

MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

## Genombasierte Identifizierung neuer potentieller Virulenzfaktoren von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

### MATHEMATISCH – NATURWISSENSCHAFTLICH-TECHNISCHEN FAKULTÄT DER MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

von Frank Thieme

geboren am 08.11.1975 in Eisleben

Gutachterin bzw. Gutachter:

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

Halle/Saale, den 18.07.2006

### ZUSAMMENFASSUNG

Das Gram-negative pflanzenpathogene Bakterium Xanthomonas campestris pv. vesicatoria Stamm 85-10 ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Paprika. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die annotierte Genomsequenz dieses Pathogens miterstellt und analysiert. Das Genom umfasst ein 5,17 Mb großes Chromosom mit einem G+C-Gehalt von 64,75% und vier Plasmide (2 kb, 19 kb, 38 kb und 182 kb), die insgesamt 4726 vorhergesagte enthalten. proteinkodierende Sequenzen Vergleiche mit anderen sequenzierten Xanthomonaden ergaben eine ähnliche Genanordnung wie im Citrus-Pathogen X. axonopodis pv. citri und X. campestris pv. campestris, welches Brassicaceen befällt. Im Gegensatz dazu weichen die Genomstrukturen der Reis-pathogenen X. oryzae pv. oryzae-Stämme stark von denen der anderen Xanthomonaden ab. Mithilfe bioinformatischer Analysen konnte eine Vielzahl möglicher Virulenzfaktoren im Genom des X. campestris pv. vesicatoria-Stammes 85-10 identifiziert werden, so z.B. alle in Gram-negativen Bakterien bekannten Proteinsekretionssysteme. Darunter war auch ein vorhergesagtes Typ IV-Sekretionssystem, das die größte Ähnlichkeit zum Icm/Dot-System humanpathogener Legionella spp. und Coxiella spp. aufweist. Das bereits gut untersuchte Typ III-Sekretionssystem stellt einen essentiellen Pathogenitätsfaktor von X. campestris pv. vesicatoria dar. Es dient hauptsächlich der Translokation von Typ III-Effektorproteinen in die Pflanzenzelle. Im Rahmen dieser Arbeit konnten, unter Verwendung der AvrBs3-Effektordomäne (AvrBs3∆2) als Reporter, sieben neue Typ III-Effektoren, so genannte "Xanthomonas outer proteins" (Xops), bestätigt werden. Während die Effektorgene xopC, xopE1, xopE2, xopH, xopI und xopJ mit dem Typ III-Sekretionssystem koreguliert sind, wird *xopG* konstitutiv exprimiert. Die Gene *xopC*, xopE2 und xopH sind mit möglichen mobilen genetischen Elementen assoziiert, die von 62 bp langen "inverted repeats" an jeder Seite begrenzt werden und eine Transposase und "cointegrate resolution proteins" kodieren. Dies deutet auf einen Erwerb dieser Gene durch horizontalen Gentransfer hin. Interessanterweise enthalten die Effektoren XopE1 und XopE2 ein mögliches N-Myristoylierungssignal in ihren N-Termini. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie zeigte, dass GFP-Fusionen beider Proteine an der Plasmamembran von Nicotiana benthamiana-Zellen lokalisiert sind.

### SUMMARY

The Gram-negative plant-pathogenic bacterium Xanthomonas campestris pv. vesicatoria strain 85-10 is the causal agent of bacterial spot disease on pepper. This work contributed to the annotation and bioinformatic analysis of the genome sequence of this pathogen. The genome comprises a 5.17 Mb chromosome with a G+C content of 64,75% and four plasmids, 2 kb, 19 kb, 38 kb, and 182 kb in size. The whole genome contains 4726 predicted protein coding sequences. Comparisons with other sequenced xanthomonads revealed a gene order that is similar to the citrus pathogen X. axonopodis pv. citri and X. campestris pv. campestris, which infects *Brassicaceae*. By contrast, the genome structure of the rice-pathogenic X. oryzae pv. oryzae strains was quite different from the other xanthomonads. Bioinformatic analyses identified a multitude of putative virulence factors in the genome of X. campestris pv. vesicatoria strain 85-10, e.g., all protein secretion systems so far described in Gram-negative bacteria. Among these systems a putative type IV secretion system was identified, which showed the highest similarity to the Icm/Dot system of human-pathogenic Legionella spp. and *Coxiella* spp.. The type III secretion system (TTSS) is an essential pathogenicity factor of X. campestris pv. vesicatoria. The main function of the TTSS is the translocation of type III effector proteins directly into the plant cell cytosol. In this work, seven type III effectors, designated as Xanthomonas outer proteins (Xops), could be verified, using the effector domain of AvrBs3 (AvrBs3 $\Delta$ 2) as reporter. The effector genes *xopC*, *xopE1*, *xopE2*, *xopH*, *xopI*, and *xopJ* are co-regulated with the TTSS, whereas *xopG* is constitutively expressed. The genes xopC, xopE2 and xopH are associated with similar putative mobile genetic elements, which are flanked by 62 bp inverted repeats on each side and consist of genes coding for a transposase and cointegrate resolution proteins. The presence of the element is indicative for the acquisition of the effector genes by horizontal gene transfer. Interestingly, the effectors XopE1 and XopE2 possess a putative N-terminal N-myristoylation signal. Confocal laser scanning microscopy analysis of XopE1 and XopE2 GFP fusion proteins showed localization to the plasma membrane of *Nicotiana benthamiana* cells.

## Danksagung

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

Ralf Koebnik danke ich für seine vielen guten Vorschläge und seine Hilfe, nicht nur bei der Bewältigung des Genomprojekts. Auch die von ihm organisierten Wandertouren waren eine willkommene Abwechslung.

Jens Boch möchte ich für die vielen oft hitzigen aber nützlichen Diskussionen danken.

Laurent Noël danke ich ganz herzlich für die Betreuung in der Anfangsphase der Arbeit und seine ständige Hilfsbereitschaft.

Alexander Urban möchte ich für seine Hilfe beim Effektorprojekt im Rahmen seiner Diplomarbeit danken, seine "zusätzlichen" Hände haben einiges erleichtert.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bonas bedanke ich mich für die erhaltene Unterstützung und die freundliche Arbeitsatmosphäre, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Bei Hannelore, Carola, Marina, Angelika und Bianca bedanke ich mich für die ausgezeichnete technische Assistenz. Weiterhin gilt mein Dank unseren Kooperationspartnern in Bielefeld, insbesondere Olaf Kaiser und Daniela Bartels, für die freundliche Aufnahme und die fruchtbare Zusammenarbeit am *Xanthomonas*-Genomprojekt.

Vielen Dank auch an Daniela Büttner, Carolin Berger, Doreen Gürlebeck, Simone Hahn, Ernst Weber, Oliver Kirchner und Robert Szczesny für die vielen Diskussionen, ihre Hilfsbereitschaft und Freundschaft.

Bei Ralf Koebnik und Sabine Kay möchte ich mich für das Korrekturlesen der Arbeit und die konstruktiven Ratschläge bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die immer für mich da war und mich unterstützt hat. Und nicht zuletzt danke ich Sabine für die moralische Unterstützung und das Ertragen meiner Launen in der Endphase der Arbeit.

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	Ι
Danksagung	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Die Interaktion von Gram-negativen Bakterien mit ihrem pflanzlichen Wirt	1
1.2. Virulenzfaktoren Gram-negativer pflanzenpathogener Bakterien	2
1.2.1. Toxine	4
1.2.2. Zellwand-abbauende Enzyme	5
1.2.3. Polysaccharid-Strukturen der bakteriellen Zelloberfläche	6
1.2.3.1. Extrazelluläre Polysaccharide	6
1.2.3.2. Lipopolysaccharide	7
1.2.4. Populationsdichte, Motilität und andere bakterielle Faktoren	7
1.3. Das Hrp-Typ III-Sekretionssystem	10
1.3.1. Aufbau von Typ III-Sekretionssystemen – Erkenntnisse aus tier- und	
pflanzenpathogenen Bakterien und der Analyse des Flagellarsystems	10
1.3.1.1. Harpin-Proteine	13
1.3.2. Erkennung von Substraten des Typ III-Sekretionssystems	14
1.3.3. Regulation der Expression von <i>hrp</i> - und Effektorgenen	15
1.4. Die Gattung Xanthomonas	17
1.4.1. Das TTSS von X. campestris pv. vesicatoria, seine Substrate und die Roll	e in der
Interaktion mit dem pflanzlichen Wirt	18
1.4.1.1. Die Regulation der hrp-Gene in X. campestris pv. vesicatoria	19
1.4.1.2. Identifizierung von Typ III-Effektoren	20
1.4.1.3. Molekulare Funktion von Typ III-Effektoren	22
1.5. Thematik der Arbeit	24
1.5.1. Vorarbeiten	24
1.5.2. Zielstellung	25

2. Ergebnisse	6
2.1. Das X. campestris pv. vesicatoria Stamm 85-10 Genomprojekt	6
2.1.1. Artikel	6
2.1.2. Zusammenfassung der Ergebnisse	9
2.2. Identifizierung und Verifizierung von Typ III-Effektoren aus X. campestris pv.	
vesicatoria4	0
2.2.1. Artikel	0
2.2.1.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	1
2.2.2. Manuskript: Verification of four novel type III effectors from Xanthomonas	
campestris pv. vesicatoria two of which, XopE1 and XopE2, are targeted to the	
plant plasma membrane due to N-myristoylation5	2
2.2.2.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	0
2.2.3. Ergänzende Ergebnisse	1
2.2.3.1. Identifizierung von XopI	1
2.2.3.2. Der N-Terminus von XopI enthält ein Typ III-Sekrtions und	
Translokationssignal	2
2.2.3.3. <i>xopI</i> wird HrpG- und HrpX-abhängig induziert	4
2.3. Eigenanteil an den Publikationen	5
3. Diskussion	37
3.1. Xanthomonas campestris pv. vesicatoria - vergleichende Genomanalysen, genomische	
Flexibilität und horizontaler Gentransfer	7
3.2. Protein-Sekretionssysteme und ihre mögliche Funktion in der Virulenz von	
Xanthomonas	1
3.3. Verifizierung und Analyse von sieben neuen Typ III-Effektorproteinen	3
3.3.1. XopC und XopI – Effektoren ohne bekannte Homologe außerhalb der Gattung	
Xanthomonas	95
3.3.2. XopE1, XopE2 und XopJ – Effektoren mit einer möglichen Funktion an der	
Plasmamembran der pflanzlichen Wirtszelle	7
3.3.3. XopG, eine mögliche Zink-Metalloprotease mit Homologie zum Botulinum-	
toxin A9	9
3.3.4. XopH, eine mögliche Tyrosinphosphatase10	0
3.4. Post-Genomanalysen - Identifizierung von Virulenzfaktoren mittels Transcriptomic10	0

4. Literaturverzeichnis	03
-------------------------	----

## Anhang

Anhang 1: Konstruktion von pL6GW356	124
Anhang 2: "Supplementary Tables" zum Artikel unter 2.1.1	125
Anhang 3: In Artikel 2.2.1. verwendete Oligonukleotide	142
Anhang 4: In 2.2.3. verwendete Oligonukleotide	143

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## Abbildungen:

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Protein-Sekretionssysteme Gram-	
	negativer Bakterien.	3
Abbildung 2:	Die hrp-Gen-Cluster pflanzenpathogener Bakterien.	9
Abbildung 3:	Modell des TTSS am Beispiel von X. campestris pv. vesicatoria.	11
Abbildung 4:	Modell der hrp-Gen-Regulation in P. syringae und R. solanacearum.	16
Abbildung 5:	Xanthomonas campestris pv. vesicatoria, der Erreger der bakteriellen	
	Fleckenkrankheit auf Paprika und Tomate.	18
Abbildung 6:	Schema der Struktur von XopI und der xopI-Region im Chromosom	
	des Xcv-Stamms 85-10.	82
Abbildung 7:	Typ III-abhängige Sekretion und Translokation des XopI-AvrBs3∆2-	
	Fusionsproteins von Xcv.	83
Abbildung 8:	Expressionsanalyse des Typ III-Effektorgens xopI mittels RT-PCR.	84
Abbildung 9:	Vergleiche der chromosomalen Sequenzen verschiedener	
	Xanthomonaden.	88
Abbildung 10	: Vorhersage möglicher genomischer Inseln im Chromosom des Xcv-	
	Stammes 85-10.	90
Abbildung 11	: Modell der Interaktion zwischen Xcv und der pflanzlichen Zelle.	92
Tabellen:		

Tabelle 1:	Bekannte Typ III-Effektorgene aus Xcv.	21
Tabelle 2:	In dieser Arbeit verifizierte Effektoren aus Xcv-Stamm 85-10.	94

## Abkürzungsverzeichnis

ADPAdenosindiphosphatÄMäußere bakterielle MembranATPAdenosintriphosphatavr, AvrAvirulenzbpBasenpaarecDNA-AFLP"complementary DNA amplified fragment length polymorphism"CyaAdenylatzyklase-Domäne des Cyclolysins von Bordetella pertussisDNA"desoxyribonucleic acid", DesoxyribonukleinsäureECW"Early californian wonder", Kultivar von Capsicum annuumECF"extracytoplasmic function"EPSextrazelluläres PolysaccharidGFP"green fluorescent protein"GUSβ-Glucuronidasehgi"HrpG-induced", HrpG-abhängig induziertHop"hrp outer protein"hpa, Hpa"hrp conserved"hrc, Hrc"hrp conserved"hrp, Hrp"hypersensitive reaction", hypersensitive Reaktionhrc, Hrc"insertion sequence"kbKilobasenpaareLPSLipopolysaccharidNLS"nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP"pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
ÄMäußere bakterielle MembranATPAdenosintriphosphatavr, AvrAvirulenzbpBasenpaarecDNA-AFLP"complementary DNA amplified fragment length polymorphism"CyaAdenylatzyklase-Domäne des Cyclolysins von Bordetella pertussisDNA"desoxribonucleic acid", DesoxyribonukleinsäureECW"Early californian wonder", Kultivar von Capsicum annuumECF"extracytoplasmic function"EPSextrazelluläres PolysaccharidGUSβ-Glucuronidasehgi"HrpG-induced", HrpG-abhängig induziertHop"hrp associated"HR"hypersensitive reaction", hypersensitive Reaktionhrc, Hrc"hrp conserved"hrp, Hrp"insertion sequence"kbKilobasenpaareLPSLipopolysaccharidNLS"nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP"pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
ATPAdenosintriphosphatavr, AvrAvirulenzbpBasenpaarecDNA-AFLP,complementary DNA amplified fragment length polymorphism"CyaAdenylatzyklase-Domäne des Cyclolysins von Bordetella pertussisDNA,,desoxyribonucleic acid", DesoxyribonukleinsäureECW,,Early californian wonder", Kultivar von Capsicum annuumECF,,extracytoplasmic function"EPSextracelluläres PolysaccharidGUSβ-Glucuronidasehgi,HrpG-induced", HrpG-abhängig induziertHop,,hrp outer protein"hpa, Hpa,,hrp conserved"hrrp, Hrp,,hypersensitive reaction", hypersensitive Reaktionhrc, Hrc,,hrp conserved"IMinnere bakterielle MembranIS,,insertion sequence"kbKilobasenpaareLPSLipopolysaccharidNLS,nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP,pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
avr, AvrAvirulenzbpBasenpaarecDNA-AFLP,complementary DNA amplified fragment length polymorphism"CyaAdenylatzyklase-Domäne des Cyclolysins von Bordetella pertussisDNA,,desoxyribonucleic acid", DesoxyribonukleinsäureECW,,Early californian wonder", Kultivar von Capsicum annuumECF,,extracytoplasmic function"EPSextrazelluläres PolysaccharidGFP,,green fluorescent protein"GUSβ-Glucuronidasehgi,,HrpG-induced", HrpG-abhängig induziertHop,,hrp outer protein"hpa, Hpa,,hrp conserved"hrr, Hrc,,hypersensitive reaction", hypersensitive Reaktionhrc, Hrc,,hrp conserved"IMinnere bakterielle MembranIS,,insertion sequence"kbKilobasenpaareLPSLipopolysaccharidNLS,nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP,,pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
byBasenparecDNA-AFLP,complementary DNA amplified fragment length polymorphism"CyaAdenylatzyklase-Domäne des Cyclolysins von Bordetella pertussisDNA,,desoxyribonucleic acid", DesoxyribonukleinsäureECW,,Early californian wonder", Kultivar von Capsicum annuumECF,,extracytoplasmic function"EPSextrazelluläres PolysaccharidGFP,,green fluorescent protein"GUSβ-Glucuronidasehgi,,HrpG-induced", HrpG-abhängig induziertHop,,hrp outer protein"hpa, Hpa,,hrp conserved"hrc, Hrc,,hrp conserved"hrp, Hrp,,hypersensitive reaction", hypersensitive Reaktionhrc, Hrc,,insertion sequence"kbKilobasenpaareLPSLipopolysaccharidNLS,,nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP,,pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
cDNA-AFLP,,complementary DNA amplified fragment length polymorphism"CyaAdenylatzyklase-Domäne des Cyclolysins von Bordetella pertussisDNA,,desoxyribonucleic acid", DesoxyribonukleinsäureECW,,Early californian wonder", Kultivar von Capsicum annuumECF,,extracytoplasmic function"EPSextracelluläres PolysaccharidGFP,,green fluorescent protein"GUSβ-Glucuronidasehgi,,HrpG-induced", HrpG-abhängig induziertHop,,hrp outer protein"hpa, Hpa,,hrp associated"HR,,hypersensitive reaction", hypersensitive Reaktionhrc, Hrc,,hrp conserved"hrp, Hrp,,hypersensitive response and pathogenicity"IMinnere bakterielle MembranIS,,insertion sequence"kbKilobasenpaareLPSLipopolysaccharidNLS,,nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP,,pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
CyaAdenylatzyklase-Domäne des Cyclolysins von Bordetella pertussisDNA"desoxyribonucleic acid", DesoxyribonukleinsäureECW"Early californian wonder", Kultivar von Capsicum annuumECF"extracytoplasmic function"EPSextrazelluläres PolysaccharidGFP"green fluorescent protein"GUSβ-Glucuronidasehgi"HrpG-induced", HrpG-abhängig induziertHop"hrp outer protein"hpa, Hpa"hrp associated"HR"hypersensitive reaction", hypersensitive Reaktionhrc, Hrc"hrp conserved"hrp, Hrp"hypersensitive response and pathogenicity"IMinnere bakterielle MembranIS"insertion sequence"kbKilobasenpaareLPSLipopolysaccharidNLS"nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP"pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
DNA"desoxyribonucleic acid", DesoxyribonukleinsäureECW"Early californian wonder", Kultivar von Capsicum annuumECF"extracytoplasmic function"EPSextrazelluläres PolysaccharidGFP"green fluorescent protein"GUSβ-Glucuronidasehgi"HrpG-induced", HrpG-abhängig induziertHop"hrp outer protein"hpa, Hpa"hrp associated"HR"hypersensitive reaction", hypersensitive Reaktionhrc, Hrc"hrp conserved"hrp, Hrp"hypersensitive response and pathogenicity"IMinnere bakterielle MembranIS"insertion sequence"kbKilobasenpaareLPSLipopolysaccharidNLS"nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP"pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
ECW"Early californian wonder", Kultivar von Capsicum annuumECF"extracytoplasmic function"EPSextracelluläres PolysaccharidGFP"green fluorescent protein"GUSβ-Glucuronidasehgi"HrpG-induced", HrpG-abhängig induziertHop"hrp outer protein"hpa, Hpa"hrp associated"HR"hypersensitive reaction", hypersensitive Reaktionhrc, Hrc"hrp conserved"hrp, Hrp"hypersensitive response and pathogenicity"IMinnere bakterielle MembranIS"insertion sequence"kbKilobasenpaareLPSLipopolysaccharidNLS"nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP"pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
ECF"extracytoplasmic function"EPSextrazelluläres PolysaccharidGFP"green fluorescent protein"GUSβ-Glucuronidasehgi"HrpG-induced", HrpG-abhängig induziertHop"hrp outer protein"hpa, Hpa"hrp associated"HR"hypersensitive reaction", hypersensitive Reaktionhrc, Hrc"hrp conserved"hrp, Hrp"hypersensitive response and pathogenicity"IMinnere bakterielle MembranIS"insertion sequence"kbKilobasenpaareLPSLipopolysaccharidNLS"nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP"pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
EPSextrazellulăres PolysaccharidGFP"green fluorescent protein"GUSβ-Glucuronidasehgi"HrpG-induced", HrpG-abhängig induziertHop"hrp outer protein"hpa, Hpa"hrp associated"HR"hypersensitive reaction", hypersensitive Reaktionhrc, Hrc"hrp conserved"hrp, Hrp"hypersensitive response and pathogenicity"IMinnere bakterielle MembranIS"insertion sequence"kbKilobasenpaareLPSLipopolysaccharidNLS"nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP"pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
GFP"green fluorescent protein"GUSβ-Glucuronidasehgi"HrpG-induced", HrpG-abhängig induziertHop"hrp outer protein"hpa, Hpa"hrp associated"HR"hypersensitive reaction", hypersensitive Reaktionhrc, Hrc"hrp conserved"hrp, Hrp"hypersensitive response and pathogenicity"IMinnere bakterielle MembranIS"insertion sequence"kbKilobasenpaareLPSLipopolysaccharidNLS"nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP"pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
GUSβ-Glucuronidasehgi"HrpG-induced", HrpG-abhängig induziertHop"hrp outer protein"hpa, Hpa"hrp associated"HR"hypersensitive reaction", hypersensitive Reaktionhrc, Hrc"hrp conserved"hrp, Hrp"hypersensitive response and pathogenicity"IMinnere bakterielle MembranIS"insertion sequence"kbKilobasenpaareLPSLipopolysaccharidNLS"nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP"pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
hgi"HrpG-induced", HrpG-abhängig induziertHop"hrp outer protein"hpa, Hpa"hrp associated"HR"hypersensitive reaction", hypersensitive Reaktionhrc, Hrc"hrp conserved"hrp, Hrp"hypersensitive response and pathogenicity"IMinnere bakterielle MembranIS"insertion sequence"kbKilobasenpaareLPSLipopolysaccharidNLS"nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP"pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
By HopIntervenceIntervenceIntervenceIntervenceIntervenceHop,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,
hpa, Hpa", hrp associated"HR", hypersensitive reaction", hypersensitive Reaktionhrc, Hrc", hrp conserved"hrp, Hrp", hypersensitive response and pathogenicity"IMinnere bakterielle MembranIS", insertion sequence"kbKilobasenpaareLPSLipopolysaccharidNLS", nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP", pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
HR",htp above and aHR",hypersensitive reaction", hypersensitive Reaktionhrc, Hrc",hrp conserved"hrp, Hrp",hypersensitive response and pathogenicity"IMinnere bakterielle MembranIS",insertion sequence"kbKilobasenpaareLPSLipopolysaccharidNLS",nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP",pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
hrc, Hrc",hrp conserved"hrp, Hrp",hypersensitive response and pathogenicity"IMinnere bakterielle MembranIS",insertion sequence"kbKilobasenpaareLPSLipopolysaccharidNLS",nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP",pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
hrp, Hrp",hypersensitive response and pathogenicity"IMinnere bakterielle MembranIS",insertion sequence"kbKilobasenpaareLPSLipopolysaccharidNLS",nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP",pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
IMinnere bakterielle MembranIS"insertion sequence"kbKilobasenpaareLPSLipopolysaccharidNLS"nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP"pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
IS "insertion sequence" kb Kilobasenpaare LPS Lipopolysaccharid NLS "nuclear localization signal", Kernlokalisierungssignal Mb Megabasenpaare PAMP "pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
<ul> <li>kb (kilobasenpaare)</li> <li>LPS Lipopolysaccharid</li> <li>NLS ,,nuclear localization signal", Kernlokalisierungssignal</li> <li>Mb Megabasenpaare</li> <li>PAMP ,,pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster</li> </ul>
LPS Lipopolysaccharid NLS "nuclear localization signal", Kernlokalisierungssignal Mb Megabasenpaare PAMP "pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
NLS"nuclear localization signal", KernlokalisierungssignalMbMegabasenpaarePAMP"pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
MbMegabasenpaarePAMP"pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
PAMP "pathogen-associated molecular pattern"; pathogen-assoziiertes, molekulares Muster
Muster
PCR "polymerase chain reaction", Polymerase-Kettenreaktion
PIP "plant inducible promoter"
PM Plasmamembran
<i>prh</i> , Prh , plant-regulatory <i>hrp</i> gene"
pv. Pathovar
R, R Resistenz
RNA "ribonucleic acid", Ribonukleinsäure
mRNA "messenger RNA", Boten-RNA
rRNA ribosomale RNA
tRNA Transfer-RNA
RT-PCR "reverse transcribed PCR", Reverse Transkription und PCR
SUMO "small ubiquitin-like modifier"
spp. Spezies
TTSS "type III secretion system", Typ III-Sekretionssystem
<i>Xac Xanthomonas axonopodis</i> pv. vesicatoria
<i>Xcc Xanthomonas campestris</i> pv. campestris
Xcv Xanthomonas campestris pv. vesicatoria
Xoo Xanthomonas oryzae pv. oryzae
xop, Xop "Xanthomonas outer protein"
yop, Yop "Yersinia outer protein"

## 1. Einleitung

Krankheiten und die Erforschung ihrer Ursprünge sind seit jeher ein Fokus wissenschaftlichen Interesses. Nicht nur menschliche Erkrankungen, sondern auch die der Nutztiere und Nutzpflanzen waren und sind von essentieller Bedeutung für die Gesellschaft.

Krankheiten von Nutzpflanzen können ebenso wie eine Pest- oder Grippe-Pandemie Millionen von Opfern fordern. So führte die Ausbreitung des Pilzes *Phytophthora infestans* Mitte des 19. Jahrhunderts über mehrere Jahre hinweg zur Vernichtung nahezu der gesamten Kartoffelernte in Irland und löste damit eine Hungerkatastrophe aus. Als deren Folge starben etwa eine Million Menschen und ca. zwei Millionen emigrierten nach Australien und Nordamerika. Auch heute noch verursacht *P. infestans* große Ernteverluste und begünstigt die Ausbreitung weiterer Infektionen, wie z.B. die der Kartoffel-Weichfäule, hervorgerufen durch das γ-Proteobakterium *Erwinia carotovora*. Unter den γ-Proteobakterien findet man eine Vielzahl von Pflanzenpathogenen, so z.B. *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae, welches Reis befällt, das wichtigste Grundnahrungsmittel in weiten Teilen Asiens, und die Weißblättrigkeit auslöst. Diese Krankheit führt zu hohen Ernteausfällen und stellt damit eine ernstzunehmende Gefahr für die Nahrungsmittelproduktion in Asien dar (http://www.fao.org/).

Diese Beispiele illustrieren die Notwendigkeit der Erforschung von Pflanzenpathogenen und ihrer Interaktion mit dem Wirt, um effektive Strategien zum Schutz der Kulturpflanzen und damit zur Vermeidung größerer Ernteausfälle zu entwickeln.

## 1.1. Die Interaktion von Gram-negativen Bakterien mit ihrem pflanzlichen Wirt

Die wichtigsten Fragen bei der Erforschung der Pathogen-Wirts-Interaktion sind die der molekularen Mechanismen, die es dem Pathogen ermöglichen, die Pflanze zu besiedeln, bzw. welche Abwehrmechanismen die Pflanze entwickelt hat.

Die Abwehr von pathogenen Organismen durch die Pflanze ist sehr effektiv, da sich die Mehrzahl der Interaktionen mit möglichen Pathogenen durch eine dauerhafte Nicht-Wirt-Resistenz auszeichnet. Die pflanzliche Abwehr erfolgt nicht über spezialisierte Immunzellen, sondern jede Zelle ist autonom in der Lage, Pathogene zu erkennen und entsprechende Reaktionen auszulösen (220). Zudem verfügen Pflanzen über verschiedene Barrieren, die einen Schutz vor pathogenen Organismen bieten, wie die Kutikula, Zellwände und antimikrobielle Substanzen. Werden diese Barrieren überwunden, kann eine Erkennung von pathogen-assoziierten, molekularen Mustern ("pathogen-associated molecular patterns"; PAMPs) in einer Rezeptor-vermittelten Weise stattfinden. Allgemeine Merkmale solcher PAMPs sind ihre konservierte Struktur, ihre meist essentielle Funktion für eine Vielzahl von Mikroorganismen sowie das Fehlen strukturell ähnlicher Komponenten im potentiellen Wirt (220). PAMPs Gram-negativer phytopathogener Bakterien umfassen z.B. Lipopolysaccharide, die Hauptbestandteile der äußeren Membran (92, 197, 210), Flagellin, die Hauptuntereinheit des Flagellums (19, 100, 110), Elongationsfaktor Tu (172) und Typ III-abhängig sekretierte Harpin-Proteine (119, 176, 299).

Neben der generellen Erkennung von PAMPs verfügen Pflanzen auch über eine spezifische Abwehr, bei der resistente pflanzliche Kultivare so genannte Avirulenzproteine (Avr-Proteine) bakterieller Pathovare (pv.) erkennen. Die Pathovar-Nomenklatur gruppiert verschiedene Stämme einer Art hinsichtlich ihres Wirtsspektrums. Die Erkennung der Avr-Proteine geschieht mittels korrespondierender pflanzlicher Resistenzgenprodukte (R-Proteine) (104), was spezifische Abwehrreaktionen der Pflanze zur Folge hat. Diese Reaktionen gehen meist mit einem schnellen, lokalen programmierten Zelltod an der Infektionsstelle einher, der als hypersensitive Reaktion (HR) bezeichnet wird und die weitere Vermehrung des Pathogens in der Pflanze stoppt (163).

Nur stark spezialisierten Pathogenen gelingt die erfolgreiche Besiedelung der Pflanze. Sie überwinden die ersten Barrieren, indem sie durch natürliche Öffnungen der Pflanzenoberfläche, Wunden oder Vektor-vermittelt über Pflanzensaft saugende Insekten in den Interzellularraum der Pflanze eindringen. Zudem sind sie in der Lage, die pflanzliche Basalabwehr zu unterdrücken und weitere Prozesse so zu manipulieren, dass sie sich auf Kosten des Wirtes vermehren können.

### 1.2. Virulenzfaktoren Gram-negativer pflanzenpathogener Bakterien

Um die pflanzliche Abwehr zu überwinden und eine lokal begrenzte Vermehrung oder systemische Ausbreitung im Wirt zu ermöglichen, haben Gram-negative pflanzenpathogene Bakterien eine Vielzahl von Virulenzfaktoren evolviert. Dazu zählen unter anderem Toxine, hydrolytische Enzyme zum Abbau der pflanzlichen Zellwand, extrazelluläre Polysaccharide, Pili, Adhäsine und andere Oberflächenstrukturen, sowie Systeme, die spezielle Proteinfaktoren in den Apoplasten bzw. direkt in die Wirtszelle befördern, wie z.B. Typ III-



Abbildung 1: Schematische Darstellung der Protein-Sekretionssysteme Gram-negativer Bakterien.

Vier der sechs Hauptgruppen bakterieller Sekretionssysteme sind abhängig vom Sec-System, welches Proteine über die innere Membran transportiert. Eine ähnliche Funktion kommt dem TAT-System zu (244). Bei der Sec-Sekretion bindet das Chaperon SecB an ein Substratprotein. Dieser Komplex interagiert mit SecA, welches SecB freigibt und das Substratprotein übernimmt. Der Transport des Substratproteins durch den SecYEG-Komplex ist abhängig von der ATPase SecA. Das N-terminale Signalpeptid des Substratproteins wird durch eine Signalpeptidase (SPase) im Periplasma abgespalten (287). Die Signalpeptide von Substraten des TAT-Systems werden von TatC erkannt und das entsprechende Protein vom einem Komplex aus TatB und TatC gebunden (5, 83). Dieser Komplex assoziiert mit TatA und transportiert das Substrat in einer  $\Delta p$ H-abhängigen Weise (5, 203). Das N-terminale Signalpeptid des Substratproteins wird durch die SPase des Sec-Systems entfernt (29, 311). Abhängig vom Sec-System sind z.B. Autotransporter, wie das Adhäsin YadA aus Yersinia, die eine N-terminale Passagierdomäne über die äußere Membran transportieren (124). "Chaperone/usher"-Sekretionssysteme, wie die Typ 1-Pilus-Apparate von uropathogenen E. coli, sind ebenfalls Sec-abhängig. Sie bestehen aus dem Chaperon FimC für die Pilusuntereinheiten und FimD, dem "usher"-Protein. FimD erkennt einen Komplex aus FimC und der Pilusuntereinheit und transportiert letztere über die äußere Membran. FimA ist die Hauptuntereinheit des Pilus, an dessen Spitze ein Fibrillum lokalisiert ist, das mit dem Adhäsin FimH endet (214, 258). Das Secabhängige Typ II-Sekretionssystem transportiert Proteine mittels eines beweglichen Pilus durch einen Kanalkomplex in der äußeren Membran, dieser wird von einem Sekretin, wie z.B. PilQ aus Neisseria, gebildet (50, 75, 256). Hier ist ein Modell des Typ 4-Pilusapparats von Neisseria gezeigt. Für die Retraktionsbewegungen des Pilus, der hauptsächlich aus PilE-Untereinheiten besteht, werden die drei ATPasen PilF (Polymerisation), PilT und PilU (Retraktion) benötigt. Die Peptidase und N-Methylase PilD dient der Prozessierung der PilE-Untereinheiten (50). Die Sekretion von Proteinen durch das Typ IV-System kann unter Beteiligung des Sec-Systems erfolgen, ist aber meist Sec-unabhängig, wie z.B. bei der Translokation von T (Transfer)-Komplexes durch Agrobacterium tumefaciens. Dessen komplexes Typ IV-Sekretionssystem ist aus VirB-Proteinen und der ATPase VirD4 aufgebaut (70). Typ I- und Typ III-Sekretionssysteme transportieren Proteine Sec-unabhängig über die innere und äußere Membran (168). Zu den Substraten von Typ I-Sekretionssystemen zählen z.B. Toxine, wie das HlyA-Toxin aus E.coli (31, 131). HlyA interagiert mit dem Membranfusionsprotein HlyD und dem ABC-Transporterprotein HlyB, welches den Transport durch Hydrolyse von ATP energetisiert. Dies löst eine Konformationsänderung in HlyD aus und führt zur Rekrutierung von TolC (131). Das komplexe Typ III-Sekretionssystem von pathogenen Bakterien transloziert hauptsächlich Effektorproteine direkt in die Wirtszelle (276). Substrate der einzelnen Sekretionssysteme sind exemplarisch aufgeführt. (ÄM, äußere bakterielle Membran; IM, innere bakterielle Membran; PM, Plasmamembran der Wirtszelle)

Effektoren (9, 168). Proteine oder Peptide spielen eine zentrale Rolle in der Virulenz und werden in Gram-negativen Bakterien von sechs Hauptgruppen bakterieller Sekretionssysteme transportiert (Abb. 1). Drei von diesen sind abhängig vom Sec-Sekretionssystem, das den Transport über die innere Membran ins Periplasma übernimmt (130, 168). Dazu zählen die Autotransporter (124, 279), das "Chaperone/usher"-Sekretionssystem, welches z.B. dem Aufbau von Typ 1-Pili dient (279) und das wichtigste allgemeine Sekretionssystem, das Typ II-Sekretionssystem, welches unter anderem hydrolytische Enzyme und Toxine sekretiert (256, 257). Einen alternativen Mechanismus für den Transport gefalteter Proteine ins Periplasma ermöglicht das TAT-System ("twin-arginine translocation"), welches in wenigen beschriebenen Fällen auch an der Einspeisung von Substraten in andere Sekretionssysteme beteiligt ist (46, 224, 244, 252, 291). Typ IV-Sekretionssysteme transportieren im Allgemeinen Sec-unabhängig Proteine und DNA in die Wirtszelle, allerdings wird das Pertussis-Toxin von Bordetella pertussis Sec-abhängig sekretiert (61, 70, 168). Typ I- und Typ III-Sekretionssysteme funktionieren Sec-unabhängig, d.h., sie transportieren ihre Substrate über beide bakterielle Membranen ohne eine periplasmatische Zwischenstufe. Typ I-Sekretionssysteme sekretieren z.B. Toxine, Proteasen und Lipasen (31, 131), während durch Typ III-Sekretionssysteme hauptsächlich Effektorproteine direkt in die Wirtszelle transloziert werden (10, 276).

Neben den Sekretions-Systemen und ihren Substraten können auch andere Faktoren, wie z.B. die Motilität der Bakterien, vermittelt durch den Flagellar-Apparat oder Typ 4-Pili, eine Rolle bei der Invasion und Besiedlung des Wirtes spielen (69, 277, 278, 286). Im Wirt angekommen, sind verschiedene Regulationssysteme wichtig, die die Expression von Virulenzfaktoren aktivieren, sowie "Quorum sensing"-Systeme, die Gene in Abhängigkeit von der bakteriellen Zelldichte regulieren (290).

### **1.2.1.** Toxine

In Gram-negativen phytopathogenen Bakterien konnte eine Vielzahl von Toxinen identifiziert werden, die gegen konkurrierende Mikroorganismen bzw. den Wirt gerichtet sind. So produzieren unter anderem die Pathovare von *Pseudomonas syringae* ein breites Spektrum von Toxinen, wie z.B. Coronatin (Polyketid), Phaseolotoxin (Sulfodiamino-phosphinyltripeptid), Syringomycin (zyklisches Lipodepsinonapeptid) und Tabtoxin (monozyklisches  $\beta$ -Lactam) (27). Allerdings synthetisieren nur etwa 50% der untersuchten *P*.

*syringae*-Stämme Toxine und diese meist nur eines (139). Des Weiteren sind die Toxine nicht essentiell für die Pathogenität der einzelnen Stämme, tragen aber als Virulenzfaktoren zur Aggressivität bei, d.h. sie beeinflussen die systemische Verbreitung, die Stärke der Symptome und die Vermehrung des Bakteriums im Wirt (27). Für das Methyljasmonat-Analogon Coronatin wurde auch eine Funktion in der Unterdrückung der Wirtsabwehr gezeigt, wahrscheinlich durch Aktivierung von Jasmonat-Signalwegen, die zur Unterdrückung der Salicylsäure-abhängigen Abwehr führt (78, 219, 320). Die Synthese des Salicylsäure-Signalmoleküls ist für die Etablierung der "systemic acquired resistance" nötig, die eine systemische Resistenz gegen eine Vielzahl von Pathogenen vermittelt (93).

Toxine werden auch von verschiedenen Xanthomonaden produziert, so z.B. Glycinecin von *X. axonopodis* pv. glycines (127) und Albicidin von *X. albilineans* (33, 255). Albicidin spielt eine Schüsselrolle in der Virulenz von *X. albilineans* und inhibiert die DNA-Replikation in den Chloroplasten, was deren Differenzierung blockiert und Chlorose auslöst (32, 33). Die Synthese von Albicidin, bei dem es sich wahrscheinlich um ein Polyketid handelt, erfolgt unter Beteiligung von nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen und Polyketidsynthasen (255).

### 1.2.2. Zellwand-abbauende Enzyme

Zu den Barrieren, die pflanzenpathogene Bakterien überwinden müssen, um ihren Wirt erfolgreich zu besiedeln und als Nährstoffquelle zu nutzen, zählt auch die pflanzliche Zellwand. Zum Abbau der Zellwand, verfügen Pathogene über eine Vielzahl hydrolytischer Enzyme, z.B. Endo-Glucanasen, die Zellulose spalten, Polygalacturonasen, die  $\alpha$ -1,4-Galacturonyl-Bindungen hydrolysieren, und Pektatlyasen, welche diese Bindungen durch  $\beta$ -Eliminierung lösen. Polygalacturonasen und Pektatlyasen dienen dem Abbau von Pektat, dem Hauptbestandteil der primären Zellwand und der Mittellamelle (9, 22). Diese Enzyme und ihre Funktion in der Virulenz wurden besonders intensiv bei *Erwinia* analysiert. Die Weichfäule-Erreger *E. carotovora* subsp. atroseptica, *E. carotovora* subsp. carotovora und *E. chrysanthemi* produzieren große Mengen von Zellwand-abbauenden Enzymen, welche die Zellwandintegrität stören und das Gewebe auflösen. Diese Enzyme stellen wichtige Virulenzfaktoren dieser Bakterien in der nekrotrophen Mazerationsphase dar, die sich an die primäre Invasions- und Proliferationsphase anschließt (26, 266, 280).

### 1.2.3. Polysaccharid-Strukturen der bakteriellen Zelloberfläche

Gram-negative Bakterien tragen komplexe Polysaccharid-Strukturen auf ihrer Oberfläche, deren Funktion noch nicht vollständig charakterisiert ist, die aber häufig zur Interaktion von Pathogenen mit ihrem Wirt beitragen (88).

### 1.2.3.1. Extrazelluläre Polysaccharide

Extrazelluläre Polysaccharide (EPS) dienen wahrscheinlich dem Schutz des Bakteriums gegen Stressoren und der Adhäsion an biologische Oberflächen in den verschiedenen Habitaten, die phytopathogene Bakterien während ihres Lebenszyklus besiedeln. Diese Funktionen lassen sich aus den Eigenschaften von EPS ableiten, wie der starken Hydratisierung als Schutz gegen Austrocknung und hydrophobe Moleküle, dem anionischen Charakter von EPS, welcher die Anreicherung von Nährstoffen und die Immobilisierung von toxischen Verbindungen unterstützt und der adhäsiven Eigenschaften, die die Bindung von Bakterien untereinander und zu anderen organischen Strukturen, wie z.B. Wirtszellen unterstützen (64, 77). Eines der am besten charakterisierten EPS von Gram-negativen phytopathogenen Bakterien ist Xanthan, welches als Verdickungsmittel mannigfaltige Verwendung in der Kosmetik und Lebensmittelindustrie findet (24). Xanthan ist das typische EPS der Gattung Xanthomonas, dessen Struktur und Biosynthese in X. campestris pv. campestris am besten analysiert ist (24). Es handelt sich um ein saures Polymer, in dem Pentasaccharid-Untereinheiten ein Zellulose-Rückgrat mit Trisaccharid-Seitenketten bilden (24, 146). Die Enzyme zur Synthese von Xanthan und die zugehörigen Export-Proteine sind im gum-Gen-Cluster kodiert (24). Die Analyse von gum-Mutanten in X. campestris pv. campestris zeigte, dass Xanthan nicht essentiell für die Pathogenität ist, aber zur Aggressivität der Bakterien gegenüber dem Wirt beiträgt (154). Einen stärkeren Effekt zeigten EPS-Mutanten von X. axonopodis pv. manihotis. Ihre Virulenz auf Maniok war stark verringert und sie konnten sich nicht mehr in der Pflanze ausbreiten (157). Eine Rolle von EPS in der Virulenz wurde auch für andere phytopathogene Bakterien, wie z.B. Ralstonia solanacearum (152), P. syringae (318) und Erwinia spp. (30, 76) gezeigt.

### 1.2.3.2. Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide (LPS) bestehen aus Lipid A, welches in die äußere bakterielle Membran eingebettet ist, sowie "Core"-Oligosaccharid und O-Antigen-Polysaccharid, die nach außen ragen. Als Hauptbestandteil der äußeren Membran tragen LPS wahrscheinlich zur Membranpermeabilität bzw. deren Beschränkung bei. Die LPS ermöglichen dadurch Wachstum und Überleben unter Stressbedingungen, z.B. bei Anwesenheit antimikrobieller Substanzen in der Pflanze. Zudem bilden sie bei pathogenen Bakterien eine Kontaktfläche zum Wirt (209). Aufgrund dieser Funktionen zeigen Defekte in der LPS-Synthese häufig pleiotrope Effekte, was eine Analyse spezifischer Funktionen in der Virulenz erschwert. Nichtsdestotrotz wurde durch Mutantenanalysen in *R. solanacearum* (125, 153), *X. campestris* (91) und *E. chrysanthemi* (261) ein möglicher Einfluss von LPS auf die Virulenz gefunden.

Versuche mit gereinigtem LPS zeigten, dass dieses von der Pflanze als PAMP detektiert werden kann und Abwehrreaktionen auslöst. So induzierte das LPS von X. campestris pv. campestris einen "oxidative burst", aktiviert die Expression von PR-Genen ("pathogenesis related") und löst andere Abwehrreaktionen der Pflanze aus (41, 197, 208, 210). Das LPS von P. syringae pv. syringae ist ein schwacher Elicitor der Produktion antimikrobieller Substanzen, so genannter Phytoalexine, in Soja (23). Andererseits wurde für LPS auch eine Funktion in der Unterdrückung von pflanzlichen Abwehrreaktionen gezeigt. So verhinderte die Inokulation von Paprikablättern mit LPS von phytopathogenen und Enterobakterien die Auslösung einer HR durch einen avirulenten X. campestris-Stamm (207, 209). Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit synthetischen Rhamnanketten erzielt, welche üblicherweise das Grundgerüst pflanzenpathogener Bakterien des O-Antigens bilden. Synthetische Oligorhamnane wurden in Arabidopsis als PAMP erkannt und konnten sowohl die Expression von PR-1 aktivieren, als auch die HR-Auslösung durch einen avirulenten P. syringae-Stamm unterdrücken (25).

### 1.2.4. Populationsdichte, Motilität und andere bakterielle Faktoren

Viele Bakterien regulieren die Expression bestimmter Gene in Abhängigkeit von ihrer Populationsdichte, was als "Quorum sensing" bezeichnet wird (290). "Quorum sensing" spielt auch eine wichtige Rolle in der Virulenz von phytopathogenen Bakterien. *E. carotovora*  subsp. atroseptica produziert das "autoinducer"-Signalmolekül N-Acylhomoserinlacton, welches den Wechsel zwischen biotropher Invasions- und nekrotropher Mazerationsphase reguliert, d.h. die Synthese Zellwand-abbauender Enzyme ist abhängig von der Populationsdichte (266). *X. campestris* pv. campestris produziert zwei verschiedene "Quorum sensing"-Signalmoleküle, die die Expression von Faktoren für epiphytisches Überleben und Virulenz regulieren. Der "diffusible signal factor", eine  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Fettsäure (293), ist an der Regulation von mindestens 165 Genen beteiligt (122). Diese Gene kodieren unter anderem für extrazelluläre Enzyme, Komponenten des Lipopolysaccharid- und EPS-Biosyntheseweges, Bestandteile und Regulatoren des Flagellarsystems sowie Komponenten des Typ III-Sekretionssystems (122). Die EPS-Produktion wird außerdem vom "diffusible factor", einem Butyrolacton, reguliert, der darüber hinaus auch in die Kontrolle der Synthese des Pigments Xanthomonadin involviert ist (230, 231).

Bakterielle Fortbewegungssysteme können ebenfalls eine Bedeutung für die Virulenz besitzen. Beispielsweise ist die durch das Flagellum vermittelte Motilität nötig für die invasive Virulenz von *R. solanacearum* (277, 278) und *Agrobacterium tumefaciens* (69). Auch die durch Typ 4-Pili vermittelte Retraktionsbewegung und Adhäsion an pflanzliches Gewebe können eine Rolle spielen, was z.B. für *R. solanacearum* gezeigt wurde (151, 185). Im Gegensatz dazu waren Typ 4-Pilinmutanten von *P. syringae* pv. *tomato* kaum in ihrer Pathogenität beeinträchtigt, wohl aber im epiphytischen Wachstum und ihrer UV-Toleranz (248). Für gereinigte Typ 4-Pili von *X. campestris* pv. *hyacinthi* wurde eine Bindung an Stomata von Hyazinthen-Blättern gezeigt, welche für die Invasion des Blattgewebes von Bedeutung sein könnte (286).

Pathogene Bakterien nutzen für die Anheftung an die Wirtszellen auch spezielle Adhäsine (211), deren Funktion in der Virulenz hauptsächlich in tierpathogenen Bakterien analysiert wurde. Es gibt jedoch auch aus phytopathogenen Bakterien Beispiele für die Bedeutung von Ahäsinen in der Virulenz, z.B. das filamentöse Hämagglutinin HecA aus *E. chrysanthemi* (250) und das nicht-fimbrilläre Adhäsin XadA aus *X. oryzae* pv. oryzae (240).

Neben diesen allgemein in pathogenen Gram-negativen Bakterien vorhandenen Virulenzfaktoren gibt es spezifische Anpassungen an den pflanzlichen Wirt. So produzieren eine ganze Reihe von pflanzenpathogenen Bakterien Phytohormone, wie z.B. verschiedene Pseudomonaden und Xanthomonaden (103, 109). Ein Einfluß der Synthese der Phytohormone Auxin und Cytokinin auf das epiphytische Wachstum und die Virulenz konnte für *E. herbicola* pv. gypsophilae gezeigt werden (74, 113, 181, 191).



### Abbildung 2: hrp-Gen-Cluster pflanzenpathogener Bakterien.

(A) Schematischer Überblick über die Gruppe I- und Gruppe II-*hrp*-Gen-Cluster verschiedener pflanzenpathogener Bakterien. (B) Vergleich der *hrp*-Gen-Cluster verschiedener Xanthomonaden. Vergleiche auf DNA-Ebene wurden mit dem "Artemis comparison tool" (60) durchgeführt. Rote Bereiche zeigen eine DNA-Identität über 80% in einer Sequenz von mindestens 400 bp Länge an. Tiefere Rottöne entsprechen einer höheren Identität des jeweiligen Sequenzabschnittes. Pfeile repräsentieren Gene und ihre Transkriptionsrichtung. Rote Pfeile stehen für *hrc* Gene, blaue für *hrp* Gene und grüne für *hpa* Gene. Potentielle und bestätigte Typ III-Effektorgene werden durch schwarze Pfeile repräsentiert, Gene, die Regulatoren des TTSS kodieren, durch weiße. Graue Pfeile stehen für uncharakterisierte Gene. Gelbe Rechtecke markieren die Position von Insertionssequenz-Elementen. Pfeile über den Genen zeigen die Operonstruktur und schwarze Punkte PIP-Boxen. (Abb. modifiziert nach D. Gürlebeck, F. Thieme und U. Bonas, 2006 [115]).

### **1.3. Das Hrp-Typ III-Sekretionssystem**

Einen essentiellen Pathogenitätsfaktor vieler pflanzenpathogener, Gram-negativer Bakterien stellt das Typ III-Sekretionssystem ("type III secretion system"; TTSS) dar. Dieses System transportiert in phytopathogenen Bakterien einige Proteine in das extrazelluläre Milieu. Die Mehrzahl der Proteinsubstrate, die so genannten Effektoren, werden aber direkt ins pflanzliche Zytosol transloziert (10, 276). Typ III-abhängige Proteinsekretion wurde zuerst für das Tierpathogen *Yersinia enterocolitica* beschrieben (123). Die Gene, jedoch, die die Komponenten des TTSS kodieren, wurden erstmals durch die Analyse nicht-pathogener Mutanten in dem Pflanzenpathogen *P. syringae* identifiziert (184, 212). In pflanzenpathogenen Bakterien wird das TTSS vom *hrp*-Gen-Cluster ("hypersensitive response and pathogenicity") kodiert (10, 276) (Abb. 2). *hrp*-Mutanten sind nicht in der Lage, Krankheitssymptome in einer suszeptiblen Pflanze hervorzurufen, können sich kaum noch in der Pflanze vermehren und lösen auch keine HR in einer resistenten Pflanze aus (37, 184).

Basierend auf der Genanordnung, Sequenzähnlichkeit und Regulation können die *hrp*-Gen-Cluster pflanzenpathogener Bakterien in zwei Gruppen unterteilt werden. Gruppe I umfasst z.B. die Cluster von *P. syringae, Erwinia* und *Panthoea* spp., während *Xanthomonas* spp. und *R. solanacearum* zur Gruppe II gehören (9, 281) (Abb. 2 A). Die meisten *hrp*-Gen-Cluster zeigen typische Merkmale von Pathogenitätsinseln: sie enthalten Gene, die Virulenzfaktoren kodieren, mobile genetische Elemente, ihr G+C-Gehalt und "codon usage" kann in einigen Sequenzregionen vom Rest des Genoms abweichen und sie werden häufig von tRNA-Genen flankiert (8, 66, 218) (Abb. 2). Diese Merkmale und die fehlende Korrelation der Phylogenie der *hrp*-Gene mit den entsprechenden 16S-rRNAs sprechen für einen Erwerb der *hrp*-Gen-Cluster durch horizontalen Gentransfer (90, 281). Die den *hrp*-Gen-Cluster flankierenden Regionen sind sehr variabel und kodieren häufig Substrate des TTSS (8, 218) (Abb. 2).

## 1.3.1. Aufbau von Typ III-Sekretionssystemen – Erkenntnisse aus tier- und pflanzenpathogenen Bakterien und der Analyse des Flagellarsystems

Elf Hrp-Proteine sind zwischen Gram-negativen pflanzen- und tierpathogenen Bakterien konserviert und werden deshalb als Hrc-Proteine (<u>"Hrp c</u>onserved") bezeichnet (35). Diese Proteine formen wahrscheinlich den Typ III-Sekretionsapparat im Zytoplasma und der inneren und äußeren Membran der Bakterien (121, 276). Bis auf HrcC und HrcD zeigen die



### Abbildung 3: Modell des TTSS am Beispiel von X. campestris pv. vesicatoria.

Der Typ III-Sekretionsapparat in der inneren und äußeren bakteriellen Membran ist mit dem extrazellulären Hrp-Pilus assoziiert, der die ca. 200 nm dicke pflanzliche Zellwand durchspannt. Der Hrp-Pilus verbindet den Typ III-Sekretionsapparat mit dem Translokon in der Zytoplasmamembran der pflanzlichen Zelle. Die Hauptaufgabe des TTSS ist der Transport von bakteriellen Effektorproteinen in die pflanzliche Wirtszelle. Der Protein-Export unterliegt der Kontrolle von HpaB und HpaC (54, 55). Die Effektorproteine werden vom Typ III-Sekretionsapparat über die innere und äußere bakterielle Membran, den Hrp-Pilus und das Typ III-Translokon in die Wirtszelle transloziert. Dort modulieren die Effektoren wahrscheinlich Wirtszellprozesse zum Vorteil des Pathogens, was zur Auslösung von Krankheitssymptomen führt. Als Beispiel sind wässrige Läsionen auf einem Paprikablatt gezeigt (rechts: Laborphänotyp). Bestimmte Effektoren, so genannte Avr-Proteine, können jedoch abhängig von einem korrespondierenden pflanzlichen Resistenzgenprodukt erkannt werden, was zur Auslösung einer lokalen Abwehrreaktion, der hypersensitiven Reaktion, führt (links: Laborphänotyp). (IM, innere bakterielle Membran; ÄM, äußere bakterielle Membran; PM, Plasmamembran der pflanzlichen Zelle)

Hrc-Proteine auch Homologie zu Komponenten des Flagellarsystems, welches möglicherweise eine evolutionäre Vorstufe des TTSS darstellt (3, 276). Neben diesen konservierten Komponenten sind auch nicht-konservierte Proteine am Aufbau des TTSS beteiligt (121).

Grundsätzlich besteht das TTSS pflanzenpathogener Bakterien aus dem Sekretionsapparat, der die innere und äußere bakterielle Membran durchspannt und mit dem Hrp-Pilus, einem extrazellulären Appendix, verbunden ist, welcher den Transport von Effektorproteinen zum Translokon, einer Pore in der pflanzlichen Plasmamembran, vermittelt (53, 165, 276) (Abb. 3). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Hrc-Proteine zu Komponenten des TTSS tierpathogener Bakterien, wie den Ysc-Proteinen aus *Yersinia* spp., und den Fli-Proteinen des Flagellarsystems können hier gewonnene Erkenntnisse wahrscheinlich auf das TTSS von pflanzenpathogenen Bakterien übertragen werden.

Zytoplasmatische bzw. membranassoziierte Komponenten des TTSS sind HrcL, HrcN und HrcQ (28, 97, 232, 276). HrcN aus *P. syringae* und sein Homolog FliI im Flagellarapparat sind F1/V1-ATPasen, die ringförmige Homohexamere an der inneren Membran formen (73, 232). Ihre ATP-Hydrolaseaktivität ist dabei abhängig vom Oligomerisierungsgrad (232) und wird im Flagellarsystem auch durch die Bindung des negativen Regulators FliH kontrolliert (198). Eine Interaktion der FliH-Homologen YscL/HrcL mit den entsprechenden ATPasen YscN/HrcN wurde auch im TTSS von tier- und pflanzenpathogenen Bakterien gezeigt (28, 140).

In der inneren bakteriellen Membran sind die Proteine HrcD, HrcR, HrcS, HrcT, HrcU, HrcV und eventuell auch HrcJ lokalisiert (28, 85). HrcJ, ein mögliches Lipoprotein, ist wahrscheinlich Teil des Innenmembranringes des TTSS, was für das entsprechende Homolog in den Tierpathogenen *S. flexneri* und *S. typhimurium* gezeigt wurde (170, 171, 275). HrcV und HrcU besitzen neben den Transmembrandomänen eine große C-terminale zytoplasmatische Domäne (28). Im Flagellarsystem interagieren diese Domänen der HrcV- und HrcU-Homologen FhlA und FhlB mit dem HrcJ-Homolog FliF und der zytoplasmatischen ATPase FliI (158, 321). Die HrcU-Homologen FlhB im Flagellarsystem und YscU im TTSS des Tierpathogens *Yersinia* kontrollieren zudem den Wechsel zwischen verschiedenen Sekretionssubstraten, d.h. von den Komponenten des "rods" und "hooks" zu denen des Flagellenfilaments (105) bzw. von der Nadelkomponente YscF, die den extrazellulären Appendix bildet, zu Effektorproteinen in *Yersinia* (94).

HrcC bildet wahrscheinlich die Sekretin-Komponente des TTSS pflanzenpathogener Bakterien in der äußeren bakteriellen Membran (85, 302). Sekretine formen einen homomultimeren, ringförmigen Komplex, wie dies z.B. für das HrcC-Homolog YscC aus dem Tierpathogen *Y. enterocolitica* beschrieben wurde (49, 169).

Die extrazellulären Fortsätze des TTSS von pflanzenpathogenen Bakterien sind die Hrp-Pili, welche die pflanzliche Zellwand vom Typ III-Sekretionsapparat in der bakteriellen Hülle bis zum Typ III-Translokon in der pflanzlichen Zytoplasmamembran durchspannen (120, 165). Hrp-Piline sind charakterisiert durch ein geringes Molekulargewicht, eine größtenteils  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur und eine geringe Sequenzähnlichkeit zueinander (165). Die Hrp-Piline werden, wie auch Effektorproteine, durch den Kanal innerhalb des Hrp-Pilus transportiert. Die Assemblierung der Piline erfolgt an der Spitze des Hrp-Pilus (120, 147, 179).

Die Translokon-Komponente des TTSS von phytopathogenen Bakterien ist nicht zwischen verschiedenen Bakterienarten konserviert und bildet wahrscheinlich einen oligomeren Porenkomplexes in der Wirtszellmembran, der den Transport der Effektoren ins Zytoplasma der Wirtszelle vermittelt (53, 56).

### 1.3.1.1. Harpin-Proteine

Die ersten bekannten Substrate des TTSS in pflanzenpathogenen Bakterien waren die Harpin-Proteine HrpN aus *E. amylovora* (299), HrpZ aus *P. syringae* pv. syringae (119) und PopA aus *R. solanacearum* (17). Weitere Vertreter dieser Gruppe von Proteinen, die vom TTSS in den Apoplasten der Pflanze sekretiert werden, wurden in *E. amylovora* (107, 159) und *Xanthomonas* spp. (160, 161, 180) identifiziert. Harpin-Proteine lösen eine nicht-Kultivarspezifische HR aus, wenn sie in den Apoplasten von Nichtwirtspflanzen injiziert werden. Außerdem sind sie untereinander nicht homolog, zeigen aber gemeinsame Merkmale wie Hitzestabilität, hoher Anteil an Glycinresten und Fehlen von Cysteinresten. Die Erkennung von Harpin-Proteinen in der Pflanze könnte an der Plasmamembran in einer Rezeptorvermittelten Weise erfolgen, was die Integration in die Plasmamembran der pflanzlichen Zelle und die Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-abhängige Erkennung von HrpZ aus *P. syringae* in Tabak vermuten lassen (176).

Die Virulenzfunktion von Harpin-Proteinen in der Pathogen-Pflanze-Interaktion ist noch weitgehend unklar. Allerdings sind *hrpN*-Mutanten von *E. amylovora* nicht mehr pathogen auf Birne und lösen auch keine HR in Nichtwirtspflanzen wie Tabak aus (299). Für HrpZ aus *P. syringae* wurde gezeigt, dass es mit dem wachsenden Hrp-Pilus assoziiert ist (179) und Poren in Lipiddoppelschichten bilden kann (177). Porenbildung in künstlichen Membranen wurde auch für PopA aus *R. solanacearum* gezeigt (234). Das Harpin-Protein HrpW aus *P. syringae* pv. tomato, eine mögliche Pektatlyase, bindet Pektat, zeigt jedoch keine hydrolytische Aktivität *in vitro* (67). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Harpin-Proteine als Hilfsproteine beim Aufbau des TTSS fungieren. Sie beeinflussen möglichen, oder sind mit der Plasmamembran der pflanzlichen Zellen assoziiert, um die Membranintegrität zur besseren Integration der Translokon-Komponenten zu stören, bzw. bilden möglicherweise selbst einen Teil des Translokons.

### 1.3.2. Erkennung von Substraten des Typ III-Sekretionssystems

Bisher konnte die genaue Natur des Typ III-Sekretionssignals, welches im N-terminalen Bereich von Substratproteinen lokalisiert ist, nicht geklärt werden. Für das Vorhandensein eines generellen Sekretionssignals sprechen aber Experimente, die zeigten, dass bestimmte Substratproteine von TTSS verschiedener bakterieller Spezies sowie vom Flagellarapparat sekretiert werden (13, 178, 254, 270, 316, 317).

Ein kontrovers diskutiertes Modell der Substraterkennung postuliert ein Signal in der 5' mRNA einiger "*Yersinia* outer proteins" (Yops) aus tierpathogenen *Yersinia* spp. und einen Mechanismus ähnlich dem kotranslationalen Transport von Proteinen ins endoplasmatische Retikulum der eukaryotischen Zelle (14, 236, 267). Diese Hypothese wird durch Experimente unterstützt, die zeigten, dass Leserastermutationen in den ersten Codonen von Effektoren, die die mRNA-Struktur kaum, aber die Aminosäuresequenz stark veränderten, immer noch zu funktionalen Typ III-Sekretionssignalen führten (13-15, 237, 238). Ein mRNA-Signal wurde auch für Typ III-Effektoren aus pflanzenpathogenen Bakterien postuliert, z.B. für AvrBs2 aus *X. campestris* pv. vesicatoria (205) und AvrPto aus *P. syringae* (13). Die ersten 28 Codonen von *avrBs2* bzw. die ersten 15 Codonen von *avrPto* waren für die Sekretion eines Fusionsproteins ausreichend und tolerierten Leserastermutationen (13, 205).

Im Gegensatz zur mRNA-Hypothese zeigte eine ganze Reihe von Studien, dass das Typ III-Sekretionssignal in den ersten 11-17 Aminosäureresten von Yop-Proteinen aus tierpathogenen *Yersinia* spp. lokalisiert ist (186, 187, 260, 268). Außerdem deuten Experimente mit künstlichen Sequenzen, die die Aminosäurereste 2-8 von YopE aus dem Tierpathogen *Y. pseudotuberculosis* mit allen Permutationen von Serin und Isoleucin ersetzten, darauf hin, dass der amphipathische Charakter des Signals von Bedeutung ist (187). Ähnliches wurden auch im Pflanzenpathogen *P. syringae* gefunden, wo Merkmale von Effektoren, wie ein hoher Anteil von Serin- und Glutamin-Resten und der amphipathische Charakter der ersten 50 Aminosäurereste, beschrieben wurden (116, 228, 259). Allerdings sind diese Charakteristika in ihrer Gesamtheit nicht allgemeingültig für Typ III-Effektoren verschiedener Bakterienarten (10, 246).

Neben dem Sekretionssignal besitzen viele Typ III-Effektoren aus pflanzen- und tierpathogenen Bakterien in ihrem N-Terminus eine Typ III-Chaperon-Bindestelle. Typ III-Chaperone haben ein geringes Molekulargewicht, einen hohen Anteil an Leucin-Resten, einen niedrigen isoelektrischen Punkt, eine C-terminale amphipathische Region und zeigen zueinander nur wenig Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz (99, 294). Die Interaktion von

Effektor und Typ III-Chaperon ist unter anderem für die Stabilität und effiziente Sekretion des Effektorproteins nötig (10, 276). Typ III-Chaperone können auch als dreidimensionales Signal an der Einspeisung ihrer Substrate ins TTSS beteiligt sein, wie für den SycE-YopE-Chaperon-Effektor-Komplex aus dem Tierpathogen *Yersinia* gezeigt wurde (34). Im Tierpathogen *Salmonella enterica* konnte zudem gezeigt werden, dass Chaperon-Effektor-Komplexe von der ATPase-Komponente des TTSS aufgelöst und das Effektorprotein für den Transport komplett entfaltet wird (4).

### 1.3.3. Regulation der Expression von hrp- und Effektorgenen

Die *hrp*-Gene, die für das TTSS phytopathogener Bakterien kodieren, werden in der Pflanze oder in bestimmten Minimalmedien, welche vermutlich die Bedingungen im pflanzlichen Apoplasten nachahmen, induziert (16, 183, 235, 262, 263, 300, 310). Wie oben erwähnt (siehe Kapitel 1.3.) unterscheiden sich die *hrp*-Gen-Cluster der Gruppe I und Gruppe II in der Regulationskaskade, die die Expression der jeweiligen Gene kontrolliert.

Die Regulation der hrp-Gene eines Gruppe-I-Clusters ist bei P. syringae gut untersucht, jedoch sind die Komponenten zur Perzeption von pflanzlichen Signalen noch nicht identifiziert worden (Abb. 4 A). In P. syringae ist die Expression der hrp-Gene abhängig vom ECF-Sigmafaktor ("extracytoplasmic function") HrpL, welcher an eine konservierte Promotorsequenz von hrp- und Effektorgenen, die so genannte hrp-Box, bindet (308, 309). Die Expression von hrpL wird synergistisch von den "enhancer binding"-Proteinen der NtrC-Familie, HrpR und HrpS (112, 138, 308), und vom Sigma 54-Factor RpoN kontrolliert. Die Expression von rpoN und des hrpRS-Operons wird vom "two-component system response regulator" GacA beeinflusst, der seinerseits in Abhängigkeit von der Wachstumsphase der Bakterien und von Umweltbedingungen reguliert wird (68). Unter hrp-supprimierenden Bedingungen wird HrpR von der Protease Lon abgebaut, was die Expression des hrp-Regulons blockiert (42). Die Verfügbarkeit von HrpS wird von HrpV und HrpG gesteuert (297). Der negative Regulator HrpV bindet HrpS und unterdrückt dadurch die Expression von hrpL, was durch die Bindung von HrpG an HrpV und der daraus folgenden Freisetzung von HrpS aufgehoben werden kann (297). Die hrp-Genexpression in P. syringae pv. tomato DC3000 wurde auch supprimiert, wenn das hrpA-Gen, welches für die Hauptuntereinheit des Hrp-Pilus kodiert (249), mutiert wurde (298). Dieser Effekt scheint unabhängig von der Sekretion des Proteins zu sein, da sekretionsdefiziente hrpA-Mutanten keinen Einfluss auf die Regulation hatten (298).



Abbildung 4: Modell der hrp-Gen-Regulation in P. syringae und R. solanacearum.

(A) Regulation der hrp-Gene in P. syringae. Der Sigmafaktor HrpL aktiviert die Expression von Genen des hrp-Clusters sowie anderer Gene mit hrp-Promotorboxen (KGGARCY-N<sub>15-16</sub>-CCACNNA) (323). Die Expression von hrpL wird durch HrpR, HrpS und den Sigma 54-Faktor RpoN reguliert. Die Expression des hrpRS-Operons wird von HrpA und möglicherweise einem unbekannten System zur Perzeption eines pflanzlichen Signals beeinflusst. Zusätzlich wird die Verfügbarkeit von HrpS über Bindung an HrpV reguliert, welches nach Interaktion mit HrpG dieses Protein wieder freigibt. Unter hrp-reprimierenden Bedingungen wird außerdem HrpR von der Protease Lon degradiert. Metabolische Signale werden über GacA, welches die Expression von rpoN und des hrpRS-Operons beeinflusst, in die Regulationskaskade eingespeist. (B) Regulation der hrp-Gene in R. solanacearum. Ein Zellwandkontakt-abhängiges Signal wird von PrhA aufgenommen, über PrhR weitergeleitet, und aktiviert PrhI. PrhI induziert die Expression von PrhJ, was zur Expression von HrpG führt. Der Transkriptionsaktivator HrpG induziert die Expression von HrpB, welches Promotoren mit einer hrp<sub>II</sub>-(TTCG-N<sub>16</sub>-TTCG) und -10-Box (YANNRT) vermutlich direkt aktiviert. HrpB und HrpG kontrollieren wahrscheinlich indirekt die Expression weiterer Gene. Die Faktoren, die die Expression von PrhI und PrhR bedingen, sind unbekannt. Metabolische und "Quorum sensing"-Signale werden wahrscheinlich auf der Stufe von HrpG in die Kaskade eingespeist. Rote Pfeile repräsentieren Aktivierung der Genexpression. (IM, innere bakterielle Membran; ÄM, äußere bakterielle Membran; PM, Plasmamembran der pflanzlichen Zelle)

Die Regulation von Gruppe-II-*hrp*-Gen-Clustern ist am besten in *R. solanacearum* untersucht (Abb. 4 B). Ein unbekanntes Pflanzenzellkontakt-abhängiges Signal wird hier von dem Außenmembran-Rezeptor PrhA ("plant-regulatory <u>hrp</u> gene") erkannt, der Ähnlichkeit zu TonB-abhängigen Siderophorrezeptoren aufweist. PrhA überträgt das Signal auf das

Protein PrhR, welches wahrscheinlich in der inneren Membran lokalisiert ist (6, 44, 192). PrhR kann nun den ECF-Sigmafaktor PrhI aktivieren. Die Expression des prhIR-Operons in Ralstonia wird durch Inkubation in Pflanzenzellkultur aktiviert, ist aber nicht abhängig von PrhA (44). Der aktivierte Sigmafaktor PrhI induziert die Expression von prhJ, das einen Transkriptionsaktivator der LuxR/UhpA-Familie kodiert (44), welcher dann die Expression von hrpG aktiviert. Für die Aktivierung der hrpG-Expression in Minimalmedium ist PrhJ dagegen nicht erforderlich (45). Der "two-component system response regulator" HrpG ist essentiell für die Induktion der anderen hrp-Gene, sowohl in Minimalmedium als auch in der Pflanze und stellt damit einen Knotenpunkt in der Kaskade dar (45). Metabolische und "Quorum sensing"-Signale werden wahrscheinlich durch den globalen Virulenzregulator PhcA, der die Expression der hrp-Gene im Vollmedium und bei hohen Zelldichten unterdrückt, über die posttranslationale Modifizierung der HrpG-Aktivität in die Kaskade eingespeist (108). HrpG seinerseits aktiviert die Expression von HrpB, einem Transkriptionsregulator vom AraC-Typ (45). Für die HrpB-abhängige Aktivierung von Promotoren in R. solanacearum sind die so genannte hrpu-Box (Konsensussequenz: TTCG-N16-TTCG) und die -10-Box (Konsensussequenz: YANNRT) nötig (79).

### 1.4. Die Gattung Xanthomonas

Die Gattung *Xanthomonas* umfasst eine Vielzahl von pflanzenpathogenen Bakterien die nahezu alle wichtigen Kulturpflanzen befallen. Zu den wirtschaftlich bedeutendsten Arten zählen *X. oryzae* pv. oryzae (*Xoo*), der Erreger der Weißblättrigkeit auf Reis ("bacterial blight"), *X. axonopodis* pv. citri (*Xac*), das Zitruskrebs ("citrus canker") auf einer Vielzahl von *Citrus*-Arten auslöst, und *X. campestris* pv. campestris (*Xcc*), der Adernschwärze ("black rot") auf verschiedenen Brassicaceen hervorruft. Aufgrund ihrer guten experimentellen Zugänglichkeit haben sich Xanthomonaden wie *Xoo*, *Xac* und *Xcc* als Modellsysteme in der Phytopathologie etabliert. Mittlerweile liegen für diese Spezies auch vollständige Genomsequenzen vor (81, 175, 223, 233). Einer in Hinsicht auf die Interaktion mit der Wirtspflanze und das TTSS am besten charakterisierten Xanthomonaden ist *X. campestris* pv. vesicatoria (*Xcv*), der auch als *X. axonopodis* pv. vesicatoria (288) und *X. euvesicatoria* (149) bezeichnet wird. *Xcv* ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit ("bacterial spot") auf Paprika (*Capsicum annuum*) und Tomate (*Lycopersicon esculentum*) (52, 57) (Abb. 5).

# 1.4.1. Das TTSS von *X. campestris* pv. vesicatoria, seine Substrate und die Rolle in der Interaktion mit dem pflanzlichen Wirt

Das TTSS von *Xcv* wird von einem 23 kb großen *hrp*-Gen-Cluster kodiert, der Teil einer Pathogenitätsinsel ist und von Regionen flankiert wird, die unter anderem für Substrate des TTSS, so genannte Xop-Proteine (,,<u>Xanthomonas o</u>uter proteins") kodiert (37, 101, 102, 218, 253) (Abb. 2 B). Die Gene des *hrp*-Gen-Clusters von *Xcv* kodieren für 11 konservierte Hrc-Proteine, sieben Hrp-Proteine und sieben Hpa-Proteine (,,<u>*hrp*</u> associated") (115) (Abb. 2 B). Die *hpa*-Gene wurden durch die Analyse nicht-polarer Mutanten identifiziert und sind nicht essentiell für die Interaktion mit der Pflanze, tragen aber zur Virulenz bei (54, 137, 218; D. Büttner und U. Bonas, unpublizierte Daten).

Einige der *hrp*- und *hpa*-Gene sind bereits genauer untersucht. HrpB2 und HrpE werden Typ III-abhängig sekretiert, sind aber auch essentiell für die Sekretion anderer Proteine durch das TTSS und stellen damit wahrscheinlich Teile des extrazellulären Appendix des TTSS dar (253, 296). Für HrpE konnte gezeigt werden, dass es die Hauptkomponente des Hrp-Pilus ist (296).

Das Typ III-abhängig sekretierte Protein HrpF ist essentiell für die Pathogenität, hat jedoch *in vitro* keinen Einfluss auf die Typ III-abhängige Sekretion anderer Proteine (253).



Abbildung 5: *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria, der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit auf Paprika und Tomate.

Krankheitssymptome auf (A) Paprika und (B) Tomate. Das Pathogen vermehrt sich lokal begrenzt in seiner Wirtspflanze. Symptome sind wässrige Läsionen auf Blättern und Früchten, die später nekrotisch werden. (C) Rasterscan-elektronenmikroskopische Aufnahme von Xcv im Blattgewebe von Paprika. Xanthomonaden sind unipolar begeißelte Stäbchen mit einem Durchmesser von 0,2-0,6 µm und einer Länge von 0,8-2,9 µm (271). Die Bakterien (gelb) sind eingebettet in das Exopolysaccharid Xanthan (hellgrün) und bilden lokal Kolonien auf der Oberfläche der pflanzlichen Mesophyllzellen (grün). Der weiße Balken entspricht 1 μm. (**D**) Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Xcv*. Die stäbchenförmigen Bakterien tragen extrazelluläre Fortsätze des Typ III-Sekretionssystems, die so genannten Hrp-Pili. Der weiße Balken entspricht 0,5 µm. (Bildquellen: [A] und [B] Clemson University, USDA Cooperative Extension Slide series images, www.forestryimages.org; [C] G. Hause und D. Gürlebeck, Martin-Luther-Universität, Halle; nachkoloriert; [D] E. Weber und G. Hause, Martin-Luther-Universität, Halle)

HrpF besitzt Lipidbinde- und Porenbildungsaktivität in Lipiddoppelschichten und bildet vermutlich die Hauptkomponente des Translokons in der pflanzlichen Zytoplasmamembran (56).

*xopA* zeigt typische Merkmale eines *hpa*-Gens: es ist in der den *hrp*-Gen-Cluster flankierenden Region lokalisiert, wird HrpG- und HrpX-abhängig exprimiert und Mutanten zeigen reduziertes Wachstum und Virulenz in suszeptiblen Pflanzen, haben aber keinen Einfluss auf die *in vitro*-Sekretion von HrpF und des Effektors AvrBs3 (217, 218). XopA wird Typ III-abhängig sekretiert, aber nicht in die Wirtszelle transloziert und ist möglicherweise eine Komponente des Translokons (54). Das Protein zeigt Homologie zu Hpa1 aus *Xoo* und dem Harpin HpaG aus *X. axonopodis* pv. glycines (161, 322), besitzt aber keine HR-auslösende Aktivität (160, 161).

Im Gegensatz zu XopA verbleiben das mögliche Typ III-Chaperon HpaB und das HpaC-Protein im Zytoplasma des Bakteriums (54, 55). Beide Proteine sind für die effiziente Sekretion von Effektoren nötig und interagieren wahrscheinlich miteinander, mit verschiedenen Effektorproteinen sowie der konservierten TTSS-Komponente HrcV (54, 55). Dies lässt vermuten, dass HpaB und HpaC eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Substraten des TTSS und der Kontrolle des Proteinexports von Effektoren spielen (54, 55).

### 1.4.1.1. Die Regulation der hrp-Gene in X. campestris pv. vesicatoria

In *Xcv* sind die Proteine HrpG und HrpX die Schlüsselregulatoren der Expression des TTSS. Sie werden, anders als ihre Homologen HrpG und HrpB aus *R. solanacearum* (siehe Kapitel 1.3.3.), außerhalb des *hrp*-Gen-Clusters kodiert (Abb. 2 A). Weitere Komponenten der Regulationskaskade, die die Expression des TTSS in der Pflanze vermittelt, wurden in *Xanthomonas* noch nicht identifiziert. Allerdings konnte in *Xcc* ein negativer Einfluss des "Quorum sensing" auf die Expression von *hrp*-Genen gezeigt werden (122).

Der Regulator HrpG gehört zur OmpR-Familie von "two-component system response regulators" und kontrolliert die Expression des Regulators HrpX (304). HrpX, ein Transkriptionsaktivator der AraC-Familie, reguliert die Expression der meisten Gene des HrpG-Regulons einschließlich der *hrp*-Operone *hrpB* bis *hrpF* (217, 218, 301). Viele HrpX-regulierte Gene besitzen in ihrer Promotor-Region eine PIP-Box ("plant-inducible promoter", Konsensus: TTCG-N16-TTCG), an welche wahrscheinlich HrpX bindet (102, 301). Die PIP-Box allein ist aber nicht ausreichend, um HrpX-Induzierbarkeit zu vermitteln, da HrpX-unabhängig exprimierte Gene wie *avrRxv* ebenfalls ein solches Motiv in ihrem Promotor

besitzen (72). Es ist wahrscheinlich, dass wie bei *R. solanacearum* zusätzlich die -10-Region eine entscheidende Rolle spielt (79), um HrpX-Induzierbarkeit zu ermöglichen (283; R. Koebnik, unpublizierte Daten).

### 1.4.1.2. Identifizierung von Typ III-Effektoren

In pflanzenpathogenen Bakterien wurden die ersten Typ III-Effektoren aufgrund ihrer Avirulenzaktivität, d.h. der Auslösung einer HR in resistenten Pflanzen, isoliert. In den verschiedenen untersuchten *Xcv*-Stämmen sind insgesamt acht Avr-Proteine bekannt (20, 21, 36, 38, 58, 72, 95, 156, 199, 205, 251, 272, 274, 305) (Tabelle 1).

Effektorgene konnten auch aufgrund ihrer Koregulation mit dem TTSS identifiziert werden. Während in *P. syringae* alle bekannten Effektorgene mit dem TTSS koreguliert sind (65, 308), trifft dies in *Xcv* nicht zu. Die Effektorgene *avrBs1, avrBs3, avrBsT* und *avrRxv* werden z.B. in *Xcv* konstitutiv exprimiert (72, 95, 164) (Tabelle 1). Eine cDNA-AFLP-Analyse zur Identifizierung HrpG-abhängig regulierter Gene in *Xcv*, die wahrscheinlich an der Pathogen-Pflanze-Interaktion beteiligt sind, ergab mehr als 20 neue Gene (217). Die cDNA-AFLP- und RT-PCR-Analyse des Wildtyp-Stammes 85-10, der *hrpG*<sup>\*</sup>-Mutante 85<sup>\*</sup>, welche die *hrp*-Gene konstitutiv exprimiert, und der *hrpX*-Deletionsmutante 85<sup>\*</sup>  $\Delta hrpX$  zeigte zudem, dass die Expression der meisten Gene des HrpG-Regulons abhängig vom Regulator HrpX ist (217). Mithilfe dieser Analysen konnten Gene identifiziert werden, die für neue Substrate des TTSS von *Xcv* kodieren, wie z.B. *xopA*, *xopB* und *xopQ* (217, 218, 246).

Die Sequenzierung bakterieller Genome eröffnet die Möglichkeit der bioinformatischen Vorhersage von Effektorkandidaten. Als Kriterien dienen dabei die Homologie zu bekannten Typ III-Effektoren, das Vorhandensein eukaryotischer Motive, wie z.B. die katalytische Triade von SUMO-Proteasen (siehe Kapitel 1.4.1.3.) und die Präsenz von PIP- und -10-Boxen in der Promotorregion des entsprechenden Gens, die auf eine Koregulation mit dem TTSS hinweisen (57). In *P. syringae* konnten auch Vorhersagen aufgrund der Anordnung bestimmter N-terminaler Aminosäurereste, die wahrscheinlich das Typ III-Sekretionssignal bilden, getroffen werden (10, 116, 228, 246). Eine ganze Reihe von Effektorgenen zeigt darüber hinaus auch Merkmale für den Erwerb mittels horizontalen Gentransfers, d.h. abweichenden G+C-Gehalt im Vergleich zum Rest des Genoms sowie flankierende mobile genetische Elemente und tRNA-Gene (57, 90) (Tabelle 1).

Reportersysteme zum Nachweis der *in vivo*-Typ III-Translokation von Effektorkandidaten wurden in *Pseudomonas* und *Xanthomonas* basierend auf der HR-Auslösung

Tabelle	T. Dekaline Typ III-Effectorgene	aus Ac	/.		
Gen-	Mögliche	PIP-	Koreg.	$G+C^d$	Referenzen
Name	Funktion/Homologie <sup>a</sup>	Box <sup>b</sup>	mit TTSS <sup>c</sup>	(%)	
avrBs1 <sup>e</sup>	Unbekannte Funktion	-	-	42,23	(95, 251)
avrBs2 <sup>e</sup>	Glycerophosphoryl-diester- phosphodiesterase	+	Ng	63,59	(205, 272)
avrBs3	AvrBs3/PthA-Familie, Transkriptionsfaktor	-	-	66,92	(38, 164, 193, 274)
avrBs4	AvrBs3/PthA-Familie, Transkriptionsfaktor	-	Ng	66,49	(36)
avrBsT	YopJ/AvrRxv-Familie, SUMO- Cysteinprotease	-	Ng	43,01	(72, 95, 199)
avrRxv <sup>e</sup>	YopJ/AvrRxv-Familie, SUMO- Cysteinprotease	(+)	-	52,32	(72, 305)
avrXv3	Unbekannte Funktion, Homologie zu HopAF1 ( <i>P. syringae</i> pv. tomato)	(+)	+	53,42	(20)
avrXv4	YopJ/AvrRxv-Familie, SUMO- Cysteinprotease	(+)	Ng	47,59	(21, 245)
hpaA <sup>e</sup>	Unbekannte Funktion	+	+	65.09	(136, 137, 301)
хорВ <sup>е</sup>	Unbekannte Funktion, Homologie zu HopD1 ( <i>P. syringae</i> pv. tomato)	+	+	55.54	(217)
xopD <sup>e</sup>	C48-Familie-SUMO- Cysteinprotease	+	+	54.76	(132, 218)
xopF1 °	Unbekannte Funktion	+	Ng	65.47	(246)
xopF2 <sup>e</sup>	Unbekannte Funktion	+	Ng	64.72	(246)
xopN <sup>e</sup>	Unbekannte Funktion, Homologie zu HopAU1 ( <i>P. syringae</i> pv. phaseolicola)	(+)	Ng	63.44	(246)
xopO <sup>e</sup>	Homologie zu HopK1 und AvrRps4 ( <i>P. syringae</i> )	+	Ng	52.04	(246)
xopP <sup>e</sup>	Unbekannte Funktion	+	Ng	61.66	(246)
xopQ <sup>e</sup>	HopQ1-1-Familie, Inosin-Uridin- Nucleosid-N-Ribohydrolase	+	+	68.88	(217, 246)
xopX <sup>e</sup>	Unbekannte Funktion, Homologie zu HopAE1 (P. syringae)	+	Ng	65.95	(196)
ecf <sup>e</sup>	"Early chlorosis factor", Homologie zu HopAE1 ( <i>P. syringae</i> )	+	-	64.88	(201)

 Tabelle 1: Bekannte Typ III-Effektorgene aus Xcv.

<sup>a</sup> Vorhergesagte Funktion und Homologie zu Typ III-Effektorproteinen aus *Pseudomonas syringae*. Für *Pseudomonas*-Effektoren wurde die neue vereinheitlichte Nomenklatur verwendet (182).

<sup>b</sup> Vorhandensein einer PIP- und -10-Box (TTCG-N<sub>16</sub>-TTCG-N<sub>31-33</sub>-YANNRT) im Promotorbereich des entsprechenden Gens. + steht für das Vorhandensein, (+) für imperfekte und – für das Fehlen eindeutig identifizierbarer Motive.

<sup>°</sup> HrpG- and HrpX-abhängige Koregulation mit dem TTSS (+, Koregulation; -, konstitutive Expression; Ng, nicht getested)

<sup>d</sup> G+C-Gehalt der DNA in der kodierenden Region (Der G+C-Gehalt des Chromosoms von Xanthomonaden liegt bei ca. 63-65%).

<sup>e</sup> Effektor wird im Genom des sequenzierten Xcv-Stamms 85-10 kodiert (siehe Kapitel 2.1.1.).

durch Avr-Proteine etabliert (111, 116, 246). In *Xcv* wurde z.B. ein AvrBs2-Derivat ohne Nterminales Typ III-Sekretionssignal als Reporter eingesetzt. In einer Tn*3*-basierten Suche nach Fusionen, die die AvrBs2-Translokation wiederherstellen, konnten so sechs neue Effektoren im Stamm 85-10 identifiziert werden (246) (Tabelle 1). Als Reporter für Typ III-abhängige Translokation wurde auch die Calmodulin-abhängige Adenylatzyklase-Domäne des Cyclolysins (Cya) von *Bordetella pertussis* verwendet, die kein Typ III-Sekretionssignal besitzt. Wird der N-Terminus eines Effektorproteins an Cya fusioniert, kann das Fusionsprotein vom TTSS in die Pflanzenzelle transportiert werden, wo das Enzym durch die Bindung von Calmodulin aktiviert wird und ATP-abhängig zyklisches AMP produziert (62, 259, 269). Mithilfe des Cya-Reporters und der Analyse des cAMP-Spiegels des infizierten Gewebes mittels Enzymimmunoassays konnte auch die Translokation von Effektoren aus *Xcv* gezeigt werden (62, 196, 201, 246) (Tabelle 1).

Die bestätigten Effektoren können nun auf ihre Funktion in der Pathogen-Wirts-Interaktion analysiert werden. Hierzu werden unter anderem phänotypische Änderungen in der Ausbildung von Krankheitssymptomen bzw. von Abwehrreaktionen in verschiedenen Wirts- und Nichtwirtspflanzen nach Infektion mit entsprechenden Deletionsmutanten im Vergleich zum *Xcv*-Wildtypstamm analysiert. Zudem sollten die Effektorgene in der Pflanze überexprimiert werden, was der Identifizierung damit verbundener Phänotypen und der subzellulären Lokalisierung dient. Mögliche pflanzliche Zielproteine und damit einen tieferen Einblick in die Funktion eines einzelnen Effektors können Hefe-Dihybrid-Sichtungen liefern (57).

### 1.4.1.3. Molekulare Funktion von Typ III-Effektoren

Viele Effektoren pflanzenpathogener Bakterien unterdrücken pflanzliche Abwehrreaktionen, vermutlich indem sie Abwehrsignalwege oder das Transkriptom der Wirtszellen modulieren (204). Die Analyse der Funktion eines einzelnen Effektors ist aber oft schwierig, da Phytopathogene meist eine große Anzahl verschiedener Effektoren besitzen, die oft funktionell redundant sind und häufig keine Ähnlichkeit zu bereits charakterisierten Proteinen zeigen (10). Die molekulare Funktion von zwei Effektorfamilien in Xcv, wovon die eine Proteine mit möglicher Cysteinprotease-Aktivität und die andere mögliche Transkriptionsfaktoren der AvrBs3/PthA-Familie umfasst, konnte jedoch bereits gut charakterisiert werden.

Cysteinproteasen werden basierend auf ihrer Aminosäuresequenz in verschiedene Gruppen eingeteilt (239). In *Xcv* findet man Mitglieder der AvrRxv/YopJ-Familie (C55) und der C48-SUMO-Protease-Familie (132, 133, 226, 245) (Tabelle 1). Effektoren der AvrRxv/YopJ-Familie wurden sowohl in verschiedenen pflanzenpathogenen als auch in tierpathogenen Bakterien identifiziert, was eine wichtige Funktion bei der Interaktion mit dem eukaryotischen Wirt impliziert (133, 226). Mitglieder dieser Familie und der C48-Gruppe zeigen strukturelle Merkmale von SUMO-Proteasen (132, 133, 226, 245). SUMO ("small ubiquitin-like modifier") wird in Eukaryoten, ähnlich wie Ubiquitin, posttranslational an Proteine gebunden. Die SUMOylierung kann vielfältige Prozesse regulieren, unter anderem Proteinstabilität, Import in den Nukleus, Enzymaktivität und Transkription (128, 129, 195, 289). In der Tat wurde für die *Xcv*-Effektoren XopD und AvrXv4 eine SUMO-Proteaseaktivität gezeigt (132, 245). In der Pflanzenzelle akkumuliert XopD in subnukleären Foci, was vermuten lässt, dass dieser Effektor durch DeSUMOylierung regulatorischer Proteine das Transkriptom der Pflanzenzelle manipuliert (132). AvrXv4 und AvrRxv sind im Zytoplasma der Pflanzenzelle lokalisiert, interferieren also wahrscheinlich mit anderen Prozessen (39, 245).

Mitglieder der AvrBs3/PthA-Familie wurden mit Ausnahme von Brg11 aus R. solanacearum bisher nur in Xanthomonaden identifiziert (80, 115). Alle Proteine dieser Familie aus Xanthomonas zeigen über 90% Identität in ihrer Aminosäuresequenz und zeichnen sich durch charakteristische Merkmale aus. Sie enthalten eine zentrale "Repeat"-Region, Kernlokalisierungssignale ("nuclear localization signals", NLSs) und eine saure Transkriptionsaktivierungsdomäne ("acidic activation domain", AAD) im C-Terminus, was auf eine Funktion als Transkriptionsfaktoren hindeutet (115). Die größten Unterschiede in der Primärstruktur der einzelnen Mitglieder zeigt die "Repeat"-Region, welche 5,5 bis 28,5 annähernd identische, direkte Sequenzwiederholungen von meist 34 Aminosäureresten umfasst (115). Anzahl und Anordnung der "Repeats" ist sowohl von Bedeutung für die Avirulenz-Spezifität dieser Effektoren als auch für ihre Virulenzaktivität (115, 126, 155, 312, 313). AvrBs3, der namensgebende und einer der am besten charakterisierten Typ III-Effektoren, wurde aus Xcv aufgrund seiner Avirulenzaktivität isoliert (38). Das AvrBs3-Protein spielt außerdem eine Rolle in der Virulenz, indem es eine Vergrößerung von Mesophyllzellen in suszeptiblem Pflanzengewebe auslöst (193). Diese Hypertrophie fördert vermutlich die Freisetzung der Bakterien aus dem Blattgewebe und könnte damit wichtig für deren Weiterverbreitung sein (193). Diese Hypothese wird durch Feldstudien mit verschiedenen Effektormutanten gestützt (306). Die Translokation von AvrBs3 durch das TTSS von Xcv konnte immunocytologisch direkt nachgewiesen werden (274). Essentiell für die Translokation sind die 27 N-terminalen Aminosäurereste von AvrBs3 (274). Zusätzlich zu diesem Signal konnte in den N-terminalen 50 Aminosäureresten von AvrBs3 auch eine Bindestelle für das Typ III-Chaperon HpaB identifiziert werden (54). Nach dem Transport ins pflanzliche Zytoplasma bildet AvrBs3 Homodimere, wofür die zentrale Region wichtig ist,

die 17,5 Sequenzwiederholungen von je 34 Aminosäureresten enthält (114). Die AvrBs3-Dimere werden, vermittelt durch Interaktion ihrer NLSs mit Importin  $\alpha$ , in den Kern transportiert (114, 117, 273, 274). Die Kernlokalisation und das Vorhandensein der AAD im C-Terminus von AvrBs3 sind für die Avirulenzaktivität und für die Auslösung der Hypertrophie nötig und weisen auf eine Funktion als eukaryotischer Transkriptionsfaktor hin (273, 285). Transkriptom-Analysen in der suszeptiblen Pflanze, die AvrBs3-abhängig induzierte Gene identifizierten, unterstützen diese Vermutung (193).

### 1.5. Thematik der Arbeit

### 1.5.1. Vorarbeiten

In einer cDNA-AFLP-Analyse des *Xcv*-Wildtyp-Stammes 85-10 und der *hrpG*<sup>\*</sup>-Mutante 85<sup>\*</sup>, welche die *hrp*-Gene konstitutiv exprimiert (217) (siehe Kapitel 1.4.1.2.), wurden unter anderem die HrpG-abhängig induzierten (*hgi*) Fragmente *hgi 37/41* und *hgi 11* gefunden, die zu den möglichen Effektorgenen *xopC* und *xopJ* korrespondieren. Die Abhängigkeit der *xopC*- und *xopJ*-Expression von HrpG und HrpX konnte mittels cDNA-AFLP und RT-PCR-Analysen in Vollmedium und *hrp*-induzierendem Minimalmedium bestätigt werden (215, 217). Das *xopJ*-Gen wurde im Rahmen der Doktorarbeit von L. Noël sequenziert. Das entsprechende Protein gehört zur YopJ/AvrRxv-Effektorproteinfamilie (215, 217). Für *xopC* lag nur eine partielle Gensequenz vor, deren vorhergesagtes Produkt keine Homologie zu Proteinen in der Datenbank zeigte (215, 217). Diese Gensequenzen erlaubten die Erstellung von pIC1-Vektorkonstrukten (215). Der integrative Vektor pIC1 ermöglicht die translationale Fusion eines c-Myc-Epitops und die transkriptionale Fusion eines *uidA*-Reportergens an ein Zielgen im Genom von *Xcv*, was Expressions- und Immunoblot-Analysen, wie z.B. Sekretionsanalysen, erlaubt (217).

Als Reporter zur Bestätigung der Typ III-abhängigen Translokation von Effektorproteinkandidaten wurde in dieser Arbeit AvrBs3A2 benutzt, ein AvrBs3-Derivat, das kein funktionales Typ III-Sekretions- und -Translokationssignal besitzt (274). AvrBs3A2 ist aber immer noch in der Lage, eine HR in der resistenten Pflanze auszulösen, wenn es transient exprimiert wird (274). Fusioniert ein funktionales Typ III-Sekretionsman und -Translokationssignal an AvrBs $3\Delta 2$ , so wird das Fusionsprotein vom TTSS in die Pflanzenzelle transloziert. Dies führt in der resistenten Paprikapflanze, die das

korrespondierende Resistenzgen *Bs3* besitzt, zur Erkennung des AvrBs3-Derivats und eine HR wird ausgelöst. Diese Erkennung ist sensitiv und erfolgt im Kern der Pflanzenzelle (274). Der AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporter wurde bereits im Vorfeld der Arbeit erfolgreich für die Bestätigung des HpaA-Effektorproteins aus *Xcv* genutzt (136). Die Verfügbarkeit eines AvrBs3-Antiserums (164) ermöglicht zudem die Detektion der Fusionsproteine in Immunoblot-Analysen, was *in vitro*-Sekretionsanalysen erlaubt.

### 1.5.2. Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war die Annotation und bioinformatische Analyse des Genoms des *Xcv*-Stammes 85-10. Beides erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Genomforschung in Bielefeld im Rahmen der GenoMik-Initiative des Bundesministeriums für Bildung und Forschung. Der Fokus der Analysen sollte dabei auf der Identifizierung möglicher Virulenzfaktoren dieses Bakteriums, besonders der Vorhersage neuer Typ III-Effektoren liegen.

Neue und bereits bekannte Effektorkandidaten sollten experimentell verifiziert und weiter charakterisiert werden. Hierzu sollte ein effektives Reportersystem zum Nachweis der Typ III-abhängigen Sekretion und Translokation etabliert werden.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Das X. campestris pv. vesicatoria Stamm 85-10 Genomprojekt

### 2.1.1. Artikel:

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Nov. 2005, p. 7254–7266 0021-9193/05/\$08.00+0 doi:10.1128/JB.187.21.7254–7266.2005 Copyright © 2005, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. Vol. 187, No. 21

### Insights into Genome Plasticity and Pathogenicity of the Plant Pathogenic Bacterium *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria Revealed by the Complete Genome Sequence

Frank Thieme,<sup>1</sup><sup>†</sup> Ralf Koebnik,<sup>1</sup><sup>†</sup> Thomas Bekel,<sup>2</sup> Carolin Berger,<sup>1</sup> Jens Boch,<sup>1</sup> Daniela Büttner,<sup>1</sup> Camila Caldana,<sup>1</sup><sup>‡</sup> Lars Gaigalat,<sup>3</sup> Alexander Goesmann,<sup>2</sup> Sabine Kay,<sup>1</sup> Oliver Kirchner,<sup>1</sup> Christa Lanz,<sup>4</sup> Burkhard Linke,<sup>2</sup> Alice C. McHardy,<sup>2</sup>¶ Folker Meyer,<sup>2</sup> Gerhard Mittenhuber,<sup>5</sup>§ Dietrich H. Nies,<sup>5</sup> Ulla Niesbach-Klösgen,<sup>1</sup> Thomas Patschkowski,<sup>3</sup> Christian Rückert,<sup>3</sup> Oliver Rupp,<sup>2</sup> Susanne Schneiker,<sup>3</sup> Stephan C. Schuster,<sup>4</sup>∥ Frank-Jörg Vorhölter,<sup>3</sup> Ernst Weber,<sup>1</sup> Alfred Pühler,<sup>3</sup> Ulla Bonas,<sup>1\*</sup> Daniela Bartels,<sup>2</sup> and Olaf Kaiser<sup>3</sup>

Institut für Genetik, Martin-Luther-Universität, D-06120 Halle (Saale), Germany<sup>1</sup>; Center for Biotechnology (CeBiTec), Universität Bielefeld, D-33594 Bielefeld, Germany<sup>2</sup>; Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld, D-33594 Bielefeld, Germany<sup>3</sup>; Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, D-72076 Tübingen, Germany<sup>4</sup>; and Institut für Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität, D-06099 Halle (Saale), Germany<sup>5</sup>

Received 21 April 2005/Accepted 22 August 2005

The gram-negative plant-pathogenic bacterium Xanthomonas campestris pv. vesicatoria is the causative agent of bacterial spot disease in pepper and tomato plants, which leads to economically important yield losses. This pathosystem has become a well-established model for studying bacterial infection strategies. Here, we present the whole-genome sequence of the pepper-pathogenic Xanthomonas campestris pv. vesicatoria strain 85-10, which comprises a 5.17-Mb circular chromosome and four plasmids. The genome has a high G+C content (64.75%) and signatures of extensive genome plasticity. Whole-genome comparisons revealed a gene order similar to both Xanthomonas axonopodis pv. citri and Xanthomonas campestris pv. campestris and a structure completely different from Xanthomonas oryzae pv. oryzae. A total of 548 coding sequences (12.2%) are unique to X. campestris pv. vesicatoria. In addition to a type III secretion systems described so far in gramnegative bacteria. Remarkably, one of the putative type IV secretion systems encoded on the largest plasmid is similar to the Icm/Dot systems of the human pathogens Legionella pneumophila and Coxiella burnetii. Comparisons with other completely sequenced plant pathogens predicted six novel type III effector proteins and several other virulence factors, including adhesins, cell wall-degrading enzymes, and extracellular polysaccharides.

Xanthomonas campestris pv. vesicatoria (also designated Xanthomonas axonopodis pv. vesicatoria [101] or Xanthomonas euvesicatoria [46]) is a gram-negative, rod-shaped  $\gamma$ -proteobacterium with a high genomic G+C content. Members of the genus Xanthomonas represent an omnipresent group of plantpathogenic bacteria which infect most economically important crop plants and cause a broad variety of diseases (54). X. campestris pv. vesicatoria, the causative agent of bacterial spot disease on pepper (Capsicum spp.) and tomato (Lycopersicon spp.) plants, enters the plant tissue through stomata and wounds. Bacterial colonization of plant intercellular spaces is locally restricted and induces macroscopically visible disease

symptoms, so-called water-soaked lesions that later become necrotic (91). The disease results in defoliation and severely spotted fruits, both of which cause massive yield losses. Bacterial spot disease occurs worldwide but is most pernicious in regions with a warm and humid climate.

Pathogenicity of X. campestris pv. vesicatoria depends on a type III protein secretion system (TTSS) (11, 17), which is highly conserved among plant and animal pathogenic bacteria (24, 97). In X. campestris pv. vesicatoria, the TTSS is encoded by the chromosomal hrp gene cluster (hypersensitive response and pathogenicity) (11) and translocates effector proteins into the plant cell (96). Once inside the plant cytoplasm, the effectors modulate host cell processes, such as suppression of the plant basal defense mechanisms, for the benefit of the pathogen (1, 13). Some effectors, termed avirulence proteins, are recognized by the host plant. This leads to the induction of the plant defense, including a rapid, locally restricted cell death reaction, the hypersensitive response, which ultimately arrests bacterial growth (1). So far, only a small number of type III effectors have been identified in X. campestris pv. vesicatoria, and their molecular functions are widely unknown (17, 19, 70, 82)

The expression of the Hrp TTSS is controlled in X. campes-

<sup>\*</sup> Corresponding author. Mailing address: Martin-Luther-Universität, Institut für Genetik, Weinbergweg 10, D-06120 Halle (Saale), Germany. Phone: 49-345-5526290. Fax: 49-345-5527277. E-mail: ulla.bonas @genetik.uni-halle.de.

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

Present address: Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, D-14476 Potsdam-Golm, Germany.
 Present address: Bioinformatics & Pattern Discovery Group, IBM

<sup>¶</sup> Present address: Bioinformatics & Pattern Discovery Group, IBM Thomas J. Watson Research Center, Yorktown Heights, NY 10598.

<sup>||</sup> Present address: Department of Biochemistry & Molecular Biology, Pennsylvania State University, PA 16802.

<sup>§</sup> Present address: Kesterstr. 27, D-86153 Augsburg, Germany.

Vol. 187, 2005

XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. VESICATORIA GENOME SEQUENCE 7255

*tris* pv. vesicatoria in planta by two key regulatory proteins, HrpG and HrpX (107, 109). The OmpR family regulator HrpG is activated by an unknown mechanism and controls the expression of a genome-wide regulon, including *hrp* and effector genes and several TTSS-unrelated genes (71). Many, but not all, HrpG-regulated genes are also regulated by HrpX, an AraC-type regulator which is controlled by HrpG. Since some HrpX-regulated genes contain a conserved sequence motif in their promoter region (*p*lant-*i*nducible *p*romoter [PIP] box; TTCGC-N<sub>15</sub>-TTCGC), it is speculated that HrpX controls their expression by binding to this promoter element (35, 107).

Recently, genome analyses and comparative genomics have been used to identify novel virulence factors. Genome sequencing of the phytopathogenic bacteria Xanthomonas axonopodis pv. citri, Xanthomonas campestris pv. campestris (26), Xanthomonas oryzae pv. oryzae (53), Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 (14), Erwinia carotovora subsp. atroseptica (8), and Ralstonia solanacearum (87) proved to be a milestone for the identification of putative effectors and other candidate pathogenicity factors by bioinformatic approaches (19). All of these pathogens have different lifestyles and host specificities. For example, X. axonopodis pv. citri causes citrus canker, whereas X. campestris pv. campestris is the causative agent of black rot, a systemic disease on a wide range of crucifers. Xanthomonas oryzae pv. oryzae causes bacterial blight on rice, which leads to massive yield losses. R. solanacearum, which belongs to the β-proteobacteria, has an unusually wide host range and, as X. campestris pv. vesicatoria does, also infects tomato. The identification of the complete repertoire of virulence factors of these bacteria and their biological functions is a prerequisite to understanding the pathogen-plant interaction, e.g., different host range and infection strategies.

Here, we describe the complete genome sequence of *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10, which is pathogenic for pepper but not for tomato plants (pepper race 2) (20, 63). Strain 85-10 was chosen because it is a well-established model for bacterium-plant interactions. For instance, type III secretion and several avirulence genes have been studied in this strain in great detail (17, 19). By comparison with other plant-pathogenic bacteria, we have gained novel insights into the genome evolution of xanthomonads and detected unique features of strain 85-10, such as its specific set of candidate virulence determinants.

#### MATERIALS AND METHODS

Whole-genome sequencing. Genomic DNA from X. campestris pv. vesicatoria 85-10 (20) was extracted from cells grown at 30°C in NYG liquid cultures (25) using the Genomic-tip 100/G kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). DNA shotgun libraries with insert sizes of 1 kb and 2 to 3 kb were constructed in pGEM-T (Promega GmbH, Mannheim, Germany), and 8-kb fragments were cloned into pTrueBlue-rop (MoBiTec GmbH, Göttingen, Germany) by MWG Biotech AG (Ebersberg, Germany). Plasmid clones were end sequenced on ABI 3700 sequencers (PE Applied Biosystems) by MWG Biotech AG. Base calling was done using TraceTuner (PE Applied Biosystems). High-quality reads were defined by a minimal length of 250 bp, with an averaging quality value of  $\geq$ 20 in a sliding window of 30 bp. Finally, 70,042 high-quality reads, a total of 49,029 (5.66 X), 14,183 (1.64 X), and 6,830 (0.79 X) end sequences (X's indicate genome equivalents) from libraries with 1-kb, 2- to 3-kb, and 8-kb inserts, respectively.

Sequence assembly and validation. Base calling, quality control, and elimination of vector DNA sequences of the sequences were performed using the software package BioMake (Bielefeld University, unpublished) as described previously (47). Sequences were assembled using the PHRAP assembly tool (www.phrap.org), resulting in 139 contigs. For finishing of the genome sequence, the Consed/Autofinish software package (38, 39) was used, supplemented by the in-house tool BACCardI (5).

For gap closure and assembly validation, a fosmid library with inserts of approximately 35 to 38 kb was constructed using the EpiFOS fosmid library production kit (Epicenter, Madison, WI). A total of 768 fosmid clones were end sequenced on ABI 3730xl and ABI 377 sequencers by the Max Planck Institute for Developmental Biology (Tübingen, Germany) and IIT GmbH (Bielefeld, Germany), respectively. Remaining gaps were closed by sequencing on shotgun and fosmid clones carried out by IIT GmbH on LI-COR 4200L (LI-COR Inc., Lincoln, NE) and ABI 377 sequencers. Additionally, gaps were closed on fosmids using an ABI 3730xl DNA analyzer by the Max Planck Institute for Developmental Biology. To obtain a high-quality genome sequence, all regions of the consensus sequence were polished to at least phred40 quality by primer walking. Collectively, 1,731 sequencing reads were added to the primary shotgun assembly for the finishing and polishing of the genomic sequence. Repetitive elements, i.e., insertion sequence (IS) elements and rRNA operons, were sequenced completely by primer walking on fosmids and, in some cases, on shotgun clones. For assembly validation, fosmid end sequences were mapped onto the genome sequence employing BACCardI (5).

Genome analysis and annotation. The genome was annotated using GenDB 2.0 (62). Briefly, a combined gene prediction strategy (58) was applied on the assembled sequences using Glimmer (88) and CRITICA (4). Putative ribosomal binding sites and tRNA genes were identified with RBSfinder (94) and tRNAscan-SE (57), respectively. Prior to the manual annotation of each predicted gene, an automatic functional annotation was computed based on different analyses. Similarity searches were performed against different databases, including SWISS-PROT and TrEMBL (9), KEGG (48), Pfam (6), TIGRFAM (41), and InterPro (65). Additionally, SignalP (67), helix-turn-helix (32), and TMHMM (52) were applied. Finally, each gene was functionally classified by assigning a clusters of orthologous groups (COG) number and corresponding COG category (98) and gene ontology numbers (42). Putative membrane transporters were compared against the transporter classification (TC) database for functional assignment (16). Potential substrates of the twin-arginine translocation (TAT) secretion pathway were predicted using TATFind 1.2 (30).

Genomic comparison. For comparative analyses, the annotated genome sequences of the following bacteria were imported into GenDB: X. campestris pv. campestris ATCC 33913 (GenBank accession no. AE008922) (26), X. axonopodis pv. citri 306 and plasmids pXAC33 and pXAC64 (GenBank accession nos. AE008923, AE008924, and AE008925, respectively) (26), X. oryzae pv. oryzae KACC10331 (GenBank accession no. AE013598) (53), Erwinia carotovora subsp. atroseptica SCRI1043 (GenBank accession no. BX950851) (8), Xylella fastidiosa 9a5c (GenBank accession nos. AE016853 to AE016855) (14), and Ralstonia solanacearum GMI1000 (GenBank accession nos. AL646052 and AL646053) (87). Homology searches were conducted on the nucleotide and amino acid sequence level using BLAST (2). Comparisons of chromosomal sequences were carried out with the Artemis Comparison Tool (ACT) (www.sanger.ac.uk /Software/ACT).

**Detection of regions with atypical G+C content.** Genomic regions with atypical G+C content were identified using a "sliding window" technique with a window size of 2,000 bp and a step size of 1,000 bp. For this, the G+C content was treated as a Gaussian distribution, and regions with differences of at least 1.5 standard deviations from the mean were calculated.

**Database submission.** The nucleotide sequences of the chromosome of *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10 and its four plasmids, pXCV2, pXCV19, pXCV38, and pXCV183, were submitted to GenBank (accession numbers: AM039948, AM039949, AM039950, AM039951, and AM039952). Sequence files giving more annotation details are available in the supplementary material at https://www.genetik.uni-bielefeld.de/GenoMik/genomeproj.html.

### **RESULTS AND DISCUSSION**

General features of the X. campestris pv. vesicatoria genome. The X. campestris pv. vesicatoria strain 85-10 genome sequence was established by employing a whole-genome shotgun approach. In the final consensus sequence, each base matched at least phred40 quality. The assembly of the high-quality sequence was validated by a complete fosmid map (Fig. 1).
### 7256 THIEME ET AL.



JKLDOMNPTCGEFHIQRSUV



FIG. 1. Circular representations of the X. campestris pv. vesicatoria strain 85-10 chromosome displaying relevant genome features (A and B) and validation of the sequence assembly by a fosmid map (B). (A) From the outer to the inner concentric circle: circle 1, genomic position in kilobases; circles 2 and 3, predicted CDS on the forward (outer wheel) and the reverse (inner wheel) strands colored according to the assigned COG classes; circles 4, 5, and 6, CDS with homologs in the chromosomes of X. axonopodis pv. citri (pink), X. campestris pv. campestris (dark blue), and X. oryzae pv. oryzae (light blue), respectively; circle 7, the G+C content showing deviations from the average (64.75%); circle 8, GC skew. The bar below the circles represents the COG colors for the functional groups (C, energy production and conversion; D, cell cycle control, mitosis, and meiosis; E, amino acid transport and metabolism; F, nucleotide transport and metabolism; G, carbohydrate transport and metabolism; H, coenzyme transport and metabolism; I, lipid transport and metabolism; J, translation; K, transcription; L, replication, recombination, and repair; M, cell wall/membrane biogenesis; N, cell motility; O, posttranslational modification, protein turnover, and chaperones; P, inorganic ion transport and metabolism; Q, secondary metabolite biosynthesis, transport, and catabolism;

J. BACTERIOL.

*X. campestris* pv. vesicatoria contains a single, circular chromosome of 5,178,466 bp (Fig. 1) and four extrachromosomal elements (Table 1). While the presence of plasmids pXCV2 (1,852 bp), pXCV38 (38,116 bp), and pXCV183 (182,572 bp) was known previously (unpublished data), the genome project revealed the existence of a fourth plasmid, which was designated pXCV19 (19,146 bp) (Table 1).

The G+C content averages 64.75% for the chromosome and varies between 56.59% and 60.73% for the plasmids. The origin of replication is clearly detectable by a bias of G toward the leading strand (GC skew) (76). The *dnaA* gene is located in this region, and, therefore, its start codon has been defined as the zero point of the chromosome (Fig. 1). The GC skew analysis of the chromosome indicates a bidirectional replication mechanism, but the chromosome is not clearly divided into two equal replichores (Fig. 1A). The location of the predicted replication terminus appears to be skewed from the 180° position opposite to *oriC*, resulting in an approximately 370-kb size difference between the replichores.

*X. campestris* pv. vesicatoria contains a total of 4,726 predicted coding sequences (CDS) (Table 1). The chromosome shows an average coding capacity of 87.13%, which is typical for most bacteria. There is no significant asymmetry in the distribution of CDS on the chromosome between the leading strand (2,223 CDS; 49.5%) and the lagging strand (2,264 CDS; 50.5%). Based on the manual annotation, biological roles were assigned to 3,080 of the 4,726 CDS. The remaining 1,646 CDS comprise 697 conserved hypothetical CDS and 949 CDS of unknown function (Fig. 1A; Table 1).

*X. campestris* pv. vesicatoria contains two rRNA operons organized in the order 16S-23S-5S and located in a region of approximately 500 kb (between 4,600,000 bp and 5,100,000 bp) on the left replichore (Fig. 1B). Altogether, 56 genes for tRNAs representing all 20 amino acids were identified. A total of 54 tRNA genes are located on the chromosome (Fig. 1B), whereas two genes for tRNAs both recognizing the AUA codon are exclusively carried on the plasmids pXCV19 and pXCV183 (Table 1).

**Horizontal gene transfer and genome plasticity.** The genome of *X. campestris* pv. vesicatoria contains 66 IS elements. A total of 58 IS elements are located on the chromosome, and 8 are located on the four plasmids (Table 1; see supplementary Table 1 at https://www.genetik.uni-bielefeld.de/GenoMik/genomeproj .html). A total of 48 elements belong to the IS3 family, 10 elements belong to the IS5 family, and 4 elements belong to the IS6

R, general function prediction only; S, function unknown; T, signal transduction mechanisms; U, intracellular trafficking and secretion; V, defense mechanisms). (B) Fosmid map of the *X. campestris* pv. vesicatoria chromosome. Each green arc represents a single fosmid clone mapped onto the assembled sequence; circle 1, coverage of the *X. campestris* pv. vesicatoria chromosome with fosmid clones (green indicates that the chromosome is covered by more than one fosmid clone, and yellow indicates that the chromosome is covered by one fosmid clone.); circle 2, genes coding for the different secretion systems and the flagellar gene cluster (red, Sec and TAT pathway; black, putative type I secretion system; blue, type II secretion systems; magenta, type III secretion system; green, type IV system components; brown, flagellar system); circle 3, complete IS elements; circle 4, tRNA genes (green) and the two rRNA operons (blue).

Vol. 187, 2005

XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. VESICATORIA GENOME SEQUENCE 7257

TABLE 1	. Features	of the	chromosome	and	plasmids	of X.	campestris	pv.	vesicatoria	strain	85-10	)
					r		r	L				

Facture	Chromosomo	Plasmid				
reature	Chromosome	pXCV2	pXCV19	pXCV38	pXCV183	
Size, bp	5,178,466	1,852	19,146	38,116	182,572	
G+C content, %	64.75	56.59	59.76	60.73	60.49	
CDS						
Predicted no. of CDS	4,487	2	22	43	172	
Function assigned	2,965	1	12	26	76	
Conserved hypothetical protein	658		4	14	21	
Hypothetical protein	864	1	6	3	75	
% of genome coding	87.13	80.72	82.86	84.81	85.52	
Average length, bp	1,009	767	722	754	910	
Maximal length, bp	11,130	1,059	2,976	2,976	5,259	
% ATG initiation codons	83.42	100	68.18	90.70	84.30	
% GTG initiation codons	12.70		31.82	9.30	13.37	
% TTG initiation codons	3.77				2.33	
Ribosomal RNA operons	2					
Transfer RNA	54		1		1	
Insertion sequence elements	58		2	1	5	

family. Four IS elements could not be grouped with a known family. In *X. campestris* pv. vesicatoria, the IS3 family member IS476/IS1477 (20 copies) is the most abundant element. IS476 has been characterized in *X. campestris* pv. vesicatoria and shown to inactivate the avirulence gene *avrBs1* (50). The IS3 family is also highly abundant in *X. axonopodis* pv. citri, whereas in *X. campestris* pv. campestris, most IS elements belong to the IS3 and IS5 families.

An indication of high genomic plasticity is the presence of atypical DNA regions, for example, regions that differ in their G+C contents from the average of the genome. Most likely, these regions were acquired by horizontal gene transfer (31). The chromosomal CDS range in their G+C contents from 40.1% to 75.1%, with an average of 65.1%. More than 85% of the CDS have a G+C content between 60% and 70%. Analysis of the 30 CDS with the lowest G+C contents (40.1% to 50.4%) revealed that 50% are ORFans, i.e., genes that are restricted to a particular genome and that possess no known homologs. With one exception, these ORFans are short (average length, 475 bp). A total of 21 ORFans are found in the vicinity of IS elements. In contrast, there are no ORFans among the 30 CDS with the highest G+C contents (72.3% to 75.1%). The small size and low G+C content of the ORFans in X. campestris pv. vesicatoria are similar to observations made in Escherichia coli (28).

To identify alien nucleotide sequences, the chromosome was analyzed for regions with significant deviations from the genomic mean in G+C content (see Materials and Methods). These regions vary in size between 2 kb and 26 kb and contain 50 out of 58 IS elements and 15 tRNA genes. The presence of IS elements and tRNA genes is typical for genomic islands (31). Interestingly, the two largest regions (3,870,000 to 3,899,000 bp and 3,190,000 to 3,215,000 bp) carry parts of a type IV secretion system (*virB6* or *virB9*, *virB8*, and *virD4*) and components of the type 4 pilus (i.e., *pilE* and *fimT*). The location of parts of the type IV apparatus within a genomic region of atypical G+C content, an indicator for horizontal gene transfer, has also been observed for *Wolinella succinogenes*, a member of the  $\varepsilon$ -proteobacteria (3). Interestingly, another ~15-kb atypical region carries the complete xanthan biosyn-

thesis cluster *gumA* to *gumM* and is flanked on one side by IS1477. An  $\sim$ 14-kb region harboring genes with homology to the filamentous phage  $\phi$ Lf ( $\sim$ 2,784,000 to 2,798,000 bp) could also be identified by this approach. Additionally, smaller atypical regions encode putative virulence determinants, such as type III effector proteins and adhesins (see below).

In summary, features such as the high number of mobile elements and deviations in G+C content suggest a highly flexible genome. This is advantageous for pathogen evolution driven by the need for continuous adaptation to the host in order to evade or suppress coevolving host defense mechanisms. This idea is corroborated by the presence of a large number of virulence determinants (see below).

Comparison of the X. campestris pv. vesicatoria sequence to genomes of other plant-pathogenic bacteria. Previously, the complete genomic sequences of three different xanthomonads, X. axonopodis pv. citri, X. campestris pv. campestris, and X. oryzae pv. oryzae, causal agents of citrus canker, the systemic black rot disease of crucifers, and rice blight, respectively, were determined (26, 53). All four xanthomonads have similar chromosome sizes: however, they differ in their plasmid contents. X. campestris pv. vesicatoria harbors four plasmids, and X. axonopodis pv. citri carries two plasmids, whereas X. campestris pv. campestris and X. oryzae pv. oryzae lack any plasmids. A comparison of the chromosomal sequences of the four xanthomonads revealed that X. campestris pv. vesicatoria is most closely related to X. axonopodis pv. citri (Fig. 1A; Fig. 2). Since the genome structure of X. oryzae pv. oryzae is completely different from the three other xanthomonads (Fig. 2B), we focused our comparative analyses of the genomic organization on X. axonopodis pv. citri and X. campestris pv. campestris. Most genes are syntenic to each other among these three xanthomonads; however, striking differences are found between the flagellar gene cluster and the replication terminus of the chromosomes (Fig. 1A; Fig. 2A). Integration events in this region are probably the reason for the asymmetric replichores (see above).

The DNA sequences of *X. campestris* pv. vesicatoria and *X. campestris* pv. campestris chromosomes differ in the locations of some large gene clusters (Fig. 2A). For instance, two

7258

THIEME ET AL.



FIG. 2. Comparison of the chromosomal sequences of (A) X. axonopodis pv. citri (Xac), X. campestris pv. vesicatoria (Xcv), and X. campestris pv. campestris (Xcc) and (B) X. campestris pv. vesicatoria (Xcv) and X. oryzae pv. oryzae (Xoo) using ACT. Red lines indicate DNA sequences longer than 400 bp with at least 80% identity. The darker the color, the higher the DNA identity. Numbers mark the locations of different gene clusters on the chromosomes, which encode (1) the hrp type III secretion system, (2) the xcs type II secretion system, (3) the flagellar system, and (4) the xps type II secretion system. Dashed lines highlight the less-conserved region in the middle of the X. campestris pv. vesicatoria, X. axonopodis pv. citri, and X. campestris pv. campestris chromosomes.

gene clusters coding for different type II secretion systems and their flanking regions are colinear between *X. campestris* pv. vesicatoria and *X. axonopodis* pv. citri, whereas their positions are exchanged in the chromosome of *X. campestris* pv. campestris compared to the other two xanthomonads (Fig. 2A). The same is true for the chromosomal location of the *hrp* gene cluster, which is found at the same position in *X. campestris* pv. vesicatoria and *X. axonopodis* pv. citri but at a different location in *X. campestris* pv. campestris (Fig. 2A). Thus, the chromosomes of *X. campestris* pv. vesicatoria and *X. axonopodis* pv. citri are not completely colinear with *X. campestris* pv. campestris (Fig. 2A).

Using a cutoff E value of  $10^{-30}$ , comparisons of the predicted protein sequences of the four xanthomonads revealed that 2,999 CDS (66.8%) of the *X. campestris* pv. vesicatoria chromosome are orthologs of genes in *X. axonopodis* pv. citri, *X. campestris* pv. campestris, and *X. oryzae* pv. oryzae, thus representing the conserved chromosomal backbone of these four species. A total of 184 CDS (4.1%), 87 CDS (1.9%), and 45 CDS (1.0%) were considered orthologs of genes present in only *X. axonopodis* pv. citri, *X. campestris* pv. campestris, and *X. oryzae* pv. oryzae, respectively. A total of 548 CDS (12.2%) are unique to *X. campestris* pv. vesicatoria, most of which encode hypothetical and conserved hypothetical proteins.

We also compared X. campestris pv. vesicatoria with the

J. BACTERIOL.

following other plant-pathogenic bacteria: X. fastidiosa, P. syringae pv. tomato, R. solanacearum and E. carotovora subsp. atroseptica. Because of the low overall DNA sequence identity, we limited the comparisons to predicted protein sequences. Using the same cutoff E value as above, there are 1,714 CDS (38.2%) in X. campestris pv. vesicatoria which are homologous to predicted proteins of X. fastidiosa, 1,780 CDS (39.7%) of P. syringae pv. tomato, 1,600 CDS (35.7%) of R. solanacearum (chromosome and megaplasmid), and 1,434 CDS (32.0%) of E. carotovora subsp. atroseptica.

Four plasmids of X. campestris pv. vesicatoria strain 85-10. Many Xanthomonas strains carry plasmids, but little is known about their function and relevance for pathogenicity (102). X. campestris pv. vesicatoria strain 85-10 harbors four different plasmids (Table 1). The smallest plasmid, pXCV2, is basically identical to pXV64 of X. campestris pv. vesicatoria strain Xv64 (106). The presence of plasmid pXCV19 was detected only due to the efforts of the genome sequencing project and contains almost exclusively genes necessary for plasmid partitioning and conjugation. pXCV38 shows similarities to the X. axonopodis pv. citri plasmid pXAC33; however, pXCV38 lacks the type III effector genes pthA1 and pthA2. Instead, pXCV38 contains nine genes encoding a putative type IV secretion system of the Vir/Tra type (XCVc0028 to XCVc0033, XCVc0035, XCVc0041, and XCVc0042) which probably serve for conjugal transfer.

Intriguingly, the largest plasmid in strain 85-10, pXCV183, encodes a putative type IV secretion system which is most similar to the Icm/Dot system of human pathogens (21). We could identify 14 of the 22 components found in *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii* (21, 111) (see supplementary Table 2 at https: //www.genetik.uni-bielefeld.de/GenoMik/genomeproj.html). We alsofound candidate genes which could fulfill the function of the missing components. This is the first report of a putative Icm/Dot-like type IV secretion system in a plant-pathogenic bacterium. The essential role of Icm/Dot type IV secretion for the virulence of *Coxiella* and *Legionella* species (21, 111) suggests that this system might contribute to the virulence of *Xanthomonas*.

One interesting question concerns the segregational stability of the plasmids, which appears to be maintained by different mechanisms. pXCV183 contains a putative postsegregational killing system (Fig. 3) of the  $\zeta$  toxin (XCVd0099)  $\varepsilon$  antitoxin (XCVd0100) type (59), which is also present on pXAC64. Additionally, the presence of an isoleucin tRNA gene on plasmids pXCV183 and pXCV19, which is missing in the chromosome, might contribute to plasmid stability. This feature is unique for *X. campestris* pv. vesicatoria relative to *X. axonopodis* pv. citri.

Genetic information storage and processing. All basic genes for information storage and processing (i.e., DNA replication, recombination, repair, transcription, and translation) are present. Interestingly, there are three genes encoding histone-like nuclear structuring proteins (H-NS). Mutations in these genes often have pleiotropic effects, and a regulatory function of these genes in virulence has been implicated (80).

Most of the transcriptional regulators in *X. campestris* pv. vesicatoria belong to one of the following families: LysR (40 genes), AraC (18 genes), TetR (17 genes), LacI (10 genes), and MarR (10 genes). In addition, *X. campestris* pv. vesicatoria



FIG. 3. Comparison between three effector integron regions of the *X. campestris* pv. vesicatoria genome. Schematic overview of the chromosomal (A) *xopC*, (B) XCV2280, and (C) the *avrBs1* region on plasmid pXCV183. Gray shaded regions indicate DNA identities of at least 80%, and red marks indicate CDS with low G+C content. Single-headed arrows represent CDS and the direction of transcription. Red arrows refer to putative effector genes. Green CDS are related to mobile genetic elements. Green double-headed arrows represent IS elements, black arrows represent a putative postsegregational killing system, and white arrows represent genes of unknown function. Blue triangles refer to 62-bp inverted region was calculated for 100-bp windows (65% on average) and is displayed at the bottom.

contains several putative two-component signal transduction systems. Approximately half of the 68 response regulators possess a predicted DNA binding motif as an output domain, while the rest contain other output domains, such as diguanylate cyclase (GGDEF domain), cyclic diguanylate (c-diGMP) phosphodiesterase (EAL domain), metal-dependent phosphohydrolase (HD domain), and CheB-like methylesterase. Altogether, 29 GGDEF and 14 EAL domains were found. These protein domains are responsible for the synthesis and turnover of the secondary messenger c-diGMP. Originally, this signal molecule was identified as an allosteric regulator of the cellulose synthase of Glucoacetobacter xvlinum (86). In several bacteria, cellulose serves as an extracellular matrix involved in biofilm formation (84). Interestingly, X. campestris pv. vesicatoria also possesses a cellulose synthase operon (XCV3640 to XCV3644) with a c-diGMP binding subunit (XCV3642). However, this catalytic subunit is probably not functional due to an internal stop codon (XCV3643 to XCV3644).

Although histidine kinases and methyl-accepting proteins (see below) are the main sensors of extracellular signals, they are by no means the only ones present in *X. campestris* pv. vesicatoria. As known for most bacteria, PAS (31 proteins) and GAF (17 proteins) domains are the most common cytoplasmic signaling domains found in *X. campestris* pv. vesicatoria (99).

Finally, the genome of *X. campestris* pv. vesicatoria encodes 15 RNA polymerase  $\sigma$  factors (69), including 1 primary  $\sigma$  factor (RpoD), 1 heat-shock factor (RpoH), 1 flagellar-specific factor (FliA), 10 alternate extracytoplasmic function-type factors, and 2  $\sigma$ 54 family factors (RpoN). Interestingly, one of the alternate sigma factors (XCV1276) carries a C-terminal extension of approximately 200 amino acids which is unique to *X. campestris* 

pv. vesicatoria, X. campestris pv. campestris, and X. oryzae pv. oryzae.

The high number and modular diversity of regulatory proteins relative to those of other bacteria, e.g., *E. coli* (36), suggest that xanthomonads are able to cope with complex and changing environmental conditions. Future studies will reveal whether any of these proteins are components of the regulatory cascade which controls expression of virulence factors like the TTSS.

Quorum sensing, chemotaxis, and motility for the adaptation to environmental conditions. Quorum sensing is a mechanism by which bacteria regulate the expression of certain genes in response to their population density (103). Only a few xanthomonads appear to produce the typical autoinducer molecule L-homoserine lactone, and there is no indication that X. campestris pv. vesicatoria does so (22). Two different alternative autoinducers have been well studied in X. campestris pv. campestris. The diffusible signal factor (DSF), an  $\alpha$ , $\beta$ -unsaturated fatty acid (105), is involved in the regulation of the synthesis of extracellular enzymes, exopolysaccharides, and cyclic glucans. Eight genes (rpfA to H) which are involved in DSF production and perception are also present in X. campestris pv. vesicatoria, thus providing circumstantial evidence for the existence of a DSF regulatory system in X. campestris pv. vesicatoria. A second diffusible factor (DF), a butyrolactone, is involved in the regulation of pigment (xanthomonadin) and exopolysaccharide synthesis in X. campestris pv. campestris (77). Next to the xanthomonadin biosynthesis gene cluster in X. campestris pv. vesicatoria is an operon that might correspond to the pigB locus of X. campestris pv. campestris, which has been implicated in the synthesis of DF (77). Both quorum-

### 7260 THIEME ET AL.

sensing systems participate in the regulation of exopolysaccharide, an important virulence factor in *X. campestris* pv. campestris (75, 78). Based on the conserved gene content, these systems are probably functional in *X. campestris* pv. vesicatoria.

X. campestris pv. vesicatoria carries a single unipolar flagellum. We identified a 147-kb region in the chromosome (116 genes, XCV1929 to XCV2044) which is almost exclusively devoted to chemotaxis and flagellar biosynthesis. The most interesting feature of this large chromosomal region is the presence of 14 tandemly repeated genes encoding methyl-accepting chemotaxis proteins. Similar gene clusters were also found in X. axonopodis pv. citri (10 mcp genes), X. campestris pv. campestris (10 mcp genes), and X. oryzae pv. oryzae (7 mcp genes). Intriguingly, this region appears to be highly dynamic since its size and gene order differ among the four Xanthomonas strains analyzed. The following other chemotaxis-related genes are also present in several copies which are dispersed in the chromosome: 10 more mcp genes, 3 cheA homologs, 2 cheB homologs, 4 cheR homologs, and 6 cheW homologs. It will be interesting to elucidate which environmental stimuli are sensed by this complex chemotactic system.

Bacterial motility is not limited to swimming. Type 4 pili enable movement by retraction and mediate bacterial adhesion to plant tissue. Immunofluorescence studies showed that purified type 4 pili of *X. campestris* pv. hyacinthi attached to stomata of hyacinth leaves, suggesting a role for these surface structures in the first stages of yellow disease (100). In *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10, several operons are predicted to encode components of type 4 pili. Although type 4 pilins are very diverse in their primary structure, they can be identified by the presence of a prepilin peptidase-processing site followed by a transmembrane  $\alpha$ -helix. Using this criterion, 15 type 4-related pilin genes were found, 8 of which are part of the two different type II protein secretion systems (see below). So far, the function of type 4 pili in pathogenicity of *X. campestris* pv. vesicatoria is not clear (74).

Surface structures involved in bacterial interactions. Besides type 4 pili, several other surface structures might be implicated in the adherence of gram-negative bacterial pathogens. X. campestris pv. vesicatoria encodes several proteins which could act as adhesins (XCV1860, XCV1861, XCV2103, XCV3670, XCV3672, XCV4203, and XCV4444), such as homologs of the Yersinia proteins YapH and YadA (43), HecA from Erwinia chrysanthemi (83), and the filamentous hemagglutinin from Bordetella pertussis (56). In E. chrysanthemi, HecA is encoded next to the TTSS cluster and plays a role in virulence (51). Homologs of hecA are also present in the genomes of Xylella spp. and R. solanacearum (83). The nonfimbrial adhesin YadA forms a sheath-like structure on the surface of Yersinia and mediates adherence to epithelial cells and autoagglutination (43). Homologs of YadA have been found in several plant and animal pathogenic bacteria (73), e.g., in X. oryzae pv. oryzae, where XadA was shown to be an important virulence factor (79).

Gram-negative bacteria exhibit complex sets of polysaccharides on their surfaces, which often contribute to their pathogenic interactions with plant and animal cells (29). The typical exopolysaccharide of the genus *Xanthomonas* is xanthan, the structure and biosynthesis of which have been well studied in *X. campestris* pv. campestris (7). The *gum* gene cluster which controls xanthan biosynthesis in *X. campestris* pv. campestris is conserved in *X. campestris* pv. vesicatoria (XCV2776 to XCV2789). Mutant studies in *X. campestris* pv. campestris demonstrated that xanthan gum is not essential for pathogenicity but contributes to bacterial aggressiveness against the host (49).

Lipopolysaccharides from Xanthomonas play a role as elicitors of plant defense reactions (61, 66). Lipopolysaccharide biosynthesis in X. campestris pv. vesicatoria strain 85-10 appears to follow the ABC transporter-dependent pathway (encoded by wzm and wzt). Next to the genes for the ABC transporter and the lipopolysaccharide core biosynthesis (rmd and gmd), several genes for O-antigen synthesis (wxc) are predicted. Interestingly, the wxc genes have counterparts in X. campestris pv. campestris but not in X. axonopodis pv. citri or X. oryzae pv. oryzae. However, all of the glycosyltransferase genes required for O-antigen modification in X. campestris pv. campestris (104) are missing in X. campestris pv. vesicatoria. Instead, two deviant glycosyltransferase genes (wbdA1 and wbdA2) were found within this gene cluster, and they encode homologs of mannosyltransferases (see supplementary Table 3 at https://www.genetik.uni-bielefeld.de/GenoMik /genomeproj.html). Thus, it seems that the O-antigen of X. campestris pv. vesicatoria is basically a polymannan, in contrast to the xylosylated polyrhamnan of X. campestris pv. campestris (64).

Surprisingly, a novel gene cluster of 11 genes (XCV1723 to XCV1733), which encodes a putative polysaccharide polymerase and a chain length regulator, both characteristic for heteropolymer polysaccharide biosynthesis, was identified. In addition, this cluster harbors three predicted glycosyltransferases and enzymes modifying sugar nucleotides or transferring amino or methyl groups. Homologs of this gene cluster were also found in the genomes of *X. axonopodis* pv. citri, *X. campestris* pv. campestris, and *X. oryzae* pv. oryzae. It is not clear which carbohydrate is produced by this novel gene cluster.

General transport systems. Candidate transport proteins have been classified according to the TC database (16). Most transport systems belong to the class of secondary transporters, such as proteins of the major facilitator superfamily (TC 2.A.1; 38 proteins) and the resistance-nodulation-cell division superfamily (TC 2.A.6; 15 proteins). Some secondary transporters are encoded in the close vicinity of accessory components (i.e., membrane fusion proteins, TC 8.A.1) which might be important for efflux of drugs, heavy metal cations, oligosaccharides, or proteins. Altogether there are 17 complete secondary transporter-type export systems, 10 of which also contain an outer membrane factor (TC 1.B.17). Often, secondary transporters lead to multidrug resistance (68). For Erwinia amylovora, it was shown that multidrug efflux contributes to virulence (15). Predominance of secondary transporters is in accordance with the fact that X. campestris pv. vesicatoria has an aerobic lifestyle.

Additionally, genes for 28 primary transporters (traffic ATPases; TP 3.A.1) were identified. Eight of these are associated with a gene encoding a periplasmic binding protein, indicating that these systems are responsible for import. One traffic ATPase (XCV1571 and XCV1573) is encoded next to genes for a membrane fusion protein (XCV1570) and an outer membrane factor (XCV1569). We believe that this gene cluster encodes a type I protein secretion system (see below) which exports several predicted extracellular proteases and peptidases.

Vol. 187, 2005

XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. VESICATORIA GENOME SEQUENCE 7261

TABLE 2. Putative pathogenicity factors and their no. of genes forX. campestris pv. vesicatoria strain 85-10

Factor by functional group	No. of genes
Secretion system	
Sec and TAT pathway	19
Type I secretion system	4
Type II secretion system	31
Type III secretion system	29
Type IV secretion system	35
Type V autotransporter	4
Others	4
Flagellum	44
Secreted proteins	
TAT substrates	66
Host cell wall-degrading enzymes	26
Type III effectors	20
Detoxification	65
Surface structures and adhesion	120
Quorum sensing	13

**Pathogenicity determinants of** *X. campestris* **pv. vesicatoria.** Bacterial secretion systems are important for the interaction of pathogens with the host (18). *X. campestris* **pv. vesicatoria** contains genes for all known protein transport systems in gram-negative bacteria, namely the Sec, signal recognition particle, and TAT pathways; at least one putative type I, two type II, one type III, and two putative type IV secretion systems of different types; four type V autotransporters; and two twopartner secretion systems (Table 2; supplementary Table 3). The presence of all known secretion systems was highlighted before for only the plant pathogens *E. carotovora* subsp. atroseptica (8) and *R. solanacearum* (37).

The Sec pathway is important for the export of many proteins into the periplasmic space (Table 2; see supplementary Table 3). The TAT system (*tatA-tatC*) offers an alternative route to the periplasm for folded proteins (81), but so far the function of this pathway has not been elucidated for *Xanthomonas*. Predicted candidate substrates of the TAT pathway are 66 proteins (Table 2; see supplementary Table 4 at https: //www.genetik.uni-bielefeld.de/GenoMik/genomeproj.html), e.g., putative xylosidases and cellulases.

Type II secretion systems of pathogenic bacteria secrete a vast number of proteins, including possible virulence determinants, into plant intercellular space (89). *X. campestris* pv. vesicatoria, like *X. axonopodis* pv. citri and *X. campestris* pv. campestris (26), harbors two type II secretion systems, whereas *X. oryzae* pv. oryzae encodes only one (Fig. 2). Remarkably, the gene for a prepilin leader peptidase is lacking. Instead, this task might be fulfilled by the type 4 pilus assembly leader peptidase (XCV3355) (45). In *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10, likely substrates include cellulases (nine candidates),  $\beta$ -glucosidases (five candidates), petate lyases (four candidates), polygalacturonases (three candidates), and xylanases (five candidates) (Table 2; see supplementary Table 3). These proteins probably exhibit plant cell wall-degrading activity. The nature and number of these candidates are similar

in all four xanthomonads. Additionally, we found a disrupted homolog of Pat-1 from the gram-positive tomato pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. michiganensis (XCV4424 and XCV4425). This gene, which encodes a putative secreted serine protease that is essential for wilt induction on tomato (33), is not present in *X. axonopodis* pv. citri and *X. campestris* pv. campestris. However, a nondisrupted homolog is present in *X. oryzae* pv. oryzae (XOO0986), suggesting a possible role of this gene in virulence.

In addition to the well-studied secretion systems, *X. campestris* pv. vesicatoria contains homologs of *raxST*, *raxA*, *raxB*, and *raxC* (XCV1244 to XCV1246 and XCV3591), which are involved in AvrXa21 activity in *X. oryzae* pv. oryzae. The nature of AvrXa21 is unknown, but it leads to specific recognition of bacteria in rice plants expressing the *Xa21* resistance gene (27). RaxA and RaxB show similarity to a double-glycine leader peptide-dependent secretion system and might, in concert with RaxC, secrete the so-far-unknown substrate (27).

The main virulence determinant of *X. campestris* pv. vesicatoria is the TTSS (17, 19), which is encoded by the *hrp* pathogenicity gene cluster (11) located in a 35.3-kb chromosomal genomic island (459,555 bp to 494,868 bp). Interestingly, the regions flanking the 16.2-kb core cluster (*hrcC-hpaB*) encode accessory components and substrates of the TTSS and are not conserved among the different xanthomonads (19, 53, 72).

Most promoters in the *hrp* gene cluster contain PIP boxes (TTCGC-N<sub>15</sub>-TTCGC), the supposed binding motif for the transcriptional regulator HrpX (35, 107). In addition to 8 known PIP boxes, we identified 15 novel boxes within a reasonable distance upstream of the CDS (Table 3). The genome contains 189 imperfect PIP boxes (TTCG-N<sub>16</sub>-TTCG); however, no clear association with pathogenicity-related genes is evident. Future work will elucidate how many of these genes are regulated by HrpG and HrpX and might play a role in pathogenicity. However, it is known already that not all HrpX-regulated genes possess this motif in their promoter regions (71). The genome sequence enables us to determine the complexities of HrpG- and HrpX-dependent regulation of gene expression by transcriptome analyses.

TTSS of plant pathogens translocate a large number of effector proteins into the plant cells (1). So far, 14 type III effectors of X. campestris pv. vesicatoria strain 85-10 are known (19, 60, 70, 82). Analysis of the X. campestris pv. vesicatoria genome sequence led to the identification of six new candidate effectors (XCVd0105, XCV0294, XCV1298, XCV2280, XCV3786, and XCV4428) (Table 4), most of which have homologs in other xanthomonads and different P. syringae strains but not in E. carotovora subsp. atroseptica (Table 4). Type III effectors of P. syringae were designated according to the new unified nomenclature (55). It appears that homologs of HopX2 (formerly HopPmaB), HopH1 (formerly HopPtoH), HopQ1-1 (formerly HopPtoQ), and XopP are distributed most widely among plant-pathogenic bacteria. For almost all effectors, homologous proteins can be found in other pathogenic bacteria. The only exception is XopC, which is unique for X. campestris pv. vesicatoria (70). It should be noted that in contrast to other X. campestris pv. vesicatoria strains, strain 85-10 does not contain homologs of the well-studied AvrBs3 family of effectors (17). Xanthomonads also lack effectors of the YopT family, which is

#### 7262 THIEME ET AL.

J. BACTERIOL.

TABLE 3. Characteristics of perfect PIP boxes in the chromosome of X. campestris pv. vesicatoria strain 85-10

Position <sup>a</sup>	Distance <sup>b</sup>	Gene product	
821742	119	pgl	Polygalacturonase
569831	153	trpE	Anthranilate synthase component I
532702	43	avrRxv <sup>c</sup>	Avirulence protein AvrRxv
490643	130	$xopA^d$	Xanthomonas outer protein A
477427	81	$hrpB1^d$	HrpB1 protein
477412	69	$hrcU^d$	HrcU protein
475194	855	$hpaC^{d}$	HpaC protein
473817	248	$hrcO^d$	HrcQ protein
470920	917	$hrp\widetilde{D}6^d$	HrpD6 protein
362283	945	gatA	Glu-tRNAGIn amidotransferase A subunit
244787	719	XCV0208	Putative secreted protein
62238	64	avrBs2	Avirulence protein AvrBs2
5169633	191	XCV4480	TonB-dependent outer membrane receptor (C-terminal fragment)
5020263	942	XCV4364	Xylosidase
4824118	922	yapH	Filamentous hemagglutinin-related protein
3910091	62	XCV3425	Predicted aminopeptidase
3634784	713	gcvH	Glycine cleavage H protein
3191886	273	XCV2805	IS1477 transposase
2894866	229	XCV2568	Putative secreted protein
2568565	140	pgl	6-Phosphogluconolactonase
2088821	976	XCV1851	ISXccl transposase
1631628	349	XCV1453	Conserved hypothetical protein
1371078	158	dnaE1	DNA polymerase III alpha chain protein

<sup>a</sup> Position of the first bp of the PIP box (TTCGC-N<sub>15</sub>-TTCGC) within the chromosomal sequence. PIP boxes in antisense direction and more than 1,000 bp distant from a CDS start were excluded.

<sup>b</sup> Distance in base pairs between the end of the PIP box and the start codon.

<sup>c</sup> AvrRxv is not regulated by HrpG (23). <sup>d</sup> HrpG/HrpX-dependent regulation shown (72, 108).

found in many animal and plant-pathogenic bacteria, such as P. syringae and R. solanacearum. In summary, the set of effectors differs between several species and even between closely related bacteria like the four xanthomonads (Table 4). The specific ef-

fector set of a given strain is certainly important for its interaction with the plant, thus potentially determining host range.

Ten of the 20 candidate and proven effector genes of X. campestris pv. vesicatoria show significantly lower G+C con-

fable 4.	Characteristics	of known and	predicted	type III	effector	proteins o	of <i>X</i> .	campestris pv	. vesicatoria	strain	85-	10
----------	-----------------	--------------	-----------	----------	----------	------------	---------------	---------------	---------------	--------	-----	----

C	Gene	Commont/s)4	G+C			Homo	log <sup>b</sup> in:			D - f - m - m - m (m)	
Gene no.	name	Comment(s)	(%)	Xac	Xcc	Xoo	Pst	Rs	Eca	Kelelelice(s)	
XCVd0104	avrBs1	Unknown function	42.23	_	+	_	_	_	_	85	
XCV0052	avrBs2	Putative glycerophosphoryl-diester phosphodiesterase	63.59	+	+	+	_	_	_	95	
XCV0471	avrRxv	YopJ/AvrRxv family, putative cysteine protease	52.32	-	(+)	_	-	+	_	110	
XCV0581	xopB	Homology to HopD1 (P. syringae pv. tomato)	55.54	_	_	_	+	_	_	71	
XCV2435	xopC	Unknown function	47.50	-	-	_	-	(+)	_	70	
XCV0437	xopD	SUMO cysteine protease; C48 family	54.76	_	+	_	_	_	_	44, 72	
XCV0414	xopF1	Unknown function	65.47	(+)	(+)	+	-	_	_	82	
XCV2942	xopF2	Unknown function	64.72	(+)	(+)	+	_	_	-	82	
XCV2156	xopJ	YopJ/AvrRxv family, putative cysteine protease	56.86	_	(+)	_	_	+	_	70	
XCV2944	xopN	Unknown function	63.44	+	+	+	_	_	-	82	
XCV1055	xopO	Homology to HopK1 and AvrRps4 (P. syringae)	52.04	_	_	_	+	_	_	82	
XCV1236	xopP	Unknown function	61.66	+	+	+	-	+	_	82	
XCV4438	xopQ	HopQ1-1 family protein, putative inosine-uridine nucleoside N-ribohydrolase	68.88	+	+	+	+	+	_	82	
XCV0572	xopX	Unknown function	65.95	+	+	+	_	_	_	60	
XCVd0105 <sup>c</sup>	<u>,</u>	Homology to HopAO1 ( <i>P. syringae</i> pv. tomato); putative tyrosine phosphatase	49.39	_	+	—	+	-	_		
XCV0294 <sup>c</sup>		Homology to HopX2 (P. syringae pv. maculicola)	63.34	+	+	_	+	+	_		
XCV1298 <sup>c</sup>		Homology to HopH1 (P. syringae pv. tomato)	52.02	_	+	+	+	+	_		
$XCV2280^{c}$		Homology to HopX2 (P. syringae pv. maculicola)	60.72	+	+	_	+	+	_		
XCV3786 <sup>c</sup>		Homology to HopK1 (P. syringae pv. tomato)	60.36	(+)	-	_	+	-	-		
$XCV4428^{c}$	avrRxoI	Homology to AvrRxoI (X. oryzae pv. oryzicola)	50.77	`-´	-	-	-	-	-	112	

<sup>a</sup> Putative function and homology to known type III effector proteins from Pseudomonas syringae or other Xanthomonas spp. For Pseudomonas effectors, the unified

nomenclature was used (55). <sup>b</sup> Homologs were determined using BLAST algorithms. –, absence of a homolog; +, presence of a homolog; (+), partial homology or a disrupted homolog in the corresponding genome (*Xac*, *X. axonopodis* pv. citri; *Xcc*, *X. campestris* pv. campestris; *Xoo*, *X. oryzae* pv. oryzae; *Pst*, *P. syringae* pv. tomato; *Rs*, *R. solanacearum*; *Eca*, *E. carotovora* subsp. atroseptica). <sup>c</sup> Putative type III effector, not experimentally verified.

Vol. 187, 2005

XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. VESICATORIA GENOME SEQUENCE 7263

tents, indicative for acquisition by horizontal gene transfer (31). This idea is corroborated by the fact that some of the predicted effector genes are located in the vicinity of mobile genetic elements. It is noteworthy that we identified two novel effector integrons similar to a previously described element (Fig. 3) (70). All three integrons are flanked by inverted repeats that were first identified next to genes coding for effectors of the AvrBs3 family (10, 70). One of the newly identified integrons is located on the chromosome and is associated with a gene (XCV2280) encoding a homolog of the effector HopX2 from P. syringae (Table 4) (40). The other integron is located on the plasmid pXCV183 and harbors the putative postsegregational killing system. This integron is flanked by a type III effector locus, which encodes AvrBs1 and a putative tyrosine phosphatase homologous to the effector HopAO1 (formerly HopPtoD2) from P. syringae pv. tomato DC3000 (12, 34). We were surprised that these are the only two effector genes present on the plasmids of X. campestris pv. vesicatoria strain 85-10. Similar effector integrons are also present in the X. axonopodis pv. citri chromosome and plasmid pXAC64 (70).

In addition to protein secretion systems, other factors might be important for the pathogen-plant interaction. We identified 65 proteins with possible functions in defense of *X. campestris* pv. vesicatoria against antimicrobial substances (Table 2; see supplementary Table 3). Interestingly, genes coding for a copper-efflux system of *X. campestris* pv. vesicatoria (XCV3747 and XCV3748) were first described to be carried on the same plasmid as AvrBs1 (92), but in strain 85-10, they are located on the chromosome. The known streptomycin resistance of this strain is encoded on a transposon (93). Additionally, we identified genes coding for catalases (five candidates), peroxidases (five candidates), and superoxide dismutases (four candidates), which might function in detoxification of reactive oxygen species produced during the plant defense reaction (see supplementary Table 3).

**Conclusions.** In this study, we present the complete genome sequence of *X. campestris* pv. vesicatoria, which revealed novel insights into the genome plasticity and pathogenicity of this important plant pathogen. All xanthomonads carry a high number of mobile elements; however, their set differs in each strain. Several regions of atypical G+C content are associated with both IS elements and tRNA genes and contain putative pathogenicity determinants which might have been acquired by horizontal gene transfer. The presence of four plasmids, two of which carry a tRNA gene not present on the chromosome, was unexpected. The role of the plasmids in pathogenicity is currently being addressed by plasmid curing.

Intriguingly, *X. campestris* pv. vesicatoria possesses all known types of protein secretion systems. Previous studies revealed that the TTSS is essential for pathogenicity. Here, several novel type III effectors were predicted and these will be analyzed in the future. In addition, the role of the other secretion systems in the interaction with the plant will be examined with a focus on cell wall-degrading enzymes and adhesins. One of the highlights of our genome analysis is the finding of a candidate Icm/Dot-like type IV secretion system in *X. campestris* pv. vesicatoria.

We were surprised by the number of genes devoted to regulation, a process that is poorly understood in *X. campestris* pv. vesicatoria. The identification of two quorum-sensing systems and of a complex and apparently dynamic chemotactic system will stimulate the study of regulation in the context of pathogenicity.

Finally, the first identification of genes possibly involved in adhesion will open new directions in the study of the complete arsenal of virulence factors in *X. campestris* pv. vesicatoria.

### ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully thank all the people involved in this project. This work was supported by the GenoMik initiative of the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) and grants to Ulla Bonas, Alfred Pühler, and the competence network center Bielefeld (BMBF grant numbers 031U213D and 0313105). D. H. Nies and G. Mittenhuber were supported by an HWP grant.

### REFERENCES

- Alfano, J. R., and A. Collmer. 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. Annu. Rev. Phytopathol. 42:385–414.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of notein database search programs. Nucleic Acids Res 25:3380–3402.
- tion of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389–3402.
   Baar, C., M. Eppinger, G. Raddatz, J. Simon, C. Lanz, O. Klimmek, R. Nandakumar, R. Gross, A. Rosinus, H. Keller, P. Jagtap, B. Linke, F. Meyer, H. Lederer, and S. C. Schuster. 2003. Complete genome sequence and analysis of *Wolinella succinogenes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 11690–11695.
- Badger, J. H., and G. J. Olsen. 1999. CRITICA: coding region identification tool invoking comparative analysis. Mol. Biol. Evol. 16:512–524.
   Bartels, D., S. Kespohl, S. Albaum, T. Druke, A. Goesmann, J. Herold, O.
- Bartels, D., S. Kespohl, S. Albaum, T. Druke, A. Goesmann, J. Herold, O. Kaiser, A. Pühler, F. Pfeiffer, G. Raddatz, J. Stoye, F. Meyer, and S. C. Schuster. 2005. BACCardI—a tool for the validation of genomic assemblies, assisting genome finishing and intergenome comparison. Bioinformatics 21:853–859.
- Bateman, A., E. Birney, L. Cerruti, R. Durbin, L. Etwiller, S. R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K. L. Howe, M. Marshall, and E. L. Sonnhammer. 2002. The Pfen protein families database. Nucleic Acids Res. 30:276–280
- The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res. 30:276–280.
  7. Becker, A., F. Katzen, A. Pühler, and L. Ielpi. 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50:145–152.
- 8. Bell, K. S., M. Sebaihia, L. Pritchard, M. T. Holden, L. J. Hyman, M. C. Holeva, N. R. Thomson, S. D. Bentley, L. J. Churcher, K. Mungall, R. Atkin, N. Bason, K. Brooks, T. Chillingworth, K. Clark, J. Doggett, A. Fraser, Z. Hance, H. Hauser, K. Jagels, S. Moule, H. Norbertczak, D. Ormond, C. Price, M. A. Quail, M. Sanders, D. Walker, S. Whitehead, G. P. Salmond, P. R. Birch, J. Parkhill, and I. K. Toth. 2004. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Envinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:11105–11110.
- Boeckmann, B., A. Bairoch, R. Apweiler, M. C. Blatter, A. Estreicher, E. Gasteiger, M. J. Martin, K. Michoud, C. O'Donovan, I. Phan, S. Pilbout, and M. Schneider. 2003. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. Nucleic Acids Res. 31:365–370.
- Bonas, U., J. Conrads-Strauch, and I. Balbo. 1993. Resistance in tomato to Xanthomonas campestris pv. vesicatoria is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene avrBs3. Mol. Gen. Genet. 238:261–269.
   Bonas, U., R. Schulte, S. Fenselau, G. V. Minsavage, B. J. Staskawicz, and D. D. S. 1990.
- Bonas, U., R. Schulte, S. Fenselau, G. V. Minsavage, B. J. Staskawicz, and R. E. Stall. 1991. Isolation of a gene-cluster from Xanthomonas campestris pv. vesicatoria that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. Mol. Plant-Microbe Interact. 4:81–88.
- Bretz, J. R., N. M. Mock, J. C. Charity, S. Zeyad, C. J. Baker, and S. W. Hutcheson. 2003. A translocated protein tyrosine phosphatase of *Pseudo-monas syringae* pv. tomato DC3000 modulates plant defence response to infection. Mol. Microbiol. 49:389–400.
- Brown, I., J. Mansfield, and U. Bonas. 1995. hrp genes in Xanthomonas campestris pv. vesicatoria determine ability to suppress papillae deposition in pepper mesophyll cells. Mol. Plant-Microbe Interact. 8:825–836.
- 14. Buell, C. R., V. Joardar, M. Lindeberg, J. Selengut, I. T. Paulsen, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, R. T. Deboy, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, R. Madupu, S. Daugherty, L. Brinkac, M. J. Beanan, D. H. Haft, W. C. Nelson, T. Davidsen, N. Zafar, L. Zhou, J. Liu, Q. Yuan, H. Khouri, N. Fedorova, B. Tran, D. Russell, K. Berry, T. Utterback, S. E. Van Aken, T. V. Feldblyum, M. D'Ascenzo, W. L. Deng, A. R. Ramos, J. R. Alfano, S. Cartinhour, A. K. Chatterjee, T. P. Delaney, S. G. Lazarowitz, G. B. Martin, D. J. Schneider, X. Tang, C. L. Bender, O. White, C. M. Fraser, and A. Collmer. 2003. The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen

#### 7264 THIEME ET AL.

Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:10181-10186.

- 15. Burse, A., H. Weingart, and M. S. Ullrich. 2004. The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. Mol. Plant-Microbe Interact. **17**:43–54.
- 16. Busch, W., and M. H. Saier. 2004. The IUBMB-endorsed transporter classification system. Mol. Biotechnol. 27:253–262.
- Büttner, D., and U. Bonas. 2002. Getting across—bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. EMBO J. 21:5313–5322.
   Büttner, D., and U. Bonas. 2002. Port of entry—the type III secretion translocon. Trends Microbiol. 10:186–192.
- 19. Büttner, D., L. Noël, F. Thieme, and U. Bonas. 2003. Genomic approaches
- in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* allow fishing for virulence genes. J. Biotechnol. **106**:203–214.
- Canteros, B. J. 1990. Diversity of plasmids and plasmid-encoded pheno-typic traits in Xanthomonas campestris pv. vesicatoria. Ph.D. thesis. University of Florida, Gainesville.
- 21. Cascales, E., and P. J. Christie. 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. Nat. Rev. Microbiol. 1:137–149. 22. Cha, C., P. Gao, Y. C. Chen, P. D. Shaw, and S. K. Farrand. 1998. Pro-
- duction of acyl-homoscrine lactone quorum-sensing signals by gram-nega-tive plant-associated bacteria. Mol. Plant-Microbe Interact. 11:1119–1129.
- Ciesioka, L. D., T. Hwin, J. D. Gearles, G. V. Minsavage, R. Saenz, M. Bravo, V. Handley, S. M. Conover, H. Zhang, J. Caporgno, N. B. Phengrasamy, A. O. Toms, R. E. Stall, and M. C. Whalen. 1999. Regulation of expression of avirulence gene *avrRxv* and identification of a family of host interaction factors by sequence analysis of *avrBsT*. Mol. Plant-Microbe Interact. 12:35-44.
- 24. Cornelis, G. R., and F. Van Gijsegem. 2000. Assembly and function of type Controls, O. R., and F. van Ojecgin. 2000. Assention and Interform Operations. III secretory systems. Annu. Rev. Microbiol. 54:735–774.
   Daniels, M. J., C. E. Barber, P. C. Turner, M. K. Sawczyc, R. J. W. Byrde,
- and A. H. Fielding. 1984. Cloning of genes involved in pathogenicity of Xanthomonas campestris pv. campestris using the broad host range cosmid pLAFR1. EMBO J. 3:3323–3328.
- 26. da Silva, A. C., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Farah, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, C. B. Monteiro-Vitorello, M. A. Sluys, N. F. Almeida, L. M. Hurtan, K. D. A. M. Do Amaral, M. C. Bertolini, L. E. Camargo, G. Camarotte, F. Cannavan, J. Cardozo, F. Chambergo, L. P. Ciapina, R. M. Cicarelli, L. L. Coutinho, J. R. Cursino-Santos, H. El-Dorry, J. B. Faria, A. J. Ferreira, R. C. Ferreira, M. I. Ferro, E. F. Formighieri, M. C. Franco, C. C. Greggio, A. Gruber, A. M. Katsuyama, L. T. Kishi, R. P. Leite, E. G. Lemos, M. V. Lemos, E. C. Locali, M. A. Machado, A. M. Madeira, N. M. Martinez-Rossi, E. C. Martins, J. Meidanis, C. F. Menck, C. Y. Miyaki, D. H. Moon, L. M. Moreira, M. T. Novo, V. K. Okura, M. C. Oliveira, V. R. Oliveira, H. A. Pereira, A. Rossi, J. A. Sena, C. Silva, R. F. De Souza, L. A. Spinola, M. A. Takita, R. E. Tamura, E. C. Teixeira, R. I. Tezza, M. Trindade Dos Santos, D. Truffi, S. M. Tsai, F. F. White, J. C. Setubal, and J. P. Kitajima. 2002. Comparison of the genomes of two Xanthomonas pathogens with differing host specificities. Nature **417:**459–463.
- da Silva, F. G., Y. Shen, C. Dardick, S. Burdman, R. C. Yadav, A. L. de Leon, and P. C. Ronald. 2004. Bacterial genes involved in type I secretion and sulfation are required to elicit the rice *Xa21*-mediated innate immune response. Mol. Plant-Microbe Interact. **17:**593–601.
- 28. Daubin, V., and H. Ochman. 2004. Bacterial genomes as new gene homes:
- the genealogy of ORFans in *E. coli*. Genome Res. **14**:1036–1042. 29. **D'Haeze, W., and M. Holsters.** 2004. Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. Trends Microbiol. 12:555–561. 30. Dilks, K., R. W. Rose, E. Hartmann, and M. Pohlschröder. 2003. Prokary-
- otic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey. J. Bacteriol. **185**:1478–1483.
- 31. Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel, and J. Hacker. 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. Nat. Rev. Microbiol. **2:**414–424.
- 32. Dodd, I. B., and J. B. Egan. 1990. Improved detection of helix-turnhelix DNA-binding motifs in protein sequences. Nucleic Acids Res. 18: 5019-5026
- 33. Dreier, J., D. Meletzus, and R. Eichenlaub. 1997. Characterization of the plasmid encoded virulence region *pat-1* of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Mol. Plant-Microbe Interact. 10:195-206
- 34. Espinosa, A., M. Guo, V. C. Tam, Z. O. Fu, and J. R. Alfano. 2003. The Pseudomonas syringae type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. Mol. Microbiol. **49:**377–387.
- Fenselau, S., and U. Bonas. 1995. Sequence and expression analysis of the hrpB pathogenicity operon of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. Mol. Plant-Microbe Interact. 8:845–854.
- Galperin, M. Y. 2004. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. Environ. Microbiol. 6:552–567.
- Genin, S., and C. Boucher. 2004. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 42:107–134.

- Gordon, D., C. Abajian, and P. Green. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. Genome Res. 8:195–202.
- 39. Gordon, D., C. Desmarais, and P. Green. 2001. Automated finishing with autofinish. Genome Res. 11:614-625.
- Guttman, D. S., B. A. Vinatzer, S. F. Sarkar, M. V. Ranall, G. Kettler, and J. T. Greenberg. 2002. A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. Science **295**:1722–1726.
- Haft, D. H., B. J. Loftus, D. L. Richardson, F. Yang, J. A. Eisen, I. T. Paulsen, and O. White. 2001. TIGRFAMs: a protein family resource for the functional identification of proteins. Nucleic Acids Res. 29:41–43.
  42. Harris, M. A., J. Clark, A. Ireland, J. Lomax, M. Ashburner, R. Foulger, K.
- Harris, M. A., J. Carle, A. Hetant, J. Lomas, M. Samburi, G. M. Rubin, J. A. Bilbeck, S. Lewis, B. Marshall, C. Mungall, J. Richter, G. M. Rubin, J. A. Blake, C. Bult, M. Dolan, H. Drabkin, J. T. Eppig, D. P. Hill, L. Ni, M. Ringwald, R. Balakrishnan, J. M. Cherry, K. R. Christie, M. C. Costanzo, S. S. Dwight, S. Engel, D. G. Fisk, J. E. Hirschman, E. L. Hong, R. S. Nash, A. Sethuraman, C. L. Theesfeld, D. Botstein, K. Dolinski, B. Feierbach, T. Berardini, S. Mundodi, S. Y. Rhee, R. Apweiler, D. Barrell, E. Camon, E. Dimmer, V. Lee, R. Chisholm, P. Gaudet, W. Kibbe, R. Kishore, E. M. Schwarz, P. Sternberg, M. Gwinn, L. Hannick, J. Wortman, M. Berriman, V. Wood, N. de la Cruz, P. Tonellato, P. Jaiswal, T. Seigfried, and R. White. 2004. The gene ontology (GO) database and informatics resource. Nucleic Acids Res. **32**:258–261.
- 43. Hoiczyk, E., A. Roggenkamp, M. Reichenbecher, A. Lupas, and J. Heesemann. 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Morax-ella* UspAs reveal a novel class of adhesins. EMBO J. **19:**5989–5999.
- Hotson, A., R. Chosed, H. Shu, K. Orth, and M. B. Mudgett. 2003. Xan-thomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. Mol. Microbiol. 50:377–389.
- 45. Hu, N. T., P. F. Lee, and C. Chen. 1995. The type IV pre-pilin leader peptidas of Xanhomonas campestris py. campestris is functional without conserved cysteine residues. Mol. Microbiol. **18**:769–777.
- Jones, J. B., G. H. Lacy, H. Bouzar, R. E. Stall, and N. W. Schaad. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. Syst. Appl. Microbiol. 27:755–762. Kaiser, O., D. Bartels, T. Bekel, A. Goesmann, S. Kespohl, A. Pühler, and
- **F. Meyer.** 2003. Whole genome shotgun sequencing guided by bioinformatics pipelines—an optimized approach for an established technique. J. Bio-technol. **106**:121-133.
- Kanchisa, M., S. Goto, S. Kawashima, and A. Nakaya. 2002. The KEGG databases at GenomeNet. Nucleic Acids Res. 30:42–46.
- Katzen, F., D. U. Ferreiro, C. G. Oddo, M. V. Ielmini, A. Becker, A. Pühler, and L. Ielpi. 1998. Xanthomonas campestris pv. campestris gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. J. Bacteriol 180:1607-1617
- 50. Kearney, B., and B. J. Staskawicz. 1990. Characterization of IS476 and its role in bacterial spot disease of tomato and pepper. J. Bacteriol. 172: 143-148.
- Kim, J. F., J. H. Ham, D. W. Bauer, A. Collmer, and S. V. Beer. 1998. The hrpC and hrpN operons of Erwinia chrysanthemi EC16 are flanked by plcA and homologs of hemolysin/adhesin genes and accompanying activator/ transporter genes. Mol. Plant-Microbe Interact. **11**:563–567.
- 52. Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, and E. L. Sonnhammer. 2001. Pre dicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J. Mol. Biol. **305:**567–580.
- 53 Lee, B. M., Y. J. Park, D. S. Park, H. W. Kang, J. G. Kim, E. S. Song, I. C. Park, U. H. Yoon, J. H. Hahn, B. S. Koo, G. B. Lee, H. Kim, H. S. Park, K. O. Yoon, J. H. Kim, C. H. Jung, N. H. Koh, J. S. Seo, and S. J. Go. 2005. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. Nucleic Acids Res. 33:577-586
- 54. Leyns, F., M. De Cleene, J. Swings, and J. De Ley. 1984. The host range of the genus Xanthomonas. Bot. Rev. 50:305-355
- Lindeberg, M., J. Stavrinides, J. H. Chang, J. R. Alfano, A. Collmer, J. L. Dangl, J. T. Greenberg, J. W. Mansfield, and D. S. Guttman. 2005. Proposed guidelines for a unified nomenclature and phylogenetic analysis of type III Hop effector proteins in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. Mol. Plant-Microbe Interact. **18**:275–282.
- 56. Locht, C., R. Antoine, and F. Jacob-Dubuisson. 2001. Bordetella pertussis, molecular pathogenesis under multiple aspects. Curr. Opin. Microbiol. 4:82-89
- 57. Lowe, T. M., and S. R. Eddy. 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. Nucleic Acids Res. 25:955-964
- 58. McHardy, A. C., A. Goesmann, A. Pühler, and F. Meyer. 2004. Development of joint application strategies for two microbial gene finders. Bioin-formatics 20:1622–1631.
- Meinhart, A., J. C. Alonso, N. Strater, and W. Saenger. 2003. Crystal structure of the plasmid maintenance system epsilon/zeta: functional mechanism of toxin zeta and inactivation by epsilon 2 zeta 2 complex formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:1661-1666.
- 60. Metz, M., D. Dahlbeck, C. Q. Morales, B. Al Sady, E. T. Clark, and B. J. Staskawicz. 2005. The conserved Xanthomonas campestris pv. vesicatoria

Vol. 187, 2005

XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. VESICATORIA GENOME SEQUENCE 7265

effector protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in Nicotiana benthamiana. Plant J. 41:801-814.

- Meyer, A., A. Pühler, and K. Niehaus. 2001. The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. Planta 213:214–222.
- Meyer, F., A. Goesmann, A. C. McHardy, D. Bartels, T. Bekel, J. Clausen, J. Kalinowski, B. Linke, O. Rupp, R. Giegerich, and A. Pühler. 2003. GenDB—an open source genome annotation system for prokaryote genomes. Nucleic Acids Res. 31:2187–2195.
- Minsavage, G. V., D. Dahlbeck, M. C. Whalen, B. Kearny, U. Bonas, B. J. Staskawicz, and R. E. Stall. 1990. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-pepper interactions. Mol. Plant-Microbe Interact. 3:41-47.
   Molinaro, A., A. Evidente, S. Fiore, N. S. Iacobellis, R. Lanzetta, and M.
- Molinaro, A., A. Evidente, S. Fiore, N. S. Iacobellis, R. Lanzetta, and M. Parrilli. 2000. Structure elucidation of the O-chain from the major lipopolysaccharide of the *Xanthomonas campestris* strain 642. Carbohydr. Res. 325:222–229.
- 65. Mulder, N. J., R. Apweiler, T. K. Attwood, A. Bairoch, D. Barrell, A. Bateman, D. Binns, M. Biswas, P. Bradley, P. Bork, P. Bucher, R. R. Copley, E. Courcelle, U. Das, R. Durbin, L. Falquet, W. Fleischmann, S. Griffiths-Jones, D. Haft, N. Harte, N. Hulo, D. Kahn, A. Kanapin, M. Krestyaninova, R. Lopez, I. Letunic, D. Lonsdale, V. Silventoinen, S. E. Orchard, M. Pagni, D. Peyruc, C. P. Ponting, J. D. Selengut, F. Servant, C. J. Sigrist, R. Vaughan, and E. M. Zdobnov. 2003. The InterPro database, 2003 brings increased coverage and new features. Nucleic Acids Res. 31: 315–318.
- Newman, M. A., M. J. Daniels, and J. M. Dow. 1995. Lipopolysaccharide from Xanthomonas campestris induces defense-related gene expression in Brassica campestris. Mol. Plant-Microbe Interact. 8:778–780.
- Nielsen, H., and A. Krogh. 1998. Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model, p. 122–130. Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 6). AAAI Press, Menlo Park, Calif.
- Nies, D. H. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiol. Rev. 27:313–339.
   Nies, D. H. 2004. Incidence and function of sigma factors in *Ralstonia*
- Nies, D. H. 2004. Incidence and function of sigma factors in *Kalstonia metallidurans* and other bacteria. Arch. Microbiol. **181**:255–268.
   Noël, L., F. Thieme, J. Gäbler, D. Büttner, and U. Bonas. 2003. XopC and
- Noël, L., F. Thieme, J. Gabler, D. Büttner, and U. Bonas. 2003. XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. J. Bacteriol. 185:7092–7102.
- Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel, and U. Bonas. 2001. cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xan*thomonas campestris pv. vesicatoria. Mol. Microbiol. 41:1271–1281.
- 72. Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel, and U. Bonas. 2002. Two novel type III-secreted proteins of Xanthomonas campestris py. vesicatoria are encoded within the am patheometricity identified. J. Patheometrical. 1961;12(0):1248-1249. DOI: 10.1016/j.
- coded within the *hrp* pathogenicity island. J. Bacteriol. 184:1340–1348.
  73. Nummelin, H., M. C. Merckel, J. C. Leo, H. Lankinen, M. Skurnik, and A. Goldman. 2004. The Yersinia adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. EMBO J. 23:701–711.
- 74. Ojanen-Reuhs, T., N. Kalkkinen, B. Westerlund-Wikstrom, J. van Doorn, K. Haahtela, E. L. Nurmiaho-Lassila, K. Wengelnik, U. Bonas, and T. K. Korhonen. 1997. Characterization of the *fimA* gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. J. Bacteriol. **179**:1280–1290.
- Osbourn, A. E., B. R. Clarke, and M. J. Daniels. 1990. Identification and DNA sequence of a pathogenicity gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Mol. Plant-Microbe Interact. 3:280–285.
- Pedersen, A. G., L. J. Jensen, S. Brunak, H. H. Staerfeldt, and D. W. Ussery. 2000. A DNA structural atlas for *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 299:907–930.
- Poplawsky, A. R., and W. Chun. 1997. *pigB* determines a diffusible factor needed for extracellular polysaccharide slime and xanthomonadin production in *Xanthomonas campestris* pv. campestris. J. Bacteriol. 179:439–444.
- Poplawsky, A. R., and W. Chun. 1998. Xanthomonas campestris pv. campestris requires a functional pigB for epiphytic survival and host infection. Mol. Plant Microbal Literat. 114/466, 475
- Plant-Microbe Interact. 11:466–475.
  79. Ray, S. K., R. Rajeshwari, Y. Sharma, and R. V. Sonti. 2002. A high-molecular-weight outer membrane protein of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* exhibits similarity to non-fimbrial adhesins of animal pathogenic bacteria and is required for optimum virulence. Mol. Microbiol. 46: 637–647.
- 80. Rimsky, S. 2004. Structure of the histone-like protein H-NS and its role in
- regulation and genome superstructure. Curr. Opin. Microbiol. 7:109–114. 81. Robinson, C., and A. Bolhuis. 2001. Protein targeting by the twin-arginine targeting pathemy. Not. Rev. Mol. Call Biol. 27:32, 256
- translocation pathway. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2:350–356.
  82. Roden, J. A., B. Belt, J. B. Ross, T. Tachibana, J. Vargas, and M. B. Mudgett. 2004. A genetic screen to isolate type III effectors translocated into pepper cells during *Xanthomonas* infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:16624–16629.
- Rojas, C. M., J. H. Ham, W. L. Deng, J. J. Doyle, and A. Collmer. 2002. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing,

and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99:**13142–13147.
84. **Römling, U.** 2002. Molecular biology of cellulose production in bacteria.

- Römling, U. 2002. Molecular biology of cellulose production in bacteria. Res. Microbiol. 153:205–212.
- Ronald, P. C., and B. J. Staskawicz. 1988. The avirulence gene avrBs1 from Xanthomonas campestris pv. vesicatoria encodes a 50-kDa protein. Mol. Plant-Microbe Interact. 1:191–198.
- Ross, P., H. Weinhouse, Y. Aloni, D. Michaeli, P. Weinberger-Ohana, R. Mayer, S. Braun, E. de Vroom, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, and M. Benziman. 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. Nature 325:279–281.
- 87. Salanoubat, M., S. Genin, F. Artiguenave, J. Gouzy, S. Mangenot, M. Arlat, A. Billault, P. Brottier, J. C. Camus, L. Cattolico, M. Chandler, N. Choisne, C. Claudel-Renard, S. Cunnac, N. Demange, C. Gaspin, M. Lavie, A. Moisan, C. Robert, W. Saurin, T. Schiex, P. Siguier, P. Thebault, M. Whalen, P. Wincker, M. Levy, J. Weissenbach, and C. A. Boucher. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. Nature 415:497–502.
- Salzberg, S. L., A. L. Delcher, S. Kasif, and O. White. 1998. Microbial gene identification using interpolated Markov models. Nucleic Acids Res. 26: 544–548.
- Sandkvist, M. 2001. Type II secretion and pathogenesis. Infect. Immun. 69:3523–3535.
- 90. Simpson, A. J., F. C. Reinach, P. Arruda, F. A. Abreu, M. Acencio, R. Alvarenga, L. M. Alves, J. E. Araya, G. S. Baia, C. S. Baptista, M. H. Barros, E. D. Bonaccorsi, S. Bordin, J. M. Bove, M. R. Briones, M. R. Bueno, A. A. Camargo, L. E. Camargo, D. M. Carraro, H. Carrer, N. B. Colauto, C. Colombo, F. F. Costa, M. C. Costa, C. M. Costa-Neto, L. L. Coutinho, M. Cristofani, E. Dias-Neto, C. Docena, H. El-Dorry, A. P. Facincani, A. J. Ferreira, V. C. Ferreira, J. A. Ferro, J. S. Fraga, S. C. Franca, M. C. Franco, M. Frohme, L. R. Furlan, M. Garnier, G. H. Goldman, S. L. Gomes, A. Gruber, P. L. Ho, J. D. Hoheisel, M. L. Junqueira, E. L. Kemper, J. P. Kitajima, J. E. Krieger, E. K. Kuarmae, F. Laigret, M. R. Lambais, L. C. Leite, E. G. Lemos, M. V. Lemos, S. A. Lopes, C. R. Lopes, J. A. Machado, M. A. Machado, A. M. Madeira, H. M. Madeira, C. L. Marino, et al. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. Nature **406**:151–157.
- 91. Stall, R. E. 1995. Xanthomonas campestris pv. vesicatoria, p. 167–184. In R. P. Singh, U. S. Singh, and K. Kohmoto (ed.), Pathogenesis and host-parasite specificity in plant diseases, vol. I. Prokaryotes. Pergamon, Elsevier Science Inc., Tarrytown, New York.
- Stall, R. E., D. C. Loschke, and J. B. Jones. 1986. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Phytopathology 76:240–243.
   Sundin, G. W., and C. L. Bender. 1995. Expression of the *strA-strB* strep-
- Sundin, G. W., and C. L. Bender. 1995. Expression of the strA-strB streptomycin resistance genes in *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas* campestris and characterization of IS6100 in X. campestris. Appl. Environ. Microbiol. 61:2891–2897.
- Suzek, B. E., M. D. Ermolaeva, M. Schreiber, and S. L. Salzberg. 2001. A probabilistic method for identifying start codons in bacterial genomes. Bioinformatics 17:1123–1130.
- Swords, K. M., D. Dahlbeck, B. Kearney, M. Roy, and B. J. Staskawicz. 1996. Spontaneous and induced mutations in a single open reading frame alter both virulence and avirulence in *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria avrBs2. J. Bacteriol. 178:4661–4669.
- Szurek, B., O. Rossier, G. Hause, and U. Bonas. 2002. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. Mol. Microbiol. 46:13–23.
- Tampakaki, A. P., V. E. Fadouloglou, A. D. Gazi, N. J. Panopoulos, and M. Kokkinidis. 2004. Conserved features of type III secretion. Cell. Microbiol. 6:805–816.
- Tatusov, R. L., N. D. Fedorova, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, B. Kiryutin, E. V. Koonin, D. M. Krylov, R. Mazumder, S. L. Mekhedov, A. N. Nikolskaya, B. S. Rao, S. Smirnov, A. V. Sverdlov, S. Vasudevan, Y. I. Wolf, J. J. Yin, and D. A. Natale. 2003. The COG database: an updated version includes eukaryotes. BMC Bioinformatics 4:41.
   Ulrich, L. E., E. V. Koonin, and I. B. Zhulin. 2005. One-component systems
- Ulrich, L. E., E. V. Koonin, and I. B. Zhulin. 2005. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. Trends Microbiol. 13:52–56.
- van Doorn, J., P. M. Boonekamp, and B. Oudega. 1994. Partial characterization of fimbriae of *Xanthomonas campestris* pv. *hyacinthi*. Mol. Plant-Microbe Interact. 7:334–344.
- Vauterin, L., J. Rademaker, and J. Swings. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. Phytopathology 90:677–682.
   Vivian, A., J. Murillo, and R. W. Jackson. 2001. The roles of plasmids in
- Vivian, A., J. Murillo, and R. W. Jackson. 2001. The roles of plasmids in phytopathogenic bacteria: mobile arsenals? Microbiology 147:763–780.
- Von Bodman, S. B., W. D. Bauer, and D. L. Coplin. 2003. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 41:455–482.
   Vorhölter, F. J., K. Niehaus, and A. Pühler. 2001. Lipopolysaccharide
- 104. Vorhölter, F. J., K. Niehaus, and A. Pühler. 2001. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: a cluster of 15 genes is involved in the biosynthesis of the LPS O-antigen and the LPS core. Mol. Genet. Genomics 266:79–95.

THIEME ET AL. 7266

- 105. Wang, L. H., Y. He, Y. Gao, J. E. Wu, Y. H. Dong, C. He, S. X. Wang, L. X. Weng, J. L. Xu, L. Tay, R. X. Fang, and L. H. Zhang. 2004. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. Mol. Microbiol. 51:903-912.
- 106. Weng, S. F., Y. F. Fan, Y. H. Tseng, and J. W. Lin. 1997. Sequence analysis 100. weng 5, r , r , r , rai, r r. rseng, and J. w. Lin (197). Sequence analysis of the small cryptic Xanthomonas campestris pv. vesicatoria plasmid pXV64 encoding a Rep protein similar to gene II protein of phage 12-2. Biochem. Biophys. Res. Commun. 231:121–125.
   107. Wengelnik, K., and U. Bonas. 1996. HrpXv, an AraC-type regulator, acti-
- verse expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas* campestris pv. vesicatoria. J. Bacteriol. **178**:3462–3469.
- 108. Wengelnik, K., O. Rossier, and U. Bonas. 1999. Mutations in the regulatory Wengelnik, K., O. Rossier, and U. Bonas. 1999. Mutations in the regulatory gene hrpG of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria result in constitutive expression of all hrp genes. J. Bacteriol. 181:6828–6831.
   Wengelnik, K., G. Van den Ackerveken, and U. Bonas. 1996. HrpG, a key hrp regulatory protein of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria is homol-

J. BACTERIOL.

ogous to two-component response regulators. Mol. Plant-Microbe Interact. 9:704-712.

- 110. Whalen, M. C., J. F. Wang, F. M. Carland, M. E. Heiskell, D. Dahlbeck, G. V. Minsavage, J. B. Jones, J. W. Scott, R. E. Stall, and B. J. Staskawicz. 1993. Avirulence gene avrRxv from Xanthomonas campestris pv. vesicatoria specifies resistance on tomato line Hawaii 7998. Mol. Plant-Microbe Interact. 6:616-627.
- 111. Zamboni, D. S., S. McGrath, M. Rabinovitch, and C. R. Roy. 2003. Coxiella burnetii express type IV secretion system proteins that function similarly to components of the Legionella pneumophila Dot/Icm system. Mol. Microbiol. 49:965-976.
- 112. Zhao, B., E. Y. Ardales, A. Raymundo, J. Bai, H. N. Trick, J. E. Leach, and **S. H. Hulbert.** 2004. The *avrRxo1* gene from the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* confers a nonhost defense reaction on maize with resistance gene Rxo1. Mol. Plant-Microbe Interact. 17:771–779.

### 2.1.2. Zusammenfassung der Ergebnisse

Der vorangegangene Artikel beschreibt die Charakteristika der Genomsequenz des Xcv-Stammes 85-10. Das Genom umfasst ein 5,17 Mb großes Chromosom und vier Plasmide mit einer Größe von 2 kb, 19 kb, 38 kb und 182 kb, die insgesamt 4726 vorhergesagte proteinkodierende Sequenzen enthalten. Das zirkuläre Chromosom zeigt einen hohen G+C-Gehalt von 64,75%, enthält 58 IS-Elemente (siehe Anhang 2) und zeigt Anzeichen hoher Plastizität. Vergleichende Genomanalysen ergaben eine ähnliche Genanordnung wie in Xac und Xcc, wobei jedoch die Region zwischen Flagellar-Cluster und Replikationsterminus nicht konserviert ist. Im Gegensatz dazu zeigten Vergleiche mit Xoo eine stark abweichende Struktur. Im Vergleich mit anderen Bakterien fällt die hohe Anzahl von regulatorischen Proteinen in Xanthomonas spp. auf. Zudem scheint "Quorum sensing" in Xcv, wie in Xcc, über zwei verschiedene alternative "autoinducer" reguliert zu werden. Diese hohe regulatorische Diversiät lässt vermuten, dass sich Xanthomonaden an komplexe und veränderliche Umweltbedingungen in ihrem Lebenszyklus anpassen können. Die Motilität von Xcv wird von einem Flagellum, welches in einer 147 kb großen Region auf dem Chromosom kodiert wird, und möglicherweise auch mittels Retraktion von Typ 4-Pili vermittelt. Mithilfe der Genomsequenz konnte eine Vielzahl möglicher Virulenzfaktoren identifiziert werden (siehe Anhang 2), so z.B. 120 Gene, deren Genprodukte in die Synthese von Oberflächenstrukturen, wie LPS und EPS, involviert sind oder die für Adhäsine kodieren. Interessanterweise kodiert das Genom zudem für alle in Gram-negativen Bakterien bekannten Proteinsekretionssysteme. Darunter ist auch ein vorhergesagtes Typ IV-Sekretionssystem, welches Ähnlichkeit zum Icm/Dot-System humanpathogener Bakterien wie Legionella pneumophila und Coxiella burnetii aufweist (siehe Anhang 2) und möglicherweise eine Rolle in der Virulenz von Xcv spielt. Dies trifft wahrscheinlich auch für die anderen Sekretionssysteme zu. Das Typ II-Sekretionssystem z.B. transportiert vermutlich 26 vorhergesagte Wirtszellwand-abbauende Enzyme und drei Adhäsine vom Autotransporter-Typ. Auch ein mögliches Typ I-Sekretionssystem, welches homolog zum Rax-System aus Xoo ist, wurde identifiziert. Dieses System ist in Xoo in die Synthese und Sekretion von AvrXa21 involviert, das in Xa21 exprimierenden Reispflanzen erkannt wird. Vergleiche mit anderen sequenzierten, pflanzenpathogenen Bakterien führten zudem zur Vorhersage von sechs neuen Kandidaten für Typ III-Effektoren basierend auf ihrer Homologie zu bekannten Effektoren. Drei dieser vorhergesagten Effektorgene sind mit ähnlichen möglichen mobilen Elementen assoziiert, was auf einen Erwerb durch horizontalen Gentransfer hindeutet.

# 2.2. Identifizierung und Verifizierung von Typ III-Effektoren aus *X. campestris* pv. vesicatoria

# 2.2.1. Artikel:

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Dec. 2003, p. 7092–7102 0021-9193/03/\$08.00+0 DOI: 10.1128/JB.185.24.7092–7102.2003 Copyright © 2003, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. Vol. 185, No. 24

# XopC and XopJ, Two Novel Type III Effector Proteins from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria

Laurent Noël,† Frank Thieme, Jana Gäbler,‡ Daniela Büttner, and Ulla Bonas\*

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

Received 23 July 2003/Accepted 18 September 2003

Pathogenicity of the gram-negative plant pathogen Xanthomonas campestris pv. vesicatoria depends on a type III secretion (TTS) system which translocates bacterial effector proteins into the plant cell. Previous transcriptome analysis identified a genome-wide regulon of putative virulence genes that are coexpressed with the TTS system. In this study, we characterized two of these genes, xopC and xopJ. Both genes encode Xanthomonas outer proteins (Xops) that were shown to be secreted by the TTS system. In addition, type III-dependent translocation of both proteins into the plant cell was demonstrated using the AvrBs3 effector domain as a reporter. XopJ belongs to the AvrRxv/YopJ family of effector proteins from plant and animal pathogenic bacteria. By contrast, XopC does not share significant homology to proteins in the database. Sequence analysis revealed that the xopC locus contains several features that are reminiscent of pathogenicity islands. Interestingly, the xopC region is flanked by 62-bp inverted repeats that are also associated with members of the Xanthomonas avrBs3 effector family. Besides xopC, a second gene of the locus, designated hpaJ, was shown to be coexpressed with the TTS system was not detectable, which is consistent with its predicted Sec signal and a putative function as transglycosylase in the bacterial periplasm.

Pathogenicity of many gram-negative bacterial pathogens of animals and plants depends on a specialized type III secretion (TTS) system which spans both bacterial membranes and is associated with an extracellular appendage (15, 24). The TTS system mediates Sec-independent protein secretion into the extracellular medium as well as the translocation of so-called effector proteins into the host cell. Bacterial mutants that are specifically affected in type III translocation are no longer pathogenic, indicating that the functions of effector proteins inside the host cell are globally essential for the successful outcome of the infection (9, 24). Recent comparative sequence analyses have uncovered homologies between effectors from different plant pathogens. Among these, several effector classes are also present in animal bacterial pathogens (7). The first reported example is the YopJ/AvrRxv family of effector proteins, which presumably function as proteases (33). YopJ from Yersinia pestis suppresses host defense responses by downregulating multiple mitogen-activated protein kinases and inhibiting the activation of the transcription factor NF- $\kappa B$ (41)

While the repertoire of effector proteins appears to be relatively limited in animal pathogens (e.g., six known effectors in *Yersinia* spp. [29]), an unexpectedly high number of effectors is found in plant pathogens (e.g., approximately 40 candidates each in *Ralstonia solanacearum* and *Pseudomonas syringae* [14, 47]). Due to the low in vitro secretion efficiency, the identification of effector proteins by biochemical approaches has been difficult. Furthermore, genetic strategies have not uncovered a significant number of effectors, probably due to redundant functions or a minor contribution to pathogenicity under laboratory conditions. In plant pathogens, many effectors have been identified as the products of avirulence (*avr*) genes that betray the pathogen to the surveillance system of resistant plants. Recognition of Avr proteins by corresponding plant resistance (R) gene products leads to the specific induction of defense responses that often culminate in the hypersensitive response (HR), a rapid local cell death at the infection site concomitant with arrest of bacterial growth (30, 49).

Recently, the availability of genomic sequence information for several plant pathogens (*Xanthomonas campestris* pv. campestris strain ATCC 33913, *X. axonopodis* pv. citri strain 306, *R. solanacearum* strain GMI1000, and *P. syringae* pv. tomato strain DC3000) has marked a milestone for the identification of putative effectors by bioinformatic approaches (14, 17, 47). Effector gene candidates have been discovered due to homologies to known effectors or the presence of eukaryotic motifs that suggest a function inside the host cell. Furthermore, many effector genes differ in G+C content and codon usage from the average genomic DNA and are associated with mobile genetic elements, indicating their acquisition by horizontal gene transfer. These genomic regions, which presumably contribute to the evolution of virulence, are generally referred to as pathogenicity islands (PAIs) (27).

Our laboratory studies the TTS system and the type III secretome of *X. campestris* pv. vesicatoria, the causal agent of bacterial spot disease in pepper and tomato (8). The *X. campestris* pv. vesicatoria TTS system is encoded by a 23-kb chromosomal *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Mailing address: Institute of Genetics, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, D-06099 Halle (Saale), Germany. Phone: (49) 345 5526290. Fax: (49) 345 5527277. E-mail: bonas@genetik.uni-halle.de.

<sup>&</sup>lt;sup>†</sup> Present address: Max-Planck-Institute for Plant Breeding Research, D-50829 Cologne, Germany.

<sup>‡</sup> Present address: Division of Cellular Immunology, German Cancer Research Center, D-69120 Heidelberg, Germany.

### Vol. 185, 2003

gene cluster which contains six operons, hrpA to hrpF (5, 21, 22, 28, 45; U. Bonas, unpublished data). Among the more than 20 proteins encoded by the hrp gene cluster, nine are highly conserved in plant and animal pathogenic bacteria. These genes were renamed hrc (hrp conserved) and probably encode the core components of the secretion apparatus (3). The role of nonconserved Hrp proteins is less clear. HrpE1 is predicted to be the major subunit of the Hrp pilus, an extracellular appendage that is associated with the TTS apparatus and probably serves as a conduit for secreted proteins moving to the plant cell surface (32; E. Weber, T. Ojanen-Reuhs, R. Koebnik, and U. Bonas, unpublished data). Protein translocation into the plant cell cytosol is presumably mediated by the type III translocon, a predicted channel-like protein complex that inserts into the host cell membrane (9). Recently, HrpF has been proposed to be the pore-forming component of the type III translocon (10). Besides hrc and hrp genes, analysis of nonpolar mutants in the hrp gene cluster also identified hpa (hrp associated) genes that might contribute to, but are not essential for, the interaction with the plant (28, 40; U. Bonas, unpublished data). Sequence analysis of the left hrp-flanking region revealed the presence of an insertion sequence (IS)-like element as well as putative effector genes with low G+C content compared to the genomic average (64% over 100 kb [39]), indicating acquisition of this region by horizontal gene transfer (40).

*hrp* gene expression is induced in planta (48) and is controlled by the regulatory genes *hrpG* and *hrpX*, which are located outside of the *hrp* gene cluster. The HrpG protein belongs to the OmpR family of two-component regulatory systems (54) and controls the expression of a large gene regulon including *hrpX*. The AraC-type transcriptional activator HrpX regulates the expression of the operons *hrpB* to *hrpF* (52) and of most members of the *hrpG* regulon (39, 40). Many *hrpX*-regulated genes contain a PIP box (plant-inducible promoter box; consensus TTCG-N<sub>16</sub>-TTCG) in their promoters, which has been proposed to serve as a regulatory element. However, this motif is neither necessary nor sufficient to confer HrpX inducibility (8).

Many *hrpG*-regulated genes have been identified by cDNAamplified fragment length polymorphism (AFLP)-based analysis of the expression profiles of two isogenic *X. campestris* pv. vesicatoria strains, 85-10 and 85\*, which differ in their *hrp* gene expression status (39). Strain 85\* carries *hrpG*\*, a mutated form of the key regulatory gene *hrpG* that leads to the constitutive expression of *hrp* and other genes (39, 53). Members of the genome-wide *hrpG* regulon encode proteins with homology to transcriptional regulators, degradative enzymes, an adhesin, and type III effectors from other plant pathogens (39). So far, the products of three new *hrpG*-regulated genes have been shown to be secreted by the TTS system and have therefore been designated *Xanthomonas* outer protein (Xop) A, XopB, and XopD (39, 40).

In this study, we performed a detailed analysis of two *hrpG*regulated genes, *xopC* and *xopJ*, which were previously identified by cDNA-AFLP (39). We confirm that the expression of both genes is regulated by HrpG and HrpX. Furthermore, we demonstrate that XopC and XopJ are two new effector proteins that are secreted and translocated by the TTS system into the plant cell. XopJ is homologous to members of the AvrRxv/ XANTHOMONAS EFFECTOR PROTEINS 7093

YopJ family of type III effectors. In contrast, XopC appears to be unique to *X. campestris* pv. vesicatoria. DNA sequence analysis of the *xopC* region revealed that this locus is a PAI which is homologous to DNA regions in *X. axonopodis* pv. citri.

### MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, growth conditions, and plasmids. The published bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1. *Escherichia coli* cells were cultivated at  $37^{\circ}$ C in Luria-Bertani medium, and *X. campestris* pv. vesicatoria strains were cultivated at  $30^{\circ}$ C in NYG (16) or in minimal medium A (1) supplemented with sucrose (10 mM) and Casamino Acids (0.3%). Plasmids were introduced into *E. coli* by electroporation and into *X. campestris* pv. vesicatoria by conjugation by using pRK2013 as a helper plasmid in triparental matings (20, 23). The following antibiotics were added to the media at the indicated final concentrations: ampicillin, 100 µg/ml; chloramphenicol, 30 µg/ml; kanamycin, 25 µg/ml; rifampin, 100 µg/ml.

Plant material and plant inoculations. Inoculation of the near-isogenic pepper cultivars Early Cal Wonder (ECW), ECW-10R, which carries the *Bs1* resistance gene, and ECW-30R, which carries the *Bs3* resistance gene, were performed as described previously (5). Bacteria were grown overnight on NYG agar and resuspended in 1 mM MgCl<sub>2</sub>. For the analysis of *X. campestris* pv. vesicatoria mutant strains, bacterial suspensions at a density of 10<sup>8</sup> CFU/ml were infiltrated into leaves by using a needleless syringe. The appearances of the HR and disease symptoms were monitored 2 and 3 days postinoculation, respectively. For translocation assays, bacteria were infiltrated into leaves at a bacterial density of 5 × 10<sup>8</sup> CFU/ml. Leaves were harvested and bleached in ethanol 2 days postinoculation to facilitate visualization of the HR. In planta growth of *X. campestris* pv. vesicatoria was determined in ECW as described previously (5) by using 10<sup>4</sup> CFU/ml. Experiments were reproduced at least three times.

Sequencing of the *xopC* region. For sequencing of the *xopC* region, cosmid clones hybridizing to *hgi 37/41* were isolated from a genomic cosmid library of *X. campestris* pv. vesicatoria strain 75-3 in pLAFR3 (pXV238, pXV789, and pXV845 [35]). *EcoRI/HindIII* fragments derived from pXV845, pXV238, and pXV789 and containing *hgi* 37 and *hgi 41* were subcloned into pBluescript II KS (pB-KS), giving pB37A (8-kb insert), pB37B (7-kb insert), and pB37C (4-kb insert), respectively. The sequence of the *xopC* region was determined by shotgun cloning of pB37A, pB37B, and pB37C and sequencing of the subclones by using an ABI 377 Prism DNA sequencer (Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.). The initial contig was extended in both directions by primer walking, using pXV238 as the template. Sequences were analyzed with Sequencher software (Gene Codes Corp., Ann Arbor, Mich.) and the DNASTAR package (DNASTAR Inc., Madison, Wis.). The inverted repeats (IRs) in the *xopC* region rithms (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/).

Generation of mutations in *xopC* and *xopJ*. A 1.0-kb deletion encompassing the promoter region and 540 bp of the *xopC* open reading frame (ORF) was achieved by Eco72I digestion and religation of pB37B, giving pB37B $\Delta$ xopC. The pB37B $\Delta$ xopC 3.1-kb *NheI/XbaI* fragment was cloned into the suicide plasmid pOK (28), giving pO37, and introduced into strain 85-10 by double crossover, creating 85-10 $\Delta$ xopC.

To mutate xopl, a 1.4-kb Sall/Bg/II fragment containing xopJ was amplified from X. campestris pv. vesicatoria strain 85-10 genomic DNA by PCR using the primers 11.Bgl (GAAGATCTTGACTGGCGATCAGAGATAGC) and 11.Sal (ACGC<u>GTCGACTCCAAGACTTCGCACCGAAG</u>) (underlined sequences indicate engineered restriction sites) and cloned into pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.), giving pC11. A frameshift mutation was introduced at codon 128 by Bsp14071 digestion of pC11, fill-in, and religation, resulting in pCxopJFS. This mutation results in a premature stop codon after 143 codons. The pCxopJFS 1.4-kb Sall/Bg/II fragment was then cloned into pOK, giving pO11, and introduced into strain 85-10 by double crossover, giving 85-10wapJFS

Epitope tagging of XopC and XopJ. The 1.4-kb *Sal1/Bg*/II fragment of pIC11 encompassing *xopC* and a 1.6-kb *Xho1/Bg*/II fragment encompassing the first 466 codons of *xopC* amplified by PCR from *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10 genomic DNA using the primers 37.Bg1 (GAAGATCTTCCTCGAGACTTTC GCAATC) and 37.Xho (CCG<u>CTCGAGCTCTTAAGTGTGCGTCTAACTG</u>) (underlined sequences indicate engineered restriction sites) were cloned into pIC1 (39) in frame with a triple *c-myc* epitope, giving pIC11 and pIC37, respectively. pIC37 and pIC11 were conjugated into strain 85\*, giving 85\*:::pIC37 and 85\*:::pIC11, respectively. The corresponding 85-10 derivatives were generated by restoring the wild-type *lnpG* allele using pOG (39). *lnpX* was deleted from strain stating the straing the strai

### 7094 NOËL ET AL.

TABLE 1. Published strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s) <sup>a</sup>	Reference or source
X. campestris pv. vesicatoria		
75-3	Tomato race 1; wild type; Rif <sup>r</sup>	35
85-10	Pepper race 2; wild type; Rif <sup>r</sup>	12
82-8	Pepper race 1; wild type; Rif <sup>r</sup>	35
$85-10\Delta hrpA-C$	85-10 derivative; carries a deletion of operons <i>hrpA</i> to <i>hrpC</i> ; Riff	D. Nennstiel and U. Bonas,
85*	85-10 derivative containing the <i>hrpG</i> <sup>*</sup> mutation; constitutive <i>hrp</i> gene expression; Rif <sup>r</sup>	53
$85^*\Delta hrpX$	85* derivative; carries a hrpX deletion; Rif <sup>r</sup>	39
$85^*\Delta hrcV$	85* derivative; carries a nonpolar <i>hrcV</i> deletion; nonfunctional TTS system: Rif	46
$85^*\Delta hrpF$	$85^*$ derivative; carries a nonpolar <i>hrpF</i> deletion; translocation mutant; Rif <sup>r</sup>	10
Escherichia coli		
DH10B	$F^-$ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR D(ara, leu)7697 araΔ139 Δ(ara, leu)7697 galU galK $\lambda^-$ nupG rpsL; Str <sup>r</sup>	Invitrogen, Carlsbad, Calif.
DH5a	$F^- \phi 80 dlac Z\Delta M15 \Delta (lac ZYA-argF) U169 endA1 recA1 deoR hdsR17 (r_k^- m_s^+) nhoA sup F44 \lambda^- thi-1 gyrA96 relA1. Nalr$	Invitrogen
DH5a Apir	DH5 $\alpha$ derivative for replication of pIC1 pRO1 and pOK derivatives	34
DB3.1	$F^-$ gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mr hsdS20( $r_{B}^-$ m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm <sup>+</sup> ) xyl-5 λ <sup>-</sup> leu mtl-1; for replication of GATEWAY cassette-containing vectors (pAG35P/pL6GW356); Sm <sup>+</sup>	Invitrogen
Plasmids		
pLAFR6	RK2 replicon, Mob <sup>+</sup> Tra <sup>-</sup> ; multicloning site flanked by transcription terminators; Tc <sup>r</sup>	6
pXV845, pXV238, pXV789	pLAFR3 derivatives; cosmid clones containing <i>xopC</i> from <i>X. campestris</i> pv. vesicatoria strain 75-3	35
pDSK602	Contains triple lacUV5 promoter; Smr	37
pDhrpFN356	pDSK602 derivative; expresses the fusion between HrpF (aa 1–387) and AvrBs3\Delta2	10
pCR2.1	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Invitrogen
pBluescript II KS or SK	Phagemid, pUC derivative; Ap <sup>r</sup>	Stratagene, La Jolla, Calif.
pBX1	pBluescript II KS; carries a 9.4-kb insert containing hrpX	52
$pB\Delta X1$	pBX1 derivative; carries a 2.4-kb insert with a 7-kb deletion including hrpX	52
pRK2013	Helper plasmid; ColE1 replicon TraRK <sup>+</sup> Mob <sup>+</sup> ; Km <sup>r</sup>	23
pRO1	Suicide vector; Sm <sup>r</sup>	53
pRX1	pRO1 derivative; carries a 2.4-kb insert from pB $\Delta X1$ with a 7-kb deletion including <i>hrpX</i>	39
pOK	Suicide vector; pKNG1O1 derivative; Sm <sup>r</sup> , Suc <sup>s</sup>	28
pOG	pOK derivative; carries wild-type hrpG	39
pIC1	Suicide vector; carries a triple <i>c-myc</i> epitope followed by a promoterless $uidA$ gene: Tc <sup>r</sup>	39

<sup>a</sup> Ap, ampicillin; Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Nal, nalidixic acid; Rif, rifampin; Sm, spectinomycin; Str, streptomycin; Suc, sucrose; Tc, tetracycline; r, resistant; s, sensitive.

85\*::pIC37 and 85\*::pIC11 by using pRX1, thus giving  $85^*\Delta hrpX$ ::pIC37 and  $85^*\Delta hrpX$ ::pIC11, respectively.

available from the authors upon request. General molecular biology experiments were performed according to standard protocols (1). **GUS assays**. β-Glucuronidase (GUS) assays were performed with exponentially equivalent to the performance of the performance of

**Construction of AvrBs3d2 fusion proteins.** To create fusions with avrBs3d2, the GATEWAY (Invitrogen) *attR* reading frame cassette B fused in frame with avrBs3d2 was introduced into pLAFR6, giving pL6GW356. The following promoters and 5' sequences of *xop* genes were amplified from genomic DNA of *X. campestris* pv. vesicatoria strain 75-3 by primers containing *attB* sites: the first 200 codons of *xopC* and 592-bp upstream sequence, the first 121 codons of *hpaJ* and 1,506-bp upstream sequence, and the first 155 codons of *xopJ* and 720-bp upstream region. Genomic DNA of strain 82-8 was used to amplify the first 200 codons of *avrBs3* and 315-bp upstream sequence. Primer sequences are available from the authors upon request. The *attB*-flanked PCR products were recombined into a donor vector and then transferred to pL6GW356 by recombination to create the expression clones pL6xopC356, pL6hpaJ356, pL6xopJ356, and pL6avrBs3356.

**RNA analyses.** RNA extraction, cDNA synthesis, and reverse transcription (RT)-PCRs were performed as described previously (39). Primer sequences are

GUS assays.  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) assays were performed with exponentially growing *X. campestris* pv. vesicatoria as described previously (46). One GUS unit is defined as 1 nmol of 4-methylumbelliferone released per minute per bacterium.

Protein analysis and secretion experiments. Secretion experiments and Western blot analyses were performed as described previously (46). The following primary antibodies were used: polyclonal anti-AvrBs3 antibody (31), monoclonal anti-*c-nyc* antibody (Roche, Mannheim, Germany), and polyclonal anti-HrcN antiserum (46). Horseradish peroxidase-labeled goat anti-mouse or goat antirabbit antibodies were used as secondary antibodies. Reactions were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.).

Nucleotide sequence accession number. The sequence of the 12.5-kb *xopC* region from *X. campestris* pv. vesicatoria strain 75-3 has been submitted to GenBank and assigned accession number AY389509.

J. BACTERIOL.

Vol. 185, 2003

#### XANTHOMONAS EFFECTOR PROTEINS 7095

TABLE	2.	Charact	eristics o	of predicted	l genes	in the	xopC	region	from X.	campestris	pv.	vesicatori	a
-------	----	---------	------------	--------------	---------	--------	------	--------	---------	------------	-----	------------	---

Gene	Characteristic(s)	Closest protein homologue(s) (organism; accession no.) <sup>a</sup>	Amino acid identity/similarity (%) <sup>b</sup>
ORFA (hpaJ)	425 aa; putative Sec signal; hrpG/hrpX-dependent	Transglycosylase (X. axonopodis pv. citri; AAM38069, AAM39253)	98/99
	expression	HopPmaG (P. syringae pv. maculicola; AAL84245)	57/70
ORFB	996 aa	Tn5044 transposase (X. axonopodis pv. citri; AAM39254)	99/99
ORFC	424 aa	Integrase-like protein (X. axonopodis pv. citri; AAM39255)	91/93
ORFD	351 aa	Cointegrate resolution protein T (X. axonopodis pv. citri; AAM39256)	95/97
ORFE	320 aa; flanked by 24-bp IRs; belongs to ISXc7-2	Putative transposase (X. campestris pv. mangiferaeindicae; AAF65225)	99/99
хорС	47% G+C; <i>hrpG/hrpX</i> - dependent expression; 834 aa; encodes an effector protein	Hypothetical protein (R. solanacearum; CAD18390)	46/64 <sup>c</sup>
ORFF	219 aa; encodes a putative truncated transposase	IS1478 transposase (X. campestris pv. campestris; AAM40932)	84/87 <sup>d</sup>

<sup>*a*</sup> Closest homologous protein found by using the BlastX algorithm (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) in nonredundant databases. <sup>*b*</sup> Identities and similarities between the respective proteins were determined using the Blast2 Sequences algorithm (51).

Comparison between the last 360 aa of XopC and the first 360 aa of the 894-aa predicted protein CAD18390 of *R. solanacearum.* Comparison over the first 164 aa of ORFF.

### RESULTS

xop. I and xopC are not conserved in xanthomonads. The function of most hrpG-induced (hgi) genes known so far remains to be elucidated. In this study, we characterized xopJ and hgi 37/41 (hereafter designated xopC; see below), which were identified by cDNA-AFLP-based transcriptome analysis (39). Both genes have a significantly lower G+C content (54 and 47%, respectively) than the genomic average of 64%, indicating that they have been acquired by horizontal gene transfer. xopJ encodes a predicted protein with homology to members of the YopJ/AvrRxv family of effector proteins (39), which presumably function as cysteine proteases (41). In contrast, the predicted protein encoded by xopC does not share any homology to known proteins in the databases (Table 2). Since the original cDNA-AFLP amplicon corresponding to xopC did not span the whole gene, we analyzed the sequence of the complete ORF by sequencing of cosmid clones, which were isolated from a genomic library of X. campestris pv. vesicatoria strain 75-3 (see Materials and Methods for details). The xopC ORF is 2,505 bp long and lacks any PIP box motif in the predicted promoter region.

Southern blot analyses revealed that the sequences corresponding to xopJ and xopC are conserved in X. campestris pv. vesicatoria strains 75-3, 85-10, 82-8, and 81-23 (data not shown). However, DNA-DNA blast searches did not reveal homologous genes in X. axonopodis pv. citri strain 306 and X. campestris pv. campestris strain ATCC 33913, suggesting that both *xopJ* and *xopC* are unique to X. campestris pv. vesicatoria.

To confirm hrpG-dependent regulation of xopC, we performed RT-PCRs. After bacterial growth in NYG medium, the xopC transcript was detectable in strain 85\* but not, or in small amounts, in strain 85-10 and the hrpX deletion mutant  $85^*\Delta hrpX$  (Fig. 1A). This indicates that expression of *xopC* is controlled by both HrpG and HrpX, as has previously been shown for xopJ (39). For a quantitative analysis of the induction levels of both genes, we created transcriptional fusions to a promoterless GUS gene and introduced the corresponding constructs into the genomes of strains 85-10, 85\*, and  $85^*\Delta hrpX$  (see Materials and Methods). The analysis of GUS activities after bacterial growth in NYG medium showed that xopC and xopJ expression in 85\* was 10 and 42 times higher, respectively, than in the *hrpG* wild-type background (Fig. 1B). Deletion of the hrpX gene (strains 85\* \Delta hrpX::pIC37 and 85\*ΔhrpX::pIC11) reduced GUS activities to the levels observed in 85-10 (Fig. 1B), confirming that gene expression is controlled by both hrpG and hrpX.

xopJ and xopC encode type III-secreted proteins. For the analysis of the predicted proteins encoded by *xopJ* and *xopC*, both genes were translationally fused to a c-myc epitope-encoding sequence in the genome of strain 85\* and the TTS mutant  $85^*\Delta hrcV$  by using the suicide vector pIC1. As shown in Fig. 2, proteins of 56 and 45 kDa, compatible with the predicted sizes of the XopC protein fused to c-myc (51 kDa plus 5-kDa epitope; first 466 amino acids [aa] only) and XopJ-cmyc (40 kDa plus 5-kDa epitope), respectively, were detected in total cell extracts. The homology of XopJ to type III effectors as well as the finding that several hgi genes encode type III-secreted proteins (39, 40) prompted us to investigate the secretion of XopJ and XopC. Therefore, the corresponding  $85^*$  and  $85^*\Delta hrcV$  derivatives were incubated in secretion medium and total cell extracts and culture supernatants were analyzed by immunoblotting. Both proteins could be detected in the culture supernatants of the corresponding 85\* strain derivative but not in culture supernatants of  $85^*\Delta hrcV$  strains (Fig. 2), indicating that secretion depends on a functional TTS system. HrcN, an intracellular protein, was not detectable in the culture supernatants, suggesting that no bacterial lysis had occurred. These data indicate that *xopJ* and *xopC* encode type III-secreted proteins.

The N termini of XopJ and XopC contain type III translocation signals. To investigate whether XopJ and XopC are not only secreted but also translocated into the plant cell, we con7096 NOËL ET AL.



FIG. 1. Expression of *xopC*, *xopJ*, and *hpaJ* (ORFA) is regulated by *hrpG* and *hrpX*. (A) cDNA-AFLP (AFLP) and RT-PCR (RT) analyses of *hgi 37/41* (corresponds to *xopC*) and *hpaJ* (ORFA) in *X. campestris* pv. vesicatoria strains 85-10, 85\*, and 85\* $\Delta$ *hrpX*, all grown in NYG medium. cDNA-AFLP amplicons were visualized by autoradiography. RT-PCR samples were separated on a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. 16S ribosomal DNA was used as a standard (rDNA). (B) Analysis of promoter activities of *xopC* and *xopJ* using the *uidA* reporter gene. Strains 85-10, 85\*, and 85\* $\Delta$ *hrpX* containing pIC37 and pIC11, respectively, were grown in NYG medium. Specific GUS activities are the average of two cultures with duplicates. Values are displayed using a logarithmic scale, and error bars represent the standard deviations. GUS activities below 0.1 U/10<sup>10</sup> CFU are considered as background. One unit is defined as 1 nmol of 4-methylumbel-liferone released per minute per bacterium.

structed fusion proteins by using an N-terminal deletion derivative of the *X. campestris* pv. vesicatoria effector protein AvrBs3 as a reporter in an HR induction assay. AvrBs3 induces the HR in ECW-30R pepper plants, which express the resistance gene *Bs3* (35). The N-terminal deletion derivative AvrBs3 $\Delta$ 2, which lacks aa 2 to 153, is no longer delivered by the TTS system. However, it is still capable of inducing the HR when expressed in resistant plant cells by using *Agrobacterium*- J. BACTERIOL.



FIG. 2. XopC and XopJ are secreted by the TTS system. Strains  $85^* \text{ and } 85^* \Delta hrcV$  containing pIC37 (A) and pIC11 (B), respectively, were incubated in secretion medium. Total protein extracts (10× concentrated) and supernatants (200× concentrated) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (10% poly-acrylamide) and analyzed by immunoblotting using the *c-myc* antibody. Membranes were reprobed with a specific antibody against the cyto-plasmic protein HrcN to ensure that no bacterial lysis had occurred. Molecular mass of proteins is given in kilodaltons.

mediated gene transfer and hence contains the effector domain (50). The fusion of a functional TTS and translocation signal to AvrBs $3\Delta 2$  should therefore restore its delivery by the TTS system and thus the ability to induce the HR in resistant plants.

Here, the N termini of XopJ and XopC were fused to AvrBs3 $\Delta$ 2 (Fig. 3A). In addition, as a positive control, the first 200 aa of AvrBs3 were fused to AvrBs3 $\Delta$ 2 (AvrBs3<sub>200</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2). As a negative control, we used the HrpF<sub>387</sub>-AvrBs3D2 fusion protein, which was previously shown to be secreted by the TTS system but does not induce the HR when delivered by X. campestris pv. vesicatoria into Bs3-expressing pepper plants. Since the fusion protein still induces the HR when directly expressed in resistant plants by use of Agrobacterium-mediated gene transfer, it has been suggested that the N terminus of HrpF lacks a functional translocation signal (10). The AvrBs3 $\Delta$ 2 fusion constructs were introduced into X. *campestris* pv. vesicatoria strains  $85^*$ ,  $85^*\Delta hrcV$ , and  $85^*\Delta hrpF$ . Western blot analysis of total protein extracts demonstrated that the XopJ  $_{155}\text{-},$  XopC  $_{200}\text{-},$  and AvrBs3  $_{200}\text{-}\text{AvrBs3}\Delta2$  fusion proteins were expressed (Fig. 3B). After incubation of the bacteria in secretion medium,  $XopJ_{155}$ -AvrBs3 $\Delta 2$  and  $XopC_{200}$ -AvrBs3 $\Delta 2$  were detected in the culture supernatants of the  $85^*$  and  $85^*\Delta hrpF$  strain derivatives, but not in those of the corresponding  $85^*\Delta hrcV$  strain derivatives (Fig. 3B). These results show that the TTS signals of XopJ and XopC are located in the N-terminal regions.

To test for type III-dependent translocation, strain 85\* carrying the different fusion constructs was inoculated into leaves of different pepper plants. As shown in Fig. 3C, strain 85\* delivering AvrBs3<sub>200</sub>-AvrBs3Δ2, XopJ<sub>155</sub>-AvrBs3Δ2, and XopC<sub>200</sub>-AvrBs3Δ2 induced the HR in the *Bs3*-expressing pepper cultivar ECW-30R but not in susceptible ECW plants



FIG. 3. XopC and XopJ N termini target AvrBs3 $\Delta 2$  into the plant cell. (A) Schematic representation of AvrBs3 $\Delta 2$  fusion proteins. The N termini of AvrBs3, HrpF, XopC, HpaJ, and XopJ were fused to AvrBs3 $\Delta 2$  and tested for secretion in vitro and the induction of the HR in *Bs3*-expressing pepper plants. The central repeat region of AvrBs3 is indicated by the striped box. White boxes correspond to the N-terminal part of the tested fusion partner. Numbers refer to amino acid positions at the fusion points. A plus sign indicates the ability of fusion protein to be secreted and/or to induce the HR on ECW-30R plants when delivered by *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85\*. A minus sign indicates no secretion of fusion proteins and/or no HR induction. (B) Western blot analysis of AvrBs3 $\Delta 2$  fusions expressed in strain 85\*, the secretion mutant  $85^*\Delta hrpF$  under control of the native promoters. After incubation of the bacteria in secretion medium, total protein extracts (10× concentrated) and supernatants (200× concentrated) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (8% poly-acrylamide) and analyzed by immunoblotting using the AvrBs3-specific antibody. Membranes were reprobed with a specific antibody against the cytoplasmic protein HrcN to ensure that no bacterial lysis had occurred (data not shown). (C) HR induction, the leaves were bleached in ethanol.

(data not shown). This indicates that the reporter protein was translocated into the plant cell and was specifically recognized by Bs3. No HR induction was observed in leaves of ECW and ECW-30R plants infected with strain 85\* delivering HrpF<sub>387</sub>-AvrBs3\Delta2 (data not shown). Furthermore, the secretion mutant 85\* $\Delta hrcV$  and the translocation mutant 85\* $\Delta hrpF$  expressing the chimeric proteins did not elicit the HR in ECW-30R plants (Fig. 3C), indicating that translocation of the reporter protein into the plant cell depends on a functional TTS system. These experiments demonstrate that the N termini of XopC and XopJ contain signals for type III-dependent secretion and translocation and validate the AvrBs3\Delta2 protein as a suitable reporter for the analysis of type III effector protein translocation.

**Contribution of XopJ and XopC to bacterial virulence.** The type III-dependent translocation of XopJ and XopC into the plant cell suggests that both proteins play a role in the plant-pathogen interaction. To study their contribution to bacterial virulence, a frameshift mutation in *xopJ* and a deletion in *xopC*, respectively, were introduced into the genome of *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10. The resulting mutants were tested for symptom formation and in planta growth in susceptible

pepper plants (ECW) as well as for HR elicitation in resistant pepper plants (ECW-10R). Strain 85-10 expresses *avrBs1*, which is recognized by the *Bs1* resistance gene in ECW-10R (35). The mutations in *xopJ* and *xopC* had no visible effect on the phenotype and timing of the appearance of disease symptoms in susceptible plants and the HR induction in resistant plants compared to what was seen with the wild-type strain 85-10 (data not shown). Furthermore, the growth of both mutant strains in susceptible pepper plants ECW was not significantly altered (Fig. 4). Thus, we could not observe any obvious contribution of XopJ and XopC to *X. campestris* pv. vesicatoria virulence under the conditions tested.

Sequence analysis of genes in the *xopC* region. The unusually low G+C content of *xopC* (47% G+C) suggests that this gene is located in a PAI. Since PAIs often contain clusters of virulence genes, we sequenced a 12.5-kb region encompassing *xopC* from *X. campestris* pv. vesicatoria strain 75-3 (see Materials and Methods for details). Besides *xopC*, this region contains six ORFs, designated ORFA to ORFF (Fig. 5A), with an overall G+C content of 59%. Homology searches revealed that the predicted ORFA (*hpaJ*) product shares similarity with transglycosylases and contains a putative Sec signal (Table 2).

45

NOËL ET AL.

7098



FIG. 4. Analysis of *xopJ* and *xopC* mutants for growth in planta. *X. campestris* pv. vesicatoria wild-type and mutant strains were inoculated at 10<sup>4</sup> CFU/ml in 1 mM MgCl<sub>2</sub> into the intercellular spaces of fully expanded leaves of susceptible ECW plants. Growth of strains 85-10, 85-10Å*npA*-*C*, 85-10Å*vopC*, and 85-10Å*opJ*FS was monitored over a period of 8 days. Values represent the mean of three samples from three different plants, and error bars indicate the standard deviations. For the sake of clarity, error bars for strains 85-10Å*vopC* and 85-10Å*vopF* were omitted. Results shown are from one representative experiment.

Furthermore, it is similar to HopPmaG, a type III effector candidate from *P. syringae* (Table 2) (26). The predicted gene products of ORFB to ORFF from *X. campestris* pv. vesicatoria share homology with proteins that are often associated with genetic mobile elements (Table 2). ORFE is flanked by 24-bp IRs and encodes a predicted protein which shares 99% aa identity to the ISXc7 transposase encoded in the *hrp* PAI from *X. campestris* pv. vesicatoria (40). Therefore, the IR-flanked region including ORFE was designated ISXc7-2. Interestingly, DNA-DNA homology searches revealed that sequences homologous to the region from ORFA to ORFD from *X. campestris* pv. vesicatoria are present in the chromosome and on the plasmid pXAC64 of *X. axonopodis* pv. citri strain 306. Both regions are associated with putative type III effector genes (Fig. 5B).

Identification of a new *hrpG*-regulated gene in the *xopC* region. To study the expression of predicted genes in the *xopC* region from *X. campestris* pv. vesicatoria, we performed RT-PCRs using RNA isolated from strains 85-10, 85\*, and  $85*\Delta hrpX$  after growth in NYG medium. ORFB, ORFC, and ORFD transcripts were amplified at comparable levels in the three different strains, indicating that gene expression was constitutive (data not shown). By contrast, no transcript could be amplified for ORFE under the RT-PCR conditions used (data not shown). The ORFA (*hpaJ*) transcript was detected only in strain 85\*, demonstrating that expression of the corresponding gene is regulated by HrpG and HrpX (Fig. 1A). ORFA was therefore designated *hpaJ*.

The homology of HpaJ to the type III effector candidate

HopPmaG from *P. syringae* pv. maculicola (Table 2) prompted us to investigate TTS and translocation of HpaJ. Therefore, the N terminus of HpaJ was fused to AvrBs3 $\Delta 2$  (Fig. 3A) and the corresponding fusion protein was expressed in strains 85<sup>\*</sup>,  $85^*\Delta hrcV$ , and  $85^*\Delta hrpF$ . HpaJ<sub>121</sub>-AvrBs3 $\Delta 2$  was expressed in all strains but could not be detected in the culture supernatant of strain 85<sup>\*</sup> (Fig. 3B). Since HrpF, a substrate of the TTS system, was detected in the supernatant (data not shown), we conclude that lack of detection of HpaJ<sub>121</sub>-AvrBs3 $\Delta 2$  in the culture supernatant was not due to a general defect in TTS. When infiltrated into pepper plants that express the *Bs3* gene, strain 85<sup>\*</sup> carrying HpaJ<sub>121</sub>-AvrBs3 $\Delta 2$  did not induce the AvrBs3-specific HR (Fig. 3C). Taken together, these results suggest that the N terminus of HpaJ does not contain a functional TTS and translocation signal.

The *xopC* region is flanked by IRs that are associated with putative effectors in different xanthomonads. Interestingly, the xopC region of X. campestris pv. vesicatoria is flanked by 62-bp IRs (Fig. 5) that were initially identified in the vicinity of effector genes belonging to the avrBs3 family in Xanthomonas spp. (IR-L and IR-R [4, 18]). In addition to the xopC region, we also found single copies of these IRs next to xopB and avrBsT (Table 3). Furthermore, homology searches revealed the presence of 13 copies (eight flanking avrBs3 homologues and five in the region corresponding to the xopC locus from X. campestris pv. vesicatoria) in the genome of X. axonopodis pv. citri strain 306 (Fig. 5) (Table 3). In the genome of X. campestris pv. campestris strain ATCC 33913, we identified five IRs, four of which are present as single copies next to genes encoding putative type III-secreted proteins: AvrXccE1 (homologous to AvrPphE from P. syringae pv. phaseolicola), AvrBs1, AvrXccB (homologous to effectors of the YopJ/AvrRxv family), and AvrXccC (homologous to AvrC from P. syringae pv. glycinea). Using sequence alignments and informative polymorphic sites analysis, one can distinguish between IR-L- and IR-R-like repeats (Table 3). While most of the avrBs3 homologues are flanked by both IR-L (5') and IR-R (3') sequences, the majority of other putative type III effector genes is flanked by a single IR-L repeat in the 3' region of the coding sequence. Blast searches did not reveal homologous IRs in other plant pathogens, suggesting that these sequences are restricted to xanthomonads.

### DISCUSSION

In this study, we identified XopJ and XopC, two novel type III effectors from *X. campestris* pv. vesicatoria. The corresponding genes were initially uncovered by transcriptome analysis due to their coregulation with the TTS system. Here, we confirmed that expression of *xopJ* and *xopC* is regulated by HrpG and HrpX and demonstrated that the corresponding gene products are secreted by the TTS system. In addition, we provide evidence for the type III-dependent translocation of XopJ and XopC by using a truncated version of the AvrBs3 effector protein as a reporter. AvrBs3 was recently detected in nuclei of infected plant cells by immunocytochemistry, thus providing direct evidence for effectors from plant pathogenic bacteria has been demonstrated by the use of reporter proteins such as adenylate cyclase and an N-terminal deletion derivative

Vol. 185, 2003

### XANTHOMONAS EFFECTOR PROTEINS 7099



FIG. 5. Comparison between the *xopC* region from *X. campestris* pv. vesicatoria strain 75-3 and corresponding regions from *X. axonopodis* pv. citri strain 306. (A) Schematic overview of the *X. campestris* pv. vesicatoria *xopC* region. The locations of *hgi 37* and *hgi 41* (*xopC*) are indicated by grey circles. The insertion site of the *c-myc* coding sequence in pIC37 is indicated by a thin arrow. White single-headed arrows represent ORFs with high coding probability (DNAStar package) and the direction of transcription (Table 2). Black arrows indicate putative effector genes. The double-headed arrow represents an IS element. Open triangles indicate 62-bp IRs. The G+C content of the region was calculated over 100-bp windows (59% on average) and displayed using Genequest (DNAStar). Scale is given in kilobases. (B) Schematic overview of the regions from *X. axonopodis* pv. citri strain 306 (*Xac*) corresponding to the *hpaJ* to ORFD sequences. The sequences are derived from plasmid pXAC64 (GenBank accession no AE008925; 3,594 to 18,000 bp) and the chromosomal section 346 (chrom.; GenBank accession no. AE011968; 1 to 10,000 bp). Open circles denote PIP boxes. The grey area represents colinear DNA regions (more than 85% identity on the DNA level).

of the effector protein AvrRpt2 from *P. syringae* (13, 25, 36). One limitation of the latter reporters is that localization of protein fusions to the plasma membrane without full translocation into the cytoplasm is sufficient for reporter activity. By contrast, AvrBs3 as a reporter requires nuclear localization for activity (50).

The signals that target XopJ and XopC for type III-dependent secretion and translocation reside in the N-terminal protein regions as has already been described for several effector proteins from plant and animal pathogenic bacteria (15). However, the nature of the secretion signal still remains enigmatic since type III-secreted proteins in both plant and animal pathogens do not share any N-terminal consensus sequence. Recently, comparative analyses of N-terminal amino acid compositions of *P. syringae* type III-secreted proteins revealed some similarities, such as a relatively high content of serine residues in the first 50 aa (26, 43). This is also true for the N-terminal regions of the *Xanthomonas* effectors XopC (16% serine) and XopJ (12% serine).

The functions of XopJ and XopC inside the plant cell remain to be investigated. Both genes appear to be restricted to *X. campestris* pv. vesicatoria strains, suggesting a specific role for *xopJ* and *xopC* in the interaction of *X. campestris* pv. vesicatoria with its respective host plants. Preliminary dipping experiments seem to confirm this for *xopC* (D. Büttner and U. Bonas, unpublished data). However, *xopC* and *xopJ* mutant strains were not affected in bacterial growth and symptom formation on susceptible plants after infiltration, indicating subtle contributions to bacterial virulence or functional redundancy. The latter might indeed be the case for XopJ, which belongs to the large YopJ/AvrRxv effector protein family (for a review, see reference 33), four members of which have been identified in *X. campestris* pv. vesicatoria (8). YopJ from *Yersinia pestis* presumably acts as a cysteine protease (42), and the putative catalytic residues are conserved in all homologues including XopJ. So far, a potential plant target of the predicted proteolytic activity has been identified only for PopP2 from *R. solanacearum*, which physically interacts with the corresponding resistance protein RRS1-R from *Arabidopsis thaliana* (19).

For XopC, we found no homology to proteins with known function in the database. Due to the low G+C content of *xopC* as well as the absence of homologous genes in other xanthomonads, *xopC* might have been acquired by horizontal gene transfer. Indeed, the *xopC* region contains typical features of PAIs, including sequences with low G+C content, an IS element, and genes encoding integrases and cointegrases. In addition to *xopC*, we identified *hpaJ* as a new *hrpG*-regulated gene in this region. Mutant studies will help to clarify whether HpaJ plays a role during the interaction with the plant, as is suggested by its coregulation with the TTS system. The presence of a Sec signal as well as the homology of HpaJ to transglycosylases suggests that it is secreted by the Sec system

### 7100 NOËL ET AL.

J. BACTERIOL.

TABLE 3. Specific IRs associated with genes coding for Xops

Organism and gene	Relative position of IR to gene or ORF <sup>a</sup>	Type of IR			IR sequence	ce <sup>b</sup>		
X. campestris pv. vesicatoria								
avrBs3*	5'	IR-L	GAGGGTCGGCAGG	GATTCGTGTAAAAA	ACAGCCA	AAAGTGAGCT	AACTCGCI	GTCAGCACAG
avrBs3*	3'	IR-R	GA	T		G		T-A
avrBs4*	5'	IR-L		G				
avrBs4*	3'	IR-R	GA	T		G		T-A
hpaJ	3'	IR-L	A	T		T	AT	
xopC	5'	IR-L		ç	J			TA
xopB	3'	IR-L		c-			T	AGAGa
avrBsT	3'	IR-L	C	c	a	tG-a-	T	TT-A
X. axonopodis pv. citri strain 306								
pthA1*	5'	IR-L						
pthA1*	3'	IR-R	GA	T		G		T-A
pthA2*	5'	IR-L						
pthA3*	5'	IR-L						
pthA3*	3'	IR-R	GA	T		G		T-A
pthA4*	5'	IR-L		(	]		C	A-TA
pthA4*	5'	IR-L		G				
pthA4*	3'	IR-R	GA	T		G		T-A
mlt	3'	IR-L	A	T		T	AT	
avrXacE3	3'	IR-L		(	]		C	TA
XACa0010	5'	IR-R	GA	T				
XACb0027	5'	IR-R	GA	T				
XAC3230	3'	IR-L	aC	T				A
X. campestris pv. campestris strain ATCC 33913								
avrXccB	3'	IR-L	ATa-		A-			A
avrXccC	3'	IR-L			tA-	G	T	
avrBs1	3'	IR-L	a	T			G	cA
XCC1633	3'	IR-L	Ag				tcGCTg	ttggTAGtG-
XCC2094	5'	IR-L	aT-A	aa			a-c	AT-A

<sup>a</sup> The IRs were identified by Blast search in nonredundant databases (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). The nearest gene or ORF and the relative position of the IR (5' or 3') are indicated. Asterisks indicate *avrBs3* homologues. <sup>b</sup> Bases differing from the *avrBs3* IR-L repeat are displayed. Capital letters indicate informative polymorphic bases, i.e., polymorphisms which are found in at least

<sup>b</sup> Bases differing from the *avrBs3* IR-L repeat are displayed. Capital letters indicate informative polymorphic bases, i.e., polymorphisms which are found in at least two sequences. The dots indicate an inserted gap.

into the periplasm. Here, it might contribute to the remodeling of the peptidoglycan layer, a process that is presumably involved in the assembly of the TTS system (44). A similar scenario has been proposed for the flagellar assembly in *Salmonella enterica*, which requires periplasmic peptidoglycandegrading enzymes (38). Furthermore, predicted peptidoglycan hydrolases in *P. syringae* and *X. campestris* pv. vesicatoria contribute to bacterial virulence (2, 40).

We did not observe secretion and translocation of HpaJ by the TTS system, which is consistent with its predicted function in the periplasm. However, the HpaJ homologue HopPmaG from *P. syringae* pv. maculicola, which also contains a Sec signal (predicted by the SignalP program [http://www.cbs.dtu.dk /services/SignalP/]), was recently shown to be translocated into the plant cell by use of the AvrRpt2<sub>80-255</sub> reporter (26). Since only 14 aa of HopPmaG were fused to the reporter, which is usually not sufficient to target a protein for type III-dependent translocation, it cannot be excluded that the delivery of the HopPmaG<sub>14</sub>-AvrRpt2<sub>80-255</sub> fusion into the plant was due to residual export signals in the AvrRpt2<sub>80-255</sub> reporter protein.

The region from *hpaJ* to ORFD in the *xopC* locus is more than 85% identical to sequences in the chromosome and the plasmid pXAC64 from *X. axonopodis* pv. citri (Fig. 5). It is

intriguing that genes encoding effector protein candidates such as the AvrBs3 homologue PthA3 as well as AvrXacE2 and AvrXacE3, which are homologous to the effector protein AvrPphE from P. syringae pv. phaseolicola, are located next to these regions. Approximately 200 bp of the 5' sequence including promoter and coding regions of avrXacE3 and XAC3230 from X. axonopodis pv. citri are more than 85% identical to the corresponding region of xopJ, which is a member of the hrpGregulon from X. campestris pv. vesicatoria. It is therefore tempting to speculate that avrXacE3 and XAC3230 are also regulated by HrpG. Taken together, the low G+C content, the association with genetic mobile elements, the presence of putative effector and/or virulence genes, and the sequence diversity of this locus among different xanthomonads indicate that the xopC region in X. campestris pv. vesicatoria as well as the corresponding sequences in X. axonopodis pv. citri are PAIs.

Interestingly, the *xopC* region is flanked by IRs, which are also present in the corresponding regions of *X. axonopodis* pv. citri. Sequence analysis revealed that these IRs are often located in the vicinity of effector genes and thus might provide a useful search criterion for the identification of effector candidates by genomic approaches. In *X. campestris* pv. vesicatoria, the full set of type III effectors is not known yet. In this study,

### Vol. 185, 2003

the products of two hrpG-induced genes were shown to be translocated into the plant cell, indicating that the hrpG regulon is a precious resource for the identification of type III effectors. More than 25 hgi genes still await characterization. In the future, sequence analyses will be greatly facilitated by the availability of the genomic sequence of X. campestris pv. vesicatoria strain 85-10 (in progress [http://www.genetik.uni -Bielefeld.de/GenoMik/partner/halle.html]) (11). This will provide the unique opportunity to identify specific virulence genes and host range determinants by comparative sequence analysis of different members of the genus Xanthomonas.

### ACKNOWLEDGMENTS

L.N. and F.T. contributed equally to this work. We thank C. Kretschmer and B. Rosinsky for excellent technical assistance.

This work was funded by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 363) and the Bundesministerium für Bildung und Forschung to U.B.

### REFERENCES

- 1. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.). 1996. Current protocols in molecular biology.
- John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
   Boch, J., V. Joardar, L. Gao, T. L. Robertson, M. Lim, and B. N. Kunkel. 2002. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* genes induced during infection of *Arabidopsis thaliana*. Mol. Microbiol. **44**:73–88. 3. **Bogdanove**, A., S. V. Beer, U. Bonas, C. A. Boucher, A. Collmer, D. L. Coplin,
- G. R. Cornelis, H.-C. Huang, S. W. Hutcheson, N. J. Panopoulos, and F. Van Gijsegem. 1996. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. Mol. Microbiol. 20:681–683.
  4. Bonas, U., J. Conrads-Strauch, and I. Balbo. 1993. Resistance in tomato to
- Bonas, U., J. Conrads-Strauch, and I. Balbo. 1993. Resistance in tomato to Xanthomonas campestris pv. vesicatoria is determined by alleles of the pep-per-specific avirulence gene avrBs3. Mol. Gen. Genet. 238:261–269.
   Bonas, U., R. Schulte, S. Fenselau, G. V. Minsavage, B. J. Staskawicz, and R. E. Stall. 1991. Isolation of a gene-cluster from Xanthomonas campestris pv. vesicatoria that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. Mol. Plant-Microbe Interact. 4:81–88.
   Bonas, U., R. E. Stall, and B. Staskawicz. 1989. Genetic and structural characterization of the avipulence gene avrBs3 from Xanthomeone campestris
- characterization of the avrulence gene avrB33 from Xanthomonas campestris pv. vesicatoria. Mol. Gen. Genet. 218:127–136.
- Büttner, D., and U. Bonas. 2003. Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. Curr. Opin. Plant Biol. 6:312–319.
- Büttner, D., and U. Bonas. 2002. Getting across—bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. EMBO J. 21:5313–5322.
   Büttner, D., and U. Bonas. 2002. Port of entry—the type III secretion translocon. Trends Microbiol. 10:186–192.
- 10. Büttner, D., D. Nennstiel, B. Klüsener, and U. Bonas. 2002. Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from Xanthomonas campestris pv. vesicatoria. J. Bacteriol. **184**:2389–2398.
- 11. Büttner, D., L. Noël, F. Thieme, and U. Bonas. Genomic approaches in Xanthomonas campestris pv. vesicatoria allow fishing for virulence genes. Biotechnol, in press.
   Canteros, B. J. 1990. Diversity of plasmids and plasmid-encoded phenotypic
- traits in Xanthomonas campestris pv. vesicatoria. Ph.D. thesis. University of Florida, Gainesville.
- 3. Casper-Lindley, C., D. Dahlbeck, E. T. Clark, and B. Staskawicz. 2002. Direct biochemical evidence for type III secretion-dependent translocation of the AvrBs2 effector protein into plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA protect of the AvrBs2 effector protein into plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:8336-8341
- 14. Collmer, A., M. Lindeberg, T. Petnicki-Ocwieja, D. Schneider, and J. Alfano. 2002. Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas* syringae yields new picks for all TTSS prospectors. Trends Microbiol. 10: 462-469
- 15. Cornelis, G. R., and F. Van Gijsegem. 2000. Assembly and function of type
- secretory systems. Annu. Rev. Microbiol. 54:735–774.
   Daniels, M. J., C. E. Barber, P. C. Turner, M. K. Sawczyc, R. J. W. Byrde, and A. H. Fielding. 1984. Cloning of genes involved in pathogenicity of Xanthomonas campestris pv. campestris using the broad host range cosmid pLAFR1. EMBO J. 3:3323–3328.
- Da Silva, A. C., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Farah, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, C. B. Monteiro-Vitorello, M. A. Sluys, N. F. Almeida, L. M. Alves, et al. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. Nature **417**:459–463.
- 18. De Feyter, R., Y. O. Yang, and D. W. Gabriel. 1993. Gene-for-genes inter-

#### XANTHOMONAS EFFECTOR PROTEINS 7101

actions between cotton R-genes and Xanthomonas campestris pv. malvacea-

- num avr genes. Mol. Plant-Microbe Interact. 6:225–237.
  19. Deslandes, L., J. Olivier, N. Peeters, D. X. Feng, M. Khounlotham, C. Boucher, I. Somssich, S. Genin, and Y. Marco. 2003. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:8024–8029.
- Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin, and D. Helinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**:7347–7351.
- Fenselau, S., I. Balbo, and U. Bonas. 1992. Determinants of pathogenicity in Xanthomonas campestris pv. vesicatoria are related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals. Mol. Plant-Microbe Interact. 5:390-396.
- Fenselau, S., and U. Bonas. 1995. Sequence and expression analysis of the hrpB pathogenicity operon of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. Mol. Plant-Microbe Interact. 8:845-854.
- Figurski, D., and D. R. Helinski. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**:1648–1652.
- Galán, J. E., and A. Collmer. 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. Science 284:1322–1328.
- Guttman, D. S., and J. T. Greenberg. 2001. Functional analysis of the type III effectors AvrRpt2 and AvrRpm1 of *Pseudomonas syringae* with the use of a single-copy genomic integration system. Mol. Plant-Microbe Interact. 14: 145–155.
- Guttman, D. S., B. A. Vinatzer, S. F. Sarkar, M. V. Ranall, G. Kettler, and J. T. Greenberg. 2002. A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen Pseudomonas syringae. Science 295:1722-1726
- Hacker, J., and J. B. Kaper. 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. Annu. Rev. Microbiol. 54:641–679.
- Huguet, E., K. Hahn, K. Wengelnik, and U. Bonas. 1998. hpaA mutants of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. Mol. Microbiol. **29:**1379–1390.
- Juris, S. J., F. Shao, and J. E. Dixon. 2002. Yersinia effectors target mammalian signalling pathways. Cell. Microbiol. 4:201–211.
   Klement, Z. 1982. Hypersensitivity, p. 149–177. In M. S. Mount and G. H.
- Lacy (ed.), Phytopathogenic prokaryotes, vol. 2. Academic Press, New York, NY
- 31. Knoop, V., B. Staskawicz, and U. Bonas. 1991. Expression of the avirulence gene avrBs3 from Xanthomonas campestris pv. vesicatoria is not under the control of hrp genes and is independent of plant factors. J. Bacteriol. 173: 7142-7150.
- Koebnik, R. 2001. The role of bacterial pili in protein and DNA translocation. Trends Microbiol. 9:586–590.
- 33. Lahaye, T., and U. Bonas. 2001. Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. Trends Plant Sci. 6:479-485.
- Meinhardt, L. W., H. B. Krishnan, P. A. Balatti, and S. G. Pueppke. 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.
- 35. Minsavage, G. V., D. Dahlbeck, M. C. Whalen, B. Kearny, U. Bonas, B. J. Staskawicz, and R. E. Stall. 1990. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in Xanthomonas campestris pv. vesicatoria-pepper interactions. Mol. Plant-Microbe Interact. 3:41-47.
- Mudgett, M. B., O. Chesnokova, D. Dahlbeck, E. T. Clark, U. Bonas, and B. J. Staskawicz. 2000. Molecular signals required for type III secretion and 36. translocation of the Xanthomonas campestris AvrBs2 protein to pepper plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13324-13329.
- Murillo, J., H. Shen, D. Gerhold, A. Sharma, D. A. Cooksey, and N. T. Keen. 1994. Characterization of pPT23B, the plasmid involved in syringolide production by *Pseudomonas syringae* pv. tomato PT23. Plasmid **31**:275-287. Nambu, T., T. Minamino, R. M. Macnab, and K. Kutsukake. 1999. Pepti-
- 38. doglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **181**:1555–1561.
- Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel, and U. Bonas. 2001. cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Mol. Microbiol. **41**:1271–1281.
- Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel, and U. Bonas. 2002. Two novel type III-secreted proteins of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria are encoded 40.
- within the *hrp* pathogenicity island. J. Bacteriol. **184**:1340–1348. **Orth, K.** 2002. Function of the *Yersinia* effector YopJ. Curr. Opin. Microbiol. 41. 5.38-43
- 42. Orth, K., Z. Xu, M. B. Mudgett, Z. O. Bao, L. E. Palmer, J. B. Bliska, W. F. Mangel, B. Staskawicz, and J. E. Dixon. 2000. Disruption of signaling by Yersinia effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. Science 290:1594-
- Petnicki-Ocwieja, T., D. J. Schneider, V. C. Tam, S. T. Chancey, L. Shan, Y. Jamir, L. M. Schechter, M. D. Janes, C. R. Buell, X. Tang, A. Collmer, and J. R. Alfano. 2002. Genomewide identification of proteins secreted by the

### 7102 NOËL ET AL.

Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99:**7652–7657.

- Pucciarelli, M. G., and F. Garcia-Del Portillo. 2003. Protein-peptidoglycan interactions modulate the assembly of the needle complex in the Salmonella immerine associated true III scarcing arctic Microbiol. 49:72-525.
- invasion-associated type III secretion system. Mol. Microbiol. 48:573–585.
   45. Rossier, O., G. Van den Ackerveken, and U. Bonas. 2000. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. Mol. Microbiol. 38:828–838.
- 6. Rossier, O., K. Wengelnik, K. Hahn, and U. Bonas. 1099. The Xanthomonas Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9368–9373.
- 47. Salanoubat, M., S. Genin, F. Artiguenave, J. Gouzy, S. Mangenot, M. Arlat, A. Billault, P. Brottier, J. C. Camus, L. Cattolico, M. Chandler, N. Choisne, C. Claudel-Renard, S. Cunnac, N. Demange, C. Gaspin, M. Lavie, A. Moisan, C. Robert, W. Saurin, T. Schiex, P. Siguier, P. Thebault, M. Whalen, P. Wincker, M. Levy, J. Weissenbach, and C. A. Boucher. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. Nature 415:497–502.
- Schulte, R., and U. Bonas. 1992. Expression of the Xanthomonas campestris pv. vesicatoria hrp gene cluster, which determines pathogenicity and hyper-

sensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. J. Bacteriol. 174:815-

- 823.
  49. Staskawicz, B. J. 2001. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. Plant Physiol. 125:73–76.
- Szurek, B., O. Rossier, G. Hause, and U. Bonas. 2002. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. Mol. Microbiol. 46:13–23.
- Tatusova, T. A., and T. L. Madden. 1999. Blast 2 sequences—a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. FEMS Microbiol. Lett. 174: 247–250.
- Wengelnik, K., and U. Bonas. 1996. HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. J. Bacteriol. 178:3462–3469.
- Wengelnik, K., O. Rossier, and U. Bonas. 1999. Mutations in the regulatory gene hrpG of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria result in constitutive expression of all hrp genes. J. Bacteriol. 181:6828–6831.
   Wengelnik, K., G. Van den Ackerveken, and U. Bonas. 1996. HrpG, a key hrp
- Wengelnik, K., G. Van den Ackerveken, and U. Bonas. 1996. HrpG, a key hrp regulatory protein of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria is homologous to two-component response regulators. Mol. Plant-Microbe Interact. 9:704– 712.

### J. BACTERIOL.

### 2.2.1.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im vorangegangenen Artikel wurden zwei neue Effektorgene charakterisiert, xopC und xopJ, die in vorangegangenen Transkriptomanalysen als mit dem TTSS koregulierte Gene identifiziert worden waren. Die HrpG- und HrpX-abhängige Aktivierung der Expression beider Gene konnte mittels translationaler uidA-Fusionen und GUS-Assays sowie mit Immunoassays c-Myc-Epitop-markierter Derivate auf Proteinebene nochmals bestätigt werden. Für XopC und XopJ wurde die Typ III-abhängige Sekretion und Translokation in die Pflanzenzelle gezeigt. Hierfür wurde die AvrBs3-Effektordomäne (AvrBs3A2) als Reporter verwendet. Der Effektor XopJ gehört zur YopJ/AvrRxv-Effektorfamilie, die sowohl in pflanzen- als auch in tierpathogenen Bakterien vorkommt. Im Gegensatz dazu zeigt XopC keine signifikante Homologie zu Proteinen in der Datenbank. xopC- bzw. xopJ-Mutanten zeigten kein verändertes Wachstum in der suszeptiblen Pflanze und auch keinen veränderten Phänotyp auf suszeptiblen und resistenten Paprikaflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Die bioinformatische Analyse der 12,5 kb großen xopC-Region des Chromosoms von Xcv-Stamm 75-3, welche wahrscheinlich sieben Gene enthält, offenbarte Eigenschaften einer Pathogenitätsinsel. Die Region wird von 62 bp langen "inverted repeats" an jeder Seite begrenzt, die auch mit Mitgliedern der avrBs3-Familie aus Xanthomonas assoziiert sind. Ähnliche mögliche Effektorgen-Regionen sind im Genom von *Xac* vorhanden und einzelne "inverted repeats" dieses Typs, die mögliche und nachgewiesene Effektorgene flankieren, konnten in der Xcc-Genomsequenz identifiziert werden. Das xopC-Gen weist einen niedrigen G+C-Gehalt (47%) im Vergleich zu den anderen Genen der Region auf, die für Transposasen, "cointegrate resolution proteins" und eine mögliche Mureintransglycosylase kodieren. Neben xopC wird ein zweites Gen, hpaJ, das für die mögliche Mureintransglycosylase kodiert, mit dem Typ III-Sekretionssystem koreguliert. Das entsprechende Genprodukt zeigt Homologie zum Effektorprotein HopAJ1 (HopPmaG) aus P. syringae pv. maculicola. Fusionen der Nterminalen Sequenz von HpaJ mit dem AvrBs3A2-Reporter wurden aber von Xcv weder Typ III-abhängig in die Pflanzenzelle transloziert noch sekretiert. Dies steht im Einklang mit einem vorhergesagten Sec-Sekretionssignal und der möglichen Funktion von HpaJ als Mureintransglycosylase im Periplasma der Bakterien. Die in diesem Artikel verwendeten Oligonukleotide sind in Anhang 3 aufgeführt.

# 2.2.2. Manuskript: Verification of four novel type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria two of which, XopE1 and XopE2, are targeted to the plant plasma membrane due to N-myristoylation

(zur Veröffentlichung in Journal of Bacteriology)

Frank Thieme<sup>1</sup>, Alexander Urban<sup>1, 2</sup>, Oliver Kirchner<sup>1, 3</sup> and Ulla Bonas<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Genetics, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, D-06099 Halle (Saale), Germany.

<sup>2</sup> present address: Institut für Biochemie und Biologie, Universität Potsdam, Karl-Liebknecht-Str. 24-25, D-14476 Golm

<sup>3</sup> present address: Schott Jenaer Glas GmbH, Otto-Schott-Str. 13, 07745 Jena

Running title: Xanthomonas effector proteins

Section: Plant Microbiology

\* For correspondence:

Institute of Genetics, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Weinbergweg 10, D-06120 Halle (Saale), Germany.

Email: ulla.bonas@genetik.uni-halle.de; Phone (+49) 345 5526290; Fax (+49) 345 5527277.

Keywords: pepper, *Nicotiana benthamiana*, pathogenicity, HopX2 family, HopH1 family, N-myristoylation, electroporation

# Abstract

Pathogenicity of the Gram-negative plant pathogen Xanthomonas campestris pv. vesicatoria depends on a type III secretion (TTS) system, which translocates bacterial effector proteins into the plant cell. In this study, we characterized four novel type III effector genes in strain 85-10 encoding Xanthomonas outer proteins (Xops), XopE1, XopE2, XopG, and XopH. Three of the xop genes are co-regulated with the TTS system, whereas xopG is constitutively expressed. Type III-dependent secretion and translocation of the new Xops was shown using the AvrBs3 effector domain as reporter. XopG and XopH show homology to the Pseudomonas syringae type III effectors HopH1 and HopAO1, respectively. XopE1 and XopE2 belong to the HopX2 family of effectors the molecular function of which is unknown. Confocal laser scanning microscopy revealed that XopE1 and XopE2 GFP fusions localize to the plant plasma membrane. Targeting to the membrane is probably due to N-myristoylation, because a point mutation in the putative myristoylated glycine residue in XopE2 resulted in localization in the cytoplasm. Results of hydroxylamine treatment of protein extracts suggest that the XopE2 protein is anchored to the host plasma membrane by myristoylation and palmitoylation. This is the first report of putative N-myristoylated effector proteins from Xanthomonas.

# Introduction

Pathogenicity of most Gram-negative plant- and animal-pathogenic bacteria depends on a highly conserved type III secretion (TTS) system. The TTS system spans both bacterial membranes and is associated with an extracellular appendage (23, 37, 82). In phytopathogenic bacteria, which reside in the intercellular spaces of the plant tissue, the TTS system secretes several proteins into the extracellular milieu. However, the majority of proteins, designated type III effectors, is translocated directly into the host cell cytosol. Bacterial mutants in which type III translocation is abolished are non-pathogenic indicating that the successful interaction with the host depends on effector protein translocation (1, 12).

Our laboratory studies the TTS system and the type III translocatome of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria (also designated *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria [86] or *Xanthomonas euvesicatoria* [43]), the causal agent of bacterial spot disease in pepper and tomato (13). The TTS system of *X. campestris* pv. vesicatoria is encoded by the 23 kb chromosomal *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) gene cluster (8, 34, 35, 62, 73) which resides in a 35.3 kb genomic island (83). *hrp* mutants are unable to grow and cause

disease symptoms in the susceptible plant and to induce the <u>hypersensitive reaction (HR)</u> in resistant plants (8). The HR is a rapid, localized programmed plant cell death reaction which ultimately arrests bacterial growth (45, 80).

Expression of genes in the *hrp* gene cluster is induced *in planta* and in certain minimal media (77, 78). Key regulatory genes are *hrpG* and *hrpX*, which are located approximately 980 kb downstream of the *hrp* gene cluster. HrpG belongs to the OmpR-family of twocomponent system response regulators (91) and controls the expression of a large regulon including *hrpX* which encodes an AraC-type transcriptional activator. HrpX regulates the expression of the *hrp* operons *hrpB* to *hrpF* (88) and of most other genes belonging to the HrpG regulon which are scattered throughout the genome (60-62). Most HrpX-regulated genes contain a PIP box (plant-inducible promoter box; consensus TTCGC-N<sub>15</sub>-TTCGC) in their promoter regions, which was proposed to serve as a regulatory element (35, 88). However, this motif is not sufficient to confer HrpX inducibility, because there are HrpX-independent promoters that contain a PIP box, e.g., *avrRxv* (21). It appears that an additional *cis*-acting element, the -10 box (consensus YANNRT), is needed for HrpX inducibility (84; R. Koebnik, unpublished data). The -10 box was first identified in *Ralstonia solanacearum* as essential for the activation of promoters by HrpB, a HrpX homolog, besides the PIP-like *hrp*<sub>II</sub> box (TTCG-N<sub>16</sub>-TTCG) (24).

Analysis of non-polar mutants of X. campestris pv. vesicatoria revealed that 18 out of the 37 putative coding sequences in the *hrp* genomic island encode Hrp proteins (8, 17, 35, 41, 73, 87, 89). Eleven Hrp proteins, termed Hrc (hrp conserved) (6), are highly conserved in plant and animal pathogens and probably constitute the core components of the TTS apparatus (82, 87). The role of several non-conserved Hrp proteins could be clarified recently. For example, HrpE is the major subunit of the Hrp pilus, which is associated with the TTS apparatus and most likely serves as a conduit for secreted proteins (47, 87). The type III-secreted protein HrpF is predicted to be the major part of the translocon. The translocon is thought to be a protein channel in the plant plasma membrane that is attached to the Hrp pilus and mediates the transport of effector proteins into the plant cell cytosol (14, 17). Mutant analyses also identified hpa (hrp associated) genes that contribute to virulence, but in most cases are not essential for the interaction with the plant (15, 16, 42, 60, 62; D. Büttner and U. Bonas, unpublished data). Recent studies revealed that HpaB and HpaC play a role in exit control of the TTS system. HpaB and HpaC interact with effector proteins and the inner membrane TTS system component HrcV suggesting a role in the recruitment of TTS substrates to the apparatus (15, 16).

Many type III effectors in *X. campestris* pv. vesicatoria and other plant pathogens have been identified as products of avirulence (*avr*) genes. Bacteria expressing a given *avr* gene are specifically recognized by a corresponding plant resistance (*R*) gene which results in the induction of the HR (45, 80). More recently, effector genes of *X. campestris* pv. vesicatoria have been discovered by a transposon-based screen using AvrBs2 as reporter (71), by their co-regulation with the TTS system and on the basis of homology to known effectors (60-62). To date, 15 type III effector proteins present in *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10 have been confirmed experimentally in this strain or closely related strains (31, 54, 56, 57, 60-62, 71, 74). So far, the molecular function of only a few effector proteins has been characterized. One example is XopD (*Xanthomonas* outer protein), which belongs to the C48-family of SUMO (small ubiquitin-like modifier) cysteine proteases (40, 62).

Recently, the genome sequence of *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10 with its 5.17 Mb chromosome and four plasmids (2-183 kb) was determined. Hallmarks are a high G+C content (64.75%), signs of extensive horizontal gene transfer and genes coding for all types of protein secretion systems so far characterized in Gram-negative bacteria (83).

In this study, we characterized four new *Xanthomonas* type III effector proteins, XopE1, XopE2, XopG and XopH. They were identified based on homology of the predicted proteins to known type III effectors. Here, we show data on the type III-dependent protein secretion and translocation as well as on gene regulation. In addition, subcellular localization studies of XopE1, XopE2 and mutant versions were performed in the plant cell using fusions to the green fluorescent protein (GFP).

# **Materials and Methods**

### **Bacterial strains and growth conditions**

Bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1. *E. coli* cells were cultivated at 37°C in Luria-Bertani medium, *A. tumefaciens* at 30°C in YEB medium (0.5% BACTO beef extract, 1% BACTO yeast extract, 0.5% BACTO peptone, 0.5% saccharose, 0.2% 1M MgSO<sub>4</sub>, pH 7.2) and *X. campestris* pv. vesicatoria strains at 30°C in NYG (27) or in minimal medium A (4) supplemented with sucrose (10 mM) and casamino acids (0.3%). Plasmids were introduced into *E. coli* and *A. tumefaciens* by electroporation and into *X.* 

*campestris* pv. vesicatoria by electroporation (see below) or conjugation, using pRK2013 as a helper plasmid in triparental matings (28, 36).

Antibiotics were added to the media at the following final concentrations: ampicillin, 100  $\mu$ g/ml; chloramphenicol, 30  $\mu$ g/ml; hygromycin 150  $\mu$ g/ml; kanamycin, 25  $\mu$ g/ml (for *Agrobacterium* 100  $\mu$ g/ml); rifampicin, 100  $\mu$ g/ml; spectinomycin, 100  $\mu$ g/ml; tetracycline, 10  $\mu$ g/ml; cycloheximide, 500  $\mu$ g/ml.

Strain or plasmid	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Reference or
		source
X. campestris pv. ve	sicatoria	
85-10	Pepper race 2; wild type; carries <i>avrBs1</i> ; Rif	(18)
85*	85-10 derivative containing the $hrpG^{-}$ mutation; constitutive $hrp$	(90)
*	gene expression; Rif	
$85^{*}_{\Delta}hrpX$	85 <sup>*</sup> derivative; carries a deletion in <i>hrpX</i> ; Rif	(61)
$85^{*}\Delta hrcV$	85 <sup>°</sup> derivative; carries a nonpolar deletion in <i>hrcV</i> ; non- functional TTS system; Rif <sup>r</sup>	(73)
$85^*\Delta hrpF$	85 <sup>*</sup> derivative; carries a nonpolar deletion in <i>hrpF</i> ; translocation mutant; Rif <sup>*</sup>	(17)
A. tumefaciens	. ,	
GV3101	Rif	(85)
E. coli		
DH10B	F <sup>-</sup> mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 endA1 recA1 deoR ara $\Delta$ 139 $\Delta$ (ara, leu)7697 galU galK $\lambda$ <sup>-</sup> nupG rpsL; Str <sup>r</sup>	(92)
DB3.1	$F^{-}$ gvrA462 endA1 $\Delta$ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20( $r_{B}^{-}$ , $m_{B}^{-}$ )	Invitrogen.
	supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm <sup>r</sup> ) xvl-5 $\lambda^{-}$ leu	Karlsruhe,
	<i>mtl</i> -1; for replication of GATEWAY cassette-containing	Germany
Dlaamida		
r Dham EN 25 (	"DSK(02 dominations (triple lock W/5 momentum Sm <sup>1</sup> ); commences a	(17)
pDnrpFN356	fusion between HrpF (amino acids 1-387) and AvrBs $3\Delta 2$	(17)
pBluescript II KS	Phagemid, pUC derivative; Ap <sup>r</sup>	Stratagene, La Jolla, CA
pK18mob:: <i>sacB</i>	Suicide plasmid for gene disruption and replacement; Mob <sup>+</sup> Tra <sup>-</sup> Suc <sup>s</sup> · Km <sup>r</sup>	(76)
pENTR/D-TOPO	<i>rrn</i> B T1 and T2 transcription termination sequences; GATEWAY <i>att</i> L sites; directional TOPO cloning site; pUC <i>ori</i> ; Km <sup>r</sup>	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
nRK2013	Helper plasmid: ColF1 replicon TraRK <sup>+</sup> Moh <sup>+</sup> : Km <sup>r</sup>	(36)
pIGGW356	nI AFR6 derivative RK2 replicon Mob <sup>+</sup> Tra <sup>-</sup> : GATEWAY attR	(60)
ploamood	cassette in frame with <i>avrBs3</i> $\Delta 2$ flanked by transcription	
pGWB5	Binary GATEWAY destination vector ( <i>attR</i> ); p35S promoter for <i>in planta</i> expression; C-terminal GFP tag; Cm <sup>r</sup> ; Kan <sup>r</sup> ; Hyg <sup>r</sup>	Dr. Tsuyoshi Nakagawa, Shimane
pGWB6	Like pGWB5, but N-terminal GFP tag; Cm <sup>r</sup> ; Kan <sup>r</sup> ; Hyg <sup>r</sup>	Dr. Tsuyoshi Nakagawa, Shimane University, Japan

**TABLE 1.** Published strains and plasmids used in this study.Strain or plasmidRelevant characteristics a

<sup>a</sup> Ap, ampicillin; Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Hyg, hygromycin; Rif, rifampicin; Sm, spectinomycin; Str, streptomycin; Suc, sucrose; Tc, tetracycline; <sup>r</sup>, resistant; <sup>s</sup>, sensitive.

### Transformation of X. campestris pv. vesicatoria by electroporation

To establish efficient electrotransformation of *X. campestris* pv. vesicatoria for the introduction of pKS18mob::*sacB* deletion constructs, several parameters of the standard protocol for *E. coli* (4) were changed. NYG cultures of *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10 (250 ml) were incubated on a rotary shaker (150 rpm) until OD<sub>600</sub> = 1.0. After centrifugation (10,000 rcf; 10 min; 4°C) the cell pellet was resuspended in 40 ml ice cold water and centrifuged as before. This step was repeated twice. After washing the pellet in 40 ml cold 10% glycerol the cells were resuspended in 1 ml 15% glycerol and stored at -80°C. For electrotransformation 0.1 - 5 µg plasmid DNA were added to 100 µl cells in a 2 mm cuvette (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Germany). Transformation was carried out at 25 µF, 12.5 kV/cm and 400  $\Omega$  (Bio-Rad 'Gene Pulser II' with 'Pulse Controller Plus', Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany), resulting in a time constant of 7 - 9 ms. After addition of 800 µl SOC medium and incubation for 2 hours at 30°C cells were plated. Approximately 1 × 10<sup>5</sup> transformants were obtained per µg of DNA.

### Plant material, plant inoculations and in planta growth experiments with Xanthomonas

Inoculation of the near-isogenic pepper cultivars Early Cal Wonder (ECW), ECW-10R, and ECW-30R (55), were performed as described previously (8). For the analysis of plant phenotypes, bacterial suspensions of  $1 \times 10^8$  cfu/ml,  $5 \times 10^6$  cfu/ml and  $5 \times 10^5$  cfu/ml in 10 mM MgCl<sub>2</sub> were hand-infiltrated by a needleless syringe into the intercellular spaces of fully expanded leaves. The development of the HR and disease symptoms was monitored over a period of six days post inoculation (dpi). For translocation assays, bacteria were infiltrated into leaves at  $5 \times 10^8$  cfu/ml as described (60). Leaves were harvested 2 dpi and bleached with ethanol to facilitate better visualization of the HR. To determine the *in planta* growth of *Xanthomonas* the method described for *Pseudomonas* (44) was adapted. Bacteria were infiltrated at  $5 \times 10^4$  cfu/ml into ECW plants. Samples were collected 0, 2, 4, 6 and 8 dpi. For each strain three leaf disks of 0.5 cm<sup>2</sup> were harvested and ball-milled (Rentsch GmbH, Haan, Germany) in 100 µl 10 mM MgCl<sub>2</sub> at 30 Hz for 40 seconds. 10 µl of 10-fold dilutions up to  $10^{-8}$  were dropped onto selective NYG agar.

# Construction of AvrBs3∆2 fusion proteins

To create translational fusions with  $avrBs3\Delta 2$  the promoters and 5' coding sequences of *xop* genes were amplified by PCR from genomic DNA of *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10, cloned into pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and recombined into

pL6GW356 (60) (Table 1). The PCR products contained the first 135 codons of *xopE1* and 1001 bp upstream sequence, the first 150 codons of *xopE2* and 1018 bp upstream sequence, the first 100 codons of *xopG* and 409 bp upstream sequence and the first 135 codons of *xopH* and 979 bp upstream sequence, respectively. Oligonucleotide sequences are given in Table 2.

# Protein analysis in Xanthomonas

*In vitro* secretion experiments and Western blot analyses were performed as described (74). For detection of AvrBs3 (46) and HrcN (73) polyclonal antisera and horse-radish peroxidaselabeled goat  $\alpha$ -rabbit antiserum (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) were used. Reactions were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

### **RNA** analyses

RNA extraction, cDNA synthesis and RT-PCR experiments were performed as described (61). Experiments were performed at least three times for each gene with two independent cDNA preparations each. Oligonucleotide sequences are given in Table 2.

## Generation of mutations in *xopE1* and *xopE2*

To mutate *xopE1*, a deletion of 1194 bp encompassing the complete gene with exception of the start and stop codon was generated. For this, a 1000 bp fragment upstream and a 998 bp fragment downstream of *xopE1* were amplified from genomic DNA of *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10 using oligonucleotides harbouring appropriate restriction sites. To generate a 1071 bp deletion encompassing the *xopE2* gene between start and stop codon, a 999 bp fragment upstream and a 1000 bp fragment downstream were amplified from *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10 genomic DNA (see Table 2). The PCR fragments were cloned into pBluescript II KS giving pKS $\Delta$ xopE1 and pKS $\Delta$ xopE2. The 2 kb *Sall/XbaI* deletion fragments of pKS $\Delta$ xopE1 and pKS $\Delta$ xopE2 were ligated into the suicide vector pK18mob::*sacB* (76) (Table 1) resulting in pK18E1 and pK18E2, respectively. pK18E1 and pK18E2 were electroporated into *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10 $\Delta$ xopE2, and 85-10 $\Delta$ xopE1 $\Delta$ xopE2) were tested by PCR and by Southern blot analyses.

I IDEL 2. Ongoinderconde	o uova in uno study	1			
Name	Sequence	Features <sup>a</sup>			
Construction of AvrBs3	2 fusions				
xopE1 forward	caccTGCCGTGATGGAAGGCGGCAC	Directional TOPO site			
xopE1 reverse	AGACAGGTAACTACAGGTGGAG				
xopE2 forward	<pre>caccCTTCCTGGGGTTCAGCCGTTC</pre>	Directional TOPO site			
xopE2 reverse	GCTGCCCGCCAGTAAATTTTC				
xopG forward	<pre>caccTGCGAGCGCTTCCTTCAGCAG</pre>	Directional TOPO site			
xopG reverse	TGCTCTTTCCATAGCGAGCGCTTG				
xopH forward	caccGATTACCGTCCCAGCCATGAC	Directional TOPO site			
xopH reverse	CTTGGACGGCCTCAACCTAG				
<b>RT-PCR</b> analyses					
RT_xopE1 forward	CATTTCAAAGCCGGCGATGTC				
RT_xopE1 reverse	GTACATGTGGGCGCACGCTTG				
RT_xopE2 forward	AGTTCAAAGCCGAGCGTGGTG				
RT_xopE2 reverse	GCTGCCCGCCAGTAAATTTTC				
RT_xopG forward	CAGCGCTTGAGAAGATTGCAG				
RT_xopG reverse	CCATGTTCCTGCCTGATGGAG				
RT_xopH forward	CCGCAACCCACGCGGGGCGAC				
RT_xopH reverse	CATTCGGACCATAACAATGGCTG				
RT_16SrRNA forward	TACGCTAATACCGCATACGAC				
RT_16SrRNA reverse	TGGCACGAAGTTAGCCGGTG				
Generation of mutations	in xopE1 and xopE2				
$\Delta xopE1_1$	ACGC <u>gtcgac</u> GTGATGGAAGGCGGCACCGTC	SalI site			
$\Delta xopE1_2$	CCC <u>aagctt</u> CATGTCGCTCTCCGATCATG	HindIII site			
$\Delta xopE1_3$	CCC <u>aagctt</u> AGATGAACGCCCCTTCGATC	HindIII site			
$\Delta xopE1 4$	CGCggatccCAGGCCACCAGCAGCCACAAC	BamHI site			
$\Delta xopE2$ 1	ACGCgtcgacCTGGGGTTCAGCCGACATAC	SalI site			
$\Delta xopE2^{-2}$	CCCaagcttCATCTTGATCTCCTGCAGTGAC	HindIII site			
$\Delta x op E2^{-3}$	CCCaagcttTGACGATGGATCAAGCCGGATG	HindIII site			
$\Delta xopE2$ 4	CGCggatccCGCCTGGACGAACTCGCCCAG	BamHI site			
Generation of XopE1 and	XopE2 GFP fusions				
xopE1 forward	caccATGGGACTATGCATTTCAAAG	Directional TOPO site			
xopE1 reverse	TCTCGCCACCGTGACAGGCGG				
xopE2 forward	CaccATGGGGCTATGCAGTTCAAAG	Directional TOPO site			
xopE2 reverse	CCAACTCAAGGGTGGGCGAC				
xopE2(G2A) forward	caccATGqcqCTATGCAGTTCAAAG	Directional TOPO site			
xopE2(G2E) forward		Directional TOPO site			

TABLE 2. Oligonucleotides used in this study

\* Special features of the oligonucleotides are underlined in the sequence.

# Generation of XopE1::GFP and XopE2::GFP fusion proteins

To create translational fusions to GFP the *xopE1* and *xopE2* genes were amplified without stop codons from genomic DNA of *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10, cloned into pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and recombined into pGWB5 (Research Institute of Molecular Genetics, Matsue, Japan) which results in a C-terminal GFP-tag. Mutations in *xopE2* were introduced using modified forward oligonucleotides. Oligonucleotide sequences are given in Table 2.

# In planta expression and subcellular localization of GFP fusions

Transient expression in *N. benthamiana* was mediated by *A. tumefaciens* strain GV3101 (85). Bacterial suspensions ( $OD_{600} = 0.5$ ) were incubated for three hours at room temperature in

infiltration medium (20). After inoculation of leaves with a needleless syringe N. benthamiana plants were kept at 20°C, 70% relative humidity and with 16 hours light. Samples were collected 48 hours post inoculation. Samples for western blot (two 0.8 cm<sup>2</sup> leaf disks) were frozen in liquid nitrogen, ground and resuspended in 120 µl 8 M urea and 30 µl 5x Laemmli buffer. Samples were boiled for 10 minutes prior to polyacrylamide gel electrophoresis. Immunoblots were incubated with a polyclonal rabbit  $\alpha$ -GFP serum (Molecular Probes, Leiden, Germany) and a horse-radish peroxidase-labeled goat  $\alpha$ -rabbit antiserum (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Reactions were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). The hydroxylamine treatment was carried out with plant extracts prepared as described above. A final concentration of 0.5 M hydroxylamine (pH 7) was added and samples were incubated for 2 hours at 22°C. Subcellular localization of GFP and effector-GFP fusions in the N. benthamiana lower epidermal cells were inspected using the confocal laser scanning microscope LSM 510 and the software LSM Image Browser (Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Germany) according to protocols from the manufacturer. To visualize plant cell nuclei samples for microscopy were treated with 0.1% Diamidin-2-phenylindol (DAPI) solution.

# **Bioinformatic approaches**

Sequence homology searches were conducted on the nucleotide and amino acid level using BLAST (2) on the following genomes: *X. axonopodis* pv. citri 306 (25), *X. campestris* pv. campestris ATC3391 (25), *X. campestris* pv. campestris 8004 (67), *X. oryzae* pv. oryzae MAFF311018 (64), *P. syringae* pv. tomato DC3000 (11) and *Ralstonia solanacearum* GMI1000 (75). For motif searches we used Pfam (5), TIGRFAM (39), MEROPS (69) and InterPro (58). Phylogenetic analyses were performed as described (51) using BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) and MEGA2 (48). For protein structure prediction phyre (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre) was used. N-myristoylation motifs were perforted using NMT (30) and Myristoylator (7).

The sequences of the *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10 effectors XopE1, XopE2, XopG, and XopH are accessible via GenBank (accession numbers: CAJ21925, CAJ23957, CAJ22929, CAJ19917, respectively).

# Results

# Identification of candidate type III effectors

Homology searches of the recently finished genomic sequence of X. campestris pv. vesicatoria strain 85-10 (83) revealed new putative type III effector genes. Here, we will describe four genes, *xopE1*, *xopE2*, *xopG* and *xopH* in detail (Fig. 1). The chromosomal genes xopE1 and xopE2 are homologous to each other (79% DNA sequence identity) (Fig. 1B and C). The predicted proteins XopE1 and XopE2 share 69% amino acid sequence identity and belong to the HopX2 (formerly HopPmaB) family of type III effector proteins (63% and 79% amino acid sequence identity to HopX2, respectively) (38, 51, 72). So far, the molecular function of HopX2-family members is enigmatic because protein motif searches and structural predictions did not give any indications. The xopG gene is also located on the chromosome and encodes a protein with a putative zinc binding motif (HEXXE; amino acid position 142-146) in a domain that shows typical features of zinc metalloproteases of the M27 family (MEROPS accession MER01174). The predicted XopG protein shows 47% sequence identity (67% similarity) to HopH1 (formerly HopPtoH) from P. syringae pv. tomato (51, 65). The HopH1 protein family includes effectors from P. syringae (51) and putative effectors from X. campestris pv. campestris, X. oryzae pv. oryzae and R. solanacearum (Fig. 2). In contrast to the three other putative effector genes, *xopH* is located on the largest plasmid in strain 85-10, pXCV183, immediately upstream of the avrBs1 effector gene (Fig. 1D). The predicted XopH protein contains a putative tyrosine phosphatase domain (amino acid position 248-314) and shows 30% identity and 49% similarity to HopAO1 (formerly HopPtoD2) from P. syringae pv. tomato (51, 65). HopAO1 has demonstrated tyrosine phosphatase activity (10, 32).



**FIGURE 1:** Schematic overview of four effector regions in the *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10 genome.

Overview of the chromosomal regions containing (A) xopG, (B) xopEI, (C) *xopE2* and (D) the *xopH* and *avrBs1* region on plasmid pXCV183. Regions shaded in grey indicate DNA identities of at least 79%. Single-headed arrows represent genes and their direction of transcription. Black arrows refer to effector genes. Grey arrows represent mobile genetic elements. Numbers 1 and 2 mark genes coding for putative cointegrate resolution proteins and transposases, respectively. Grey doubleheaded arrows represent IS elements. Grey triangles refer to 62-bp inverted repeats. Jagged lines indicate frame-shifts or destroyed genes.

The DNA regions containing *xopE2*, *xopG* and *xopH* show signs of acquisition by horizontal gene transfer (29). Both *xopE2* and *xopH* are associated with similar putative mobile elements (83), which are flanked by inverted repeats and consist of a transposase gene and genes encoding cointegrate resolution proteins (Fig. 1C, D). Such an element was first described in conjunction with the effector gene *xopC* (60). The *xopG* gene shows a lower G+C content (52.02%) compared to the chromosomal average (64.75%) and is flanked by mobile genetic elements (IS*1477*, IS*1479*, and IS*Xac2*) and a tRNA gene (Fig. 1A).

# XopE1, XopE2, XopG and XopH are secreted and translocated by the TTS system

To investigate whether XopE1, XopE2, XopG, and XopH are indeed type III effectors we tested for their secretion *in vitro* and translocation into the plant cell. For this, we generated translational fusions with the effector domain of AvrBs3 from *X. campestris* pv. vesicatoria. AvrBs3 induces the HR in the resistant pepper cultivar ECW-30R, which contains the corresponding resistance gene *Bs3* (55). The reporter protein AvrBs3 $\Delta$ 2 lacks the amino acid residues 2-152, which contain the type III secretion and translocation signal, but is still capable to induce the HR when transiently expressed in resistant plant cells (81). Translational fusion of AvrBs3 $\Delta$ 2 to a functional type III secretion and translocation signal leads to translocation by the TTS system and thus the induction of the HR in ECW-30R pepper plants (60).



**FIGURE 2**: Neighbor-joining phylogenetic tree of the HopH1 family of type III effector proteins. The phylogenetic analysis was performed in MEGA2 (48) using the neighbor-joining gamma model with a gamma parameter of 2.25. Confidence of the analysis was determined by bootstrapping, using 1,000 replicates. Numbers above the nodes are the corresponding bootstrap scores. The horizontal line below the phylogenetic tree indicates a genetic distance of 0.5. The names of known type III effectors, GenBank accession numbers and the original strain are indicated. For botulinum toxin A (bontoxylisin) only the peptidase domain (MEROPS family M27, amino acid residues 117-449) was analyzed. Here, the promoter and 5' coding regions of *xopE1*, *xopE2*, *xopG*, and *xopH* were fused to *avrBs3* $\Delta$ 2 in pL6GW356 (60). As controls we used AvrBs3 $\Delta$ 2 (81), AvrBs3<sub>1-200</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 (60) and HrpF<sub>1-387</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 (17). The latter is secreted but not translocated by the TTS system (17). The fusion constructs were conjugated into *X. campestris* pv. vesicatoria strains 85<sup>\*</sup> (91) and the type III-secretion mutant 85<sup>\*</sup> $\Delta$ *hrcV*, which is deleted in a gene coding for a conserved inner membrane component of the TTS system (73). Strain 85<sup>\*</sup> is a derivative of strain 85-10 which carries a point mutation in *hrpG* leading to constitutive expression of the TTS system (90). Expression of the fusion proteins was verified by western blot analysis using an AvrBs3-specific antibody (Fig. 3A). When the bacteria were incubated in secretion medium XopE1<sub>1-135</sub>-, XopE2<sub>1-150</sub>-, XopG<sub>1-100</sub>-, and XopH<sub>1-135</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 were detected in the culture supernatants of strain 85<sup>\*</sup>, but not of 85<sup>\*</sup> $\Delta$ *hrcV* (Fig. 3A). To ensure that no bacterial lysis had occurred the blots were reprobed with an antibody against HrcN, an intracellular component of the TTS system (73) (Fig. 3A). These results demonstrate that XopE1, XopE2, XopG, and XopH contain functional type III secretion signals in their N-terminal regions.



**FIGURE 3**: The N termini of XopE1, XopE2, XopG, and XopH harbor type III secretion signals and target AvrBs $3\Delta 2$  into the plant cell.

(A) In vitro secretion assay of Xop-AvrBs3 $\Delta 2$  fusion proteins. X. campestris pv. vesicatoria strains 85<sup>\*</sup> and the type III secretion-deficient mutant 85<sup>\*</sup> $\Delta hrcV$  expressing the AvrBs3 $\Delta 2$  chimeras as indicated were incubated in secretion medium. Equal protein amounts of total extracts and supernatants were analyzed by immunoblotting, using an AvrBs3-specific antibody. Membranes were reprobed with a specific antibody against the intracellular protein HrcN to ensure that no bacterial lysis had occurred. (B) In vivo translocation assay. X. campestris pv. vesicatoria strains 85<sup>\*</sup>, the type III secretion deficient mutant 85<sup>\*</sup> $\Delta hrcV$  and the translocation deficient mutant 85<sup>\*</sup> $\Delta hrpF$  expressing the AvrBs3 $\Delta 2$  fusion constructs as indicated were infiltrated into AvrBs3-responsive ECW-30R plants. Leaves were harvested two days post inoculation and bleached in ethanol for better visualization of the HR.
To test for type III-dependent translocation, strains 85<sup>\*</sup> and 85<sup>\*</sup> $\Delta hrcV$  expressing the fusion constructs described above were inoculated into leaves of ECW-30R plants and the near-isogenic pepper line ECW that is not able to recognize AvrBs3 and thus is susceptible. As control for type III-dependent translocation all constructs were also expressed in strain 85<sup>\*</sup> $\Delta hrpF$ , which is type III secretion-competent but does not translocate effector proteins into the plant cell (17). As shown in Fig. 3B, strain 85<sup>\*</sup> expressing AvrBs3<sub>1-200</sub>-, XopE1<sub>1-135</sub>-, XopE2<sub>1-150</sub>-, XopG<sub>1-100</sub>-, and XopH<sub>1-135</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 fusions induced the HR in ECW-30R, but not in the susceptible ECW plants (data not shown). As expected, no HR induction was observed in leaves of ECW and ECW-30R plants infected with strain 85<sup>\*</sup> expressing AvrBs3 $\Delta$ 2 (Fig. 3B), HrpF<sub>1-387</sub>-AvrBs3 $\Delta$ 2 (data not shown) (17) and with the secretion and translocation mutants 85<sup>\*</sup> $\Delta hrcV$  and 85<sup>\*</sup> $\Delta hrpF$  expressing the chimeric proteins (Fig. 3B). Taken together, these results demonstrate the type III-dependent translocation of the new Xop fusions into the plant cell.

#### xopE1, xopE2 and xopH are members of the HrpG regulon

To analyze the regulation of expression of the new effector genes we performed RT-PCR analyses of *X. campestris* pv. vesicatoria wild-type strain 85-10, its derivative  $85^*$  (90) and the *hrpX* deletion mutant  $85^* \Delta hrpX$  (61) grown in complex NYG medium.

As shown in Fig. 4, transcripts of *xopE1*, *xopE2* and *xopH* are highly abundant in strain 85<sup>\*</sup> but not (*xopE1* and *xopH*) or in much lower amounts (*xopE2*) in the wild-type strain 85-10 and  $85^*\Delta hrpX$ . This indicates that *xopE1*, *xopE2* and *xopH* are HrpG- and HrpX-dependently expressed and thus co-regulated with the TTS system. In contrast, the expression of *xopG* is detectable at similar levels in 85-10,  $85^*$  and  $85^*\Delta hrpX$  (Fig. 4) suggesting constitutive expression.

Hereafter, we focused our work on XopE1 and XopE2, because they belong to the functionally uncharacterized HopX2 family of effector proteins from *Xanthomonas* spp. and *Pseudomonas* spp. (72).

### Analysis of *xopE1* and *xopE2* deletion mutants

To study the contribution of *xopE1* and *xopE2* to bacterial virulence both genes were deleted in the chromosome of *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10 in a non-polar fashion using the suicide plasmid pK18mob::*sacB* (76). The resulting single and double mutants were tested for symptom formation and growth in susceptible pepper plants (ECW) and for HR elicitation



**FIGURE 4**: Expression analysis of the type III effector genes *xopE1*, *xopE2*, *xopG*, and *xopH* using RT-PCR.

*X. campestris* pv. vesicatoria strains 85-10, 85<sup>\*</sup>, and 85<sup>\*</sup> $\Delta hrpX$  were grown in NYG medium. 16S rRNA was used as constitutive control. The DNA samples were separated on a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. The results of one representative experiment are shown.

in resistant ECW-10R pepper plants. Strain 85-10 expresses the avirulence protein AvrBs1, which is recognized in ECW-10R pepper plants harboring the *Bs1* resistance gene (55). Bacterial strains carrying single deletions of *xopE1* and *xopE2*, as well as double mutants showed no significant difference in development of disease symptoms in susceptible plants and the HR induction in resistant plants when compared to the wild-type strain 85-10 (data not shown). Furthermore, the growth of single *xopE1* and *xopE2* mutants and the double mutant in susceptible pepper plants (ECW) was not significantly altered (Fig. 5).



**FIGURE 5**: Bacterial growth of wildtype and *xopE1* and *xopE2* mutant strains in susceptible pepper plants. *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10 (wild-type) and mutant strains  $85-10\Delta hrcV$ ,  $85-10\Delta xopE1$ ,  $85-10\Delta xopE2$  and  $85-10\Delta xopE1\Delta xopE2$ were infiltrated into ECW plants. Bacterial multiplication was monitored over a period of eight days. Values represent the mean of three samples from three different plants. Error bars indicate the standard deviations. Results from one representative experiment are shown.

## XopE1 and XopE2 harbor a conserved N-myristoylation motif and localize to the plant plasma membrane

Inspection of the XopE1 and XopE2 amino acid sequences revealed putative N-myristoylation motifs in both proteins. These typical eukaryotic motifs suggest that XopE1 and XopE2 might be acylated after delivery into the host cell cytosol and then targeted to the plant plasma membrane (33, 68) (Table 3). The N-myristoylation motif which is conserved in the homolog HopX2 from *P. syringae* (38) and in other effectors from *Xanthomonas* spp. and *Pseudomonas* spp. (Table 3) shows characteristic properties (Table 3), suggesting myristoylation of the N-terminal glycine residue (G2) *in planta*. Additionally, the conserved cysteine residue at position 4 could be palmitoylated (52) (Table 3).

To investigate the subcellular localization of XopE1 and XopE2 we used GFP as reporter. For this, *xopE1* and *xopE2* were translationally fused to *gfp* in a binary vector under control of the CaMV 35S promoter. The constructs were transiently expressed in the leaves of the solanaceous plant *Nicotiana benthamiana* using *Agrobacterium*-mediated gene transfer. Transient expression in pepper was not feasible because of the very low transformation efficiency. Immunoblot analysis 48 hours post inoculation showed that the fusion constructs were stably expressed (Fig. 6A), however, expression of XopE1::GFP was only weakly detectable (data not shown). Subcellular localization of the GFP fusion proteins was



**FIGURE 6**: *In planta* expression of GFP-tagged XopE2 and the mutant derivatives XopE2(G2A) and XopE2(G2E).

(A) XopE2::GFP fusion proteins are stably expressed in planta. Agrobacterium strains that mediate T-DNA-based delivery of xopE2::gfp, xopE2(G2A)::gfp, xopE2(G2E)::gfp, or gfp under control of the CaMV 35S promoter, were infiltrated into N. benthamiana leaves. Samples were collected 48 hours post inoculation and equal protein amounts were analyzed by immunoblotting, using a GFP-specific antibody. Asterisks indicate unspecific signals. (B) XopE2 is acylated in the plant. XopE2::GFP and XopE2(G2A)::GFP samples prepared as in (A) were treated with 0.5 M hydroxylamine pH 7 (HA) or with 0.5 M Tris pH 7 (Tris). Immunoblot analysis was carried out as in (A).

Organism <sup>a</sup>	Effector	Accession	N-terminal amino acid	Putative function or
	protein <sup>b</sup>	number	sequence <sup>c</sup>	family membership
<i>Xcv</i> 85-10	XopE1 <sup>d</sup>	CAJ21925	MGLCISKPAM SGSSVAASPE	HopX2 family
	XopE2 <sup>d</sup>	CAJ23957	MGLCSSKPSV VGSPVAGSPE	HopX2 family
	XopJ <sup>d</sup>	AAK72486	MGLCVSKPSV AGSPEHYAAH	C55 cysteine protease
<i>Xac</i> 306	AvrXacE1	AAM35178	MGLCVSRPAT SGSSVAASPE	HopX2 family
	AvrXacE3*	AAM39257	MCLCSSKPSV AGSPVAGSPE	HopX2 family
	XAC3230	AAM38074	MGLCTSKPSV VGSPVAGSPE	ADP-ribosyl
				transferase
Xcc	AvrXccB*	AAM42989	MGLCNSKSVA GSVVGSPIAT	C55 cysteine protease
ATCC33913				
	AvrXccC*	AAM41397	MGLCASKPSV AGSPARYTTH	AvrB1 homolog
	AvrXccE1	AAM40923	MGLCVSKPSV AGSPDHYATH	HopX2 family
Xcc 8004	XC_2004*	AAY49067	MGLCASKPSV AGSPARYTTH	AvrB1 homolog
	XC_2602	AAY49651	MGLCVSKPSV AGSPDHYATH	HopX2 family
	XC_3802*	AAY50842	MGLCNSKSVA GSVVGSPIAT	C55 cysteine protease
P. syringae	HopX2 <sup>d</sup>	AAL84240	MGLCVSKGST ASSPQHYAVR	HopX2 family
	HopZ2 <sup>d</sup>	CAC16700	MGICVSKPSV RHDYNEDYGR	C55 cysteine protease

**TABLE 3**. Conserved N-termini of effector proteins from *Xanthomonas* spp. and *Pseudomonas* spp. harbor putative N-myristoylation signals

<sup>a</sup> X. campestris pv. vesicatoria strain 85-10 (Xcv 85-10), X. axonopodis pv. citri strain 306 (Xac 306), X. campestris pv. campestris strains ATCC33913 and 8004 (Xcc ATCC33913, Xcc 8004)

<sup>b</sup> For *Pseudomonas* effectors the unified nomenclature was used (51). Asterisks indicate a manual change of the predicted translational start position (GLIMMER-based gene prediction leads to approximately 40% wrongly assigned start codons [94]). The start codon predicted here for *avrXccC* recently could be verified experimentally (19).

<sup>c</sup> Characteristic features of the N-myristoylation signal. The putatively myristoylated glycine residue is labeled in black. Residues likely to interact with the active center of the eukaryotic N-myristoyl transferase are shadowed in light gray. The conserved cysteine residue (white) could be palmitoylated. Residues that might interact with the surface of the N-myristoyl transferase are shadowed in dark gray. The less well conserved hydrophilic linkers are boxed.

<sup>d</sup> Experimentally verified type III effectors: XopE1 and XopE2 (this study); XopJ (60); HopX2 (38); HopZ2 (3).

determined by confocal laser scanning microscopy. As control we used GFP which was clearly detectable in the cytoplasm surrounding chloroplasts and nucleus and in cytoplasmic strands spanning the tonoplast (Fig. 7A, F). As expected, GFP was also detectable in nuclei, which were visualized by DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) staining (Fig. 7A, F).

In contrast to GFP, the fluorescence of the XopE1::GFP and XopE2::GFP fusions was clearly confined to the periphery of the lower epidermal cells and was not detectable in the nucleus or in the cytoplasm (Fig. 7B, C, G and H). These results suggest that XopE1 and XopE2 are predominantly localized at the plant plasma membrane.

### In planta localization and modification depends on glycine residue 2 in XopE2

To test whether the membrane localization is due to myristoylation, the glycine residue at amino acid position 2 in XopE2 was substituted by alanine and glutamic acid, respectively, using site-directed mutagenesis. XopE2 was chosen because it is better expressed in the plant.

Expression of the mutant fusion proteins XopE2(G2A)::GFP and XopE2(G2E)::GFP in *N. benthamiana* resulted in fluorescence patterns similar to the GFP control (Fig. 7A) suggesting a cytoplasmatic localization (Fig. 7D, E). Immunoblot analyses revealed fusion proteins of the expected molecular mass and showed that the altered localization was not due to instability of the mutant fusion proteins (Fig. 6A). Thus, the glycine residue at amino acid position 2 of XopE2 is essential for its localization to the plant plasma membrane.

Close inspection of the immunoblot in Fig. 6A revealed a different molecular mass of XopE2::GFP compared to the XopE2(G2A)::GFP and XopE2(G2E)::GFP mutant proteins. This together with the localization studies (Fig. 7C, D, E) strongly suggested that wild-type XopE2 was modified *in planta*. We reasoned that the post-translational modification could be covalent linkage of acyl chains, e.g., palmitoylation via thioester bonds (68). To examine this possibility protein extracts from *N. benthamiana* leaves expressing XopE2::GFP, XopE2(G2A)::GFP and XopE2(G2E)::GFP were treated with 0.5 M neutral hydroxylamine to release thioester bonds (68). This resulted in two distinct signals in immunoblot analyses of the XopE2::GFP sample which correspond in size to the untreated control ("Tris") and the XopE2(G2A)::GFP mutant version (Fig. 6B). These findings indicate that XopE2 is modified in the plant cell by acylation.

## Discussion

In this study, we characterized four type III effector genes, xopE1, xopE2, xopG, and xopH which were predicted by bioinformatic analysis of the genome of *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10 (83). Using the AvrBs3 effector domain as a reporter the type III-dependent secretion *in vitro* and translocation into the plant cell was demonstrated for all four candidate effector proteins. This increases the number of known type III effectors in *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10 to a total of 19 proteins.

Bioinformatic approaches gave hints to possible molecular functions of several new effector proteins in the plant cell. XopG and probably all other members of the HopH1 family are putative zinc metalloproteases, because they contain a zinc coordinating motif similar to that of botulinum toxin A from *Clostridium botulinum*. Botulinum toxin A is a neurotoxin that selectively cleaves synaptic SNARE (soluble <u>N</u>-ethyl-maleimide sensitive factor <u>attachment</u>



#### FIGURE 7: XopE1 and XopE2 localize to the plant plasma membrane.

Agrobacterium strains that mediate T-DNA-based transfer of (A) *gfp*, (B) *xopE1::gfp*, (C) *xopE2::gfp*, (D) *xopE2*(G2A)::*gfp*, or (E) *xopE2*(G2E)::*gfp* under control of the CaMV 35S promoter, were infiltrated into *N*. *benthamiana* leaves. Samples were taken 48 h post inoculation. Fluorescence of GFP and the GFP fusion proteins was visualized by confocal laser scanning microscopy in the lower epidermal cells. GFP fluorescence is shown in green (first column), nuclei were stained with Diamidin-2-phenylindol (DAPI) and appear white (second column). Chloroplast autofluorescence is shown in red (third column). The rightmost column is a merged view of the first three pictures. Panel (F) represents a magnification of a nucleus- and chloroplast-containing area from the merged view in (A), white arrows indicate cytoplasmic strands through the tonoplast. Panels (G) and (H) show magnifications of a nucleus- and chloroplast-containing area from the merged view in (S) µm in panels A-E and to 20 µm in panel F-G.

protein <u>re</u>ceptors) proteins thus blocking fusion of synaptic vesicles at the nerve terminal and inhibiting the release of neurotransmitters (50). In general, proteins of the SNARE superfamily facilitate the fusion of vesicles with the target membrane (66). In higher plants, SNAREs are involved in post-golgi trafficking, e. g., in the release of reactive oxygen species, toxic compounds and signaling processes (22, 26, 63, 66). Thus, SNAREs play a role inpathogen defense and it is therefore tempting to speculate that XopG targets SNARE proteins in plant cells.

XopH shows homology to the *P. syringae* pv. tomato type III effector HopAO1, which was shown to be important for virulence. HopAO1 has tyrosine phosphatase activity and modulates plant defense responses (10, 32). We believe that XopH belongs to the same class of enzymes.

The effectors XopE1 and XopE2 belong to the HopX2 effector family (72) which is quite prominent in *Xanthomonas* but bioinformatic approaches did not reveal a possible biochemical function. There are three homologs in *X. axonopodis* pv. citri strain 306 (25), one in *X. campestris* pv. campestris strain ATC33913 (25), one in *X. campestris* pv. campestris strain 8004 (67) and two in *X. campestris* pv. vesicatoria strain 85-10 (83) (Table 3). The broad distribution of the HopX2 family in many species of *Xanthomonas* suggests a conserved role in the interaction with the respective host plants. However, *xopE1* and *xopE2* single and double mutant strains were not affected in bacterial growth and symptom formation on susceptible pepper plants under the conditions we tested. Similar results were also reported for a mutant in the *X. campestris* pv. campestris homolog *avrXccE1*. In the latter study, seven additional putative effector genes of *X. campestris* pv. campestris were mutated alone or in combination, but none of the mutants showed an altered virulence phenotype (19). This suggests subtle contributions to bacterial virulence or functional redundancy, which is discussed for many type III effectors (1).

Type III effector genes in *Xanthomonas* are often co-regulated with the TTS system (60-62). Indeed, the expression of *xopE1*, *xopE2* and *xopH* is dependent on HrpG and HrpX, whereas *xopG* is constitutively expressed. Constitutive expression was also reported for other effectors, e.g., *avrBs1* which is located immediately downstream of *xopH* but situated in a different operon, *avrBs3* and *avrRxv* (21, 31, 46). The promoter regions of *xopE1* and *xopE2* contain a PIP box and a -10 box (TTCG-N<sub>16</sub>-TTCG-N<sub>31</sub>-CA-g/c-acT) which is present in many *Xanthomonas* promoters that are regulated by HrpX (84). However, the *xopH* promoter, which is also controlled by HrpX, does not contain the PIP and -10 box motifs. The absence of these motifs was also reported for other HrpX-regulated genes, e.g., *hpaJ* (60) and suggests the involvement of additional regulators downstream of HrpX.

Two effectors, XopE1 and XopE2, were characterized more in detail. Confocal laser scanning microscopy studies revealed that both XopE1 and XopE2 localize to the plant plasma membrane. Targeting of XopE1 and XopE2 to the membrane is most likely due to Nterminal modification of the proteins by acylation. This hypothesis is corroborated by the presence of N-myristoylation signals in the N-termini of the proteins (Table 3). Recognition of the N-myristoylation motif in the eukaryotic host cell leads to the attachment of the 14carbon saturated fatty acid myristate to the N-terminal glycine residue (33, 68). Indeed, the membrane localization of XopE2 was dependent on the presence of the N-terminal glycine residue, which is most likely myristoylated. Besides the myristoyl anchor often additional membrane attachment factors are found, e.g., subsequent palmitoylation of a cysteine residue (Table 3). The latter modifications are required for stable binding of the target protein to the membrane (53). Our finding that hydroxylamine treatment of plant protein extracts resulted in a shift in molecular mass (Fig. 6B) indicates that palmitate is covalently linked by a thioester bond to the cysteine residue at amino acid position 4 (68) (Table 3), a modification which is also discussed for other effector proteins (53). In animal cells, such dual acylation (myristoylation and palmitoylation) can direct proteins to lipid rafts (93). Lipid rafts are specialized membrane microdomains in which often signaling molecules are concentrated (49). Recently, lipid rafts were also described for plant plasma membranes (9), but their role in the interaction with pathogens has not been elucidated. The XopE2 modification and localization will be analyzed in more detail. Preliminary experiments using inhibitors of Nmyristoyl transferase (2-hydroxymyristic acid) and palmitoyl transferase (2-bromopalmitate) did not alter the subcellular localization of XopE2::GFP. However, it is unclear if these inhibitors target the enzymes in N. benthamiana.

How common is N-myristoylation of type III effectors? Membrane targeting mediated by N-myristoylation was described previously only for type III effectors from the plant pathogen *P. syringae* (59, 70, 79). However, analysis of the recently published *Xanthomonas* and *Pseudomonas* genome sequences revealed a number of proteins with putative N-terminal N-myristoylation signals which are homologous to the motif described here (Table 3). Interestingly, all these proteins are *bona fide* or putative effectors belonging to different effector families (Table 3). XopE1 and XopE2 are the only proteins for which the subcellular

localization in the host cell was studied so far. It is noteworthy that the conserved Nmyristoylation signal overlaps with the putative N-terminal type III secretion and translocation signal which is usually not conserved on the primary sequence level (1, 23). It might well be that the need for N-myristoylation has prevented a diversification of the amino acid sequence. Furthermore, the presence of the conserved signal sequence in different effector families supports the idea of a modular structure of effector proteins (82). One could therefore speculate about an exchange of functional modules between different effector genes during evolution.

In conclusion, XopE1 and XopE2 are the first *Xanthomonas* effectors which are targeted to the plant plasma membrane, most likely mediated by N-myristoylation. Both effector proteins might interfere with signaling processes that are important for the basal plant defence against the pathogen (1, 49). The next challenge is to identify the target proteins of XopE1 and XopE2 in the host plant.

## Acknowledgments

We are grateful to R. Koebnik for helpful discussions and to S. Kay, D. Büttner and J. Boch for critical reading of the manuscript. We thank C. Kretschmer and B. Rosinsky for excellent technical assistance. This work was funded by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 363 and SFB 648) and the Federal Ministry of Education and Research (BMBF, GenoMik initiative) to U. B.

## References

- 1. **Alfano, J. R., and A. Collmer.** 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. Annu. Rev. Phytopathol. **42:**385-414.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.
- Arnold, D. L., R. W. Jackson, A. J. Fillingham, S. C. Goss, J. D. Taylor, J. W. Mansfield, and A. Vivian. 2001. Highly conserved sequences flank avirulence genes: isolation of novel avirulence genes from *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. Microbiol. 147:1171-1182.
- 4. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.). 1996. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Bateman, A., L. Coin, R. Durbin, R. D. Finn, V. Hollich, S. Griffiths-Jones, A. Khanna, M. Marshall, S. Moxon, E. L. Sonnhammer, D. J. Studholme, C. Yeats, and S. R. Eddy. 2004. The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res. 32:D138-141.
- Bogdanove, A., S. V. Beer, U. Bonas, C. A. Boucher, A. Collmer, D. L. Coplin, G. R. Cornelis, H.-C. Huang, S. W. Hutcheson, N. J. Panopoulos, and F. Van Gijsegem. 1996. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. Mol. Microbiol. 20:681-683.
- 7. **Bologna, G., C. Yvon, S. Duvaud, and A. L. Veuthey.** 2004. N-Terminal myristoylation predictions by ensembles of neural networks. Proteomics **4**:1626-1632.
- 8. **Bonas, U., R. Schulte, S. Fenselau, G. V. Minsavage, B. J. Staskawicz, and R. E. Stall.** 1991. Isolation of a gene-cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. Mol. Plant-Microbe Interact. **4:**81-88.
- Borner, G. H., D. J. Sherrier, T. Weimar, L. V. Michaelson, N. D. Hawkins, A. Macaskill, J. A. Napier, M. H. Beale, K. S. Lilley, and P. Dupree. 2005. Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. Plant Physiol. 137:104-116.
- Bretz, J. R., N. M. Mock, J. C. Charity, S. Zeyad, C. J. Baker, and S. W. Hutcheson. 2003. A translocated protein tyrosine phosphatase of *Pseudomonas* syringae pv. tomato DC3000 modulates plant defence response to infection. Mol. Microbiol. 49:389-400.
- Buell, C. R., V. Joardar, M. Lindeberg, J. Selengut, I. T. Paulsen, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, R. T. Deboy, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, R. Madupu, S. Daugherty, L. Brinkac, M. J. Beanan, D. H. Haft, W. C. Nelson, T. Davidsen, N. Zafar, L. Zhou, J. Liu, Q. Yuan, H. Khouri, N. Fedorova, B. Tran, D. Russell, K. Berry, T. Utterback, S. E. Van Aken, T. V. Feldblyum, M. D'Ascenzo, W. L. Deng, A. R. Ramos, J. R. Alfano, S. Cartinhour, A. K. Chatterjee, T. P. Delaney, S. G. Lazarowitz, G. B. Martin, D. J. Schneider, X. Tang, C. L. Bender, O. White, C. M. Fraser, and A. Collmer. 2003. The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:10181-10186.
- 12. **Büttner, D., and U. Bonas.** 2003. Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. Curr. Op. Plant. Biol. **6:**312-319.
- 13. **Büttner, D., and U. Bonas.** 2002. Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. EMBO J. **21**:5313-5322.

- 14. **Büttner, D., and U. Bonas.** 2002. Port of entry the type III secretion translocon. Trends Microbiol. **10**:186-192.
- 15. **Büttner, D., D. Gürlebeck, L. D. Noël, and U. Bonas.** 2004. HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. Mol. Microbiol. **54**:755-768.
- Büttner, D., C. Lorenz, E. Weber, and U. Bonas. 2006. Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Mol. Microbiol. 59:513-527.
- 17. **Büttner, D., D. Nennstiel, B. Klüsener, and U. Bonas.** 2002. Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. J. Bacteriol. **184:**2389-2398.
- 18. **Canteros, B. J.** 1990. Ph.D. thesis. Diversity of plasmids and plasmid-encoded phenotypic traits in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. University of Florida, Gainesville.
- Castañeda, A., J. D. Reddy, B. El-Yacoubi, and D. W. Gabriel. 2005. Mutagenesis of all eight *avr* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* had no detected effect on pathogenicity, but one *avr* gene affected race specificity. Mol. Plant-Microbe Interact. 18:1306–1317.
- 20. Chung, E., E. Seong, Y. C. Kim, E. J. Chung, S. K. Oh, S. Lee, J. M. Park, Y. H. Joung, and D. Choi. 2004. A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang). Mol. Cells 17:377-380.
- Ciesiolka, L. D., T. Hwin, J. D. Gearlds, G. V. Minsavage, R. Saenz, M. Bravo, V. Handley, S. M. Conover, H. Zhang, J. Caporgno, N. B. Phengrasamy, A. O. Toms, R. E. Stall, and M. C. Whalen. 1999. Regulation of expression of avirulence gene *avrRxv* and identification of a family of host interaction factors by sequence analysis of *avrBsT*. Mol. Plant-Microbe Interact. 12:35-44.
- Collins, N. C., H. Thordal-Christensen, V. Lipka, S. Bau, E. Kombrink, J. L. Qiu, R. Huckelhoven, M. Stein, A. Freialdenhoven, S. C. Somerville, and P. Schulze-Lefert. 2003. SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. Nature 425:973-977.
- 23. Cornelis, G. R., and F. Van Gijsegem. 2000. Assembly and function of type III secretory systems. Annu. Rev. Microbiol. 54:735-774.
- 24. Cunnac, S., C. Boucher, and S. Genin. 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.
- da Silva, A. C., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Farah, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, C. B. Monteiro-Vitorello, M. A. Sluys, N. F. Almeida, L. M. Alves, A. M. Do Amaral, M. C. Bertolini, L. E. Camargo, G. Camarotte, F. Cannavan, J. Cardozo, F. Chambergo, L. P. Ciapina, R. M. Cicarelli, L. L. Coutinho, J. R. Cursino-Santos, H. El-Dorry, J. B. Faria, A. J. Ferreira, R. C. Ferreira, M. I. Ferro, E. F. Formighieri, M. C. Franco, C. C. Greggio, A. Gruber, A. M. Katsuyama, L. T. Kishi, R. P. Leite, E. G. Lemos, M. V. Lemos, E. C. Locali, M. A. Machado, A. M. Madeira, N. M. Martinez-Rossi, E. C. Martins, J. Meidanis, C. F. Menck, C. Y. Miyaki, D. H. Moon, L. M. Moreira, M. T. Novo, V. K. Okura, M. C. Oliveira, V. R. Oliveira, H. A. Pereira, A. Rossi, J. A. Sena, C. Silva, R. F. De Souza, L. A. Spinola, M. A. Takita, R. E. Tamura, E. C. Teixeira, R. I. Tezza, M. Trindade Dos Santos, D. Truffi, S. M. Tsai, F. F. White, J. C. Setubal, and J. P. Kitajima. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. Nature 417:459-463.

- 26. **Dangl, J. L., and J. D. Jones.** 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature **411**:826-833.
- Daniels, M. J., C. E. Barber, P. C. Turner, M. K. Sawczyc, R. J. W. Byrde, and A. H. Fielding. 1984. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. EMBO J. 3:3323-3328.
- 28. Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin, and D. Helinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7347-7351.
- 29. **Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel, and J. Hacker.** 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. Nat. Rev. Microbiol. **2:**414-424.
- Eisenhaber, F., B. Eisenhaber, W. Kubina, S. Maurer-Stroh, G. Neuberger, G. Schneider, and M. Wildpaner. 2003. Prediction of lipid posttranslational modifications and localization signals from protein sequences: big-Pi, NMT and PTS1. Nucleic Acids Res. 31:3631-3634.
- 31. **Escolar, L., G. Van den Ackerveken, S. Pieplow, O. Rossier, and U. Bonas.** 2001. Type III secretion and *in planta* recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. Mol. Plant Pathol. **2:**287–296.
- 32. Espinosa, A., M. Guo, V. C. Tam, Z. Q. Fu, and J. R. Alfano. 2003. The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. Mol. Microbiol. **49:**377-387.
- 33. **Farazi, T. A., G. Waksman, and J. I. Gordon.** 2001. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. J. Biol. Chem. **276**:39501-39504.
- 34. **Fenselau, S., I. Balbo, and U. Bonas.** 1992. Determinants of pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals. Mol. Plant-Microbe Interact. **5**:390-396.
- 35. **Fenselau, S., and U. Bonas.** 1995. Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. Mol. Plant-Microbe Interact. **8**:845-854.
- 36. **Figurski, D., and D. R. Helinski.** 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76:**1648-1652.
- 37. Galán, J. E., and A. Collmer. 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. Science 284:1322-1328.
- 38. Guttman, D. S., B. A. Vinatzer, S. F. Sarkar, M. V. Ranall, G. Kettler, and J. T. Greenberg. 2002. A Functional Screen for the Type III (Hrp) Secretome of the Plant Pathogen *Pseudomonas syringae*. Science 295:1722-1726.
- 39. Haft, D. H., B. J. Loftus, D. L. Richardson, F. Yang, J. A. Eisen, I. T. Paulsen, and O. White. 2001. TIGRFAMs: a protein family resource for the functional identification of proteins. Nucleic Acids Res. 29:41-43.
- 40. Hotson, A., R. Chosed, H. Shu, K. Orth, and M. B. Mudgett. 2003. Xanthomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins *in planta*. Mol. Microbiol. **50**:377-389.
- 41. **Huguet, E., and U. Bonas.** 1997. *hrpF* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes an 87-kDa protein with homology to NoIX of *Rhizobium fredii*. Mol. Plant-Microbe Interact. **10:**488-498.
- 42. Huguet, E., K. Hahn, K. Wengelnik, and U. Bonas. 1998. *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. Mol. Microbiol. **29:**1379-1390.

- 43. Jones, J. B., G. H. Lacy, H. Bouzar, R. E. Stall, and N. W. Schaad. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. Syst. Appl. Microbiol. 27:755-762.
- 44. Katagiri, F., R. Thilmony, and S. Y. He. 2002. The Arabidopsis thaliana-Pseudomonas syringae interaction. The Arabidopsis Book: 1-35.
- 45. **Klement, Z.** 1982. Hypersensitivity, p. 149-177. *In* M. S. Mount and G. H. Lacy (ed.), Phytopathogenic prokaryotes, vol. 2. Academic Press, New York.
- 46. **Knoop, V., B. Staskawicz, and U. Bonas.** 1991. Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. J. Bacteriol. **173:**7142-7150.
- 47. **Koebnik, R.** 2001. The role of bacterial pili in protein and DNA translocation. Trends Microbiol. **9**:586-590.
- 48. Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen, and M. Nei. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics 17:1244-1245.
- 49. Lafont, F., L. Abrami, and F. G. van der Goot. 2004. Bacterial subversion of lipid rafts. Curr. Opin. Microbiol. 7:4-10.
- 50. Lalli, G., S. Bohnert, K. Deinhardt, C. Verastegui, and G. Schiavo. 2003. The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. Trends Microbiol. 11:431-437.
- Lindeberg, M., J. Stavrinides, J. H. Chang, J. R. Alfano, A. Collmer, J. L. Dangl, J. T. Greenberg, J. W. Mansfield, and D. S. Guttman. 2005. Proposed guidelines for a unified nomenclature and phylogenetic analysis of type III Hop effector proteins in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. Mol. Plant-Microbe Interact. 18:275-282.
- 52. **Maurer-Stroh, S., B. Eisenhaber, and F. Eisenhaber.** 2002. N-terminal N-myristoylation of proteins: prediction of substrate proteins from amino acid sequence. J. Mol. Biol. **317:**541-557.
- 53. **Maurer-Stroh, S., and F. Eisenhaber.** 2004. Myristoylation of viral and bacterial proteins. Trends Microbiol. **12**:178-185.
- 54. Metz, M., D. Dahlbeck, C. Q. Morales, B. Al Sady, E. T. Clark, and B. J. Staskawicz. 2005. The conserved *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in *Nicotiana benthamiana*. Plant J. **41:**801-814.
- 55. Minsavage, G. V., D. Dahlbeck, M. C. Whalen, B. Kearny, U. Bonas, B. J. Staskawicz, and R. E. Stall. 1990. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* pepper interactions. Mol. Plant-Microbe Interact. **3**:41-47.
- 56. Morales, C. Q., J. Posada, E. Macneale, D. Franklin, I. Rivas, M. Bravo, J. Minsavage, R. E. Stall, and M. C. Whalen. 2005. Functional analysis of the early chlorosis factor gene. Mol. Plant-Microbe Interact. 18:477-486.
- 57. Mudgett, M. B., O. Chesnokova, D. Dahlbeck, E. T. Clark, U. Bonas, and B. J. Staskawicz. 2000. Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13324-13329.
- 58. Mulder, N. J., R. Apweiler, T. K. Attwood, A. Bairoch, D. Barrell, A. Bateman, D. Binns, M. Biswas, P. Bradley, P. Bork, P. Bucher, R. R. Copley, E. Courcelle, U. Das, R. Durbin, L. Falquet, W. Fleischmann, S. Griffiths-Jones, D. Haft, N. Harte, N. Hulo, D. Kahn, A. Kanapin, M. Krestyaninova, R. Lopez, I. Letunic, D. Lonsdale, V. Silventoinen, S. E. Orchard, M. Pagni, D. Peyruc, C. P. Ponting, J. D. Selengut, F. Servant, C. J. Sigrist, R. Vaughan, and E. M. Zdobnov. 2003. The

InterPro Database, 2003 brings increased coverage and new features. Nucleic Acids Res. **31:**315-318.

- 59. Nimchuk, Z., E. Marois, S. Kjemtrup, R. T. Leister, F. Katagiri, and J. L. Dangl. 2000. Eukaryotic fatty acylation drives plasma membrane targeting and enhances function of several type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*. Cell 101:353-363.
- 60. Noël, L., F. Thieme, J. Gäbler, D. Büttner, and U. Bonas. 2003. XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. J. Bacteriol. **185**:7092-7102.
- 61. Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel, and U. Bonas. 2001. cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Mol. Microbiol. **41**:1271-1281.
- 62. Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel, and U. Bonas. 2002. Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria are encoded within the *hrp* pathogenicity island. J. Bacteriol. **184**:1340-1348.
- 63. Nuhse, T. S., T. Boller, and S. C. Peck. 2003. A plasma membrane syntaxin is phosphorylated in response to the bacterial elicitor flagellin. J. Biol. Chem. 278:45248-45254.
- 64. Ochiai, H., Y. Inoue, M. Takeya, A. Sasaki, and H. Kaku. 2005. Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests contribution of large numbers of effector genes and insertion sequences to its race diversity. Japan Agricultural Research Quarterly **39**:275-287.
- 65. Petnicki-Ocwieja, T., D. J. Schneider, V. C. Tam, S. T. Chancey, L. Shan, Y. Jamir, L. M. Schechter, M. D. Janes, C. R. Buell, X. Tang, A. Collmer, and J. R. Alfano. 2002. Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:7652-7657.
- 66. **Pratelli, R., J. U. Sutter, and M. R. Blatt.** 2004. A new catch in the SNARE. Trends Plant Sci. **9:**187-195.
- 67. Qian, W., Y. Jia, S. X. Ren, Y. Q. He, J. X. Feng, L. F. Lu, Q. Sun, G. Ying, D. J. Tang, H. Tang, W. Wu, P. Hao, L. Wang, B. L. Jiang, S. Zeng, W. Y. Gu, G. Lu, L. Rong, Y. Tian, Z. Yao, G. Fu, B. Chen, R. Fang, B. Qiang, Z. Chen, G. P. Zhao, J. L. Tang, and C. He. 2005. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Genome Res. 15:757-767.
- 68. Rajala, R. V., R. S. Datla, T. N. Moyana, R. Kakkar, S. A. Carlsen, and R. K. Sharma. 2000. N-myristoyltransferase. Mol. Cell Biochem. 204:135-155.
- 69. **Rawlings, N. D., D. P. Tolle, and A. J. Barrett.** 2004. MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Res. **32:**D160-164.
- 70. **Robert-Seilaniantz, A., L. Shan, J.-M. Zhou, and X. Tang.** 2006. The *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 type III effector HopF2 has a putative myristoylation site required for its avirulence and virulence functions. Mol. Plant-Microbe Interact. **19:**130-138.
- 71. Roden, J. A., B. Belt, J. B. Ross, T. Tachibana, J. Vargas, and M. B. Mudgett. 2004. A genetic screen to isolate type III effectors translocated into pepper cells during *Xanthomonas* infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**:16624-16629.
- 72. Rohmer, L., D. S. Guttman, and J. L. Dangl. 2004. Diverse evolutionary mechanisms shape the type III effector virulence factor repertoire in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. Genetics 167:1341-1360.

- 73. **Rossier, O., G. Van den Ackerveken, and U. Bonas.** 2000. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. Mol. Microbiol. **38**:828-838.
- 74. **Rossier, O., K. Wengelnik, K. Hahn, and U. Bonas.** 1999. The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**:9368-9373.
- 75. Salanoubat, M., S. Genin, F. Artiguenave, J. Gouzy, S. Mangenot, M. Arlat, A. Billault, P. Brottier, J. C. Camus, L. Cattolico, M. Chandler, N. Choisne, C. Claudel-Renard, S. Cunnac, N. Demange, C. Gaspin, M. Lavie, A. Moisan, C. Robert, W. Saurin, T. Schiex, P. Siguier, P. Thebault, M. Whalen, P. Wincker, M. Levy, J. Weissenbach, and C. A. Boucher. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. Nature 415:497-502.
- 76. Schäfer, A., A. Tauch, W. Jäger, J. Kalinowski, G. Thierbach, and A. Pühler. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Gene **145:**69-73.
- 77. Schulte, R., and U. Bonas. 1992. Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. J. Bacteriol. **174:**815-823.
- 78. Schulte, R., and U. Bonas. 1992. A *Xanthomonas* pathogenicity locus is induced by sucrose and sulfur-containing amino-acids. Plant Cell **4**:79-86.
- 79. Shan, L., V. K. Thara, G. B. Martin, J.-M. Zhou, and X. Tang. 2000. The *Pseudomonas* AvrPto protein is differentially recognized by tomato and tobacco and is localized to the plant plasma membrane. Plant Cell 12:2323–2337.
- 80. **Staskawicz, B. J.** 2001. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. Plant Physiol. **125**:73–76.
- 81. Szurek, B., O. Rossier, G. Hause, and U. Bonas. 2002. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. Mol. Microbiol. **46**:13-23.
- Tampakaki, A. P., V. E. Fadouloglou, A. D. Gazi, N. J. Panopoulos, and M. Kokkinidis. 2004. Conserved features of type III secretion. Cell. Microbiol. 6:805-816.
- 83. Thieme, F., R. Koebnik, T. Bekel, C. Berger, J. Boch, D. Büttner, C. Caldana, L. Gaigalat, A. Goesmann, S. Kay, O. Kirchner, C. Lanz, B. Linke, A. C. McHardy, F. Meyer, G. Mittenhuber, D. H. Nies, U. Niesbach-Klösgen, T. Patschkowski, C. Rückert, O. Rupp, S. Schneiker, S. C. Schuster, F. Vorhölter, E. Weber, A. Pühler, U. Bonas, D. Bartels, and O. Kaiser. 2005. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria revealed by the complete genome sequence. J. Bacteriol. 187:7254-7266.
- Tsuge, S., S. Terashima, A. Furutani, H. Ochiai, T. Oku, K. Tsuno, H. Kaku, and Y. Kubo. 2005. Effects on promoter activity of base substitutions in the *cis*-acting regulatory element of HrpXo regulons in *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae. J. Bacteriol. 187:2308-2314.
- 85. Van Larebeke, N., G. Engler, M. Holsters, S. Van den Elsacker, I. Zaenen, R. A. Schilperoort, and J. Schell. 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. Nature 252:169-170.
- 86. Vauterin, L., J. Rademaker, and J. Swings. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. Phytopathology **90:**677-682.
- 87. Weber, E., T. Ojanen-Reuhs, E. Huguet, G. Hause, M. Romantschuk, T. K. Korhonen, U. Bonas, and R. Koebnik. 2005. The type III-dependent Hrp pilus is

required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria with pepper host plants. J. Bacteriol. **187:**2458-2468.

- 88. Wengelnik, K., and U. Bonas. 1996. HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. J. Bacteriol. **178**:3462-3469.
- 89. Wengelnik, K., C. Marie, M. Russel, and U. Bonas. 1996. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. J. Bacteriol. **178**:1061-1069.
- 90. Wengelnik, K., O. Rossier, and U. Bonas. 1999. Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria result in constitutive expression of all *hrp* genes. J. Bacteriol. **181**:6828-6831.
- 91. Wengelnik, K., G. Van den Ackerveken, and U. Bonas. 1996. HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. Mol. Plant-Microbe Interact. **9**:704-712.
- 92. Woodcock, D. M., P. J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S. S. Smith, M. Z. Michael, and M. W. Graham. 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. Nucleic Acids Res. 17:3469-3478.
- 93. Zacharias, D. A., J. D. Violin, A. C. Newton, and R. Y. Tsien. 2002. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. Science 296:913-916.
- 94. Zhu, H. Q., G. Q. Hu, Z. Q. Ouyang, J. Wang, and Z. S. She. 2004. Accuracy improvement for identifying translation initiation sites in microbial genomes. Bioinformatics 20:3308-3317.

#### 2.2.2.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im vorangegangenen Manuskript wurden vier neue Effektorgene, xopE1, xopE2, xopG und xopH, charakterisiert, die im Genom von Xcv-Stamm 85-10 aufgrund ihrer Homologie zu bekannten Effektoren vorhergesagt wurden. Drei der Gene sind mit dem Typ III-Sekretionssystem koreguliert, während xopG konstitutiv exprimiert wird. Die Typ IIIabhängige Sekretion und Translokation der Effektoren wurde mittels Reporterfusionen mit der Effektordomäne von AvrBs3 (AvrBs3A2) gezeigt. XopG zeigt Homologie zum Effektor HopH1 aus *P. syringae* und bildet eine Proteinfamilie mit weiteren möglichen Effektoren aus P. syringae, Xcc und Xoo. Die Mitglieder dieser Familie enthalten ein Zinkbindemotiv in einer Domäne, die Ähnlichkeit zur Zinkmetalloprotease-Domäne des Botulinumtoxins A aus Clostridium botulinum aufweist. Im Gegensatz zu den anderen Effektoren wird XopH nicht auf dem Chromosom, sondern auf dem größten Plasmid, pXCV183, kodiert. XopH zeigt Ähnlichkeit zu dem P. syringae Effektor HopAO1, einer Tyrosinphosphatase. XopE1 und XopE2 gehören zur HopX2-Familie von Effektoren aus Pseudomonas spp. und Xanthomonas spp., deren molekulare Funktion unbekannt ist. Einzel- und Doppelmutanten im xopEl- und xopE2-Gen zeigten kein verändertes Wachstum in der suszeptiblen Pflanze und auch keinen veränderten Phänotyp auf suszeptiblen und resistenten Paprikaflanzen im Vergleich zum Wildtyp. XopE1 und XopE2 enthalten ein mögliches N-Myristoylierungssignal im N-Terminus, das mit dem möglichen Typ III-Sekretionssignal überlappt und in allen Mitgliedern der HopX2-Familie und einigen Mitgliedern anderer Effektorklassen konserviert ist. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie zeigte, dass XopE1- und XopE2-GFP-Fusionen an der Plasmamembran von N. benthamiana-Zellen lokalisiert sind. Diese Lokalisation wird wahrscheinlich durch N-Myristoylierung vermittelt, da eine Mutation im vermutlich myristoylierten Glycinrest an Aminosäureposition zwei von XopE2 in einer Lokalisation des entsprechenden GFP-Fusionsproteins im Zytoplasma der Pflanzenzelle resultierte. Des Weiteren lassen die Ergebnisse einer Hydroxylamin-Behandlung der Proteinextrakte vermuten, dass das XopE2-Protein zusätzlich zur Myristoylierung auch durch Palmitoylierung in der Plasmamembran der Pflanzenzelle verankert wird. Dies ist die erste Beschreibung von möglicherweise N-myristoylierten Effektorproteinen aus Xanthomonas spp. und der erste Hinweis, dass Mitglieder der HopX2-Familie und andere Effektoren, die das hier beschriebene konservierte Motiv besitzen, an der Plasmamembran der pflanzlichen Zelle lokalisiert sind.

## 2.2.3. Ergänzende Ergebnisse

Die in Kapitel 2.2.1. und 2.2.2. vorgestellten Daten zeigten die Typ III-abhängige Sekretion und Translokation von XopC, XopE1, XopE2, XopG, XopH und XopJ. Zusätzlich wurde in der Genomanalyse von *Xcv*-Stamm 85-10 ein weiterer Typ III-Effektor, XopI (XCV0806; Akzessionsnummer: CAJ22437), identifiziert, der ein F-Box-Motivs aufweist. Die F-Box ist ein typisch eukaryotisches Motiv, das in Proteinen identifiziert wurde, die Teil des Ubiquitin-Proteasom-Systems sind (307). Ein Fusionsprotein zwischen den N-terminalen 140 Aminosäureresten von XopI und dem AvrBs3-Deletionsderivat AvrBs3 $\Delta$ 2 wurde Typ IIIabhängig sekretiert und in die Pflanzenzelle transloziert. Mittels RT-PCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass das Effektorgen *xopI* mit dem TTSS koreguliert wird.

### 2.2.3.1. Identifizierung von XopI

Der Typ III-Effektor XopI wurde bei Proteinmotiv-Suchen im vorhergesagten Proteom des *Xcv*-Stammes 85-10 identifiziert. Das Protein besitzt in seiner N-terminalen Region ein eukaryotisches F-Box-Motiv (Pfam-Motiv PF00646; Aminosäurereste 47-92), was auf eine Funktion in der Wirtszelle hindeutet. Zusätzlich enthält der C-Terminale Teil von XopI mögliche "Repeat"-Strukturen, die durch RADAR (http://www.ebi.ac.uk/Radar/) vorhergesagt wurden (Abb. 6 A).

Das chromosomale *xopI*-Gen weist einen G+C-Gehalt von 65.11% auf, der sich nicht signifikant vom genomischen Durchschnitt (64,75%) unterscheidet. Auch die benachbarten chromosomalen DNA-Regionen zeigen keine Anzeichen für einen Erwerb des Gens durch horizontalen Gentransfer vor kurzer evolutionärer Zeit und kodieren wahrscheinlich "house keeping"-Gene (Abb. 6 B).

BLAST-Suchen (12) mit der XopI-Aminosäuresequenz identifizierten je nur ein Homolog in *Xac* (XAC0754, 93% Identität der Aminosäuresequenz) und in der vorläufigen Sequenz von *X. oryzae* pv. oryzicola Stamm BLS256 (http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=Xoc) (91% Identität der Aminosäuresequenz). Die beiden sequenzierten *Xoo*-Stämme (175, 223) enthalten zwar auch jeweils ein XopI-Homolog, der entsprechende offene Leserahmen ist aber durch Leserastermutationen und Stop-Codonen zerstört. Außerdem fehlt den *Xoo*-Homologen die Sequenz, die das F-Box-Motiv kodiert.



Abbildung 6: Schema der Struktur von XopI und der *xopI*-Region im Chromosom des *Xcv*-Stamms 85-10. (A) Vorhergesagte Motive im XopI-Protein. Im N-Terminus des Proteins befindet sich wahrscheinlich das Typ III-Sekretions- und Translokationssignal (gelb) sowie ein F-Box-Motiv (dunkelgrün). Der C-terminale Teil von XopI enthält mögliche "Repeat"-Strukturen (hellgrün). (B) Schematischer Überblick über die *xopI*-Effektorgenregion im Chromosom des *Xcv*-Stamms 85-10. Pfeile repräsentieren vorhergesagte Gene und deren Transkriptionsrichtung. Das Gen *thiL* kodiert wahrscheinlich für eine Thiaminphosphatkinase und die *kdp*-Gene für einen Kalium-Transporter.

## 2.2.3.2 Der N-Terminus von XopI enthält ein Typ III-Sekretions- und Translokationssignal

Um zu überprüfen, ob XopI vom TTSS sekretiert und in die Pflanzenzelle transloziert wird, wurden Fusionen mit dem Reporter AvrBs3 $\Delta 2$  (274) hergestellt. Zu diesem Zweck wurde ein DNA-Fragment, das 1038 bp des Promotors und die ersten 140 Codonen von *xopI* beinhaltet, mittels PCR aus genomischer DNA des *Xcv*-Stammes 85-10 amplifiziert (für Oligonukleotidsequenzen siehe Anhang 4), in den ENTRY-Vektor pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) kloniert und mithilfe der GATEWAY-Rekombination (Invitrogen) translational an *avrBs3\Delta 2* im DESTINATION-Vektor pL6GW356 (siehe Anhang 1) fusioniert. Als Kontrollen dienten das AvrBs3 $\Delta 2$ -Protein (274) und das AvrBs3<sub>1</sub>. <sub>200</sub>-AvrBs3 $\Delta 2$ -Fusionsprotein.

Für die Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion wurde das *xopI*-Konstrukt in den *Xcv*-Stamm 85<sup>\*</sup> (304) und die Typ III-Sekretionsmutante  $85^*\Delta hrcV$  (253) konjugiert. Die Synthese des Fusionsproteins wurde mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung eines AvrBs3-spezifischen Antikörpers gezeigt (Abb. 7 A). In Sekretionsmedium wurde XopI<sub>1-140</sub>-AvrBs3 $\Delta 2$  im Kulturüberstand von Stamm 85<sup>\*</sup>, aber nicht in dem von Stamm 85<sup>\*</sup> $\Delta hrcV$  nachgewiesen (Abb. 7 A). Um eine Lyse der Bakterien im Sekretionsmedium auszuschließen, wurden die Blots zusätzlich mit einem Antikörper gegen HrcN (253), einer intrazellulären Komponente des TTSS, inkubiert (Abb. 7 A).



**Abbildung 7**: Typ III-abhängige Sekretion und Translokation des XopI-AvrBs3 $\Delta 2$ - Fusionsproteins von *Xcv*. (A) *in vitro*-Sekretionsassay. Der *Xcv*-Stamm 85<sup>\*</sup> und die Typ III-sekretionsdefiziente Mutante 85<sup>\*</sup> $\Delta hrcV$ , welche das XopI<sub>1-140</sub>-AvrBs3 $\Delta 2$ -Fusionsprotein synthetisierten, wurden in Sekretionsmedium inkubiert. Gleiche Proteinmengen von Totalextrakten und Kulturüberständen wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot-Analyse unter Verwendung eines AvrBs3-spezifischen Antiserums (164) analysiert. Um bakterielle Zelllysis auszuschließen, wurden die Membranen mit einem Antiserum gegen das intrazelluläre HrcN-Protein inkubiert (253). (B) *In vivo*-Translokationsassay. *Xcv*-Stamm 85<sup>\*</sup>, die Typ III-Sekretionsmutante 85<sup>\*</sup> $\Delta hrcV$  und die Typ III-translokationsdefiziente Mutante 85<sup>\*</sup> $\Delta hrpF$ , welche das XopI<sub>1-140</sub>-AvrBs3 $\Delta 2$ -Fusionsprotein, das AvrBs3<sub>1-200</sub>-AvrBs3 $\Delta 2$ -Fusionsprotein bzw. AvrBs3 $\Delta 2$  synthetisierten, wurden in Blätter von AvrBs3-responsiven ECW-30R-Paprikapflanzen inokuliert. Für eine bessere Visualisierung der HR wurden die Blätter zwei Tage nach Inokulation geerntet und in Ethanol gebleicht.

Für den Test der Typ III-abhängigen Translokation wurden die Stämme 85<sup>\*</sup> und 85<sup>\*</sup>Δ*hrcV*, die das Fusionsprotein XopI<sub>1-140</sub>-AvrBs3Δ2 synthetisierten, in Pflanzen der AvrBs3-responsiven Paprikalinie ECW-30R und der suszeptiblen Linie ECW inokuliert. Als Kontrolle für Typ III-abhängige Translokation wurde XopI<sub>1-140</sub>-AvrBs3Δ2 zusätzlich in Stamm 85<sup>\*</sup>Δ*hrpF* synthetisiert, welcher Typ III-sekretionskompetent ist, aber keine Effektoren in die Pflanzenzelle translozieren kann (56). XopI<sub>1-140</sub>-AvrBs3Δ2 synthetisierende 85<sup>\*</sup> Stämme induzierten eine HR in ECW-30R, ähnlich der von 85<sup>\*</sup>, der die Positivkontrolle AvrBs3<sub>1-200</sub>-AvrBs3Δ2 synthetisiert (Abb. 7 B). Dies war in der suszeptiblen ECW-Pflanze nicht der Fall (Daten nicht gezeigt). Wie erwartet, wurde keine HR in Blättern der ECW- und ECW-30R-Pflanzen induziert, die mit dem Stamm 85<sup>\*</sup> infiltriert wurden, der AvrBs3Δ2 synthetisierte (Abb. 7 B). Dies traf auch für die als Sekretions- bzw. Translokationskontrolle dienenden Stämme 85<sup>\*</sup>Δ*hrcV* und 85<sup>\*</sup>Δ*hrpF* zu, die XopI<sub>1-140</sub>-AvrBs3Δ2 synthetisierten (Abb. 7 B).

Diese Daten zeigen, dass der N-Terminus von XopI ein funktionales Typ III-Sekretionsund Translokations-Signal enthält.

## 2.2.3.3. xopI wird HrpG- und HrpX-abhängig induziert

Um die Regulation des Effektorgens *xopI* zu analysieren, wurden RT-PCR-Analysen des *Xcv*-Wildtyp-Stammes 85-10, des Derivats 85<sup>\*</sup> (303) und der *hrpX*-Deletionsmutante  $85^*\Delta hrpX$  (217), die in NYG-Komplexmedium angezogen wurden, wie in (217) beschrieben durchgeführt.

Wie Abb. 8 zeigt, ist das *xopI*-Transkript in Stamm 85<sup>\*</sup>, aber weder im Wildtyp-Stamm 85-10 noch in  $85^* \Delta hrpX$  detektierbar. Dies deutet auf eine HrpG- und HrpX-abhängige Regulation von *xopI* hin.



**Abbildung 8**: Expressionsanalyse des Typ III-Effektorgens *xopI* mittels RT-PCR.

Für die Experimente wurde cDNA aus dem *Xcv*-Wildtyp-Stamm 85-10, aus der *hrpG*-Mutante 85<sup>\*</sup>, welche die *hrp*-Gene konstitutiv exprimiert, und aus der *hrpX*-Deletionsmutante  $85^*\Delta hrpX$  synthetisiert. Als Kontrolle für gleiche cDNA-Mengen in den verschiedenen Ansätzen diente die Amplifikation von 16S rDNA. Die DNA-Proben wurden in einem 1.5%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Das Ergebnis eines representativen Experiments ist gezeigt.

## 2.3. Eigenanteil an den Publikationen

### Kapitel 2.1.1.

Frank Thieme, Ralf Koebnik, Thomas Bekel, Carolin Berger, Jens Boch et al. (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria revealed by the complete genome sequence. *Journal of Bacteriology* 187(21):7254-7266.

Eigenanteil: Präparation genomischer DNA zur Erstellung der Fosmid-Bibliothek. Experimente zur Validierung der Contig-Assemblierung der endogenen Plasmide ("Long range"-PCRs). Erarbeitung der Annotationsrichtlinien. Annotation bzw. Überprüfung der Annotation von mehr als 2000 Genen. Überarbeitung der Annotationsdaten und Übermittlung der annotierten Sequenz an die Datenbank. Bioinformatische Analysen, darunter Genomvergleiche und funktionelle Klassifizierung von Genen. Anfertigung des Manuskripts mit Ausnahme folgender Kapitel (geteilte Erstautorenschaft mit R. Koebnik): "Genetic information storage and processing", "Quorum sensing, chemotaxis, and motility for the adaptation to environmental conditions", "Surface structures involved in bacterial interactions", "General transport systems". Die Kapitel "Materials and Methods", "General features of the Xanthomonas campestris pv. vesicatoria genome", "Horizontal gene transfer and genome plasticity", "Comparision of the X. campestris pv. vesicatoria sequence to genomes of other plantpathogenic bacteria" und "Conclusions" wurden in Zusammenarbeit mit D. Bartels und O. Kaiser erstellt. Erstellung der Abbildungen 2 und 3, der Tabellen 2 und 4, der "Supplementary materials" und der Endversion des Manuskripts.

### Kapitel 2.2.1.

Laurent Noël, Frank Thieme, Jana G\u00e4bler, Daniela B\u00fcttner, and Bonas U. (2003) XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *Journal of Bacteriology* 185(24):7092-102.

Eigenanteil: Integration der von L. Noël erstellten pIC-Konstrukte in die *Xcv*-Stämme sowie deren Überprüfung und erste Analyse. Die detaillierte Analyse dieser Stämme war Teil von L. Noëls Doktorarbeit (215) und J. Gäblers Diplomarbeit, in deren

Rahmen auch die *xopC*- und *xopJ*-Mutanten erstellt und untersucht wurden. J. Gäbler wurde von L. Noël und D. Büttner betreut. Durchführung der RT-PCR-Experimente. Konstruktion des Plasmids pL6GW356 und Etablierung der darauf basierenden Typ III-Sekretions- und -Translokationsanalysen. Analyse der Typ III-abhängigen Sekretion und Translokation der XopC-, XopJ- und HpaJ-AvrBs3 $\Delta$ 2-Fusionsproteine. Sequenzierung der *xopC*-Region aus *Xcv*-Stamm 75-3. Annotation und bioinformatische Analyse der *xopC*-Region. Der Artikel wurde von L. Noël und D. Büttner geschrieben. Geteilte Erstautorenschaft mit L. Noël.

#### Kapitel 2.2.2.

Frank Thieme, Alexander Urban, Oliver Kirchner, and Ulla Bonas (2006) Verification of four novel type III effectors from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria two of which, XopE1 and XopE2, are targeted to the plant plasma membrane most likely due to Nmyristoylation. In Vorbereitung

<u>Eigenanteil:</u> Durchführung der bioinformatischen Analysen und meisten Experimente sowie Anfertigung des Manuskripts. Die Erstellung der *xopE1*- und *xopE2*-Deletionsmutanten und ihre Untersuchung auf Paprikapflanzen, die RT-PCR-Analysen von *xopG* und *xopH*, die Erstellung von XopE1- und XopE2-GFP-Fusionen und die Untersuchung ihrer subzellulären Lokalisierung in *N. benthamiana* waren Teil der Diplomarbeit von A. Urban, die im Rahmen dieser Arbeit betreut wurde. Die Erstellung von Mutanten im N-Myristoylierungsmotiv von XopE2 und deren Analyse sowie die Reproduzierung der Expressionsdaten und Lokalisierungsstudien waren Teil dieser Arbeit. O. Kirchner etablierte die Elektroporation von *Xcv*-Stamm 85-10.

## 3. Diskussion

## 3.1. Xanthomonas campestris pv. vesicatoria - vergleichende Genomanalysen, genomische Flexibilität und horizontaler Gentransfer

Aufgrund der ökonomischen Bedeutung vieler *Xanthomonas*-Arten als Krankheiterreger in einer Vielzahl von Kulturpflanzen wurden und werden Genomprojekte durchgeführt, um einen besseren Zugang zu diesen Modellorganismen zu erhalten und mögliche Virulenzfaktoren *in silico* identifizieren zu können. Im Moment sind die kompletten Sequenzen des *Xac*-Stammes 306 (81), der *Xcc*-Stämme ATCC33913 (81) und 8004 (233) und der *Xoo*-Stämme KACC10331 (175) und MAFF311018 (223) verfügbar. Die vorläufige Sequenz des Reispathogens *X. oryzae* pv. oryzicola Stamm BLS256 ist ebenfalls in der TIGR-Datenbank zugänglich (http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/CMRGenomes.spl). Weitere Genom-projekte wurden begonnen oder sind in Planung (http://www.plantpath.iastate.edu /xgr/; http://www.cns.fr/externe/English/Projets).

Die Verfügbarkeit verschiedener Xanthomonas-Genomsequenzen eröffnet die Möglichkeit vergleichender Genomanalysen mit der annotierten Sequenz des Xcv-Stammes 85-10, die im Rahmen dieser Arbeit miterstellt wurde. Stamm 85-10 ist pathogen auf Capsicum annuum, aber nicht auf Lycopersicon esculentum (59, 199). Der Stamm besitzt vier Plasmide und ein 5,17 Mb großes Chromosom und kodiert für 4726 Gene. Das Chromosom weist einen Xanthomonas-typischen hohen G+C-Gehalt (64,75%) auf. Das Genom zeigt keine Anzeichen einer Reduktion, d.h. Verkleinerung des Genoms und Verlust bestimmter Funktionen, die auf eine Anpassung an eine obligat parasitäre Lebensweise hindeuten würden (202). Der Vergleich der chromosomalen Sequenzen zeigte, dass Xcv die größte Ähnlichkeit zu Xac aufweist und sich Unterschiede zu den Xcc-Stämmen wahrscheinlich durch Inversion bzw. Rekombination größerer Bereiche ergeben haben (233) (Abb. 9 A). Die Struktur der Xoo-Chromosomen hingegen weicht stark von der des Xcv-Chromosoms ab, wobei die Sequenzen der Xoo-Stämme untereinander, bis auf kleine, lokal begrenzte Unterschiede und eine Inversion, kolinear und weitgehend identisch sind (Abb. 9 A und D). Interessanterweise zeigt die vorläufige Sequenz des Reispathogens X. oryzae pv. oryzicola, welches sich lokal im Interzellularraum der Mesophyllzellen vermehrt, größere Ähnlichkeit zum sich ebenfalls lokal vermehrenden Xcv als zu den Reis-pathogenen Xoo-Stämmen, die sich systemisch ausbreiten



Abbildung 9: Vergleiche der chromosomalen Sequenzen verschiedener Xanthomonaden.

Die Vergleiche in A, B und C erfolgten mithilfe des "Artemis Comparison Tool" basierend auf BlastN-Ergebnissen (60). DNA-Bereiche länger als 400 bp mit mindestens 80% Identität sind gezeigt. Rote Bereiche markieren kolineare Sequenzabschnitte und blaue Bereiche Inversionen der entsprechenden Sequenz. Dunklere Farbe symbolisiert höhere Sequenzidentität. Für die Vergleiche in D wurde das "Multiple Genome Comparison and Alignment (http://alggen.lsi.upc.es/recerca/align/mgcat/ Tool" intro-mgcat.html) verwendet. Alle "maximal unique matches", Sequenzen die in beiden Genomen genau einmal ohne Abweichungen vorkommen, mit einer Länge von mehr als 400 bp sind gezeigt. Die Zahlen in A-D markieren die Position von Gen-Clustern in den jeweiligen chromosomalen Sequenzen, welche das (1)das hrp-TTSS, (2)xcs-Typ II-Sekretionssystem, (3) das Flagellarsystem und (4) das xps-Typ II-Sekretionssystem kodieren. (Xoc, X. oryzae pv. oryzicola)

können (Abb. 9 B und D). Für eine abschließende Analyse ist aber eine finale Sequenz von *X. oryzae* pv. oryzicola nötig, da die vorläufige Sequenz unvollständig und die Assemblierung fehlerhaft sein könnte.

Aus der Vielzahl multipler Treffer bei BlastN-basierten Vergleichen (60) (Abb. 9 C) ist ersichtlich, dass die *Xoo*-Genome und wahrscheinlich auch das *X. oryzae* pv. oryzicola-Genom im Vergleich zu den anderen Xanthomonaden einen höheren Anteil an repetitiven Sequenzen aufweisen. Bei diesen Sequenzen handelt es sich hauptsächlich um IS-Elemente. Der hohe Gehalt an mobilen genetischen Elementen bietet eine mögliche Erklärung für die im Vergleich zu den anderen Xanthomonaden deutlich abweichende Genomstruktur, die vermutlich auf Rekombinations-, Insertions- und Inversionsereignissen an diesen repetitiven Sequenzen beruht (200, 233). Solche Veränderungen finden sich häufig im Vergleich nahe verwandter pathogener Bakterien, was besonders intensiv bei verschiedenen Arten und Stämmen humanpathogener Bakterien analysiert wurde (98, 135), aber auch für Pflanzenpathogene beschrieben wurde (233, 314). Diese Veränderungen sind vermutlich von Vorteil für die Fitness der klonalen Bakterienpopulation im Wirt, da sie eine genotypische Diversität der Population schaffen und die Genexpression der angrenzenden Sequenzregionen beeinflussen können (98, 135).

Die hohe Zahl von möglichen mobilen genetischen Elementen, die meist Teil von variablen chromosomalen Regionen sind, lässt zudem horizontalen Gentransfer und hohe genomische Flexibilität vermuten (90). So enthalten die Chromosomen der verschiedenen sequenzierten Xanthomonaden zwischen 38 (in *Xac*; siehe Anhang 2) und mehr als 200 IS-Elemente (in *Xoo*) (175, 223). Analysiert man die chromosomale Sequenz von *Xcv* auf Abweichungen in Bezug auf "codon usage", G+C-Gehalt und Dinukleotidfrequenz (284), so können 21 Sequenzbereiche identifiziert werden, die signifikante Unterschiede zum Rest des Chromosoms und Merkmale von genomischen Inseln aufweisen (90). Die in diesen Inseln lokalisierten Gene kodieren meist für Transposasen, Integrasen und Proteine unbekannter Funktion, jedoch auch für LPS-Biosyntheseenzyme und Komponenten von Typ 4-Pili sowie für Substrate des TTSS (Abb. 10). Ähnliche Ergebnisse erhält man auch bei der Analyse der anderen Xanthomonaden (284). Dies lässt vermuten, dass Oberflächenstrukturen wie LPS, die als Kontaktfläche zur Pflanze dienen und von dieser als PAMP erkannt werden können, einer ständigen Adaptation unterliegen (227), was auch auf andere Virulenzfaktoren, wie z.B. das Hrp-Pilin HrpE (295), zuzutreffen scheint.

Regionen im Genom von *Xcv*, die Gene enthalten, die für Substrate des TTSS kodieren zeigen ebenfalls häufig Merkmale für einen Erwerb durch horizontalen Gentransfer (90, 217, 218) (Tabelle 2). So sind z.B. die Effektorgene *xopC* und *xopE2* im Chromosom und *xopH* und *avrBs1* auf dem Plasmid pXCV183 mit einem ähnlichen möglichen mobilen genetischen Element assoziiert, welches für eine Transposase und "cointegrate resolution"-Proteine kodiert und von "inverted repeats" flankiert ist. Diese "inverted repeats" wurden zuerst in der Nachbarschaft von *avrBs3* und homologen Effektorgenen assoziiert, jedoch nicht in den anderen Xanthomonaden. Zumindest eine "inverted repeat"-Sequenz wurde aber auch in flankierenden Bereichen anderer *Xanthomonas*-Effektorgene identifiziert, die nicht mit einem solchen Element assoziiert sind, so z.B. bei *ecf* (201) und *xopB* in *Xcv*. Interessanterweise wird auch die Region im Chromosom von *Xcc*, die XopH und AvrBs1 kodiert, von einem solchen "inverted repeat" flankiert. Für einen Erwerb von Effektorgenen durch horizontalen Gentransfer sprechen auch Daten aus anderen phytopathogenen Bakterien, wie *P. syringae* 

und *R. solanacearum* (8, 18, 66, 86, 141, 142, 148, 174, 229, 242). So ist z.B. das Effektorgen *avrPphB* aus *P. syringae* pv. phaseolicola Teil einer genomischen Insel (142, 229). Diese Insel ist von "attachment sites" flankiert und kann in Abhängigkeit von der Integrase XerC, welche in der Pflanze induziert wird, entfernt werden. In der resistenten Pflanze, welche *avrPphB*-exprimierende Stämme erkennt, ist diese Exzision mit einer hohen Frequenz zu beobachten (229). Dies lässt vermuten, dass solche Mechanismen nicht nur für den Erwerb von Effektorgenen, sondern auch für deren Entfernung aus dem Genom von Bedeutung sind. Man kann spekulieren, dass diese Dynamik eine effiziente Möglichkeit des Pathogens darstellt, der Abwehr des Wirtes, die auf der Erkennung bestimmter Effektoren beruht, zu entgehen bzw. neue Effektorgene aus anderen Spezies zu erhalten. Der Verlust eines einzelnen Effektorgens spielt für die Virulenz meist keine Rolle, da Pflanzenpathogene eine Vielzahl dieser Proteine kodieren, die anscheinend redundante Funktionen im Wirt haben (10, 63, 115, 246).



Abbildung 10: Vorhersage möglicher genomischer Inseln im Chromosom des *Xcv*-Stammes 85-10. Die annotierte Sequenz des Chromosoms wurde mithilfe des Programms PAI-IDA (Fenstergröße 5 kb, Schrittgröße 1 kb) (284) auf Regionen mit Abweichungen in Bezug auf G+C-Gehalt, Dinukleotidfrequenz und "codon usage" analysiert. Die Ergebnisse sind als Plot über die chromosomale Sequenz dargestellt. Regionen mit einem "Score"-Wert über vier (rote Linie) wurden wahrscheinlich vor relativ kurzer evolutionärer Zeit erworben und sind möglicherweise Teil von genomischen Inseln (rote ovale). Regionen, welche mögliche Virulenzfaktoren kodieren, wurden entsprechend beschriftet. Die *rrn*-Operone sind falsch-positive Vorhersagen, da sie sich im Allgemeinen vom Rest des Genoms unterscheiden.

# **3.2.** Protein-Sekretionssysteme und ihre mögliche Funktion in der Virulenz von *Xanthomonas*

Mithilfe bioinformatischer Analysen der Genomsequenz von *Xcv*-Stamm 85-10 konnte eine Vielzahl möglicher Virulenzfaktoren identifiziert werden, darunter alle in Gram-negativen Bakterien bekannten Sekretionssysteme (siehe Anhang 2; Abb. 11).

Die Funktion von Typ I-Sekretionssystemen in der Virulenz von *Xanthomonas* ist kaum untersucht. Es konnten zwar entsprechende Gene in den Genomen identifiziert werden, aber eine Funktion in der Interaktion mit der Pflanze wurde nur in einem Fall beschrieben, dem so genannten Rax-System aus *Xoo*-Stamm PXO99 (48, 82, 265). Das Rax-System ist in die Regulation, Modifizierung und Sekretion von AvrXa21 involviert, welches in Reis, vermittelt durch die Rezeptorkinase Xa21, erkannt wird (82, 292). Die genaue Natur von AvrXa21 ist unbekannt. Wahrscheinlich handelt es sich um ein Toxin, das mittels eines "double glycine-leader peptide" exportiert wird (82). Homologe der *rax*-Gene wurden auch in *Xcv*, nicht aber in *Xac* und *Xcc* (82), identifiziert. Ob das Rax-System in *Xcv* einen Virulenzfaktor darstellt, ist noch unbekannt. Eine Toxinproduktion konnte in *Xcv*-Stamm 85-10 bislang nicht nachgewiesen werden.

Das Genom von Xcv kodiert, wie auch das von Xac und Xcc (81, 233), zwei Typ II-Sekretionssysteme, das xcs- und das xps-System. Dagegen enthalten die Genome der Xoo-Stämme und wahrscheinlich auch das von X. oryzae pv. oryzicola nur das xps-System (Abb. 9). Interessanterweise identifizierte die Sichtung einer Transposon-Insertions-Bibliothek des Xcc-Stamms 8004, die nahezu jedes Gen abdeckte, sechs unterschiedliche Insertionen in Komponenten des xps-Typ II-Sekretionssystems (xpsD, xpsE, xpsF, xpsK, xpsL) und xpsM), die die Virulenz des Stammes in Brassica oleraceae verminderten. Eine Insertion in Genen des xcs-Clusters mit einem ähnlichen Effekt auf die Virulenz wurde dagegen nicht gefunden (233). Dies impliziert eine unterschiedliche Spezialisierung beider Systeme und könnte den Verlust des anscheinend nicht primär in die Virulenzfunktionen involvierten xcs-Systems in Xanthomonaden, die monocotyledone Pflanzen infizieren, erklären. Ob tatsächlich ein Zusammenhang mit dem Wirtsspektrum besteht, muss jedoch noch geklärt werden, ebenso wie ein möglicher Einfluss der Typ II-Sekretionssysteme auf die Virulenz von Xcv, das sich im Gegensatz zu Xcc nicht systemisch im Wirt ausbreiten kann. Ein Vergleich der Art und Zahl möglicher Zellwand-abbauender Enzyme, die wahrscheinlich von dem einen oder anderen Typ II-Sekretionssystem in den Apoplasten der Pflanze sekretiert werden, zeigte



Abbildung 11: Modell der Interaktion zwischen Xcv und der pflanzlichen Zelle.

Die Adhäsion des Bakteriums an die pflanzliche Zellwand kann durch Typ V-Autotransporter-Adhäsine, Typ 4-Pili und EPS vermittelt werden (64, 225, 240). Auch bakterielle Oberflächenstrukturen, wie LPS in der äußeren Membran stellen als Kontaktfläche zum Wirt mögliche Virulenzfaktoren dar (88). Solche bakteriellen Strukturen können aber auch als PAMPs von der Pflanze erkannt werden, z.B. LPS (41). Dies führt zur Auslösung der basalen Abwehr (220). Als Abwehrreaktion produziert die Pflanze unter anderem antimikrobielle Substanzen, z.B. ROI, wogegen das Bakterium durch Detoxifikations-Systeme geschützt ist (88). Ist der Kontakt zur pflanzlichen Zelle hergestellt, kommt den Protein-Sekretionssystemen eine wichtige Funktion zu. So transportieren die Typ II-Sekretionssysteme wahrscheinlich Zellwand-abbauende Enzyme in den Apoplasten der Pflanze, um die Zellwand-Barriere zu schwächen bzw. Abbauprodukte für das Bakterium als Nährstoffe nutzbar zu machen (257). Die Synthese Zellwand-abbauender Enzyme wird vom "Quorum sensing" wahrscheinlich positiv beeinflusst (122). Die Funktionen von Typ I- und Typ IV-Sekretionssystemen in der Virulenz von Xcv sind unbekannt. Das TTSS hingegen ist gut untersucht und stellt einen essentiellen Pathogenitätsfaktor dar. Seine Expression wird von den Regulatoren HrpG und HrpX, wahrscheinlich in Abhängigkeit von einem pflanzlichen Signal, aktiviert (115). Die Aktivität von HrpG wird wahrscheinlich negativ von der "Quorum sensing"-Signalkaskade beeinflusst (108, 122). Das TTSS transportiert hauptsächlich Effektorproteine in die pflanzliche Zelle, die dort Abwehrprozesse unterdrücken und möglicherweise weitere Funktionen besitzen, um das Überleben der Bakterien im Apoplasten zu ermöglichen (204). Effektorproteine können aber auch in einer R-Gen-vermittelten Weise erkannt und Abwehrreaktionen, wie z.B. die HR, ausgelöst werden (115). Das Sec- und TAT-System, welche wahrscheinlich auch Funktionen in der Virulenz pflanzenpathogener Bakterien besitzen (46, 89, 168), sind nicht dargestellt. (ÄM, äußere bakterielle Membran; IM, innere bakterielle Membran; PM, Plasmamembran der pflanzlichen Zelle; EPS, extrazelluläres Polysaccharid; LPS, Lipopolysaccharid; ROI, "reactive oxygen intermediates", reaktive Sauerstoff-Intermediate; PAMPs, "pathogen-associated molecular patterns")

kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Xanthomonaden. Dies deutet auf eine allgemeine Funktion dieser Systeme in der Virulenz von *Xanthomonas* hin. Erste Analysen

von Sekretin-Mutanten der Typ II-Sekretionssysteme von *Xcv* zeigten aber keinen signifikanten Einfluss auf die Virulenz (V. Cogez, D. Büttner und U. Bonas, unpublizierte Daten).

Interessanterweise werden im Stamm 85-10 auch zwei unterschiedliche Typ IV-Sekretionssysteme kodiert. Komponenten für ein Vir/Tra-Typ IV-System, welches die Konjugation und bei *Agrobacterium* den Transfer von Proteinen und der T-DNA in die Pflanzenzelle ermöglicht (70), werden auf dem Plasmid pXCV38 und dem Chromosom kodiert. Systeme dieses Typs wurden auch in anderen Xanthomonaden identifiziert (81, 233) und ein Einfluss auf die Virulenz von *Xcc*-Stamm 8004 in *B. oleraceae* konnte bereits gezeigt werden (233). Das zweite Typ IV-System von *Xcv*-Stamm 85-10 wird auf dem Plasmid pXCV183 kodiert und zeigt die höchste Ähnlichkeit zum Icm/Dot-System, einem Pathogenitätsfaktor der humanpathogenen Bakterien *Legionella pneumophila* und *Coxiella burnetii* (61, 319). Ein solches System konnte bisher in keinem anderen pflanzenpathogenen Bakterium identifiziert werden. Ob diese Systeme auch für die Virulenz von *Xcv* von Bedeutung sind, muss noch geklärt werden. Erste Versuche mit einer im möglichen Icm/Dot-System defizienten *Xcv*-Mutante zeigten allerdings keinen Einfluss auf die Auslösung von Krankheitssymptomen in Paprika (D. Büttner und U. Bonas, unpublizierte Daten).

#### **3.3.** Verifizierung und Analyse von sieben neuen Typ III-Effektorproteinen

Das TTSS ist ein essentieller Pathogenitätsfaktor und das am besten charakterisierte Sekretionssystem von *Xcv* (51, 115) (Abb. 11). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Typ IIIabhängige Translokation von sieben neuen *Xcv*-Effektoren bestätigt werden, was die Zahl der bekannten Effektoren aus Stamm 85-10 auf 21 erhöht (Tabelle 1 und 2). Die neuen Effektoren wurden durch ihre Koregulation mit dem TTSS, die Präsenz eukaryotischer Motive und die Homologie zu bekannten Effektoren identifiziert (Tabelle 2) und ihre Typ III-abhängige Translokation mittels des AvrBs3 $\Delta$ 2-Reporters (274) bestätigt (siehe Anhang 1).

Die Funktion von Typ III-Effektoren besteht wahrscheinlich in der Modulation von Wirtszellprozessen, um das Überleben und die Vermehrung der Bakterien im Apoplasten der Pflanze zu ermöglichen (10, 204) (Abb. 11). So wurde für eine Vielzahl von Effektoren eine Funktion in der Unterdrückung pflanzlicher Abwehrreaktionen beschrieben. Verschiedene Effektoren aus *P. syringae* und *Xanthomonas* spp. sind z.B. in der Lage, die pflanzliche HR zu unterdrücken (2, 43, 96, 106, 144, 150, 188, 189, 282). Auch in die Suppression der basalen Abwehr, die unter anderem mit der Verstärkung der pflanzlichen Zellwand, z.B.

Gen-	Mögliche	PIP-	Koreg. <sup>c</sup>	G+C <sup>d</sup>	Identifiziert durch
name	Funktion/Homologie <sup>a</sup>	Box <sup>b</sup>		(%)	
xopC	Unbekannte Funktion, keine Homologie zu bekannten Effektoren, mögliche Phosphoribosyltransferase und Hydrolase	+	+	47,50	HrpG- und HrpX- abhängige Expression (217)
xopE1	HopX2-Familie, unbekannte Funktion, mögliches N-Myristoylierungsmotiv	+	+	63,34	Homologie
xopE2	HopX2-Familie, unbekannte Funktion, mögliches N-Myristoylierungsmotiv	+	+	60,72	Homologie
xopG	HopH1-Familie, mögliche Zinkmetalloprotease	-	-	52,02	Homologie
хорН	Mögliche Tyrosinphosphatase, Homologie zu HopAO1 ( <i>P. syringae</i> )	-	+	49,38	Homologie
xopI	Mögliches F-Box-Protein, keine Homologie zu bekannten Effektoren	+	+	65,11	Eukaryotisches Motiv
xopJ	YopJ/AvrRxv-Familie, mögliche SUMO-Cysteinprotease, mögliches N- Myristoylierungsmotiv	+	+	56,86	HrpG- und HrpX- abhängige Expression, Homologie (217)

 Tabelle 2: In dieser Arbeit verifizierte Typ III-Effektoren aus Xcv-Stamm 85-10.

<sup>a</sup> Vorhergesagte Funktion und Homologie zu Typ III-Effektorproteinen von *Pseudomonas syringae* oder anderen *Xanthomonas* spp. Für *Pseudomonas*-Effektoren wurde die neue vereinheitlichte Nomenklatur verwendet (182).

<sup>b</sup> Vorhandensein einer PIP- und -10-Box (TTCG-N<sub>16</sub>-TTCG-N<sub>31-33</sub>-YANNRT) im Promotorbereich des entsprechenden Gens. + steht für das Vorhandensein und – für das Fehlen eindeutig identifizierbarer Motive.
<sup>c</sup> HrpG- and HrpX-abhängige Koregulation mit dem TTSS (+, Koregulation; -, konstitutive Expression)
<sup>d</sup> G+C-Gehalt der DNA in der kodierenden Region (Der G+C-Gehalt des Chromosoms von Xanthomonaden liegt bei ca. 63-65%).

durch Kallose-Einlagerung, einhergeht, sind Effektoren involviert (47, 84, 106, 118, 143, 162). Man könnte zudem spekulieren, dass Typ III-Effektoren sowohl durch ihre Virulenzfunktion in der Wirtszelle, z.B. in der Unterdrückung von pflanzlichen Abwehrreaktionen, als auch aufgrund ihrer Avirulenzaktivität, der *R*-Gen-abhängigen Erkennung bestimmter Avr-Proteine, zur Festlegung des Wirtsbereiches des Pathogens beitragen. Dies wird durch die essentielle Funktion des TTSS in der Interaktion mit der Pflanze (37, 115) und Unterschiede im Effektorset, selbst zwischen nahe verwandten *Xanthomonas*-Arten mit unterschiedlichem Wirtsspektrum, unterstützt (81) (siehe Kapitel 2.1.1.). Die molekulare Funktion der meisten Effektoren aus *Xcv* ist jedoch bisher unbekannt.

## 3.3.1. XopC und XopI – Effektoren ohne bekannte Homologe außerhalb der Gattung *Xanthomonas*

Fünf der sieben neuen Effektoren gehören zu Proteinfamilien oder haben zumindest ein Homolog in einem Phytopathogen außerhalb der Gattung *Xanthomonas*. Die beiden Ausnahmen sind XopC und XopI, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Die bioinformatische Analyse von XopI ergab nur Homologe in Xac und X. oryzae pv. oryzicola, aber in keinem anderen sequenzierten pflanzenpathogenen Bakterium. Die in den beiden sequenzierten Xoo-Stämmen gefundenen Homologe sind wahrscheinlich Pseudogene, denen interessanterweise auch exakt der Sequenzbereich fehlt, der für das F-Box-Motiv kodiert. Dies lässt vermuten dass es sich bei diesem Bereich um eine distinkte funktionale Domäne handelt. Der C-terminale Teil von XopI enthält mögliche "Repeat"-Strukturen, die der Interaktion mit anderen Proteinen dienen könnten, was typisch für F-Box-Proteine ist (307). F-Box-Proteine interagieren mit Zielproteinen, um diese zum Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System zu bestimmen, welches die Stabilität nahezu aller Proteine in der eukaryotischen Zelle kontrolliert (307). Der Abbau von Proteinen durch dieses System verläuft in zwei Schritten: der kovalenten Bindung einer Ubiquitin-Kette mittels E1-, E2- und E3-Enzymen an das Zielprotein und dem nachfolgenden ATP-abhängigen Abbau durch das 26S-Proteasom (307). F-Box-Proteine rekrutieren die Substrate dieses Systems zum SCF-Komplex (Skp1/Cul1/F-Box-Protein). In diesem modularen Komplex bindet das Adaptorprotein Skp1 das F-Box-Motiv von F-Box-Proteinen, welche über andere Domänen Zielproteine binden, sowie den N-Terminus des Cul1/Cdc53-Gerüstproteins. Der C-Terminus des Cul1/Cdc53-Proteins interagiert mit dem Rbx1/Roc1/Hrt1-RING-Domänen-Protein, das seinerseits die Plattform für das E2-Enzym bildet (307).

XopI könnte also gezielt Wirtsproteine zum SCF-Komplex rekrutieren und so deren Abbau einleiten. Auch andere Typ III-Effektoren manipulieren wahrscheinlich das Ubiquitin-Proteasom-System, wie z.B. AvrPtoB aus *P. syringae*, dessen E3-Ubiquitin-Ligaseaktivität nötig ist, um pflanzliche Zelltod-Reaktionen zu unterdrücken (1, 145). Dies ist besonders interessant, da viele pflanzliche Prozesse, wie Hormon-Signalwege, Entwicklung und Abwehrreaktionen, in Abhängigkeit von SCF-Komplexen reguliert werden (206, 307).

Aufgrund der möglichen Funktion von XopI als F-Box-Protein in der Pflanze wäre die Identifizierung möglicher pflanzlicher Interaktoren mittels Hefe-Dihybrid-Sichtung einer Paprika-cDNA-Bibliothek besonders interessant. Die so gefundenen pflanzlichen Zielproteine, welche möglicherweise von XopI zum SCF-Komplex rekrutiert werden, könnten einen tieferen Einblick in die Wirkungsweise dieses Effektors liefern. Des Weiteren sollte getestet werden, ob das vorhergesagte F-Box-Motiv in XopI tatsächlich mit einem Skp1-Protein des SCF-Komplexes, z.B. aus *C. annuum*, interagieren kann. Eine entsprechende Sequenz von *CaSkp1* ist in der Datenbank verfügbar (Akzessionsnummer: AY899281) (71).

Hefe-Dihybrid-Sichtungen sind auch für die anderen identifizierten Effektoren sinnvoll, um ihre Funktion zu verstehen. Zudem sollte die subzelluläre Lokalisierung der Effektorproteine mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie von GFP-markierten Proteinvarianten in der Pflanzenzelle analysiert werden. Dies liefert Informationen über den Ort, an dem der Effektor wahrscheinlich seine Funktion entfaltet (siehe Kapitel 3.3.2.) und ermöglicht es, falsch-positive Interaktoren aus der Hefe-Dihybrid-Sichtung zu ermitteln, die der Effektor in der Zelle wahrscheinlich nicht erreichen kann, um so die weitere Analyse zu fokussieren. Des Weiteren bietet die bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (40, 134) die Möglichkeit, das Effektorprotein und einen möglichen Interaktor hinsichtlich Interaktion und Lokalisierung in der Pflanzenzelle zu analysieren. Hierzu werden die nicht-überlappende N-terminale bzw. C-terminale Hälfte des "yellow fluorescent protein", die allein nicht in der Lage sind zu fluoreszieren, an das Effektorprotein bzw. den möglichen Interaktor fusioniert. Interagieren beide Fusionsproteine in der pflanzlichen Zelle, wird das Chromophor des "yellow fluorescent protein" rekonstituiert und die resultierende Fluoreszenz kann nach Anregung detektiert werden (40, 134). Dies ermöglicht die Bestätigung der Daten aus der Hefe-Dihybrid-Sichtung in der pflanzlichen Zelle.

Wie XopI besitzt auch XopC nur bekannte Homologe in nahe verwandten Xanthomonaden, was Southern-Hybridisierungen ergaben (216, 246). Blast-Suchen (11) in der NCBI-Datenbank identifizierten keine XopC-Homologen in den anderen sequenzierten Xanthomonaden, sondern nur eine partielle Homologie zu den hypothetischen Proteinen aus R. Außerdem Psi-Blastsolanacearum. zeigten (11)und phyre-Analysen (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/), dass zwei Sequenzabschnitte von XopC Ähnlichkeit zu Phosphoribosyltransferasen (Aminosäureposition 200-400), welche Nukleotidam Stoffwechsel beteiligt sind (221), bzw. zu Hydrolasen der Haloacid-Dehalogenase-Superfamilie (Aminosäureposition 590-730) besitzen. Zu letzterer zählen Hydrolasen mit verschiedenen Substratspezifitäten, z.B. Phosphatasen und Epoxid-Hydrolasen (167). Einige bakterielle Toxine, wie das Cholera- oder das Diphterie-Toxin, besitzen Ribosyltransferaseund Hydrolase-Aktivitäten. Allerdings handelt es sich bei diesen um ADP-

Ribosyltransferasen, die  $NAD^+$  spalten und die ADP-Ribose-Gruppe auf Zielproteine transferieren, um diese zu inaktivieren (315).

Mutanten in dem Effektorgen *xopC* zeigten keine Veränderung des Phänotyps im Vergleich zum Wildtyp auf suszeptiblen und resistenten Paprika-Pflanzen und auch keine Unterschiede im Wachstum, was auch für Mutanten in den Effektorgenen *xopE1*, *xopE2* und *xopJ* zutrifft (siehe Kapitel 2.2.). Das Fehlen eines biologischen Effekts erschwert die funktionelle Analyse, da z.B. die biologische Relevanz der vorhergesagten Domänen und Motive nicht getestet werden kann. Es ist also erforderlich, spezifische Effekte von XopC und auch der anderen Typ III-Effektoren zu identifizieren, wie z.B. die Auslösung einer HR in einer Nichtwirtspflanze oder die Unterdrückung von Zelltodreaktionen nach *Xcv*-vermittelter Translokation von Effektoren bzw. *Agrobacterium*-vermittelter Expression von Effektorgenen in der Pflanzenzelle.

## 3.3.2. XopE1, XopE2 und XopJ – Effektoren mit einer möglichen Funktion an der Plasmamembran der pflanzlichen Wirtszelle

XopE1 und XopE2 sind homolog zueinander und gehören zur HopX2-Familie von Effektoren aus *P. syringae* und *Xanthomonas* spp. (182, 247). Diese Familie bildet zusammen mit der HopX1-Familie, die aus AvrPphE aus *P. syringae* und Homologen besteht, die HopX-Superfamilie (182). Die molekulare Funktion der Mitglieder dieser Superfamilie ist unklar, jedoch verfügen die Mitglieder der HopX2-Familie anscheinend alle über ein mögliches Nterminales N-Myristoylierungs-Motiv, das auch in anderen Effektorfamilien konserviert ist. Dieses Motiv vermittelt wahrscheinlich die Acylierung und Bindung des Proteins an die Plasmamembran der planzlichen Wirtszelle (194). Innerhalb der HopX2-Familie und der Proteine mit homologen N-Myristoylierungsmotiven wurden aber bisher nur XopE1 und XopE2 auf ihre subzelluläre Lokalisierung hin untersucht. Beide Proteine sind wie vermutet mit der Plasmamembran der Pflanzenzelle assoziiert. Diese Lokalisierung war bei XopE2 abhängig vom Glycinrest an Aminosäureposition zwei, welcher wahrscheinlich myristoyliert wird. Zusätzlich zu diesem Glycinrest ist auch der Cysteinrest an Aminosäureposition vier konserviert, der vermutlich palmitoyliert wird (194).

Interessanterweise besitzt XopJ, ein Mitglied der YopJ/AvrRxv-Familie, die wahrscheinlich SUMO-Cystein-Proteasen umfasst (siehe Kapitel 1.4.1.3.) (133, 204), ebenfalls ein N-terminales N-Myristoylierungsmotiv, das zu dem von XopE1 und XopE2 homolog ist. Solche N-terminalen Motive konnten auch in anderen Vertretern dieser Familie

identifiziert werden, so z.B. in HopZ2 aus P. syringae (18, 194) und in PopP3 aus R. solanacearum (174). Die pflanzlichen Zielproteine dieser Effektoren befinden sich also wahrscheinlich an der Zytoplasmamembran. Für AvrRxv wurde eine Lokalisation im Zytolasma beschrieben, aber das Protein scheint auch mit der Plasma- und der Kernmembran assoziiert zu sein (39). Diese Membranlokalisierung könnte auf einem internen N-Myristoylierungsmotiv (Aminosäureposition 29-45) beruhen. Solche internen Motive findet man in vielen Vertretern dieser Familie. Allerdings ist unklar, ob diese durch Prozessierung des Proteins zugänglich gemacht werden und wo die entsprechenden Proteine in der Wirtszelle lokalisiert sind. Andere Effektoren der YopJ/AvrRxv-Familie besitzen keine solchen Motive und sind im Zytoplasma, wie z.B. AvrXv4 aus Xcv (245), bzw. im Zellkern, wie z.B. PopP2 aus R. solanacearum (87), der pflanzlichen Zelle lokalisiert. Für AvrXv4, das in Lycopersicon pennellii erkannt wird und eine HR auslöst (21), konnte zudem die SUMO-Protease-Aktivität gezeigt werden (245). Für AvrRxv wurde eine Avirulenzaktivität auf der Tomaten-Linie Hawai 7998 beschrieben (305), welche abhängig von der vorhergesagten katalytischen Triade ist (39). Ähnliche Beobachtungen wurden auch für die von AvrBsT auf N. benthamiana ausgelöste HR gemacht (226). Dies deutet darauf hin, dass Mitglieder dieser Familie zwar die gleiche enzymatische Funktion, aber nicht die gleichen Zielproteine in der Wirtspflanze haben. Bisher konnte jedoch in pflanzenpathogenen Bakterien nur für PopP2 aus R. solanacearum ein mögliches Zielprotein identifiziert werden. Der Effektor interagiert mit seinem korrespondierenden Resistenzprotein RRS1-R in der resistenten Arabidopsis-Pflanze bzw. mit RRS1-S in der suszeptiblen Pflanze (87).

Für zukünftige Analysen der Funktion der Effektoren XopE1, XopE2 und XopJ, dürfte ihre Avirulenzaktivität in verschiedenen Solanaceen von Bedeutung sein. So ergaben vorläufige Analysen für XopJ eine HR-auslösende Aktivität in *N. benthamiana* nach *Agrobacterium*-vermittelter Synthese. Solche Aktivitäten wurden auch für andere Mitglieder der YopJ/AvrRxv-Effektorfamilie beschrieben und waren abhängig von der katalytischen Triade der möglichen SUMO-Proteasen (39, 226, 245). Eine direktere Möglichkeit zum Nachweis der SUMO-Proteaseaktivität von XopJ bietet die Analyse des SUMOylierungs-Musters pflanzlicher Proteine, nach der Expression des Effektors bzw. einer Mutante in der katalytischen Triade, mittels Immunoassays mit einem SUMO-spezifischen Antikörper (132, 245).

Für XopE1 und XopE2 zeigten vorläufige Analysen eine HR-auslösende Aktivität in Solanum pseudocapsicum. Der Xcv-Wildtyp-Stamm 85-10 löst in dieser Pflanze eine HR aus, ebenso wie die *xopE1*- und *xopE2*-Einzelmutanten, jedoch in leicht abgeschwächter Form. Die *xopE1/xopE2*-Doppelmutante hingegen ist nicht mehr in der Lage, eine HR auszulösen.

Ob XopJ auch an der Plasmamembran der pflanzlichen Zelle lokalisiert ist und in wieweit die mögliche N-Myristoylierung der Effektoren XopJ, XopE1 und XopE2 ihre Avirulenzaktivität beeinflusst, muss noch geklärt werden. Myristoylierung und die funktionelle Relevanz dieser Proteinmodifikation wurde bisher nur für Effektoren aus *P. syringae* gezeigt (133, 213, 243, 264). Neben dem Studium der subzellulären Lokalisierung von Wildtyp-Proteinen und Derivaten mit zerstörten N-Myristoylierungsmotiven kann die *in planta*-Acylierung der Effektorproteine XopE1, XopE2 und XopJ auch mittels Immunoblot und Autoradiographie der durch Immunoprezipitation gereinigten Effektoren direkt gezeigt werden. Hierzu wird radioaktives <sup>3</sup>H-Myristat in das Pflanzengewebe infiltriert, welches als Substrat für die eukaryotische N-Myristoyltransferase dient und kovalent an Glycin-Reste von N-Myristoylierungsmotiven gebunden wird (213). Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis dieser posttranslationalen Modifikationen bietet die massenspektrometrische Analyse (190) von aus der Pflanze isolierten XopE1, XopE2 und XopJ.

## 3.3.3. XopG, eine mögliche Zink-Metalloprotease mit Homologie zum Botulinumtoxin A

Der Effektor XopG gehört zur HopH1-Familie (182), die Proteine aus *Pseudomonas* spp., *R. solanacearum* und *Xanthomonas* spp. umfasst. Es fehlen jedoch Homologe in *Xac*. Die Sequenzähnlichkeit dieser Proteine zur Zink-Metalloprotease-Domäne des Botulinumtoxins A aus *Clostridium botulinum* (173) deutet auf eine dementsprechende Funktion hin.

Auch für XopG ist die Identifizierung von Interaktoren mittels Hefe-Dihybrid-Sichtungen essentiell, um die mögliche Funktion als Zink-Metalloprotease zu testen. Hierfür könnte auch eine wahrscheinlich katalytisch nahezu inaktive XopG-Proteinversion benutzt werden, in der der Glutamat-Rest an Position 174, der neben dem HExxE-Motiv auch zur Bindung von Zinkionen beitragen könnte, zu einem Alanin-Rest verändert wurde. Eine ähnliche Proteinversion des Botulinum-Neurotoxins A aus *C. botulinum* zeigte eine verringerte Zink-Bindung und eine stark verringerte proteolytische Aktivität bei höchstwahrscheinlich korrekter Faltung (241). Für die identifizierten möglichen Substrate kann eine XopG-abhängige Spaltung in Hefe oder nach *Agrobacterium*-vermittelter transienter Expression in der Pflanzenzelle getestet werden.
## 3.3.4. XopH, eine mögliche Tyrosinphosphatase

Der Effektor XopH wird direkt stromaufwärts von *avrBs1* auf dem größten Plasmid des Stammes 85-10, pXCV183, kodiert. Diese beiden Gene stellen die einzigen bekannten auf Plasmiden kodierten und auch die einzigen bekannten direkt benachbarten Effektorgene im *Xcv*-Stamm 85-10 dar. Die Gene *xopH* und *avrBs1* sind auch im Chromosom von *Xcc* direkt benachbart, aber in den anderen sequenzierten Xanthomonaden konnten keine entsprechenden Homologe identifiziert werden. Die beiden Gene formen kein Operon, da *avrBs1* konstitutiv exprimiert wird (95), wohingegen *xopH* mit dem TTSS koreguliert ist.

XopH zeigt Homologie zum Typ III-Effektor HopAO1 aus *P. syringae* pv. tomato, einer Tyrosinphosphatase, die Zelltod-Reaktionen unterdrücken kann (43, 96, 228). Um die Tyrosinphosphatase-Aktivität auch für XopH zu zeigen, sollten enzymatische Tests durchgeführt werden. Diese basieren auf der Freisetzung von Phosphat, welches spektrophotometrisch messbar ist, von Tyrosin-phosphorylierten Peptidsubstraten und sind mittels kommerziell verfügbarer Systeme und gereinigtem Protein bzw. Gesamt-Proteinextrakten möglich (43, 96).

## 3.4. Post-Genomanalysen - Identifizierung von Virulenzfaktoren mittels Transcriptomic

Neben den bisher beschrieben Genomanalysen bietet die Verfügbarkeit der *Xcv*-Genomsequenz auch die Möglichkeit zur Durchführung von Hochdurchsatzanalysen, wie z.B. Transkriptom-Studien mittels Microarray-Analysen. Die Untersuchung der Genexpression in *Xcv* stellt ein effektives Mittel zur Identifizierung möglicher Virulenzfaktoren dar, was Ergebnisse von Transkriptom-Studien mittels cDNA-AFLP (217, 218) und die hier beschriebene HrpG- und HrpX-abhängige Expression von Effektorgenen wie *xopC*, *xopE1*, *xopE2*, *xopH*, *xopI* und *xopJ* zeigen. Die bisherige Analyse des HrpG- und HrpX-Regulons soll nun mit den Mitteln der Microarray-Technik erweitert werden, um weitere Virulenzfaktoren des *Xcv*-Stammes 85-10 zu identifizieren. Für beide Schlüsselregulatoren liegen entsprechende Deletionsmutanten und auch eine konstitutiv aktive Version von HrpG vor, die die Identifizierung von Genen ermöglichen, die in Abhängigkeit von diesen Regulatoren aktiviert bzw. reprimiert werden (217, 301, 303, 304). Ein 70mer-DNA-Microarray aller vorhergesagten proteinkodierenden Sequenzen des Genoms ist ebenfalls verfügbar (A. Becker und U. Bonas, unpublizierte Daten). 64 Gene, die in Abhängigkeit von

HrpG bzw. HrpX induziert und fünf Gene, die reprimiert werden, sind bereits in vorangegangenen cDNA-AFLP- und RT-PCR-Analysen identifiziert worden (216-218, 301, 302, 304; F. Thieme, L. Noël, D. Büttner, A. Urban, R. Koebnik, und U. Bonas, unpublizierte Daten). Diese Gene bilden wahrscheinlich nur einen Teil des Regulons, wie Microarray-Analysen des Regulons, welches vom HrpX-Homolog HrpB in *R. solanacearum* kontrolliert wird und 143 induzierte und 50 reprimierte Gene umfasst (222), vermuten lassen.

Zusätzlich zu Analysen des Transkriptoms von *Xcv in vitro* ist es von großem Interesse, die bakterielle Genexpression in der Pflanze zu analysieren. Auf diese Weise könnten von HrpG und HrpX unabhängige Faktoren identifiziert werden, die an der Interaktion des Bakteriums mit der Pflanze beteiligt sind. So wäre es möglich, unbekannte Komponenten der Regulationskaskade, z.B. oberhalb von HrpG, zu identifizieren.

Trotz der hohen Anzahl möglicher Regulatoren in Xanthomonaden ist die Identifizierung solcher Komponenten auch *in silico* möglich. In Analogie zu *R. solanacearum* könnte man eine PrhA-PrhIR-System-ähnliche Pflanzenzellkontakt-abhängige Signalkaskade vermuten (siehe Kapitel 1.3.3.), die aus einem TonB-abhängigen Rezeptor, einem anti-Sigma- und einem Sigma-Faktor besteht und von Genen kodiert wird, die eng benachbart sind (166). Im *Xcv*-Stamm 85-10 findet sich nur ein solches System, das von den Genen XCV4221-4224 kodiert wird (R. Koebnik, unpublizierte Daten) und in *Xac*, aber nicht in den anderen Xanthomonaden konserviert ist.

Diese Annahme muss jedoch nicht zutreffend sein, da dieses System auch in andere Prozesse, wie z.B. die Eisenaufnahme, involviert sein könnte (166). Zudem deuten Daten einer Hefe-Dihybrid-Sichtung in *Xac* auf eine Interaktion von HrpG mit einer "two-component system sensor histidine kinase" hin (7). Diese Kinase könnte den "two-component system response regulator" HrpG durch Phoshorylierung aktivieren. Eine posttranslationale Modifizierung zur Aktivierung des auf einem niedrigen Niveau in Vollmedium exprimierten HrpG legen auch Studien in *Xcv* nahe (303). Die Sensor-Histidinkinase, welche von XAC3683 kodiert wird, ist in *Xcc* und *Xoo* konserviert. Interessanterweise findet man in Stamm 85-10 ebenfalls eine nahezu identische Sensor-Histidinkinase (XCV3804), die aber mit einem "response regulator" fusioniert ist. Die Regulatoren, die die Expression der *hrp*-Gene steuern, sind Teil komplexer Regulationskaskaden (siehe Kapitel 1.3.3.) (115). Es ist also denkbar, dass beide Systeme, das erste auf transkriptioneller und das zweite auf posttranslationaler Ebene, und möglicherweise auch weitere Kaskaden in die Regulation von HrpG involviert sind. Es bleibt jedoch zu klären, ob zumindest eines dieser Systeme HrpG aktiviert und welche anderen Gene ebenfalls reguliert werden.

Die Existenz weiterer Komponenten der Kaskade unterhalb von HrpG und HrpX ist ebenfalls wahrscheinlich, da nicht in allen HrpX-abhängigen Promotoren das PIP-Motiv (TTCG-N<sub>16</sub>-TTCG), welches von HrpX erkannt wird, und das ebenfalls nötige -10-Motiv (YANNRT) identifiziert werden konnten (283, 301; A. Krüger, U. Bonas und R. Koebnik, unpublizierte Daten). Dies trifft auch auf das Regulon zu, das vom HrpX-Homolog HrpB in *R. solanacearum* kontrolliert wird, wo ein Großteil der regulierten Gene kein entsprechendes Promotormotiv besitzt (222). Einen möglichen Kandidaten für eine Komponente der Signalkaskade unterhalb von HrpX stellt das Gen XCV1512 dar. Dieses wird HrpG- und HrpX-abhängig exprimiert, was die cDNA-AFLP-Analyse des HrpG-Regulons des *Xcv*-Stammes 85-10 ergab, und kodiert einen möglichen Transkriptionsregulator der MarR-Familie (217). Zudem zeigte eine Transposoninsertionsmutante im Homolog XC\_2827 des *Xcc*-Stammes 8004 eine reduzierte Virulenz auf *B. oleraceae* (233). Entsprechende Analysen für *Xcv* stehen noch aus.

Die Verfügbarkeit der Genomsequenz des *Xcv*-Stammes 85-10 ist ein wichtiger Schritt für die weitere Analysen dieses Modellorganismus in Hinblick auf die Interaktion mit seinem pflanzlichen Wirt. Sie ermöglichte die Vorhersage einer Vielzahl von Virulenzfaktoren und wird deren Analyse in der Zukunft erheblich erleichtern. Zudem werden nun moderne Hochdurchsatzanalysen, wie Transkriptom-Studien mittels Microarrays und Proteom-Analysen, möglich. Die Untersuchung des Typ III-Sekretoms könnte z.B. noch unbekannte Effektorproteine identifizieren, während die Analyse des Phosphoproteoms Einblicke in regulatorische Netzwerke ermöglichen könnte. Diese Analysen in Kombination mit den in *Xcv* bereits etablierten Techniken, wie der effizienten Erzeugung von Deletionsmutanten und Untersuchung von Phänotypen in verschiedenen pflanzlichen Spezies, werden zu einem tieferen Verständnis der Interaktion zwischen Pathogen und pflanzlichem Wirt beitragen.

# 4. Literaturverzeichnis

- 1. **Abramovitch, R. B., R. Janjusevic, C. E. Stebbins, and G. B. Martin.** 2006. Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **103**:2851-2856.
- 2. Abramovitch, R. B., Y. J. Kim, S. Chen, M. B. Dickman, and G. B. Martin. 2003. *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. Embo J. 22:60-69.
- 3. Aizawa, S. I. 2001. Bacterial flagella and type III secretion systems. FEMS Microbiol. Lett. 202:157-164.
- 4. **Akeda, Y., and J. E. Galan.** 2005. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. Nature **437**:911-915.
- 5. Alami, M., I. Luke, S. Deitermann, G. Eisner, H. G. Koch, J. Brunner, and M. Muller. 2003. Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. Mol. Cell **12**:937-946.
- 6. **Aldon, D., B. Brito, C. Boucher, and S. Genin.** 2000. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. EMBO J. **19:**2304-2314.
- 7. Alegria, M. C., C. Docena, L. Khater, C. H. Ramos, A. C. da Silva, and C. S. Farah. 2004. New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar citri. J. Bacteriol. **186**:6186-6197.
- 8. Alfano, J. R., A. O. Charkowski, W. L. Deng, J. L. Badel, T. Petnicki-Ocwieja, K. van Dijk, and A. Collmer. 2000. The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97:**4856-4861.
- 9. Alfano, J. R., and A. Collmer. 1996. Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. Plant Cell 8:1683-1698.
- 10. Alfano, J. R., and A. Collmer. 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. Annu. Rev. Phytopathol. 42:385-414.
- 11. Altschul, S. F., and E. V. Koonin. 1998. Iterated profile searches with PSI-BLAST-a tool for discovery in protein databases. Trends Biochem. Sci. 23:444-447.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.
- Anderson, D. M., D. E. Fouts, A. Collmer, and O. Schneewind. 1999. Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:12839-12843.
- 14. Anderson, D. M., and O. Schneewind. 1997. A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. Science **278**:1140-1143.
- 15. Anderson, D. M., and O. Schneewind. 1999. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ. Mol. Microbiol. **31**:1139-1148.
- 16. Arlat, M., C. L. Gough, C. Zischek, P. A. Barberis, A. Trigalet, and C. A. Boucher. 1992. Transcriptional organization and expression of the large *hrp* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum*. Mol. Plant-Microbe Interact. **5:**187-193.

- Arlat, M., F. Van Gijsegem, J. C. Huet, J. C. Pernollet, and C. A. Boucher. 1994. PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. EMBO J. 13:543-553.
- Arnold, D. L., R. W. Jackson, A. J. Fillingham, S. C. Goss, J. D. Taylor, J. W. Mansfield, and A. Vivian. 2001. Highly conserved sequences flank avirulence genes: isolation of novel avirulence genes from *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. Microbiol. 147:1171-1182.
- Asai, T., G. Tena, J. Plotnikova, M. R. Willmann, W. L. Chiu, L. Gomez-Gomez, T. Boller, F. M. Ausubel, and J. Sheen. 2002. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. Nature 415:977-983.
- 20. Astua-Monge, G., G. V. Minsavage, R. E. Stall, M. J. Davis, U. Bonas, and J. B. Jones. 2000. Resistance of tomato and pepper to T3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is specified by a plant-inducible avirulence gene. Mol. Plant-Microbe Interact. 13:911-921.
- Astua-Monge, G., G. V. Minsavage, R. E. Stall, C. E. Vallejos, M. J. Davis, and J. B. Jones. 2000. Xv4-avrXv4: A new gene-for-gene interaction identified between Xanthomonas campestris pv. vesicatoria race T3 and the wild tomato relative Lycopersicon pennellii. Mol. Plant-Microbe Interact. 13:1346-1355.
- 22. Barras, F., F. van Gijsegem, and A. K. Chatterjee. 1994. Extracellular enzymes and pathogensis of soft-rot *Erwinia*. Annu. Rev. Phytopathol. **32**:201-234.
- 23. Barton-Willis, P. A., M. C. Wang, M. R. Holliday, M. R. Long, and N. T. Keen. 1984. Purification and composition of lipopolysaccharides from *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae*. Physiol. Plant Pathol. **25**:387-398.
- 24. Becker, A., F. Katzen, A. Pühler, and L. Ielpi. 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. Appl. Microbiol. Biotechnol. **50**:145-152.
- Bedini, E., C. De Castro, G. Erbs, L. Mangoni, J. M. Dow, M. A. Newman, M. Parrilli, and C. Unverzagt. 2005. Structure-dependent modulation of a pathogen response in plants by synthetic O-antigen polysaccharides. J. Am. Chem. Soc. 127:2414-2416.
- 26. Bell, K. S., M. Sebaihia, L. Pritchard, M. T. Holden, L. J. Hyman, M. C. Holeva, N. R. Thomson, S. D. Bentley, L. J. Churcher, K. Mungall, R. Atkin, N. Bason, K. Brooks, T. Chillingworth, K. Clark, J. Doggett, A. Fraser, Z. Hance, H. Hauser, K. Jagels, S. Moule, H. Norbertczak, D. Ormond, C. Price, M. A. Quail, M. Sanders, D. Walker, S. Whitehead, G. P. Salmond, P. R. Birch, J. Parkhill, and I. K. Toth. 2004. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 101:11105-11110.
- 27. Bender, C. L., F. Alarcon-Chaidez, and D. C. Gross. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63:266-292.
- 28. **Berger, C.** 2005. Molekulare Charakterisierung des Typ III-Sekretionssystems von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Ph.D. thesis, Martin-Luther-Universität, Halle/Wittenberg.
- 29. Berks, B. C., T. Palmer, and F. Sargent. 2005. Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. Curr. Opin. Microbiol. 8:174-181.
- 30. Bernhard, F., D. L. Coplin, and K. Geider. 1993. A gene cluster for amylovoran synthesis in *Erwinia amylovora*: characterization and relationship to *cps* genes in *Erwinia stewartii*. Mol. Gen. Genet. 239:158-168.

- 31. Binet, R., S. Letoffe, J. M. Ghigo, P. Delepelaire, and C. Wandersman. 1997. Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters--a review. Gene 192:7-11.
- 32. **Birch, R. G., and S. S. Patil.** 1987. Evidence that an albicidin-like phytotoxin induces chlorosis in sugarcane leaf scald disease by blocking plastid DNA replication. Physiol. Mol. Plant. Pathol. **30**:207-214.
- 33. Birch, R. G., and S. S. Patil. 1985. Preliminary characterization of an antibiotic produced by *Xanthomonas albilineans* which inhibits DNA synthesis in *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. **131**:1069-1075.
- 34. Birtalan, S. C., R. M. Phillips, and P. Ghosh. 2002. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. Mol. Cell. 9:971-980.
- Bogdanove, A., S. V. Beer, U. Bonas, C. A. Boucher, A. Collmer, D. L. Coplin, G. R. Cornelis, H.-C. Huang, S. W. Hutcheson, N. J. Panopoulos, and F. Van Gijsegem. 1996. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. Mol. Microbiol. 20:681-683.
- 36. **Bonas, U., J. Conrads-Strauch, and I. Balbo.** 1993. Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBs3*. Mol. Gen. Genet. **238**:261-269.
- 37. Bonas, U., R. Schulte, S. Fenselau, G. V. Minsavage, B. J. Staskawicz, and R. E. Stall. 1991. Isolation of a gene-cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. Mol. Plant-Microbe Interact. **4:**81-88.
- 38. Bonas, U., R. E. Stall, and B. Staskawicz. 1989. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Mol. Gen. Genet. 218:127-136.
- Bonshtien, A., A. Lev, A. Gibly, P. Debbie, A. Avni, and G. Sessa. 2005. Molecular properties of the *Xanthomonas* AvrRxv effector and global transcriptional changes determined by its expression in resistant tomato plants. Mol. Plant-Microbe Interact. 18:300-310.
- 40. Bracha-Drori, K., K. Shichrur, A. Katz, M. Oliva, R. Angelovici, S. Yalovsky, and N. Ohad. 2004. Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. Plant J. 40:419-427.
- 41. **Braun, S. G., A. Meyer, O. Holst, A. Pühler, and K. Niehaus.** 2005. Characterization of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* lipopolysaccharide substructures essential for elicitation of an oxidative burst in tobacco cells. Mol. Plant-Microbe Interact. **18:**674-681.
- 42. Bretz, J., L. Losada, K. Lisboa, and S. W. Hutcheson. 2002. Lon protease functions as a negative regulator of type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. Mol. Microbiol. 45:397-409.
- 43. Bretz, J. R., N. M. Mock, J. C. Charity, S. Zeyad, C. J. Baker, and S. W. Hutcheson. 2003. A translocated protein tyrosine phosphatase of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 modulates plant defence response to infection. Mol. Microbiol. 49:389-400.
- 44. **Brito, B., D. Aldon, P. Barberis, C. Boucher, and S. Genin.** 2002. A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum hrp* genes. Mol. Plant-Microbe Interact. **15:**109-119.
- 45. **Brito, B., M. Marenda, P. Barberis, C. Boucher, and S. Genin.** 1999. *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. Mol. Microbiol. **31**:237-251.

- Bronstein, P. A., M. Marrichi, S. Cartinhour, D. J. Schneider, and M. P. DeLisa. 2005. Identification of a twin-arginine translocation system in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and its contribution to pathogenicity and fitness. J. Bacteriol. 187:8450-8461.
- 47. **Brown, I., J. Mansfield, and U. Bonas.** 1995. *hrp* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* determine ability to suppress papillae deposition in pepper mesophyll cells. Mol. Plant-Microbe Interact. **8**:825-836.
- 48. **Burdman, S., Y. Shen, S. W. Lee, Q. Xue, and P. Ronald.** 2004. RaxH/RaxR: a two-component regulatory system in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* required for AvrXa21 activity. Mol. Plant-Microbe Interact. **17:**602-612.
- 49. Burghout, P., R. van Boxtel, P. Van Gelder, P. Ringler, S. A. Muller, J. Tommassen, and M. Koster. 2004. Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. J. Bacteriol. 186:4645-4654.
- 50. Burrows, L. L. 2005. Weapons of mass retraction. Mol. Microbiol. 57:878-888.
- 51. **Büttner, D., and U. Bonas.** 2003. Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. Curr. Op. Plant Biol. **6:**312-319.
- 52. **Büttner, D., and U. Bonas.** 2002. Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. EMBO J. **21:**5313-5322.
- 53. **Büttner, D., and U. Bonas.** 2002. Port of entry the type III secretion translocon. Trends Microbiol. **10**:186-192.
- 54. **Büttner, D., D. Gürlebeck, L. D. Noël, and U. Bonas.** 2004. HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. Mol. Microbiol. **54**:755-768.
- 55. Büttner, D., C. Lorenz, E. Weber, and U. Bonas. 2006. Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Mol. Microbiol. **59:**513-527.
- 56. **Büttner, D., D. Nennstiel, B. Klüsener, and U. Bonas.** 2002. Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. J. Bacteriol. **184:**2389-2398.
- 57. Büttner, D., L. Noël, F. Thieme, and U. Bonas. 2003. Genomic approaches in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* allow fishing for virulence genes. J. Biotechnol. 106:203-214.
- 58. Canteros, B., G. Minsavage, U. Bonas, D. Pring, and R. Stall. 1991. A gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines avirulence in tomato is related to *avrBs3*. Mol. Plant-Microbe Interact. **4**:628-632.
- 59. **Canteros, B. J.** 1990. Diversity of plasmids and plasmid-encoded phenotypic traits in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Ph.D. thesis, University of Florida.
- 60. Carver, T. J., K. M. Rutherford, M. Berriman, M. A. Rajandream, B. G. Barrell, and J. Parkhill. 2005. ACT: the Artemis Comparison Tool. Bioinformatics 21:3422-3423.
- 61. Cascales, E., and P. J. Christie. 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. Nat. Rev. Microbiol. 1:137-149.
- 62. **Casper-Lindley, C., D. Dahlbeck, E. T. Clark, and B. Staskawicz.** 2002. Direct biochemical evidence for type III secretion-dependent translocation of the AvrBs2 effector protein into plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **99:**8336-8341.
- 63. Castañeda, A., J. D. Reddy, B. El-Yacoubi, and D. W. Gabriel. 2005. Mutagenesis of all eight *avr* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* had no detected effect on pathogenicity, but one *avr* gene affected race specificity. Mol. Plant-Microbe Interact. **18**:1306–1317.

- 64. Chan, J. W. Y. F., and P. H. Goodwin. 1999. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. Biotechnol. Adv. **17:**489-508.
- 65. Chang, J. H., J. M. Urbach, T. F. Law, L. W. Arnold, A. Hu, S. Gombar, S. R. Grant, F. M. Ausubel, and J. L. Dangl. 2005. A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 102:2549-2554.
- 66. Charity, J. C., K. Pak, C. F. Delwiche, and S. W. Hutcheson. 2003. Novel exchangeable effector loci associated with the *Pseudomonas syringae hrp* pathogenicity island: evidence for integron-like assembly from transposed gene cassettes. Mol. Plant-Microbe Interact. **16**:495-507.
- 67. Charkowski, A. O., J. R. Alfano, G. Preston, J. Yuan, S. Y. He, and A. Collmer. 1998. The *Pseudomonas syringae* pv. tomato HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate. J. Bacteriol. **180**:5211-5217.
- 68. Chatterjee, A., Y. Cui, H. Yang, A. Collmer, J. R. Alfano, and A. K. Chatterjee. 2003. GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. Mol. Plant-Microbe Interact. **16**:1106-1117.
- 69. Chesnokova, O., J. B. Coutinho, I. H. Khan, M. S. Mikhail, and C. I. Kado. 1997. Characterization of flagella genes of *Agrobacterium tumefaciens*, and the effect of a bald strain on virulence. Mol. Microbiol. **23**:579-590.
- 70. Christie, P. J. 2004. Type IV secretion: the Agrobacterium VirB/D4 and related conjugation systems. Biochim. Biophys. Acta 1694:219-234.
- 71. Chung, E., C.-M. Ryu, S.-K. Oh, R. N. Kim, J. M. Park, H. S. Cho, S. Lee, J. S. Moon, S.-H. Park, and D. Choi. 2006. Suppression of pepper *SGT1* and *SKP1* causes severe retardation of plant growth and compromises basal resistance. Physiologia Plantarum:1-13.
- 72. Ciesiolka, L. D., T. Hwin, J. D. Gearlds, G. V. Minsavage, R. Saenz, M. Bravo, V. Handley, S. M. Conover, H. Zhang, J. Caporgno, N. B. Phengrasamy, A. O. Toms, R. E. Stall, and M. C. Whalen. 1999. Regulation of expression of avirulence gene *avrRxv* and identification of a family of host interaction factors by sequence analysis of *avrBsT*. Mol. Plant-Microbe Interact. 12:35-44.
- Claret, L., S. R. Calder, M. Higgins, and C. Hughes. 2003. Oligomerization and activation of the FliI ATPase central to bacterial flagellum assembly. Mol. Microbiol. 48:1349-1355.
- 74. Clark, E., S. Manulis, Y. Ophir, I. Barash, and Y. Gafni. 1993. Cloning and characterization of *iaaM* and *iaaH* from *Erwinia herbicola* pathovar *gypsophilae*. Phytopathology 83:234-240.
- 75. Collins, R. F., S. A. Frye, A. Kitmitto, R. C. Ford, T. Tonjum, and J. P. Derrick. 2004. Structure of the *Neisseria meningitidis* outer membrane PilQ secretin complex at 12 A resolution. J. Biol. Chem. **279:**39750-39756.
- 76. Condemine, G., A. Castillo, F. Passeri, and C. Enard. 1999. The PecT repressor coregulates synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in *Erwinia chrysanthemi*. Mol. Plant-Microbe Interact. 12:45-52.
- Coplin, D. L., and D. Cook. 1990. Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. Mol. Plant-Microbe Interact. 3:271-279.
- 78. Cui, J., A. K. Bahrami, E. G. Pringle, G. Hernandez-Guzman, C. L. Bender, N. E. Pierce, and F. M. Ausubel. 2005. *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant

defenses against pathogens and herbivores. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 102:1791-1796.

- 79. Cunnac, S., C. Boucher, and S. Genin. 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.
- 80. Cunnac, S., A. Occhialini, P. Barberis, C. Boucher, and S. Genin. 2004. Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. Mol. Microbiol. **53**:115-128.
- 81. da Silva, A. C., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Farah, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, C. B. Monteiro-Vitorello, M. A. Sluys, N. F. Almeida, L. M. Alves, A. M. Do Amaral, M. C. Bertolini, L. E. Camargo, G. Camarotte, F. Cannavan, J. Cardozo, F. Chambergo, L. P. Ciapina, R. M. Cicarelli, L. L. Coutinho, J. R. Cursino-Santos, H. El-Dorry, J. B. Faria, A. J. Ferreira, R. C. Ferreira, M. I. Ferro, E. F. Formighieri, M. C. Franco, C. C. Greggio, A. Gruber, A. M. Katsuyama, L. T. Kishi, R. P. Leite, E. G. Lemos, M. V. Lemos, E. C. Locali, M. A. Machado, A. M. Madeira, N. M. Martinez-Rossi, E. C. Martins, J. Meidanis, C. F. Menck, C. Y. Miyaki, D. H. Moon, L. M. Moreira, M. T. Novo, V. K. Okura, M. C. Oliveira, V. R. Oliveira, H. A. Pereira, A. Rossi, J. A. Sena, C. Silva, R. F. De Souza, L. A. Spinola, M. A. Takita, R. E. Tamura, E. C. Teixeira, R. I. Tezza, M. Trindade Dos Santos, D. Truffi, S. M. Tsai, F. F. White, J. C. Setubal, and J. P. Kitajima. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. Nature 417:459-463.
- 82. da Silva, F. G., Y. Shen, C. Dardick, S. Burdman, R. C. Yadav, A. L. de Leon, and P. C. Ronald. 2004. Bacterial genes involved in type I secretion and sulfation are required to elicit the rice *Xa21*-mediated innate immune response. Mol. Plant-Microbe Interact. 17:593-601.
- 83. de Leeuw, E., T. Granjon, I. Porcelli, M. Alami, S. B. Carr, M. Muller, F. Sargent, T. Palmer, and B. C. Berks. 2002. Oligomeric properties and signal peptide binding by *Escherichia coli* Tat protein transport complexes. J. Mol. Biol. 322:1135-1146.
- 84. **DebRoy, S., R. Thilmony, Y. B. Kwack, K. Nomura, and S. Y. He.** 2004. A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **101**:9927-9932.
- 85. **Deng, W. L., and H. C. Huang.** 1999. Cellular locations of *Pseudomonas syringae* pv. syringae HrcC and HrcJ proteins, required for harpin secretion via the type III pathway. J. Bacteriol. **181:**2298-2301.
- 86. **Deng, W. L., A. H. Rehm, A. O. Charkowski, C. M. Rojas, and A. Collmer.** 2003. *Pseudomonas syringae* exchangeable effector loci: sequence diversity in representative pathovars and virulence function in *P. syringae* pv. syringae B728a. J. Bacteriol. **185**:2592-2602.
- 87. Deslandes, L., J. Olivier, N. Peeters, D. Feng, M. Khounlotham, C. Boucher, I. Somssich, S. Genin, and Y. Marco. 2003. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 100:8024-8029.
- 88. **D'Haeze, W., and M. Holsters.** 2004. Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. Trends Microbiol. **12:**555-561.
- 89. **Ding, Z., and P. J. Christie.** 2003. *Agrobacterium tumefaciens* twin-argininedependent translocation is important for virulence, flagellation, and chemotaxis but not type IV secretion. J. Bacteriol. **185**:760-771.
- 90. **Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel, and J. Hacker.** 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. Nat. Rev. Microbiol. **2**:414-424.

- 91. Dow, J. M., A. E. Osbourn, T. J. Wilson, and M. J. Daniels. 1995. A locus determining pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is involved in lipopolysaccharide biosynthesis. Mol. Plant-Microbe Interact. **8:**768-777.
- 92. Dow, M., M. A. Newman, and E. von Roepenak. 2000. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. Annu. Rev. Phytopathol. **38**:241-261.
- 93. **Durrant, W. E., and X. Dong.** 2004. Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol. **42:**185-209.
- 94. Edqvist, P. J., J. Olsson, M. Lavander, L. Sundberg, A. Forsberg, H. Wolf-Watz, and S. A. Lloyd. 2003. YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system. J. Bacteriol. **185**:2259-2266.
- 95. Escolar, L., G. Van den Ackerveken, S. Pieplow, O. Rossier, and U. Bonas. 2001. Type III secretion and *in planta* recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. Mol. Plant. Pathol. 2:287–296.
- 96. Espinosa, A., M. Guo, V. C. Tam, Z. Q. Fu, and J. R. Alfano. 2003. The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. Mol. Microbiol. **49:**377-387.
- 97. Fadouloglou, V. E., A. P. Tampakaki, N. M. Glykos, M. N. Bastaki, J. M. Hadden, S. E. Phillips, N. J. Panopoulos, and M. Kokkinidis. 2004. Structure of HrcQ<sub>B-C</sub>, a conserved component of the bacterial type III secretion systems. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 101:70-75.
- 98. Feil, E. J. 2004. Small change: keeping pace with microevolution. Nat. Rev. Microbiol. 2:483-495.
- 99. Feldman, M. F., and G. R. Cornelis. 2003. The multitalented type III chaperones: all you can do with 15 kDa. FEMS Microbiol. Lett. **219**:151-158.
- Felix, G., J. D. Duran, S. Volko, and T. Boller. 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. Plant J. 18:265-276.
- 101. **Fenselau, S., I. Balbo, and U. Bonas.** 1992. Determinants of pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals. Mol. Plant-Microbe Interact. **5**:390-396.
- 102. **Fenselau, S., and U. Bonas.** 1995. Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa, and Fli secretion systems. Mol. Plant-Microbe Interact. **8**:845-854.
- 103. Fett, W. F., S. F. OSMAN, and M. F. DUNN. 1987. Auxin production by plantpathogenic pseudomonads and xanthomonads. Appl. Environ. Microbiol. **53**:1839-1845.
- 104. Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. Annu. Rev. Phytopathol. 9:275-296.
- 105. Fraser, G. M., T. Hirano, H. U. Ferris, L. L. Devgan, M. Kihara, and R. M. Macnab. 2003. Substrate specificity of type III flagellar protein export in *Salmonella* is controlled by subdomain interactions in FlhB. Mol. Microbiol. **48**:1043-1057.
- 106. **Fujikawa, T., H. Ishihara, J. E. Leach, and S. Tsuyumu.** 2006. Suppression of defense response in plants by the *avrBs3/pthA* gene family of *Xanthomonas* spp. Mol. Plant-Microbe Interact. **19**:342-349.
- 107. Gaudriault, S., M. N. Brisset, and M. A. Barny. 1998. HrpW of *Erwinia amylovora*, a new Hrp-secreted protein. FEBS Lett. **428**:224-228.

- 108. Genin, S., B. Brito, T. P. Denny, and C. Boucher. 2005. Control of the *Ralstonia* solanacearum Type III secretion system (Hrp) genes by the global virulence regulator PhcA. FEBS Lett. **579**:2077-2081.
- 109. Glickmann, E., L. Gardan, S. Jacquet, S. Hussain, M. Elasri, A. Petit, and Y. Dessaux. 1998. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. Mol. Plant-Microbe Interact. **11**:156-162.
- 110. **Gomez-Gomez, L., and T. Boller.** 2002. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. Trends Plant Sci. **7:**251-256.
- Greenberg, J. T., and B. A. Vinatzer. 2003. Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. Curr. Opin. Microbiol. 6:20-28.
- 112. Grimm, C., W. Aufsatz, and N. J. Panopoulos. 1995. The *hrpRS* locus of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* constitutes a complex regulatory unit. Mol. Microbiol. 15:155-165.
- 113. **Guo, M., S. Manulis, I. Barash, and A. Lichter.** 2001. The operon for cytokinin biosynthesis of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* contains two promoters and is plant induced. Can. J. Microbiol. **47:**1126-1131.
- 114. **Gürlebeck, D., B. Szurek, and U. Bonas.** 2005. Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. Plant J. **42:**175-187.
- 115. **Gürlebeck, D., F. Thieme, and U. Bonas.** 2006. Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. J. Plant Physiol. **163:**233-255.
- 116. Guttman, D. S., B. A. Vinatzer, S. F. Sarkar, M. V. Ranall, G. Kettler, and J. T. Greenberg. 2002. A Functional Screen for the Type III (Hrp) Secretome of the Plant Pathogen *Pseudomonas syringae*. Science 295:1722-1726.
- 117. **Harel, A., and D. J. Forbes.** 2004. Importin beta: conducting a much larger cellular symphony. Mol. Cell **16**:319-330.
- 118. **Hauck, P., R. Thilmony, and S. Y. He.** 2003. A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **100**:8577-8582.
- 119. **He, S. Y., H. C. Huang, and A. Collmer.** 1993. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin<sub>Pss</sub>: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. Cell **73**:1255-1266.
- 120. He, S. Y., and Q. Jin. 2003. The Hrp pilus: learning from flagella. Curr. Opin. Microbiol. 6:15-19.
- 121. He, S. Y., K. Nomura, and T. S. Whittam. 2004. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. Biochim. Biophys. Acta 1694:181-206.
- 122. He, Y.-W., M. Xu, K. Lin, Y.-J. A. Ng, C.-M. Wen, L.-H. Wang, Z.-D. Liu, H.-B. Zhang, Y.-H. Dong, J. M. Dow, and L.-H. Zhang. 2006. Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell–cell communication-dependent genes and functions. Mol. Microbiol. 59:610-622.
- 123. Heesemann, J., B. Algermissen, and R. Laufs. 1984. Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. 46:105-110.
- 124. Henderson, I. R., and J. P. Nataro. 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. Infect. Immun. 69:1231-1243.
- 125. Hendrick, C. A., and L. Sequeira. 1984. Lipopolysaccharide-defective mutants of the wilt pathogen *Pseudomonas solanacearum*. Appl. Environ. Microbiol. **48**:94-101.

- 126. Herbers, K., J. Conrads-Strauch, and U. Bonas. 1992. Race-specificity of plant resistance to bacterial spot disease determined by repetitive motifs in a bacterial avirulence protein. Nature **356**:172-174.
- 127. Heu, S., J. Oh, Y. Kang, S. Ryu, S. K. Cho, Y. Cho, and M. Cho. 2001. *gly* gene cloning and expression and purification of glycinecin A, a bacteriocin produced by *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra. Appl. Environ. Microbiol. **67:**4105-4110.
- 128. **Hochstrasser, M.** 2000. Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. Nat. Cell Biol. **2**:E153-E157.
- 129. **Hochstrasser, M.** 1998. There's the rub: a novel ubiquitin-like modification linked to cell cycle regulation. Genes Dev. **12:**901-907.
- 130. **Holland, I. B.** 2004. Translocation of bacterial proteins--an overview. Biochim. Biophys. Acta **1694:5**-16.
- 131. Holland, I. B., L. Schmitt, and J. Young. 2005. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. Mol. Membr. Biol. 22:29-39.
- Hotson, A., R. Chosed, H. Shu, K. Orth, and M. B. Mudgett. 2003. Xanthomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. Mol. Microbiol. 50:377-389.
- 133. Hotson, A., and M. B. Mudgett. 2004. Cysteine proteases in phytopathogenic bacteria: identification of plant targets and activation of innate immunity. Curr. Opin. Plant Biol. 7:384-390.
- 134. Hu, C. D., Y. Chinenov, and T. K. Kerppola. 2002. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. Mol. Cell 9:789-798.
- 135. **Hughes, D.** 2000. Evaluating genome dynamics: the constraints on rearrangements within bacterial genomes. Genome Biol. **1:**REVIEWS0006.
- 136. **Huguet, E.** 1998. Caractérisation moléculaire détaillée de la partie droite de la région des gènes *hrp* de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, Ph.D. thesis, Paris-Grignon.
- 137. **Huguet, E., K. Hahn, K. Wengelnik, and U. Bonas.** 1998. *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. Mol. Microbiol. **29:**1379-1390.
- 138. Hutcheson, S. W., J. Bretz, T. Sussan, S. Jin, and K. Pak. 2001. Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate *hrp*-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. J. Bacteriol. **183**:5589-5598.
- 139. Hwang, M. S., R. L. Morgan, S. F. Sarkar, P. W. Wang, and D. S. Guttman. 2005. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. Appl. Environ. Microbiol. 71:5182-5191.
- 140. Jackson, M. W., and G. V. Plano. 2000. Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. FEMS Microbiol. Lett. 186:85-90.
- 141. Jackson, R. W., E. Athanassopoulos, G. Tsiamis, J. W. Mansfield, A. Sesma, D. L. Arnold, M. J. Gibbon, J. Murillo, J. D. Taylor, and A. Vivian. 1999. Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:10875-10880.
- 142. Jackson, R. W., J. W. Mansfield, D. L. Arnold, A. Sesma, C. D. Paynter, J. Murillo, J. D. Taylor, and A. Vivian. 2000. Excision from tRNA genes of a large chromosomal region, carrying *avrPphB*, associated with race change in the bean pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Mol. Microbiol. **38**:186-197.
- 143. Jakobek, J. L., J. A. Smith, and P. B. Lindgren. 1993. Suppression of bean defense responses by *Pseudomonas syringae*. Plant Cell **5**:57-63.

- 144. Jamir, Y., M. Guo, H. S. Oh, T. Petnicki-Ocwieja, S. Chen, X. Tang, M. B. Dickman, A. Collmer, and J. R. Alfano. 2004. Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. Plant J. 37:554-565.
- 145. Janjusevic, R., R. B. Abramovitch, G. B. Martin, and C. E. Stebbins. 2006. A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. Science 311:222-226.
- 146. Jansson, P. E., L. Kenne, and B. Lindberg. 1975. Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. Carbohydr. Res. 45:275-282.
- 147. Jin, Q., W. Hu, I. Brown, G. McGhee, P. Hart, A. L. Jones, and S. Y. He. 2001. Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. Mol. Microbiol. 40:1129-1139.
- 148. Joardar, V., M. Lindeberg, D. J. Schneider, A. Collmer, and C. R. Buell. 2005. Lineage-specific regions in *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000. Molecular Plant Pathology **6**:53-64.
- 149. Jones, J. B., G. H. Lacy, H. Bouzar, R. E. Stall, and N. W. Schaad. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. Syst. Appl. Microbiol. 27:755-762.
- 150. Kang, L., X. Tang, and K. S. Mysore. 2004. *Pseudomonas* type III effector AvrPto suppresses the programmed cell death induced by two nonhost pathogens in *Nicotiana benthamiana* and tomato. Mol. Plant-Microbe Interact. **17:**1328-1336.
- 151. Kang, Y., H. Liu, S. Genin, M. A. Schell, and T. P. Denny. 2002. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. Mol. Microbiol. **46**:427-437.
- 152. Kao, C. C., E. Barlow, and L. Sequeira. 1992. Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*. J. Bacteriol. 174:1068-1071.
- 153. Kao, C. C., and L. Sequeira. 1991. A gene cluster required for coordinated biosynthesis of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide also affects virulence of *Pseudomonas solanacearum*. J. Bacteriol. **173**:7841-7847.
- 154. Katzen, F., D. U. Ferreiro, C. G. Oddo, M. V. Ielmini, A. Becker, A. Pühler, and L. Ielpi. 1998. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris gum* mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. J. Bacteriol. **180**:1607-1617.
- 155. **Kay, S., J. Boch, and U. Bonas.** 2005. Characterization of AvrBs3-like effectors from a *Brassicaceae* pathogen reveals virulence and avirulence activities and a protein with a novel repeat architecture. Mol. Plant-Microbe Interact. **18**:838-848.
- 156. Kearney, B., and B. J. Staskawicz. 1990. Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. Nature **346**:385-386.
- 157. Kemp, B. P., J. Horne, A. Bryant, and R. M. Cooper. 2004. Xanthomonas axonopodis pv. manihotis gumD gene is essential, for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (Manihot esculenta). Physiological and Molecular Plant Pathology 64:209-218.
- 158. **Kihara, M., T. Minamino, S. Yamaguchi, and R. M. Macnab.** 2001. Intergenic suppression between the flagellar MS ring protein FliF of *Salmonella* and FlhA, a membrane component of its export apparatus. J. Bacteriol. **183**:1655-1662.
- 159. Kim, J. F., and S. V. Beer. 1998. HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class. J. Bacteriol. 180:5203-5210.

- 160. **Kim, J. G., E. Jeon, J. Oh, J. S. Moon, and I. Hwang.** 2004. Mutational analysis of *Xanthomonas* harpin HpaG identifies a key functional region that elicits the hypersensitive response in nonhost plants. J. Bacteriol. **186**:6239-6247.
- 161. Kim, J.-G., B. K. Park, C.-H. Yoo, E. Jeon, J. Oh, and I. Hwang. 2003. Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. glycines *hrp* pathogenicity island. J. Bacteriol. **185**:3155-3166.
- 162. Kim, M. G., L. da Cunha, A. J. McFall, Y. Belkhadir, S. DebRoy, J. L. Dangl, and D. Mackey. 2005. Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4regulated basal defense in *Arabidopsis*. Cell **121**:749-759.
- 163. **Klement, Z.** 1982. Hypersensitivity, p. 149-177. *In* M. S. Mount and G. H. Lacy (ed.), Phytopathogenic prokaryotes, vol. 2. Academic Press, New York.
- 164. **Knoop, V., B. Staskawicz, and U. Bonas.** 1991. Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. J. Bacteriol. **173:**7142-7150.
- 165. **Koebnik, R.** 2001. The role of bacterial pili in protein and DNA translocation. Trends Microbiol. **9:**586-590.
- 166. **Koebnik, R.** 2005. TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule? Trends Microbiol. **13:**343-347.
- 167. Koonin, E. V., and R. L. Tatusov. 1994. Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity. Application of an iterative approach to database search. J. Mol. Biol. 244:125-132.
- Kostakioti, M., C. L. Newman, D. G. Thanassi, and C. Stathopoulos. 2005. Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. J. Bacteriol. 187:4306-4314.
- Koster, M., W. Bitter, H. de Cock, A. Allaoui, G. R. Cornelis, and J. Tommassen. 1997. The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. Mol. Microbiol. 26:789-797.
- 170. Kubori, T., Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. Lara-Tejero, A. Sukhan, J. E. Galan, and S. I. Aizawa. 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. Science 280:602-605.
- 171. **Kubori, T., A. Sukhan, S. I. Aizawa, and J. E. Galan.** 2000. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **97**:10225-10230.
- 172. Kunze, G., C. Zipfel, S. Robatzek, K. Niehaus, T. Boller, and G. Felix. 2004. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. Plant Cell **16**:3496-3507.
- 173. Lalli, G., S. Bohnert, K. Deinhardt, C. Verastegui, and G. Schiavo. 2003. The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. Trends Microbiol. 11:431-437.
- 174. Lavie, M., B. Seunes, P. Prior, and C. Boucher. 2004. Distribution and sequence analysis of a family of type III-dependent effectors correlate with the phylogeny of *Ralstonia solanacearum* strains. Mol. Plant-Microbe Interact. 17:931-940.
- 175. Lee, B. M., Y. J. Park, D. S. Park, H. W. Kang, J. G. Kim, E. S. Song, I. C. Park, U. H. Yoon, J. H. Hahn, B. S. Koo, G. B. Lee, H. Kim, H. S. Park, K. O. Yoon, J. H. Kim, C. H. Jung, N. H. Koh, J. S. Seo, and S. J. Go. 2005. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. Nucleic Acids Res. 33:577-586.
- 176. Lee, J., D. F. Klessig, and T. Nürnberger. 2001. A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene HIN1

independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. Plant Cell **13**:1079-1093.

- 177. Lee, J., B. Klüsener, G. Tsiamis, C. Stevens, C. Neyt, A. P. Tampakaki, N. J. Panopoulos, J. Noller, E. W. Weiler, G. R. Cornelis, J. W. Mansfield, and T. Nürnberger. 2001. HrpZ<sub>Psph</sub> from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:289-294.
- 178. Lee, S. H., and J. E. Galan. 2004. *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. Mol. Microbiol. **51**:483-495.
- Li, C. M., I. Brown, J. Mansfield, C. Stevens, T. Boureau, M. Romantschuk, and S. Taira. 2002. The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ. Embo J. 21:1909-1915.
- 180. Li, P., X. Lu, M. Shao, J. Long, and J. Wang. 2004. Genetic diversity of harpins from *Xanthomonas oryzae* and their activity to induce hypersensitive response and disease resistance in tobacco. Sci. China C. Life Sci. 47:461-469.
- 181. Lichter, A., I. Barash, L. Valinsky, and S. Manulis. 1995. The genes involved in cytokinin biosynthesis in *Erwinia herbicola* pv. gypsophilae: characterization and role in gall formation. J. Bacteriol. **177:**4457-4465.
- 182. Lindeberg, M., J. Stavrinides, J. H. Chang, J. R. Alfano, A. Collmer, J. L. Dangl, J. T. Greenberg, J. W. Mansfield, and D. S. Guttman. 2005. Proposed guidelines for a unified nomenclature and phylogenetic analysis of type III Hop effector proteins in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. Mol. Plant-Microbe Interact. 18:275-282.
- 183. Lindgren, P. B., R. Frederick, A. G. Govindarajan, N. J. Panopoulos, B. J. Staskawicz, and S. E. Lindow. 1989. An ice nucleation reporter gene system: identification of inducible pathogenicity genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. EMBO J. 8:1291-1301.
- 184. Lindgren, P. B., R. C. Peet, and N. J. Panopoulos. 1986. Gene-cluster of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. J. Bacteriol. **168**:512-522.
- 185. Liu, H., Y. Kang, S. Genin, M. A. Schell, and T. P. Denny. 2001. Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. Microbiology 147:3215-3229.
- Lloyd, S. A., M. Norman, R. Rosqvist, and H. Wolf-Watz. 2001. Yersinia YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA signals. Mol. Microbiol. 39:520-532.
- 187. Lloyd, S. A., M. Sjostrom, S. Andersson, and H. Wolf-Watz. 2002. Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences. Mol. Microbiol. **43:**51-59.
- 188. Lopez-Solanilla, E., P. A. Bronstein, A. R. Schneider, and A. Collmer. 2004. HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions. Mol. Microbiol. **54**:353-365.
- 189. **Makino, S., A. Sugio, F. White, and A. J. Bogdanove.** 2006. Inhibition of resistance gene-mediated defense in rice by *Xanthomonas oryzae* pv. oryzicola. Mol. Plant-Microbe Interact. **19:**240-249.
- 190. Mann, M., and O. N. Jensen. 2003. Proteomic analysis of post-translational modifications. Nat. Biotechnol. 21:255-261.
- 191. **Manulis, S., A. Haviv-Chesner, M. T. Brandl, S. E. Lindow, and I. Barash.** 1998. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in

pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. Mol. Plant-Microbe Interact. **11:**634-642.

- 192. Marenda, M., B. Brito, D. Callard, S. Genin, P. Barberis, C. Boucher, and M. Arlat. 1998. PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of genes in the presence of plant cells. Mol. Microbiol. 27:437-453.
- 193. **Marois, E., G. Van den Ackerveken, and U. Bonas.** 2002. The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. Mol. Plant-Microbe Interact. **15:**637-646.
- 194. **Maurer-Stroh, S., and F. Eisenhaber.** 2004. Myristoylation of viral and bacterial proteins. Trends Microbiol. **12:**178-185.
- 195. **Melchior, F.** 2000. Sumo nonclassical ubiquitin. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **16:**591-626.
- 196. Metz, M., D. Dahlbeck, C. Q. Morales, B. Al Sady, E. T. Clark, and B. J. Staskawicz. 2005. The conserved *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in *Nicotiana benthamiana*. Plant J. 41:801-814.
- 197. Meyer, A., A. Pühler, and K. Niehaus. 2001. The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. Planta **213**:214-222.
- 198. **Minamino, T., and R. M. MacNab.** 2000. FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. Mol. Microbiol. **37:**1494-1503.
- 199. Minsavage, G. V., D. Dahlbeck, M. C. Whalen, B. Kearny, U. Bonas, B. J. Staskawicz, and R. E. Stall. 1990. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* pepper interactions. Mol. Plant-Microbe Interact. 3:41-47.
- 200. Monteiro-Vitorello, C. B., M. C. de Oliveira, M. M. Zerillo, A. M. Varani, E. Civerolo, and M. A. Van Sluys. 2005. *Xylella* and *Xanthomonas* Mobil'omics. Omics 9:146-159.
- 201. Morales, C. Q., J. Posada, E. Macneale, D. Franklin, I. Rivas, M. Bravo, J. Minsavage, R. E. Stall, and M. C. Whalen. 2005. Functional analysis of the early chlorosis factor gene. Mol. Plant-Microbe Interact. 18:477-486.
- 202. Moran, N. A. 2003. Tracing the evolution of gene loss in obligate bacterial symbionts. Current Opinion in Microbiology 6:512–518.
- 203. Mori, H., and K. Cline. 2002. A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid ΔpH/Tat translocase. J. Cell Biol. 157:205-210.
- 204. **Mudgett, M. B.** 2005. New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. Annu. Rev. Plant Biol. **56:**509-531.
- 205. Mudgett, M. B., O. Chesnokova, D. Dahlbeck, E. T. Clark, U. Bonas, and B. J. Staskawicz. 2000. Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13324-13329.
- 206. Nemhauser, J. L., and J. Chory. 2005. A new FronTIR in targeted protein degradation and plant development. Cell 121:970-972.
- 207. Newman, M. A., M. J. Daniels, and J. M. Dow. 1997. The activity of lipid A and core components of bacterial lipopolysaccharides in the prevention of the hypersensitive response in pepper. Mol. Plant-Microbe Interact. 10:926-928.
- 208. Newman, M. A., M. J. Daniels, and J. M. Dow. 1995. Lipopolysaccharide from *Xanthomonas campestris* induces defense-related gene expression in *Brassica campestris*. Mol. Plant-Microbe Interact. 8:778-780.

- 209. Newman, M.-A., E. von Roepenack, M. Daniels, and M. Dow. 2000. Lipopolysaccharides and plant responses to phytopathogenic bacteria. Mol. Plant Pathol. 1:25-31.
- Newman, M. A., E. von Roepenack-Lahaye, A. Parr, M. J. Daniels, and J. M. Dow. 2002. Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. Plant J. 29:487-495.
- 211. Niemann, H. H., W. D. Schubert, and D. W. Heinz. 2004. Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. Microbes Infect. 6:101-112.
- 212. Niepold, F., D. Anderson, and D. Mills. 1985. Cloning determinants of pathogenesis from *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:406-410.
- 213. Nimchuk, Z., E. Marois, S. Kjemtrup, R. T. Leister, F. Katagiri, and J. L. Dangl. 2000. Eukaryotic fatty acylation drives plasma membrane targeting and enhances function of several type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*. Cell 101:353-363.
- 214. Nishiyama, M., R. Horst, O. Eidam, T. Herrmann, O. Ignatov, M. Vetsch, P. Bettendorff, I. Jelesarov, M. G. Grutter, K. Wuthrich, R. Glockshuber, and G. Capitani. 2005. Structural basis of chaperone-subunit complex recognition by the type 1 pilus assembly platform FimD. Embo J. 24:2075-2086.
- 215. **Noël, L.** 2001. Utilisation de la technique de cDNA-AFLP pour l'étude d'un transcriptome procaryote: Identification et caractérisation du régulon *hrp* chez *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Ph.D. thesis. L'UNVERSITÉ PARIS XI ORSAY, Paris.
- 216. Noël, L., F. Thieme, J. Gäbler, D. Büttner, and U. Bonas. 2003. XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. J. Bacteriol. 185:7092-102.
- 217. Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel, and U. Bonas. 2001. cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Mol. Microbiol. **41**:1271-1281.
- 218. **Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel, and U. Bonas.** 2002. Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria are encoded within the *hrp* pathogenicity island. J. Bacteriol. **184:**1340-1348.
- 219. Nomura, K., M. Melotto, and S. Y. He. 2005. Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. Curr. Opin. Plant Biol. 8:361-368.
- Nürnberger, T., F. Brunner, B. Kemmerling, and L. Piater. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. Immunol. Rev. 198:249-266.
- 221. Nyhan, W. L. 2005. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. Mol. Genet. Metab. 86:25-33.
- 222. Occhialini, A., S. Cunnac, N. Reymond, S. Genin, and C. Boucher. 2005. Genomewide analysis of gene expression in *Ralstonia solanacearum* reveals that the *hrpB* gene acts as a regulatory switch controlling multiple virulence pathways. Mol. Plant-Microbe Interact. **18**:938-949.
- 223. Ochiai, H., Y. Inoue, M. Takeya, A. Sasaki, and H. Kaku. 2005. Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests contribution of large numbers of effector genes and insertion sequences to its race diversity. Japan Agricultural Research Quarterly **39**:275-287.
- 224. Ochsner, U. A., A. Snyder, A. I. Vasil, and M. L. Vasil. 2002. Effects of the twinarginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 99:8312-8317.

- 225. Ojanen-Reuhs, T., N. Kalkkinen, B. Westerlund-Wikstrom, J. van Doorn, K. Haahtela, E. L. Nurmiaho-Lassila, K. Wengelnik, U. Bonas, and T. K. Korhonen. 1997. Characterization of the *fimA* gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*. J. Bacteriol. **179**:1280-1290.
- 226. Orth, K., Z. Xu, M. B. Mudgett, Z. Q. Bao, L. E. Palmer, J. B. Bliska, W. F. Mangel, B. Staskawicz, and J. E. Dixon. 2000. Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, ubiquitin-like protein protease. Science **290**:1594-1597.
- 227. **Patil, P. B., and R. V. Sonti.** 2004. Variation suggestive of horizontal gene transfer at a lipopolysaccharide (*lps*) biosynthetic locus in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen of rice. BMC Microbiol. **4:**40.
- 228. Petnicki-Ocwieja, T., D. J. Schneider, V. C. Tam, S. T. Chancey, L. Shan, Y. Jamir, L. M. Schechter, M. D. Janes, C. R. Buell, X. Tang, A. Collmer, and J. R. Alfano. 2002. Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:7652-7657.
- 229. Pitman, A. R., R. W. Jackson, J. W. Mansfield, V. Kaitell, R. Thwaites, and D. L. Arnold. 2005. Exposure to host resistance mechanisms drives evolution of bacterial virulence in plants. Curr. Biol. 15:2230-2235.
- 230. **Poplawsky, A. R., and W. Chun.** 1997. *pigB* determines a diffusible factor needed for extracellular polysaccharide slime and xanthomonadin production in *Xanthomonas campestris* pv. campestris. J. Bacteriol. **179:**439-444.
- 231. **Poplawsky, A. R., and W. Chun.** 1998. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* requires a functional *pigB* for epiphytic survival and host infection. Mol. Plant-Microbe Interact. **11:**466-475.
- 232. Pozidis, C., A. Chalkiadaki, A. Gomez-Serrano, H. Stahlberg, I. Brown, A. P. Tampakaki, A. Lustig, G. Sianidis, A. S. Politou, A. Engel, N. J. Panopoulos, J. Mansfield, A. P. Pugsley, S. Karamanou, and A. Economou. 2003. Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. J. Biol. Chem. 278:25816-25824.
- 233. Qian, W., Y. Jia, S. X. Ren, Y. Q. He, J. X. Feng, L. F. Lu, Q. Sun, G. Ying, D. J. Tang, H. Tang, W. Wu, P. Hao, L. Wang, B. L. Jiang, S. Zeng, W. Y. Gu, G. Lu, L. Rong, Y. Tian, Z. Yao, G. Fu, B. Chen, R. Fang, B. Qiang, Z. Chen, G. P. Zhao, J. L. Tang, and C. He. 2005. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Genome Res. 15:757-767.
- 234. Racape, J., L. Belbahri, S. Engelhardt, B. Lacombe, J. Lee, J. Lochman, A. Marais, M. Nicole, T. Nürnberger, F. Parlange, S. Puverel, and H. Keller. 2005. Ca2+-dependent lipid binding and membrane integration of PopA, a harpin-like elicitor of the hypersensitive response in tobacco. Mol. Microbiol. **58**:1406-1420.
- 235. Rahme, L. G., M. N. Mindrinos, and N. J. Panopoulos. 1992. Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. J. Bacteriol. **174:**3499-3507.
- 236. **Ramamurthi, K. S., and O. Schneewind.** 2003. Substrate recognition by the *Yersinia* type III protein secretion machinery. Mol. Microbiol. **50**:1095-1102.
- 237. **Ramamurthi, K. S., and O. Schneewind.** 2002. *Yersinia* enterocolitica type III secretion: mutational analysis of the *yopQ* secretion signal. J. Bacteriol. **184**:3321-3328.
- 238. **Ramamurthi, K. S., and O. Schneewind.** 2003. *Yersinia yopQ* mRNA encodes a bipartite type III secretion signal in the first 15 codons. Mol. Microbiol. **50:**1189-1198.
- 239. Rawlings, N. D., D. P. Tolle, and A. J. Barrett. 2004. MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Res. 32:D160-164.

- 240. **Ray, S. K., R. Rajeshwari, Y. Sharma, and R. V. Sonti.** 2002. A high-molecularweight outer membrane protein of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* exhibits similarity to non-fimbrial adhesins of animal pathogenic bacteria and is required for optimum virulence. Mol. Microbiol. **46:**637-647.
- 241. **Rigoni, M., P. Caccin, E. A. Johnson, C. Montecucco, and O. Rossetto.** 2001. Sitedirected mutagenesis identifies active-site residues of the light chain of botulinum neurotoxin type A. Biochem. Biophys. Res. Commun. **288**:1231-1237.
- 242. **Rivas, L. A., J. Mansfield, G. Tsiamis, R. W. Jackson, and J. Murillo.** 2005. Changes in race-specific virulence in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola are associated with a chimeric transposable element and rare deletion events in a plasmid-borne pathogenicity island. Appl. Environ. Microbiol. **71:**3778-3785.
- 243. Robert-Seilaniantz, A., L. Shan, J.-M. Zhou, and X. Tang. 2006. The *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 type III effector HopF2 has a putative myristoylation site required for its avirulence and virulence functions. Mol. Plant-Microbe Interact. **19:**130-138.
- 244. **Robinson, C., and A. Bolhuis.** 2001. Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **2:**350-356.
- 245. Roden, J., L. Eardley, A. Hotson, Y. Cao, and M. B. Mudgett. 2004. Characterization of the *Xanthomonas* AvrXv4 effector, a SUMO protease translocated into plant cells. Mol. Plant-Microbe Interact. **17**:633-643.
- 246. Roden, J. A., B. Belt, J. B. Ross, T. Tachibana, J. Vargas, and M. B. Mudgett. 2004. A genetic screen to isolate type III effectors translocated into pepper cells during *Xanthomonas* infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 101:16624-16629.
- 247. Rohmer, L., D. S. Guttman, and J. L. Dangl. 2004. Diverse evolutionary mechanisms shape the type III effector virulence factor repertoire in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. Genetics 167:1341-1360.
- 248. Roine, E., D. M. Raineri, M. Romantschuk, M. Wilson, and D. N. Nunn. 1998. Characterization of type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Mol. Plant-Microbe Interact. 11:1048-1056.
- 249. Roine, E., W. S. Wei, J. Yuan, E. L. Nurmiaho-Lassila, N. Kalkkinen, M. Romantschuk, and S. Y. He. 1997. Hrp pilus: A *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3459-3464.
- 250. **Rojas, C. M., J. H. Ham, W. L. Deng, J. J. Doyle, and A. Collmer.** 2002. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **99:**13142-13147.
- 251. Ronald, P. C., and B. J. Staskawicz. 1988. The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes a 50-kDa protein. Mol. Plant-Microbe Interact. 1:191–198.
- 252. **Rossier, O., and N. P. Cianciotto.** 2005. The *Legionella pneumophila tatB* gene facilitates secretion of phospholipase C, growth under iron-limiting conditions, and intracellular infection. Infect. Immun. **73:**2020-2032.
- 253. **Rossier, O., G. Van den Ackerveken, and U. Bonas.** 2000. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. Mol. Microbiol. **38**:828-838.
- 254. Rossier, O., K. Wengelnik, K. Hahn, and U. Bonas. 1999. The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9368-9373.

- 255. Royer, M., L. Costet, E. Vivien, M. Bes, A. Cousin, A. Damais, I. Pieretti, A. Savin, S. Megessier, M. Viard, R. Frutos, D. W. Gabriel, and P. C. Rott. 2004. Albicidin pathotoxin produced by *Xanthomonas albilineans* is encoded by three large PKS and NRPS genes present in a gene cluster also containing several putative modifying, regulatory, and resistance genes. Mol. Plant-Microbe Interact. 17:414-427.
- 256. Sandkvist, M. 2001. Biology of type II secretion. Mol. Microbiol. 40:271-283.
- 257. Sandkvist, M. 2001. Type II secretion and pathogenesis. Infect. Immun. 69:3523-3535.
- 258. Sauer, F. G., H. Remaut, S. J. Hultgren, and G. Waksman. 2004. Fiber assembly by the chaperone-usher pathway. Biochim. Biophys. Acta 1694:259-267.
- 259. Schechter, L. M., K. A. Roberts, Y. Jamir, J. R. Alfano, and A. Collmer. 2004. *Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a Cya translocation reporter. J. Bacteriol. **186**:543-555.
- Schesser, K., E. Frithz-Lindsten, and H. Wolf-Watz. 1996. Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes. J. Bacteriol. 178:7227-7233.
- 261. Schoonejans, E., D. Expert, and A. Toussaint. 1987. Characterization and virulence properties of *Erwinia chrysantemi* lipopolysaccharide-deficient φEC2-resistant mutants. J. Bacteriol. **169:**4011-4017.
- 262. Schulte, R., and U. Bonas. 1992. Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. J. Bacteriol. **174:**815-823.
- 263. Schulte, R., and U. Bonas. 1992. A *Xanthomonas* pathogenicity locus is induced by sucrose and sulfur-containing amino-acids. Plant Cell **4**:79-86.
- 264. Shan, L., V. K. Thara, G. B. Martin, J.-M. Zhou, and X. Tang. 2000. The *Pseudomonas* AvrPto protein is differentially recognized by tomato and tobacco and is localized to the plant plasma membrane. Plant Cell 12:2323–2337.
- 265. Shen, Y., P. Sharma, F. G. da Silva, and P. Ronald. 2002. The *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae raxP* and *raxQ* genes encode an ATP sulphurylase and adenosine-5'-phosphosulphate kinase that are required for AvrXa21 avirulence activity. Mol. Microbiol. 44:37-48.
- 266. Smadja, B., X. Latour, D. Faure, S. Chevalier, Y. Dessaux, and N. Orange. 2004. Involvement of N-acylhomoserine lactones throughout plant infection by *Erwinia* carotovora subsp. atroseptica (Pectobacterium atrosepticum). Mol. Plant-Microbe Interact. 17:1269-1278.
- 267. Sorg, J. A., N. C. Miller, and O. Schneewind. 2005. Substrate recognition of type III secretion machines -testing the RNA signal hypothesis. Cell. Microbiol. 7:1217-1225.
- 268. Sory, M. P., A. Boland, I. Lambermont, and G. R. Cornelis. 1995. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11998-12002.
- 269. Sory, M. P., and G. R. Cornelis. 1994. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. Mol. Microbiol. 14:583-594.
- 270. Subtil, A., C. Parsot, and A. Dautry-Varsat. 2001. Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. Mol. Microbiol. **39**:792-800.
- 271. Swings, J. G., and E. L. Civerolo. 1993. *Xanthomonas*, vol. 1. Chapman & Hall, London.
- 272. Swords, K. M., D. Dahlbeck, B. Kearney, M. Roy, and B. J. Staskawicz. 1996. Spontaneous and induced mutations in a single open reading frame alter both

virulence and avirulence in *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria *avrBs2*. J. Bacteriol. **178**:4661-4669.

- 273. Szurek, B., E. Marois, U. Bonas, and G. Van den Ackerveken. 2001. Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. Plant J. 26:523-534.
- 274. Szurek, B., O. Rossier, G. Hause, and U. Bonas. 2002. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. Mol. Microbiol. **46:**13-23.
- 275. Tamano, K., S. Aizawa, E. Katayama, T. Nonaka, S. Imajoh-Ohmi, A. Kuwae, S. Nagai, and C. Sasakawa. 2000. Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. Embo J. 19:3876-3887.
- Tampakaki, A. P., V. E. Fadouloglou, A. D. Gazi, N. J. Panopoulos, and M. Kokkinidis. 2004. Conserved features of type III secretion. Cell. Microbiol. 6:805-816.
- 277. **Tans-Kersten, J., D. Brown, and C. Allen.** 2004. Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by FlhDC and the plant host environment. Mol. Plant-Microbe Interact. **17:**686-695.
- 278. Tans-Kersten, J., H. Huang, and C. Allen. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. J. Bacteriol. **183**:3597-3605.
- 279. **Thanassi, D. G., C. Stathopoulos, A. Karkal, and H. Li.** 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.
- 280. Toth, I. K., and P. R. Birch. 2005. Rotting softly and stealthily. Curr. Opin. Plant Biol. 8:424-429.
- 281. **Troisfontaines, P., and G. R. Cornelis.** 2005. Type III secretion: more systems than you think. Physiology (Bethesda) **20**:326-339.
- 282. Tsiamis, G., J. W. Mansfield, R. Hockenhull, R. W. Jackson, A. Sesma, E. Athanassopoulos, M. A. Bennett, C. Stevens, A. Vivian, J. D. Taylor, and J. Murillo. 2000. Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrPphF* in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease. EMBO J. 19:3204-3214.
- 283. Tsuge, S., S. Terashima, A. Furutani, H. Ochiai, T. Oku, K. Tsuno, H. Kaku, and Y. Kubo. 2005. Effects on promoter activity of base substitutions in the *cis*-acting regulatory element of HrpXo regulons in *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae. J. Bacteriol. 187:2308-2314.
- 284. **Tu, Q., and D. Ding.** 2003. Detecting pathogenicity islands and anomalous gene clusters by iterative discriminant analysis. FEMS Microbiol. Lett. **221**:269-275.
- 285. Van den Ackerveken, G., E. Marois, and U. Bonas. 1996. Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. Cell 87:1307-1316.
- van Doorn, J., P. M. Boonekamp, and B. Oudega. 1994. Partial characterization of fimbriae of *Xanthomonas campestris* pv. *hyacinthi*. Mol. Plant-Microbe Interact. 7:334-344.
- 287. van Wely, K. H., J. Swaving, R. Freudl, and A. J. Driessen. 2001. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 25:437-454.
- 288. Vauterin, L., J. Rademaker, and J. Swings. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. Phytopathology **90:**677-682.

- 289. Verger, A., J. Perdomo, and M. Crossley. 2003. Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. EMBO Rep. 4:137-142.
- 290. Von Bodman, S. B., W. D. Bauer, and D. L. Coplin. 2003. Quorum sensing in plantpathogenic bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 41:455-482.
- 291. Voulhoux, R., G. Ball, B. Ize, M. L. Vasil, A. Lazdunski, L. F. Wu, and A. Filloux. 2001. Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. Embo J. 20:6735-6741.
- 292. Wang, G. L., W. Y. Song, D. L. Ruan, S. Sideris, and P. C. Ronald. 1996. The cloned gene, *Xa21*, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates in transgenic plants. Mol. Plant-Microbe Interact. **9:**850-855.
- 293. Wang, L. H., Y. He, Y. Gao, J. E. Wu, Y. H. Dong, C. He, S. X. Wang, L. X. Weng, J. L. Xu, L. Tay, R. X. Fang, and L. H. Zhang. 2004. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. Mol. Microbiol. 51:903-912.
- 294. Wattiau, P., S. Woestyn, and G. R. Cornelis. 1996. Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. Mol. Microbiol. 20:255-262.
- 295. Weber, E., and R. Koebnik. 2006. Positive selection of the Hrp pilin HrpE of the plant pathogen *Xanthomonas*. J. Bacteriol. **188**:1405-1410.
- 296. Weber, E., T. Ojanen-Reuhs, E. Huguet, G. Hause, M. Romantschuk, T. K. Korhonen, U. Bonas, and R. Koebnik. 2005. The type III-dependent Hrp pilus is required for productive interaction of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria with pepper host plants. J. Bacteriol. 187:2458-2468.
- 297. Wei, C. F., W. L. Deng, and H. C. Huang. 2005. A chaperone-like HrpG protein acts as a suppressor of HrpV in regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* type III secretion system. Mol. Microbiol. **57:**520-536.
- 298. Wei, W., A. Plovanich-Jones, W. L. Deng, Q. L. Jin, A. Collmer, H. C. Huang, and S. Y. He. 2000. The gene coding for the Hrp pilus structural protein is required for type III secretion of Hrp and Avr proteins in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:2247-2252.
- 299. Wei, Z. M., R. J. Laby, C. H. Zumoff, D. W. Bauer, S. Y. He, A. Collmer, and S. V. Beer. 1992. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. Science 257:85-88.
- 300. Wei, Z. M., B. J. Sneath, and S. V. Beer. 1992. Expression of *Erwinia amylovora hrp* genes in response to environmental stimuli. J. Bacteriol. 174:1875-1882.
- 301. Wengelnik, K., and U. Bonas. 1996. HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. J. Bacteriol. **178**:3462-3469.
- 302. Wengelnik, K., C. Marie, M. Russel, and U. Bonas. 1996. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. J. Bacteriol. **178**:1061-1069.
- 303. Wengelnik, K., O. Rossier, and U. Bonas. 1999. Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria result in constitutive expression of all *hrp* genes. J. Bacteriol. 181:6828-6831.
- 304. Wengelnik, K., G. Van den Ackerveken, and U. Bonas. 1996. HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. Mol. Plant-Microbe Interact. 9:704-712.
- 305. Whalen, M. C., J. F. Wang, F. M. Carland, M. E. Heiskell, D. Dahlbeck, G. V. Minsavage, J. B. Jones, J. W. Scott, R. E. Stall, and B. J. Staskawicz. 1993. Avirulence gene avrRxv from Xanthomonas campestris pv. vesicatoria specifies resistance on tomato line Hawaii 7998. Mol. Plant-Microbe Interact. 6:616-627.

- 306. Wichmann, G., and J. Bergelson. 2004. Effector genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* promote transmission and enhance other fitness traits in the field. Genetics 166:693-706.
- 307. Willems, A. R., M. Schwab, and M. Tyers. 2004. A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. Biochim. Biophys. Acta **1695**:133-170.
- 308. Xiao, Y., S. Heu, J. Yi, Y. Lu, and S. W. Hutcheson. 1994. Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. J. Bacteriol. **176**:1025-1036.
- 309. Xiao, Y., and S. W. Hutcheson. 1994. A single promoter sequence recognized by a newly identified alternate sigma factor directs expression of pathogenicity and host range determinants in *Pseudomonas syringae*. J. Bacteriol. **176**:3089-3091.
- 310. Xiao, Y., Y. Lu, S. Heu, and S. W. Hutcheson. 1992. Organization and environmental regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. syringae 61 *hrp* cluster. J. Bacteriol. **174**:1734-1741.
- 311. Yahr, T. L., and W. T. Wickner. 2001. Functional reconstitution of bacterial Tat translocation *in vitro*. Embo J. 20:2472-2479.
- 312. Yang, B., and F. F. White. 2004. Diverse members of the AvrBs3/PthA family of type III effectors are major virulence determinants in bacterial blight disease of rice. Mol. Plant-Microbe Interact. 17:1192-1200.
- 313. Yang, Y. N., R. De Feyter, and D. W. Gabriel. 1994. Host-specific symptoms and increased release of *Xanthomonas citri* and *X. campestris* pv. *malvacearum* from leaves are determined by the 102-bp tandem repeats of *pthA* and *avrb6*, respectively. Mol. Plant-Microbe Interact. **7:**345-355.
- 314. Yap, M. N., J. D. Barak, and A. O. Charkowski. 2004. Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence. Appl. Environ. Microbiol. **70**:3013-3023.
- 315. Yates, S. P., R. Jorgensen, G. R. Andersen, and A. R. Merrill. 2006. Stealth and mimicry by deadly bacterial toxins. Trends Biochem. Sci. 31:123-133.
- 316. Young, B. M., and G. M. Young. 2002. YplA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*. J. Bacteriol. **184:**1324-1334.
- 317. Young, G. M., D. H. Schmiel, and V. L. Miller. 1999. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 96:6456-6461.
- 318. Yu, J., A. Penaloza-Vazquez, A. M. Chakrabarty, and C. L. Bender. 1999. Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Mol. Microbiol. **33**:712-720.
- 319. Zamboni, D. S., S. McGrath, M. Rabinovitch, and C. R. Roy. 2003. Coxiella burnetii express type IV secretion system proteins that function similarly to components of the Legionella pneumophila Dot/Icm system. Mol. Microbiol. 49:965-976.
- 320. Zhao, Y., R. Thilmony, C. L. Bender, A. Schaller, S. Y. He, and G. A. Howe. 2003. Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. Plant J. 36:485-499.
- 321. Zhu, K., B. Gonzalez-Pedrajo, and R. M. Macnab. 2002. Interactions among membrane and soluble components of the flagellar export apparatus of *Salmonella*. Biochemistry **41**:9516-9524.
- 322. Zhu, W. G., M. M. Magbanua, and F. F. White. 2000. Identification of two novel *hrp*-associated genes in the *hrp* gene cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae. J. Bacteriol. **182**:1844-1853.

323. Zwiesler-Vollick, J., A. Plovanich-Jones, K. Nomura, S. Bandyopadhyay, V. Joardar, B. N. Kunkel, and S. Y. He. 2002. Identification of novel *hrp*-regulated genes through functional genomic analysis of the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 genome. Mol. Microbiology. **45**:1207-1218.



## Anhang 1: Konstruktion von pL6GW356

Anhang - Abbildung 1: Konstruktion des GATEWAY-Destination-Vektors pL6GW356 (216).

(A) Als Ausgangspunkt der Klonierungen diente das pBLUESCRIPT-Derivat pBS356 (273), welches *avrBs3* $\Delta 2$  (grün unterlegter Bereich) enthält. Zur besseren Übersicht wurde nur Teile der Sequenz gezeigt, die die "multiple cloning site" und den Beginn und das Ende der *avrBs3* $\Delta 2$  CDS enthalten. (B) Die GATEWAY-*att*R-Kassette, welche eine Chloramphenicolresistenz- (Cm<sup>r</sup>) und ein *ccdB*-Toxin-Gen zur Selektion enthält, wurde "blunt end" in die *Sma*I-Restriktionsschnittstelle von pBS356 kloniert (GATEWAY conversion system, Invitrogen, Karlsruhe). (C) Der GATEWAY-Destination-Vektor pL6GW356 wurde durch das Klonieren des *XbaI/Hin*dIII-Restriktionsfragments aus dem so entstandenen Vektor in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen von pLAFR6 (Darstellung nicht maßstabsgetreu) erzeugt. pL6GW356 ermöglicht die translationale Fusion von N-Termini möglicher Effektoren an *avrBs3* $\Delta 2$  mittels GATEWAY-Rekombination (Invitrogen, Karlsruhe). Die Konstrukte stehen dabei unter Kontrolle des Promotors des jeweiligen Kandidatengens.

# Anhang 2: "Supplementary Tables" zum Artikel unter 2.1.1.

#### **SUPPLEMENTARY TABLE 1:**

Distribution of IS elements between X. campestris pv. vesicatoria (Xcv), X. axonopodis pv. citri (Xac) and X. campestris pv. campestris (Xcc)

Family	Туре	Xcv		Xac		Хсс
		chromosome	plasmids	chromosome	plasmids	chromosome
IS3	IS1389			1		
IS3	IS1404		1			6
IS3	IS476 / IS1477	18	2			6
IS3	ISD1					1
IS3	ISXac2	4	1	5	3	
IS3	ISXac3	14	2	19	1	9
IS3	ISXac4			2		
IS3	ISXcc1	6				5
IS3	ISXcd1			2		
IS4	IS1481					11
IS4	ISXac1			8	1	
IS5	IS1478	3		1		16
IS5	IS1479 / IS1646	5	2	1		8
IS5	IS1480					6
IS6	IS6100	4				
	Others	4				1
	Sum:	58	8	38	4	69
	Total:		66		42	69

Family membership, type and numbers of IS elements are given for the chromosomes and plasmids of the three xanthomonads. Numbers for *X. axonopodis* pv. citri and *X. campestris* pv. campestris are derived from the data on http://cancer.lbi.ic.unicamp.br/xanthomonas/ and confirmed with the genome sequence data in GenBank.

#### **SUPPLEMENTARY TABLE 2:**

Comparison of the putative type IV-secretion system proteins on the *X. campestris* pv. vesicatoria plasmid pXCV183 to components of the Tra and Icm/Dot system

X. campestris	Legionella pneumophila	Coxiella burnetii	Nearest Tra homolog
pv. vesicatoria			
pXCV183			
DotA-like	DotA (1012 aa);	DotA (806 aa);	IraY (721 aa); <i>E. coli</i> ;
	GB:AAP75481;	GB:AAO91144; Identities = 186/805 (229/)	GB:AA194219; Identities = 170/705 (25%) Resitives = 170/705
aa); XCV00027	(27%) Positivos –	= 180/805 (23%), Positivos = 310/805	179/705 (25%), POSILIVES = 285/705 (40%), Gaps =
	(27%), FOSILIVES - 157/339 (46%) Cape -	(30%) Gaps = 120/805	205/705 (40%), Gaps =
	38/339 (11%)	(16%)	112/103 (13/0)
DotB-like	DotB (387 aa):	DotB (372 aa):	TraJ (385 aa): Serratia
protein (398	GB:AAU28734;	GB:AAO91141; Identities	entomophila; GB:AAR13113;
aa); XCVd0007	Identities = 158/361	= 161/356 (45%),	Identities = 116/362 (32%),
	(43%), Positives =	Positives = 216/356	Positives = 190/362 (52%),
	223/361 (61%), Gaps =	(60%), Gaps = 4/356 (1%)	Gaps = 19/362 (5%)
	4/361 (1%)		
DotC-like	DotC (303 aa);	DotC (274 aa);	Tral (259 aa); Erwinia
protein (259	GB:AAC38180;	GB:AAO91140; Identities	amylovora; GB:AAQ97918;
aa); XCVd0006	Identities = $87/214$	= 95/219 (43%), Positives	Identities = $77/218(35\%)$ ,
	(40%), POSILIVES = 130/214 (64%) Cape =	= 130/219 (59%), Gaps = 18/210 (3%)	POSILIVES = 117218 (53%), Gaps = 3/218 (1%)
	2/214 (0%), Gaps =	0/219 (376)	Gaps – 5/210 (176)
DotD-like	DotD (163 aa):	DotD (155 aa):	No significant similarity
protein (164	GB:AAC38179:	GB:AAO91139: Identities	ite eigineant einnanty
aa); XCVd0005	Identities = $41/155$	= 36/127 (28%), Positives	
	(26%), Positives =	= 69/127 (54%), Gaps =	
	83/155 (53%), Gaps =	5/127 (3%)	
	11/155 (7%)		
IcmB-like	IcmB (1009 aa);	IcmB (1003 aa);	TraU (1014 aa);
protein (1015	GB:AAS91896;		Citronobacter freundii;
aa); XCV00162	(42%) Desitives =	= 399/999 (39%),	GB:AAN87691; Identities = 280(080(28%)) Depitives = 280(280(28%)) Depitives = 280(280(28%)) Depitives = 280(28%)) Depitives = 280(28%)) Depitives = 280(28%) Depitives = 280(28%)) Depitives = 280
	(42%), FOSILIVES - 602/984 (61%) Gaps = -	(59%) Gaps = 5/999 (0%)	250/900 (26%), FUSIIVES = 456/980 (46%), Gaps = 100000000000000000000000000000000000
	5/984 (0%)		50/980 (5%)
IcmC-like	IcmC (194 aa);	IcmC (169 aa);	No significant similarity
protein (176	GB:AÀS91916;	GB:AAO91121; Identities	, s
aa); XCVd0166	Identities = 39/175	= 31/162 (19%), Positives	
	(22%), Positives =	= 76/162 (46%), Gaps =	
	71/175 (40%), Gaps =	18/162 (11%)	
	11/175 (6%)		
NO SIGNIFICANT	ICMD	ICMU	No significant similarity
IcmE-like	IcmE (1048 aa);	IcmE (1034 aa):	TraL (381 aa): Sinorhizobium
protein (415	GB:AAU26548;	GB:AAO91123; Identities	<i>meliloti</i> ;GB:CAC79171;
aa); XCVd0168	Identities = 79/292	= 86/325 (26%), Positives	Identities = 90/392 (22%),
-	(27%), Positives =	= 139/325 (42%), Gaps =	Positives = 144/392 (36%),
	127/292 (43%), Gaps =	26/325 (8%)	Gaps = 56/392 (14%)
	18/292 (6%)		
IcmG-like	IcmG (268 aa);	IcmG (261 aa);	No significant similarity
protein (273	GB:AAS91952;	GB:AAO91122; Identities	
aa), ACVUU107	(22%) Positivos -	-30/100 (23%), POSITIVES	
	(22.0), 100  (0.000 - 0.000 - 0.000 - 0.000 - 0.0000- 0.0000 - 0.0000 - 0.0000- 0.0000- 0.0000 - 0.0000 - 0	= 00/100 (40 %), Gaps =	
	16/163 (9%)		
No significant	IcmF	No significant similarity	No significant similarity
similarity			

<i>X. campestris</i> pv. vesicatoria pXCV183	Legionella pneumophila	Coxiella burnetii	Nearest Tra homolog
IcmJ-like protein (250 aa); XCVd0164	IcmJ (208 aa); GB:AAS91970; Identities = 58/217 (26%), Positives = 82/217 (37%), Gaps = 29/217 (13%)	IcmJ (212 aa); GB:AAO91119; Identities = 32/86 (37%), Positives = 45/86 (52%), Gaps = 4/86 (4%)	No significant similarity
IcmK-like protein (313 aa); XCVd0169	IcmK (360 aa); GB:AAS91981; Identities = 104/295 (35%), Positives = 160/295 (54%), Gaps = 12/295 (4%)	IcmK (344 aa) GB:AAO91124; Identities = 97/258 (37%), Positives = 141/258 (54%), Gaps = 9/258 (3%)	TraN (352 aa); <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000; GB:AAO59076; Identities = 90/309 (29%), Positives = 150/309 (48%), Gaps = 24/309 (7%)
IcmL-like protein (277 aa); XCVd0170	IcmL (212 aa); GB:AAS92002; Identities = 62/201 (30%), Positives = 97/201 (48%), Gaps = 4/201 (1%)	IcmL (218 aa); GB:AAO91125; Identities = 50/204 (24%), Positives = 96/204 (47%), Gaps = 4/204 (1%)	TraM (230 aa); <i>E. coli</i> ; GB:BAA75159; Identities = 41/145 (28%), Positives = 75/145 (51%), Gaps = 6/145 (4%)
IcmO-like protein (855 aa); XCVd0043	IcmO (783 aa); GB:AAU26543; Identities = 253/601 (42%), Positives = 359/601 (59%), Gaps = 13/601 (2%)	IcmO (792 aa); GB:AAO91128; Identities = 255/593 (43%), Positives = 364/593 (61%), Gaps = 14/593 (2%)	TrbC (762 aa); <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000; Identities = 182/605 (30%), Positives = 296/605 (48%), Gaps = 26/605 (4%)
IcmP-like protein (383 aa); XCVd0041	IcmP (365 aa); GB:AAS92046; Identities = 96/374 (25%), Positives = 169/374 (45%), Gaps = 23/374 (6%)	IcmP (387 aa); GB:AAO91129; Identities = 95/384 (24%), Positives = 176/384 (45%), Gaps = 46/384 (11%)	TrbA (423 aa); <i>E. coli</i> ; GB:AAQ17648; Identities = 74/290 (25%), Positives = 124/290 (42%), Gaps = 32/290 (11%)
No significant similarity	IcmQ	IcmQ	No significant similarity
No significant similarity	IcmR	No significant similarity	No significant similarity
No significant similarity	IcmS	IcmS	No significant similarity
IcmT-like protein (93 aa); XCVd0008	IcmT (85 aa); GB:AAP46693; Identities = 28/81 (34%), Positives = 47/81 (58%), Gaps = 2/81 (2%)	IcmT (85 aa); GB:AAO91137; Identities = 20/77 (25%), Positives = 43/77 (55%), Gaps = 0/77 (0%)	TraK (96 aa); <i>E. coli</i> ; GB:AAT94204; Identities = 22/64 (34%), Positives = 34/64 (53%), Gaps = 0/77 (0%)
No significant	IcmV	IcmV	No significant similarity
similarity			
No significant similarity		ICmW	No significant similarity
No significant similarity	IcmX	IcmX	No significant similarity

In the first row the Icm/Dot-homologous proteins encoded on pXCV183 are given with their length and CDS number. In the following rows similar proteins from *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii* and Tra homologs are shown with their length, GeneBank accession, identities, similarities and gaps. The closest homolog is marked in beige. Fields underlayed in red mean no homologous Tra proteins. Green coloured fields indicate missing components on plasmid pXCV183.

#### SUPPLEMENTARY TABLE 3: Putative pathogenicity factors of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria strain 85-10

#### 1. Secretion systems

#### 1.1. Sec and TAT pathways

Gene	Gene	Gene product	Start	Stop
number	name			
XCV0206	secB	Preprotein translocase subunit SecB	241429	241941
XCV0839	secA	Preprotein translocase subunit SecA	956045	958864
XCV0985	secE	Preprotein translocase subunit SecE	1116319	1116726
XCV1019	secY	Preprotein translocase subunit SecY	1144961	1146325
XCV2692	secF	Preprotein translocase subunit SecF	3049043	3048075
XCV2693	secD	Preprotein translocase subunit SecD	3050977	3049133
XCV2694	yajC	Preprotein translocase subunit YajC (SecM)	3051521	3051168
XCV2854	secG	Preprotein translocase subunit SecG	3247376	3246903
XCV1338	ffh	Signal recognition particle protein	1504697	1506073
XCV4485	yidC	Preprotein translocase subunit YidC	5177582	5175858
XCV2750	ftsY	Cell division protein FtsY (SRP receptor)	3130305	3131960
XCV4319	tatC	Sec-independent protein translocase TatC	4969297	4968560
XCV4320	tatB	Sec-independent protein translocase TatB	4969920	4969294
XCV4321	tatA	Sec-independent protein translocase TatA	4970163	4969936
XCV1373	lepA	GTP-binding protein LepA	1553444	1555234
XCV1374	lepB	Signal peptidase I	1555340	1556140
XCV1291	IspA	Lipoprotein signal peptidase	1449436	1449954
XCV2058	IolA	Outer membrane lipoprotein-sorting protein LolA	2344431	2345102
XCV0978	IolB	Outer membrane lipoprotein receptor LolB	1109125	1109778

#### 1.2. Putative type I secretion systems

Gene number	Gene name	Gene product	Start	Stop
XCV1569	oprN5	Outer membrane efflux protein	1770710	1769307
XCV1570		Membrane fusion protein	1771792	1770707
XCV1571		ABC transporter permease and ATP- binding protein	1773464	1771776
XCV1573		ABC transporter permease and ATP- binding protein	1776464	1774695

#### 1.3. Type II secretion systems

Gene number	Gene name	Gene product	Start	Stop
XCV0755	xcsC	Type II secretion system protein C	862713	863531
XCV0756	xcsD	Type II secretory pathway component	863528	865597
XCV0757	xcsE	Type II secretory pathway ATPase	865602	867089
XCV0758	xcsF	Type II secretion system protein F	867076	868278
XCV0759	xcsG	Type II secretory pathway pseudopilin	868307	868771
XCV0760	xcsH	Type II secretion system protein H	868823	869293
XCV0761	xcsl	Type II secretory pathway pseudopilin	869277	869657
XCV0762	xcsJ	Type II secretion system protein J	869654	870256

Gene	Gene	Gene product	Start	Stop
number	xcsK	Type II secretion system protein K	870256	871245
XCV0765	xcsL	Type II secretion system protein L	871242	872330
XCV0766	xcsM	Type II secretion system protein M	872327	872803
XCV0767	xcsN	Type II secretion system protein N	872809	873519
XCV3658	xpsD	Type II secretory pathway component	4215582	4213303
XCV3659	xpsN	General secretion pathway protein N	4216388	4215591
XCV3660	xpsM	General secretion pathway protein M	4217031	4216378
XCV3661	xpsL	General secretion pathway protein	4218136	4217015
XCV3662	xpsK	General secretion pathway protein K	4219038	4218133
XCV3663	xpsJ	General secretion pathway protein J	4219616	4218981
XCV3664	xpsl	Type II secretory pathway pseudopilin	4220029	4219613
XCV3665	xpsH	General secretion pathway protein	4220535	4220026
XCV3666	xpsG	Type II secretory pathway pseudopilin	4221036	4220545
XCV3667	xpsF	Type II secretory pathway component	4222463	4221246
XCV3668	xpsE	Type II secretory pathway ATPase	4224366	4222639
XCV4312		Type II secretory pathway ATPase	4955334	4957148
XCVd0011	pilL	Putative PilL-like lipoprotein	11295	12134
XCVd0012	pilN	Putative PilN-like Bacterial type II and III secretion system protein	12131	13867
XCVd0013	pilO	Putative PilO-like pilus assembly protein	13907	15253
XCVd0014	pilQ	Putative PilQ-like type II/IV secretion system protein	15739	17349
XCVd0016	pilT	Putative PilT-like type II/IV secretion system protein	18707	20026
XCVd0017	pilV	Putative PilV-like type IV prepilin	20023	21510
XCV3355	pilD	Type II secretory pathway prepilin signal peptidase	3842523	3843386

1.4. Type III secretion system, associated proteins and regulators

Gene number	Gene name	Gene product	Start	Stop
XCV0435	hrcC	HrcC protein	483229	485052
XCV0427	hrpB1	HrpB1 protein	477533	477988
XCV0428	hrpB2	HrpB2 protein	478022	478414
XCV0429	hrcJ	HrcJ protein	478416	479177
XCV0430	hrpB4	HrpB4 protein	479185	479814
XCV0431	hrcL	HrpB5 protein	479799	480500
XCV0432	hrcN	HrcN protein	480490	481818
XCV0433	hrpB7	HrpB7 protein	481811	482320
XCV0434	hrcT	HrcT protein	482317	483147
XCV0426	hrcU	HrcU protein	477318	476245
XCV0425	hrcV	HrcV protein	476236	474314
XCV0423	hrcQ	HrcQ protein	473544	472630
XCV0422	hrcR	HrcR protein	472643	471999
XCV0421	hrcS	HrcS protein	471994	471734
XCV0419	hrcD	HrcD protein	470913	469975
XCV0418	hrpD6	HrpD6 protein	469978	469721
XCV0417	hrpE	HrpE protein	469639	469358
XCV0411	hrpF	HrpF protein	464869	462449
XCV0441	hpaH	Putative transglycosylase HpaH	490947	491420
XCV0424	hpaC	HpaC protein	474314	473676
XCV0420	hpaA	HpaA protein	471737	470910

Gene number	Gene name	Gene product	Start	Stop
XCV0416	hpaB	HpaB protein	469303	468833
XCV0415	hpaE	HpaE protein	468814	468512
XCV0409	hpaF	HpaF protein	461903	461310
XCV0408	hpaG	HpaG LRR protein	461253	459955
XCV2440	hpaJ	Lytic murein transglycosylase	2774746	2776023
XCV0440	хорА	Xanthomonas outer protein A	490488	490135
XCV1314	hrpG	Transcriptional regulator HrpG	1474097	1473306
XCV1315	hrpXv	AraC-type transcriptional regulator HrpX	1474927	1476357

## 1.5. Putative type IV-secretion systems and regulators

Gene	Gene	Gene product	Start	Stop
number	name			
XCVc0028	virB1	Type IV secretion system protein VirB1	22894	21983
XCVc0029	virB11	Type IV secretion system protein VirB11	23903	22881
XCVc0030	virB10	Type IV secretion system protein VirB10	25134	23914
XCVc0031	virB9	Type IV secretion system protein VirB9	25918	25136
XCVc0032	virB8	Type IV secretion system protein VirB8	26617	25943
XCVc0033	virB6	Type IV secretion system protein VirB6	27480	26614
XCVc0035	virB5	Putative type IV secretion system protein VirB5	28706	28134
XCVc0041	virB4	Type IV secretion system protein VirB4	37013	34380
XCVc0042	virB2	Type IV secretion system protein VirB2	37709	37332
XCV0462	virK	VirK protein (function unknown)	522157	522588
XCV1424		Type IV secretion system VirJ-like protein	1601470	1602843
XCV2608		Type IV secretion system VirJ-like protein	2941765	2940503
XCV2807	virB9	Type IV secretion system protein VirB9	3194234	3193467
XCV2808	virB8	Type IV secretion system protein VirB8	3195247	3194231
XCV2810	virD4	Type IV secretion system protein VirD4	3197789	3196116
XCV3390	virB6	Type IV secretion system protein VirB6	3876868	3875732
XCV3558	virB6	Type IV secretion system protein VirB6	4073539	4074657
XCV3561	virB6	Type IV secretion system protein VirB6	4077679	4078863
XCV3564	virB6	Type IV secretion system protein VirB6	4081738	4082910
XCVd0005	dotD	Putative DotD-like type IV secretion system protein	6587	7081
XCVd0006	dotC	Putative DotC-like type IV secretion system protein	7068	7847
XCVd0007	dotB	Putative DotB-like type IV secretion system protein	7844	9040
XCVd0008	icmT	Putative IcmT-like type IV secretion system protein	9037	9318
XCVd0027	dotA	Putative TraY/DotA-like type IV secretion system protein	35127	32545
XCVd0041	icmP	Putative IcmP-like type IV secretion system protein	45982	47133
XCVd0043	icmO	Putative IcmO-like type IV secretion system protein	47904	50471
XCVd0162	icmB	Putative IcmB-like type IV secretion system protein	172661	169614
XCVd0164	icmJ	Putative IcmJ-like type IV secretion system protein	174909	174157
XCVd0166	icmC	Putative IcmC-like type IV secretion system protein	175891	175361

Gene number	Gene name	Gene product	Start	Stop
XCVd0167	icmG	Putative IcmG-like type IV secretion system protein	176722	175901
XCVd0168	icmE	Putative IcmE-like type IV secretion system protein	178099	176852
XCVd0169	icmK	Putative IcmK-like type IV secretion system protein	179037	178096
XCVd0170	icmL	Putative IcmL-like type IV secretion system protein	179867	179034
XCV2145	virA	VirA-like sensor histidine kinase	2463919	2461463
XCV2147	virG	VirG-like two-component system regulatory protein	2465684	2464905

## 1.6. Putative type V autotransporters

Gene	Gene	Gene product	Start	Stop
number	name			
XCV1402		Autotransporter subtilase family protease	1582534	1585368
XCV2103		Putative filamentous hemagglutinin-related	2399348	2409541
		protein		
XCV2109		Putative autotransporter serine protease	2420591	2417760
XCV4444		Putative hemagglutinin-related protein	5131305	5126497

## 1.7. Other putative secretion systems

Gene number	Gene name	Gene product	Start	Stop
XCV1244	raxST	Putative sulfotransferase RaxST	1400264	1401139
XCV1245	raxA	Membrane fusion protein RaxA	1401228	1402466
XCV1246	raxB	ABC transporter permease and ATP- binding protein RaxB	1402463	1404619
XCV3591	raxC	Outer membrane efflux protein RaxC	4123846	4125228

## 2. Flagellum

Gene number	Gene name	Gene product	Start	Stop
XCV1961	motB1	Flagellar motor protein MotB	2235838	2234864
XCV1962	motA1	Flagellar motor component MotA	2236585	2235845
XCV1977	fliA	RNA polymerase sigma factor for flagellar operon FliA	2252200	2251433
XCV1978	fleN	Flagellar synthesis regulator FleN	2253156	2252197
XCV1979	flhF	Flagellar GTP-binding protein FlhF	2254768	2253068
XCV1980	flhA	Flagellar biosynthesis pathway component FlhA	2257535	2255442
XCV1981	flhB	Flagellar biosynthesis pathway component FlhB	2258662	2257532
XCV1986	fliR	Flagellar biosynthesis pathway component FliR	2268399	2267608
XCV1987	fliQ	Flagellar biosynthesis pathway component FliQ	2268682	2268413
XCV1988	fliP	Flagellar biosynthesis pathway component FliP	2270420	2269575
XCV1989	fliO	Flagellar biogenesis protein FliO	2270829	2270422

Gene number	Gene name	Gene product	Start	Stop
XCV/1990	fliN	Elagellar motor switch/type III secretory	2271164	2270826
1000		pathway protein FliN	2271101	2270020
XCV1991	fliM	Flagellar motor switch protein FliM	2272174	2271161
XCV1992	fliL	Flagellar basal body-associated protein	2272736	2272185
		FliL		
XCV1993	fliK	Flagellar hook-length control protein FliK	2274194	2272902
XCV1994	fliJ	Flagellar biosynthesis chaperone FliJ	2274646	2274191
XCV1995	flil	Flagellar biosynthesis/type III secretory	2276026	2274650
		pathway ATPase Flil		
XCV1996	fliH	Flagellar biosynthesis/type III secretory	2276643	2276023
		pathway protein FliH		
XCV1997	fliG	Flagellar motor switch protein FliG	2277650	2276640
XCV1998	fliF	Flagellar biosynthesis lipoprotein FliF	2279364	2277640
XCV1999	fliE	Flagellar hook-basal body complex protein	2279749	2279378
XCV2014	fleQ	Flagellar sigma-54 dependent	2296975	2295491
7072014	neg	transcriptional activator FleQ	2200010	2200401
XCV2015		putative two-component response regulator	2297351	2296968
XCV2016	rpoN1	RNA polymerase sigma-54 factor	2298763	2297360
XCV2017	100111	Two-component system response	2299645	2298980
//0/2011		regulator, LuxR family	2200010	
XCV2020	fliS	Flagellin-specific chaperone FliS	2300962	2300549
XCV2021	fliD	Flagellar capping protein	2302438	2301113
XCV2022	fliC	Flagellin and related hook-associated	2303909	2302710
		proteins		
XCV2023	flgL	Flagellin and related hook-associated	2305432	2304227
		proteins		
XCV2024	flgK	Flagellar hook-associated protein 1 (HAP1)	2307306	2305432
XCV2025	flgJ	Muramidase (flagellum-specific)	2308496	2307318
XCV2026	flgl	Flagellar basal-body P-ring protein	2309616	2308498
XCV2027	flgH	Flagellar basal body L-ring protein	2310319	2309627
XCV2028	flgG	Flagella basal body rod protein	2311143	2310358
XCV2029	flgF	Flagella basal body rod protein	2312658	2311903
XCV2030	flgE	Flagellar hook protein FlgE	2314026	2312803
XCV2031	flgD	Flagellar hook capping protein	2314723	2314058
XCV2032	flgC	Flagellar basal body rod protein	2315168	2314761
XCV2033	flgB	Flagellar basal body protein	2315573	2315172
XCV2034		Chemotaxis signal transduction protein	2316851	2315907
XCV2035	flgA	Flagellar basal body P-ring biosynthesis	2317088	2317846
		protein		
XCV2036		Negative regulator of flagellin synthesis	2317913	2318224
XCV3814	motA2	Flagellar motor component MotA	4398421	4399275
XCV3815	motB2	Flagellar motor protein MotB	4399286	4400443

### 3. Secreted proteins

3.1. Putative host cell wall degrading enzymes

Gene number	Gene name	Gene product	Start	Stop
XCV0029	egl1	Cellulase	32717	31584
XCV0031	egl2	Cellulase	34399	33347
XCV0033	egl3	Cellulase	36240	35167
XCV0358		Putative cellulase	410531	411892
XCV0670	engXCA	Endoglucanase	760093	758663

Gene	Gene	Gene product	Start	Stop
number	name			
XCV1802		Putative cellulase	2025431	2027686
XCV2704	egl4	Cellulase	3065332	3063572
XCV3634	celS	Putative cellulase	4181290	4180475
XCV3641	bcsZ	Cellulase	4192480	4191299
XCV0722	pgl	Polygalacturonase	821886	823283
XCV2571		Polygalacturonase	2898068	2899738
XCV3632		Putative rhamnogalacturonase B	4178465	4180036
XCV1505	bgIS	Beta-glucosidase precursor	1699037	1696776
XCV1823	celD	Glucan 1,4-beta-glucosidase precursor	2056213	2058879
XCV3211		Beta-glucosidase precursor	3654692	3657361
XCV3988	bglX	Beta-glucosidase	4578732	4576561
XCV4337		Beta-glucosidase precursor	4987360	4990068
XCV2278		Pectate lyase precursor	2612110	2610788
XCV2569		Putative pectate lyase	2896431	2897447
XCV3132	pel1	Pectate lyase precursor	3552590	3551643
XCV3687	pel2	Pectate lyase precursor	4262450	4261371
XCV0965		Xylanase	1095634	1096854
XCV3292		Xylanase	3762707	3761802
XCV4355	xynA	Endo-1,4-beta-xylanase	5008114	5006882
XCV4358	xynB2	Xylanase	5013406	5012429
XCV4360	xynB3	Xylanase	5014894	5013902

## 3.2. Other degradative enzymes

Gene number	Gene name	Gene product	Start	Stop
XCV0122	kdgK	2-keto-3-deoxygluconate kinase	141604	140582
XCV0152	kdul	4-deoxy-L-threo-5-hexosulose-uronate ketol-isomerase	182221	183075
XCV0153	kduD	2-deoxy-D-gluconate 3-dehydrogenase	183258	184013
XCV0346	kdgT	2-keto-3-deoxy-D-gluconate permease	399014	398058
XCV2701		Putative phytase	3060083	3058962
XCV4424		Putative secreted protein (Homolog of Pat- 1 from <i>Clavibacter michiganensis</i> susp. <i>michiganensis</i> )	5101797	5102339
XCV4425		Hypothetical protein (due to frame shift homology to Pat-1 of <i>Clavibacter</i> <i>michiganensis</i> susp. <i>michiganensis</i> continues in that CDS)	5102336	5102602

3.3. Type III effector proteins and candidates

Gene	Gene	Gene product	Start	Stop
number	name			
XCVd0104	avrBs1	Avirulence protein AvrBs1	114452	113115
XCV0052	avrBs2	Avirulence protein AvrBs2	62327	64471
XCV0471	avrRxv	Avirulence protein AvrRxv	532770	533891
XCV0581	хорВ	Xanthomonas outer protein B	660643	662484
XCV2435	хорС	Xanthomonas outer protein C	2767573	2765069
XCV0437	хорD	Xanthomonas outer protein D	487189	488826
XCV0414	xopF1	Xanthomonas outer protein F1	466199	468211
XCV2942	xopF2	Xanthomonas outer protein F2	3347435	3345432
XCV2156	хорЈ	Xanthomonas outer protein J	2480214	2479093
XCV2944	хорN	Xanthomonas outer protein N	3348571	3350772
XCV1055	хорО	Xanthomonas outer protein O	1184982	1185617

Gene number	Gene name	Gene product	Start	Stop
XCV1236	хорР	Xanthomonas outer protein P	1386857	1388833
XCV4438	xopQ	Xanthomonas outer protein Q	5115144	5113750
XCV0572	хорХ	Xanthomonas outer protein X	644180	642081
XCVd0105		Conserved hypothetical protein (Homologous to HopAO1; putative tyrosine phosphatase)	115613	114543
XCV0294		Conserved hypothetical protein (Homologous to HopX2)	339406	338204
XCV1298		Conserved hypothetical protein (Homologous to HopH1)	1455851	1456492
XCV2280		Conserved hypothetical protein (Homologous to HopX2)	2613433	2614509
XCV3786		Conserved hypothetical protein (Homologous to HopK1)	4372231	4373688
XCV4428	avrRxo1	Putative avirulence protein AvrRxo1 (Homologous to AvrRxo1 from <i>X. oryzae</i> pv. oryzicola)	5103966	5105318

#### 4. Detoxification

Gene	Gene	Gene product	Start	Stop
number	name			
XCV1240	katE	Catalase	1393469	1391361
XCV1350	katG	Catalase	1516962	1514716
XCV3845		Putative manganese-containing catalase	4429413	4430312
XCV4083	srpA	Catalase	4678607	4679698
XCV4122	catB	Catalase	4717838	4716315
XCV1074		Putative glutaredoxin	1206680	1207021
XCV2826		Glutaredoxin-related protein	3216985	3216665
XCV3626	grx	Glutaredoxin-like protein	4171963	4172889
XCV3637	arsC	Arsenate reductase (glutaredoxin)	4184137	4183715
XCV1026	dsbB	Protein-disulfide reductase (glutathione)	1150116	1150634
XCV1514	gpo	Glutathione peroxidase-like protein	1708716	1709201
XCV1514	gpo	Glutathione peroxidase-like protein	1708716	1709201
XCV1592		Glutathione peroxidase	1797810	1798367
XCV1592		Glutathione peroxidase	1797810	1798367
XCV4457	btuE	Glutathione peroxidase	5139899	5139348
XCV4457	btuE	Glutathione peroxidase	5139899	5139348
XCV2903		Putative glutathione reductase	3306384	3305014
XCV3234	gshB	Glutathione synthetase	3691418	3692368
XCV0637		Putative glutathione transferase	718440	719414
XCV0931	gst1	Glutathione transferase	1060027	1060668
XCV1035	gst2	Glutathione transferase	1162970	1162356
XCV1348	gst3	Glutathione transferase	1513305	1513961
XCV1518	gst4	Glutathione transferase	1714265	1714900
XCV1532	gst5	Glutathione transferase	1726559	1727197
XCV2591	gst6	Glutathione transferase	2921282	2920584
XCV2637	gst	Putative glutathione transferase	2972764	2973408
XCV3327		Glutathione S-transferase	3806221	3806928
XCV4137	gst7	Putative glutathione transferase	4735586	4734897
XCV4464	gst8	Putative glutathione transferase	5145126	5145746
XCV2489	kefB	Glutathione-regulated potassium efflux protein B	2810713	2808863
XCV4166	kefC	Glutathione-regulated potassium-efflux protein C	4768789	4770606

Gene	Gene	Gene product	Start	Stop
number	name			
XCV1170		Putative peroxiredoxin	1309272	1308895
XCV1171		Putative peroxiredoxin (fragment)	1309377	1309276
XCV1788		Putative AhpC/TSA family peroxiredoxin	2011193	2010711
XCV0193	sodC1	Superoxide dismutase	230671	231273
XCV0194	sodC2	Superoxide dismutase	231322	231969
XCV2583	sodM	Superoxidase dismutase	2912120	2911509
XCV2827	sodB	Superoxide dismutase	3217106	3217684
XCV0080		Putative thioredoxin	92935	93264
XCV0480		Putative thioredoxin	545266	545856
XCV0969		Putative thioredoxin	1099400	1100011
XCV1327		Putative thioredoxin	1491843	1491397
XCV2313		Putative thioredoxin	2646724	2646404
XCV2429		Thioredoxin-like protein	2756332	2756931
XCV2940		Thioredoxin	3343453	3344310
XCV3955	trxA	Thioredoxin	4539262	4539603
XCV4158		Putative thioredoxin	4756489	4756100
XCV0647		Putative thioredoxin reductase	731708	732607
XCV1208		Putative thioredoxin reductase	1353343	1355052
XCV2055	trxB1	Thioredoxin-disulfide reductase	2339646	2338678
XCV2311	trxB2	Thioredoxin reductase	2645760	2644801
XCV2196		Putative non-heme chloroperoxidase	2526073	2525249
XCV0942	ahpF	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	1071381	1069789
XCV0943	ahpC	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	1072131	1071568
XCV0903	ostA	Organic solvent tolerance protein	1034004	1031575
XCV0290	ohr	Organic hydroperoxide resistance protein	335792	336220
XCV0187	bacA	Putative undecaprenol kinase (bacitracin	223855	223058
XCV1496	tnmT	Thiopurine S-methyltransferase	1686071	1685415
XCV2325	strB	Streptomycin 3"-kinase	2657426	2656581
XCV2326	str∆	Streptomycin 3"-kinase	2658220	2657417
XCV2502	0071	Putative phosphinothricin N-	2822340	2822879
		acetyltransferase	2022010	202207.0
XCV2336	сорА	Copper-translocating P-type ATPase	2668496	2665995
XCV3747	copA	Copper resistance protein A	4328641	4330425
XCV3748	сорВ	Copper resistance protein B	4330422	4331516
XCV3221	cutC	Copper homeostasis protein	3672148	3671417

#### 5. Surface

#### 5.1. EPS/LPS/Xanthomonadin

Gene number	Gene name	Gene product	Start	Stop
XCV0307		Putative polysaccharide deacetylase	352053	351163
XCV1102	opsX	Lipopolysaccharide core biosynthesis heptosyltransferase	1237181	1236339
XCV1725	wzxE	Lipopolysaccharide biosynthesis protein	1943335	1944588
XCV1726		Glycosyltransferase	1944585	1945523
XCV1727		Putative membrane protein	1945508	1946665
XCV1728		Putative exopolysaccharide chain length determinant protein	1946709	1947560
XCV1742	exoD	Exopolysaccharide synthesis protein ExoD	1963183	1962515
XCV2769	gumP	GumP protein	3150068	3149220
XCV2770	fabH	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] synthase III	3151135	3150068
XCV2776	gumM	Xanthan biosynthesis glycosyltransferase GumM	3154895	3154101
Gene number	Gene name	Gene product	Start	Stop
--------------------	--------------	---	--------------------	--------------------
XCV2777	gumL	Xanthan biosynthesis pyruvyltransferase GumL	3155694	3154900
XCV2778	gumK	Xanthan biosynthesis glucuronosyltransferase GumK	3156928	3155732
XCV2779	gumJ	Xanthan biosynthesis oligosaccharidyl-lipid flippase GumJ	3158503	3156992
XCV2780	guml	Xanthan biosynthesis glycosyltransferase Guml	3159549	3158500
XCV2781	gumH	Xanthan biosynthesis glycosyltransferase GumH	3160688	3159546
XCV2782	gumG	Xanthan biosynthesis acetyltransferase GumG	3161970	3160753
XCV2783	gumF	Xanthan biosynthesis acetyltransferase GumF	3162956	3161838
XCV2784	gumE	Xanthan biosynthesis exopolysaccharide polymerase GumE	3164254	3162953
XCV2785	gumD	Xanthan biosynthesis glycosyltransferase GumD	3165791	3164337
XCV2786	gumC	Xanthan biosynthesis chain length determinant protein GumC	3167459	3166035
XCV2787	gumB	Xanthan biosynthesis polysaccharide export protein GumB	3168154	3167456
XCV2788		Transcriptional regulator, MerR family	3169119	3168763
XCV2789	gumA	Integration host factor alpha subunit	3169399	3169100
XCV3592	waaA	3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase	4126819	4125503
XCV3593	waaM	Lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase	4127112	4128032
XCV3594	waaL	Lipid A core - O-antigen ligase	4129456	4128125
XCV3595	waaG	Glycosyltransferase	4130549	4129437
XCV3625		Polysaccharide deacetylase	4171917	4171126
XCV3701	wxcJ	3-oxoacid CoA transferase beta subunit	4276838	4276206
XCV3702	wxcl	3-oxoacid CoA transferase alpha subunit	4277569	4276838
XCV3703	xanA	Phosphoglucomutase / phosphomannomutase	4277704	4279050
XCV3704	xanB	Phosphomannose isomerase / GDPmannose dehydrogenase	4279097	4280500
XCV3705	ugd2	UDP-glucose dehydrogenase	4281956	4280790
XCV3706	rmID	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	4283118	4282297
XCV3707 XCV3708	rmlC rmlA	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase Glucose-1-phosphate thymidylyltransferase	4283753 4284637	4283196 4283750
XCV3709	rmlB	TDP-glucose 4.6-dehvdratase	4285748	4284693
XCV3710	etfB	Electron transfer flavoprotein beta subunit	4285984	4286730
XCV3711	etfA	Electron transfer flavoprotein alpha subunit	4286730	4287674
XCV3712	wxcK	Aminotransferase	4288199	4289302
XCV3713	wxcL	Glycosyltransferase	4289287	4290258
XCV3714	wxcM	Bifunctional isomerase / acetyl transferase	4290255	4291184
XCV3715	wxcN	Putative membrane protein involved in synthesis of cell surface polysaccharides	4291087	4291608
XCV3716	wxcO	Putative carbohydrate translocase	4291703	4293955
XCV3717	rmd	NDP-hexose oxidoreductase	4295075	4294140
XCV3718	gmd	GDP-mannose 4,6-dehydratase	4296099	4295059
XCV3719	wbdA1	Bifunctional glycosyltransferase	4298722	4296206
XCV3720	wxcB	Putative protein kinase	4300869	4298722
XCV3721	wzt	O-antigen ABC transporter ATP-binding protein	4302208	4300922
XCV3722	wzm	O-antigen ABC transporter permease	4302999	4302205

Gene	Gene	Gene product	Start	Stop
number	name	-		-
XCV3723	wbdA2	Bifunctional glycosyltransferase	4306201	4303082
XCV3921	waaE	Lipopolysaccharide core biosynthesis	4500010	4500834
		glycosyltransferase		
XCV3922		Putative cell surface polysaccharide polymerase/ligase	4502307	4501030
XCV3923	CV3923 Putative dolichyl-phosphate mannosyltransferase		4504194	4502473
XCV4180	XCV4180 Xanthomonadin biosynthesis protein		4792671	4792240
XCV4181		Xanthomonadin exporter	4795024	4792658
XCV4182		Putative xanthomonadin exporter (fragment)	4795241	4795014
XCV4183		Putative xanthomonadin exporter (fragment)	4795458	4795231
XCV4184		Putative secreted protein	4796244	4795597
XCV4185		Xanthomonadin biosynthesis acyltransferase	4797142	4796168
XCV4186		Xanthomonadine biosynthesis acyl carrier protein dehydratase	4797426	4797139
XCV4187		Putative xanthomonadin biosynthesis ayltransferase	4798187	4797438
XCV4188		Putative xanthomonadin biosynthesis membrane protein	4798987	4798241
XCV4189		Xanthomonadin biosynthesis acyl carrier protein	4799309	4798962
XCV4484		Polysaccharide deacetylase	5175772	5173070

## 5.2. Adhesion/Antigens/Hemolysins

Gene	Gene	Gene product	Start	Stop
number	name	-		-
XCV2815		Tfp pilus adhesin	3205853	3202185
XCV3670	xadA1	Xanthomonas adhesin XadA	4233676	4226603
XCV3672	xadA2	Xanthomonas adhesin XadA	4239398	4236201
XCV1470	oma	Outer membrane antigen	1653570	1651117
XCV0056		Hemolysin-III family membrane protein	69088	69750
XCV3180		Hemolysin-III family membrane protein	3613375	3614019
XCV1859	fhaC	HlyB family outer membrane activator	2094268	2095968
		protein		
XCV1860	fhaB1	Filamentous hemagglutinin-related protein	2096009	2097628
XCV1861	fhaB2	Filamentous hemagglutinin-related protein	2097680	2108809
XCV2103		Putative filamentous hemagglutinin-related	2399348	2409541
		protein		
XCV4203	yapH	Filamentous hemagglutinin-related protein	4823171	4814988
XCV4204		Hemolysin activator protein	4824865	4823183
XCV4444		Putative hemagglutinin-related protein	5131305	5126497
XCV3640	bcsC	Putative cellulose synthase operon protein	4191317	4186788
		С		
XCV3641	bcsZ	Cellulase	4192480	4191299
XCV3642	bcsB	Cellulose synthase regulatory subunit	4194840	4192477
		(Cyclic di-GMP binding protein)		
XCV3643	bcsA	sA Cellulose synthase catalytic subunit [UDP- 4195658		4194846
		forming] (fragment)		
XCV3644	bcsA	Cellulose synthase catalytic subunit [UDP-	4197041	4195680
		forming] (fragment)		

### 5.3. Fimbrial proteins

Gene	Gene	Gene product	Start	Stop
number	name			10101
XCVd0011	pilL	Putative PilL-like lipoprotein	11295	12134
XCVd0012	pilN	Putative PIIN-like Bacterial type II and III secretion system protein	12131	13867
XCVd0013	pilO	Putative PilO-like pilus assembly protein	13907	15253
XCVd0014	pilQ	Putative PilQ-like type II/IV secretion system protein	15739	17349
XCVd0015	pilR	Putative PilR-like integral membrane protein	17351	18448
XCVd0016	pilT	Putative PiIT-like type II/IV secretion system protein	18707	20026
XCVd0017	pilV	Putative PilV-like type IV prepilin	20023	21510
XCV1152		Tfp pilus assembly protein	1280994	1281347
XCV1174	pilH	Putative two-component system response regulator, PilH family	1311827	1312213
XCV2452		Putative F pilin acetylation protein	2783441	2782794
XCV2813		Putative type IV pilus assembly protein FimT	3201019	3201561
XCV2814	pilE	Type IV pilin PilE	3202152	3201745
XCV2815		Tfp pilus adhesin	3205931	3202185
XCV2818		PilX-related protein	3207699	3207238
XCV2819		PilW-related protein	3208859	3207702
XCV2820		Putative type IV pilus assembly protein PilV		3208865
XCV2821		Putative type IV pilus assembly protein FimT	3209859	3209341
XCV3067	pilU	Tfp pilus assembly protein ATPase	3492236	3491106
XCV3068		Tfp pilus assembly protein, ATPase	3493386	3492349
XCV3229	pilL	Two-component system sensor histidine	3687680	3680463
		PilL		
XCV3230	pilJ	Methyl-accepting chemotaxis protein	3689830	3687794
XCV3231	pill	Chemotaxis signal transduction protein	3690400	3689870
XCV3232	pilH	Type IV pilus response regulator PilH	3690762	3690400
XCV3233	pilG	Type IV pilus response regulator PilG	3691181	3690780
XCV3350	pilS	Two-component system sensor protein PilS	3835068	3836681
XCV3351	pilR	Two-component system response regulator PilR	3836948	3838402
XCV3352	pilB	Tfp pilus assembly pathway ATPase PilB	3840350	3838617
XCV3353	pilA	Tfp pilus assembly protein major pilin	3840912	3840484
XCV3354	pilC	Fimbrial assembly protein	3841254	3842516
XCV3355	pilD	Type II secretory pathway prepilin signal peptidase PulO	3842523	3843386
XCV3497	pilQ	Fimbrial assembly protein	4009964	4008015
XCV3498	pilP	Tfp pilus assembly protein	4010517	4009984
XCV3499	pilO	Fimbrial assembly membrane protein	<u>40</u> 11179	4010514
XCV3500	pilN	Tfp pilus assembly protein	4011958	4011176
XCV3501	pilM	Tfp pilus assembly protein	4013016	4011958
XCV3730		Tfp pilus assembly protein	4311406	4312539
XCV3930		PilA-related fimbrial protein	4510411	4511136

## 6. Quorum sensing:

Gene	Gene	Gene product	Start	Stop
number	name			
XCV1910	greA	Transcriptional elongation factor	2158277	2158753
XCV1911	rpfE	Putative regulatory protein RpfE	2158698	2159690
XCV1912		Putative single-stranded-DNA-specific	2159687	2161426
		exonuclease		
XCV1913		Putative membrane protein	2162744	2161500
XCV1914	rpfD	AlgR/AgrA/LytR family regulatory protein	2162874	2163758
		RpfD		
XCV1915	prfB	Peptide chain release factor 2	2164007	2165131
XCV1916	lysU	Lysyl-tRNA synthetase heat inducible	2165335	2166852
XCV1917	rpfG	Two-component system response regulator	2166993	2168129
		RpfG		
XCV1918	rpfH	Putative membrane protein RpfH	2168131	2168760
XCV1919	rpfC	Sensory/regulatory protein RpfC	2168768	2170948
XCV1920	rpfF	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family	2171830	2170961
		protein RpfF		
XCV1921	rpfB	Long-chain-fatty-acid-CoA-ligase RpfB	2173689	2172007
XCV1924	rpfA	Aconitate hydratase	2177416	2174648

**SUPPLEMENTARY TABLE 4: Putative substrates of the TAT secretion pathway in** *X. campestris* **pv. vesicatoria strain 85-10** (predicted by TATFind 1.2; Dilks *et al.*, 2003)

Gene	Gene	Gene product	Start	Stop
number	name			
XCV0002	dnaN	DNA polymerase III beta chain	1606	2706
XCV0049		Putative secreted protein	58210	57425
XCV0092		Putative modulator of DNA gyrase	109430	107796
XCV0093		Putative modulator of DNA gyrase	111777	110149
XCV0111		Putative lignostilbene-alpha,beta-	129622	128108
		dioxygenase		
XCV0129		IS1479 transposase	153678	152698
XCV0143		Putative oxidoreductase	171122	172270
XCV0314	ggt1	Gamma-glutamyltranspeptidase	359853	358273
XCV0358		Putative cellulase	410531	411892
XCV0435	hrcC	HrcC protein	483229	485052
XCV0477		Putative secreted protein	542161	538580
XCV0622		IS1479 transposase	705742	704762
XCV0803	nusB	Transcription termination factor NusB	914445	914933
XCV0866		Putative membrane protein	994896	995996
XCV0923	gfo	Glucosefructose oxidoreductase	1052261	1053370
XCV0929		Hypothetical protein	1057816	1057499
XCV0936		Putative secreted protein	1064195	1064710
XCV1048	cysU	ABC transporter sulfate permease	1174304	1175164
XCV1054	phIN1	Phospholipase C	1182652	1184751
XCV1294		IS1479 transposase	1453165	1452185
XCV1335		Putative alpha-L-arabinofuranosidase	1501943	1500360
XCV1347		Putative transcriptional regulator	1512551	1513246
XCV1359		Putative beta-galactosidase	1534489	1531925
XCV1519	cynT1	Carbonic anhydrase	1715013	1715726
XCV1615	pstA	ABC transporter phosphate permease	1828587	1827718
XCV1667	hisC	Aminotransferase	1876979	1875855
XCV1688		Putative oxidoreductase	1903205	1902237
XCV1704		Transcriptional regulator, MarR family	1922191	1921400
XCV1805		Putative alpha-xylosidase	2031547	2034450
XCV1822		Putative secreted protein	2055832	2053877
XCV1833		Drug/metabolite transporter superfamily protein	2071692	2070784
XCV2101		Putative secreted protein	2395955	2396653
XCV2540		Conserved hypothetical protein	2866123	2868534
XCV2600		Putative secreted protein	2930918	2929944
XCV2634	petA	Ubiquinol-cytochrome c reductase, iron- sulfur subunit	2970012	2969368
XCV2671		Two-component system sensor histidine kinase-response regulator hybridprotein	3011890	3015984
XCV2724		Putative secreted protein	3091258	3088883
XCV2732		Putative secreted protein	3109438	3107081
XCV2738		Putative peptidase (fragment)	3116133	3115039
XCV2932		Putative secreted protein	3334638	3336173
XCV3046		Putative xanthine dehydrogenase iron-sulfur binding subunit	3469825	3469175
XCV3143		Putative metallo-beta-lactamase superfamily protein	3561500	3562507
XCV3213		Putative sugar hydrolase	3659363	3661750
XCV3291	phIN2	Phospholipase C	3759396	3761543
XCV3293	penP	Beta-lactamase	3763713	3762820

Gene	Gene	Gene product	Start	Stop
number	name	-		-
XCV3323		TonB-dependent outer membrane receptor	3801809	3799932
XCV3395		IS1479 transposase	3882388	3881408
XCV3470		Putative secreted protein	3976029	3976550
XCV3538	hisC3	Histidinol-phosphate aminotransferase	4054095	4052893
XCV3541		Amine oxidase	4056683	4055076
XCV3601		Sensor histidine kinase / response regulator	4140494	4143205
		fusion protein		
XCV3641	bcsZ	Cellulase	4192480	4191299
XCV3685		TonB-dependent outer membrane receptor	4258776	4255897
XCV3747	сорА	Copper resistance protein A	4328641	4330425
XCV4083	srpA	Catalase	4678607	4679698
XCV4093	rarD	Predicted chloramphenicol-sensitive protein	4690873	4689965
XCV4113		Putative secreted protein	4708744	4707560
XCV4176		IS1479 transposase	4789113	4790093
XCV4265	phoD1	Alkaline phosphatase	4898642	4900270
XCV4266	phoD2	Alkaline phosphatase	4900442	4902013
XCV4268		Putative membrane protein	4902753	4903004
XCV4281	xylB2	Xylosidase	4915919	4914297
XCVd0021		IS1646 transposase	24444	25424
XCVd0026		IS1479 transposase	30427	29447
XCVd0044		Putative secreted protein	50461	51081
XCVc0026		Endonuclease	21337	20732

Anhang 3: In Artikel 2.2.1	verwendete Oligonukleotide
----------------------------	----------------------------

Name	Sequenz	Kommentare <sup>a</sup>
Sequenzierung der	xopC-Region	
C01	CTGGCGCTGTTGGCGGGATTG	
C02	ACTACCGCCAGATCGCCGATG	
C03	GCAGAGCTGGAATTTACAAAC	
C04	TTTGGGCCAGGGTTGCTTGAC	
C05	TGCGCTGCTACGCTGGTTGAG	
C06	AAGAAGGCCCATTTGACGAAG	
C07	CTGGGTCACCTGTGCGCCCTG	
C08	GCCAGCGCATAGCGCTTGATC	
C09	CCTCGAGTACGCGTAGTTCAC	
C10	TCGGGGATATCCCTCACCTTG	
C11	CCCTGGGGCCAGGAAGTCCAG	
C12	TCGCCATACAGGACATCGCAC	
C13	TTTCCCGGCCGGAGCCAGGTC	
C14	CAAAGCCTTGGCCGCCGCCAG	
C15	GGAAGCGCCATTGCTGATG	
C16	CGCATTGCGTGATTTCTCCAG	
C17	CTTTCAGAGGCAGCAATTTAC	
C18	GTTCCGTGATTTTAGATACAAC	
C19	GTCAGGGAGCTGGGATCGCAC	
C20	CTGGAGAACCAGATCGACTTG	
C21	CAACCCTCGACGACCGGGGTG	
C22	CGGGCAACTGCATGCGGCATC	
C23	GCCACATACGCCATCACCCAG	
C24	GATTCCGCTGGTGATCGCAC	
Konstruktion von	avrBs3/2-Fusionnen	
attB hpaI forward		attB1-Sequenz
und_npus forward	GGACAACCTG	undr bequenz
attB_hpaJ reverse	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtCCAGCAGCTGC TGTCCTTCCTG	attB2-Sequenz
attB_xopC forward	ggggacaagtttgtacaaaaagcaggctTGCCGGCACGC GCTGCATTG	attB1-Sequenz
attB_xopC reverse	<u>ggggaccactttgtacaagaaagctgggt</u> CGACGTATTCT CCACGAGATTTATC	attB2-Sequenz
attB_xopJ forward	ggggacaagtttgtacaaaaagcaggctCTGTATCTGTG	attB1-Sequenz
attB_xopJ reverse	ggggaccatttgtacaagaaagctgggtCGGAAACTACT	attB2-Sequenz
DT-DCD-Analmaan	9111901001119	
DT hnol forward	ͲͲϹϹϹͲϹͲϹϹϪϹϹϪͲϹͲϹϹϪϹ	
RI_IIPAJ IOFWARD		
RI_npaj reverse		
RT_ORFB lorward		
RI_ORFB reverse		
RT_ORFC forward		
RI_ORFC reverse		
RT_ORFD Iofward		
RI_OKFD reverse		
RI_ORFE IOFWARD		
RI_UKFE reverse		
KI_xopC forward		
RI_xopC reverse		
KI_XOPJ IOFWARD		
RI_XOPJ reverse		
KI_IOSIKINA IORWard		
KI_IOSIKINA reverse	IGCACGAAGTTAGCCGGTG	

\* Spezielle Sequenzmotive im Oligonukleotid sind unterstrichen.

# Anhang 4: In 2.2.3. verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Kommentare <sup>a</sup>		
Konstruktion von avrBs3A2-Fusionen				
xopI forward	caccCGTTCTTCAACCAGTTGCGTG	TOPO-Motiv für gerichtete Klonierung		
xopI reverse	CGCTGCAAGCCTTCCGTATC			
<b>RT-PCR-Analysen</b>				
RT_xopI forward	CTGGGATGCTTGCCCGAGGAC			
RT_xopI reverse	GAAGGCAGCCTGGCGCACTC			

\* Spezielle Sequenzmotive im Oligonukleotid sind unterstrichen.

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich erkläre weiterhin, dass andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden. Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle, den 12.05.2006

Frank Thieme

## LEBENSLAUF

## **PERSÖNLICHE DATEN:**

			A State of the
Name:	Frank Thieme		
Anschrift:	Rosenstraße 1, 06114 Halle/Saale		
Geburtsdatum:	08.11.1975		
Geburtsort:	Lutherstadt Eisleben		and the
Staatsangehörigkeit:	deutsch		
AUSBILDUNG:			
1982-1990	Polytechnische Obers	schule "Walter Schneider"	" Lüttchendorf
1990-1994	Martin-Luther-Gymnasium Eisleben		
1994-1995	Wehrdienst in Halle/Saale und Bad Frankenhausen		
1995-2000	Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg		
2000-2001	Diplomarbeit am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Gruppe von Frau Professor Dr. Ulla Bonas		
	Thema:	Identifizierung neuer hrp Gene in Xanthomonas co	pG-abhängig regulierter ampestris pv. vesicatoria.
	Abschluss: Di	iplom-Biologe	
2001-2006	Promotionsarbeit am	Institut für Genetik der M	1artin-Luther-Universität
	Halle-Wittenberg in der Gruppe von Frau Professor Dr. Ulla Bonas		
	Thema:	Genombasierte Identifiz	ierung neuer potentieller
		Virulenzfaktoren von Xa pv. vesicatoria	inthomonas campestris