Wolf, C., Göttfert, M., **Zehner, S. 2011.** Characterization of the self-cleaving effector protein NopE1 of *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 193, 3733-3739.
- Wenzel, M., Friedrich, L., Göttfert, M., **Zehner, S. 2010.** The type III-secreted protein NopE1 affects symbiosis and exhibits a calcium-dependent autocleavage activity. Mol. Plant-Microbe Interact. 23, 124-129.
- Hempel, J., **Zehner, S.**, Göttfert, M., Patschkowski, T. **2009.** Analysis of the secretome of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. J. Biotechnol. 140, 51-58. [1]
- Zehner, S.**, Schober, G., Wenzel, M., Lang, K., Göttfert, M. **2008.** Expression of the *Bradyrhizobium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated *tts* box promoter. Mol. Plant-Microbe Interact. 21, 1087-1093.
- Süß, C. Hempel, J., **Zehner, S.**, Krause, A., Patschkowski, T., Göttfert, M. **2006.** Identification of genistein-inducible and type III secreted proteins of *Bradyrhizobium japonicum*. J. Biotechnol. 126, 69-77.

Erklärung über den persönlichen Anteil an den wissenschaftlichen Publikationen zur Habilitationsthematik

Publikation 1 Zehner et al. 2008

Diese Publikation beruht auf Experimenten, die von mir konzipiert und zu einem großen Teil von mir durchgeführt wurden. Ein Teil der Experimente wurde von Katrin Lang durchgeführt. Die Studentinnen Grit Schober und Mandy Wenzel arbeiteten unter meiner Anleitung. Das Manuskript wurde mir erstellt.

Publikationen 2 und 3 (Süß et al. 2006, Hempel et al. 2009)

Die Idee und Konzeption der Experimente wurde von Prof. Dr. Michael Göttfert und von mir erstellt. Die Experimente und Auswertung der Daten wurden von Christin Süß, Jana Hempel und von mir durchgeführt. Die Manuskripte wurden in Zusammenarbeit aller Beteiligten erstellt.

Publikation 4 und 5 (Wenzel et al. 2010, Schirrmeister et al., 2011)

Die Veröffentlichung beruht auf Experimenten, die hauptsächlich von mir konzipiert wurden. Die Studenten Mandy Wenzel, Lars Friedrich, Christine Wolf, Jana Schirrmeister und Markus Hoppe wurden von mir betreut. Die Manuskripte wurden von mir erstellt.

Publikation 6 (Schirrmeister et al. 2013)

Die Experimente für diese Veröffentlichung wurden gemeinsam von J. Schirrmeister und mir geplant. Die Studenten Sara Zocher, Liane Flor und Jana Schirrmeister wurden von mir betreut. Ich habe das Manuskript erstellt.

Gesamtverzeichnis der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

- Hoyer, E., Knöppel, J., Liebmann, M., Steppert, M., Raiwa, M., Herczynski, O., Hanspach, E., **Zehner, S.**, Göttfert, M., Tsushima, S., Fahmy, K., Oertel, J. (2019). Calcium binding to a disordered domain of a type III-secreted protein from a coral pathogen promotes secondary structure formation and catalytic activity. *Sci Rep* 9: 7115.
- Bedrunka, P., Olbrisch, F., Rüger, M., **Zehner, S.**, Frankenberg-Dinkel, N. (2018). Nitric oxide controls c-di-GMP turnover in *Dinoroseobacter shibae*. *Microbiology* 164: 1405-1415.
- Durán, D., Imperial, J., Palacios, J., Ruiz-Argueso, T., Göttfert, M., **Zehner, S.**, Rey, L. (2018). Characterization of a novel MIIA domain-containing protein (MdcE) in *Bradyrhizobium* spp. *FEMS Microbiol Lett* 365.
- Acosta-Jurado, S., Alias-Villegas, C., Navarro-Gomez, P., **Zehner, S.**, Murdoch, P. D., Rodriguez-Carvajal, M. A., Soto, M. J., Ollero, F. J., Ruiz-Sainz, J. E., Göttfert, M., Vinardell, J. M. (2016). The *Sinorhizobium fredii* HH103 MucR1 global regulator is connected with the *nod* regulon and is required for efficient symbiosis with *Lotus burttii* and *Glycine max* cv. Williams. *Mol Plant Microbe Interact* 29: 700-712.
- Ibe, S., Schirrmeister, J., **Zehner, S.** (2015). Single step purification of recombinant proteins using the metal ion-inducible autocleavage (MIIA) domain as linker for tag removal. *J Biotechnol* 208: 22-27.
- Vinardell, J. M., Acosta-Jurado, S., **Zehner, S.**, Göttfert, M., Becker, A., Baena, I., Blom, J., Crespo-Rivas, J. C., Goesmann, A., Jaenicke, S., Krol, E., McIntosh, M., Margaret, I., Perez-Montano, F., Schneiker-Bekel, S., Serrania, J., Szczepanowski, R., Buendia, A. M., Lloret, J., Bonilla, I., Pühler, A., Ruiz-Sainz, J. E., Weidner, S. (2015). The *Sinorhizobium fredii* HH103 Genome: A comparative analysis with *S. fredii* strains differing in their symbiotic behavior with soybean. *Mol Plant Microbe Interact* 28: 811-824.
- Rosbach, S., Kunze, K., Albert, S., **Zehner, S.**, Göttfert, M. (2014). The *Sinorhizobium meliloti* EmrAB efflux system is regulated by flavonoids through a TetR-like regulator (EmrR). *Mol Plant Microbe Interact* 27: 379-387.
- Schirrmeister, J., Zocher, S., Flor, L., Göttfert, M., **Zehner, S.** (2013). The domain of unknown function DUF1521 exhibits metal ion-inducible autocleavage activity - a novel example from a putative effector protein of *Vibrio coralliilyticus* ATCC BAA-450. *FEMS Microbiol Lett* 343: 177-182.
- Weidner, S., Becker, A., Bonilla, I., Jaenicke, S., Lloret, J., Margaret, I., Pühler, A., Ruiz-Sainz, J. E., Schneiker-Bekel, S., Szczepanowski, R., Vinardell, J. M., **Zehner, S.**, Göttfert, M. (2012). Genome sequence of the soybean symbiont *Sinorhizobium fredii* HH103. *J Bacteriol* 194: 1617-1618.
- Schirrmeister, J., Friedrich, L., Wenzel, M., Hoppe, M., Wolf, C., Göttfert, M., **Zehner, S.** (2011). Characterization of the self-cleaving effector protein NopE1 of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 193: 3733-3739.
- Wenzel, M., Friedrich, L., Göttfert, M., **Zehner, S.** (2010). The type III-secreted protein NopE1 affects symbiosis and exhibits a calcium-dependent autocleavage activity. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 124-129.
- Hempel, J., **Zehner, S.**, Göttfert, M., Patschkowski, T. (2009). Analysis of the secretome of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. *J Biotechnol* 140: 51-58.
- Okazaki, S., **Zehner, S.**, Hempel, J., Lang, K., Göttfert, M. (2009). Genetic organization and functional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii*. *FEMS Microbiol Lett* 295: 88-95.

- Zehner, S.**, Schober, G., Wenzel, M., Lang, K., Göttfert, M. (2008). Expression of the *Bradyrhizobium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated *tts* box promoter. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 1087-1093.
- Kambe, M., Yagasaki, J., **Zehner, S.**, Göttfert, M., Aizawa, S. (2007). Characterization of two sets of subpolar flagella in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 189: 1083-1089.
- Süß, C., Hempel, J., **Zehner, S.**, Krause, A., Patschkowski, T., Göttfert, M. (2006). Identification of genistein-inducible and type III-secreted proteins of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Biotechnol* 126: 69-77.
- Zehner, S.**, Kotzsch, A., Bister, B., Sussmuth, R. D., Mendez, C., Salas, J. A., van Pée, K. H. (2005). A regioselective tryptophan 5-halogenase is involved in pyrroindomycin biosynthesis in *Streptomyces rugosporus* LL-42D005. *Chem Biol* 12: 445-452.

ÜBERSICHTSARTIKEL:

- van Pée, K. H., Keller, S., Wage, T., Wynands, I., Schnerr, H., **Zehner, S.** (2000). Enzymatic halogenation catalyzed via a catalytic triad and by oxidoreductases. *Biol Chem* 381: 1-5.

BUCHBEITRÄGE:

- Kling, E., Schmid, C., Unversucht, S., Wage, T., **Zehner, S.**, van Pée, K. H. (2005). Enzymatic incorporation of halogen atoms into natural compounds. *Ernst Schering Res Found Workshop*: 165-194.
- van Pée, K.-H. & **Zehner, S.** (2003) Enzymology and molecular genetics of biological halogenation. in: The Handbook of environmental chemistry vol.3, part P. Natural production of organohalogen compounds. ed. by G. Gribble. Springer- Verlag Berlin Heidelberg, pp. 171-199.

Lebenslauf

[Aus Datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.]

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Habilitationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die der Habilitationsschrift zugrunde liegenden Publikationen wurden in Zusammenarbeit mit den genannten Autoren angefertigt. Ich habe bisher an keiner anderen Universität einen Antrag auf eine Habilitation eingereicht.

Dr. Susanne Zehner

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Michael Göttfert bedanken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe an diesem Forschungsthema arbeiten durfte. Ich bin sehr dankbar für die Unterstützung, die Ratschläge und Gespräche, seine unermüdliche Geduld und die wirklich schöne Zeit.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern und Studenten der Arbeitsgruppe für ihre fleißige Mitarbeit. Ohne ihren Einsatz wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank an Dr. Jana Schirrmeister, für ihre engagierte und systematische Arbeit. Ich möchte mich auch sehr herzlich bei unserem guten Geist, Monika Weishaupt, bedanken. Ich danke auch allen Gästen unserer Arbeitsgruppe und den Kollegen im Fachbereich Biologie (2003-2015) für die angenehme und kooperative Arbeitsatmosphäre.

Vielen Dank an Prof. Dr. Silvia Rossbach, Dr. Shin Okazaki, Dr. Anna Zdyb und Dr. Katrin Puttke für die wissenschaftlichen Diskussionen.

Ich möchte mich bei meinen Kooperationspartnern Dr. Luis Rey, Dr. José Maria Vinardell und Dr. Karim Fahmy für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

Herzlichen Dank an Prof. Kutzner für seine Briefe und die stete Erinnerung an meine „Pflicht“.

Vielen Dank an meine Eltern, die nie aufhören an mich zu glauben.

Für meine Familie

“Now I must climb this mountain“

Gracias por llevarme a la meta. Sin vosotros no hubiese sido posible.

Publikationen

(1)

Expression of the *Bradyrhizobium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated *tts* box promoter

Zehner, S., Schober, G., Wenzel, M., Lang, K., Göttfert, M. 2008. Mol. Plant-Microbe Interact. 21, 1087-1093.

doi: 10.1094/MPMI-21-8-1087.

Abstract:

In *Bradyrhizobium japonicum*, as in some other rhizobia, symbiotic efficiency is influenced by a type III secretion system (T3SS). Most genes encoding the transport machinery and secreted proteins are preceded by a conserved 30-bp motif, the type-three secretion (*tts*) box. In this study, we found that regions downstream of 34 *tts* boxes are transcribed. For *nopB*, *nopL*, and *gunA2*, the transcriptional start sites were found to be 12, 11, and 10 bp downstream of their *tts* boxes, respectively. The deletion of this motif or modification of two or more conserved residues strongly reduced expression of *nopB*. This indicates that the *tts* box is an essential promoter element. Data obtained with *lacZ* reporter gene fusions of five genes preceded by a *tts* box (*gunA2*, *nopB*, *rhcV*, *nopL*, and *blr1806*) revealed that they are expressed in 4-week-old nodules of *Macroptilium atropurpureum*. These data suggest that the T3SS is active in mature nitrogen-fixing nodules. The two-component response regulator TtsI is required for the expression of *rhcV*, *nopL*, and *blr1806* in bacteroids. Staining of inoculated roots showed that *nopB* is also expressed in early infection stages.

[Kompletter Artikel wurde aus verlagsrechtlichen Gründen entfernt.]

(2)

**Identification of genistein-inducible and type III secreted proteins of
*Bradyrhizobium japonicum***

Süß, C. Hempel, J., Zehner, S., Krause, A., Patschkowski, T., Göttfert, M. 2006. J. Biotechnol. 126, 69-77.

doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.03.037.

Abstract:

Flagellin is the bulk protein secreted by *Bradyrhizobium japonicum*. For easier identification of minor protein fractions, the flagellin genes *bll6865* and *bll6866* were deleted. Extracellular proteins of the corresponding mutant were purified and separated by 2D gel electrophoresis. Several of the protein spots were detectable only after addition of genistein to the growth medium-genistein is an isoflavone secreted by soybean that activates the expression of genes encoding a type III secretion system. These secreted proteins were not present in supernatants of mutants in which conserved genes of the type III secretion system or the regulatory gene *ttsI*, which is essential for activation of the type III secretion system, are deleted. Out of 22 genistein-inducible protein spots 8 different proteins could be identified by mass spectrometry. One of the proteins, Blr1752, has similarity to NopP of *Rhizobium* sp. strain NGR234 that is known to be secreted. Another protein is Blr1656 (GunA2) that was shown previously to have endoglucanase activity. Three proteins have similarity to subunits of the flagellar apparatus. Some proteins appeared in several separate spots indicating posttranslational modification. A conserved tts box motif was found in the putative promoter region of six genes encoding secreted proteins.

[Kompletter Artikel wurde aus verlagsrechtlichen Gründen entfernt.]

(3)

Analysis of the secretome of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*

Hempel, J., Zehner, S., Göttfert, M., Patschkowski, T. 2009. J. Biotechnol. 140, 51-58.

doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.11.002.

Abstract:

Proteins from the supernatant of *Bradyrhizobium japonicum* were separated by two-dimensional gel electrophoresis and stained with Coomassie. This revealed more than 100 protein spots. Sixty-eight proteins were identified by mass spectrometry. Thirty-five are predicted to contain an N-terminal signal peptide characteristic for proteins transported by the general secretory pathway. Most of these appear to be substrate-binding proteins of the ABC transporter family. Ten proteins were categorized as unclassified conserved or hypothetical. None of the proteins has similarity to proteins transported by a type I secretion system or to autotransporters. Three of the proteins might be located in the outer membrane. The addition of genistein led to changes in the spot pattern of three flagellar proteins and resulted in the identification of the nodulation outer protein Pgl. Moreover, the application of shot-gun mass spectrometry resulted in the first-time identification of NopB, NopH and NopT, which were present only after genistein induction. Replacing genistein with daidzein or coumestrol reduced the amount of the type III-secreted protein GunA2.

[Kompletter Artikel wurde aus verlagsrechtlichen Gründen entfernt.]

(4)

The type III-secreted protein NopE1 affects symbiosis and exhibits a calcium-dependent autocleavage activity

Wenzel, M., Friedrich, L., Göttfert, M., Zehner, S. 2010. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23, 124-129.

doi: 10.1094/MPMI-23-1-0124.

Abstract:

The type III-secreted proteins NopE1 and NopE2 of *Bradyrhizobium japonicum* contain a repeated domain of unknown function (DUF1521), which is present in a few uncharacterized proteins. A *nopE1/nopE2* double mutant strain exhibited higher nodulation efficiency on *Vigna radiata* KPS2 than the wild type or single *nopE1* or *nopE2* mutants. This indicates that both proteins are effectors that functionally overlap. To test translocation into the plant cell compartment during symbiosis, NopE1 and NopE2 were fused with adenylate cyclase (*cya*) as reporter. A fusion with the full-length proteins or N-terminal peptides resulted in increased cAMP levels in nodules, indicating translocation. Purified NopE1 exhibited self-cleavage in the presence of Ca²⁺. Two identical cleavage sites (GD'PHVD) were identified inside the DUF1521 domains. The C-terminal cleavage site was analyzed by alanine scanning. Protein variants in which aspartate or proline next to the cleavage sites was substituted displayed no cleavage. A noncleavable protein was obtained by exchange of the aspartate residues preceding both cleavage sites. Complementation analysis with the noncleavable NopE1 variant did not restore wild-type phenotype on *Vigna radiata* KPS2, indicating a physiological role of NopE1 cleavage in effector function.

[Kompletter Artikel wurde aus verlagsrechtlichen Gründen entfernt.]

(5)

**Characterization of the self-cleaving effector protein NopE1 of
*Bradyrhizobium japonicum***

Schirrmeister, J., Friedrich, L., Wenzel, M., Hoppe, M., Wolf, C., Göttfert, M., Zehner, S. 2011. J. Bacteriol. 193, 3733-3739.

doi: 10.1128/JB.00437-11.

Abstract:

NopE1 is a type III-secreted protein of the symbiont *Bradyrhizobium japonicum* which is expressed in nodules. *In vitro* it exhibits self-cleavage in a duplicated domain of unknown function (DUF1521) but only in the presence of calcium. Here we show that either domain is self-sufficient for cleavage. An exchange of the aspartic acid residue at the cleavage site with asparagine prevented cleavage; however, cleavage was still observed with glutamic acid at the same position, indicating that a negative charge at the cleavage site is sufficient. Close to each cleavage site, an EF-hand-like motif is present. A replacement of one of the conserved aspartic acid residues with alanine prevented cleavage at the neighboring site. Except for EDTA, none of several protease inhibitors blocked cleavage, suggesting that a known protease-like mechanism is not involved in the reaction. In line with this, the reaction takes place within a broad pH and temperature range. Interestingly, magnesium, manganese, and several other divalent cations did not induce cleavage, indicating a highly specific calcium-binding site. Based on results obtained by blue-native gel electrophoresis, it is likely that the uncleaved protein forms a dimer and that the fragments of the cleaved protein oligomerize. A database search reveals that the DUF1521 domain is present in proteins encoded by *Burkholderia phytofirmans* PsNJ (a plant growth-promoting betaproteobacterium) and *Vibrio coralliilyticus* ATCC BAA450 (a pathogenic gammaproteobacterium). Obviously, this domain is more widespread in proteobacteria, and it might contribute to the interaction with hosts.

[Kompletter Artikel wurde aus verlagsrechtlichen Gründen entfernt.]

(6)

The domain of unknown function DUF1521 exhibits metal ion-inducible autocleavage activity – a novel example from a putative effector protein of *Vibrio coralliilyticus* ATCC BAA-450

Schirrmeister, J., Zocher, S., Flor, L., Göttfert, M., Zehner, S. 2013. FEMS Microbiol. Lett. 343, 177-182.

doi: 10.1111/1574-6968.12145.

Abstract:

Vibrio coralliilyticus ATCC BAA-450 is a pathogen causing coral bleaching at elevated seawater temperatures. Based on the available genome sequence, the strain has a type III secretion system. Within the corresponding gene cluster, VIC_001052 is encoded, which contains a conserved domain of unknown function DUF1521. In this study, we show that the purified domain exhibits autocleavage activity in the presence of several divalent metal ions, for example, calcium and manganese but not with magnesium or zinc. Autocleavage is not affected by temperatures between 0 and 30 °C, indicating that seawater temperature is not a critical factor for this activity. The DUF1521 domain and the cleavage site are conserved in several proteins from proteobacteria, suggesting a similar cleavage activity for these proteins.

[Kompletter Artikel wurde aus verlagsrechtlichen Gründen entfernt.]