

# **Transkriptomische Analysen zur Xanthanproduktion in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Biologie  
der Universität Bielefeld

vorgelegt von  
**Javier Serrania Vallejo**  
aus Bielefeld

Juli 2008

## Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	Zusammenfassung .....	1
<b>B</b>	Einleitung .....	2
B.1	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	2
B.2	Bakterielle Exopolysaccharide .....	2
B.3	Wasserlösliche Polymerverdicker .....	3
B.4	Das Exopolysaccharid Xanthan .....	4
B.5	Die industrielle Produktion von Xanthan .....	5
B.6	Die Biosynthese von Xanthan .....	8
B.7	Kohlenstoffverwertung durch <i>Xanthomonas campestris</i> .....	10
B.8	Transkriptomische Analysen mittels Microarrays .....	14
B.9	Ziele der Arbeit .....	16
<b>C</b>	Material und Methoden .....	17
C.1	Material .....	17
C.1.1	Bakterienstämme .....	17
C.1.2	Plasmide .....	18
C.1.3	Primer .....	18
C.1.4	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	23
C.1.5	Enzyme .....	24
C.1.6	Software .....	25
C.1.7	Medien .....	25
C.1.7.1	Nährmedien .....	25
C.1.7.2	Medienzusätze .....	27
C.1.8	Puffer und Lösungen .....	28
C.1.8.1	Puffer zur Bakterienkonservierung .....	28
C.1.8.2	Puffer und Lösungen für Enzymreaktionen .....	28
C.1.8.3	Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese .....	28
C.1.8.4	Puffer für Microarray-Analysen .....	28
C.1.8.5	Puffer zur Xanthan-Konzentrationsbestimmung .....	29
C.2	Methoden .....	30
C.2.1	Mikrobiologische Methoden .....	30
C.2.1.1	Bakterienanzucht .....	30
C.2.1.2	Bestimmung des Bakterientiters .....	30
C.2.1.3	Konservierung der Bakterienkulturen .....	30
C.2.1.4	Motilitätstest .....	30
C.2.2	Isolation, Manipulation und Analyse von DNA .....	31
C.2.2.1	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> .....	31

C.2.2.2	Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel .....	32
C.2.2.3	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	32
C.2.2.4	DNA-Ligation .....	32
C.2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	33
C.2.2.6	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	34
C.2.2.7	Konstruktion der Deletions- und Insertionsmutanten.....	34
C.2.3	DNA-Transfermethoden.....	35
C.2.3.1	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	35
C.2.3.2	Konjugation.....	36
C.2.4	Mikroarray-Analysen.....	36
C.2.4.1	Genom-Genom Hybridisierung .....	36
C.2.4.1.1	Isolierung der genomischen DNA für Mikroarray-Analysen.....	36
C.2.4.1.2	Markierung der genomischen DNA für Mikroarray-Analysen.....	37
C.2.4.2	Genexpressionsanalysen mittels Mikroarray .....	39
C.2.4.2.1	RNA-Isolierung .....	39
C.2.4.2.2	Reverse Transkription der isolierten RNA .....	41
C.2.4.2.3	Fluoreszenzfärbung der cDNA .....	42
C.2.4.2.4	Hybridisierung der cDNA-Probe gegen den Mikroarray .....	43
C.2.4.3	Mikroarray Datenanalyse.....	43
C.2.5	Bestimmung der Xanthankonzentration.....	44
C.2.6	Quantitative RT-PCR.....	45
C.2.7	Diskontinuierliche Fermentation .....	46
<b>D</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
D.1	Genomvergleich zweier <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> Stämme mittels Mikroarray-Technologie.....	48
D.1.1	Der Mikroarray Xcc5kOLI .....	48
D.1.2	Genomvergleich der <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> Stämme B100 und LMG 8031*.....	50
D.2	Genexpressionsprofil einer Xcc-Fermentation.....	51
D.2.1	Diskontinuierliche Fermentation von Xcc LMG 8031* im 10 L-Maßstab.....	51
D.2.2	Transkriptomische Zeitreihe der Fermentation mittels Mikroarray-Technologie .....	52
D.2.3	„k-means“-Clustering der transkriptomischen Daten .....	56
D.2.4	Transkriptomisches Profil der Xanthan-Biosynthesegene .....	60
D.3	Genetische Manipulationen des Produktionsstammes Xcc LMG 8031*.....	61
D.3.1	Genetische Manipulation des <i>galU</i> -Gens zur Induktion der Expression.....	61
D.3.2	Analysen zur Genexpression der <i>galU</i> -Mutante .....	66
D.3.3	Genetische Manipulationen zur Inaktivierung der Motilität .....	67

D.3.3.1	Deletion des Flagellar-Regulatorgens <i>fleQ</i> .....	68
D.3.3.2	Deletion des Flagellar-Ankergens <i>flgE</i> .....	70
D.3.3.3	Motilitäts-Analysen der deletierten Stämme JSΔQ und JSΔE .....	72
D.3.4	Charakterisierung der Mutanten JSU, JSΔQ, und JSΔE .....	73
D.4	Analysen zur Galactoseverwertung in Xcc .....	75
D.4.1	Microarray-Analyse zur Galactoseverwertung .....	75
D.4.1.1	Gene, die in beiden Galactose-Wachstumsbedingungen eine Repression aufweisen.....	81
D.4.1.2	Gene, die in beiden Galactose-Wachstumsbedingungen eine Induktion aufweisen.....	82
D.4.2	qRT-PCR der Galactose-Verwertungsgene .....	83
<b>E</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>86</b>
E.1	Validierung des Microarrays Xcc5kOLI.....	86
E.2	Das genomweite Transkriptionsprofil einer Xcc-Fermentation .....	87
E.3	Stammentwicklung des Xanthan-Produktionsstammes Xcc LMG 8031* .....	89
E.3.1	Die Inaktivierung der Motilität führt zu keiner messbaren Erhöhung der Biomasse- oder Xanthanproduktion .....	89
E.3.2	Die Erhöhung der Genexpression des <i>galU</i> -Gens führt zu keiner messbaren Erhöhung der Xanthanproduktion.....	90
E.4	Galactoseverwertung in <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	91
E.4.1	Das Gen <i>sgIT</i> kodiert für einen möglichen Galactose-Transporter der inneren Membran.....	92
E.4.2	Die Galactose-Verwertungsregionen beinhalten Gene zur Degradierung von Galactose-haltigen Kohlenhydratverbindungen im Medium und Periplasma .	92
E.4.3	Zwei TonB-abhängige Rezeptoren sind mögliche Galactose-Transporter durch die äußere Membran .....	93
E.4.4	Die Galactose-Verwertungsregionen beinhalten Gene zur Verwertung von Galactose im Cytoplasma .....	94
E.4.5	Modell der Galactoseverwertung in Xcc .....	95
E.5	Ausblick .....	97
<b>F</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>98</b>
<b>G</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>102</b>
<b>H</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>111</b>
H.1	„k-means“-Cluster .....	111
H.2	Danksagung.....	128

## A Zusammenfassung

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) wird industriell zur Produktion des Exopolysaccharids Xanthan verwendet, das z.B. in der Lebensmittelindustrie als Verdickungsmittel eingesetzt wird. Xcc ist ebenfalls der Erreger der Aderschwärze bei der Pflanzenfamilie der Kreuzblütengewächse. In dieser Arbeit wurde ein genomweites transkriptomisches Profil einer Kultivierung in einem 10 L Bioreaktor erstellt. Zur Transkriptionsanalyse wurde der kürzlich entwickelte Microarray Xcc5kOLI verwendet. Es konnten zwei Genregionen identifiziert werden, die ein wachstumsphasenspezifisches Transkriptionsprofil aufwiesen. Eine der zwei Genregionen beinhaltet hauptsächlich Gene ribosomaler Proteine und zeigte eine Induktion in der exponentiellen und eine Repression in der stationären Wachstumsphase. Dieses Profil spiegelt wahrscheinlich die allgemeine metabolische Aktivität der Bakterienkultur wieder. Die zweite Genregion beinhaltet hauptsächlich Gene, die in die Flagellar-Biosynthese involviert sind. Diese Gene zeichnen sich durch eine Induktion in der exponentiellen und eine kurze erneute Induktion zu Beginn der stationären Phase aus.

Zu Zwecken der Stammoptimierung des Produktionsstammes Xcc LMG 8031\* wurde untersucht, ob die Inaktivierung der Motilität zu einer Erhöhung der Biomasse- oder Xanthanproduktion führt. Hierfür wurden Stämme produziert, die Deletionen in den Genen *fleQ* und *flgE* tragen. Das Gen *fleQ* kodiert für einen Regulator der Flagellar-Biosynthese und *flgE* für das Strukturprotein des Flagellar-Ankers. Beide Deletionen führten zu einem nicht motilen Phänotyp. Das transkriptomische Profil des Gens *galU* wies eine Reduktion der Genexpression im Übergang zur stationären Phase auf. GalU katalysiert die Umwandlung von Glucose-1-Phosphat zu UDP-Glucose, welches für die Xanthanproduktion benötigt wird. Durch Klonierung eines konstitutiv hoch exprimierten Promotors vor das *galU*-Gen wurde der Einfluss einer Überexpression auf die Xanthanproduktion untersucht. Weder die Verwendung der nicht motilen Stämme, mit den Deletionen in den Genen *fleQ* bzw. *flgE*, noch die Überexpression des *galU*-Gens führten zu einer erhöhten Biomasse- oder Xanthanproduktion.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Analyse der Kohlenstoffverwertung in Xcc. Hierfür wurden transkriptomische Analysen zur Kurzzeit- und Langzeitantwort des Stammes Xcc B100 auf die Anwesenheit von Galactose durchgeführt. Es konnten in dieser Arbeit drei Genregionen identifiziert werden, die sowohl im Kurzzeit- als auch Langzeitwachstum in Galactose eine Induktion der Gene im Vergleich zum Wachstum in Glucose aufweisen. Diese Genregionen beinhalteten unter anderem Gene für Glycosidasen, die in das Periplasma oder ins Medium exportiert werden. Ebenfalls sind die Gene zweier TonB-abhängiger Rezeptoren in den Genregionen lokalisiert, die für den Transport von Galactose durch die äußere Membran zuständig sein können. Das Genprodukt des Gens *sgIT* konnte als möglicher Galactosetransporter durch die innere Membran identifiziert werden. Auch liegen Gene für Enzyme des Galactoseabbaus im Cytoplasma in den Galactose-Verwertungsregionen. Somit war es möglich mit den Genen der drei identifizierten Galactose-Verwertungsregionen ein Modell der Galactoseverwertung in Xcc zu entwickeln.

## **B Einleitung**

### **B.1 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***

Die pflanzenpathogenen, gelbpigmentierten Pseudomonaden sind in der Gattung *Xanthomonas* zusammengefasst und gehören somit auch zu der Klasse der Gammaproteobakterien. Sie sind stäbchenförmig und polar begeißelt. Die einzelnen Spezies der Gattung *Xanthomonas* werden anhand ihrer Wirtsspezifität in unterschiedliche Pathovaren (pv.) unterteilt.

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) ist der Erreger der Adernschwärze bei der Pflanzenfamilie der Kreuzblütengewächse zu der auch die Gattung *Brassica* (Kohl) gehört. Der Befall mit Xcc führt bei der Pflanze zu einer Schwarzfärbung der Blattadern und im weiteren Verlauf zu einer Austrocknung des Blattgewebes. Die Infektion findet hierbei in der Regel durch die Hydathoden statt, kann aber auch über die Wurzel oder über Wunden am Pflanzengewebe erfolgen (Cook et al., 1952). Hat eine Infektion stattgefunden, so ist der Befall zunächst auf das Xylem begrenzt (Bretschneider et al., 1989). Durch die Vermehrung des Pathogens im Leitbündel und die Produktion des Exopolysaccharids Xanthan werden die Leitbündel verstopft und die Versorgung der Pflanzenzellen durch die Leitbündel verhindert. Für die Pathogenität ist die Xanthanproduktion zwar vorteilhaft jedoch nicht essentiell. So zeigen Stämme, die nicht mehr zur Xanthanproduktion fähig sind, eine reduzierte, aber noch vorhandene Pathogenität (Bretschneider et al., 1989; Ramirez et al., 1988; Shaw et al., 1988). Im weiteren Verlauf der Infektion sind die Bakterienzellen nicht mehr ausschließlich in den Leitbündeln zu finden. Es kommt zu der für die Krankheit typischen Schwarzfärbung der Blattadern durch Einlagerung von Melanin in die Interzellularräume.

Das von *Xanthomonas campestris* ausgeschiedene und enzymatisch schwer abbaubare Exopolysaccharid (Xanthan) wird industriell erzeugt und wässrigen Lösungen, wie z.B. Pudding, Diätsuppen oder Druckerschwärze, zur Erhöhung der Viskosität zugesetzt (Schlegel, 1992). *Xanthomonas campestris* wird daher weltweit zur biotechnologischen Produktion von Xanthan verwendet. Hierbei hat sich Xcc als biotechnologischer Produktionsstamm durchgesetzt.

### **B.2 Bakterielle Exopolysaccharide**

Bakterielle Exopolysaccharide bestehen aus sich wiederholenden Oligosaccharidgrundeinheiten, die linear oder verzweigt sein können. Durch die große Anzahl an Monosaccharidbausteinen und die Vielzahl möglicher glykosidischer Bindungen, ist eine hohe Vielfalt an möglichen Oligosaccharidgrundeinheiten gegeben. Die Art und

Anordnung der Monosaccharidbausteine sowie die Länge und die chemischen Modifikationen bestimmen hierbei die rheologischen und chemischen Eigenschaften der bakteriellen Exopolysaccharide. Im Vergleich zu Lipopolysacchariden sind Exopolysaccharide nicht fest mit der Zellwand verbunden und werden frei in die Umgebung abgegeben. Eine häufige und wichtige Funktion der Exopolysaccharide ist der Schutz des Bakteriums gegen eine Vielzahl von Stressfaktoren, wie z.B. ungünstige pH-Werte und Salzkonzentrationen oder Austrocknung. Exopolysaccharide können aber auch Funktionen in der molekularen Kommunikation übernehmen. Als Beispiele sollen hier die Erkennung des Symbiosepartners oder Funktionen in der Pathogenität genannt werden. Einige bakteriell produzierte Exopolysaccharide haben in der Industrie eine wichtige Rolle als biotechnologische Produkte erlangt. Hierbei bedient man sich der rheologischen und chemischen Eigenschaften der Exopolysaccharide. Die Verwendung als Polymerverdicker in Lebensmitteln und als Feuchtigkeitsspeicher in kosmetischen Produkten sind Beispiele für die industrielle Anwendung von Polysacchariden.

### B.3 Wasserlösliche Polymerverdicker

Wasserlösliche polymere Verdicker haben eine große wirtschaftliche Bedeutung und finden in vielen Feldern Anwendung, wie z.B. in der Lebensmittelindustrie, in der Kosmetik, in technischen Anwendungen als Bohrhilfsmittel oder als Flockungsmittel (Abb. B.1). Bei technischen Anwendungen handelt es sich bei den Produkten in der Regel um Polyacrylate oder deren Derivate. Vorteile dieser Produkte liegen in der kostengünstigen Produktion und den guten anwendungstechnischen Eigenschaften. Ein großer Nachteil der Polyacrylate und ihrer Derivate ist jedoch, dass sie nicht biologisch abbaubar sind und damit eine ökologische Belastung der Umwelt darstellen.



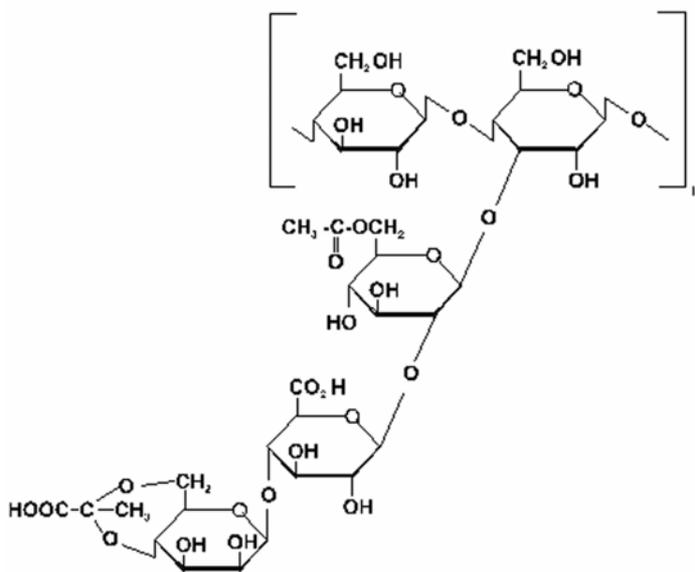
**Abb. B.1:** Auswahl handelsüblicher Xanthanhaltiger Produkte.

In vielen Fällen könnten mikrobielle Polysaccharide, wie z.B. das von *Xanthomonas campestris* synthetisierte Xanthan, diese petrochemischen Verdicker ersetzen. Im

Lebensmittelbereich erfahren Xanthan und andere mikrobielle Polysaccharide, wie z.B. Carrageenan, bereits einen verbreiteten Gebrauch. Im Bereich der technischen Anwendungen führt Xanthan jedoch noch ein Schattendasein. Abb. B.1 zeigt eine Reihe von handelsüblichen Produkten, die Xanthan beinhalten.

## B.4 Das Exopolysaccharid Xanthan

Xanthan ist ein Heteropolysaccharid, bestehend aus sich wiederholenden Pentasacchariden. Jedes Pentasaccharid ist aufgebaut aus zwei D-Glucosezuckern, zwei D-Mannosezuckern und einer D-Glucuronsäure (Abb. B.2).



**Abb. B.2:** Die chemische Struktur des Xanthans (Becker et al., 1998). Abgebildet ist die Pentasaccharid-Grundeinheit. Jedes Pentasaccharid besteht aus zwei  $\beta$ 1-4 verknüpften D-Glucosezuckern, die die Hauptkette des Xanthan bilden, und einer Trisaccharid Seitenkette aus zwei Mannosezuckern und einer Glucuronsäure zwischen den beiden Mannosebausteinen. Beide Mannosebausteine können acetyliert vorliegen und der terminale Mannosebaustein kann auch pyruviliert sein.

Die Hauptkette besteht aus Glucosezuckern, die  $\beta$ 1-4 verknüpft sind. Die chemische Struktur der Hauptkette ist somit identisch mit der chemischen Struktur der Cellulose. Jeder zweite Glucosezucker der Hauptkette trägt eine Seitenkette mit zwei Mannosezuckern und einer Glucuronsäure zwischen diesen beiden. Beide Mannoseeinheiten können acetyliert und die terminale Mannoseeinheit auch pyruviliert sein (Jansson et al., 1975; Melton et al., 1976; Stankowski et al., 1993). Der Grad der Pyruvilyierung und der Acetylierung schwankt mit den Bedingungen der Kultivierung und den zur Xanthanproduktion verwendeten Stämmen von *Xanthomonas campestris*. So liegt normalerweise der Pyruvilyierungsgrad bei ca. 50 % und der Acetylierungsgrad bei ca. 60-70 % für den inneren Mannosezucker und bei ca. 20 % für den terminalen Mannosezucker (Becker et al., 1998; Stankowski et al., 1993). Die einzelnen

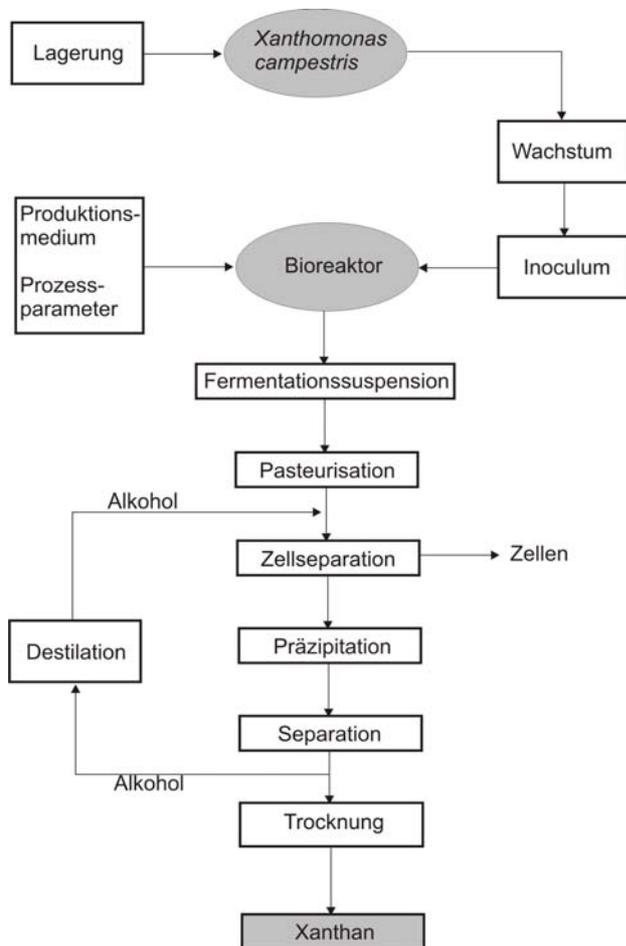
Xanthanketten kommen in Einfach-, Doppel- und Dreifachhelices vor wobei das Molekulargewicht von Xanthan in einem Bereich von  $2 \times 10^6$  bis  $20 \times 10^6$  Da liegt (Garcia-Ochoa et al., 2000; Milas & Rinaudo, 1979). Die einzelnen stäbchenförmigen Moleküle bilden durch intermolekulare Assoziation ein verknäultes Netz, welches die Viskosität der Lösung erhöht. Dieses Netz der Polymerketten ist für die pseudoplastischen Fließigenschaften verantwortlich, da bei höheren Scherkräften das Netz aufgelöst wird und damit die Viskosität der Lösung abnimmt.

### **B.5 Die industrielle Produktion von Xanthan**

Das Exopolysaccharid Xanthan wurde in den 50er Jahren in den *Northern Regional Research Laboratories* (NRRL) des US-Landwirtschaftsministerium entdeckt (Garcia-Ochoa et al., 2000; Margaritis & Zajic, 1978). Das vom Bakterienstamm *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 produzierte Polysaccharid B-1459, oder Xanthan, wurde in den darauf folgenden Jahren intensiv auf seine chemischen Eigenschaften und technischen Anwendungsmöglichkeiten untersucht. 1967 begann anschließend die kommerzielle Produktion und bis heute stellt Xanthan ein beeindruckendes biotechnologisches Produkt dar (Garcia-Ochoa et al., 2000). In Europa ist Xanthan als Lebensmittelzusatzstoff mit der E-Nummer 415 zugelassen.

Die industrielle Xanthanproduktion lässt sich in zwei Produktionsabschnitte einteilen. In der ersten Phase der Xanthanproduktion wird der Produktionsstamm, unter möglichst optimalen Xanthan-Produktionsbedingungen, kultiviert. Im zweiten Produktionsabschnitt muss nun das Xanthan aus der Zellsuspension isoliert und aufbereitet werden. Abb. B.3 zeigt schematisch die einzelnen Arbeitsschritte einer typischen industriellen Xanthanproduktion. Für die Xanthanproduktion muss ein geeigneter Produktionsstamm in einer Art gelagert werden, bei der sich der Stamm nicht über die Zeit verändert. Hierfür wird der Stamm üblicherweise in lyophilisiertem Zustand oder in eingefrorenen Glycerinkulturen gelagert. Vor der eigentlichen Fermentation muss ein geeignetes Inoculum hergestellt werden. Zum Aufbau des Inoculums wird eine kleine Menge des Produktionsstammes aus der Langzeitlagerung entnommen und der ersten Vorkultur zugegeben. Das Volumen des Inoculums sollte 5-10 % des gesamten Flüssigkeitsvolumens im Gefäß betragen. Dem zufolge hängt die Anzahl der nötigen Vorkulturstufen vom Volumen des Produktionsfermenters ab (Garcia-Ochoa et al., 2000). Da Xanthan die Zellen umhüllt und den Transport von Nährstoffen und Sauerstoff zur Zelle behindert, führt eine hohe Xanthankonzentration im Inoculum zu einer verlängerten lag-Phase in der Produktionsfermentation. Daher werden beim Aufbau des Inoculums in der Regel Medien verwendet, die auf Wachstum und geringe Xanthanproduktion optimiert sind (Garcia-Ochoa et al., 2000). Während der Produktionsfermentation sind die Prozessparameter für die Produktivität und die Ausbeute an Xanthan entscheidend. Einige

wichtige Parameter sind die Temperatur, der pH-Wert, die Bauweise des Fermenters und des Rührers. Die optimale Produktionstemperatur liegt bei 28 °C. In vielen Studien wird auch eine Produktionstemperatur von 30 °C verwendet, wobei der Unterschied in der Xanthan-Produktion zwischen den beiden verwendeten Temperaturen sehr gering ist (Garcia-Ochoa et al., 1997; Garcia-Ochoa et al., 2000; Moraine & Rogovin, 1966).



**Abb. B.3:** Darstellung eines industriellen Xanthan-Produktionsprozesses (Garcia-Ochoa et al., 2000). Zu Beginn einer industriellen Xanthanproduktion muss der verwendete Produktionsstamm zur Bildung des Inoculums aus der Langzeitlagerung entnommen werden. Während der Kultivierung des Inoculums sollte die Xanthanproduktion reprimiert werden, da Xanthan eine Verlängerung der lag-Phase verursacht. Nach der Produktionsfermentation wird die Zellsuspension pasteurisiert und folgend unlösliche Partikel durch Filtration entfernt. Anschließend wird das Xanthan durch Zugabe von Alkoholen wie z.B. Methanol, Ethanol oder Isopropanol präzipitiert und von der Suspension abgetrennt. Am Ende muss das noch feuchte Xanthan getrocknet, gemahlen und wasserdicht verpackt werden.

Der pH-Wert wird in der Regel durch pH-Messapparaturen kontrolliert und bei einem neutralen pH-Wert von 7 konstant gehalten. Es ist aber auch möglich den pH-Wert nicht zu beeinflussen. In diesem Fall sinkt der pH-Wert im Verlauf der Kultivierung durch das produzierte Xanthan auf ca. pH 5 ab. Untersuchungen des pH-Effekts auf die Xanthanproduktion haben gezeigt, dass ein konstant neutraler pH-Wert das Wachstum

fördert aber nur geringe Auswirkung auf die Xanthanausbeute hat. Der Grund hierfür liegt in der erhöhten Xanthanproduktion der Zellen in der stationären Phase bei nicht kontrolliertem pH-Wert (Garcia-Ochoa et al., 1996; Garcia-Ochoa et al., 2000). Da Xcc ein obligat aerobes Bakterium ist und das Produkt Xanthan die Zellkultur verdickt, ist die Sauerstofftransferrate (OTR) eine Schlüsselgröße der Xanthanproduktion. Die OTR hängt von der Bauweise des Bioreaktors, der Sauerstoffzufuhr, der Viskosität und der Rührerdrehzahl ab. Für die Bauweise des Bioreaktors hat sich der Kessel mit Rührer durchgesetzt. In einigen Publikationen wird aber auch die Verwendung von Blasensäulen oder anderen Apparaturen zur Xanthanproduktion beschrieben (Garcia-Ochoa et al., 2000; Pons et al., 1989; Pons et al., 1990; Suh et al., 1992; Zaidi et al., 1991). Durch die hohen Viskositäten, die während der Produktion erreicht werden, wird der Sauerstofftransport limitiert. Dieser hängt, wie oben schon erwähnt, auch von der Rührerdrehzahl und der Sauerstoffzufuhr ab. Üblicherweise wird hierbei die Sauerstoffzufuhr konstant gehalten und die Rührerdrehzahl im Verlauf der Kultivierung erhöht.

Ist die Kultivierung beendet so beginnt der zweite Abschnitt der Xanthanproduktion. Dieser beinhaltet die Aufreinigung und Aufbereitung des in der Zellsuspension gelösten Xanthans zu dem versandfertigen biotechnologischen Produkt. Je nach Verwendungszweck des fertigen Produktes sind unterschiedliche Aufbereitungsschritte oder entsprechende Wiederholungen mancher Schritte nötig. So ist es sicher ein Unterschied ob das produzierte Xanthan als Lebensmittelzusatzstoff oder in der Ölindustrie als Bohrzusatzmittel verwendet werden soll. Des Weiteren sollen hier kurz die allgemeinen Schritte einer typischen Xanthanaufbereitung beschrieben werden. Die Zellsuspension besteht nach einer Produktionsfermentation aus ca. 10-30 g/l Xanthan, 1-10 g/l Bakterienzellen und 3-10 g/l noch nicht verbrauchten Nährstoffen (Garcia-Ochoa et al., 1993). Der erste Schritt ist hierbei die Inaktivierung der Bakterienzellen. Die Pasteurisation bietet sich für diesen Schritt besonders an, da durch die erhöhte Temperatur die Viskosität der Suspension abnimmt und dadurch die Handhabung für die folgenden Schritte erleichtert wird. Geeignete Bedingungen für die Inaktivierung der Mikroorganismen sind hierbei eine Temperatur von 80-130 °C für 10-20 min bei pH 6,3-6,9 (Smith & Park, 1982). Die Sterilisation kann auch mittels Zugabe von Chemikalien oder Enzymen erfolgen, jedoch müssen diese normalerweise wieder kostenintensiv entfernt werden und haben nicht den reduzierenden Effekt auf die Viskosität der Lösung. Nach der Inaktivierung müssen die Bakterienzellen und andere Partikel abgetrennt werden. Dies geschieht in der Regel mittels Filtrationsschritten. Die hohe Viskosität macht es hierbei meistens notwendig den Filtrationsschritten einen Verdünnungsschritt vorzuschalten. Verdünnt werden kann mit Wasser, Alkohol oder Mixturen aus Alkohol und Salzen wobei Konzentrationen verwendet werden müssen die nicht zu einer Präzipitation des Xanthans führt (Garcia-Ochoa et al., 1993; Smith & Park, 1982). Sind die

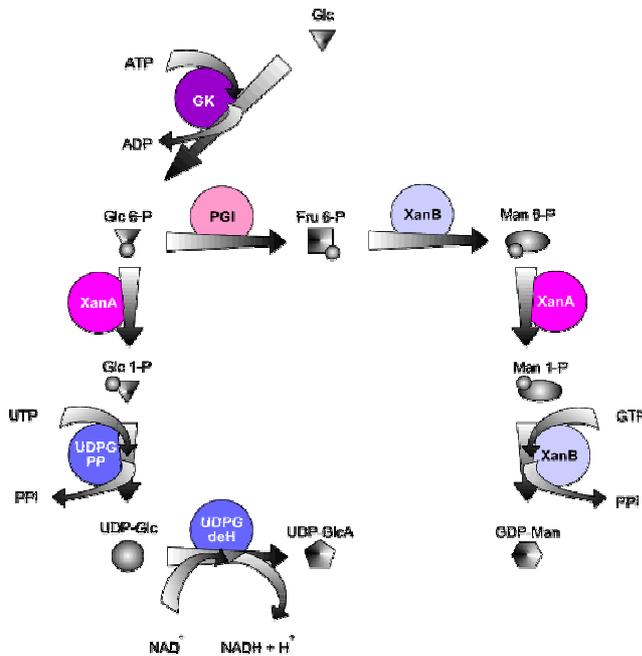
wasserunlöslichen Partikel aus der Suspension entfernt kann mit der Abtrennung des Xanthans begonnen werden. Die Zugabe von Alkoholen wie Methanol, Ethanol oder Isopropanol führt, bei entsprechend hohem Verhältnis, zu einer Präzipitation des Xanthans, welches in einem nachfolgenden Schritt die Abtrennung von der Suspension ermöglicht (Gonzalez et al., 1989). Der Alkohol kann nach der Abtrennung des Xanthans aus der Suspension destilliert werden und zur Kostenreduktion erneut verwendet werden. Das feuchte Präzipitat muss anschließend noch getrocknet und gemahlen werden. Hierbei gilt, je feiner die Körnung des Xanthanpulvers desto besser lässt es sich in Flüssigkeiten wieder lösen. Abschließend muss das fertige Produkt verpackt werden. Hierbei ist besonders auf die Wasserdichte der Verpackung zu achten, da Xanthan hygroskopisch ist.

### **B.6 Die Biosynthese von Xanthan**

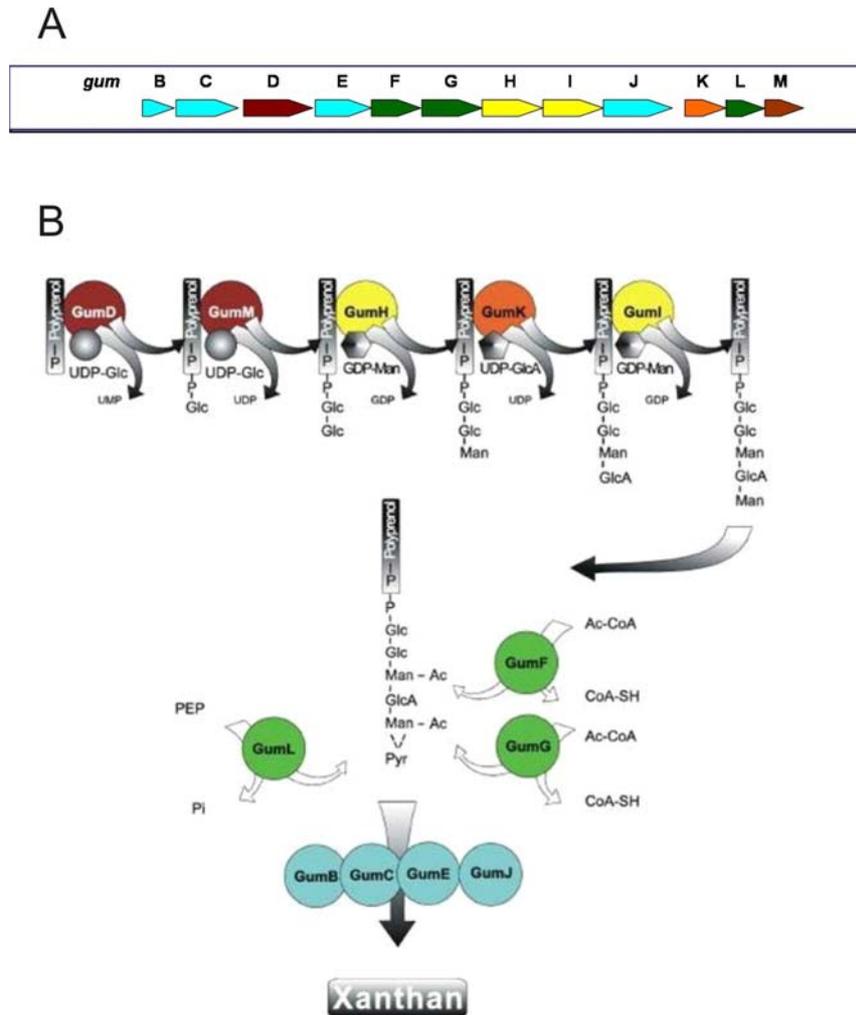
Die Umwandlung von Zuckern in aktivierte Zuckervorstufen ist der erste Schritt in der Biosynthese des Exopolysaccharids Xanthan. Hierbei sind die Enzyme für die Synthese von GDP-Mannose, UDP-Glucose und dTDP-Rhamnose in einem 35,3 kb-Gencluster lokalisiert (Hötte et al., 1990; Köplin et al., 1993). Zwei wichtige Gene zur Xanthan-Biosynthese sind die Gene *xanA* und *xanB*. *xanA* kodiert hierbei für ein Enzym mit Phosphoglucomutase- und Phosphomannomutase-Aktivität. Das Genprodukt von *xanB* ist ein bifunktionales Enzym mit Phosphomannose Isomerase- und GDP-Mannose Phosphorylase-Aktivität (Köplin et al., 1992). Diese Gene liegen ebenfalls in dem oben genannten Gencluster und spielen eine entscheidende Rolle in der Synthese der aktivierten Zucker UDP-Glucose und GDP-Mannose. Für die Xanthan-Biosynthese werden die aktivierten Zucker UDP-Glucose, GDP-Mannose und UDP-Glucuronsäure benötigt. Abb. B.4 zeigt den Syntheseweg der Zuckerbausteine.

Die Enzyme, die für die weitere Xanthan-Synthese benötigt werden, sind in einem 16 kb Gencluster im Xcc-Genom kodiert. Dieses so genannte *gum*-Gencluster (Abb. B.5A) beinhaltet zwölf offene Leseraster [(*gumB* bis *gumM*) (Capage et al., 1987; Harding et al., 1987)]. Die transkriptionelle Organisation der *gum*-Gene wurde mittels *lacZ*-Fusionsreportergene untersucht (Katzen et al., 1996). Die Promotoranalysen zeigten, dass die *gum*-Region in einem Operon organisiert ist und von einem Promotor vor *gumB* aus exprimiert wird. Ebenfalls wurde ein zweiter Promotor vor *gumK* identifiziert. Die zwölf Genprodukte des *gum*-Genclusters lassen sich sowohl in Glycosyltransferasen als auch in modifizierende Enzyme sowie in Enzyme, die für die Polymerisation und den Transport von Xanthan zuständig sind, einteilen (Katzen et al., 1998). Mit Hilfe von entsprechenden Mutanten und der Analyse der gebildeten Xanthanvorstufen konnte ein Modell der Xanthan-Biosynthese erstellt werden [(Abb. B.5B) (Katzen et al., 1998)]. So katalysiert das Genprodukt von *gumD* den initialen Schritt der Xanthan-Biosynthese, bei dem

Glucose-1-phosphat aus UDP-Glucose, unter Abspaltung von UMP, auf den Polyisoprenol-P Akzeptor transferiert wird. Nachfolgend sind die Genprodukte der Gene *gumM*, *gumH*, *gumK* und *gumI* für die sequenzielle Verlängerung der Saccharidkette um die Bausteine Glucose, Mannose, Glucuronsäure und der endständigen Mannose zuständig. Am Ende dieses Prozesses liegt die Pentasaccharid-Grundeinheit des Xanthans gebunden an einem Polyisoprenoldiphosphat-Anker vor. Für die Acetylierung der Mannosebausteine sind die Genprodukte der Gene *gumF* und *gumG* zuständig. Dabei acetyliert das Protein GumF den mittleren Mannosebaustein und GumG den endständigen Mannosebaustein. Die Pyruvlierung des endständigen Mannosebausteins wird durch das Enzym GumL katalysiert (Katzen et al., 1998). Die Genprodukte der Gene *gumB*, *gumC*, *gumE* und *gumJ* sind in die Polymerisation und den Export des Exopolysaccharids involviert (Katzen et al., 1998). In Abb. B.5A ist die Anordnung der Gene im *gum*-Gencluster dargestellt. Abb. B.5B zeigt schematisch den Syntheseweg der Xanthanproduktion und die beteiligten Enzyme.



**Abb. B.4:** Synthese der Nucleotidzucker-Vorstufen (Becker et al., 1998; Köplin et al., 1992; Sutherland, 1977). Abkürzungen: Fru 6-P, Fructose-6-phosphat; GK, Glucokinase; Glc, Glucose; Glc 6-P, Glucose-6-phosphat; Glc 1-P, Glucose-1-Phosphat; UDP-Glc, UDP-Glucose; UDP-GlcA, UDP-Glucuronsäure; Man 6-P, Mannose-6-phosphat; Man 1-P, Mannose-1-phosphat; GDP-Man, GDP-Mannose; PGI, Phosphoglucose Isomerase; UDPG-deH, UDP-Glucose Dehydrogenase; UDPG-PP, UDP-Glucose Pyrophosphorylase.

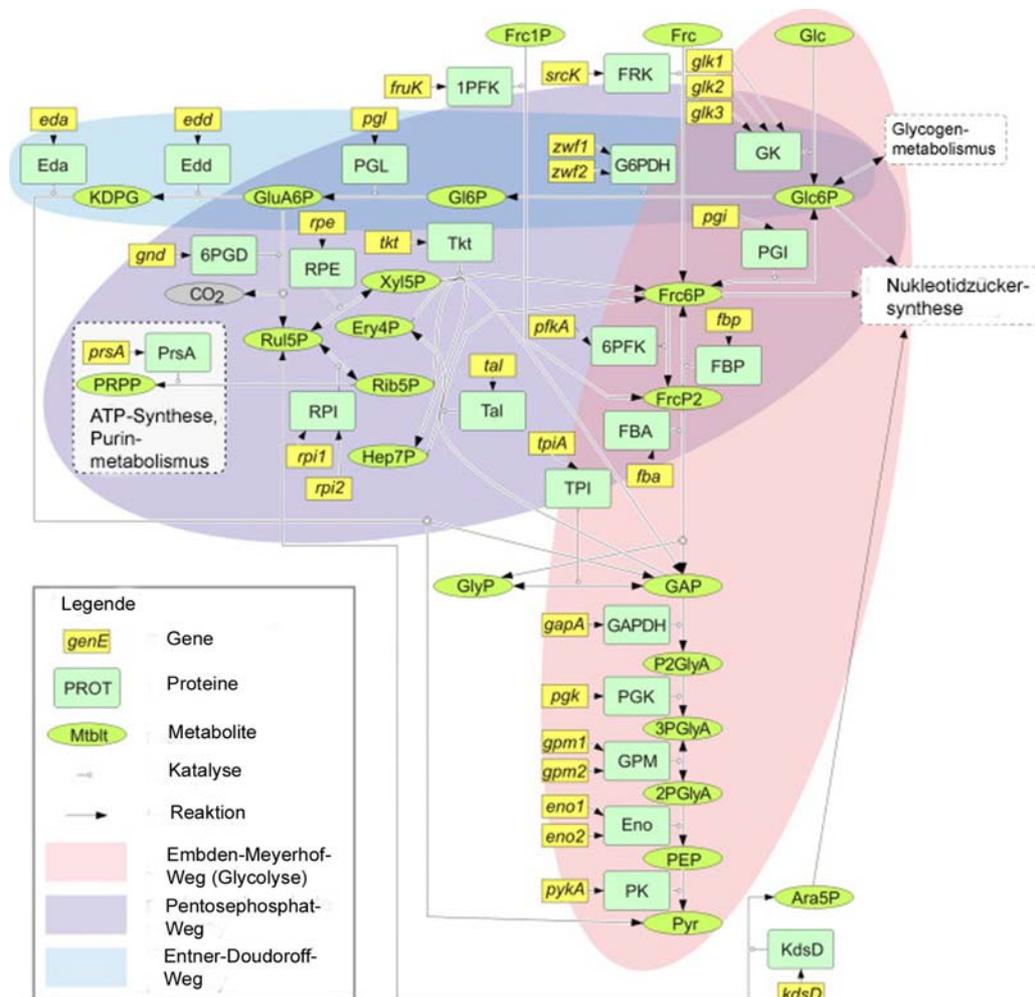


**Abb. B.5:** Schematische Darstellung der Xanthan Biosynthese (Becker et al., 1998). A) Anordnung der *gum*-Gene im *gum*-Gencluster. B) Xanthan Biosyntheseweg und die involvierten Enzyme (Katzen et al., 1998). Farbcode: Braun, Glucosyltransferase; Gelb, Mannosyltransferase; Grün, Dekorationsenzyme; Orange, Glucuronsäure-Transferase; Türkis, Polymerisations- und Exportenzyme. Abkürzungen: Ac, Acetyl; Ac-CoA, Acetyl-CoA; Glc, Glucose; UDP-Glc, UDP-Glucose; GlcA, Glucuronsäure; UDP-GlcA, UDP-Glucuronsäure; Man, Mannose; GDP-Man, GDP-Mannose; PEP, Phosphoenolpyruvat; Pyr, Pyruvat.

## B.7 Kohlenstoffverwertung durch *Xanthomonas campestris*

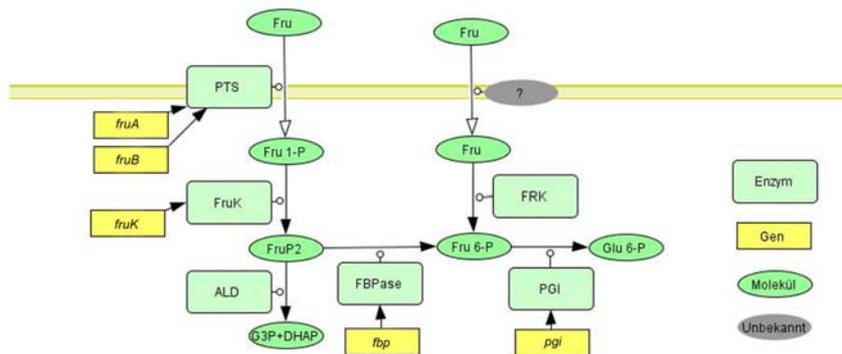
Die Aufnahme und Verwertung von unterschiedlichen Kohlenstoffquellen durch *Xanthomonas campestris* dient in erster Linie der Energiegewinnung. Sie spielt jedoch auch eine Rolle für die Xanthanproduktion und der Pathogenität. So können die aufgenommenen Kohlenstoffquellen im Cytoplasma verdaut oder zur Bereitstellung der aktivierten Zucker verwendet werden. Im Hinblick auf den Verlauf der pathogenen Interaktion mit der Wirtspflanze ist das Erkennen und der Verdau von Polysacchariden der Pflanzenzellwand von Nöten (Blanvillain et al., 2007; Gough et al., 1988; Lerouxel et al., 2006; Seifert & Roberts, 2007).

Bis zu diesem Zeitpunkt sind nur die Aufnahme und Verwertung von Glucose (Pielken et al., 1988; Vorhölter et al., 2008; Whitfield et al., 1982), Fructose (Crecy-Lagard et al., 1991a; Crecy-Lagard et al., 1991b; Crecy-Lagard et al., 1995) und Sucrose (Blanvillain et al., 2007) in *Xanthomonas campestris* genauer untersucht worden. Untersuchungen der Glucoseverwertung mittels radioaktiv markierter Glucose und enzymologischer Untersuchungen haben gezeigt, dass Glucose in Xcc hauptsächlich über den Entner-Doudoroff-Weg katabolisiert und nur ein geringer Anteil über den Pentosephosphat-Weg abgebaut wird (Pielken et al., 1988; Whitfield et al., 1982). Die Annotation des sequenzierten Genoms des Xcc B100-Stammes haben gezeigt, dass alle relevanten Gene für den Entner-Doudoroff-Weg, den Embden-Meyerhof-Weg (Glycolyse) und dem Pentosephosphat-Weg vorhanden sind [(Abb. B.6)(Vorhölter et al., 2008)].



**Abb. B.6:** Kohlenhydratmetabolismus bei Xcc (Vorhölter et al., 2008). Die Annotation des sequenzierten Genoms von Xcc B100 hat gezeigt, dass alle essenziellen Gene, die für die Kohlenhydratabbauege Embden-Meyerhof-Weg (Glycolyse), Pentosephosphatweg und Entner-Doudoroff-Weg nötig sind, im Genom vorhanden sind. Xcc baut Glucose hauptsächlich über den Entner-Doudoroff-Weg ab. Ein geringer Anteil wird auch über den Pentosephosphatweg verwertet (Pielken et al., 1988; Whitfield et al., 1982).

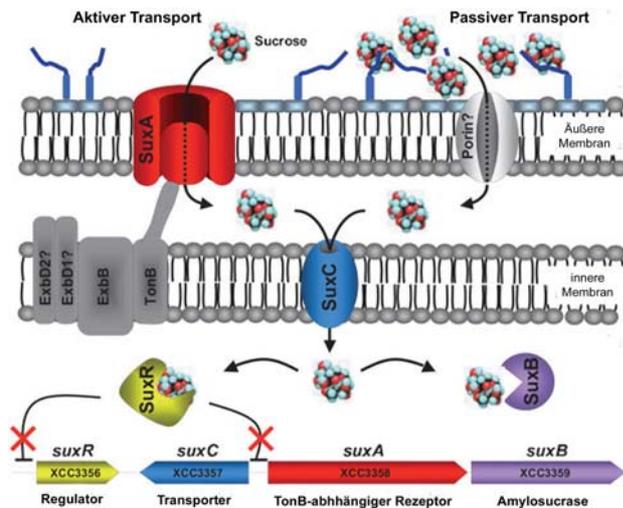
Fructose (Fru) wird von Xcc hauptsächlich durch ein Phosphotransferasesystem (PTS) aufgenommen (Abb. B.7). Dabei wird die aufgenommene Fructose zu Fructose-1-Phosphat (Fru 1-P) phosphoryliert. An diesem Schritt sind die Genprodukte der Gene *fruA* und *fruB* beteiligt (Crecy-Lagard et al., 1991a; Crecy-Lagard et al., 1991b; Crecy-Lagard et al., 1995). In einer anschließenden Reaktion wird Fru 1-P durch das Protein FruK zu Fructose-1,6-bisphosphat (FruP2) phosphoryliert. FruP2 kann im Folgenden entweder, mittels einer Fructose-1,6-bisphosphataldolase (ALD), zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) oder, mittels einer Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), zu Fructose-6-Phosphat (Fru 6-P) umgewandelt werden. Fru 6-P wird anschließend mittels einer Phosphoglucosomerase (PGI) in Glucose-6-Phosphat umgewandelt und anschließend im Entner-Doudoroff-Weg abgebaut. Das G3P und DHAP kann über den Embden-Meyerhof-Weg (Glycolyse) abgebaut werden. Des Weiteren konnte mittels PTS-Defizienten Mutanten gezeigt werden, dass in der Zelle vorkommendes Fructose mittels einer Fructokinase (FRK) zu Fru 6-P phosphoryliert wird. Es muss also noch einen unbekanntem Transportweg für Fructose neben dem PTS geben (Crecy-Lagard et al., 1991a; Crecy-Lagard et al., 1991b; Crecy-Lagard et al., 1995).



**Abb. B.7:** Darstellung des Fructosemetabolismus durch Xcc (Crecy-Lagard et al., 1991a; Crecy-Lagard et al., 1991b; Crecy-Lagard et al., 1995). Xcc nimmt Fructose hauptsächlich über ein Phosphotransferasesystem (PTS) auf. Hierbei wird die Fructose zu Fructose-1-phosphat phosphoryliert. Durch eine weitere Phosphorylierung entsteht Fructose-1,6-bisphosphat. Dieses kann im weiteren Verlauf auf zwei unterschiedlichen katabolischen Wegen abgebaut werden. Bei der ersten Möglichkeit wird Fructose-1,6-bisphosphat durch eine Fructose-1,6-bisphosphataldolase zu Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat umgewandelt und im Embden-Meyerhof-Weg (Glycolyse) weiter abgebaut. Bei der zweiten Möglichkeit wird Fructose-1,6-bisphosphat erst durch eine Fructose-1,6-bisphosphatase zu Fructose-6-Phosphat umgewandelt um anschließend durch eine Phosphoglucosomerase zu Glucose-6-Phosphat umgewandelt zu werden. Dies kann nachfolgend im Entner-Doudoroff-Weg weiter abgebaut werden. Des Weiteren besitzt Xcc eine Fructokinase die unphosphorylierte Fructose im inneren der Zelle zu Fructose-6-phosphat umwandeln kann. Ein zusätzlicher Transportweg für Fructose in die Zelle scheint vorhanden zu sein, konnte aber noch nicht genauer identifiziert werden. Symbole: Schwarze Pfeile, Umwandlungsreaktion; Offene Kreise, Katalysator der Reaktion. Abkürzungen: ALD, Fructose-1,6-bisphosphataldolase; DHAP, Dihydroxyacetonphosphat; FBPase, Fructose-1,6-bisphosphatase; FRK, Fructokinase; Fru, Fructose; Fru 1-P, Fructose-1-phosphat; Fru 6-P, Fructose-6-phosphat; FruP2, Fructose-1,6-bisphosphat; G3P, Glycerinaldehyd-3-phosphat; PGI, Phosphoglucosomerase; PTS, Phosphotransferasesystem.

Die Sucroseverwertung durch Xcc zeigt eine Besonderheit des *Xanthomonas* Kohlenstoffmetabolismus auf. Die Genome der sieben sequenzierten *Xanthomonas* Stämme, Xcc 8004 (Qian et al., 2005), Xcc ATCC33913 (Da Silva et al., 2002), Xcc B100 (Vorhölter et al., 2008), *Xanthomonas axinipodis* pv. citri [(Xac)(Da Silva et al., 2002)], *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria [(Xcv)(Thieme et al., 2005)], *Xanthomonas orizae* pv. orizae (Xoo) KACC10331 (Lee et al., 2005) und Xoo MAFF311018 (Ochiai et al., 2005), zeigen eine Überrepräsentation an TonB-abhängigen Rezeptoren („TonB-dependent receptor“, TBDR). TBDR sind hauptsächlich für den Transport von Eisensiderophorkomplexen und Vitamin B12 in das Periplasma von gramnegativen Bakterien bekannt (Nikaido, 2003). Dabei unterliegen die meisten TBDR der Regulation durch den so genannten Fur-Repressor („ferric uptake regulator“) und werden bei Eisenmangel aktiviert (Bagg & Neilands, 1987). Eine Überrepräsentation von TBDR (TBDR/Mbs Verhältnis > 7,4), ähnlich der bei *Xanthomonas*, ist nur bei einer kleinen Anzahl weiterer Bakteriengattungen, mit hauptsächlich marinen Habitaten, zu finden. Die Gemeinsamkeit der Bakteriengattung liegt in der Fähigkeit komplexe Kohlenhydrate verwerten zu können (Blanvillain et al., 2007). Daher liegt die Vermutung nahe, dass einige TBDR ebenfalls eine Rolle in der Kohlenhydratverwertung, beziehungsweise dem Transport, spielen. Bei der Sucroseverwertung in Xcc konnte dies mittels Mutationsanalysen, Expressionsanalysen und Transportuntersuchungen gezeigt werden [(Abb. B.8)(Blanvillain et al., 2007)]. Hierbei wird Sucrose durch den TBDR SuxA durch die äußere Membran transportiert. SuxC ist für den Transport der Sucrose durch die innere Membran ins Cytoplasma verantwortlich. Im Cytoplasma kann Sucrose nun den Repressor SuxR inaktivieren. Dies wiederum führt zu einer Induzierung der Transkription der *sux*-Gene. Im Cytoplasma wird Sucrose durch die Amylosucrase zu Fructose umgewandelt (Blanvillain et al., 2007).

Mutationsanalysen deuten darauf hin, dass es, neben dem TBDR SuxA-Transport, auch noch einen passiven Transportweg durch die äußere Membran gibt. Der Transport durch die innere Membran hingegen scheint ausschließlich mittels dem Transporter SuxC möglich zu sein, da ein *suxC*-Deletionsstamm nicht mehr in Medien mit Sucrose als einzige Kohlenstoffquelle wächst (Blanvillain et al., 2007). Die vier Gene, die für SuxA (TBDR), SuxB (Amylosucrase), SuxC (Transporter innere Membran) und SuxR (Regulator) kodieren, liegen in einem Gencluster, der so genannten *sux*-Genregion („sucrose utilization in *Xanthomonas*“). Dabei bilden *suxA* und *suxB* ein Operon (Blanvillain et al., 2007).

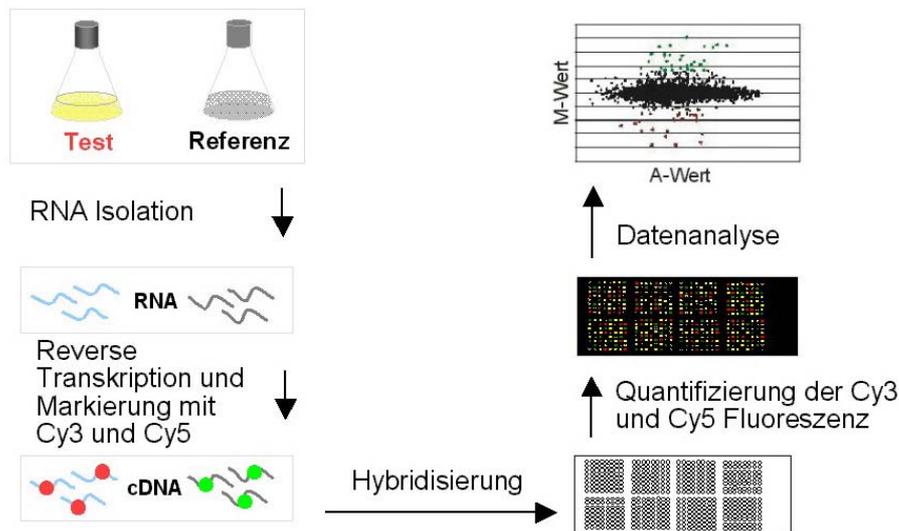


**Abb. B.8:** Darstellung der Sucroseverwertung durch Xcc (Blanvillain et al., 2007). Sucrose wird durch den TBDR SuxA durch die äußere Membran geschleust und mittels SuxC durch die innere Membran transportiert. Die Amylosucrase SuxB wandelt die Sucrose in Fructose um. Sucrose inaktiviert den Repressor SuxR und führt somit zu einer Induzierung der *suc*-Gene. Des Weiteren legen Mutationsanalysen nahe, dass es noch einen weiteren Sucrosetransporter in der äußeren Membran gibt.

## B.8 Transkriptomische Analysen mittels Microarrays

Die Microarray-Technologie ermöglicht einen Hochdurchsatz-Screening der Genexpression des zu untersuchenden Organismus. Die Herstellung eines dem Einsatzgebiet entsprechenden Microarrays ist bei dieser Technik der erste Schritt. Zur Herstellung eines Microarrays für einen bestimmten Organismus, der möglichst alle Gene abdeckt, benötigt man die genomische Sequenz und eine möglichst gute Annotation. Ein DNA-Microarray besteht hierbei aus mehreren tausend unterschiedlichen DNA-Oligonukleotiden, die auf kleinstem Raum auf einem entsprechenden Trägermaterial (z.B. Epoxyglasobjektträger) aufgetragen werden. Jedes Oligonukleotid repräsentiert hierbei ein entsprechendes Zielgen und sollte möglichst einzigartig sein, damit Kreuzhybridisierungen im späteren Verlauf der Prozessierung minimiert werden. Die Oligonukleotide haben in der Regel Längen im Bereich von 50 bis zu ca. 200 Basen und werden kovalent an die Trägeroberfläche gebunden, wobei die Position auf der Trägeroberfläche für jedes Oligonukleotid bekannt ist und die Signale den entsprechenden Oligonukleotiden zugeordnet werden können. Liegt ein solcher Microarray vor, so können vergleichende Genexpressionsanalysen durchgeführt werden. Hierfür ist es erforderlich die gesamte RNA aus den zwei zu vergleichenden Proben zu isolieren. Die gewonnene RNA wird mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben, die dann jeweils mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert wird. Cy3 und Cy5 sind dabei gängige Fluoreszenzfarbstoffe. Die so markierten cDNA-Proben können nun gemeinsam gegen den Microarray hybridisiert und mittels entsprechender Software ausgewertet werden. Das Ergebnis ist dabei ein Gesamtüberblick der Unterschiede in der Genexpression zweier

Zustände. In Abb. B.9 ist der Arbeitsverlauf eines Microarray-Experimentes schematisch dargestellt. Es ist auch möglich, mittels eines Microarrays, Genomvergleiche durchzuführen. Hierbei wird die genomische DNA zweier Stämme isoliert, mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und gegen den Microarray hybridisiert. Durch die Analyse der Signalstärken können nun deletierte Genregionen identifiziert werden. Dabei ist zu beachten, dass nur Gene untersucht werden können, die auch auf dem Microarray repräsentiert sind. So können Insertionen, die in dem Microarray zugrunde liegendem Genom nicht vorkommen, nicht detektiert werden. Mit dem Genomvergleich mittels Microarray-Technologie kann somit schnell ein Überblick über die genomische Diversität zweier Stämme gewonnen werden.



**Abb. B.9:** Schematische Darstellung des Arbeitsverlaufes eines Microarray-Experimentes. Diese Technik erlaubt die differentielle Betrachtung der Expression jedes Gens, das auf dem Mikroarray repräsentiert ist, zu zwei verschiedenen Zuständen. Mittels reverser Transkription der isolierten RNA wird die cDNA amplifiziert. Die cDNA beider Zustände werden unterschiedlich markiert (z.B. Cy3 und Cy5) und gegen den Microarray hybridisiert. Die Spots werden identifiziert und quantifiziert.

## **B.9 Ziele der Arbeit**

Xanthan ist ein wichtiges biotechnologisches Produkt mit einer Weltproduktionsmenge von über 80.000 Tonnen pro Jahr[(Stand 2006) (Seisun, 2006)]. Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, mittels transkriptomischer Analysen, die Vorgänge während der Xanthanproduktion auf der Ebene der Genexpression zu untersuchen. Durch das transkriptomische Monitoring einer Fermentation in einem 10 l Bioreaktor sollte ein globaler Überblick über die Prozesse gewonnen werden. In Kombination mit Flux-Analysen sollte hierbei nach möglichen Kandidaten für eine genetische Manipulation zur Erhöhung der Produktionseffizienz gesucht werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Analyse der Kohlenstoffverwertung in Xcc. Die Untersuchung der Kohlenstoffverwertung durch Xcc ist sowohl in der Hinsicht der Pathogenität als auch hinsichtlich der industriellen Produktion von Interesse. So ist die Kohlenstoffquelle bei industriell produziertem Xanthan ein bedeutender Kostenfaktor. In dieser Arbeit sollten, mittels transkriptomischer Analysemethoden, die Unterschiede in der Genexpression mit den Kohlenstoffquellen Galactose und Glucose untersucht werden.

## C Material und Methoden

### C.1 Material

#### C.1.1 Bakterienstämme

Tabelle C. 1: Bakterienstämme

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz / Herkunft
<b><i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)</b>		
DH5 $\alpha$	<i>recA1</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> $\phi$ 80d/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15	Bethesda Research Laboratories
S17-1	<i>E. coli</i> 294, <i>thi</i> RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 integriert in das Chromosom	Simon et al., 1983
<b><i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (Xcc)</b>		
B100	DSM1526, Sm <sup>r</sup>	Hötte et al., 1990
LMG 8031*	Industriell verwendeter Xanthan-Produktionsstamm, Xcc LMG 8031 Derivat	
JS $\Delta$ Q	LMG 8031* enthält eine Deletion von Nukleotid 78 bis 1355 der <i>fleQ</i> -Kodierregion	diese Arbeit
JS $\Delta$ E	LMG 8031* enthält eine Deletion von Nukleotid 31 bis 1193 der <i>figE</i> -Kodierregion	diese Arbeit
JSU	LMG 8031* enthält eine Deletion beginnend 44 Nukleotide stromaufwärts der <i>galU</i> -Kodierregion und endend 598 Nukleotide stromaufwärts der <i>galU</i> -Kodierregion; Insertion des <i>aacC1</i> -Promotors (273 nt) 44 Nukleotide stromaufwärts der <i>galU</i> -Kodierregion (Sequenz der Insertion beginnend 23 Nukleotide stromaufwärts und endend 289 Nukleotide stromaufwärts der <i>aacC1</i> -Kodierregion auf dem Plasmid pMS255, zusätzlich enthält das Insert eine <i>Bam</i> HI-Schnittstelle)	diese Arbeit

## C.1.2 Plasmide

**Tabelle C. 2:** Verwendete Plasmide und ihre relevanten Eigenschaften

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz / Herkunft
pK19mobGII	pK19mob enthält <i>gusA</i> , Km <sup>r</sup>	Katzen et al., 1999
pMS255	Gm-Resistenzcassette und <i>lacZ</i> -Promotortest-Cassette im pSVB30, Ap <sup>r</sup>	Becker et al., 1995
pK19/Δ <i>fleQ</i>	pK19mobGII enthält ein 1,2 kb <i>EcoRI-HindIII</i> -Fragment mit einer Deletion von Nukleotid 78 bis 1355 der <i>fleQ</i> -Kodierregion aus LMG 8031*	diese Arbeit
pK19/Δ <i>flgE</i>	pK19mobGII enthält ein 1,4 kb <i>EcoRI-HindIII</i> -Fragment mit einer Deletion von Nukleotid 31 bis 1193 der <i>flgE</i> -Kodierregion aus LMG 8031*	diese Arbeit
pK19/ <i>galU</i>	pK19mobGII enthält ein 2,0 kb <i>EcoRI-HindIII</i> -Fragment mit einer Deletion beginnend 44 Nukleotide stromaufwärts der <i>galU</i> -Kodierregion und endend 598 Nukleotide stromaufwärts der <i>galU</i> -Kodierregion aus LMG 8031*; Insertion des <i>aacC1</i> -Promotors (273 nt) 44 Nukleotide stromaufwärts der <i>galU</i> -Kodierregion (Sequenz der Insertion beginnend 23 Nukleotide stromaufwärts und endend 289 Nukleotide stromaufwärts der <i>aacC1</i> -Kodierregion auf dem Plasmid pMS255, zusätzlich enthält das Insert eine <i>Bam</i> HI-Schnittstelle)	diese Arbeit

## C.1.3 Primer

**Tabelle C. 3:** Verwendete Primer zur Klonierung

Zielgen	Primer-bezeichnung	Merkmale	Sequenz (5' → 3')
<i>fleQ</i>	<i>fleQ1_Up</i>	20 b <u>Annealing-Region</u> stromaufwärts des <i>fleQ</i> -Gens	AGCTAGA <b>AAGCTTT</b> GACGCTC <u>AAGGAGATCGCC</u>
Deletion des <i>fleQ</i> -Gens in LMG 8031*		Endständige <b><i>HindIII</i></b> -Schnittstelle	

Zielgen	Primer-bezeichnung	Merkmale	Sequenz (5' → 3')
	fleQ1_Dn	20 b <u>Annealing-Region</u> am Start des <i>fleQ</i> -Gens	<u>ATCAGAGGATCCGTCGATGC</u> <u>ATGAACTCGAGCAACGACAC</u>
		20 b <u>Annealing-Region</u> zum PCR-Produkt von fleQ2_Up mit integrierter <b>BamHI-Schnittstelle</b>	
	fleQ2_Up	20 b <u>Annealing-Region</u> am Ende des <i>fleQ</i> -Gens	<u>GCATCGACGGATCCTCTGAT</u> <u>GATCAACGAGGCACTGGAAC</u>
		20 b <u>Annealing-Region</u> zum PCR-Produkt von fleQ1_Dn mit integrierter BamHI-Schnittstelle	
	fleQ2_Dn	20 b <u>Annealing-Region</u> stromabwärts des <i>fleQ</i> - Gens	<u>GATCGAGAATTCACCGGAGA</u> <u>CGACGCCTCCGT</u>
		Endständige <b>EcoRI-</b> <b>Schnittstelle</b>	
<i>flgE</i> Deletion des <i>flgE</i> - Gens in LMG 8031*	flgE1_Up	20 b <u>Annealing-Region</u> stromaufwärts des <i>flgE</i> - Gens	<u>AGCTAGAAGCTTACCTTTACA</u> <u>ACAGCCTTGGG</u>
		Endständige <b>HindIII-</b> <b>Schnittstelle</b>	
	flgE1_Dn	20 b <u>Annealing-Region</u> am Start des <i>flgE</i> -Gens	<u>ATCAGAGGATCCGTCGATGC</u> <u>GATGCCGGACAACGAGGTAT</u>
		20 b <u>Annealing-Region</u> zum PCR-Produkt von flgE2_Up mit integrierter <b>BamHI-Schnittstelle</b>	
	flgE2_Up	20 b <u>Annealing-Region</u> am Ende des <i>flgE</i> -Gens	<u>GCATCGACGGATCCTCTGAT</u> <u>GGTCACCCAGACGATCATCA</u>
		20 b <u>Annealing-Region</u> zum PCR-Produkt von flgE1_Dn mit integrierter <b>BamHI-Schnittstelle</b>	
	flgE2_Dn	20 b <u>Annealing-Region</u> stromabwärts des <i>flgE</i> - Gens	<u>GATCGAGAATTCGCTGGTATT</u> <u>GCGCATCAACC</u>
		Endständige <b>EcoRI-</b> <b>Schnittstelle</b>	

Zielgen	Primer-bezeichnung	Merkmale	Sequenz (5' → 3')
Austausch des nativen Promotors in LMG 8031* durch den Promotor des <i>aacC1</i> -Gentamycin-resistenzgens aus pMS255	galUvP_Up	20 b <u>Annealing-Region</u> zur nativen LMG 8031* Sequenz stromaufwärts des <i>galU</i> -Gens  Endständige <b>HindIII-Schnittstelle</b>	<u>AGCTAGAAGCTTACGTTTCGT</u> <u>CCCGGTCGGCTT</u>
	galUvP_Dn-BamHI	20 b <u>Annealing-Region</u> zur nativen LMG 8031* Sequenz stromaufwärts des <i>galU</i> -Gens  Endständige <b>BamHI-Schnittstelle</b>	<u>ATTATCGGATCCGCCGAAGC</u> <u>GCACGGTAATGA</u>
	galU_Up	20 b <u>Annealing-Region</u> zur nativen LMG 8031* Sequenz am Start des <i>galU</i> -Gens  20 b <u>Annealing-Region</u> zum PCR-Produkt von <i>aacC1_Dn</i>	<u>GTTACGCCGTGGGTTCGATGT</u> <u>ATACGGTCGTTCCATTCCCC</u>
	galU_Dn	20 b <u>Annealing-Region</u> zur nativen LMG 8031* Sequenz am Ende des <i>galU</i> -Gens  Endständige <b>EcoRI-Schnittstelle</b>	<u>GATCGAGAATTC</u> <u>TCAGCCGC</u> <u>GTGCGTCAGCCG</u>
	<i>aacC1</i> _Up-BamHI	20 b <u>Annealing-Region</u> zur Sequenz des Promotors des <i>aacC1</i> -Gentamycin-Resistenzgens  Endständige <b>BamHI-Schnittstelle</b>  Als Template diente das Plasmid pMS255	<u>TATAATGGATCCGCCTCGACT</u> <u>TCGCTGCTGCC</u>

Zielgen	Primer-bezeichnung	Merkmale	Sequenz (5' → 3')
	aacC1_Dn	20 b <u>Annealing-Region</u> zur Sequenz des Promotors des <i>aacC1</i> - Gentamycin- Resistenzgens  Als Template diente das Plasmid pMS255	<u>ACATCGACCCACGGCGTAAC</u>

**Tabelle C. 4:** Verwendete Primer für qRT-PCR Analysen

Zielgen	Primerbezeichnung	Sequenz (5' → 3')
xcc-b100_2488 ( <i>sgIT</i> )	sgIT_Up	CTGATCAGGCGTACCCCACC
	sgIT_Dn	GGTAAAGATCGTCGCCACCG
xcc-b100_2507 ( <i>aglA2</i> )	aglA2_Up	GATGGACTTCCCGGATGACG
	aglA2_Dn	ATGGTCTGGCCACCCTCGTA
xcc-b100_2508	2508_Up	AGACCGACAACCAGCGCTTC
	2508_Dn	TCGTTTTCCGGCTGGATCAT
xcc-b100_2509 ( <i>siaE</i> )	siaE_Up	CATTGTGACAGCACCTGGG
	siaE_Dn	GGATGTCGCCTTCCACCTTG
xcc-b100_2510	2510_Up	GGAACCTGATGGGCATCGAC
	2510_Dn	CACCCAGCTTAAACGGCAGG
xcc-b100_2511	2511_Up	ACGTCGATTTTCGTGGCGAT
	2511_Dn	AGGCGAACTCAGTGCCCTTG
xcc-b100_2512	2512_Up	ATTCACCGTGTT CAGCGCA
	2512_Dn	TTCTTGCCCAGGTGGTCCAT
xcc-b100_2513	2513_Up	CTCAAGACCCGCCAGCTGTT
	2513_Dn	GCATGTCTTCCATTTCCGCC
xcc-b100_2514 ( <i>dgoA</i> )	dgoA_Up	CCGATGACTGCATCCACCAC
	dgoA_Dn	ATCTCGATCGCGTCGAATCC
xcc-b100_2515 ( <i>dgoD</i> )	dgoD_Up	AAGAACCGGTGCTGGCTGAG
	dgoD_Dn	CTTGACGCATTCCGGTGATGC
xcc-b100_2516	2516_Up	CACCATGGACGAGCACGAAG
	2516_Dn	GAGTTGGGAATGGACACGCC

Zielgen	Primerbezeichnung	Sequenz (5' → 3')
xcc-b100_2517 ( <i>dgoK</i> )	dgoK_Up	GAAACCCAATTGGTGGGCCT
	dgoK_Dn	ATGACGGTGGCAAAGTCGGT
xcc-b100_3045	3045_Up	TACAGCCCATGGGGTAACCG
	3045_Dn	GCCGATCGACGAGTTGGAGT
xcc-b100_3046 ( <i>galA2</i> )	galA2_Up	GGTGGTGAAAGACCCGTTCCG
	galA2_Dn	CGGCCCAATCATCGGAGTAG
xcc-b100_3047 ( <i>bga3</i> )	bga3_Up	TTCAACTACCGCACCAGCCA
	bga3_Dn	GTGTAGCCGCGGGTATCGTC
xcc-b100_3128	3128_Up	TCGGGGAAATGCTTCGTGAC
	3128_Dn	AGGCGCCAAATAACGCTCAT
xcc-b100_1992 ( <i>galU</i> )	galU_Up-qPCR	GCGAGATCCAGCTCACCGAT
	galU_Dn-qPCR	CTCGATCAAACCGATGTGCG
xcc-b100_2294	2294_Up	ATTCCAGGCCGCCTACATCA
	2294_Dn	TACTGCACCCCGGCATTCTT
xcc-b100_1537	1537_Up	CGTTGAAACGCTCACGATGC
	1537_Dn	ATCGAATTGGAACAGGCCGA
xcc-b100_3996	3996_Up	AATACTGGCGCGAGCGTTTC
	3996_Dn	TCCCAGTCACGATGCAGCTC
xcc-b100_2230 ( <i>fleQ</i> )	fleQ_Up-qPCR	GTTTTGGTGCTGGGCGAATC
	fleQ_Dn-qPCR	CGCCTTTTTTCGTGACCGAAC
xcc-b100_2247 ( <i>flgE</i> )	flgE_Up-qPCR	CAGCCTGGATCTGGCGATCT
	flgE_Dn-qPCR	AAGCCGTTACCGCTGGGATT
xcc-b100_2203 ( <i>flhF</i> )	flhF_Dn	AACGCCCATTTTTCCGACCT
	flhF_Up	CAGGTGATCGGCATCTGGTG
xcc-b100_2210 ( <i>fliR</i> )	fliR_Up	GAGTGGGACGGGTTCAATGC
	fliR_Dn	GATCACACCGGAGGTCACCC
xcc-b100_2217 ( <i>fliL</i> )	fliL_Up	CTGATGCTGCTGTGCGAGGT
	fliL_Dn	ACGCACTTCTTGCCGGTCTC
xcc-b100_2223 ( <i>fliF</i> )	fliF_Up	CGATAAAGGCAACGCCGAAG
	fliF_Dn	AAAGCCCGGATCCTTTTCCA
xcc-b100_2229	2229_Up	GCATCAACGGCAAGATGTCCG

Zielgen	Primerbezeichnung	Sequenz (5' → 3')
	2229_Dn	GCCTGTAAAAAGCCGCGATG
xcc-b100_2232 ( <i>rpoN2</i> )	rpoN2_Up	CCCGTATTACCACGGGCAAA
	rpoN2_Dn	CCGGTTCGCTTTCAATCAGG
xcc-b100_2238 ( <i>fliD</i> )	fliD_Up	ACCATCGACAAGGATGGCGT
	fliD_Dn	AGGGTGCCGTTGTTGACGTT
xcc-b100_2245 ( <i>flgG</i> )	flgG_Up	AGGGCTTCGACCAGGGTAGC
	flgG_Dn	GGGTAGCCGCTGTTGGTGAC
xcc-b100_2250 ( <i>flgB</i> )	flgB_Up	AGCGGATGAAGCTCATTGCC
	flgB_Dn	TGCTGCCGATCTCGTAGTGC
xcc-b100_2253	2253_Up	TTGCCTCCGCTGGAGAAGAC
	2253_Dn	CCGTTCTGCAACGCTTCCTT
xcc-b100_3340 ( <i>fabG2</i> )	fabG2_Up	GAGTTCGGTGCGGTCTCGAT
	fabG2_Dn	CGAGGCGATGTTGATGATGC
xcc-b100_1495	1495_Up	CAAGAATTCGCCGTTCCAGG
	1495_Dn	GGTATTTTCGCGTCCAGCCAC
xcc-b100_3531 ( <i>glnS</i> )	glnS_Up	GTCTGTTTGTGGACCGCGTG
	glnS_Dn	AGTGTCTCGGTGTGGCCCTC

### C.1.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle C. 5: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalie / Verbrauchsmaterial	Hersteller / Bezugsquelle
Agar	Invitrogen
Agarose	Peqlab
Antibiotika	Serva
Bromphenolblau	Serva
Casein (hydrolysiert)	Merk
CyScribe GFX Säulen	GE Healthcare
DNA Längenmarker	MBBL Dr. Bartling GMBH
dNTPs	Peqlab
EDTA	Sigma
Einwegküvetten	Brand, Sarstedt

<b>Chemikalie / Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller / Bezugsquelle</b>
Ethidiumbromid	Serva
Glycin	Bio-Rad
Hefeextrakt	Oxoid
IPTG	Serva
Malzextrakt	Fluka
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Microcon YM-30 Filter	Millipore
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
PCR ReaktionsgefäÙe	Biozym, Starlab
PE-Röhrchen (12 und 50 ml)	Greiner, Sarstedt
Petrischalen	Greiner
Pipettierspitzen	Starlab
ReaktionsgefäÙe 1,5 ml	Brand, Sarstedt
ReaktionsgefäÙe 1,5 ml (RNase frei)	Eppendorf
Triton X-100	Serva
Trypton	Oxoid
X-Gal	Roth
X-Gluc	Bioline

Weitere Standard-Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Serva, Roth oder Sigma-Aldrich bezogen.

### C.1.5 Enzyme

**Tabelle C. 6:** Verwendete Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller / Bezugsquelle</b>
RNase freie DNase	Qiagen
RNaseOUT rekombinanter RNase-Inhibitor	Invitrogen
BioScript Reverse Transkriptase	Bioline
Taq-Polymerase	Peqlab
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes
Restriktionsendonukleasen	Fermentas
T4 DNA-Ligase	Fermentas

## C.1.6 Software

Tabelle C. 7: Verwendete Software

Bezeichnung	relevante Eigenschaften	Hersteller/Referenz
Align Plus 4 V. 4.10	Programm zum Vergleich von DNA- oder Proteinsequenzen	Scientific & Educational Software
CellDesigner 3.5	Programm zur Rekonstruktion und Visualisierung von Stoffwechselwegen	Systems Biology Institute, Tokio, Kitano et. al., 2005
Clustal W V 1.6	Programm zum Vergleich mehrerer DNA-Sequenzen	IMB
EMMA 2.4	Programm zur Microarray-Datenauswertung	Centrum für Biotechnologie, Universität Bielefeld, Dondrup et. al., 2003
GenDB	Genomdatenbank	Centrum für Biotechnologie, Universität Bielefeld, Meyer et. al. 2003
Genesis 1.6	Programm zur Clusteranalyse	Institut für Genomik und Bioinformatik, TU Graz, Sturn et. al. 2002
ImaGene 6.0	Programm zur Microarray-Datenauswertung	Biodiscovery Inc.
Opticon Monitor 1.08	Programm zu qRT-PCR Datenauswertung	Bio-Rad
Primer Designer 4 V. 4.20	Programm zur Ermittlung und Berechnung von Primern	Scientific & Educational Software

## C.1.7 Medien

### C.1.7.1 Nährmedien

Die Medien werden, sofern nicht anders vermerkt, mit deionisiertem Wasser ( $H_2O_{MP}$ ; Milli-Q<sup>®</sup> Water Purification System; Millipore) angesetzt und autoklaviert.

<u>PA-Medium (Penassay Broth)</u>	17,5 g/l	Penassay Broth
<u>LB(G)-Medium (Luria-Bertani Broth)</u>	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
	(1 g/l	Glucose)

<u>TY-Medium</u>	5	g/l	Trypton
	3	g/l	Hefeextrakt
	0,4	g/l	CaCl <sub>2</sub>
 <u>M9 Minimalmedium</u>	 750	 ml	 H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub>
	200	ml	5 x M9 Lösung Auf 975 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub> Auffüllen
	25	ml	20 % C-Quelle
	2	ml	1 M MgSO <sub>4</sub>
	0,1	ml	1 M CaCl <sub>2</sub>
	5	ml	10 % hydrolysiertes Casein Lösungen einzeln autoklavieren
 5 x M9 Lösung	 30	 g/l	 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
	15	g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	2,5	g/l	NaCl
	5,0	g/l	NH <sub>4</sub> Cl
 <u>M9 Minimalmedium modifiziert</u> (Galactoseexperimente)	 868	 ml	 H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub>
	100	ml	10 x M9 Lösung
	1	ml	1 M MgSO <sub>4</sub>
	1	ml	0,1 M CaCl <sub>2</sub>
	30	ml	30 % C-Quelle Lösungen einzeln autoklavieren
 10 x M9 Lösung	 85	 g/l	 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
	30	g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	5	g/l	NaCl
	10	g/l	NH <sub>4</sub> Cl
 <u>Malzmedium</u>	 5	 g/l	 Pepton
	3	g/l	Malzextrakt
	3	g/l	Hefeextrakt
	11	g/l	Glucose Monohydrat
 <u>Bioreaktor-Produktionsmedium</u>	 60	 g/l	 Glucose Monohydrat
	1	g/l	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,15	g/l	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	0,01	g/l	CaCl <sub>2</sub>
	3,3	mg/l	ZnCl <sub>2</sub>
	3	mg/l	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	1	mg/l	FeCl <sub>3</sub>
	1,6	g/l	NH <sub>4</sub> Cl Lösungen einzeln autoklavieren oder sterilfiltrieren

<u>Vorkulturmedium</u>	11	g/l	Glucose Monohydrat
	5	g/l	Pepton
	3	g/l	Hefeextrakt
	3	g/l	Malzextrakt
	5	g/l	MOPS-Puffer pH 7
<u>Zwischenkulturmedium</u>	30	g/l	Glucose Monohydrat
	1	g/l	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,15	g/l	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	0,01	g/l	CaCl <sub>2</sub>
	3,3	mg/l	ZnCl <sub>2</sub>
	3	mg/l	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	1	mg/l	FeCl <sub>3</sub>
			Lösungen einzeln autoklavieren oder sterilfiltrieren
<u>Medium für Motilitätsplatten</u> (Bromfieldplatten)	400	mg/l	Trypton
	100	mg/l	Hefeextrakt
	67	mg/l	CaCl <sub>2</sub>
	3	g/l	Agar

### C.1.7.2 Medienzusätze

#### Agar

Zur Herstellung von Festmedien wird dem Flüssigmedium 15 g/l Agar zugesetzt.

#### Antibiotika

**Tabelle C. 8:** Konzentration der verwendeten Antibiotika bei verschiedenen Bakterienstämmen

Substanz	Konzentration [mg/l] für <i>Escherichia coli</i> - Anzucht	Konzentration [mg/l] für <i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> pv. <i>campestris</i> -Anzucht
Ampicilin (Ap)	100	-
Chloramphenicol (Cm)	12,5	-
Kanamycin (Km)	50	50
Streptomycin (Sm)	-	800

## C.1.8 Puffer und Lösungen

### C.1.8.1 Puffer zur Bakterienkonservierung

PS (Puffersaline)	7	g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	3	g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	5	g/l	NaCl

### C.1.8.2 Puffer und Lösungen für Enzymreaktionen

10 x One-Phor-All-Puffer	100	mM	Tris-Acetat
	100	mM	Mg-Acetat
	500	mM	Na-Acetat pH 7,5
10 x Ligationspuffer	660	mM	Tris-HCl
	50	mM	MgCl <sub>2</sub>
	10	mM	ATP
	10	mM	DTE pH 7,5
PCR-dNTP-Mix	10	mM	dATP
	10	mM	dTTP
	10	mM	dCTP
	10	mM	dGTP

### C.1.8.3 Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

TA-Puffer	40	mM	Tris-Acetat
	10	mM	Na-Acetat
	1	mM	EDTA pH 7
DNA-Ladepuffer	10	ml	TA-Puffer
	80	ml	Glycerin
	2,5	g	Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Färbelösung	1	mg/l	Ethidiumbromid

### C.1.8.4 Puffer für Microarray-Analysen

50 x dNTP-Stammlösung (4:1 aa-dUTP/dTTP)	25	mM	dATP
	25	mM	dCTP
	25	mM	dGTP
	5	mM	dTTP
	20	mM	Aminoallyl-dUTP (aa-dUTP)

Waschpuffer 1	250 ml	H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub>
	250 µl	Triton X-100
	5 min bei 80 °C, danach auf Raumtemperatur (RT) abkühlen	
Waschpuffer 2	500 ml	H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub>
	50 µl	32 % HCl
Waschpuffer 3	225 ml	H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub>
	25 ml	1 M KCl
<i>Blocking</i> -Puffer	150 ml	H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub>
	40 µl	32 % HCl
	50 ml	Vorwärmen auf 50 °C 4 x Nexterion Block E (Schott)

#### C.1.8.5 Puffer zur Xanthan-Konzentrationsbestimmung

Nachweisreagenz	14 ml	H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub>
	86 ml	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (95–97 %)
		Auf Eis mischen und auf RT abkühlen lassen
	70 mg	L-Cystein-HCl

## C.2 Methoden

### C.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### C.2.1.1 Bakterienanzucht

*E. coli* Stämme werden je nach Verwendungszweck in LB(G)-Medium, TY-Medium, auf PA-Agarplatten und LB(G)-Agarplatten bei 37 °C angezogen. Für die Anzucht der Xcc Stämme in Flüssigkultur werden je nach Verwendungszweck LB(G)-Medium, TY-Medium, M9-Minimalmedium oder Bioreaktor-Produktionsmedium verwendet. Als Festmedium werden LB(G)-Agarplatten, Malzmedium-Agarplatten und PA-Agarplatten verwendet. Die Inkubationstemperatur beträgt 30 °C.

**Tabelle C. 9:** Anzuchtbedingungen der Bakterien

Gattung	Flüssigmedium	Festmedium	Inkubations- temperatur
<i>E. coli</i>	TY, LB(G)	PA, LB(G)	37 °C
<i>Xanthomonas</i>	TY, M9, Bioreaktor- Produktionsmedium	PA, LB(G), Malzmedium	30 °C

#### C.2.1.2 Bestimmung des Bakterientiters

Der Bakterientiter wird mittels photometrischer Bestimmung der Zelldichte bei 600 nm ermittelt. Als Referenz wird das bakterienfreie Nährmedium verwendet. Eine optische Dichte (o.D.<sub>600</sub>) von 0,1 entspricht bei *E. coli* einem Bakterientiter von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml und bei *Xanthomonas* einem Bakterientiter von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml.

#### C.2.1.3 Konservierung der Bakterienkulturen

1,5 ml einer üN-Kultur werden 30 sec bei 10.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 0,4 ml Puffersaline und 0,6 ml 87 % Glycerin resuspendiert. Nach gründlichem Durchmischen kann die Glycerinkultur bei –20 °C gelagert werden.

#### C.2.1.4 Motilitätstest

Zur Untersuchung der Motilität werden 3 µl einer üN-Kultur auf eine Bromfeldplatte gegeben und für 3-5 Tage bei 30 °C inkubiert. Hierbei ist es wichtig, dass die üN-Kulturen die gleiche o.D. haben um mit einer identischen Bakterienkonzentration zu starten. Durch Messung des

Koloniedurchmessers und Beobachtung der Morphologie können Unterschiede in der Motilität dokumentiert werden.

Bei den Bromfieldplatten unterscheidet man je nach Agarkonzentration zwischen „Swimming“- und „swarming“-Platten. Die „Swimming“-Platten haben eine Agarkonzentration von 0,3 % und erlauben das Fortbewegen durch sogenanntes „Swimming“, eine Fortbewegung einzelner Bakterienzellen mit Hilfe polarer Geißeln. Die „Swarming“-Platten hingegen haben eine höhere Agarkonzentration von 0,6 %. Auf diesen Platten ist nur noch ein Fortbewegen mittels „Swarming“ möglich. Das „Swarming“ ist definiert als ein Gleiten auf der Agarplatte wobei mehrere Bakterienzellen sich zu einem Verbund organisieren und sich koordiniert mittels Flagellen fortbewegen.

### **C.2.2 Isolation, Manipulation und Analyse von DNA**

#### **C.2.2.1 Plasmidisolierung aus *E. coli***

Die Plasmidisolierung erfolgt mittels des QIAprep Spin Miniprep Kits der Firma Qiagen und wird nach Herstellerangaben durchgeführt. Die zu verwendenden Puffer (P1, P2, N3, PB und PE) sind im Kit enthalten. Mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit können Plasmide rasch isoliert werden. Nachdem die Zellen mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen werden erfolgt eine Neutralisierung des Lysats unter salzreichen Bedingungen. Chromosomale DNA, Zelltrümmer sowie denaturierte Proteine können nun präzipitiert und von der Plasmid-DNA abgetrennt werden. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgt durch Bindung an eine Anionenaustauschersäule bei hoher Salzkonzentration und Elution bei niedriger Salzkonzentration.

- $\frac{1}{4}$  der Zellen gewachsen auf Festmedium (Petrischale) in 250  $\mu$ l P1-Puffer resuspendieren
- Zugabe von 250  $\mu$ l P2-Puffer, sofort 4 bis 6 mal invertieren
- Zugabe von 350  $\mu$ l N3-Puffer, sofort 4 bis 6 mal invertieren
- 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- QIAprep Spin-Säule in 2 ml Sammelgefäß setzen
- Überstand nach Zentrifugation auf die Säule geben
- 30-60 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- Säule mit 500  $\mu$ l PB-Puffer waschen
- 30-60 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- Säule mit 750  $\mu$ l PE-Puffer waschen
- 30-60 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen und erneut 30-60 sec zentrifugieren

- Säule in neues Eppendorfgefäß überführen
- DNA mit 30-50 µl EB-Puffer oder H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> eluieren, dazu 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren

### **C.2.2.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel**

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Aufreinigung und Visualisierung von DNA-Fragmenten. Dabei wandert die negativ geladene DNA in einer festen Gelmatrix durch die angelegte Spannung zur Anode. Die Wandergeschwindigkeit der DNA hängt von ihrer Größe und Form ab. Kleine DNA-Fragmente wandern schneller im Gel als größere Fragmente. Durch den Einsatz von Markern kann die Größe eines DNA-Fragmentes bestimmt werden. Mit dem interkalierenden Reagenz Ethidiumbromid wird die DNA gefärbt und anschließend im UV-Licht sichtbar gemacht.

- 1,0-2,0 % Agarose in 100 ml TA-Puffer aufkochen und in eine Gelkammer mit Kamm gießen, erkalten lassen
- DNA-Probe mit DNA-Ladepuffer mischen und in die Geltasche geben
- Gel bei 90 V laufen lassen
- Gel in Ethidiumbromid-Bad färben und anschließend in deionisiertem Wasser waschen
- Detektion der DNA-Fragmente im UV-Licht

### **C.2.2.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Typ II-Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische palindromische Sequenzen erkennen und definiert schneiden.

- DNA-Lösung (ca. 2-3 µg DNA) im Eppendorfgefäß mit 2 oder 4 µl (je nach Enzym) 10x One-Phor-All-Puffer mischen
- ca. 1 Unit Restriktionsenzym zugeben
- mit H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> auf 20 µl auffüllen
- Inkubation 2 h bei 37 °C oder üN bei RT
- Kontrolle der Spaltung mittels Gelelektrophorese

### **C.2.2.4 DNA-Ligation**

Die endständige 5'-Phosphatgruppe und 3'-Hydroxylgruppe des Zuckergerüsts von DNA-Molekülen können von Ligasen unter Bildung von Phosphodiesterbrücken miteinander verknüpft werden. Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein von glatten Fragmentenden oder von Fragmentenden-Überhängen, die zueinander komplementär sind.

- gespaltene Vektor-DNA und Insert-DNA im Verhältnis von 1:5-15 in Eppendorfgefäß geben
- 2 µl 10 x Ligase- Puffer zugeben
- 2 Units T4 DNA- Ligase zugeben
- mit H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> auf 20 µl auffüllen
- 2-4 h bei RT, oder üN in Thermoskanne mit anfänglich 20 °C warmen Wasser bei 4 °C inkubieren

### C.2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion [Polymerase Chain Reaction, PCR, (Saiki et al., 1988)] dient der *in vitro* Amplifikation von DNA. Kurze Oligonukleotide, so genannte Primer, flankieren die zu amplifizierende DNA-Region an Strang und Gegenstrang und bilden den Ausgangspunkt der DNA-Synthese durch eine hitzestabile DNA-Polymerase. Der erste Schritt eines PCR-Zyklus ist die Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge durch eine Erhöhung der Temperatur auf 92-98 °C. Der zweite Schritt ist die Anlagerung der Primer. Dafür wird die Temperatur auf eine primerspezifische Anlagerungstemperatur gesenkt. Zur Verlängerung der Primer erhöht man die Temperatur auf das Temperaturoptimum der verwendeten DNA-Polymerase. Schließlich wird das neu gebildete PCR-Produkt wieder zu Einzelsträngen denaturiert und steht dem nächsten PCR-Zyklus zur Primeranlagerung wieder zur Verfügung. Durch eine zyklische Wiederholung dieses Prozesses, in der Regel 25 bis 35 Wiederholungen, kann eine exponentielle Amplifikation erreicht werden.

Das exakte Protokoll für die PCR hängt von der verwendeten Polymerase ab. Nach der PCR werden die PCR-Produkte mittels des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt.

#### Phusion High Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes) PCR-Program

1.	Vorlauf	30 sec	98 °C
2.	Denaturierung	10 sec	98 °C
3.	Annealing	20 sec	primerabhängig
4.	Polymerisation	30 sec/kb	72 °C
5.	25 x die Schritte 2-4 wiederholen		
6.	finale Polymerisation	7 min	72 °C

**Taq-Polymerase (Peqlab) PCR-Programm**

1.	Vorlauf	2 min	95 °C
2.	Denaturierung	30 sec	95 °C
3.	Annealing	1 min	primerabhängig
4.	Polymerisation	1 min/1 kb	72 °C
5.	30 x die Schritte 2-4 wiederholen		
6.	finale Polymerisation	7 min	72 °C

**C.2.2.6 Aufreinigung von PCR-Produkten**

Polymerasen, Primer und Nukleotide, die evtl. bei weiteren Reaktionen stören, können mit dem Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) entfernt werden. Die Aufreinigung erfolgt mittels Chromatographie, wobei die PCR-Produkte an das Säulenmaterial gebunden, gewaschen und schließlich eluiert werden.

Die Durchführung erfolgt wie im Handbuch beschrieben mit den vom Hersteller mitgelieferten Puffern (PB, PE).

- 500 µl Puffer PB zu 100 µl PCR-Reaktionsansatz geben
- QIAquick Säule in 2 ml Sammelgefäß einsetzen
- Gemisch aus Puffer PB und Reaktionsansatz auf die Säule geben, 30-60 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren (Bindung der DNA)
- Durchlauf verwerfen, Säule in gleiches Sammelgefäß zurück setzen
- zum Waschen 750 µl Puffer PE auf die Säule geben, 30-60 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Durchlauf verwerfen, Säule in gleiches Sammelgefäß zurück setzen und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Säule in neues Eppendorfgefäß setzen
- DNA mit 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> von der Säule eluieren, dazu 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren

**C.2.2.7 Konstruktion der Deletions- und Insertionsmutanten**

In den mobilisierbaren Vektor pK19mobGII werden entsprechenden *EcoRI-HindIII*-Fragmente mit komplementären Sequenzen zu den flankierenden Bereichen des zu deletierende Gens inseriert (Katzen et al., 1999). Durch Verwendung des *E. coli*-Stammes S17-1 als Donor wird mittels Konjugation der Vektor in *Xcc* eingeschleust (Simon et al., 1983). Da das Plasmid in *Xcc* nicht replizierbar ist bleibt es nur stabil in der Rezipientenzelle wenn es sich durch ein homologes Rekombinationsereignis in das Genom integriert. Nach

diesen merodiploiden Stämmen kann durch Anzucht in Gegenwart des Antibiotikums Kanamycin selektiert werden, da das Plasmid für eine Kanamycinresistenz kodiert. Im folgenden Schritt wird ein merodiploider Stamm ohne Zugabe von Antibiotikum bis zur stationären Phase angezogen. Durch Ausplattieren auf X-Gluc-haltigen Platten kann nun nach Stämmen gesucht werden, die das Plasmid durch ein weiteres rekombinantes Ereignis aus dem Genom entfernt haben (Homogenotisanten). Die auf dem Plasmid kodierte GUS-Aktivität ermöglicht es entsprechende Homogenotisanten auf X-Gluc-haltigen Platten als weiße Kolonien zu detektieren. Die Homogenotisanten können, als Produkt der zweiten homologen Rekombination, sowohl das native Gen als auch die Modifikation (Deletion, Insertion) tragen. Mittels PCR werden die Homogenotisanten mit der richtigen Modifikation identifiziert.

### C.2.3 DNA-Transfermethoden

#### C.2.3.1 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Durch eine  $\text{CaCl}_2$ -Behandlung können *E. coli*-Zellen kompetent gemacht werden. Kompetente Zellen sind durch Transformation in der Lage, freie zirkuläre Plasmid-DNA aufzunehmen (modifiziert nach Maniatis et al., 1982).

##### Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen

- 50 ml *E. coli*-Kultur bis zur exponentiellen Phase (o.D.<sub>600</sub> ~ 0,6) anwachsen lassen.
- Zentrifugation, 6 min, 6000 rpm, 4 °C
- Pellet in 10 ml 100 mM  $\text{MgCl}_2$  (4 °C) resuspendieren
- Zentrifugation, 6 min, 6000 rpm, 4 °C
- Pellet in 10 ml 100 mM  $\text{CaCl}_2$  (4 °C) resuspendieren
- 30 min bei 0 °C inkubieren
- Zentrifugation, 6 min, 6000 rpm, 4 °C
- Pellet in 1,7 ml 100 mM  $\text{CaCl}_2$  (4 °C) resuspendieren
- Zugabe von 0,3 ml 87 % Glycerin (4 °C)
- Zellen in 0,2 ml Portionen aliquotieren
- bei -80 °C lagern

##### Transformation $\text{CaCl}_2$ -kompetenter *E. coli* Zellen

- DNA zu 100 µl kompetente *E. coli* Zellen geben
- 30 min bei 0 °C inkubieren
- Hitzeschock: 1 min bei 42 °C

- 1 ml LB(G)- Medium zugeben und mischen
- 30–60 min bei 37 °C inkubieren
- 100 µl auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattieren
- Zellen abzentrifugieren und Überstand verwerfen
- Zellen im Rücklauf resuspendieren und auf Selektionsmedium ausplattieren

### C.2.3.2 Konjugation

Der Transfer eines Plasmids von einer Donorzelle in eine Rezipientenzelle wird als Konjugation bezeichnet. Hierbei benötigt die Donorzelle Transferfunktionen und ein Plasmid mit einer Mobilisierungsregion (*mob*-Region). Plasmide die nur über eine *mob*-Region verfügen, benötigen einen Donorstamm der die Transferfunktionen zur Verfügung stellt. In dieser Arbeit wurde mit dem *E. coli*-Stamm S17-1 als Donor gearbeitet, der ein im Chromosom integriertes RP4-Derivat trägt, das die Transferfunktion vermittelt (Simon et al., 1983). Im Folgenden ist das Prinzip der Filterkreuzung beschrieben:

- $5 \times 10^7$  exponentielle Donorzellen mit  $2 \times 10^8$  stationäre Rezipientenzellen mischen
- Zellen abzentrifugieren
- Überstand abgießen und Zellen in Rücklauf resuspendieren
- Kreuzungsgemisch auf Nitrocellulosefilter (Porengröße 0,45 µm) auf LB(G)-Festmedium auftragen
- üN bei 30 °C inkubieren
- Abschwemmen der Kreuzungsfilter in 1 ml LB(G)-Flüssigmedium
- Verdünnungsreihe anlegen und auf Selektionsmedium ausplattieren
- bei 30 °C inkubieren

## C.2.4 Mikroarray-Analysen

### C.2.4.1 Genom-Genom Hybridisierung

#### C.2.4.1.1 Isolierung der genomischen DNA für Microarray-Analysen

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgt mittels des Nucleo Spin Tissue Kit der Firma Macherey & Nagel und wird nach Herstellerangaben durchgeführt. Die zu verwendenden Puffer (T1, B3, BW, B5 und EB) sowie das Enzym Proteinase K sind im Kit enthalten.

- 1 ml einer Flüssigkultur mit einer o.D.<sub>600</sub> von 1,0 bei 8.000 x g für 5 min zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Pellet in 180 µl T1-Puffer resuspendieren, 25 µl Proteinase K zugeben und vortexen

- Für 1–3 h bei 56 °C in einem Thermomixer bei 300 rpm inkubieren, jede Stunde vortexen
- 20 µl RNase A (20 mg/ml) zugeben und 5 min bei RT inkubieren
- Probe vortexen, 200 µl B3-Puffer zugeben und erneut vortexen
- 10 min bei 70 °C inkubieren und kurz vortexen (wenn unlösliche Partikel zu sehen sind: Probe für 5 min bei 11.000 x g zentrifugieren und in ein neues Reaktionsgefäß überführen)
- 210 µl EtOH (96 -100 %) zugeben und vortexen. (wenn immer noch Präzipitate zu sehen sind sollten diese mit auf die Säule überführt werden)
- Die Probe auf eine Nucleo Spin Tissue Kit Säule mit Auffanggefäß überführen
- Für 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren und Durchfluss verwerfen
- Säule mit 500 µl BW-Puffer waschen
- Für 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren und Durchfluss verwerfen
- Säule mit 600 µl B5-Puffer waschen
- Für 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren und Durchfluss verwerfen
- Für 1 min bei 11.000 x g trockenzentrifugieren und Durchfluss verwerfen
- Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- Zum eluieren 100 µl EP-Puffer auf die Säule geben (EB-Puffer auf 70 °C vorwärmen)
- Für 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren und Eluat auffangen
- DNA-Konzentration im ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies) messen

### C.2.4.1.2 Markierung der genomischen DNA für Microarray-Analysen

Die Markierung der genomischen DNA erfolgt mittels des Bioprime DNA Labeling System (Invitrogen) und wird nach Herstellerangaben durchgeführt. Die zu verwendende 2,5 x „Random Primer Solution“ sowie das Klenow Fragment zur Amplifizierung sind im Kit enthalten.

Vor der Markierung sollte ein Testverdau mit den zu verwendeten Restriktionsenzymen durchgeführt werden.

- 0,5 µg DNA in insges. 12,5 µl für 30 min bei 37 °C mit *Bsp143I* (*Sau3AI*) verdauen
- Verdaute genomische DNA im Agarosegel kontrollieren

Ist der Testverdau in Ordnung können die Bedingungen so übernommen werden. Ansonsten muss eine höhere Restriktionsenzymkonzentration oder andere Restriktionsenzyme ausprobiert werden.

- 2 µg DNA in insges. 50 µl für 1 h bei 37 °C mit *Bsp143I* (*Sau3AI*) inkubieren

- Ein 5 µl Aliquot im Agarosegel auftragen
- Zu 1 Volumen Probe 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und 3 Volumen EtOH zugeben.
- Bei -70 °C für 30 min oder üN einfrieren
- Für 15 min bei 12.000 x g und RT zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Mit 200 µl 70 % EtOH waschen und 5 min bei RT stehen lassen
- Für 5 min bei 12.000 x g und RT zentrifugieren und Überstand verwerfen
- 5 min an der Luft bei RT trocknen lassen
- In 20 µl TE-Puffer resuspendieren
- 20 µl 2,5 x „Random Primer Solution“ auf Eis dazugeben
- Für 5 min in kochenden Wasser denaturieren und danach zügig auf Eis abkühlen
- Zugeben von
  - 1 µl 50 x dNTP mit aa-dUTP ( 4:1 Verhältnis aa-dUTP/dTTP)
  - 8 µl H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub>
  - 1 µl 40 U/µl Klenow Fragment
- Vorsichtig mischen und 15 bis 30 sec abzentrifugieren
- Für 2 h bei 37 °C inkubieren
- Zu 50 µl Probe 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> zugeben und auf eine Microcon YM-30 Zentrifugen-Filtereinheit (Millipore) geben
- Für 7 min bei 12.000 x g und RT zentrifugieren und Durchfluss verwerfen
- Zweimal mit 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> waschen und für 7 min bei 12.000 x g und RT zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- Kontrollieren ob sich noch ca. 20 µl Probe auf dem Filter befinden, gegebenenfalls nochmals kurz zentrifugieren
- Den Filter umgedreht in ein neues Reaktionsgefäß überführen und für 1 min bei 12.000 x g zentrifugieren
- Mit einer 1 M Natriumbicarbonat-Stammlösung (pH 9) eine Konzentration von 0,1 M Natriumbicarbonat einstellen
- Mit der Probe nun die Cy3- oder Cy5-NHS Ester lösen (um die Farbstoffe vor Licht zu schützen sollte mit braunen Reaktionsgefäßen gearbeitet werden)
- Für 1 h bei RT und vor Licht geschützt inkubieren
- 1,5 µl 4 M Hydroxylamid zu 20 µl Probe geben und 15 min vor Licht geschützt inkubieren
- 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> zugeben und auf einen Microcon YM-30 Zentrifugen-Filtereinheit (Millipore) geben
- Für 7 min bei 12.000 x g und RT zentrifugieren und Durchfluss verwerfen

- Zweimal mit 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> waschen und für 7 min bei 12.000 x g und RT zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- Kontrollieren ob sich noch ca. 20 µl Probe auf dem Filter befinden, gegebenenfalls nochmals kurz zentrifugieren
- Den Filter umgedreht in ein neues braunes Reaktionsgefäß überführen und für 1 min bei 12.000 x g zentrifugieren
- Eluat auffangen und bei -20 °C bis zur Hybridisierung aufbewahren

Die Hybridisierung wird durchgeführt wie in C.2.4.2.4 beschrieben, mit der Ausnahme, dass die Probe vor der Injektion in die Hybridisierungskammer, anstatt 5 min bei 65 °C, 2 min bei 80 °C inkubiert wird.

### C.2.4.2 Genexpressionsanalysen mittels Microarray

#### C.2.4.2.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgt mittels des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen und wird nach Herstellerangaben durchgeführt. Die zu verwendenden Puffer (RLT, RW1 und RPE) sind im Kit enthalten. Die RNase freie DNase und der RDD-Puffer sind im RNase free DNase Set der Firma Qiagen enthalten. Während der Arbeit mit RNA: Handschuhe tragen, Pipettenspitzen mit Filter und RNase-freie Eppendorfgefäße verwenden.

- 25-50 ml der Bakterienkultur zügig bei 21.000 x g und RT für 3 min zentrifugieren, bei hoher Viskosität kann die Zellsuspension vor der Zentrifugierung verdünnt werden
- Überstand abziehen und Pellet in flüssigem Stickstoff einfrieren, Pellet kann bei -80 °C gelagert werden
- Pellet in 800 µl 10 mM Tris-HCl pH 8 resuspendieren
- je 200 µl Zellsuspension in vier vorgekühltem *Fast Protein*-Behälter (Q BIOgene) geben
- 700 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol (10 µl/ml) zugeben
- Zellen im Ribolyser (Hybaid) aufschließen, 30 sec, Stufe 6,5
- 3 min auf Eis inkubieren
- 3 min bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugieren
- Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- erneut 3 min bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugieren
- Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- entsprechendes Volumen 98 % Ethanol zugeben und mischen (250 µl Ethanol zu 450 µl Zelllysat)

- 700 µl auf die RNeasy-Säule geben (zwei Säulen verwenden, wenn mit 4 x *Fast Protein*-Behälter begonnen wurde)
- 30 sec bei 13.000 x g zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen und erneut 700 µl auf die Säule geben
- 30 sec bei 13.000 x g zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen und die Säule in ein neues 2 ml Auffanggefäß überführen
- 500 µl RW1-Puffer auf die Säule geben und 30 sec bei 13.000 x g zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- 500 µl RPE-Puffer auf die Säule geben und 30 sec bei 13.000 x g zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- 500 µl RPE-Puffer auf die Säule geben und 30 sec bei 13.000 x g zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- 2 min bei 13.000 x g zentrifugieren
- Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen
- 30 µl RNase-freies Wasser auf die Säule geben und 1 min stehen lassen
- 1 min bei 13.000 x g zentrifugieren
- erneut 30 µl RNase-freies Wasser auf die Säule geben und 1 min stehen lassen
- 1 min bei 13.000 x g zentrifugieren
- zu 60 µl Eluat 3 µl DNase und 6 µl RDD-Puffer geben und 1 h bei 30 °C inkubieren
- gleiche Eluate vereinen
- zu 100 µl RNA 350 µl RLT-Puffer und 250 µl 98 % Ethanol in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß geben
- ca. 700 µl auf eine RNeasy-Säule geben
- 30 sec bei 13.000 x g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 350 µl RW1-Puffer auf die Säule geben, 30 sec bei 13.000 x g zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- 10 µl DNase und 70 µl RDD-Puffer mischen und auf die Säule geben
- Säule 15 min bei RT stehen lassen
- 350 µl RW1-Puffer auf die Säule geben und 30 sec bei 13.000 x g zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen
- Säule in ein neues 2 ml Auffanggefäß überführen
- 500 µl RPE-Puffer auf die Säule geben und 30 sec bei 13.000 x g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- erneut 500 µl RPE-Puffer auf die Säule geben und 30 sec bei 13.000 x g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen

- 2 min bei 13.000 x g zentrifugieren, Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen
- 50 µl RNase-freies Wasser auf die Säule geben und 1 min bei RT stehen lassen
- 1 min bei 13.000 x g zentrifugieren
- Eluat auffangen und bei –80 °C lagern
- RNA im Agarosegel kontrollieren und die RNA-Konzentration im ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies) ermitteln

### C.2.4.2.2 Reverse Transkription der isolierten RNA

Die reverse Transkription wird mit BioScript Reverse Transkriptase (Bioline) durchgeführt. 5 x RT-Puffer wird mit der BioScript mitgeliefert. Die Aufreinigung der komplementären DNA (cDNA) erfolgt mit dem CyScribe Kit (Amersham-Biosciences). Der „Capture“-Puffer ist im Kit enthalten.

Folgende Komponenten mischen:

10 µg der isolierten RNA	bis zu 18,8 µl
„random“ Hexamere [5 µg/µl]	2 µl

mit RNase-freiem Wasser auf 20,8 µl auffüllen

- 10 min bei 70 °C inkubieren
- 5 min bei 0 °C inkubieren

Während der Inkubation die Nukleotid-Lösung durch Mischen folgender Komponenten herstellen:

5 x RT-Puffer	6 µl
RNase Inhibitor RNaseOut (40 U/µl) (Invitrogen)	0,5 µl
BioScript Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1,5 µl
25 x dNTP Stammlösung (4:1 aa-dUTP/dTTP Mix)	1,2 µl

- mischen und kurz abzentrifugieren
- 9,2 µl Nukleotid-Lösung zu den Ansätzen zugeben, mischen und kurz abzentrifugieren
- 1 h bei 42 °C inkubieren
- 15 µl 0,2 M NaOH zugeben (100 µl Pipettenspitze mit Filter verwenden, Pipette nicht mehr verstellen), durch Schnippen an das Eppendorfgefäß mischen und kurz abzentrifugieren
- 15 min bei 65 °C inkubieren
- 15 µl 0,2 M HCl zugeben (100 µl Pipettenspitze mit Filter verwenden, erneut die gleiche Pipette benutzen), durch Auf- und Abpipettieren mischen und kurz abzentrifugieren
- 450 µl „Capture“-Puffer zugeben

- alles auf eine CyScribe GFX-Säule geben
- 30 sec bei 13.000 x g und 20 °C zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 600 µl 80 % Ethanol auf die Säule geben
- 30 sec bei 13.000 x g und 20 °C zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- den Waschschrift zweimal wiederholen
- 10 sec bei 13.000 x g und 20 °C zentrifugieren, Säule in ein neues 1,5 ml Gefäß überführen
- 60 µl 0,1 M Natriumbicarbonat (pH 9,0) auf die Säule geben
- 5 min bei RT stehen lassen
- 1 min bei 13.000 x g und 20 °C zentrifugieren

### C.2.4.2.3 Fluoreszenzfärbung der cDNA

Die Aufreinigung der cDNA wird mit dem CyScribe Kit (Amersham-Biosciences) durchgeführt. Die zu verwendenden Puffer („Capture“-Puffer, „Washing“-Puffer, „Elution“-Puffer) sind im Kit enthalten. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind Cy3-NHS-Ester und Cy5-NHS-Ester (GE Healthcare). Proben müssen vor Licht geschützt werden.

- Fluoreszenzfarbstoff in der cDNA-Probe lösen
- 1 h bei RT im Dunkeln inkubieren
- 4,5 µl 4 M Hydroxylamid zugeben
- 15 min bei RT im Dunkeln inkubieren
- 600 µl „Capture“-Puffer zu der Cy5-markierten Probe geben, mischen und die Cy3-markierte Probe zugeben
- alles auf eine CyScribe GFX-Säule geben
- 30 sec bei 13.000 x g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 600 µl „Washing“-Puffer zugeben, 30 sec bei 13.000 x g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 600 µl „Washing“-Puffer zugeben, 30 sec bei 13.000 x g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 600 µl „Washing“-Puffer zugeben, 30 sec bei 13.000 x g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 10 sec bei 13.000 x g zentrifugieren und Säule in ein neues 1,5 ml Gefäß überführen
- 60 µl „Elution“-Puffer auf die Säule geben
- 5 min bei RT stehen lassen
- 1 min bei 13.000 x g zentrifugieren

- Die 60 µl Eluat der vereinten Cy3- und Cy5-markierten cDNA wird in ein neues braunes Eppendorfgefäß aufgefangen
- bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C lagern

### C.2.4.2.4 Hybridisierung der cDNA-Probe gegen den Microarray

Markierte cDNA-Probe vor Licht schützen.

- Xcc5kOLI-Microarray 5 min bei RT in 250 ml Waschpuffer 1 waschen
- 2 min bei RT in Waschpuffer 2 waschen, Waschschrift wiederholen
- 10 min bei RT in Waschpuffer 3 waschen
- 1 min bei RT in H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> waschen
- 15 min in 50 °C vorgewärmtem „Blocking“-Puffer waschen, mindestens alle 5 min schütteln
- 1 min bei RT in H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> waschen
- Microarrays bei 1.200 rpm für 3 min zentrifugieren
- Markierte cDNA-Probe in einem Vakuumkonzentrator auf ein Volumen von unter 10 µl einengen (ca. 15 min)
- DIG Easy Hyb-Lösung (Roche) zur cDNA-Probe zugeben bis ein Volumen von 100 µl erreicht ist
- 1,5 µl Lachssperma (5 µg/µl) dazu geben
- cDNA-Probe bei 65 °C für 5 min inkubieren
- Xcc5kOLI-Microarray nach Herstellerangaben in der HS4800 Hybridisierungsstation (Tecan) platzieren
- Die Proben in die Hybridisierungskammern injizieren und für 1,5 h bei 45 °C inkubieren
- Xcc5kOLI-Microarray aus der Hybridisierungsstation nehmen und für 1 min in 2 x SSC mit 0,2 % SDS (vorgewärmt auf 42 °C) waschen
- 1 min in 0,2 x SSC mit 0,1 % SDS bei RT waschen, diesen Waschschrift wiederholen
- 1 min in 0,2 X SSC waschen, diesen Waschschrift wiederholen
- 1 min in 0,05 x SSC (auf 18 °C vorgekühlt) waschen
- Xcc5kOLI-Microarrays bei 1.200 rpm für 3 min zentrifugieren
- Xcc5kOLI-Microarray mit LS Reloaded Microarray Scanner (Tecan) scannen

### C.2.4.3 Microarray Datenanalyse

Die Signalintensität und Hintergrundintensität für jeden Spot wird mittels der ImaGene 6.0 Software (Biodiscovery Inc.) detektiert. Der log<sub>2</sub>-Wert der Verhältnisse der Intensitäten, auch M-Wert genannt, wird nach folgender Formel berechnet:  $M_i = \log_2 (R_i / G_i)$ .  $R_i = I_{ch1i} - Bg_{ch1i}$

und  $G_i = I_{ch2i} - Bg_{ch2i}$ , wobei  $I_{ch1i}$  oder  $I_{ch2i}$  die Intensitäten der Spots bei Anregung mit Laser 1 oder Laser 2 und  $Bg_{ch1i}$  oder  $Bg_{ch2i}$  die Hintergrundintensitäten der Spots bei Anregung mit Laser 1 oder Laser 2 sind. Dabei entspricht ein M-Wert von 1 oder -1 einem zweifachen Unterschied in der Intensität der Signale beider Kanäle zueinander. Die Intensität jedes Spots, auch A-Wert genannt, wird mit der Formel  $A_i = \log_2 (R_i G_i)^{0.5}$  berechnet (Dudoit et al., 2002). Der p-Wert gibt die Fehlerwahrscheinlichkeit einer falschen Detektion des Gens an. Das heißt, es wird fälschlicherweise als induziert oder reprimiert eingestuft. Differentiell exprimierte Gene werden durch t-Test Statistik identifiziert (Dudoit et al., 2002). Die Normalisierung der Daten nach Yang et al. (2002) und die t-Statistik werden mittels der EMMA 2.4 Software durchgeführt ([www.genetik.uni.bielefeld.de/EMMA/](http://www.genetik.uni.bielefeld.de/EMMA/); Dondrup et al., 2003).

Die Genesis 1.6 Software wird für die Clusteranalysen verwendet. Zur Berechnung der Distanzen wird der Euklidische Algorithmus verwendet. Zur „k-means“ Clusteranalyse wurde die Clusteranzahl auf 15 Cluster festgelegt, da diese Anzahl durch Ausprobieren eine sinnvolle Größe der Cluster bewirkt. Die Berechnung wurde hierbei mit 22 Iterationen durchgeführt.

### C.2.5 Bestimmung der Xanthankonzentration

Die Xanthanmenge wird durch Säurehydrolyse mit anschließender kolorimetrischer Analyse der Glucosekonzentration ermittelt. Hierfür werden die Kulturen bis zum Erreichen der Stationärphase in M9-Minimalmedium mit 5 % Glucose angezogen. Die entsprechende Xanthankonzentration lässt sich anhand der gemessenen Glucosekonzentration annäherungsweise berechnen.

- Zellen bei 4 °C und 9.000 x g für 20 min zentrifugieren
- 20 ml des Überstandes 4 Tage gegen  $H_2O_{MP}$  dialysieren, täglich das Wasser wechseln
- Nach der Dialyse die Volumenveränderung notieren
- 2 ml Nachweisreagenz zu 100 µl dialysiertem Überstand geben
- Reaktionsansatz vortexen und auf Eis stellen
- Reaktionsansatz 4 min kochen und wieder auf Eis stellen
- Proben kurz bei RT stehen lassen
- Absorption bei 415 nm messen, als Blindprobe dient ein Reaktionsansatz ohne dialysiertem Überstand

Zur Glucosekonzentrationsbestimmung wird zunächst eine Kalibriergerade mit Glucoselösungen bekannter Konzentration (100 mg/l bis 1 g/l) erstellt. Mit Hilfe dieser Kalibriergerade kann nun die Glucosekonzentration der Proben ermittelt werden. Durch das bekannte Gewichtsverhältnis von Glucose zum Gesamtgewicht des Xanthans kann die Xanthankonzentration errechnet werden. Da der Grad der Modifizierung des Xanthans variiert und von vielen Faktoren abhängt, ist diese Berechnung nur eine Annäherung. In dieser Arbeit wird das Gewicht von 50 % acetyliertem und pyruviliertem Xanthan zur Berechnung der Xanthankonzentration verwendet. Dabei entspricht 1 g Glucose 2,539 g Xanthan.

### **C.2.6 Quantitative RT-PCR**

Die quantitative RT-PCR (qRT-PCR) ermöglicht es gezielt für einzelne Gene transkriptionelle Unterschiede zu messen. Ein Vorteil gegenüber der Microarray-Technologie ist hierbei die höhere Sensitivität dieser Messmethode. Genexpressionsanalysen mittels Microarray-Technologie verschaffen eher einen globalen Überblick, die qRT-PCR hingegen ermöglicht es einzelne Gene gezielt zu analysieren. Somit eignet sich die qRT-PCR als dem Microarray nachgeschaltete Messmethode um Ergebnisse zu verifizieren und einzelne evtl. nicht mittels Microarray detektierte Kandidaten gezielt zu analysieren. In dieser Arbeit wurde die qRT-PCR mittels des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green I durchgeführt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff lagert sich nur in doppelsträngiger DNA ein. Der gebundene SYBR-Green I DNA Komplex absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 498 nm und emittiert Licht bei einer Wellenlänge von 522 nm. Die Fluoreszenz des gebundenen SYBR-Green I ermöglicht es nun die Bildung doppelsträngiger DNA während des PCR-Prozesses zu messen.

Die RNA wird wie in C.2.4.2.1 beschrieben isoliert. Zur Durchführung der qRT-PCR wird entweder der SensiMix One-Step Kit (Quantace) oder der Verso SYBR Green 1-Step QRT-PCR Kit Plus ROX Vial (Thermo Scientific) verwendet. Die qRT-PCR wird mittels eines Opticon Real-Time PCR Detektions Systems (Bio-Rad) durchgeführt.

#### **qRT-PCR Programm**

1.	Reverse Transkription	30 min	49 °C
2.	Enzymaktivierung	10 min	95 °C
3.	Denaturierung	15 sec	95 °C
4.	Annealing	30 sec	primerabhängig
5.	Polymerisation	30 sec	72 °C
6.	Fluoreszenzmessung		
7.		44 x die Schritte 3-6 wiederholen	

Nach dem Durchlaufen des qRT-PCR Programms wird, zur Analyse der PCR-Produkte, eine Schmelzanalyse durchgeführt. Hierfür wird die Temperatur, in einem Bereich von 55 °C bis 96 °C, in 1 °C-Schritten erhöht. Bei jeder Zwischenstufe wird die Temperatur für 10 s gehalten und die Fluoreszenz gemessen. Durch den Abfall der Fluoreszenz lässt sich die Schmelztemperatur des PCR-Produktes ermitteln. Da größere DNA-Fragmente höhere Schmelztemperaturen haben, lassen sich spezifische PCR-Produkte von Primerdimeren unterscheiden.

### **C.2.7 Diskontinuierliche Fermentation**

Für die diskontinuierliche Fermentation wurde zunächst 1 ml einer Glycerinkultur des Stammes Xcc LMG 8031\* zu 100 ml Vorkulturmedium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben gegeben. Die Vorkultur wurde bei 20 °C und bei 120 rpm für 65 h inkubiert. Die gesamte Vorkultur wurde anschließend zum Animpfen von 900 ml Zwischenkultur verwendet. Die Zwischenkultur wird in einem 2 l Bioreaktor mit der Modellbezeichnung Biostat B2 der Firma B. Braun Biotech angezogen. Die Kultivierung der Zwischenkultur wurde bei 30 °C für 22 h durchgeführt. Dabei wurde der pH-Wert bei 7 konstant gehalten und mit Luft begast (1,5 vvm). Der  $pO_2$ -Wert wurde durch Regelung des Rührers bei 30 % gehalten. Nach 22 h wurde die gesamte Zwischenkultur zum Animpfen von 9 l Bioreaktor-Produktionsmedium verwendet. Die Fermentation wurde in einem 10 l Bioreaktor mit der Modellbezeichnung Biostat C der Firma B. Braun Biotech durchgeführt. Dabei wurde die Temperatur bei 30 °C gehalten und mit 0,68 vvm Luft begast (vvm = Luftvolumen/Flüssigvolumen/Minute). Der pH-Wert wurde während der Kultivierung bei pH 6,4 und der  $pO_2$ -Wert, durch Regelung des Rührers, bei 30 % gehalten. Während der Kultivierung wurden ca. alle 4 h Proben genommen bis nach 72 h die Kultivierung beendet wurde. Die Fermentation führte die Firma „Evonik Industries“ in Freising durch. Die Bakterienzellzahl wird durch das Ausplattieren von Verdünnungsreihen ermittelt. Zur Bestimmung der Trockenmasse (TM) wird die Zellsuspension erst mit  $H_2O_{MP}$  verdünnt (Verhältnis Zellsuspension zu  $H_2O_{MP}$  = 1 zu 7). Anschließend wird die Probe in vorgetrockneten und gewogenen Zentrifugenröhrchen für 20 min bei 19.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet unter Vakuum bei 60 °C und 0,2 mbar getrocknet. Anschließend wird die Probe gekühlt und gewogen. Die Glucosekonzentration wurde mittels der YSI 2700 Analysestation (YSI Life Sciences) gemessen. Hierfür wurde die Zellsuspension mit  $H_2O_{MP}$  verdünnt (Verhältnis Zellsuspension zu  $H_2O_{MP}$  = 1 zu 8) und anschließend für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um einen klaren Überstand für die Analyse zu bekommen. Der Acetatgehalt wurde mittels Ionenchromatographie (Compact IC 761; Metrohm) bestimmt. Hierfür wurde zunächst die

Biomasse durch Zentrifugation und das Xanthan durch Ultrafiltration entfernt. Die Analysen der Fermentationsparameter erfolgte bei der Firma Evonik Industries in Freising.

## D Ergebnisse

### D.1 Genomvergleich zweier *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Stämme mittels Microarray-Technologie

In dieser Arbeit wurde mit zwei verschiedenen Bakterienstämmen der Art *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (Xcc) mit den Bezeichnungen LMG 8031\* und B100 gearbeitet. Der erste in dieser Arbeit verwendete Stamm, Xcc LMG 8031\*, ist ein industriell verwendeter Xanthan-Produktionsstamm und ein Derivat von Xcc LMG 8031. Der zweite Stamm mit der Bezeichnung Xcc B100 wurde vor Kurzem sequenziert (Vorhölter et al., 2008). Die Sequenz und die Annotation des Xcc B100-Stammes bilden die Grundlage für das Design des in dieser Arbeit verwendeten Microarrays Xcc5kOLI.

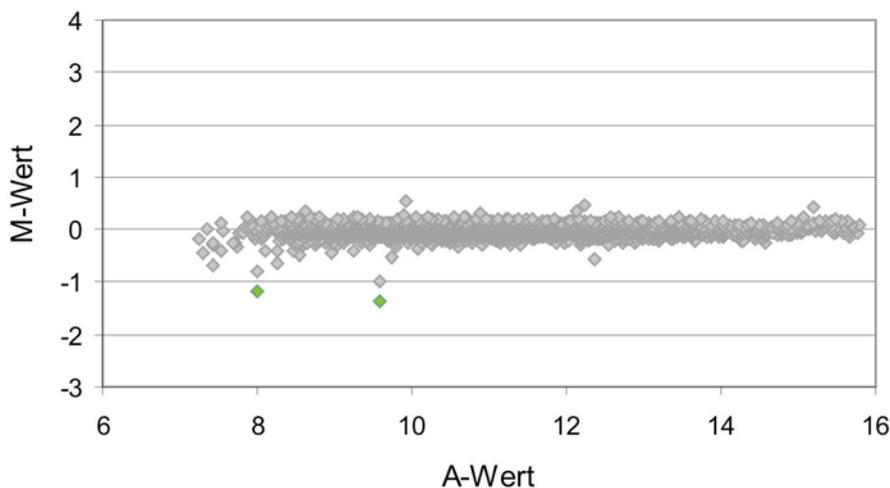
Durch die Verwendung von Microarrays kann ein schneller Genomvergleich zweier Stämme durchgeführt werden. Hierfür wird die genomische DNA zweier Stämme isoliert, mit Restriktionsenzymen verdaut, anschließend mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und gegen den Microarray hybridisiert.

#### D.1.1 Der Microarray Xcc5kOLI

Der Microarray beinhaltet genspezifische 50mer- bis 70mer- Oligonukleotide zu 4553 annotierten Genen. Dabei ist jedes Oligonukleotid in dreifacher Replikatzahl auf dem Microarray vorhanden. Um das Ausmaß der Kreuzhybridisierung zu untersuchen, sind auch Stringenzkontrollen mit je 70 %, 80 % und 90 % Sequenzidentität zu den fünf Genen *gapA*, *rpsA*, *rpsB*, *rpsL* und *rpmI* in das Microarraylayout integriert. Zusätzlich beinhaltet der Microarray noch 12 „alien“-DNA-Oligonukleotide (Sequenzen die nicht im Xcc-Genom vorkommen) und fünf „spiking“-Kontroll-Oligonukleotide (Oligonukleotide, zu denen Sonden mit bekannter Konzentration vorliegen).

Um die Streuung der Messdaten einer Hybridisierung zu untersuchen, wurde die revers transkribierte RNA von drei unabhängigen Xcc B100-Anzuchten mit identischen Kultivierungsbedingungen, in den drei möglichen Kombinationen gegen den Microarray hybridisiert (Probe 1 : Probe 2; Probe 1 : Probe 3; Probe 2 : Probe 3). Als Medium wurde hierbei M9-Minimalmedium mit 1 % Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet. Die so gemessenen M-Werte geben demzufolge die Streuung wieder, deren Ursache in der technischen Aufbereitung der Proben und der transkriptomischen Unterschiede der biologischen Replikatelagen. Eine solche Testhybridisierung ist nötig, um die Grenzwerte für die spätere Datenanalyse festzulegen. Abb. D.1 zeigt die gemessenen M-Werte der Testhybridisierung. Bei der dargestellten Punktwolke wurden die M-Werte ( $\log_2$  der Differenz der Signalintensitäten) auf der y-Achse und die A-Werte ( $\log_2$  der Signalintensitäten) auf der

x-Achse aufgetragen. Mehr als 99% der Gene liegen zwischen den M-Werten -0,3 und 0,3. Bei den Grenzwerten von  $M \geq 1$  und  $M \leq -1$  wurden in dieser Testhybridisierung zwei Gene als differentiell exprimiert identifiziert (*ctaB*:  $M = -1,35$ ,  $A = 9,58$ ,  $p = 0,13$ ; *tysR*:  $M = 1,18$ ,  $A = 8,0$ ,  $p = 0,01$ ; Abb. D.1 grüne Punkte). Dies ist eine akzeptable Anzahl an falsch-positiven Detektionen und entspricht den Werten, die für Microarrays anderer Organismen beschrieben werden (Hüser et al., 2003; Loos et al., 2001; Rüberg et al., 2003). Auch Grenzwerte für die A- und p-Werte werden zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen und zur Vermeidung falsch-positiver Detektionen verwendet. Der A-Wert, der die Signalintensität wieder gibt, sollte einen gewissen Wert nicht unterschreiten, weil bei niedrigen A-Werten die Streuung der M-Werte zunimmt. Die Testhybridisierung legt einen Grenzwert von  $A > 8$  nahe. Als Grenzwert für den p-Wert, der sich aus der t-Test Statistik berechnet (Dudoit et al., 2002) und die Wahrscheinlichkeit einer falsch-positiven Detektion angibt, wird in der Regel  $p \leq 0,05$  verwendet. Dies entspricht einer Wahrscheinlichkeit von 5 % der falsch-positiven Detektion. Bei Verwendung dieser drei Grenzwerte wurde keines der Gene in der Testhybridisierung als differentiell exprimiert identifiziert.

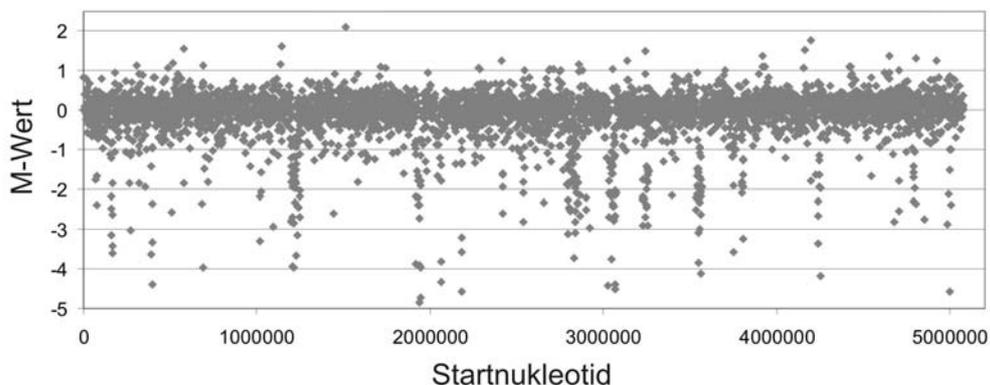


**Abb. D.1:** Hybridisierung zur Analyse der Messdatenstreuung. Auf der x-Achse ist der A-Wert ( $\log_2$  der Signalintensität) und auf der y-Achse der M-Wert ( $\log_2$  der Signaldifferenz) aufgetragen. Aus drei unabhängigen Xcc B100-Kultivierungen in M9-Minimalmedium wurde die RNA isoliert, revers transkribiert und mit entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die drei Proben wurden anschließend in den drei möglichen Kombinationen (Probe 1 : Probe 2; Probe 1 : Probe 3; Probe 2 : Probe 3) gegen den Microarray Xcc5kOLI hybridisiert. Zwei Gene (*ctaB* und *tysR*) haben einen M-Wert von  $\leq -1$ , keines der Gene überschreitet jedoch alle drei Grenzwerte zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen von  $M \geq 1$  oder  $\leq -1$ ,  $A > 8$  und  $p \leq 0,05$ .

Da der Microarray Xcc5kOLI sowohl für transkriptomische Analysen des Stammes Xcc B100 als auch des Stammes Xcc LMG 8031\* verwendet werden soll, muss zunächst untersucht werden, ob der Microarray, der auf der genomischen Sequenz des Xcc B100-Stammes basiert, auch für den Xcc LMG 8031\*-Stamm verwendet werden kann.

### D.1.2 Genomvergleich der *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Stämme B100 und LMG 8031\*

Um den Grad der Unterschiede der beiden Genome zu analysieren und die Verwendbarkeit des Microarrays für den Stamm Xcc LMG 8031\* zu prüfen, wurde ein Genomvergleich mittels des Xcc5kOLI-Microarrays durchgeführt. Hierfür wurde die genomische DNA der beiden Stämme isoliert, mit Restriktionsenzymen verdaut und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die so markierte genomische DNA der beiden Stämme wurde anschließend gemeinsam gegen den Microarray hybridisiert. Durch diese Methode des Genomvergleichs können Genregionen identifiziert werden, die im Xcc B100-Stamm vorkommen, jedoch im Xcc LMG 8031\*-Stamm deletiert sind. Abb. D.2 zeigt eine Punktwolke („scatter plot“) bei der für jedes auf dem Microarray repräsentierte Gen, der M-Wert auf der y-Achse aufgetragen ist. Auf der x-Achse sind die Gene nach der Position des Startnukleotids im Genom sortiert. Dabei ist Nukleotid eins das erste Nukleotid des Gens *dnaA*. Aus Genomvergleichen verschiedener Stämme der Art *Vibrio cholerae* ist beschrieben, dass ein M-Wert von  $\leq -1,6$  mit einer hohen Wahrscheinlichkeit (90 – 100 %) auf eine Abwesenheit des entsprechenden Gens im vergleichenden Genom hindeutet (Dziejman et al., 2002). Die Punktwolke zeigt an, dass die deletierten Bereiche Gene beinhalten deren M-Werte deutlich unter dem Wert von -1,6 liegen. Zur Detektion von deletierten Bereichen mit möglichst wenigen falsch positiven Detektionen bietet sich daher ein etwas höherer M-Grenzwert von -2 an.



**Abb. D.2:** Genomvergleich der beiden Xcc Stämme LMG 8031\* und B100 mittels des Microarrays Xcc5kOLI. Das Design des Microarrays basiert auf der Sequenz des Xcc B100-Stammes. Gene, die im Stamm Xcc LMG 8031\* im Vergleich zu Xcc B100 fehlen, zeichnen sich durch einen niedrigen M-Wert aus. Auf der x-Achse sind die Gene nach der Position des Startnukleotids im Genom sortiert.

Genregionen die im Stamm Xcc LMG 8031\* vorkommen, jedoch in Xcc B100 deletiert sind, können mit dieser Methode nicht detektiert werden, weil diese Gene nicht auf dem Microarray repräsentiert sind. Gene die bei diesem Genomvergleich mit einem hohen M-Wert detektiert wurden, sind in der Regel Transposasen oder Gene die in beiden Stämmen in unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen. Mit dem Genomvergleich kann eine

schnelle Einschätzung der Ähnlichkeit zweier Genome getroffen werden. Zum Vergleich der Genvarianz der beiden Stämme Xcc LMG 8031\* und Xcc B100 mit Genomvergleichsstudien anderer Organismen wurde die Anzahl der Gene ermittelt, die einen M-Wert  $\leq -1$ ,  $\leq -1,6$  und  $\leq -2$  aufweisen. So haben nur 312 der insgesamt 4435 detektierten Gene einen M-Wert  $< -1$  (7 %), 200 Gene einen M-Wert  $\leq -1,6$  (4,4 %) und nur 131 der Gene einen M-Wert  $< -2$  (3 %). Dies liegt eher im Bereich konservierter Genome und deutet auf eine moderate Heterogenität der Genome. Demzufolge sind die zwei Genome der Stämme Xcc B100 und Xcc LMG 8031\* ähnlich genug, um den Microarray auch für transkriptomische Analysen des Stammes Xcc LMG 8031\* einzusetzen. Abgesehen von einer Genregion von *fimT* (xcc-b100\_1667) bis xcc-b100\_1694, die unter anderem 18 Virulenzgene trägt, beinhalten die möglicherweise deletierten Regionen zum größten Teil Gene unbekannter Funktion.

## D.2 Genexpressionsprofil einer Xcc-Fermentation

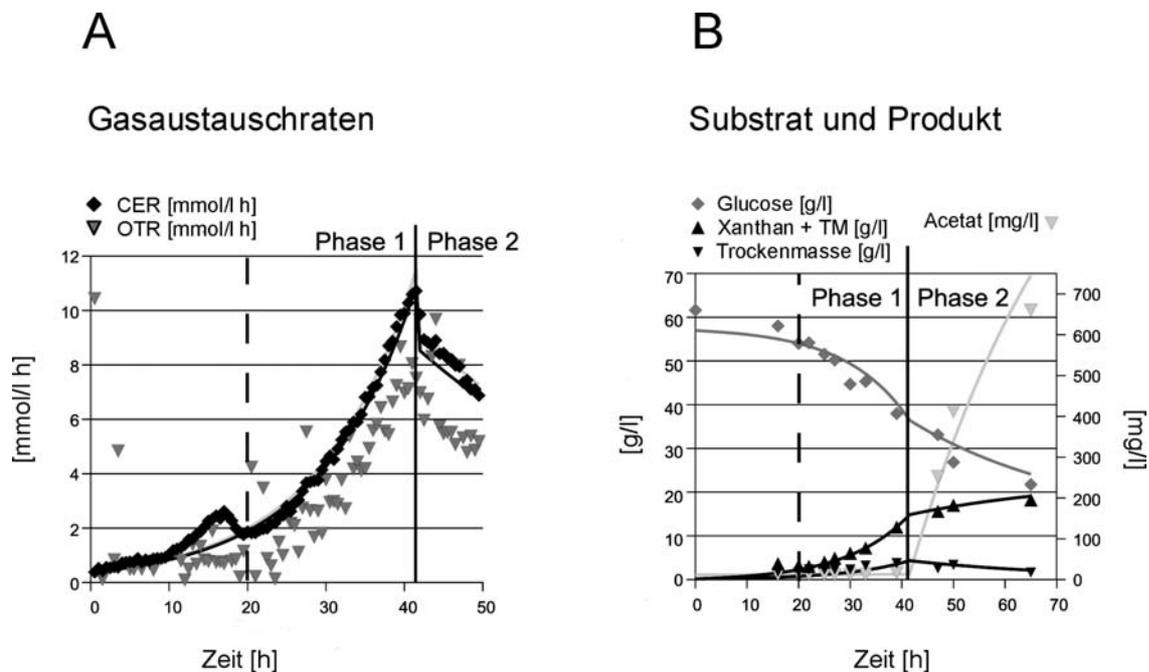
Mittels des zur Verfügung stehenden Microarrays (Xcc5kOLI) wurde von einer typischen Xcc-Kultivierung im 10 L-Maßstab ein Profil der Genexpression erstellt. Hieraus sollten Erkenntnisse über mögliche transkriptionelle Vorgänge gewonnen werden, die das Verständnis der genetischen Vorgänge während einer Fermentation fördern und Ansatzpunkte für die Stammentwicklung liefern.

### D.2.1 Diskontinuierliche Fermentation von Xcc LMG 8031\* im 10 L-Maßstab

Der industriell verwendete Xanthan-Produktionsstamm Xcc LMG 8031\* wurde in einem 10 L-Bioreaktor kultiviert. Die Fermentation erfolgte, wie in Material und Methoden beschrieben, in Freising bei der Firma „Evonik Industries“. Hierbei wurden ca. alle vier Stunden Proben genommen, bis die Kultivierung nach 65 Stunden beendet wurde. Der Verlauf der Fermentation ist in Abb. D.3 wiedergegeben. Sowohl die Gasaustauschraten (Abb. D.3A) als auch die Werte der Substrate und Produkte (Abb. D.3B) zeigen eine klare Einteilung in zwei Phasen (im weiteren Verlauf Phase 1 und Phase 2 genannt), die weitestgehend der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase entsprechen.

Phase 1 zeichnet sich durch die Biomasseproduktion aus. In dieser Phase wird das aufgenommene Substrat in Biomasse und Xanthan umgewandelt. Mit zunehmender Zellzahl steigt auch der Sauerstoffverbrauch und die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Abluft an, was auf ein exponentielles Wachstum in Phase 1 hindeutet. Die Zunahme der Biomasse ist auf Phase 1 beschränkt, wobei die Xanthanproduktion in Phase 1 und auch in Phase 2 stattfindet. Mit Beginn der Phase 2 ist eine Anreicherung des Nebenproduktes Acetat im Medium feststellbar. Zwischen den Messpunkten 10 und 20 Stunden ist ein lokales Maximum in der

CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Abluft zu beobachten. Dieses Zeitfenster ist auch die einzige Phase der Fermentation, in der Säure zur Regulierung des pH-Wertes zugegeben werden musste. Die Probenentnahme deckt diesen Bereich leider nicht ausreichend ab, um diese Phase transkriptomisch zu analysieren. Phase 1 wird deshalb als Zeitfenster zwischen den Messpunkten 20 und 42 Stunden definiert. Phase 2 verläuft demzufolge von Messpunkt 42 h bis zum Ende der Fermentation nach 65 Stunden.

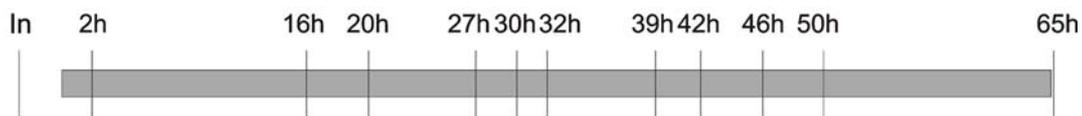


**Abb. D.3:** Darstellung der Fermentationsparameter: Gasaustauschraten bzw. Substrat und Produkt. A) Sowohl die Kohlendioxidtransferrate (CER, schwarze Vierecke) als auch die Sauerstofftransferrate (OTR, graue Dreiecke) haben ihr Maximum nach ca. 42 h Kultivierung. B) Dargestellt sind die Daten der Glucosekonzentration (graues Viereck), Xanthan mit Trockenmasse (große schwarze Dreiecke), Trockenmasse (kleine schwarze Dreiecke) und Acetatkonzentration (graue Dreiecke). Nach 42 h reichert sich Acetat im Medium an und es wird keine weitere Biomasse produziert, wobei die Xanthankonzentration weiter ansteigt. Sowohl die Daten der Gasaustauschraten als auch der Substrat- und Produktkonzentrationen zeigen eine Einteilung in zwei Phasen (Phase 1 und Phase 2), die der exponentiellen bzw. der stationären Wachstumsphase entsprechen.

## D.2.2 Transkriptomische Zeitreihe der Fermentation mittels Microarray-Technologie

Das Genexpressionsprofil der Fermentation wurde mittels des Microarrays Xcc5kOLI aufgenommen. Da die hier verwendete Microarray-Technologie eine vergleichende Methode ist, musste zunächst eine geeignete Referenz produziert werden, gegen die alle Proben der Fermentation hybridisiert werden können. Das Verwenden einer identischen Referenz ermöglicht es, die einzelnen Proben miteinander zu vergleichen und eine transkriptomische Zeitreihe für nahezu jedes Gen im Genom zu erstellen. Zur Produktion der Referenz wurde der Stamm Xcc LMG 8031\* in Erlenmeyerkolben im Produktionsmedium bei 30 °C angezogen und die RNA nach Erreichen einer o.D.<sub>600</sub> von 0,4 isoliert. Die isolierte RNA aus

mehreren Kultivierungen wurde vereint und gründlich vermischt um eine homogene Verteilung der mRNA sicherzustellen. Auf diese Weise wurde eine identische Referenz für bis zu 90 Hybridisierungen hergestellt. Für eine Zeitreihenmessung der Fermentation, wurden für jeden Zeitpunkt drei technische Replikate analysiert. Abb. D.4 zeigt die Verteilung der Zeitpunkte der Probenentnahme. Um die Genexpressionsprofile auswerten zu können wurde zunächst der erste Probenentnahmezeitpunkt der Fermentation als Startpunkt der transkriptionellen Profilerstellung definiert. Dies bedeutet, dass die Veränderungen der M-Werte jedes Gens zum Startpunkt (Zeitpunkt 2 h) der Fermentation angezeigt werden. So können die Veränderungen der Genaktivität im Verlauf der Fermentation für jedes Gen beobachtet werden. Dies ist möglich, da für alle Hybridisierungen eine identische Referenz verwendet wurde. Um Genregionen zu identifizieren, die ein koordiniertes Verhalten in der Genexpression im Verlauf der Fermentation aufweisen, wurden Punktwolken erstellt in denen die Gene nach ihrer Position im Genom auf der x-Achse sortiert wurden und die Veränderungen der M-Werte auf der y-Achse angegeben sind (Abb. D.5A). Die Positionsnummern wurden hierbei in der Reihenfolge der Position im Genom vergeben, beginnend mit dem Gen *dnaA* (mit der Positionsnummer 1) und endend mit dem Gen *xcc-b100\_4468* (mit der Positionsnummer 4436). Gene, die benachbart im Genom lokalisiert sind und eine koordinierte Repression oder Induktion zeigen, können mit solch einer Punktwolke leicht als Punktcluster identifiziert werden.



**Abb. D.4:** Probenentnahmezeitpunkte während der 10 L-Batch-Fermentation. Der graue Balken repräsentiert die Fermentationsdauer. Als Startpunkt für die transkriptionelle Profilerstellung der Fermentation wurde der erste Messpunkt nach 2 h Kultivierung gewählt. So können die Veränderungen der M-Werte jedes Gens zum Startpunkt angezeigt werden. Abkürzungen: In, Inoculum.

Eine Genregion die bei der Fermentation ein auffälliges Expressionsverhalten zeigt geht von Positionsnummer 2177 bis 2230 und beinhaltet die Gene von *cheZ* bis *xcc-b100\_2253*. Diese Genregion ist in den Punktwolken der Abb. D.5A mit einem schwarzen Pfeil markiert. Sie beinhaltet hauptsächlich Gene, deren Produkte eine Rolle in der Motilität spielen. Diese Genregion zeigt eine Induktion zwischen den Zeitpunkten 20 und 30 h und erneut zum Zeitpunkt 46 h. Die Motilität ist für die Bakterienzelle im Hinblick auf den Energieverbrauch ein kostspieliger Prozess. Es ist also nachvollziehbar, dass die entsprechenden Gene der Motilität während der exponentiellen Phase, in der genügend Energie zur Verfügung steht, aktiv sind. Die kurze erneute Induktion zum Zeitpunkt 46 h, könnte hingegen eine Reaktion

auf die sich verschlechternden Bedingungen während der Fermentation sein. So könnten die Gene kurzzeitig aktiviert worden sein, damit sich das Bakterium den sich verschlechternden Umweltbedingungen entziehen kann. Anschließend werden diese Gene zur Energieersparnis wieder reprimiert.

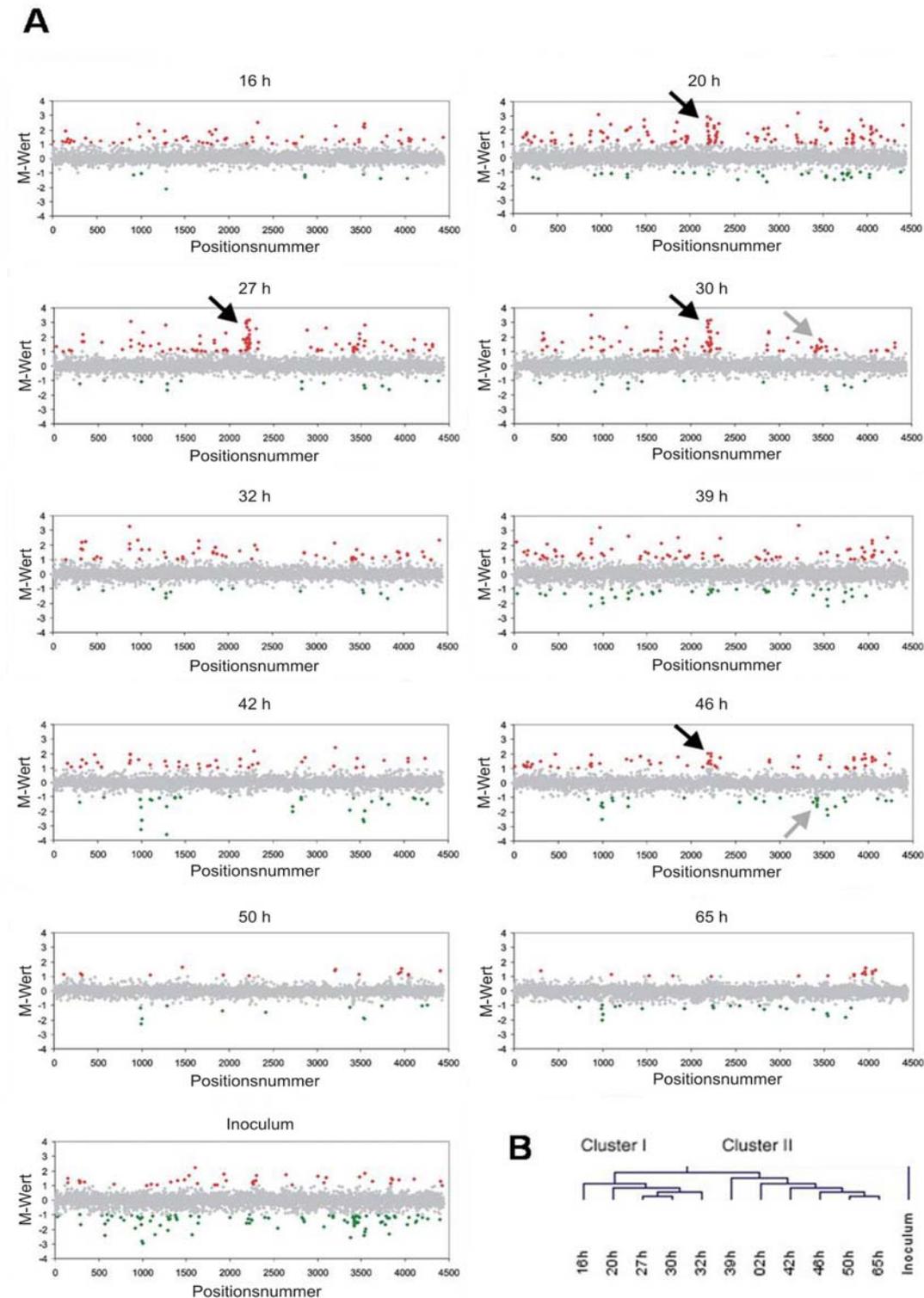


Abb. D.5

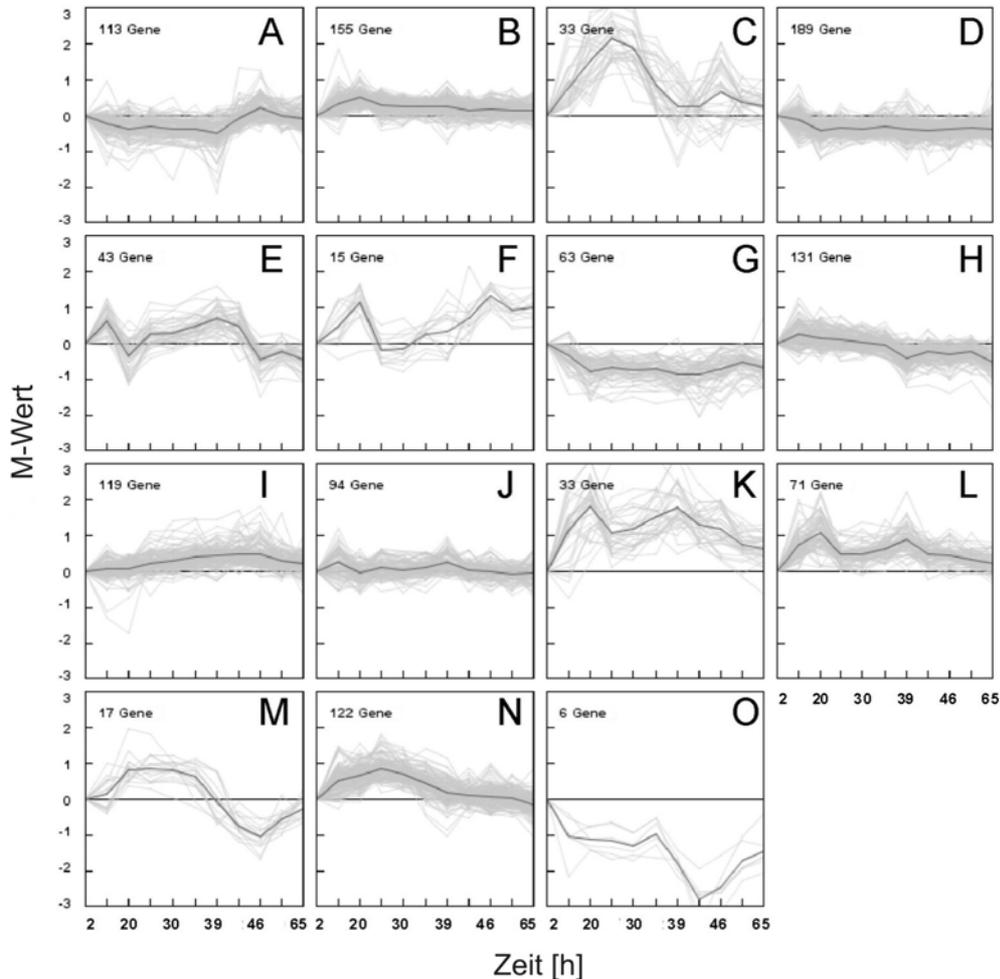
Eine weitere Genregion, die ein auffälliges transkriptomisches Profil zeigt, beinhaltet die Gene *rpIQ* bis *rpsJ* mit den entsprechenden Positionsnummern 3394 bis 3420. Diese Genregion ist in Abb. D.5 mit einem grauen Pfeil gekennzeichnet und beinhaltet hauptsächlich Gene die für ribosomale Proteine kodieren. Das Transkriptionsprofil zeigt hierbei eine Induzierung in Phase 1 und eine Reprimierung in Phase 2 der Fermentation.

Ein hierarchisches Clustering der Transkriptomdaten zeigt, dass die Zeitpunkte der Probennahme sich in zwei große Cluster einsortieren (Abb. D.5B). Die zwei Cluster entsprechen hierbei den Phasen 1 und 2 der Fermentation mit der Ausnahme, dass der Zeitpunkt 2 h in Cluster II liegt. In diesem Cluster befinden sich ansonsten nur Messwerte die nach 32 stündiger Fermentation aufgenommen wurden. Dies deutet darauf hin, dass das transkriptomische Profil der Bakterienzellen nach 2 h Fermentation noch eher dem Profil einer stationären als einer exponentiellen Kultur ähnelt. Das Inoculum bildet beim hierarchischen Clustering ein Cluster für sich. Dies war durch die Unterschiede in der Anzucht auch so zu erwarten.

**Abb. D.5:** Transkriptionsprofil einer Fermentation von Xcc LMG 8031\* in einem 10 L-Bioreaktor. A) Die Punktwolken geben den  $\log_2$ -Wert der Signalintensitätsunterschiede (M-Wert) auf der y-Achse und die Position im Genom auf der x-Achse an. Dabei wird die Position im Genom durch eine Positionsnummer dargestellt. Hierfür wurden die Gene, beginnend mit dem Gen *dnaA* und endend mit dem Gen *xcc-b100\_4468*, nach ihrer Reihenfolge im Genom nummeriert. Die angegebenen M-Werte sind die Unterschiede der M-Werte im Vergleich zu dem Startpunkt der Fermentation (Zeitpunkt 2 h). Die roten Punkte markieren Gene mit einer Veränderung des M-Wertes  $\geq 1$ . Die grünen Punkte markieren Gene mit einer Veränderung des M-Wertes  $\leq -1$ . Der schwarze Pfeil kennzeichnet eine Genregion, die hauptsächlich für Proteine der Motilität kodiert. Der graue Pfeil markiert eine Genregion, die hauptsächlich für ribosomale Proteine kodiert. B) Hierarchisches Cluster der Probenentnahmezeitpunkte der Fermentation. Die Zeitpunkte sortieren sich in zwei große Cluster, die zum großen Teil den Phasen 1 und 2 entsprechen. Das Inoculum bildet ein Cluster für sich, das auf die unterschiedlichen Kulturbedingungen zurückzuführen ist. Der Zeitpunkt 2 h sortiert sich in Cluster 2 ein, was darauf schließen lässt, dass zu diesem frühen Zeitpunkt die transkriptomische Umstellung auf die exponentielle Phase noch nicht beendet ist. Das Clustering wurde nach dem Prinzip des „average linkage clustering“ und der euklidischen Distanzberechnung durchgeführt.

### **D.2.3 „k-means“-Clustering der transkriptomischen Daten**

Um die hohe Anzahl der Daten zu analysieren und Gene zu identifizieren, die ein ähnliches Transkriptionsprofil besitzen, aber nicht benachbart im Genom lokalisiert sind, wurde ein „k-means“-Clustering durchgeführt (Abb. D.6). Bei dieser Art des Clusters wird die Anzahl der Cluster vorgegeben. Zunächst werden hierbei die Clusterzentren zufällig positioniert. In einem weiteren Schritt werden die Punkte den Clusterzentren zugeordnet, denen sie am nächsten liegen. Hierfür wurde die euklidische Distanzberechnung verwendet. Darauf folgend wird für jedes Cluster das Zentrum neu berechnet und die Clusterzuordnung wiederholt. Diese Schleife sollte solange wiederholt werden bis die Clusterzuordnungen sich nicht oder nur noch kaum verändern. Die Clusteranzahl sollte dabei so gewählt werden, dass die Clustergröße und -zusammensetzung zufriedenstellend sind. Wird eine zu geringe Anzahl an Cluster vorgegeben, so bilden sich große Cluster, die sehr unterschiedliche Transkriptionsprofile beinhalten und die nicht mehr unterschieden werden können. Ist die vorgegebene Clusteranzahl zu hoch angesetzt, so entstehen sich viele sich ähnelnde Cluster und der gruppierende und sortierende Effekt eines Clusterings geht verloren. Für die Transkriptomdaten der Fermentation hat sich die Clusteranzahl von 15 als geeignet ergeben. Hierbei wurden nur Gene berücksichtigt, die im Verlauf der Fermentation mindestens einmal einen M-Wert über 0,5 oder unter -0,5 zeigten. Dadurch wurden Gene aussortiert, die keine signifikanten Unterschiede der Genexpression im Verlauf der Fermentation zeigten. In Abb. D.6 sind die „k-means“-Gencluster und die Expressionsprofile der entsprechenden Gene abgebildet. Besondere Aufmerksamkeit wurde auf Cluster gelegt, die eine unterschiedliche Genaktivität in Phase 1 und 2 zeigten, da diese womöglich Gene beinhalten die Indikatoren für den Zustand der Fermentation darstellen und als Qualitätskontrolle für eine Fermentation dienen könnten. So wäre es unter Umständen möglich anormal verlaufende Fermentationen auf transkriptomischer Ebene zu identifizieren und frühzeitig aus der Produktionskette zu entfernen. Die Cluster C, M und O zeigen ein solches Transkriptionsprofil und werden im Folgenden im Detail beschrieben.



**Abb. D.6:** Resultat des „k-means“-Clustering der Transkriptomdaten der Fermentation. Für das „k-means“-Clustering wurden nur Gene berücksichtigt, die mindestens zu einem Zeitpunkt einen M-Wert höher 0,5 oder niedriger -0,5 aufweisen konnten. Die angegebenen M-Werte sind die Veränderungen zum Startpunkt 2 h. Als Clusteranzahl wurde 15 vorgegeben und es wurde die euklidische Distanzberechnung verwendet. Die Anzahl an Iterationen war auf maximal 50 eingestellt. Das Clustering wurde mit der Software Genesis durchgeführt (Sturn et al., 2002).

Cluster M (Abb. D.6M; Tabelle D.1) beinhaltet 17 Gene die eine Induktion in Phase 1 und eine Repression in Phase 2 aufweisen. Dieses Transkriptionsprofil ähnelt dem der Genregion für ribosomale Proteine, die im Transkriptionsprofil der Fermentation aufgefallen ist (Abb. D.5A, graue Pfeile). Demzufolge kodieren auch 14 der 17 Gene des Cluster M für ribosomale Proteine. Neun dieser Gene sind ortholog zu den Genen des ribosomalen S10 Operons in *E. coli* (Zurawski & Zurawski, 1985) und liegen in der Genregion, die mittels der Punktwolkendiagramme detektiert wurde (Abb. D.5A; graue Pfeile). Zusätzlich beinhaltet dieses Cluster das Gen für eine  $\beta'$ -Untereinheit einer RNA-Polymerase (*rpoC*), eine exportierte Katalase (*cat3*) und ein Gen für ein Protein der RND-Überfamilie (*czcA*) deren Ortholog in *Ralstonia* sp. CH34 als Schwermetalltransporter fungiert (Goldberg et al., 1999).

**Tabelle D.1:** Gene des „k-means“-Gencluster M.

Genname	GenDB-Ident.Nr.	Genprodukt
<i>rpsA</i>	xcc-b100_1986	30S ribosomales Protein S1
<i>rpsK</i>	xcc-b100_3437	30S ribosomales Protein S11
<i>rpsN</i>	xcc-b100_3446	30S ribosomales Protein S14
<i>rplE</i>	xcc-b100_3447	50S ribosomales Protein L5
<i>rplN</i>	xcc-b100_3449	50S ribosomales Protein L14
<i>rpmC</i>	xcc-b100_3451	50S ribosomales Protein L29
<i>rpsC</i>	xcc-b100_3453	30S ribosomales Protein S3
<i>rplV</i>	xcc-b100_3454	50S ribosomales Protein L22
<i>rpsS</i>	xcc-b100_3455	30S ribosomales Protein S19
<i>rplB</i>	xcc-b100_3456	50S ribosomales Protein L2
<i>rplW</i>	xcc-b100_3457	50S ribosomales Protein L23
<i>rplD</i>	xcc-b100_3458	50S ribosomales Protein L4
<i>rplC</i>	xcc-b100_3459	50S ribosomales Protein L3
<i>rpsJ</i>	xcc-b100_3460	30S ribosomales Protein S10
<i>rpoC</i>	xcc-b100_3465	DNA abhängige RNA-Polymerase ( $\beta'$ -Untereinheit)
<i>cat3</i>	xcc-b100_4136	Exportierte Katalase
<i>czcA</i>	xcc-b100_4232	RND Überfamilie Protein

Das transkriptomische Profil des Clusters C zeichnet sich durch eine Induktion von Zeitpunkt 20 h bis ungefähr 39 h und eine zusätzliche Induktion zum Zeitpunkt 46 h aus (Abb. D.6C; Tabelle D.2). Dieses Cluster beinhaltet insgesamt 33 Gene von denen elf für Proteine der Motilität kodieren. Auch die meisten Gene der Genregion, die in Abb. D.5A durch schwarze Pfeile gekennzeichnet sind, sortieren sich in dieses Cluster ein. Das transkriptomische Profil dieses Clusters lässt vermuten, dass die beinhalteten Gene womöglich für Genprodukte kodieren, die in stark energieverbrauchende Prozesse involviert und möglicherweise an einer Stressantwort beteiligt sind. So würde sich die Induktion während der energiereichen exponentiellen Phase und die erneute Induktion zu Beginn der stationären Phase mit den damit verbundenen Stressbedingungen erklären lassen.

**Tabelle D.2:** Gene des „k-means“-Cluster C

Gene	GenDB-Ident.Nr.	Genprodukt
<i>sfIA</i>	xcc-b100_0339	NADH-abhängige FMN-Reduktase
<i>metE</i>	xcc-b100_0340	Konserviertes hypothetisches Protein
	xcc-b100_0341	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamat-Homocystein Methyltransferase
<i>cysK</i>	xcc-b100_0560	TonB-abhängiger Rezeptor
	xcc-b100_0994	Cysteinsynthase
	xcc-b100_1208	TonB-abhängiger Rezeptor
	xcc-b100_1287	TonB-abhängiger Rezeptor
<i>ptlF</i>	xcc-b100_1339	Endoproteinase Arg-C
	xcc-b100_1679	Typ-IV Sekretionssystemprotein,
<i>corC</i>	xcc-b100_1839	Magnesium und Kobalt Effluxprotein
	xcc-b100_1847	Mutmaßliche lösliche lytische Mureintransglycosylase
	xcc-b100_1972	TonB-abhängiger Rezeptor
	xcc-b100_2325	Mutmaßliche filamentöse Hemagglutinin-abhängiges Protein
	xcc-b100_2253	Mutmaßlicher Negativregulator der Flagellinsynthese
<i>flgB</i>	xcc-b100_2250	Flagellar-Protein
<i>flgD</i>	xcc-b100_2248	Flagellar-Protein
<i>flgE</i>	xcc-b100_2247	Flagellar-Anker FlgE

## D Ergebnisse

Gene	GenDB-Ident.Nr.	Genprodukt
<i>flgI</i>	xcc-b100_2243	Flagellar-Protein
<i>fliD</i>	xcc-b100_2238	Flagellar-Protein
<i>phuR</i>	xcc-b100_3584	TonB-abhängiger Rezeptor
	xcc-b100_3585	Konserviertes hypothetisches Protein
<i>fliE</i>	xcc-b100_2224	Flagellar-Protein
<i>fliG</i>	xcc-b100_2222	Flagellar-Protein
<i>fliL</i>	xcc-b100_2217	Flagellar-Protein
<i>fliM</i>	xcc-b100_2216	Flagellar-Protein
<i>fliO</i>	xcc-b100_2214	Flagellar-Protein
<i>flhF</i>	xcc-b100_2203	Flagellar-Protein
	xcc-b100_2916	Mutmaßliches sekretiertes Protein
<i>papD2</i>	xcc-b100_2917	Mutmaßliches Chaperon des Piliaufbaus
<i>cat1</i>	xcc-b100_3134	Katalase
<i>ahpF</i>	xcc-b100_3518	Alkylhydroperoxidreductase Untereinheit F
<i>oxyR</i>	xcc-b100_3519	Transkriptioneller Regulator der LysR-Familie, oxidativer Stress
	xcc-b100_4343	TonB-abhängiger Rezeptor

Ein weiteres interessantes Cluster ist das Cluster O (Abb. D.60; Tabelle D.3). Mit sechs Genen ist es das kleinste der 15 Gencluster. Es beinhaltet Gene, die eine sehr starke Repression in Phase 2 aufweisen. Drei Gene in diesem Cluster, *cysI*, *cysD* und *metL*, kodieren für Proteine der Aminosäuresynthese von Cystein beziehungsweise Methionin. *cysI*, *cysD* und das für einen Sulfat-bindenden ABC-Transporter kodierende *xcc-b100\_3413* spielen auch eine Rolle im Sulfurmetabolismus. Dieses Gencluster mit Genen der Aminosäure- und Sulfursynthese scheint ein allgemeiner Indikator für die generelle Reduktion der Proteinbiosynthese in der Produktionsphase 2 zu sein.

Abschließend ist zu sagen, dass die große Anzahl an transkriptomischen Daten, die bei einem „Monitoring“ einer Fermentation entstehen, sich mittels „k-means“-Clustering gut in mögliche Regulons sortieren lassen. Diese Regulons beinhalten Gene, die zumindest ein ähnliches Genexpressionsverhalten zeigen und möglicherweise somit der gleichen Regulierung unterliegen, sich aber nicht unbedingt auf dem Genom in direkter Nachbarschaft befinden müssen. Dieser Datensatz bietet somit eine nützliche Profilibibliothek zu fast allen Xcc-Genen die für weitere Arbeiten und Studien verwendet werden können. Die Genlisten zu allen „k-means“-Gencluster sind im Anhang aufgelistet.

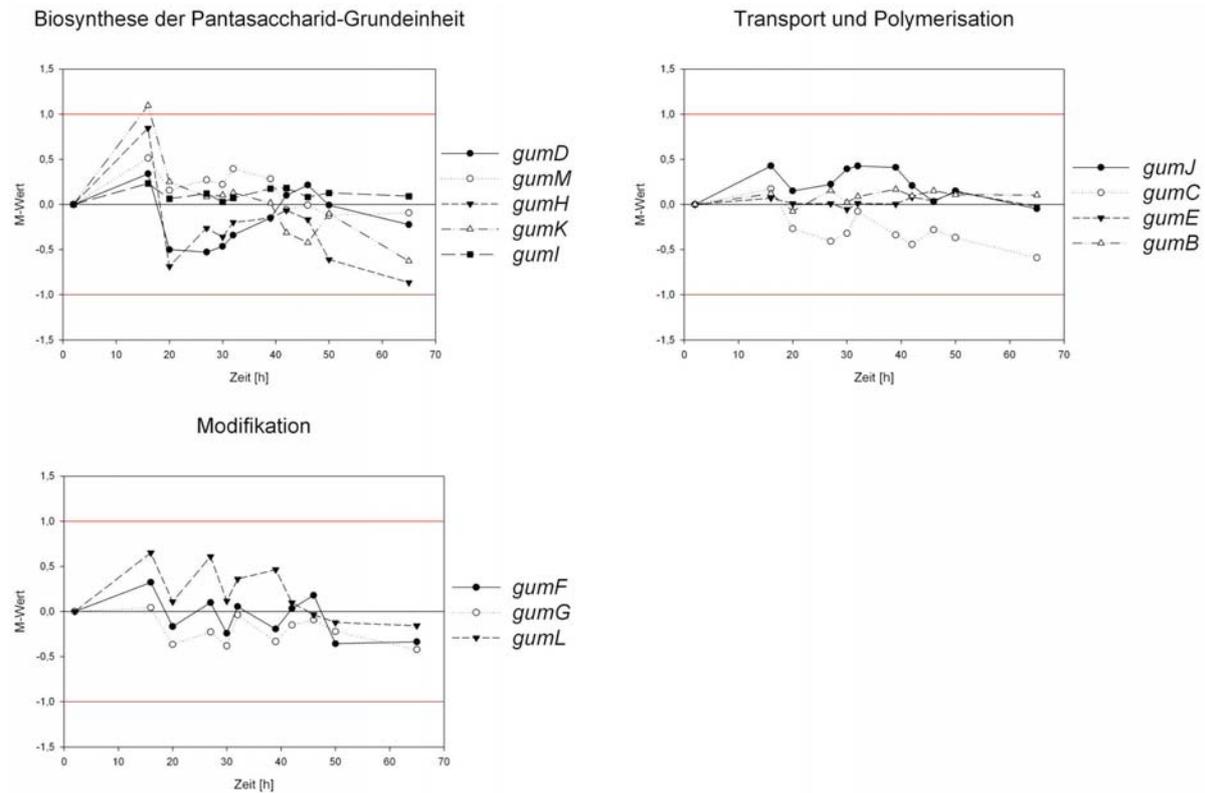
**Tabelle D.3:** Gene des „k-means“-Cluster O

Gene	GenDB- Ident.Nr.	Genprodukt
<i>cysI</i>	xcc-b100_1003	Sulfitreduktase
<i>cysD</i>	xcc-b100_0993	Mutmaßliches Protein des Cysteinmetabolismus
<i>metL</i>	xcc-b100_1299	Homoserindehydrogenase
<i>sbp</i>	xcc-b100_3413	ABC-Sulfatimporter Sulfat-bindendes Protein
<i>tauD</i>	xcc-b100_3577	Taurindioxygenase
	xcc-b100_3578	ABC-Transporter Substratbindendes Protein

#### D.2.4 Transkriptomisches Profil der Xanthan-Biosynthesegene

Von besonderer Bedeutung sind Gene, die für die Xanthan-Biosynthese verantwortlich sind. Diese Gene (*gumB* bis *gumM*) liegen zusammen auf einem 16 kb Gencluster im Xcc-Genom und kodieren für Enzyme der Biosynthese der Pentasaccharid-Grundeinheit, Modifikation, Export und Polymerisation des Xanthans. Die Gene sind dabei in einem Operon organisiert, das einen Promotor vor *gumB* und einen zusätzlichen Promotor vor *gumK* aufweist (Katzen et al., 1996; Katzen et al., 1998).

Das transkriptomische Profil der *gum*-Gene zeigt im Verlauf der Fermentation keine auffallende Induktion oder Repression. Diese Beobachtung bestätigt die Fermentationsdaten zur Xanthanproduktion in der eine kontinuierliche Xanthan-Biosynthese durch beide Fermentationsphasen beobachtet wurde. Abb. D.7 zeigt die Fermentationsprofile der *gum*-Gene getrennt nach ihren Funktionen in der Pentasaccharidsynthese, Modifikation, Transport und Polymerisation. Hierbei ist zu erkennen, dass die Gene ein koordiniertes Profil zeigen. Von den zwölf Genen überschreitet nur das Gen *gumK* den M-Grenzwert von  $\geq 1$  zu einem frühen Zeitpunkt der Fermentation (Zeitpunkt 16 h). *gumK* kodiert für eine Glucuronosyltransferase und katalysiert den Einbau der Glucuronsäure in die Pentasaccharid-Grundeinheit. Ein Grund für das deutlichere Transkriptionsprofil von *gumK* kann der zusätzliche Promotor sein, der vor diesem Gen lokalisiert ist. Leider geben die Transkriptionsprofile der *gum*-Gene keine weiteren Anhaltspunkte für eine phasenspezifische Regulierung.



**Abb. D.7:** Transkriptomische Profile der *gum*-Gene sortiert nach ihrer Funktion in der Pentasaccharidgrundeinheit-Biosynthese, Modifikation, Transport und Polymerisation. Auf der x-Achse ist die Zeit der Kultivierung aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Veränderung des M-Wertes zum Startpunkt der Fermentation (Zeitpunkt 2 h) angegeben.

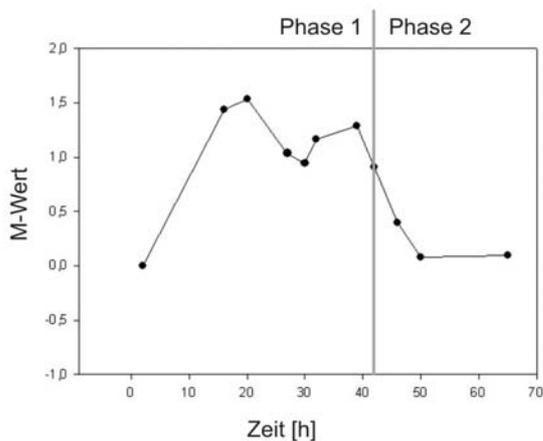
### D.3 Genetische Manipulationen des Produktionsstammes Xcc LMG 8031\*

Anhand der transkriptomischen Daten der Fermentation (Abschnitt D.2.2) und der metabolischen Daten der Firma „Evonik Industries“ wurde nach möglichen Zielgenen gesucht, die für eine genetische Manipulation geeignet wären. Hierbei fiel das Augenmerk auf das Gen *galU* der Biosynthese der aktivierten Zuckervorstufen. Es sollte untersucht werden, ob eine Induktion der Expression eine Kohlenstoff-Flussverschiebung zu Gunsten der Xanthanproduktion führt. Eine weitere Fragestellung war, ob durch die Inaktivierung der Motilität und der damit gesparten Energie ein messbarer Effekt in der Biomasseproduktion zu identifizieren ist.

#### D.3.1 Genetische Manipulation des *galU*-Gens zur Induktion der Expression

Das Gen *galU* kodiert für eine UTP-Glucose-1-Phosphaturidylyltransferase und zeigte in der Fermentation eine Reduktion der Genexpression nach ca. 41 h Kultivierung (Abb. D.8). Das entspricht dem Übergang von Phase 1 zu Phase 2 der Fermentation. Das Protein GalU

katalsiert die Umwandlung von Glucose-1-Phosphat zu UDP-Glucose unter Verbrauch von UTP. Die so gebildete UDP-Glucose kann anschließend von der Zelle für die Xanthanproduktion verwendet werden. Die reduzierte Genexpression in Phase 2 der Fermentation könnte somit eventuell der limitierende Faktor der Xanthanproduktion in dieser Phase sein. Zwar zeigte die Fermentation, dass in beiden Phasen Xanthan gebildet wird, jedoch ist in Phase 2 durch den Stopp der Biomasseproduktion eine höhere Xanthausbeute denkbar, da die aufgenommene Glucose zu einem höheren Anteil in die Xanthanproduktion fließen könnte. Es sollte demnach überprüft werden, ob eine Induktion der Genexpression von *galU* in Phase 2 zu einer höheren Xanthausbeute führt.

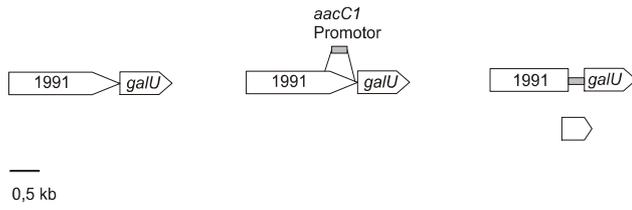


**Abb. D.8:** Transkriptomisches Profil des Gens *galU* während der Fermentation. Das Gen *galU* kodiert für eine UTP-Glucose-1-Phosphaturidyltransferase. Auf der x-Achse ist die Zeit der Kultivierung angegeben. Die Differenz des M-Werts zum Startpunkt der Fermentation (Zeitpunkt 2 h) ist auf der y-Achse aufgetragen. *galU* zeigt eine erhöhte Expression in Phase 1 und eine Reduktion beim Übergang in Phase 2.

Um die Expression des Gens *galU* zu erhöhen, wurde ein konstitutiv hoch exprimierter Promotor vor das Gen kloniert. Als Promotor wurde hierbei der Promotor des Gens *aacC1* ausgewählt. Dieses Gen vermittelt eine Gentamicinresistenz und liegt, als Bestandteil einer Resistenzkassette, im Vektor pMS255 vor. Das *aacC1* Gen kodiert hierbei für eine Acetyltransferase-3-I (AAC3I) und wurde ursprünglich in einem Transposon (Tn1696) in *Pseudomonas aeruginosa* identifiziert (Becker et al., 1995; Wohlleben et al., 1989). Aus frühere Arbeiten ist bekannt, dass *aacC1* konstitutiv auf einem recht hohen Level exprimiert wird (Williams & Northrop, 1976; Wohlleben et al., 1989). Die Promotorregion des Gens ist bekannt und die -35-Region wurde 219 – 212 bp und die -10-Region 195 – 188 bp entfernt vom Genstart identifiziert (Wohlleben et al., 1989). Abb. D.9 zeigt das Vorgehen zur genetischen Manipulation des *galU*-Gens im Xcc LMG 8031\*-Stamm. Hierfür wurde eine Region von 289 bp bis 23 bp stromaufwärts des *aacC1*-Gens aus dem Vektor pMS255

amplifiziert. Dieses Amplifikat deckt die -35 und -10 Region des *aacC1*-Promotors ab und wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit *aacC1*-Promotor genannt. Diese Promotorregion wurde vor das *galU*-Gen ins Xcc LMG 8031\*-Genom inseriert. Zur gleichen Zeit wurde ein Bereich (44 – 598 bp stromaufwärts) vor dem *galU*-Gen aus dem Genom entfernt, um mögliche regulatorische Bereiche zu eliminieren. Hierbei wurde in Kauf genommen, dass das Gen *xcc-b100\_1991* dabei zerstört wird. Dieses Gen ist als Epimerase bzw. Dehydratase mit möglicher Funktion in der UDP-Rhamnose Biosynthese annotiert. Zur Insertion des *aacC1*-Promotors und gleichzeitigen Deletion der stromaufwärts liegenden Region vor *galU* (weiter im Text als Modifikationsstelle bezeichnet) wurde zunächst der stromabwärts der Modifikationsstelle liegende Bereich mittels PCR amplifiziert. Dieses Fragment beinhaltet fast das ganze *galU*-Gen und wird im Weiteren *galU*-Fragment genannt. Die Primer wurden dabei so gestaltet, dass das Amplifikat des *galU*-Fragments am 5'Ende eine Überlappung mit dem *aacC1*-Promotor aufweist. Diese beiden Fragmente, der *aacC1*-Promotor und das *galU*-Fragment, wurden in einer Fusions-PCR zu einem Fragment vereint (Abb. D.9B, 2.PCR). Dieses Fusionsfragment wurde unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in den Vektor pK19mobGII eingefügt. Anschließend wurde die stromaufwärts liegende Region der Modifikationsstelle durch PCR amplifiziert und mittels der Restriktionsendonukleasen *Hind*III und *Bam*HI vor den *aacC1*-Promotor in den Vektor pK19mobGII kloniert. Der Vektor beinhaltet nun in seinem Polylinker („multiple cloning site“, MCS) den *aacC1*-Promotor mit den flankierenden Bereichen der Modifikationsstelle. Nach der Sequenzierung des Inserts im Vektor wurde dieser durch bakterielle Konjugation in den Rezipientenstamm Xcc LMG 8031\* eingeschleust. *E. coli* S17-1 diente hierbei als Donorstamm. Da der Vektor in Xcc nicht replizierbar ist, kann durch Selektion auf Kanamycinresistenz (vermittelt durch den Vektor pK19mobGII) und Streptomycinresistenz (Wildtypresistenz) nach Transkonjuganten gesucht werden, die den Vektor durch eine Einfachrekombination („single cross over“) in ihr Genom an der Modifikationsstelle integriert haben. Im nächsten Schritt wurden die Bakterien ohne Selektionsdruck angezogen. Anschließend konnten durch Kultivierung auf X-Gluc-haltigen Platten Einzelkolonien identifiziert werden, die keine  $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Aktivität mehr aufwiesen. Diese Kolonien weisen eine weiße statt einer blauen Färbung auf. Die GUS-Aktivität wird durch das *gusA*-Gen auf dem Vektor vermittelt. Ein Fehlen der GUS-Aktivität deutet auf den Verlust des Vektors durch eine erneute Rekombination („double cross over“) hin. Als Ergebnis einer solchen zweiten Rekombination kann man den Wildtyp oder die gewünschte Mutante erhalten. Mittels PCR und Sequenzierung wurde die korrekte Homogenisierung bestätigt. Abb. D.9A zeigt die vorgenommene Deletion und Insertion und Abb. D.9B beschreibt den Arbeitsverlauf der Klonierung. Die isolierte Mutante wurde Xcc JSU genannt und wird im Folgenden noch weiter charakterisiert.

A



B

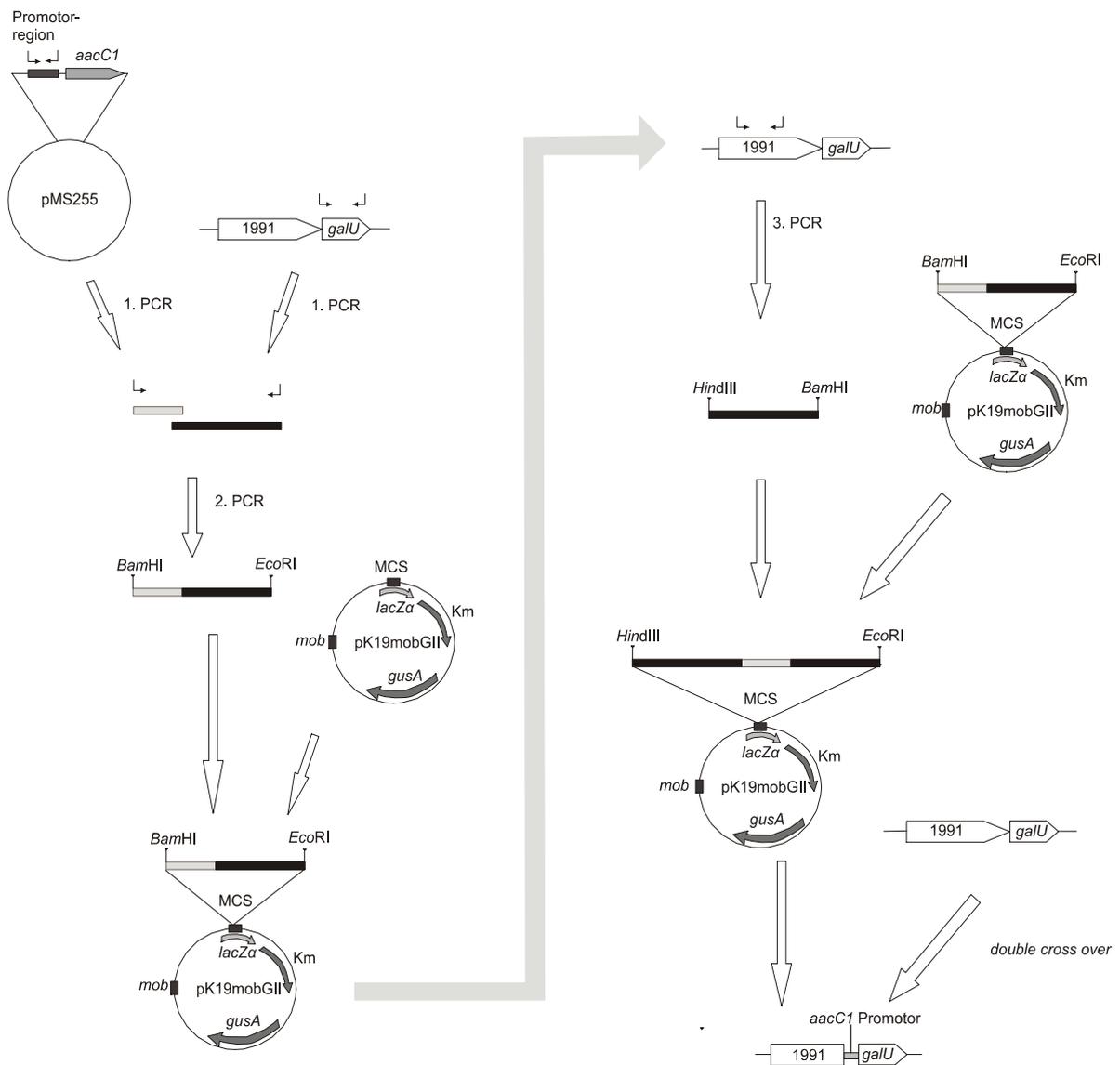
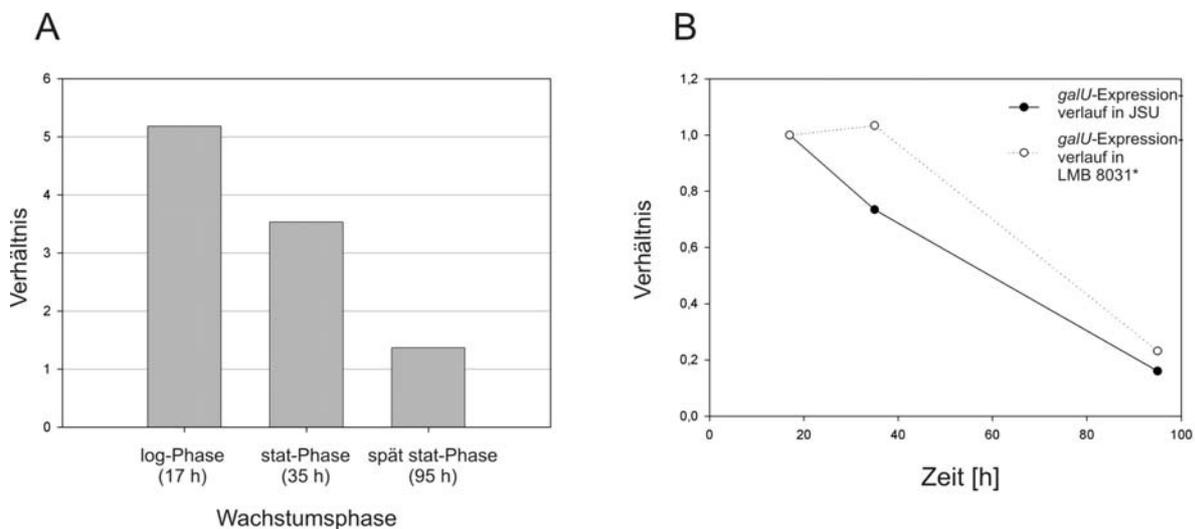


Abb. D.9

**Abb. D.9:** Schematische Darstellung der genetischen Manipulation des *galU*-Gens in Xcc LMG 8031\*.  
A) Schaubild der genetischen Veränderung in Xcc LMG 8031\*. Der so veränderte Stamm wurde Xcc JSU benannt. Es wurde der Promotor des Gentamicin-Resistenzgens *aacC1* (23 – 289 bp stromaufwärts des *aacC1*-Gens auf pMS255) vor das *galU*-Gen inseriert und gleichzeitig ein Genbereich (44 - 598 bp stromaufwärts des *galU*-Gens) deletiert. B) Darstellung des Arbeitsverlaufes der genetischen Manipulation. Zunächst wurden die Fragmente des *aacC1*-Promotors und des *galU*-Gens mittels PCR hergestellt. Dabei hatten die Fragmente einen überlappenden Bereich, der es möglich machte durch Fusions-PCR die beiden Fragmente zu vereinen. Dieses Fusionsfragment wurde in den Vektor pK19mobGII kloniert. Anschließend wurde das Fragment des stromabwärts der Modifikationsstelle liegenden Bereichs durch PCR amplifiziert und vor den *aacC1*-Promotor in den Vektor kloniert. Dieser Vektor wurde mittels bakterieller Konjugation in den Xcc LMG 8031\*-Stamm eingeschleust. Der Vektor ist in Xcc nicht replizierbar und bleibt daher nur stabil in der Zelle, wenn ein Einbau im Genom stattfindet. Durch Selektion auf die vom Vektor vermittelte Kanamycinresistenz wurden Stämme isoliert, die den Vektor im Genom durch eine Einfachrekombination („single cross over“) eingebaut haben. Als nächstes wurde auf das Ereignis einer erneuten Rekombination („double cross over“) selektioniert. Hierfür wurden Stämme identifiziert, die keine vom Vektor vermittelte  $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Aktivität mehr aufweisen. Mittels PCR und Sequenzierung wurde die korrekte Homogenisierung bestätigt. Abkürzungen: Km, Kanamycinresistenzgen; mob, Mobilisierungsregion; MCS, Polylinker oder „multiple cloning site“; PCR, Polymerase-Kettenreaktion.



*galU*-Expression der Mutante Xcc JSU zum Wildtyp Xcc LMG 8031\*. So ist in der exponentiellen Wachstumsphase der größte Unterschied messbar. In dieser Phase führt der zusätzlich eingebaute *aacC1*-Promotor zu einer 5-fach höheren Expression des Genes. Zur stationären Phase, nach 35 h Kultivierung, beträgt der Unterschied in der Expression nur noch das ca. 3,5-fache und gleicht sich in der spät-stationären Phase, nach 95 h Kultivierung, dem Wildtyp im Expressionslevel an.



**Abb. D.11:** Vergleich der Genexpression des *galU*-Gens mittels qRT-PCR A) Vergleich der Genexpression in den beiden Stämmen Xcc JSU und Xcc LMG 8031\* zu den drei Phasen (exponentielle, stationäre und spät-stationäre Wachstumsphase). B) Zeitlicher Verlauf der Genexpression. Das Verhältnis bezieht sich auf die Messdaten der exponentiellen Phase, sodass die Unterschiede zu dieser Phase angegeben sind. Durch die Pfaffl-Methode (Pfaffl, 2001) wurden die Verhältnisse berechnet. Als Referenzgene dienen *glnS* und *xcc-b100\_1495*.

Abb. D.11B zeigt den transkriptomischen Verlauf der *galU*-Expression während der drei Wachstumsphasen in Xcc JSU bzw. in Xcc LMG 8031\*. Hierbei wird das Verhältnis zum Messwert der exponentiellen Phase angegeben, sodass beide Expressionsverläufe bei einem Verhältnis von eins zur exponentiellen Phase beginnen. Die Daten zeigen, dass beide Expressionen eine Reduktion innerhalb der stationären und besonders der spät-stationären Phase aufweisen. So unterliegt auch noch das *galU*-Gen mit dem *aacC1*-Promotor einer anscheinend übergeordneten Repression in der späten stationären Phase.

### D.3.3 Genetische Manipulationen zur Inaktivierung der Motilität

Nachdem die transkriptomische Zeitreihe der Fermentation (Abschnitt D.2.2) ein auffälliges Verhalten einer Genregion gezeigt hat, die überwiegend Motilitätsgene beinhaltet, sollte der Effekt der Inaktivierung der Motilität durch Deletion eines entsprechenden Flagellar-Genes untersucht werden. Da die Fähigkeit der Motilität von einem Produktionsstamm im Fermenter nicht benötigt wird und ein Energieverbrauchender Prozess ist, stellte sich die Frage, ob eine

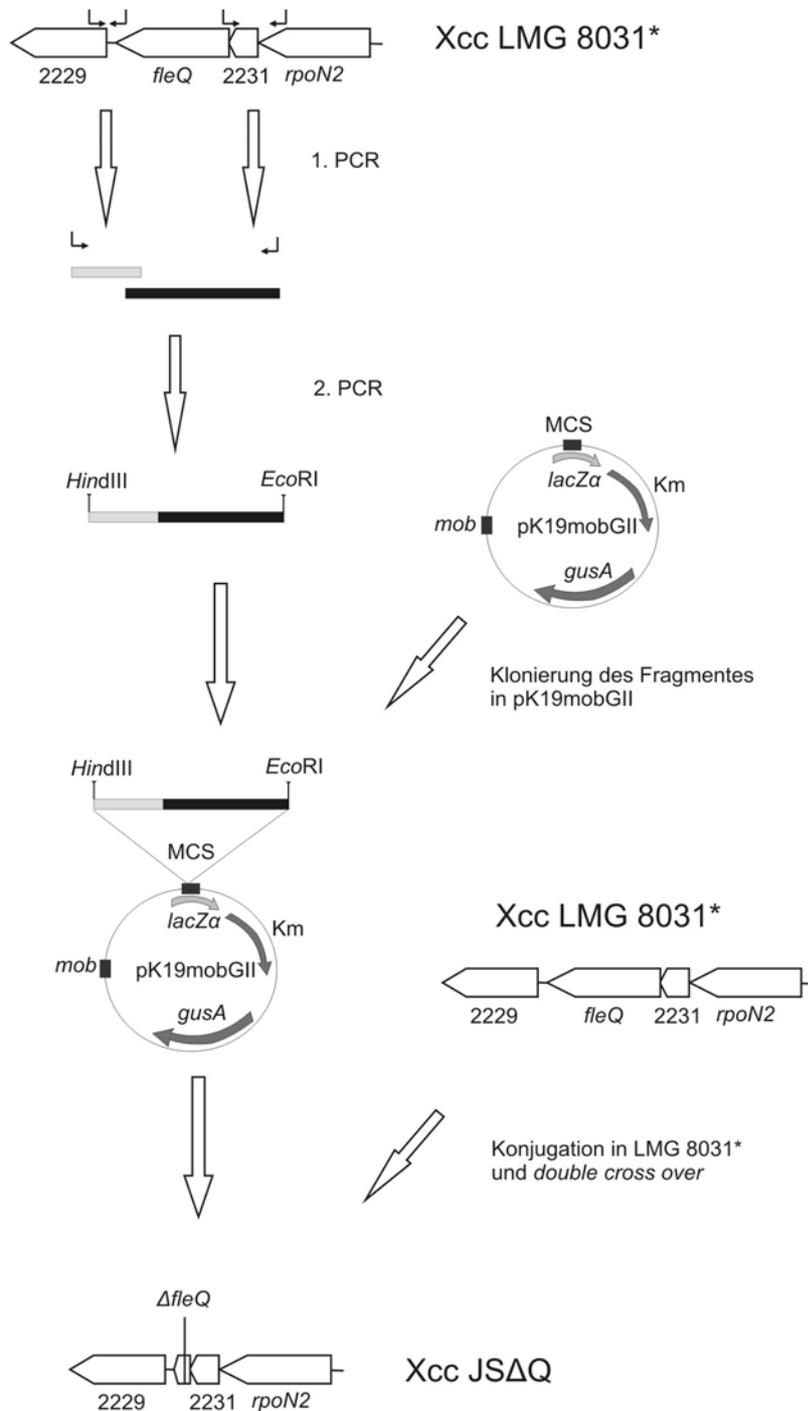
Abschaltung der Motilität zu einer Steigerung eines biotechnologisch vorteilhaften Prozesses wie die Biomasseproduktion oder Xanthanproduktion führt. Um dies zu analysieren wurden zwei Deletionsstämme konstruiert.

Der erste Stamm trägt eine Deletion im regulatorischen Gen *fleQ*. Aus *Pseudomonas aeruginosa* ist das Protein FleQ als ein Hauptregulator der Flagellar-Biosynthese bekannt (Arora et al., 1997; Arora et al., 1998; Dasgupta et al., 2002). In Xcc ist der aktivierende Effekt von FleQ auf sechs Promotor der Flagellar-Genregion bekannt (Hu et al., 2005). Zwanzig der induzierten Gene des Flagellar-Genbereichs aus der transkriptomischen Zeitreihe liegen in den vermeintlichen Operons, die von FleQ in Xcc reguliert werden. So könnte eine Deletion des *fleQ*-Gens die Inaktivierung einer Reihe von Flagellar-Genen bewirken.

Da die Deletion eines Regulators durch seine eventuell noch unbekanntem Einflüsse auf andere Funktionen der Zelle auch unerwünschte Nebeneffekte aufweisen kann, sollte auch ein Strukturgen der Flagellar-Biosynthese deletiert werden. Die Deletion eines Strukturgens hat den Vorteil, dass die Wahrscheinlichkeit von Nebeneffekten geringer ist als bei der Deletion eines Regulators, der Nachteil besteht jedoch darin, dass nur die Expression eines Gens blockiert wird. Es kann also sein, dass die Biosynthese der weiteren Flagellar-Proteine weiter stattfindet. Als zu deletierende Flagellar-Strukturgen wurde das Gen *flgE* ausgewählt. Dieses Gen kodiert für den Flagellar-Anker und ist somit einer der ersten Bausteine der Flagellar-Biosynthese.

### D.3.3.1 Deletion des Flagellar-Regulatorgens *fleQ*

Zur Konstruktion der *fleQ*-Deletion in Xcc LMG 8031\* wurden die flankierenden Bereiche stromauf- und stromabwärts des Gens mittels PCR amplifiziert. Abb. D.12 zeigt schematisch die Konstruktion der *fleQ*-Deletionsstamm Xcc JSΔQ. Stromaufwärts des *fleQ*-Gens wurden die Primer *fleQ1\_Up* und *fleQ1\_Dn* verwendet, um ein 854 bp großes Fragment zu amplifizieren. Stromabwärts des *fleQ*-Gens wurde mit den Primern *fleQ2\_Up* und *fleQ2\_Dn* ein 352 bp großes Fragment amplifiziert. Beide Fragmente verfügen über eine 20 bp große überlappende Region, die es ermöglicht die Fragmente in einer zweiten PCR zu einem 1186 bp großen Fragment zu fusionieren. Für die Fusions-PCR wurden die Primer *fleQ1\_Up* und *fleQ2\_Dn* verwendet. Das resultierende Fragment wurde mittels der Restriktionsenzyme *HindIII* und *EcoRI* in den Vektor pK19mogGII kloniert. Das entstandene Plasmid pK19/Δ*fleQ* enthält somit ein 1,2 kb großes Fragment mit einer 1278 bp großen Deletion in der *fleQ*-Kodierregion. Durch die verwendeten Primer *fleQ1\_Dn* und *fleQ2\_Up* besitzt das Fragment eine *Bam*HI-Schnittstelle an der Position der Deletion. Diese Schnittstelle ermöglicht später bei Bedarf den Einbau von zusätzlichen DNA-Abschnitten wie zum Beispiel weitere Resistenzkassetten.

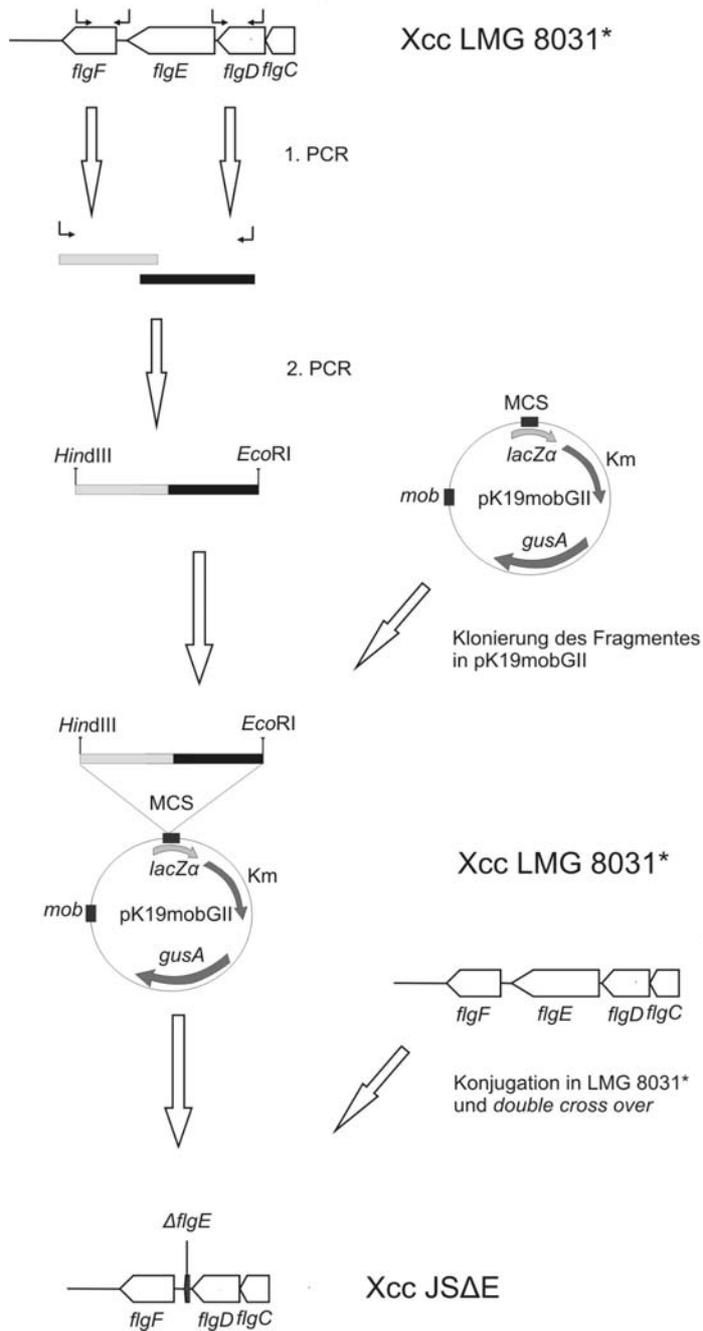


**Abb. D.12:** Schematische Darstellung der Deletion des *fleQ*-Gens in *Xcc* LMG 8031\*. Zunächst wurden die flankierenden Bereiche des zu deletierenden Gens mittels PCR amplifiziert. Dabei hatten die Fragmente einen überlappenden Bereich, und konnten somit durch Fusions-PCR zusammen gefügt werden. Dieses Fusionsfragment wurde in den Vektor pK19mobGII kloniert. Der entstandene Vektor wurde mittels bakterieller Konjugation in den *Xcc* LMG 8031\*-Stamm eingeschleust. Der Vektor ist selber in *Xcc* nicht replizierbar und bleibt daher nur stabil in der Zelle, wenn ein Einbau im Genom stattfindet. Durch Selektion auf die vom Vektor vermittelte Kanamycinresistenz wurden Stämme identifiziert, die den Vektor im Genom, durch eine Einfachrekombination („single cross over“), eingebaut haben. Als nächstes wurde auf das Ereignis einer erneuten Rekombination („double cross over“) selektioniert. Hierfür wurden Stämme identifiziert, die keine vom Vektor vermittelte  $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Aktivität mehr aufweisen. Mittels PCR wurde die korrekte Homogenisierung bestätigt. Abkürzungen: Km, Kanamycinresistenzgen; mob, Mobilisierungsregion; MCS, Polylinker oder „multiple cloning site“; PCR, Polymerase-Kettenreaktion.

Das Plasmid pK19/ $\Delta$ fleQ wurde durch bakterielle Konjugation in den Rezipientenstamm Xcc LMG 8031\* eingeschleust. *E. coli* S17-1 diente hierbei als Donorstamm. Da der Vektor in Xcc nicht replizierbar ist, kann durch Selektion auf Kanamycinresistenz (vermittelt durch den Vektor pk19mobGII) und Streptomycinresistenz (Wildtypresistenz) nach Transkonjuganten gesucht werden, die den Vektor durch eine Einfachrekombination („single cross over“) in ihr Genom eingebaut haben. Im nächsten Schritt wurden die Bakterien ohne Selektionsdruck angezogen und durch Kultivierung auf X-Gluc-haltigen Platten, wie auch schon bei der *galU*-Modifikation (Abschnitt D.3.1), auf das Fehlen der GUS-Aktivität selektioniert und damit Kolonien identifiziert, die durch eine erneute Rekombination („double cross over“) den Vektor wieder aus ihrem Genom entfernt haben. Als Ergebnis einer solchen zweiten Rekombination kann man den Wildtyp oder die gewünschte Deletion erhalten. Mittels PCR wurde die korrekte Homogenisierung bestätigt. Der identifizierte Deletionsstamm wurde Xcc JS $\Delta$ Q genannt.

### **D.3.3.2 Deletion des Flagellar-Ankergens *flgE***

Für die Deletion der *flgE*-Kodierregion in Xcc LMG 8031\* wurde die gleiche Vorgehensweise wie in Abschnitt D.3.3.1 verwendet. Abb. D.13 zeigt schematisch die Vorgehensweise der Konstruktion der Deletion des *flgE*-Gens. Es wurden die flankierenden Bereiche der zu deletierenden Region mittels PCR amplifiziert. Stromaufwärts des *flgE*-Gens wurde mit den Primern flgE1\_Up und flgE1\_Dn ein 708 bp großes Fragment amplifiziert. Zur Amplifizierung des 736 bp großen stromabwärts von *flgE* gelegenen Fragments wurden die Primer flgE2\_Up und flgE2\_Dn verwendet. Wie auch bei der *fleQ*-Deletion (Abschnitt D.3.3.1) verfügen beide flankierenden Fragmente über eine 20 bp große überlappende Sequenz, die eine Fusions-PCR ermöglicht. Das fusionierte Fragment hat eine Größe von 1424 bp und wurde mittels der Primer fleQ1\_Up und fleQ2\_Dn amplifiziert. Anschließend wurde das *Hind*III-*Eco*RI-Fragment in den Vektor pK19mobGII kloniert. Die Konjugation und die Selektionierung der richtigen Transkonjuganten und Homogenisanten wurden, wie im Abschnitt D.3.3.1 beschrieben, durchgeführt. Der Deletionsstamm trägt somit eine 1163 bp große Deletion in der Kodierregion des *flgE*-Gens. Durch PCR wurde die korrekte Homogenisierung des Deletionsstammes bestätigt.



**Abb. D.13:** Schematische Darstellung der Deletion des *flgE*-Gens in *Xcc* LMG 8031\*. Zunächst wurden die flankierenden Bereiche des zu deletierenden Gens mittels PCR amplifiziert. Die entstandenen Fragmente besitzen einen überlappenden Bereich, der es ermöglicht durch Fusions-PCR die beiden Fragmente zu vereinen. Das Fusionsfragment wurde in den Vektor pK19mobGII kloniert. Dieser Vektor wurde mittels bakterieller Konjugation in den *Xcc* LMG 8031\*-Stamm eingeschleust. Der Vektor ist in *Xcc* nicht replizierbar und bleibt daher nur stabil in der Zelle, wenn ein Einbau im Genom stattfindet. Durch Selektion auf die vom Vektor vermittelte Kanamycinresistenz wurden Stämme identifiziert, die den Vektor im Genom, durch eine Einfachrekombination („single cross over“), eingebaut haben. Als nächstes wurde auf das Ereignis einer erneuten Rekombination („double cross over“) selektioniert. Hierfür wurden Stämme identifiziert, die keine vom Vektor vermittelte  $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Aktivität mehr aufweisen. Mittels PCR wurde die korrekte Homogenisierung bestätigt. Abkürzungen: Km, Kanamycinresistenzgen; mob, Mobilisierungsregion; MCS, Polylinker oder „multiple cloning site“; PCR, Polymerase-Kettenreaktion.

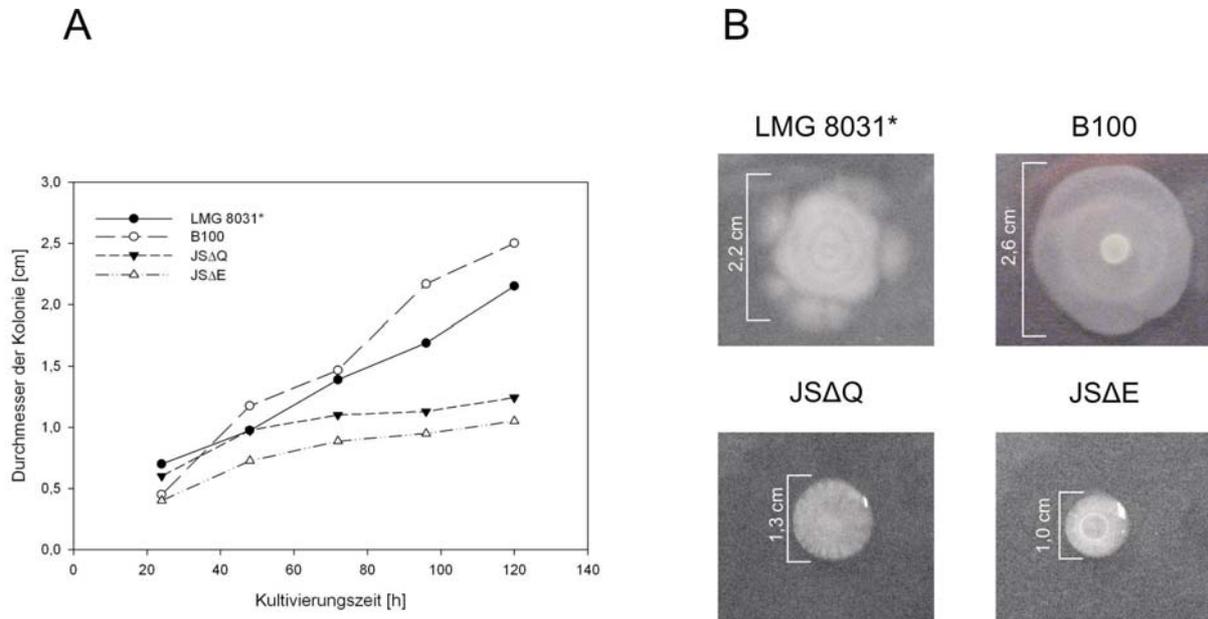
### D.3.3.3 Motilitäts-Analysen der deletierten Stämme JSΔQ und JSΔE

Um zu untersuchen, ob die Deletionen der Gene *fleQ* und *flgE* auch zum Verlust der Motilität geführt haben, wurden die Deletionsstämme auf Motilitätsplatten mit 0,3 % Agar kultiviert. Durch die geringe Agarkonzentration der verwendeten Platten können sich motile Bakterien mittels Rotation der polaren Flagellen („Swimming“) durch das Medium bewegen, sodass über den Durchmesser und die Morphologie der Kolonien die Beweglichkeit analysiert werden kann. Für den Motilitätstest wurden die Wildtypstämme (Xcc LMG 8031\* und Xcc B100) und die deletierten Stämme (Xcc JSΔQ und Xcc JSΔE) für 120 h bei 30 °C auf Motilitätsplatten kultiviert und der Koloniedurchmesser alle 24 h gemessen (Abb. D.14A). Angeimpft wurde mit 3 µl Bakterienkultur, die in der Mitte der Motilitätsplatte aufgetropft wurden. Von jedem Stamm wurden neun parallele Ansätze ausgewertet. Der Wildtypstamm Xcc LMG 8031\*, der der Ausgangsstamm der genetischen Manipulationen ist, zeigt einen motilen Phänotyp mit einer sehr flachen, nicht mucoiden Kolonie-Morphologie (Abb. D.14B). Die beiden Stämme, Xcc JSΔQ und Xcc JSΔE, zeigen einen nicht motilen Phänotyp mit einer mucoiden Kolonie-Morphologie (Abb. D.14B), die durch die Xanthanbildung etwas an Umfang zunimmt (Abb. D.14A). Der Mittelwert des Kolonie-Durchmessers der deletierten Stämme betrug bei Xcc JSΔQ 1,24 cm und bei Xcc JSΔE 1,05 cm. Der Wildtyp Xcc LMG 8031\* erreichte nach 120 h einen mittleren Durchmesser von 2,15 cm. Interessanterweise hat sich bei dem Motilitätstest ein Unterschied in der Kolonie-Morphologie der beiden in dieser Arbeit verwendeten Wildtypstämme Xcc LMG 8031\* und Xcc B100 gezeigt. Während Xcc LMG 8031\* eine ringförmige, nicht kontinuierliche Ausbreitung mit abschließenden Flecken an den Rändern aufweist, präsentiert Xcc B100 eine gleichmäßige runde Ausbreitung der Kolonie. Dies deutet auf einen möglichen Unterschied der Regulation der Motilität beider Stämme hin. Auch war der gemittelte Durchmesser des Xcc B100-Stammes mit 2,5 cm leicht größer, als der des Xcc LMG 8031\*-Stammes mit 2,15 cm.

Bei einer Erhöhung der Agarkonzentration in den Motilitätsplatten auf 0,6 % zeigten alle Stämme die nicht motile, mucoiden Kolonie-Morphologie. Diese Agarkonzentration erlaubt nicht mehr das Fortbewegen mittels „Swimming“, jedoch wäre eine Fortbewegung mittels „Swarming“ möglich. Bei dieser Fortbewegungsart agieren die Zellen im Verbund. Es werden peritriche Flagellen gebildet, die durch koordinierte Bewegungen ein Gleiten auf der halbfesten Oberfläche der Motilitätsplatte bewirken (Fraser & Hughes, 1999). Die Fähigkeit zum „swarmen“ ist zwar bei *Pseudomonas aeruginosa* bekannt (Köhler et al., 2000), jedoch ist bisher bei *Xanthomonas* kein „Swarming“ beschrieben worden. Der nicht-motile Phänotyp aller vier Stämme (Xcc LMG 8031\*, Xcc B100, Xcc JSΔQ und Xcc JSΔE) lässt vermuten,

dass die Wildtypstämme Xcc LMG 8031\* und Xcc B100 nicht in der Lage sind sich mittels „Swarming“ fortzubewegen.

Abschließend ist fest zu halten, dass die beiden Stämme Xcc JSΔQ und Xcc JSΔE, durch die Deletion des regulatorischen Gens *fleQ* bzw. des Strukturgens *flgE*, die Fähigkeit der Motilität verloren haben.

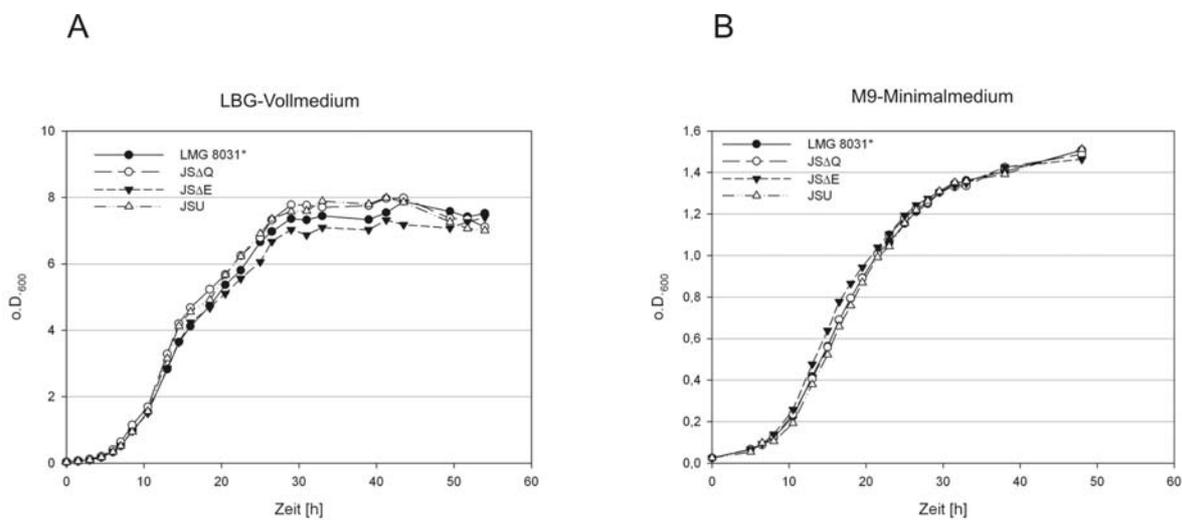


**Abb. D.14:** Motilitätstest der Wildtypstämme (Xcc LMG 8031\* und Xcc B100) und der deletierten Stämme (Xcc JSΔQ und Xcc JSΔE). A) Zunahme des Kolonie-Durchmessers. Angegeben ist der Mittelwert von neun Replikaten. B) Abbildungen der Kolonie-Morphologie. Die deletierten Stämme (Xcc JSΔQ und Xcc JSΔE) sind nicht motil und bilden eine mucoide Kolonie, die mit der Zeit durch Schleimbildung etwas an Umfang zunimmt. Die Kolonien der Wildtyp-Stämme Xcc LMG 8031\* und Xcc B100 weisen einen größeren Durchmesser im Vergleich zu den deletierten Stämmen auf. Die Kolonien sind flach und nicht-mucoide. Diese Kolonie-Morphologie weist auf einem motilen Phänotyp hin.

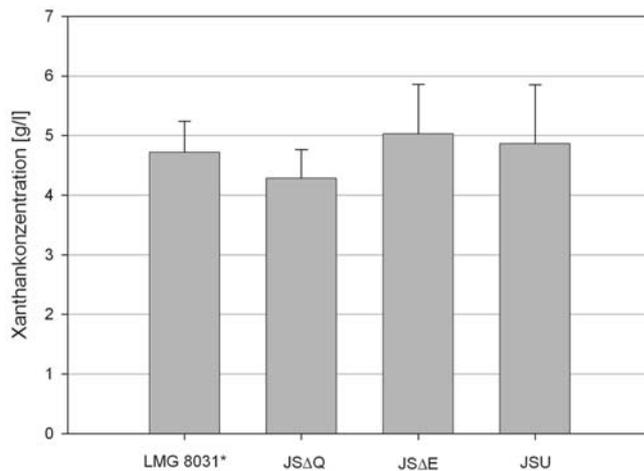
### D.3.4 Charakterisierung der Mutanten JSU, JSΔQ, und JSΔE

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Deletionen der Flagellar-Gene zum Verlust der Motilität und die genetische Modifikation des *galU*-Gens zu einer erhöhten Expression des Gens geführt haben, wurde untersucht, ob messbare Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit oder Xanthanproduktion beobachtet werden können. Der Wildtyp Xcc LMG 8031\* und die Mutationstragenden Stämme Xcc JSΔQ, Xcc JSΔE und Xcc JSU wurden sowohl in LBG-Vollmedium als auch in M9-Minimalmedium angezogen und der Wachstumsverlauf aufgezeichnet (Abb. D.15). Die Kultivierung fand in 500 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml Medium bei 30 °C und 220 rpm statt. Sowohl in Minimalmedium als auch in Vollmedium ist kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und den Mutanten zu erkennen.

Um einen möglichen Einfluss der genetischen Manipulationen auf die Xanthanproduktion zu messen, wurden die Stämme Xcc LMG 8031\*, Xcc JSΔQ, Xcc JSΔE und Xcc JSU in M9-Minimalmedium bei 30 °C mit 5 % Glucose als Kohlenstoffquelle angezogen. Geerntet wurde in der stationären Phase. Die Xanthankonzentration wurde mit der Methode der Säurehydrolyse, wie in Material und Methoden beschrieben, gemessen (Abb. D.16). Die Xanthankonzentration wurde für jeden Stamm von fünf unabhängigen Kultivierungen ermittelt. Auch hier konnte bei den durchgeführten Messungen kein Unterschied in der Xanthanproduktion der genetisch-manipulierten Stämme im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Die genetischen Manipulationen haben somit nicht zu dem erwünschten Einfluss auf die Effizienz der Xanthanproduktion geführt.



**Abb. D.15:** Wachstumsanalysen des Wildtyps Xcc LMG 8031\* und der Mutations-tragenden Stämme Xcc JSΔQ, Xcc JSΔE und Xcc JSU. A) Wachstumsanalyse in LMB-Vollmedium. B) Wachstumsanalyse in M9-Minimalmedium.



**Abb. D.16:** Xanthan-Konzentrationsbestimmung. Die Stämme Xcc LMG 8031\*, Xcc JSΔQ, Xcc JSΔE und Xcc JSU wurden in M9-Minimalmedium mit 5 % Glucose angezogen. Die Kulturen wurden in der stationären Phase geerntet und die Xanthankonzentration durch die Methode der Säurehydrolyse ermittelt. Die angegebenen Werte sind der Mittelwert aus fünf unabhängigen Kultivierungen. Die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angegeben.

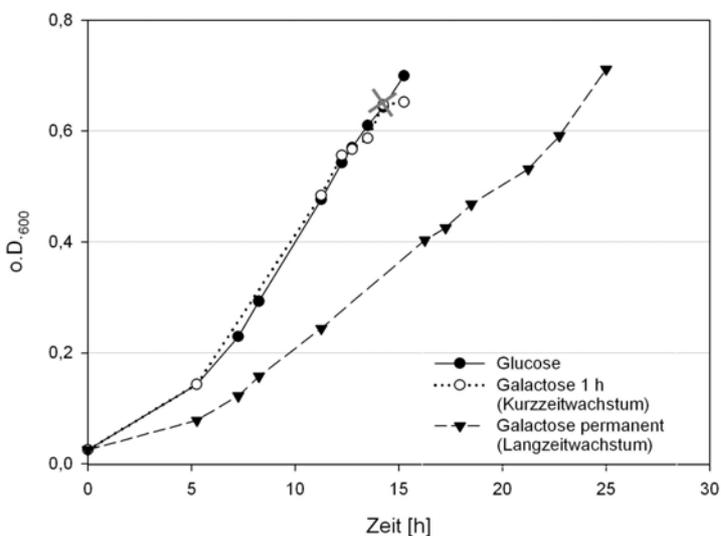
## D.4 Analysen zur Galactoseverwertung in Xcc

Die Aufnahme und Verwertung von unterschiedlichen Kohlenstoffquellen spielt sowohl für die Xanthanproduktion als auch für die Pathogenität von Xcc eine entscheidende Rolle. Die aufgenommenen Kohlenhydrate können entweder zur Energiegewinnung metabolisiert oder zur Synthese von Polysacchariden, wie zum Beispiel Xanthan, verwendet werden. Ebenfalls wird angenommen, dass die Erkennung von komplexen Polysacchariden der Pflanzenzellwand und deren Verdau eine wichtige Rolle in der pathogenen Interaktion mit der Wirtspflanze spielen. In *Xanthomonas* ist bislang nur die Aufnahme und Verwertung von Glucose (Pielken et al., 1988; Vorhölter et al., 2008; Whitfield et al., 1982), Fructose (Crecy-Lagard et al., 1991a; Crecy-Lagard et al., 1991b; Crecy-Lagard et al., 1995) und Sucrose (Blanvillain et al., 2007) genauer untersucht worden (siehe auch Abschnitt B.7). In dieser Studie wurde die Galactoseverwertung von Xcc B100 auf transkriptomischer Ebene untersucht. Zur Identifizierung von Genen, deren Genprodukte in die Verwertung von Galactose involviert sind, wurde der Microarray Xcc5kOLI verwendet.

### D.4.1 Microarray-Analyse zur Galactoseverwertung

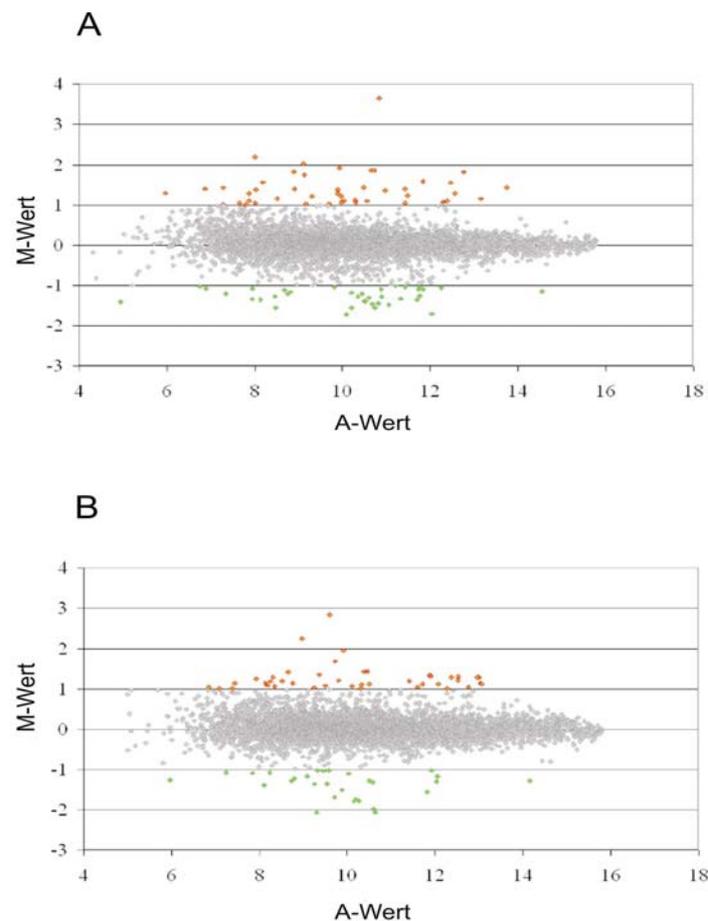
Um den Effekt von Galactose als Kohlenstoffquelle auf die Genexpression von Xcc B100 zu analysieren, wurde der Stamm zunächst in M9-Minimalmedium mit 1 % Galactose oder 1 % Glucose kultiviert (Abb. D.17). Zur Analyse der Genexpression in Gegenwart von Galactose wurden zwei unterschiedliche Kulturbedingungen genutzt. Bei der ersten Anzucht der Bakterien wurde der Stamm zunächst in M9-Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle kultiviert. Nach Erreichen einer o.D.<sub>600</sub> von 0,7 wurde dem Medium 1 % Galactose zugegeben und nach einer weiteren Stunde Inkubation wurden die Zellen

geerntet. Diese Kultivierung wird im weiteren Text als Galactose-Kurzzeitwachstum bezeichnet. Bei der zweiten Kultivierung der Bakterien wurde der Stamm von Beginn an in M9-Minimalmedium mit Galactose als einzige Kohlenstoffquelle angezogen und nach Erreichen einer o.D. von 0,7 geerntet. Diese Kultivierung wird im weiteren Text als Galactose-Langzeitwachstum bezeichnet. Beim Kurzzeitwachstum konnte, nach Zugabe der Galactose, eine lag-Phase beobachtet werden (Abb. D.17). Ein Grund für die lag-Phase kann die Umstrukturierung des Kohlenstoffmetabolismus auf die neue Kohlenstoffquelle sein. Ebenfalls ist zu beobachten, dass das Wachstum in Galactose deutlich langsamer verläuft im Vergleich zum Wachstum mit Glucose als Kohlenstoffquelle. Von je drei unabhängigen Kultivierungen der beiden Wachstumsbedingungen wurde die RNA isoliert, revers transkribiert und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Ebenfalls wurde die RNA von drei unabhängigen Kultivierungen mit Glucose als Kohlenstoffquelle isoliert, revers transkribiert und markiert. Diese fluoreszenzmarkierte cDNA wurde in den Microarray-Experimenten als Referenz verwendet, mit der die zwei Galactose-Wachstumsbedingungen verglichen wurden. Für jeden Vergleichsansatz (Glucose-Referenz : Galactose-Kurzzeitwachstum; Glucose-Referenz : Galactose-Langzeitwachstum) wurden drei Hybridisierungen durchgeführt und ausgewertet (Abb. D.18).



**Abb. D.17:** Wachstumsverlauf der Xcc B100-Kultivierung in M9-Minimalmedium mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. Die angegebenen Werte sind der Mittelwert von drei unabhängigen Kultivierungen die für das Microarray-Experiment verwendet wurden. Schwarze Kreise geben das Wachstum in M9-Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle an. Weiße Kreise geben das Kurzzeitwachstum mit Galactose als Kohlenstoffquelle an. Hierfür wurde die Kultur zunächst in M9-Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle bis zur exponentiellen Phase angezogen. Anschließend wurde dem Medium Galactose zugegeben und eine weitere Stunde kultiviert bevor die Zellen geerntet wurden. Schwarze Dreiecke geben das Wachstum mit Galactose als Kohlenstoffquelle an (Galactose-Langzeitwachstum). Das Kreuz markiert den Zeitpunkt der Galactosezugabe zum M9-Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle (Kurzzeitwachstum).

Als differentiell exprimiert wurden die Gene eingestuft, die alle drei Grenzwertbedingungen ( $M \geq 1$  oder  $\leq -1$ ,  $A > 8$  und  $p \leq 0,05$ ) erfüllten (siehe auch Abschnitt D.1.1). Beim Vergleich der Kultivierung in Glucose (Referenz) mit dem Galactose-Kurzzeitwachstum konnten 65 Gene als differentiell exprimiert identifiziert werden. Davon weisen 35 Gene eine erhöhte und 30 Gene eine reduzierte Expression auf (Abb. D.18A, Tabelle D.4, Tabelle D.5). Das permanente Wachstum des Stammes Xcc B100 in galactosehaltigem Medium führt zu einer Induktion der Expression bei 32 Genen und einer Reduktion der Expression bei 26 Genen (Abb. D.18, Tabelle D.6, Tabelle D.7).



**Abb. D.18:** Punktwolken der Microarray-Daten zur Galactoseverwertung. In den Punktwolken sind für jedes Gen die A-Werte ( $\log_2$  der Signalintensität) auf der x-Achse und die M-Werte ( $\log_2$  der Signaldifferenz) auf der y-Achse aufgetragen. Drei Microarray-Hybridisierungen von drei unabhängigen Kultivierungen wurden durchgeführt. Gene wurden als differentiell exprimiert eingestuft, wenn  $M \geq 1$  oder  $\leq -1$ ,  $A > 8$  und  $p \leq 0,05$  war. A) Die Bakterienkultur wurde zunächst bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase in M9-Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle kultiviert. Anschließend wurde 1 % Galactose zugegeben und eine weitere Stunde inkubiert bevor die Zellen geerntet wurden. Diese Kultivierung wurde Galactose-Kurzzeitwachstum genannt. Als Referenz wurde der Stamm Xcc B100 in M9-Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle angezogen. B) Die Bakterienkultur wurde in M9-Minimalmedium mit Galactose als Kohlenstoffquelle kultiviert. Diese Kultivierung wurde Galactose-Langzeitwachstum genannt. Als Referenz wurde der Stamm Xcc B100 in M9-Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle angezogen. Die differentiell exprimierten Gene sind in Tabelle D.4 bis D.7 aufgelistet. Gene die in beiden Versuchsansätzen als induziert oder reprimiert identifiziert wurden sind in Tabelle D.8 und Tabelle D.9 aufgelistet.

**Tabelle D.4:** Differentiell exprimierte Gene mit induzierter Genexpression durch Zugabe von Galactose eine Stunde vor der Zellernte (Galactose-Kurzzeitwachstum).

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt	M-Wert
xcc-b100_2511	-	TonB-abhängiger Rezeptor	3,65
xcc-b100_3045	-	TonB-abhängiger Rezeptor	2,20
xcc-b100_3997	-	Mutmaßliches Membranprotein	2,04
xcc-b100_3299	-	Mutmaßliches Bakterioferritin	1,92
xcc-b100_2508	<i>bga</i>	Exportierte $\beta$ -Galactosidaseähnliche Glycosidase	1,87
xcc-b100_1870	-	Unbekannte Funktion	1,86
xcc-b100_3248	-	Unbekannte Funktion	1,82
xcc-b100_4110	-	Unbekannte Funktion	1,82
xcc-b100_2507	-	Exportierte Glycosidase	1,75
xcc-b100_3996	-	Unbekannte Funktion	1,59
xcc-b100_1933	<i>argE</i>	Acetylornithin-Deacetylase	1,56
xcc-b100_4077	-	Unbekannte Funktion	1,55
xcc-b100_0818	<i>celS</i>	Exportierte Cellulase / Xyloglucan-Hydrolase	1,44
xcc-b100_1497	-	Unbekannte Funktion	1,44
xcc-b100_3869	-	Mutmaßliche manganhaltige Katalase	1,40
xcc-b100_2318	-	Unbekannte Funktion	1,40
xcc-b100_0028	-	Mutmaßliche exportierte Peptidase	1,39
xcc-b100_2488	<i>sgIT</i>	Glucose oder Galactose:Na <sup>+</sup> Symporter	1,38
xcc-b100_4089	-	Mutmaßliches Membranprotein	1,36
xcc-b100_0440	<i>glgA</i>	Glycogensynthase	1,29
xcc-b100_0242	-	Mutmaßliches exportiertes Peptid	1,29
xcc-b100_4073	-	Unbekannte Funktion	1,23
xcc-b100_0659	-	Unbekannte Funktion	1,22
xcc-b100_2291	-	Unbekannte Funktion	1,16
xcc-b100_0759	-	Unbekannte Funktion	1,15
xcc-b100_2321	<i>cheB</i>	Protein-Glutamat Methylesterase	1,13
xcc-b100_2515	<i>dgoD</i>	Galactonatdehydratase	1,10
xcc-b100_2320	-	Unbekannte Funktion	1,10
xcc-b100_2148	<i>rpfA</i>	Aconitase	1,09
xcc-b100_2294	-	Mutmaßliches exportiertes Protein	1,07
xcc-b100_3966	-	Mutmaßliches exportiertes Protein	1,07
xcc-b100_1496	<i>fdhA</i>	Formiatdehydrogenase	1,06
xcc-b100_4078	-	Unbekannte Funktion	1,05
xcc-b100_3870	-	Unbekannte Funktion	1,03
xcc-b100_1537	-	Unbekannte Funktion	1,02

**Tabelle D.5:** Differentiell exprimierte Gene mit reprimierter Genexpression durch Zugabe von Galactose eine Stunde vor der Zellernte (Galactose-Kurzzeitwachstum).

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt	M-Wert
xcc-b100_3458	<i>rplD</i>	50S ribosomales Protein L4	-1,73
xcc-b100_0675	<i>engXCA</i>	Exportierte Cellulase	-1,71
xcc-b100_1669	<i>pilW</i>	Typ IV Pilus Protein PilW	-1,56
xcc-b100_1670	<i>pilX</i>	Typ IV Protein PilX	-1,55
xcc-b100_0175	<i>fpvA</i>	TonB-abhängiger Rezeptor	-1,55
xcc-b100_3457	<i>rplW</i>	50S ribosomales Protein L23	-1,49
xcc-b100_3440	<i>rplO</i>	50S ribosomales Protein L15	-1,47
xcc-b100_3455	<i>rpsS</i>	30S ribosomales Protein S19	-1,45
xcc-b100_1668	<i>pilV</i>	Pre-Pilin "leader"- Sequenz	-1,40
xcc-b100_1287	-	TonB-abhängiger Rezeptor	-1,39
xcc-b100_3585	-	Unbekannte Funktion	-1,35
xcc-b100_3453	<i>rpsC</i>	30S ribosomales Protein S3	-1,33
xcc-b100_0874	<i>ilvC</i>	Ketosäure-Reduktisomerase	-1,31
xcc-b100_1667	<i>fimT</i>	Pilusprotein	-1,28
xcc-b100_4260	-	Mutmaßliches exportiertes Protein	-1,28
xcc-b100_1089	-	Unbekannte Funktion	-1,26
xcc-b100_3603	-	Unbekannte Funktion	-1,21

## D Ergebnisse

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt	M-Wert
xcc-b100_3446	<i>rpsN</i>	30S ribosomales Protein S14	-1,21
xcc-b100_3451	<i>rpmC</i>	50S ribosomales Protein L29	-1,18
xcc-b100_2659	-	Unbekannte Funktion	-1,16
xcc-b100_2654	-	Unbekanntes Protein	-1,15
xcc-b100_1385	-	Exportiertes Protein	-1,11
xcc-b100_3744	<i>gmd</i>	GDP-Mannose 4,6-Dehydratase	-1,10
xcc-b100_1671	<i>pilY</i>	Tfp Pilusprotein	-1,09
xcc-b100_3497	-	Extrazelluläre Protease	-1,09
xcc-b100_3447	<i>rplE</i>	50S ribosomales Protein L5	-1,06
xcc-b100_3339	<i>acpP</i>	Acylträgerprotein	-1,06
xcc-b100_1096	<i>sucC</i>	Succinyl-CoA Synthetase $\beta$ -Untereinheit	-1,04
xcc-b100_3449	<i>rplN</i>	50S ribosomales Protein L14	-1,04
xcc-b100_3437	<i>rpsK</i>	30S ribosomales Protein S11	-1,01

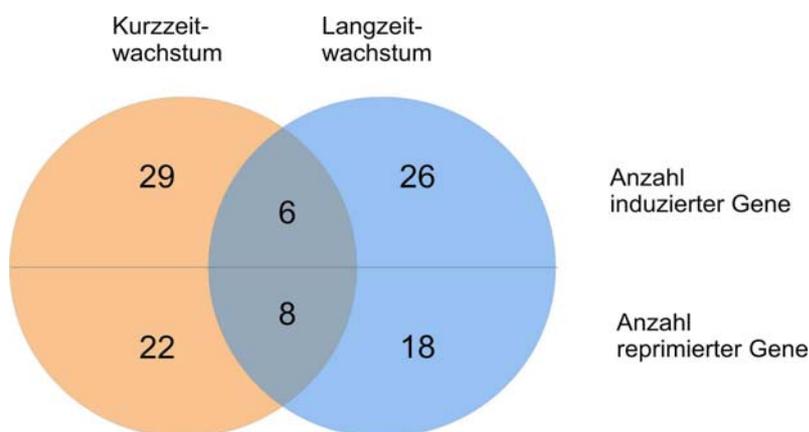
**Tabelle D.6** Differentiell exprimierte Gene mit induzierter Genexpression bei permanentem Wachstum in galactosehaltigem Medium (Galactose-Langzeitwachstum).

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt	M-Wert
xcc-b100_2511	-	TonB-abhängiger Rezeptor	2,84
xcc-b100_2507	-	Exportierte Glycosidase	2,26
xcc-b100_0175	<i>fpvA</i>	TonB-abhängiger Rezeptor	1,95
xcc-b100_3584	<i>phuR</i>	TonB-abhängiger Heminrezeptor	1,69
xcc-b100_2508	-	Exportierte $\beta$ -Galactosidaseähnliche Glycosidase	1,44
xcc-b100_2515	<i>dgoD</i>	Galactonatdehydratase	1,43
xcc-b100_2455	-	Mutmaßliches DNA-Reparaturprotein	1,35
xcc-b100_3458	<i>rplD</i>	50S ribosomales Protein L4	1,35
xcc-b100_3440	<i>rplO</i>	50S ribosomales Protein L15	1,31
xcc-b100_3457	<i>rplW</i>	50S ribosomales Protein L23	1,30
xcc-b100_3459	<i>rplC</i>	50S ribosomales Protein L3	1,30
xcc-b100_3455	<i>rpsS</i>	30S ribosomales Protein S19	1,29
xcc-b100_3585	-	Unbekannte Funktion	1,29
xcc-b100_2751	-	Unbekannte Funktion	1,26
xcc-b100_3460	<i>rpsJ</i>	30S ribosomales Protein S10	1,22
xcc-b100_3476	<i>rplY</i>	50S ribosomales Protein L25	1,21
xcc-b100_3456	<i>rplB</i>	50S ribosomales Protein L2	1,20
xcc-b100_2993	-	Unbekannte Funktion	1,19
xcc-b100_3447	<i>rplE</i>	50S ribosomales Protein L5	1,14
xcc-b100_2488	<i>sgIT</i>	Glucose oder Galactose:Na <sup>+</sup> Symporter	1,14
xcc-b100_3436	<i>rpsD</i>	30S ribosomales Protein S4	1,12
xcc-b100_3446	<i>rpsN</i>	30S ribosomales Protein S14	1,12
xcc-b100_3448	<i>rplX</i>	50S ribosomales Protein L24	1,12
xcc-b100_1664	<i>oar</i>	Mutmaßlicher TonB-abhängiger Rezeptor	1,12
xcc-b100_2923	<i>tsf</i>	Elongationsfaktor Ts	1,10
xcc-b100_3045	-	TonB-abhängiger Rezeptor	1,09
xcc-b100_2431	-	Unbekannte Funktion	1,08
xcc-b100_2563	-	Unbekannte Funktion	1,08
xcc-b100_3453	<i>rpsC</i>	30S ribosomales Protein S3	1,05
xcc-b100_3451	<i>rpmC</i>	50S ribosomales Protein L29	1,05
xcc-b100_0951	<i>gltA</i>	Citratsynthase	1,01
xcc-b100_4229	<i>rpmG</i>	50S ribosomales Protein L33	1,01

**Tabelle D.7:** Differentiell exprimierte Gene mit reprimierter Genexpression bei permanentem Wachstum in galactosehaltigem Medium (Galactose-Langzeitwachstum).

GenDB-Ident.Nr	Genname	Genprodukt	M-Wert
xcc-b100_1667	<i>fimT</i>	Pilus Protein	-2,07
xcc-b100_1849	<i>petB</i>	Ubiquinol-Cytochrome c Reduktase, Untereinheit b	-2,06
xcc-b100_1670	<i>pilX</i>	Typ IV Protein PilX	-1,98
xcc-b100_4344	-	TonB-abhängiger Rezeptor	-1,79
xcc-b100_1668	<i>pilV</i>	pre-Pilin "leader"- Sequenz	-1,77
xcc-b100_1669	<i>pilW</i>	Typ IV Pilus Protein PilW	-1,74
xcc-b100_4018	<i>ctaD</i>	Cytochrome c Oxidase Untereinheit I	-1,69
xcc-b100_2325	-	Mutmaßliches Hämagglutinin-ähnliches Protein	-1,55
xcc-b100_2653	-	Unbekannte Funktion	-1,51
xcc-b100_0114	-	Unbekannte Funktion	-1,40
xcc-b100_4343	-	TonB-abhängiger Rezeptor	-1,36
xcc-b100_1847	-	Mutmaßliche Murein-Transglycosylase	-1,35
xcc-b100_4260	-	Mutmaßliches exportiertes Protein	-1,31
xcc-b100_1671	<i>pilY</i>	Tfp Pilusprotein	-1,30
xcc-b100_4265	-	Unbekannte Funktion	-1,28
xcc-b100_2659	-	Unbekannte Funktion	-1,27
xcc-b100_0110	<i>aldA</i>	Aldehyd-Dehydrogenase (NAD(+))	-1,27
xcc-b100_4321	-	Kleines exportiertes Protein	-1,22
xcc-b100_0675	<i>engXCA</i>	Exportierte Cellulase	-1,17
xcc-b100_1870	-	Unbekannte Funktion	-1,16
xcc-b100_2347	-	Unbekannte Funktion	-1,10
xcc-b100_0188	-	Unbekannte Funktion	-1,08
xcc-b100_1497	-	Unbekannte Funktion	-1,03
xcc-b100_1672	<i>pilE</i>	Tfp Pilusprotein PilE	-1,02
xcc-b100_4015	-	Cytochrome c Oxidase, Untereinheit III	-1,02
xcc-b100_0449	-	Mutmaßliches exportiertes Protein	-1,01

Die am stärksten vertretene Gruppe unter den differentiell exprimierten Genen ist die Gruppe mit unbekannter Funktion gefolgt von Genen des Typ IV Sekretionssystems, Glycosidasen, ribosomalen Proteinen und TonB-abhängiger Rezeptoren. Der Vergleich der Microarray-Ergebnisse des Galactose-Kurzzeitwachstums mit den Ergebnissen des Galactose-Langzeitwachstums zeigt eine Überlappung von 14 Genen die in beiden Experimenten als induziert bzw. in beiden Experimenten als reprimiert detektiert wurden (Abb. D.19, Tabelle D.8, Tabelle D.9). Dabei wurden sechs Gene in beiden Versuchsansätzen als induziert und acht Gene als reprimiert detektiert. Diese 14 Gene wurden des Weiteren genauer betrachtet.



**Abb. D.19:** Venn-Diagramm der differentiell exprimierten Gene. Der Stamm Xcc B100 wurde in M9-Minimalmedium mit Galactose als Kohlenstoffquelle kultiviert. Zwei Kultivierungen der Galactosezugabe wurden durchgeführt. Beim Galactose Kurzzeitwachstum wurde die Bakterienkultur zunächst in M9-Minimalmedium mit Glucose kultiviert. Nach Erreichen der exponentiellen Phase (o.D. 0,7) wurde 1 % Galactose zugegeben und eine weitere Stunde inkubiert bevor die Zellen geerntet wurden. Beim Galactose-Langzeitwachstum wurde die Bakterienkultur von Beginn an in M9-Minimalmedium mit Galactose als Kohlenstoffquelle angezogen. Zur Herstellung der Referenz wurde die Bakterienkultur in M9-Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle angezogen. Sechs Gene wurden identifiziert die sowohl im Kurzzeitwachstumsexperiment als auch beim Langzeitwachstumsexperiment induziert sind. Ebenfalls wurden acht Gene identifiziert, die in beiden Wachstumsbedingungen eine Repression aufweisen. Als differentiell exprimiert gelten Gene die einen M-Wert von  $\geq 1$  oder  $\leq -1$ , einen A-Wert von  $> 8$  und einen p-Wert von  $\leq 0,05$  aufwiesen.

#### D.4.1.1 Gene, die in beiden Galactose-Wachstumsbedingungen eine Repression aufweisen

Die Microarray-Analysen zu Galactoseverwertung haben acht Gene identifiziert die sowohl kurz nach Zugabe als auch bei permanentem Wachstum in Galactose, anstelle von Glucose, eine Induktion der Genexpression aufweisen (Tabelle D.8). Für zwei dieser Gene, xcc-b100\_4260 und xcc-b100\_2659, ist keine Funktion bekannt. Fünf der Gene (*fimT* und *pilVWXYZ*) liegen im Genom nebeneinander und haben die gleiche Transkriptionsrichtung. (Alm et al., 1996; Li et al., 2007). Auch das Gen *engXCA* zeigte eine Reduktion der Genexpression unter beiden Galactose-Wachstumsbedingungen und kodiert für eine Endoglucanase, die exportiert wird und Cellulose degradiert (Gough et al., 1988; Gough et al., 1990; Schröter et al., 2001).

**Tabelle D.8:** Differentiell reprimierte Gene unter beiden Galactose-Wachstumsbedingungen

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt	M 1h <sup>a</sup>	M p <sup>b</sup>
xcc-b100_0675	<i>engXCA</i>	Exportierte Cellulase	-1,71	-1,17
xcc-b100_1669	<i>pilW</i>	Typ IV Pilus Protein PilW	-1,56	-1,74
xcc-b100_1670	<i>pilX</i>	Typ 4 Protein PilX	-1,55	-1,98
xcc-b100_1668	<i>pilV</i>	Pre-Pilin "leader"-Sequenz	-1,40	-1,77
xcc-b100_1667	<i>fimT</i>	Pilusprotein	-1,28	-2,07
xcc-b100_4260	-	Mutmaßliches exportiertes Protein	-1,28	-1,31
xcc-b100_2659	-	Unbekannte Funktion	-1,16	-1,27
xcc-b100_1671	<i>pilY</i>	Tfp Pilusprotein	-1,09	-1,30

<sup>a</sup> Galactose-Kurzzeitwachstum (nur eine Stunde Kultivierung in Galactose)

<sup>b</sup> Galactose-Langzeitwachstum (permanente Kultivierung in Galactose)

#### D.4.1.2 Gene, die in beiden Galactose-Wachstumsbedingungen eine Induktion aufweisen

Die Annotation der sechs Gene, die in beiden Wachstumsbedingungen eine Induktion in der Genexpression aufweisen (Tabelle D.9), deuten auf eine Funktion in der Galactoseverwertung hin. Lokalisiert sind die sechs Gene in drei Regionen des Chromosoms (Abb. D.20). Diese drei Bereiche werden im weiteren Text Galactose-Verwertungsregionen genannt. Die Galactose-Verwertungsregion 1 (Abb. D.20B) besteht aus dem Gen *sglT*, welches für einen mutmaßlichen Galactose- oder Glucoseimporter der inneren Membran kodiert (Vorhölter et al., 2008). Etwa 24 kb entfernt liegt die Galactose-Verwertungsregion 2 (Abb. D.20B). Sie besteht aus elf Genen von denen vier Gene (*algA2*, *xcc-b100\_2508*, *xcc-b100\_2511* und *dgoD*) in den Microarray-Analysen als differentiell exprimiert identifiziert wurden. Aufgrund der Genorganisation und der ähnlichen Funktion der anderen sieben Gene wurde die Galactose-Verwertungsregion 2 auf die oben genannten elf Gene ausgeweitet. Die Genorganisation deutet dabei auf zwei Operon-ähnliche Unterregionen mit entgegengesetzten Transkriptionsrichtungen hin. Die große Untereinheit beinhaltet sieben Gene von *algA2* bis *xcc-b100\_2513* und die kleine Untereinheit besteht aus vier Genen von *dgoA* bis *dgoK*.

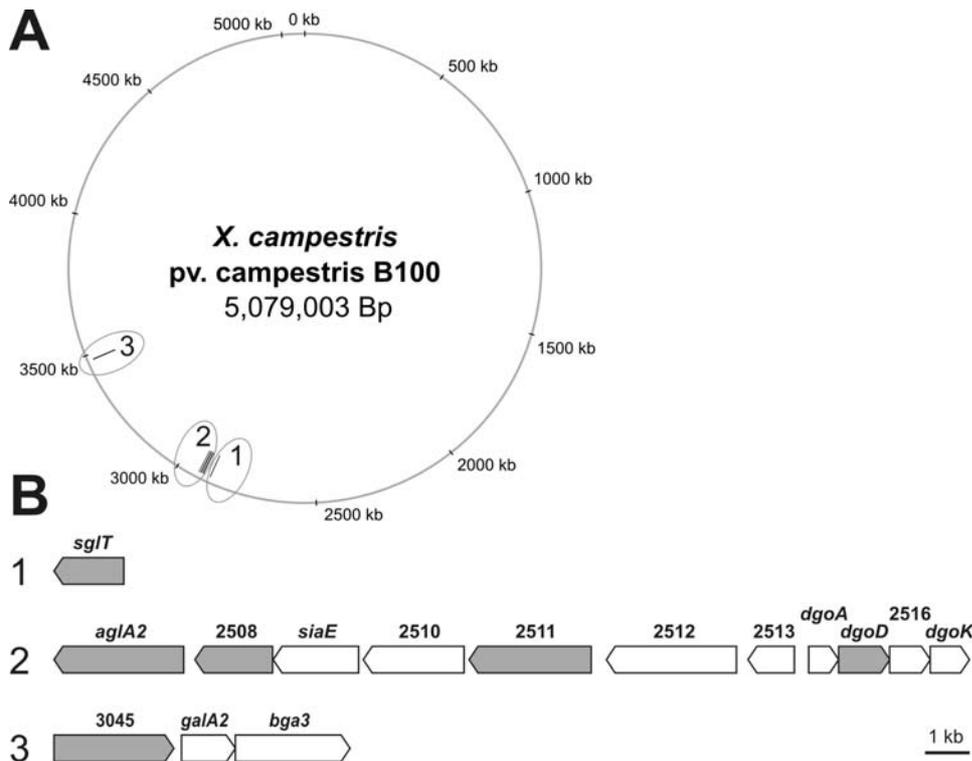
**Tabelle D.9:** Differentiell induzierte Gene unter beiden Galactose-Wachstumsbedingungen

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt	M 1h <sup>a</sup>	M p <sup>b</sup>
xcc-b100_2511	-	TonB-abhängiger Rezeptor	3,65	2,84
xcc-b100_3045	-	TonB-abhängiger Rezeptor	2,20	1,09
xcc-b100_2515	<i>dgoD</i>	Galactonat-Dehydratase	1,10	1,43
xcc-b100_2508	-	Exportierte $\beta$ -Galactosidaseähnliche Glycosidase	1,87	1,44
xcc-b100_2507	-	Exportierte Glycosidase	1,75	2,26
xcc-b100_2488	<i>sglT</i>	Glucose oder Galactose:Na <sup>+</sup> Symporter	1,38	1,14

<sup>a</sup> Galactose-Kurzzeitwachstum (nur eine Stunde Kultivierung in Galactose)

<sup>b</sup> Galactose-Langzeitwachstum (permanente Kultivierung in Galactose)

Die Galactose-Verwertungsregion 3 (Abb. D.20B) besteht aus drei Genen von denen das Gen *xcc-b100\_3045* in Microarray-Analysen als differentiell exprimiert detektiert wurde und für einen TonB-abhängigen Rezeptor kodiert. Die beiden zusätzlichen Gene (*galA2* und *bga3*) der Galactose-Verwertungsregion 3 liegen direkt stromabwärts des *xcc-b100\_3045* Gens und haben ebenfalls Funktionen in der Kohlenstoffverwertung. Das *galA2*-Gen kodiert für eine exportierte Arabinogalactan-endo-1,4- $\beta$ -galactosidase und *bga3* für eine exportierte  $\beta$ -Galactosidase.



**Abb. D.20:** Genomische Organisation der drei Galactose-Verwertungsregionen (Serrania et al., 2008). A) Position der Galactose-Verwertungsregionen im Genom von Xcc B100. Die eingekreisten Zahlen markieren die Position der Galactose-Verwertungsregionen 1, 2 und 3 im Genom von Xcc B100 B) Genorganisation der Galactose-Verwertungsregionen. Die grauen Blockpfeile kennzeichnen Gene hin, die in den Microarray-Analysen unter beiden Galactose-Wachstumsbedingungen als induziert detektiert wurden. Weiße Blockpfeile markieren Gene, die sich in den vorhergesagten Galactose-Verwertungsregionen befinden, jedoch in den Microarray-Analysen nicht als differentiell exprimiert detektiert wurden.

#### D.4.2 qRT-PCR der Galactose-Verwertungsgene

Um die Transkription der Gene der drei Galactose-Verwertungsregionen genauer zu untersuchen, wurden diese Gene mittels qRT-PCR analysiert (Abb. D.21). Hierfür wurden dieselben RNA-Isolate des Galactose-Kurzzeitwachstums und -Langzeitwachstums verwendet, die auch schon für die Microarray-Analysen eingesetzt wurden. Die RNA aus der Kultivierungen mit Glucose als Kohlenstoffquelle wurde hierbei, wie auch in den Microarray-Experimenten, als Referenz verwendet. Die Verhältnisse wurden nach der Pfaffli-Methode berechnet (Pfaffli, 2001) und als Normalisierungsgen diente *xcc-b100\_3128*. Dieses Gen hat in den Microarray-Analysen zur Galactoseverwertung und in Vorversuchen ein stabiles Transkriptionsverhalten gezeigt. Alle Gene der Galactose-Verwertungsregionen, mit Ausnahme von *xcc-b100\_2512*, zeigten eine erhöhte Genexpression in Anwesenheit von Galactose im Vergleich zu Glucose als Kohlenstoffquelle. Den deutlichsten Unterschied in der Genexpression konnte in der Kurzzeitantwort auf Galactose bei dem Gen *xcc-b100\_2511* gemessen werden. Dieses Gen wird beim Galactose-Kurzzeitwachstum ca. 300-fach und beim Galactose-Langzeitwachstum noch ca. 60-fach stärker transkribiert

als beim Wachstum mit Glucose. Dieses Gen kodiert für einen TonB-abhängigen Rezeptor. Direkt stromaufwärts ist das Gen *xcc-b100\_2512* lokalisiert, das als einziges Gen in den Galactose-Verwertungsregionen eine Reduktion der Expression aufweist. So beträgt der gemessene Wert bei Galactose-Kurzzeitwachstum 0,39, was einer ca. 2,5-fach niedrigeren Expression im Vergleich zum Wachstum in Glucose entspricht. Im Langzeitwachstum beträgt das gemessene Verhältnis zur Referenz sogar nur 0,05, was einer 20-fachen Reduktion der Expression entspricht. Das Gen *xcc-b100\_2512* kodiert, wie auch *xcc-b100\_2511* für einen TonB-abhängigen Rezeptor.



**Abb. D.21:** qRT-PCR-Analysen zur Transkription der Gene der drei Galactose-Verwertungsregionen. Von jedem Gen wurden drei Replikate analysiert. Als Normalisierungsgen wurde *xcc-b100\_3128* verwendet A) Balkendiagramm der Verhältnisse nach Pfaffl (Pfaffl, 2001). B) Organisation der Gene in den drei Galactose-Verwertungsregionen (1, 2, 3). Graue Blockpfeile markieren Gene, die in den Microarray-Analysen als differentiell induziert identifiziert wurden. Das Gen *xcc-b100\_2512* zeigte als einziges Gen der Galactose-Verwertungsregionen in den qRT-PCR-Analysen eine Repression. Dieses Gen ist durch einen gestichelten Blockpfeil gekennzeichnet. Werte unter den Blockpfeilen: **Verhältnis Galactose-Kurzzeitwachstum zur Referenz**; Verhältnis Galactose-Langzeitwachstum zur Referenz.

Die durchgeführten qRT-PCR-Analysen zeigen, dass auch Gene der postulierten Galactose-Verwertungsregionen, die nicht durch die Microarray-Analysen detektiert wurden, durch Wachstum in Galactose induziert werden. Die gemessenen Verhältnisse zur Referenz liegen zwischen 3,3 und 302 für das Kurzzeit- bzw. zwischen 2,0 und 121,1 für das Langzeitwachstum in Galactose. Eine Ausnahme bildet, wie oben erwähnt, das Gen `xcc-b100_2512`, welches ein entgegengesetztes Expressionsverhalten zeigt.

## E Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein genomweites transkriptomisches Profil einer Xcc-Kultivierung im 10 L-Maßstab erstellt. Hierfür wurde der neu entwickelte Microarray Xcc5kOLI verwendet. Die Daten des genomweiten transkriptomischen Profils wurden auf phasenspezifische Regulierungen untersucht. Das Gen *galU*, dessen Genprodukt eine Rolle in der Nukleotidzucker-Biosynthese spielt, und die Flagellar-Gene *fleQ* und *flgE* wurden genetisch manipuliert und die Auswirkung auf die Biomasse- und Xanthanproduktion untersucht. Des Weiteren konnten in dieser Arbeit drei Genregionen identifiziert werden, die durch Galactose als Kohlenstoffquelle induziert werden. Ein Modell der Galactoseaufnahme und -verwertung wird vorgeschlagen.

### E.1 Validierung des Microarrays Xcc5kOLI

Der in dieser Arbeit verwendete Microarray basiert auf der Sequenz des Stammes Xcc B100 und beinhaltet 50mer- bis 70mer- Oligonukleotide zu 4553 annotierten Genen. Zur Validierung des verwendeten Microarrays Xcc5kOLI wurde eine Hybridisierung zur Analyse der Streuung durchgeführt. 99 % der Gene hatten einen M-Wert zwischen -0,3 und 0,3 und zwei Gene hatten einen M-Wert  $\leq -1$ . Die gemessenen Daten liegen in einem Bereich, der schon in früheren Validierungen von Microarrays anderer Bakterien beschrieben ist. So wurde zum Beispiel bei der Analyse der Streuung eines Microarrays, basierend auf dem Genom des Stammes *Sinorhizobium meliloti* (*S. meliloti*), zwei von 5668 Genen identifiziert, die die Grenzwerte  $M \geq 0,9$  oder  $\leq -0,9$  überschritten hatten (Rüberg et al., 2003). Für einen Microarray des Aminosäureproduzenten *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) lagen 99 % der Gene bei den Validierungsexperimenten zwischen dem M-Wertbereich -0,59 und 0,52 (Hüser et al., 2003). Die Validierung eines Microarrays basierend auf dem Genom von *Corynebacterium jeikeium* (*C. jeikeium*), einem Microorganismus der Hautflora, zeigte, dass mehr als 99 % der Gene zwischen den M-Werten -0,8 und 0,8 lagen (Brune et al., 2006). Die gemessene Streuung des neuen Microarrays Xcc5kOLI liegt somit in Bereichen, die dem publizierter und bewährter Microarrays entspricht.

In dieser Arbeit wurde ein Genomvergleich der beiden Stämme Xcc B100 und Xcc LMG 8031\* mittels Microarray durchgeführt. Ein solcher Genomvergleich wird auch als „Genomotyping“ bezeichnet und gibt einen schnellen Überblick über die genetische Varianz zweier Stämme. Mit dieser Methode kann aber nur das Fehlen von Genen im Genom des zu vergleichenden Stammes identifiziert werden. Somit können Gene die im Stamm Xcc LMG 8031\* im Vergleich zum Xcc B100-Stamm fehlen mittels des Xcc5kOLI-Microarrays durch einen niedrigen M-Wert detektiert werden. Es konnten 312 Gene mit einem M-Wert  $\leq -1$  (7 %) und 131 Gene mit einem M-Wert  $\leq -2$  (3 %) identifiziert werden. Im Vergleich mit publizierten

„Genomotyping“-Studien anderer Organismen ist die Anzahl an fehlenden Genen recht gering. So zeigt die sehr heterogene Spezies *Pseudomonas putita* (*P. putita*) bei verschiedenen Stämmen das Fehlen von 13,9 % bis 37,4 % der Gene im Vergleich zum Referenzstamm *P. putita* DSM 6125 (Ballerstedt et al., 2007). *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*), ein Erreger der Cholera, hingegen zeigte ein recht konserviertes Genom bei Genom-Analysen verschiedener Stämme (Dziejman et al., 2002). Zwischen 36 und 49 Gene wurden bei sieben Stämmen im Vergleich zum Referenzstamm *V. cholerae* N16961 als fehlend identifiziert. Dies entspricht ca. 1 % der Gene im Genom. Als Grenzwert zur Identifizierung fehlender Gene wurde bei diesem auf Microarray-Experimenten basierenden Genomvergleich ein M-Wert von  $\leq -1,6$  verwendet. In dem in dieser Arbeit durchgeführten Genomvergleich liegen 200 Gene unter einem M-Wert von  $-1,6$ . Dies entspricht ca. 4,4 % der Gesamtzahl der annotierten Gene in Xcc B100. Somit liegt die Anzahl abwesender Gene in Xcc LMG 8031\* im Vergleich zu Xcc B100 zwischen den beschriebenen Werten der heterogenen Spezies *P. putita* und der recht konservierten Genome der Spezies *V. cholerae*. Ein von der Firma „Insilico Biotechnology“ rekonstruiertes Modell zur Biomasse-, Xanthan- und Acetatproduktion ,basierend auf dem Xcc B100-Genom, beinhaltet 397 Gene. Von diesen 397 Genen konnten 392 Gene im Genomvergleich in dieser Arbeit als vorhanden identifiziert werden (M-Wert  $> -1$ ). Das Ausmaß der Datenstreuung, der Genomvergleich und die Resultate der Fermentations-Zeitreihe und der Galactoseverwertungs-Analysen haben gezeigt, dass der Microarray für transkriptomische Analysen der Stämme Xcc B100 und Xcc LMG 8031\* verwendet werden kann und reproduzierbare Daten liefert.

## **E.2 Das genomweite Transkriptionsprofil einer Xcc-Fermentation**

Das pflanzenpathogene Bakterium Xcc ist in der Lage das industriell verwendete Polysaccharid Xanthan zu produzieren. Xanthan wird z.B. als Verdickungsmittel in der Lebensmittelindustrie und als Feuchtigkeitsspender in der Kosmetikindustrie verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde ein genomweites transkriptomisches Profil einer Xcc-Kultivierung im Fermentationsmaßstab erstellt. Der industriell verwendete Xanthan-Produktionsstamm Xcc LMG 8031\* wurde hierfür in Freising bei der Firma „Evonik Industries“ in einem 10 L-Bioreaktor kultiviert. Eine genomweite transkriptomische Analyse einer Xcc-Fermentation eines Xanthan-Produktionsstammes gab es bislang nicht. Die große Datenmenge wurde anhand von Punktwolken visualisiert und durch Clustering-Verfahren analysiert. Durch ein hierarchisches Clustering der Microarray-Daten konnte gezeigt werden, dass sich die einzelnen Zeitpunkte der Probenentnahme in zwei Cluster einsortieren. Diese zwei Cluster entsprechen hierbei auch den zwei Phasen, die bei der Fermentation beobachtet wurden. Sie entsprechen der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass in den Transkriptom-Daten

der Zeitreihe zum Zeitpunkt des Übergangs von der exponentiellen in die stationäre Phase ein Wandel in der Expression vieler Gene vorliegt, die in den Punktwolken nicht detektiert werden können, da sie in den M-Wert Bereichen zwischen -1 und 1 liegen. Eine Vielzahl solcher geringen Expressionsveränderungen kann jedoch zu der ermittelten Clusterbildung geführt haben. Interessanterweise wurde beim hierarchischen Clustering der Probenentnahme-Zeitpunkt nach zwei Stunden Kultivierung in die Gruppe der stationären Phase einsortiert. Das Transkriptionsprofil dieses Zeitpunktes ähnelt demzufolge eher der stationären als der exponentiellen Phase. Es liegt somit nahe, dass sich die Bakterienkultur nach zwei Stunden sich noch in der lag-Phase befindet. Mit dem hierarchischen Clustering konnten somit zwei Umbrüche in der genomweiten Transkription detektiert werden, die durch die Auswertung der Punktwolken nicht visualisiert werden konnten.

Durch die Visualisierung der Transkriptionsdaten mittels Punktwolken konnten in dieser Arbeit zwei Genregionen identifiziert werden, die ein auffälliges Transkriptionsprofil aufweisen. Die erste Genregion beinhaltet hauptsächlich ribosomale Proteine und geht von Gen *rpIQ* bis *rpsJ* beziehungsweise von *xcc-b100\_3434* bis *xcc-b100\_3460*. In dieser Region wurden 15 von 27 Genen in Phase 1 als induziert und in Phase 2 als reprimiert identifiziert. Diese Gene spiegeln möglicherweise den Proteinbiosynthese-Level der Zellen wieder und können somit Indikatoren für den Verlauf einer Fermentation sein. Möglicherweise könnte in Zukunft die Expression bestimmter Gene zur Qualitätskontrolle von Kultivierungen verwendet werden. Für ein solches „Monitoring“ des Fermentationsverlaufes wären die Gene dieser Region eventuell geeignet.

Die zweite Genregion beinhaltet die Gene von *cheZ* (*xcc-b100\_2199*) bis *xcc-b100\_2253*. Von den 54 Genen in dieser Genregion wurden 26 Gene als induziert detektiert. Sie enthält hauptsächlich Gene der Flagellar-Biosynthese und zeigt eine Induktion in Phase 1 und eine weitere kurze Induktion zu Beginn der Phase 2. Diese Genregion ist besonders interessant, da die Fähigkeit der Motilität des Bakteriums in einer biotechnologischen Kultivierung im Bioreaktor nicht benötigt wird. Demzufolge könnte die Energie die für die Motilität aufgewendet wird für andere Prozesse in biotechnologischer Hinsicht besser genutzt werden. Innerhalb dieser Genregion liegt das Gen des Regulators FleQ. Aus *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), einer nahen verwandten Spezies zu Xcc, ist bekannt, dass FleQ der Hauptregulator der Flagellar-Biosynthese ist. Dabei ist FleQ selbst nur durch eine posttranslationale Repression durch das Protein FleN reguliert (Arora et al., 1997; Dasgupta et al., 2000; Dasgupta & Ramphal, 2001; Dasgupta et al., 2002;). FleQ aktiviert hierbei die Flagellar-Gene in Zusammenarbeit mit dem alternativen Sigmafaktor RpoN ( $\sigma^{54}$ ) (Arora et al., 1997; Totten et al., 1990). Homologe Gene zu den regulatorischen Genen *fleQ*, *fleN* und dem alternativen Sigmafaktor *rpoN* aus *P. aeruginosa* befinden sich in der identifizierten Genregion. Aus Xcc ist bekannt, dass die Transkription des jeweiligen Promotors vor den

Genen *fliE*, *fliQ*, *fliL*, *flgG*, *flgB* und *flhF* sowohl RpoN- als auch FleQ-abhängig sind (Hu et al., 2005). Mit Ausnahme von *fliQ* wurden all diese Gene in Phase 1 und zu Beginn der Phase 2 als induziert detektiert. Somit ist zu vermuten, dass das transkriptomische Verhalten dieser Genregion den aktivierenden Einfluss der Regulators FleQ widerspiegelt. Warum die Flagellar-Gene zu diesen Zeitpunkten aktiviert werden ist unklar. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass der energieverbrauchende Prozess der Motilität vorwiegend zu Zeiten aktiviert ist in denen kein Mangel vorherrscht, um bei schlechter werdenden Bedingungen mit der Maschinerie der Motilität ausgerüstet zu sein. Die kurze Aktivierung der Flagellar-Gene zu Beginn der Phase 2 hingegen kann eine Stressantwort auf die schlechter werdenden Bedingungen sein, die zur Energieeinsparung später wieder eingestellt wird.

### **E.3 Stammentwicklung des Xanthan-Produktionsstammes Xcc LMG 8031\***

#### **E.3.1 Die Inaktivierung der Motilität führt zu keiner messbaren Erhöhung der Biomasse- oder Xanthanproduktion**

Für die biotechnologische Produktion von Xanthan und die Kultivierung von Xcc im Bioreaktor ist die Motilität nicht notwendig. So stellt sich die Frage, ob sich das Ausschalten der Motilität bei einem Xanthan-Produktionsstamm positiv auf andere biotechnologisch relevante Zellprozesse auswirkt. Diese Fragestellung wurde im weiteren Verlauf der Arbeit untersucht. Hierfür wurden in dieser Arbeit zwei Deletionsmutanten des Stammes Xcc LMG 8031\* hergestellt, die jeweils eine Deletion im Gen *fleQ* bzw. *flgE* tragen. FleQ ist ein regulatorisches Protein dessen aktivierende Wirkung auf viele Gene der Flagellar-Biosynthese in Xcc bekannt ist. Es ist beschrieben, dass eine Inaktivierung des *fleQ*-Gens zu einem flagellenlosen nicht motilen Phänotyp führt (Hu et al., 2005). Da die Deletion eines Regulators auch immer die Gefahr mitführt unerwünschte Effekte in anderen zellulären Prozessen zu bewirken, wurde neben der Deletion des *fleQ* Gens auch das Gen *flgE* deletiert. *flgE* kodiert für das Protein des Flagellar-Ankers und ist somit ein Flagellar-Strukturprotein, das zu einem frühen Zeitpunkt der Flagellar-Biosynthese benötigt wird. Der Flagellar-Anker besteht aus ca. 120 einzelnen FlgE-Proteinen und verbindet den Flagellar-Motor mit dem langen Filament der Geißel (Samatey et al., 2004). Bei *P. aeruginosa* ist ein Modell beschrieben, in dem das Fehlen des Flagellenankers zu einer Akkumulation des Anti-Sigmafaktors FlgM in der Zelle führt und dies eine Repression weiterer Flagellar-Gene bewirkt. Somit wurde mit dem *flgE*-Gen ein Strukturgen deletiert, dessen Abwesenheit möglicherweise, wie in *P. aeruginosa*, einen reprimierenden Effekt auf weitere Flagellar-Gene ausübt. Beide deletierten Stämme zeigten einen nicht motilen Phänotyp, jedoch konnte kein messbarer Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit

oder der Xanthanproduktion festgestellt werden. Sowohl die Wachstumsgeschwindigkeit als auch die erreichte o.D.<sub>600</sub> der deletierten Stämme unterschieden sich nicht von denen des Wildtyps. Die Wachstumsgeschwindigkeit wird womöglich durch andere Faktoren limitiert und die zusätzliche Energie kann nicht für eine Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit verwendet werden. Die Stämme Xcc LMG 8031\* und Xcc B100 zeigen in den Motilitäts-Analysen eine unterschiedliche Kolonimorphologie. Der Xcc B100-Stamm bildet gleichmäßig runde Kolonien. Die Kolonien des Stammes Xcc LMG 8031\* hingegen zeigen eine ringförmige, nicht kontinuierliche Ausbreitung mit Flecken an den Rändern. Die nicht kontinuierliche Ausbreitung deutet auf mögliche Unterschiede in der Regulierung der Motilität hin. Sie könnte auch auf eine Degenerierung der Regulierung der Motilität im Produktionsstamm bedeuten.

### **E.3.2 Die Erhöhung der Genexpression des *galU*-Gens führt zu keiner messbaren Erhöhung der Xanthanproduktion**

Das transkriptomische Profil des *galU*-Gens zeigt eine Induktion der Expression in Phase 1 und einen Abfall im Übergang zu Phase 2. Im Rahmen des BmBF-Projektes „Entwicklung von Verfahren zur Herstellung mikrobieller Exopolysaccharide als wasserlösliche Verdicker auf Basis nachwachsender Rohstoffe“ wurde von der Firma „Insilico Biotechnology“ durch lineare Optimierung die theoretisch maximale Xanthanausbeute für beide Fermentationsphasen ermittelt. Dabei liegt die ermittelte Xanthanausbeute in Phase 1 bei unveränderter Biomasseproduktion bei 91 % der maximalen Xanthanausbeute. In Phase 2 hingegen könnten durch den Stopp der Biomasseproduktion die aufgenommenen Ressourcen und die Energie für andere Zellprozesse verwendet werden. So liegt in Phase 2 die theoretisch maximale Xanthanausbeute 57 % über der ermittelten Xanthanproduktion. Die aufgenommene Glucose wird in beiden Phasen zu 30 % für die Synthese von UDP-Glucose und UDP-Glucuronat verwendet. Es scheint, dass der Überschuss an aufgenommener Glucose in Phase 2, die nicht mehr zur Biomasseproduktion verwendet wird, nicht vollständig abgebaut, sondern als intermediäres Produkt Acetat ausgeschieden wird. Diesen Daten zufolge sind Gene, die eine phasenspezifische Regulierung aufweisen und die Zufuhr der aufgenommenen Kohlenstoffquelle zur Xanthanproduktion katalysieren, mögliche Kandidaten zur Stammentwicklung des Produktionsstammes Xcc LMG 8031\*. Das Gen *galU* kodiert für eine UTP-Glucose-1-Phosphat-Uridyltransferase, die die Umwandlung von Glucose-1-Phosphat zu UDP-Glucose unter Verbrauch von UTP katalysiert. Eine erhöhte UDP-Glucose-Konzentration in der Zelle könnte möglicherweise zu einer erhöhten Xanthanproduktion führen. In *C. glutamicum* ist beschrieben, dass eine erhöhte Expression von *galU* eine höhere Trehaloseproduktion bewirkt (Padilla et al., 2004). Eine Erhöhung der Expression des *galU*-Gens in *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) führt hingegen zu keiner höheren

Exopolysaccharid-Synthese (Boels et al., 2001). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Induktion der Expression des *galU*-Gens im Produktionsstamm Xcc LMG 8031\* eine erhöhte Xanthanproduktion auslöst. Zu diesem Zweck wurde im Produktionsstamm Xcc LMG 8031\* vor das *galU*-Gen ein konstitutiv hoch exprimierter Promotor integriert. Hierfür wurde der Promotor des Gens *aacC1* ausgewählt. Dies ist der Promotor eines Gentamicin-Resistenzgens und Bestandteil einer Resistenzkassette im Vektor pMS255. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass *aacC1* konstitutiv auf einem hohen Niveau exprimiert wird (Becker et al., 1995; Williams & Northrop, 1976; Wohlleben et al., 1989). Der Einbau des *aacC1*-Promotors führte zu einer 5-fach höheren Expression des *galU*-Gens in der exponentiellen und 3,5-fach höheren Expression in der stationären Phase im Vergleich zum Wildtyp. Nach 95 Stunden Kultivierung konnte kein Unterschied mehr in der Expression von *galU* zwischen dem genetisch manipulierten Stamm und dem Wildtyp festgestellt werden. Somit scheint die Genexpression auch mit der Insertion des *aacC1*-Promotors noch phasenspezifisch reguliert zu sein. Auch konnte kein Unterschied in der Xanthanausbeute oder dem Wachstum zwischen dem genetisch manipulierten Stamm und dem Wildtyp festgestellt werden. Möglicherweise reicht die Erhöhung der Expression nicht aus, um einen messbaren Effekt hervorzurufen. Ebenfalls ist es möglich, dass posttranskriptionelle Regulationsmechanismen der erhöhten Expression entgegenwirken oder dass andere unbekannte Prozesse, und nicht die Versorgung mit UDP-Glucose, die Xanthanproduktion limitieren. Es ist auch denkbar, dass die zusätzliche UDP-Glucose in anderen Synthesewegen als der Xanthan-Biosynthese verbraucht wird.

#### **E.4 Galactoseverwertung in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***

Die Analyse der Verwertung verschiedener Zucker in Xcc ist sowohl in biotechnologischer Hinsicht als alternative Kohlenstoffquelle der Fermentation als auch hinsichtlich der Pathogenität interessant. Bislang ist nur die Aufnahme und Verwertung von Glucose (Pielken et al., 1988; Vorhölter et al., 2008; Whitfield et al., 1982), Fructose (Crecy-Lagard et al., 1991a; Crecy-Lagard et al., 1991b; Crecy-Lagard et al., 1995) und Sucrose (Blanvillain et al., 2007) genauer untersucht worden. In dieser Arbeit wurde durch transkriptomische Analysen die Galactoseverwertung betrachtet. Galactose ist ein häufiger Bestandteil von Polysacchariden pflanzlicher Zellwände. Dies macht es wahrscheinlich, dass Galactose von Xcc erkannt und verdaut werden kann. Mittels Microarray- und qRT-PCR-Analysen konnten drei Genregionen im Genom identifiziert werden, die durch die Anwesenheit von Galactose induziert sind. Ein Modell der Galactoseverwertung in Xcc wird mit den Genen der drei Galactose-Verwertungsregionen in diesem Abschnitt vorgeschlagen.

#### **E.4.1 Das Gen *sgIT* kodiert für einen möglichen Galactose-Transporter der inneren Membran**

Es konnte in dieser Arbeit eine Induktion des *sgIT*-Gens in Anwesenheit von Galactose festgestellt werden. So wurde bei den Microarray-Analysen das *sgIT*-Gen sowohl im Kurzzeitwachstum, als auch im Langzeitwachstum in Galactose, verglichen mit dem Wachstum in Glucose, als induziert identifiziert. Mittels qRT-PCR wurde eine ca. 3-fache Induktion in beiden Galactose-Wachstumsbedingungen gemessen. Das *sgIT*-Gen wurde kürzlich durch Sequenzanalysen als ein möglicher Hexose-Transporter, der für den Transport von Glucose oder Galactose verantwortlich sein könnte, identifiziert (Vorhölter et al., 2008). Die in dieser Arbeit durchgeführten transkriptomischen Analysen deuten darauf hin, dass das Genprodukt des *sgIT*-Gens für den Transport von Galactose durch die innere Membran der Zelle verantwortlich ist. Im Genom befinden sich zwei weitere mögliche Glucose- oder Galactose-Transporter mit den Gennamen *gluP1* und *gluP2* (Vorhölter et al., 2008). Da keines der beiden Gene in den Microarray-Analysen der beiden Galactose-Wachstumsbedingungen als differentiell exprimiert detektiert wurde, kann vermutet werden, dass die Genprodukte von *gluP1* und *gluP2* möglicherweise für den Glucosetransport durch die innere Membran verantwortlich sind. Die Umgebung des *sgIT*-Gens im Genom deutet auf eine monocistronische Genorganisation hin. So ist das stromabwärts gelegene Gen in entgegengesetzter Richtung angeordnet. Das stromaufwärts liegende Gen *bgI3* (kodiert für eine exportierte  $\beta$ -Glucosidase) ist durch eine 261 bp große intergenische Region vom *sgIT*-Gen getrennt. Die Größe der intergenischen Region lässt auf einen möglichen Promotor und eine monocistronischen Organisation schließen.

#### **E.4.2 Die Galactose-Verwertungsregionen beinhalten Gene zur Degradierung von Galactose-haltigen Kohlenhydratverbindungen im Medium und Periplasma**

Zwei Gene der Galactose-Verwertungsregionen, *bga3* und *xcc-b100\_2508*, kodieren für mögliche  $\beta$ -Galactosidasen ähnlich dem *lacZ*-Gen in anderen Bakterien wie z.B. *E. coli* (EC 3.2.1.23). Die zwei Genprodukte sind somit mögliche Kandidaten zum Abbau von Lactose in Galactose und Glucose. In Genregion 3 befindet sich das *galA2*-Gen, welches als Gen einer Arabinogalactan-endo-1,4- $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.89) annotiert ist. Dieses Genprodukt katalysiert wahrscheinlich die Spaltung von Arabinogalactan, das häufig an Glycoproteinen der Pflanzenzellwand gebunden ist, in Galactobiose und Galactose. In der Galactose-Verwertungsregion 2 befindet sich auch das Gen einer  $\alpha$ -Glucosidase (*aglA2*, EC 3.2.1.20). Neben Sucrose kann das Enzym auch Melibiose als Substrat verwerten.

Hierbei wird Melibiose zu Galactose und Glucose gespalten. Das Gen *siaE* aus der Galactose-Verwertungsregion 2 ist annotiert als das Gen einer Sialat-O-acetylerase (EC 3.1.1.53), welches in einigen Organismen auch andere O-Acetylerester als Substrat akzeptiert (Corfield et al., 1993). Die Aktivität von Glycosyl-O-acetylerasen können den Verdau von Oligosacchariden fördern, da O-Acetyl-Modifizierungen die Aktivität von Glycosidasen inhibieren können (Corfield et al., 1993). Durch das Entfernen der O-Acetyl-Gruppen wird somit möglicherweise die Aktivität der Glycosidasen erhöht. Das Gen *xcc-b100-2510* ist als mögliche Glycosyl-Hydrolase annotiert, wobei aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz kein spezielles Kohlenhydrat als Substrat des Enzyms vorhergesagt werden kann. Die Identifizierung des Gens als induziert in Anwesenheit von Galactose lässt vermuten, dass das Genprodukt im Verdau von Galactose-haltigen Kohlenhydratverbindungen involviert ist. N-terminale Signalpeptide deuten bei den genannten Genen darauf hin, dass die Genprodukte in das Periplasma exportiert werden. Ob die Enzyme auch durch die äußere Membran ins Medium abgegeben werden kann anhand der Gensequenz nicht ermittelt werden. Jedoch ist der Export ins Medium bei der Arabinogalactan-endo-1,4- $\beta$ -galactosidas *GalA* wahrscheinlich, da das Substrat des Enzyms hauptsächlich an der Pflanzenzellwand gebunden vorkommt. Abschließend ist zu sagen, dass durch die in dieser Arbeit durchgeführten transkriptomische Analysen eine interessante Gruppe an Genen identifiziert werden konnte, die den vielseitigen Abbau und Verdau von Oligosacchariden durch *Xcc* widerspiegeln.

### **E.4.3 Zwei TonB-abhängige Rezeptoren sind mögliche Galactose-Transporter durch die äußere Membran**

In dieser Arbeit konnten mittels transkriptomischer Analysen zwei TonB-abhängige Rezeptoren („TonB-dependent receptor“, TBDR) identifiziert werden, die in Anwesenheit von Galactose im Medium induziert sind. Die Gene der TBDR, *xcc-b100\_2511* und *xcc-b100\_3045*, liegen in der Galactose-Verwertungsregion 2 beziehungsweise Galactose-Verwertungsregion 3. Die Genprodukte der beiden Gene sind mögliche Kandidaten für den Transport von Galactose durch die äußere Membran. Dabei kann es sein, dass die TBDR ebenfalls Galactose in Form von Galactose-haltigen Kohlenhydratverbindungen transportieren können, die im Periplasma durch weitere Enzyme abgebaut und schließlich als Monosaccharide durch die innere Membran transportiert werden. Dies kann durch die transkriptomischen Analysen aber nicht eindeutig geklärt werden, jedoch lassen die identifizierten Gene für den Abbau von Oligosacchariden, die wahrscheinlich im Periplasma lokalisiert sind, vermuten, dass auch Disaccharide und kleine Oligosaccharide die äußere Membran passieren können.

TBDR sind hauptsächlich für den Transport von Eisensiderophorkomplexen und Vitamin B12 in das Periplasma von gramnegativen Bakterien bekannt (Nikaido, 2003). Die TBDR unterliegen meist der Regulation durch den Fur-Repressor und werden bei Eisenmangel aktiviert (Bagg & Neilands, 1987). Eine Besonderheit der Spezies *Xanthomonas* ist die Überrepräsentation von TBDR-Genen im Genom. Eine solche Überrepräsentation ist auch aus einigen Bakteriengattungen mariner Herkunft bekannt. Gemeinsam haben diese Gattungen, dass sie in der Lage sind komplexe Kohlenhydrate zu verwenden (Blanvillain et al., 2007). Demzufolge ist es wahrscheinlich, dass einige der TBDR für die Aufnahme von Kohlenhydraten zuständig sind. Erst vor kurzem wurde in *Xcc* die Funktion eines TBDR in der Sucroseaufnahme nachgewiesen (Blanvillain et al., 2007). Insgesamt befinden sich drei TBDR in den identifizierten Galactose-Verwertungsregionen. Davon zeigten zwei eine Induktion (*xcc-b100\_2511* und *xcc-b100\_3045*). Der dritte TBDR (*xcc-b100\_2512*) zeigt hingegen als einziges Gen der drei Genregionen eine Repression in Anwesenheit von Galactose. Als Kandidaten des Galactose-Transportes durch die äußere Membran kommen demzufolge nur die beiden TBDR in Frage, die eine Induktion in Galactose-haltigem Medium aufweisen. Das reprimierte Gen *xcc-b100\_2512* wird womöglich für andere Kohlenhydratbedingungen benötigt. Zur Genorganisation kann gesagt werden, dass die Repression des *xcc-b100\_2513*-Gens auf eine monocistronische Organisation der Gene *xcc-b100\_2512* und *xcc-b100\_2513* hinweist.

#### **E.4.4 Die Galactose-Verwertungsregionen beinhalten Gene zur Verwertung von Galactose im Cytoplasma**

Die kleinere Untereinheit der Galactose-Verwertungsregion 2 beinhaltet die Gene *dgoA*, *dgoD*, *xcc-b100\_2616* und *dgoK*. Diese Gene wurden in Anwesenheit von Galactose als induziert identifiziert. Sie kodieren für Enzyme die benötigt werden, um Galactose zu Zwischenprodukten des Kohlenhydratmetabolismus umzuwandeln. So kodiert *xcc-b100\_2516* für eine mögliche 1,4-Lactonase, die Galactono-1,4-lacton (Galctn) zu Galactonat (GalA) umwandeln kann. Das Gen *dgoD* kodiert für eine Galactonatdehydratase, die GalA in 2-Dehydro-3-deoxy-galactonat (ddGalA) umwandelt. Dies kann wiederum durch das Genprodukt des Gens *dgoK* unter Verbrauch von ATP zu 2-Dehydro-3-deoxy-galactonat-6-phosphat (ddGalAP) umgewandelt werden, welches im Anschluss durch das Genprodukt des Gens *dgoA* in Pyruvat und D-Glyceraldehyd 3-Phosphat (GAP) gespalten werden kann. Das gebildete GAP kann im Embden-Meyerhof-Weg (Glycolyse) ebenfalls zu Pyruvat abgebaut werden, welches nun dem Zitratzyklus zufließen kann.

### E.4.5 Modell der Galactoseverwertung in Xcc

Die in dieser Arbeit identifizierten Gene der Galactose-Verwertungsregionen erlauben es ein Modell der Galactoseverwertung in Xcc vorzuschlagen (Abb. E.1). Dabei wird das Genprodukt von *galA2* aus der Zelle exportiert und spaltet das an der Pflanzenzellwand gebundene Arabinogalactan. Für den Transport von Galactose und Galactose-haltigen Kohlenhydratverbindungen sind die beiden TonB-abhängigen Rezeptoren der Gene *xcc-b100\_2511* und *xcc-b100\_3045* zuständig. Im Periplasma werden die Galactose-haltigen Kohlenhydratverbindungen durch zwei  $\beta$ -Galactosidasen (kodiert durch *bga3* und *xcc-b100\_2508*) und eine  $\alpha$ -Glucosidase (kodiert durch *aglA2*) weiter abgebaut. Ob sich diese Enzyme im Periplasma befinden oder ins Medium abgegeben werden kann nicht gesagt werden. Ein Kandidat für den Transport von Galactose durch die innere Membran ist das Genprodukt des *sgIT*-Gens. In der Zelle wird anschließend die Galactose durch eine Galactose-1-dehydrogenase zu Galctn umgewandelt. Das Gen der Galactose-1-dehydrogenase ist in den transkriptomischen Analysen jedoch nicht als induziert identifiziert worden. Die darauffolgenden Reaktionsschritte werden von den Enzymen der Gene *xcc-b100\_2516*, *dgoD*, *dgoK* und *dgoA* katalysiert und resultieren in der Bildung von Pyruvat und GAP. Das GAP kann im Embden-Meyerhof-Weg (Glycolyse) zu Pyruvat abgebaut werden und anschließend in den Zitratzyklus einfließen.

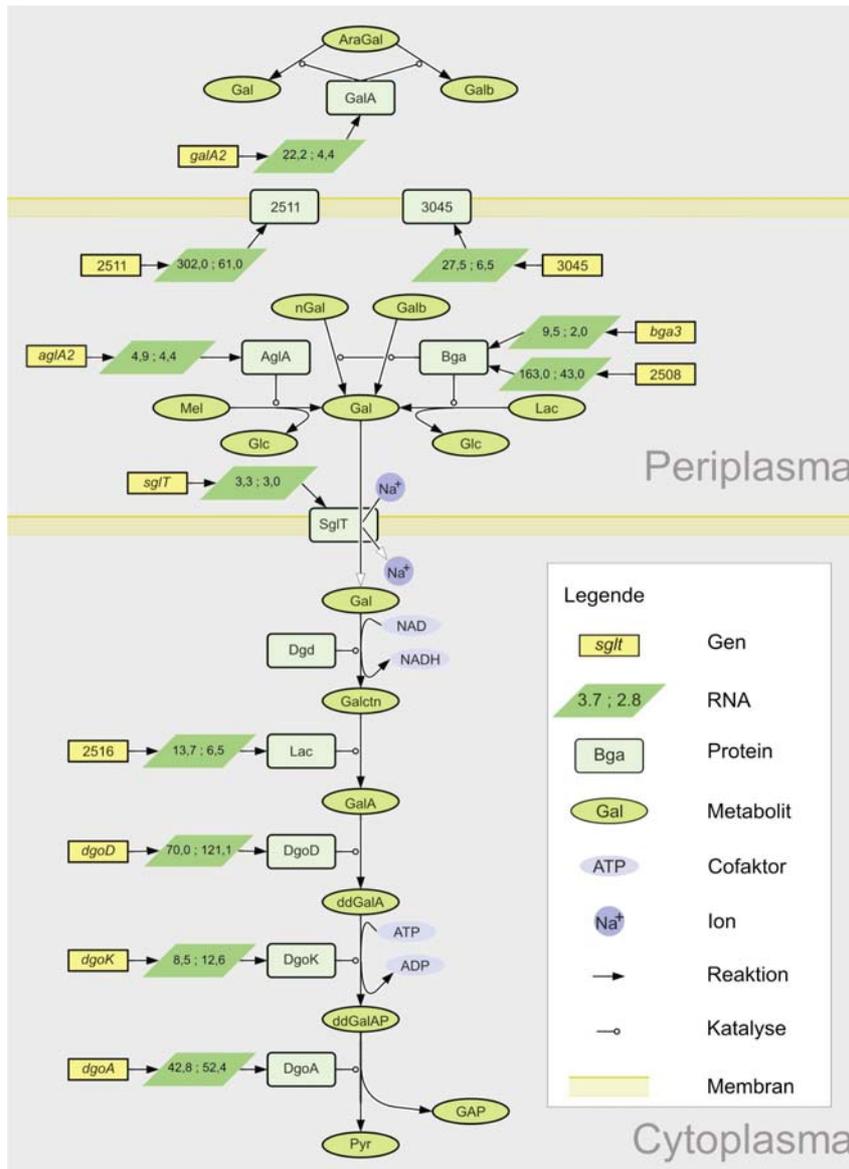


Abb. E.1: Modell der Galactoseverwertung in *Xcc* (Serrania et al., 2008). Die Gene der Galactose-Verwertungsregionen sind durch gelbe Kästen markiert. Die Zahlen in den grünen Feldern geben die Verhältnisse nach Pfaffl an, die für die Transkription der Gene mittels qRT-PCR ermittelt wurden. Die erste Zahl gibt das gemessene Verhältnis der Genexpression des Galactose-Kurzzeitwachstums zum Wachstum in Glucose an. Die zweite Zahl gibt das Verhältnis des Galactose-Langzeitwachstums zum Wachstum in Glucose an. N-terminale Signalpeptide von sieben in den Galactose-Verwertungsregionen kodierten Enzymen deuten auf einen Transport in das Periplasma hin. Unter diesen Enzymen befinden sich drei Glycosidasen. Ob diese Enzyme im Periplasma verbleiben oder durch die äußere Membran in die Umgebung abgegeben werden kann nicht vorhergesagt werden. Jedoch ist es wahrscheinlich, dass die Arabinogalactan-endo-1,4- $\beta$ -galactosidas GalA ins Medium transportiert wird, um an das Substrat Arabinogalactan an den Pflanzenzellwänden zu gelangen. Der Transport von Galactose und Galactose-haltigen Kohlenhydratverbindungen durch die äußere Membran wird möglicherweise durch die Genprodukte der Gene *xcc-b100-2511* und *xcc-b100-3045* durchgeführt. Die beiden Gene kodieren für TonB-abhängige Rezeptoren. Der Transport durch die innere Membran wird möglicherweise durch das Membranprotein des Gens *sglT* katalysiert. Im Cytoplasma kann die Galactose durch fünf Enzyme zu Pyruvat und D-Glyceraldehyd 3-Phosphat (GAP) abgebaut werden. GAP kann im Embden-Meyerhof-Weg (Glycolyse) ebenfalls zu Pyruvat umgesetzt werden, welches anschließend in den Zitratzyklus einfließen kann. Abkürzungen: Gal, Galactose; AraGal, Arabinogalactan; nGal, Galactan, Galb, Galactobiose; Glc, Glucose, Lac, Lactose; Mel, Melibiose; Galctn, Galactono-1,4-lacton; GalA, Galactonat; ddGalA, 2-Dehydro-3-deoxy-galactonat; ddGalAP, 2-Dehydro-3-deoxy-galactonat 6-Phosphat; GAP, D-Glyceraldehyd 3-Phosphat; Pyr, Pyruvat.

## E.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte ein genomweites transkriptomisches Profil einer Kultivierung im 10 L Maßstab erstellt werden. Hierfür wurde der Xanthan-Produktionsstamm Xcc LMG 8031\* verwendet. Die erhaltene Datenmenge der Transkriptionsprofile von nahezu jedem Gen im Genom kann auch in zukünftigen Arbeiten zu wachstumsspezifischen Fragestellungen verwendet werden. Anhand der Transkriptionsdaten konnten in dieser Arbeit zwei Genregionen identifiziert werden, die ein phasenspezifisches Verhalten aufwiesen. Eine der Genregionen beinhaltet hauptsächlich Gene ribosomaler Proteine und ist in der exponentiellen Wachstumsphase induziert und in der stationären Phase reprimiert. Die Genexpression scheint die allgemeine metabolische Aktivität der Bakterienkultur wiederzuspiegeln. In nachfolgenden Arbeiten könnte die Genaktivität dieser Gene als Indikator des Wachstumszustandes dienen. Ebenfalls könnten sie im Xanthan-Produktionsprozess als Qualitätskontrolle auf transkriptomischer Ebene zur Identifizierung untypischer Kultivierungen eingesetzt werden.

Zur Analyse möglicher Ansatzpunkte einer Stammentwicklung des Produktionsstammes Xcc LMG 8031\* wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine Inaktivierung der Motilität zu einer höheren Biomasse- oder Xanthanproduktion führt. Ebenfalls wurde untersucht, ob eine Induktion des *galU*-Gens eine erhöhte Xanthanproduktion bewirkt. In beiden Fällen konnte kein messbarer Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden. Durch eine mögliche Fluxanalyse der genetisch veränderten Stämme im 10-Liter Bioreaktor könnte eventuell untersucht werden in welchem Maße Unterschiede in den Flüssen im Vergleich zum Wildtyp bestehen. Dies könnte neue Erkenntnisse über mögliche weitere genetische Manipulationen liefern, die zu einer erhöhten Xanthanproduktion führen können.

In dieser Arbeit ließen sich mittels transkriptomischer Analysen Gene identifizieren, die in Anwesenheit von Galactose induziert werden. Anhand dieser Gene konnte ein Modell der Galactoseverwertung in Xcc entwickelt werden. Die Gene und deren Genprodukte können in zukünftigen Arbeiten auf anderen, nicht transkriptomischen Ebenen untersucht werden.

Der Microarray Xcc5kOLI wurde für die genomweiten transkriptomischen Analysen und Genomvergleiche dieser Arbeit verwendet. Dieser hat sich im Laufe der Arbeit als sehr nützliches und robustes Werkzeug erwiesen und steht für nachfolgende Arbeiten für Genexpressionsanalysen in Xcc zur Verfügung.

**F Abkürzungen**

aa	-	Aminoallyl
A	-	Absorption
Abb.	-	Abbildung
Ac	-	Acetyl
Ac-CoA	-	Acetyl-Coenzym A
ALD	-	Fructose-1,6-bisphosphataldolase
Ap	-	Ampicilin
AraGal	-	Arabinogalactan
ATP	-	Adenosintriphosphat
b	-	Basen
BmBF	-	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bp	-	Basenpaare
BPB	-	Bromphenolblau
BSA	-	Rinderserumalbumin
°C	-	Grad Celsius
<i>C. glutamicum</i>	-	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<i>C. jeikeium</i>	-	<i>Corynebacterium jeikeium</i>
CER	-	carbon dioxide exchange rate, Kohlendioxidtransferrate
cm	-	Zentimeter
Cm	-	Chloramphenicol
Da	-	Dalton
ddGalA	-	2-Dehydro-3-deoxy-galactonat
ddGalAP	-	2-Dehydro-3-deoxy-galactonat-6-Phosphat
DHAP	-	Dihydroxyacetonphosphat
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
DNase	-	DNA abbauendes Enzym
dNTP	-	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	-	Ethylendiamintetraacetat
EPS	-	Exopolysaccharid
EtOH	-	Ethanol
FBPase	-	Fructose-1,6-bisphosphatase
Fru	-	Fructose
Fru 1-P	-	Fructose-1-phosphat
Fru 6-P	-	Fructose-6-phosphat
FruP2	-	Fructose-1,6-bisphosphat
g	-	Gramm

G3P	-	Glyceraldehyd-3-phosphat
Gal	-	Galactose
GalA	-	Galactonat
Galb	-	Galactobiose
Galctn	-	Galactono-1,4-Lacton
GAP	-	D-Glyceraldehyd
GDP	-	Guanosindiphosphat
GDP-Man	-	Guanosindiphosphat-Mannose
GK	-	Glucokinase
Glc	-	Glucose
Glc 1-P	-	Glucose-1-phosphat
Glc 6-P	-	Glucose-6-Phosphat
GlcA	-	Glucuronsäure
GTP	-	Guanosintriphosphat
h	-	Stunde
insges	-	insgesamt
IPTG	-	Isopropylthiogalactosid
kb	-	Kilobasen
kDa	-	Kilo-Dalton
Km	-	Kanamycin
l	-	Liter
<i>L. lactis</i>	-	<i>Lactococcus lactis</i>
Lac	-	Lactose
LB	-	Luria Broth
LPS	-	Lipopolysaccharide
log-Phase	-	exponentielle Phase
m	-	Meter
M	-	Molar
m...	-	Milli....( $10^{-3}$ )
mA	-	Milliampere
Man	-	Mannose
Man 1-P	-	Mannose-1-phosphat
Man 6-P	-	Mannose-6-phosphat
MCS	-	multiple cloning site, Polylinker
Mel	-	Melibiose
min	-	Minute
<i>mob</i>	-	Mobilisierungsregion

MOPS	-	Morpholinopropionsäure
MW	-	Molekulargewicht
μ...	-	Mikro...(10 <sup>-6</sup> )
n...	-	Nano...(10 <sup>-9</sup> )
n.d.	-	nicht detektiert
nGal	-	Galactan
NRRL	-	Northern Regional Research Laboratories
nt	-	Nukleotid
o.D.	-	optische Dichte
ORF	-	open reading frame, offener Leseraster
OTR	-	oxigen transfer rate, Sauerstofftransferrate
<i>P. aeruginosa</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. putita</i>	-	<i>Pseudomonas putita</i>
PA	-	Penassay Broth
PCR	-	Polymerase Chain Reaktion, Polymerasekettenreaktion
PEP	-	Phosphoenolpyruvat
PGI	-	Phosphoglucoisomerase
PTS	-	Phosphotransferasesystem
pv.	-	Pathovar
Pyr	-	Pyruvyl
qRT-PCR	-	qantitative reverse Transkriptions-PCR
r	-	resistent
RBS	-	Ribosomenbindungsstelle
RNA	-	Ribonukleinsäure
RNase	-	Ribonuklease
rpm	-	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	-	Raumtemperatur
s	-	sensitiv
<i>S. meliloti</i>	-	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
SDS	-	Natriumdodecylsulfat
sec	-	Sekunde
Sm	-	Streptomycin
stat-Phase	-	stationäre Phase
<i>sux</i>	-	sucrose utilization in <i>Xanthomonas</i> , Sucroseverwendung in <i>Xanthomonas</i>
t	-	Zeit
TBDR	-	TonB-dependent receptor, TBDR

TM	-	Trockenmasse
Tn	-	Transposon
TY	-	Trypton-Yeast-Medium
U	-	unit, Enzymeinheit
UDP	-	Uridindiphosphat
UDP-Glc	-	Uridindiphosphat-Glucose
UDP-GlcA	-	Uridindiphosphat-Glucuronsäure
UDPG-deH	-	Uridindiphosphat-Glucose Dehydrogenase
UDPG-PP	-	Uridindiphosphat-Glucose Pyrophosphorylase
üN	-	Über Nacht
UTP	-	Uridintriphosphat
UV	-	Ultraviolettes Licht
V	-	Volt
<i>V. cholerae</i>	-	<i>Vibrio cholerae</i>
vvm	-	Luftstrom = Luftvolumen/Flüssigvolumen/Minute
W	-	Watt
WT	-	Wildtyp
Xac	-	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri
Xcc	-	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. campestris
Xcv	-	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria
Xoo	-	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. oryzae
X-Gal	-	5-Brom-4-chlor-3-indoyl- $\beta$ -D-galactosid
X-Gluc	-	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glucuronsäure

## G Literatur

- Alm, R.A., Hallinan, J.P., Watson, A.A., Mattick, J.S. (1996) Fimbrial biogenesis genes of *Pseudomonas aeruginosa*: *pilW* and *pilX* increase the similarity of type 4 fimbriae to the GSP protein-secretion systems and *pilY1* encodes a gonococcal PilC homologue. *Mol Microbiol.* 22, 161-173.
- Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S., Ramphal, R. (1997) A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J.Bacteriol.* 179, 5574-5581.
- Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S., Ramphal, R. (1998) The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infect.Immun.* 66, 1000-1007.
- Bagg, A., Neilands, J.B. (1987) Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26, 5471-5477.
- Ballerstedt, H., Volkers, R.J., Mars, A.E., Hallsworth, J.E., dos, S., V, Puchalka, J., van Duuren, J., Eggink, G., Timmis, K.N., de Bont, J.A., Wery, J. (2007) Genomotyping of *Pseudomonas putida* strains using *P. putida* KT2440-based high-density DNA microarrays: implications for transcriptomics studies. *Appl.Microbiol.Biotechnol* 75, 1133-1142.
- Becker, A., Schmidt, M., Jager, W., Pühler, A. (1995) New gentamicin-resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene* 162, 37-39.
- Becker, A., Katzen, F., Puhler, A., Ielpi, L. (1998) Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Appl.Microbiol.Biotechnol* 50, 145-152.
- Blanvillain, S., Meyer, D., Boulanger, A., Lautier, M., Guynet, C., Denancé, N., Vasse, J., Lauber, E., Arlat, M. (2007) Plant carbohydrate scavenging through TonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS.ONE.* 2, e224.
- Boels, I.C., Ramos, A., Kleerebezem, M., de Vos, W.M. (2001) Functional analysis of the *Lactococcus lactis* galU and galE genes and their impact on sugar nucleotide and exopolysaccharide biosynthesis. *Appl.Enviro.Microbiol.* 67, 3033-3040.

- Bretschneider, K.E., Gonella, M.P., Robeson, D.J. (1989) A Comparative Light and Electron Microscopical Study of Compatible and Incompatible Interactions Between *Xanthomonas-Campestris* Pv *Campestris* and Cabbage (*Brassica-Oleracea*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34, 285-297.
- Brune, I., Becker, A., Paarmann, D., Albersmeier, A., Kalinowski, J., Pühler, A., Tauch, A. (2006) Under the influence of the active deodorant ingredient 4-hydroxy-3-methoxybenzyl alcohol, the skin bacterium *Corynebacterium jeikeium* moderately responds with differential gene expression. *J.Biotechnol.* 127, 21-33.
- Capage, M.A., Doherty, D.H., Betlach, M.R., Vanderslice, R.W. (1987) Recombinant-DNA mediated production of xanthan gum.
- Cook, A.A., Walker, J.C., Larson, R.H. (1952) Studies on the disease cycle of black rot of crucifers. *Phytopathology* 42, 162-167.
- Corfield, A.P., Wagner, S.A., O'Donnell, L.J., Durdey, P., Mountford, R.A., Clamp, J.R. (1993) The roles of enteric bacterial sialidase, sialate O-acetyl esterase and glycosulfatase in the degradation of human colonic mucin. *Glycoconj.J.* 10, 72-81.
- Crecy-Lagard, V., Bouvet, O.M., Lejeune, P., Danchin, A. (1991a) Fructose catabolism in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Sequence of the PTS operon, characterization of the fructose-specific enzymes. *J.Biol.Chem.* 266, 18154-18161.
- Crecy-Lagard, V., Lejeune, P., Bouvet, O.M., Danchin, A. (1991b) Identification of two fructose transport and phosphorylation pathways in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol Gen.Genet.* 227, 465-472.
- Crecy-Lagard, V., Binet, M., Danchin, A. (1995) Fructose phosphotransferase system of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: characterization of the *fruB* gene. *Microbiology* 141 ( Pt 9), 2253-2260.
- Da Silva, A.C., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M., do Amaral, A.M., Bertolini, M.C., Camargo, L.E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L.P., Cicarelli, R.M., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El Dorry, H., Faria, J.B., Ferreira, A.J., Ferreira, R.C., Ferro, M.I., Formighieri, E.F., Franco, M.C., Greggio, C.C., Gruber, A., Katsuyama, A.M., Kishi, L.T., Leite, R.P., Lemos, E.G., Lemos, M.V., Locali, E.C., Machado, M.A., Madeira, A.M., Martinez-Rossi, N.M., Martins, E.C., Meidanis, J., Menck, C.F., Miyaki, C.Y., Moon, D.H.,

- Moreira, L.M., Novo, M.T., Okura, V.K., Oliveira, M.C., Oliveira, V.R., Pereira, H.A., Rossi, A., Sena, J.A., Silva, C., de Souza, R.F., Spinola, L.A., Takita, M.A., Tamura, R.E., Teixeira, E.C., Tezza, R.I., Trindade dos, S.M., Truffi, D., Tsai, S.M., White, F.F., Setubal, J.C., Kitajima, J.P. (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417, 459-463.
- Dasgupta, N., Arora, S.K., Ramphal, R. (2000) *fleN*, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.* 182, 357-364.
- Dasgupta, N., Ramphal, R. (2001) Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.* 183, 6636-6644.
- Dasgupta, N., Ferrell, E.P., Kanack, K.J., West, S.E., Ramphal, R. (2002) *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is sigma70 dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J.Bacteriol.* 184, 5240-5250.
- Dondrup, M., Goesmann, A., Bartels, D., Kalinowski, J., Krause, L., Linke, B., Rupp, O., Sczyrba, A., Pühler, A. and Meyer, F. (2003) EMMA: a platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data. *J.Biotechnol.* 106, 135-146.
- Dudoit, S., Yang, Y.H., Callow, M.J., Speed, T.P. (2002) Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. *Statistica Sinica* 12, 111-139.
- Dziejman, M., Balon, E., Boyd, D., Fraser, C.M., Heidelberg, J.F., Mekalanos, J.J. (2002) Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 1556-1561.
- Fraser, G.M., Hughes, C. (1999) Swarming motility. *Curr.Opin.Microbiol.* 2, 630-635.
- Garcia-Ochoa, F., Casas, J.A., Mohedano, A.F. (1993) Precipitation of xanthan gum. *Sep.Sci.Technol.* 28, 1303-1313.
- Garcia-Ochoa, F., Santos, V.E., Alcon, A. (1996) Simulation of Xanthan gum production by a chemically structured kinetic model. *Math.Comput.Simul.* 42, 187-195.
- Garcia-Ochoa, F., Santos, V.E., Alcon, A. (1997) Xanthan gum production in a laboratory aerated stirred tank bioreactor. *Chem.Biochem.Eng.Q.* 11, 69-74.

- Garcia-Ochoa, F., Santos, V.E., Casas, J.A., Gomez, E. (2000) Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnol.Adv.* 18, 549-579.
- Goldberg, M., Pribyl, T., Juhnke, S., Nies, D.H. (1999) Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the resistance-nodulation-cell division protein family. *J.Biol.Chem.* 274, 26065-26070.
- Gonzalez, R., Johns, M.R., Greenfield, P.F., Pace, G.W. (1989) Xanthan gum precipitation using ethanol. *Process.Biochem.* 24, 200-203.
- Gough, C.L., Dow, J.M., Barber, C.E., Daniels, M.J. (1988) Cloning of two endoglucanase genes of *Xanthomonas campestris*: analysis of the role of the major endoglucanase in pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact.* 1, 275-281.
- Gough, C.L., Dow, J.M., Keen, J., Henrissat, B., Daniels, M.J. (1990) Nucleotide sequence of the *engXCA* gene encoding the major endoglucanase of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Gene* 89, 53-59.
- Harding, N.E., Cleary, J.M., Cabanas, D.K., Rosen, I.G., Kang, K.S. (1987) Genetic and physical analyses of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. *J.Bacteriol.* 169, 2854-2861.
- Hötte, B., Rath-Arnold, I., Pühler, A., Simon, R. (1990) Cloning and analysis of a 35.3-kilobase DNA region involved in exopolysaccharide production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J.Bacteriol.* 172, 2804-2807.
- Hu, R.M., Yang, T.C., Yang, S.H., Tseng, Y.H. (2005) Deduction of upstream sequences of *Xanthomonas campestris* flagellar genes responding to transcription activation by FleQ. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 335, 1035-1043.
- Hüser, A.T., Becker, A., Brune, I., Dondrup, M., Kalinowski, J., Plassmeier, J., Pühler, A., Wiegrabe, I., Tauch, A. (2003) Development of a *Corynebacterium glutamicum* DNA microarray and validation by genome-wide expression profiling during growth with propionate as carbon source. *J.Biotechnol.* 106, 269-286.
- Jansson, P.E., Kenne, L., Lindberg, B. (1975) Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr.Res.* 45, 275-282.
- Katzen, F., Becker, A., Zorreguieta, A., Pühler, A., Ielpi, L. (1996) Promoter analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide. *J.Bacteriol.* 178, 4313-4318.

- Katzen, F., Ferreira, D.U., Oddo, C.G., Ielmini, M.V., Becker, A., Pühler, A., Ielpi, L. (1998) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *J.Bacteriol.* 180, 1607-1617.
- Katzen, F., Becker, A., Ielmini, M.V., Oddo, C.G., Ielpi, L. (1999) New mobilizable vectors suitable for gene replacement in gram-negative bacteria and their use in mapping of the 3' end of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon. *Appl.Environ.Microbiol.* 65, 278-282.
- Kitano, H., Funahashi, A., Matsuoka, Y., Oda, K. (2005) Using process diagrams for the graphical representation of biological networks. *Nat.Biotechnol.* 23, 961-966.
- Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C., Pechere, J.C. (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J.Bacteriol.* 182, 5990-5996.
- Köplin, R., Arnold, W., Hötte, B., Simon, R., Wang, G., Pühler, A. (1992) Genetics of xanthan production in *Xanthomonas campestris*: the *xanA* and *xanB* genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis. *J.Bacteriol.* 174, 191-199.
- Köplin, R., Wang, G., Hötte, B., Priefer, U.B., Pühler, A. (1993) A 3.9-kb DNA region of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* that is necessary for lipopolysaccharide production encodes a set of enzymes involved in the synthesis of dTDP-rhamnose. *J.Bacteriol.* 175, 7786-7792.
- Lee, B.M., Park, Y.J., Park, D.S., Kang, H.W., Kim, J.G., Song, E.S., Park, I.C., Yoon, U.H., Hahn, J.H., Koo, B.S., Lee, G.B., Kim, H., Park, H.S., Yoon, K.O., Kim, J.H., Jung, C.H., Koh, N.H., Seo, J.S., Go, S.J. (2005) The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res.* 33, 577-586.
- Lerouxel, O., Cavalier, D.M., Liepman, A.H., Keegstra, K. (2006) Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process. *Curr.Opin.Plant Biol.* 9, 621-630.
- Li, Y.X., Hao, G.X., Galvani, C.D., Meng, Y.Z., De la Fuente, L., Hoch, H.C., Burr, T.J. (2007) Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. *Microbiology-Sgm* 153, 719-726.
- Loos, A., Glanemann, C., Willis, L.B., O'Brien, X.M., Lessard, P.A., Gerstmeir, R., Guillouet, S., Sinskey, A.J. (2001) Development and validation of *corynebacterium* DNA microarrays. *Appl.Environ.Microbiol.* 67, 2310-2318.

- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982) Molecular cloning: a laboratory manual Cold Spring Harbour Laboratory, New York.
- Margaritis, A., Zajic, J.E. (1978) Mixing, mass transfer, and scale-up of polysaccharide fermentations. *Biotechnol Bioeng* 20, 939-1001.
- Melton, L.D., Mindt, L., Rees, D.A., Sanderson, G.R. (1976) Covalent structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*: evidence from partial hydrolysis studies. *Carbohydr.Res.* 46, 245-257.
- Meyer, F., Goesmann, A., McHardy, A.C., Bartels, D., Bekel, T., Clausen, J., Kalinowski, J., Linke, B., Rupp, O., Giegerich, R., Pühler, A. (2003) GenDB--an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res.* 31, 2187-2195.
- Milas, M., Rinaudo, M. (1979) Conformational investigation on the bacterial polysaccharide xanthan. *Carbohydr.Res.* 76, 189-196.
- Moraine, R.A., Rogovin, P. (1966) Kinetics of Polysaccharides B-1459 fermentation. *Biotechnol.Bioeng.* 8, 511-524.
- Nikaido, H.(2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol.Mol Biol.Rev.* 67, 593-656.
- Ochiai, H., Inoue, Y., Takeya, M., Sasaki, A., Kaku, H. (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 ResearchQuarterly* 39, 275-287.
- Padilla, L., Morbach, S., Kramer, R., Agosin, E. (2004) Impact of heterologous expression of *Escherichia coli* UDP-glucose pyrophosphorylase on trehalose and glycogen synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl.Environ.Microbiol.* 70, 3845-3854.
- Pfaffl, M.W.(2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Pielken, P., Schimz, K.L., Eggeling, L., Sahm, H. (1988) Glucose metabolism in *Xanthomonas campestris* and influence of methionine on the carbon flow. *Can.J.Microbiol.* 34, 1333-1337.
- Pons, A., Dussap, C.G., Gros, J.B. (1989) Modelling *Xanthomonas campestris* batch fermentation in a bubble column. *Biotechnol.Bioeng.* 33, 394-405.

- Pons, A., Dussap, C.G., Gros, J.B. (1990) Xanthan batch fermentations: compared performance of a bubble column and a stirred tank fermentor. *Bioprocess Eng.* 5, 107-114.
- Qian, W., Jia, Y., Ren, S.X., He, Y.Q., Feng, J.X., Lu, L.F., Sun, Q., Ying, G., Tang, D.J., Tang, H., Wu, W., Hao, P., Wang, L., Jiang, B.L., Zeng, S., Gu, W.Y., Lu, G., Rong, L., Tian, Y., Yao, Z., Fu, G., Chen, B., Fang, R., Qiang, B., Chen, Z., Zhao, G.P., Tang, J.L., He, C. (2005) Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res.* 15, 757-767.
- Ramirez, M.E., Fucikovsky, L., Garcia-Jiménez, F., Quintero, R., Galindo, E. (1988) Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *Xanthomonas campestris*. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 29, 5-10.
- Rüberg, S., Tian, Z.X., Krol, E., Linke, B., Meyer, F., Wang, Y., Pühler, A., Weidner, S., Becker, A. (2003) Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J.Biotechnol.* 106, 255-268.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Samatey, F.A., Matsunami, H., Imada, K., Nagashima, S., Shaikh, T.R., Thomas, D.R., Chen, J.Z., Derosier, D.J., Kitao, A., Namba, K. (2004) Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. *Nature* 431, 1062-1068.
- Schlegel, H. G. (1992) *Allgemeine Mikrobiologie* Thieme, Stuttgart; New York.
- Schröter, K., Flaschel, E., Pühler, A., Becker, A. (2001) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* secretes the endoglucanases ENGXCA and ENGXCB: construction of an endoglucanase-deficient mutant for industrial xanthan production. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 55, 727-733.
- Seifert, G.J., Roberts, K. (2007) The biology of arabinogalactan proteins. *Annu.Rev.Plant Biol.* 58, 137-161.
- Seisun, D.(2006) The market of hydrocolloids and other uses of seaweeds. *Aqua Sur - 3rd International conference on aquaculture.*

- Serrania, J., Vorhölter, F.J., Niehaus, K., Pühler, A., Becker, A. (2008) Identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* galactose utilization genes from transcriptome data. J.Biotechnol. in Press.
- Shaw, J.J., Settles, L.G., Kado, C.I. (1988) Transposon Tn4431 Mutagenesis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: Characterization of a Nonpathogenic Mutant and Cloning of a Locus of Pathogenicity. Molecular Plant-Microbe Interaction 1, 39-45.
- Simon, R., Priefer, U.B., Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Biotechnology 1, 784-791.
- Smith, J.H., Park, D.S. (1982) Recovery of microbial polysaccharides. J.Chem.Technol.Biotechnol. 32, 119-129.
- Stankowski, J.D., Mueller, B.E., Zeller, S.G. (1993) Location of a second O-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. Carbohydr.Res. 241, 321-326.
- Sturn, A., Quackenbush, J., Trajanoski, Z. (2002) Genesis: cluster analysis of microarray data. Bioinformatics 18, 207-208.
- Suh, I.S., Schumpe, A., Deckwer, W.D. (1992) Xanthan production in bubble column and air lift reactors. Biotechnol Bioeng 39, 85-94.
- Sutherland, I.W. (1977) Microbial exopolysaccharide synthesis. In: Sandford, P. A., Laskin, A. (Eds.), Extracellular microbial polysaccharides. American Chemical Society, Washington D.C., pp. 40-57.
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Buttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Mittenhuber, G., Nies, D.H., Niesbach-Klosgen, U., Patschkowski, T., Rückert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S.C., Vorhölter, F.J., Weber, E., Pühler, A., Bonas, U., Bartels, D., Kaiser, O. (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. J.Bacteriol. 187, 7254-7266.
- Totten, P.A., Lara, J.C., Lory, S. (1990) The *rpoN* gene product of *Pseudomonas aeruginosa* is required for expression of diverse genes, including the flagellin gene. J.Bacteriol. 172, 389-396.

- Vorhölter, F.J., Schneiker, S., Goesmann, A., Krause, L., Bekel, T., Kaiser, O., Linke, B., Patschkowski, T., Rückert, C., Schmid, J., Sidhu, V.K., Sieber, V., Tauch, A., Watt, S.A., Weisshaar, B., Becker, A., Niehaus, K., Pühler, A. (2008) The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *J.Biotechnol.* 134, 33-45.
- Whitfield, C., Sutherland, I.W., Cripps, R.E. (1982) Glucose metabolism of *Xanthomonas campestris*. *J.Gen.Microbiol.* 128, 981-985.
- Williams, J.W., Northrop, D.B. (1976) Purification and properties of gentamicin acetyltransferase I. *Biochemistry* 15, 125-131.
- Wohlleben, W., Arnold, W., Bissonnette, L., Pelletier, A., Tanguay, A., Roy, P.H., Gamboa, G.C., Barry, G.F., Aubert, E., Davies, J. et. al. (1989) On the evolution of Tn21-like multiresistance transposons: sequence analysis of the gene (aacC1) for gentamicin acetyltransferase-3-I(AAC(3)-I), another member of the Tn21-based expression cassette. *Mol Gen.Genet.* 217, 202-208.
- Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J., Speed, T.P. (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.* 30, e15.
- Zaidi, A., Ghosh, P., Schumpe, A. (1991) Xanthan production in a plunging jet reactor. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 35, 330-333.
- Zurawski, G., Zurawski, S.M. (1985) Structure of the *Escherichia coli* S10 ribosomal protein operon. *Nucleic Acids Res.* 13, 4521-4526.

# H Anhang

## H.1 „k-means“-Cluster

**Tabelle H. 1:** Cluster A Genliste

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_0030	<i>egl</i>	exported cellulase
xcc-b100_0031	<i>egl</i>	exported cellulase
xcc-b100_0073	-	hypothetical protein
xcc-b100_0255	-	transcriptional regulator, TetR family
xcc-b100_0261	-	diguanylate cyclase
xcc-b100_0268	<i>ivd</i>	isovaleryl-CoA dehydrogenase
xcc-b100_0276	-	putative exported or membrane-anchored cytochrome
xcc-b100_0286	<i>ohr</i>	organic hydroperoxide resistance protein
xcc-b100_0288	-	esterase/lipase/thioesterase family enzyme
xcc-b100_0289	-	hypothetical protein
xcc-b100_0349	-	hypothetical protein
xcc-b100_0350	-	hypothetical protein
xcc-b100_0377	-	transcriptional regulator, MarR family
xcc-b100_0408	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0471	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0472	<i>hmgA</i>	homogentisate 1,2-dioxygenase
xcc-b100_0638	-	exported putative esterase
xcc-b100_0690	<i>pep</i>	exported prolyl oligopeptidase
xcc-b100_0698	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0773	<i>xcsE</i>	type II protein secretion system ATPase
xcc-b100_0803	-	two-component system response regulator protein
xcc-b100_0873	<i>ilvB</i>	acetolactate synthase large subunit
xcc-b100_0874	<i>ilvC</i>	ketol-acid reductoisomerase
xcc-b100_0885	<i>ppa</i>	inorganic diphosphatase
xcc-b100_0949	<i>rpmE</i>	50S ribosomal protein L31
xcc-b100_0936	<i>rpoZ</i>	RNA polymerase omega subunit
xcc-b100_1098	-	Hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_1150	-	TonB-dependent outer membrane receptor
xcc-b100_1282	-	Putative membrane protein
xcc-b100_1313	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_1458	-	Two-component system response regulator, probable
xcc-b100_1588	-	TonB-dependent outer membrane receptor (C-terminal fragment)
xcc-b100_1652	<i>rpsO</i>	30S ribosomal protein S15
xcc-b100_1710	<i>ihfA</i>	integration host factor alpha chain
xcc-b100_1714	<i>gumD</i>	undecaprenylphosphate glucosylphosphate transferase
xcc-b100_1840	-	Putative secreted protein
xcc-b100_2072	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2234	-	hypothetical protein
xcc-b100_2141	<i>lysU</i>	lysyl-tRNA synthetase heat inducible
xcc-b100_2129	<i>carA</i>	Carbamoyl-phosphate synthase (glutamine-hydrolyzing)
xcc-b100_2537	<i>recA</i>	RecA protein
xcc-b100_2538	<i>lexA2</i>	LexA repressor
xcc-b100_2771	-	Glutathione peroxidase
xcc-b100_2784	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_2811 plus multiple hits	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2876	<i>cspA</i>	major cold shock protein
xcc-b100_2991	-	Heat shock protein
xcc-b100_3180	<i>cyoA</i>	Cytochrome O ubiquinol oxidase subunit II
xcc-b100_3186	<i>rpsT</i>	30S ribosomal protein S20
xcc-b100_3188	<i>rpmA</i>	50S ribosomal protein L27
xcc-b100_3409	-	Putative secreted protein
xcc-b100_3417	-	Putative secreted protein
xcc-b100_3443	<i>rplR</i>	50S ribosomal protein L18
xcc-b100_3461	<i>tufA</i>	elongation factor Tu
xcc-b100_3473	<i>tufA</i>	elongation factor Tu
xcc-b100_3478	<i>ispE</i>	4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase
xcc-b100_3540	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3655	-	Putative secreted esterase/lipase/thioesterase family protein
xcc-b100_3667	<i>glyA</i>	Serine hydroxymethyltransferase
xcc-b100_3672	-	Putative secreted protein
xcc-b100_3680	-	phosphotransferase
xcc-b100_3737	<i>wxcH</i>	hypothetical protein
xcc-b100_3760	<i>rhIE</i>	ATP-dependent RNA helicase
xcc-b100_3762	-	Conserved hypothetical protein

## H Anhang

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_3807	-	Putative secreted protein
xcc-b100_3810	-	Putative secreted protein
xcc-b100_3811	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_3855	-	Putative oxidoreductase
xcc-b100_3896	-	Putative xanthine dehydrogenase molybdenum binding subunit
xcc-b100_3999	<i>bglX</i>	Beta-glucosidase
xcc-b100_4018	<i>ctaD</i>	Cytochrome c oxidase, subunit I
xcc-b100_2424	-	Hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_4070	-	hypothetical protein
xcc-b100_0069	-	IS1481 transposase
xcc-b100_4177	<i>nrdB</i>	Ribonucleoside-diphosphate reductase beta chain
xcc-b100_4182	<i>mgtE</i>	Magnesium transporter
xcc-b100_4297	<i>tatA</i>	sec-independent protein translocase
xcc-b100_4316	-	putative membrane protein
xcc-b100_4330	<i>xynA</i>	exported endo-1,4-beta-xylanase
xcc-b100_4363	-	putative exported protein
xcc-b100_3889	-	IS1481 transposase
xcc-b100_4412	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_4422	-	Putative microcystin-dependent protein
xcc-b100_4424	-	Putative microcystin-dependent protein
xcc-b100_4424	-	Putative microcystin-dependent protein
xcc-b100_4460	<i>phoN</i>	Acid phosphatase
xcc-b100_0034	-	hypothetical protein
xcc-b100_0287	-	putative exported esterase/lipase family enzyme
xcc-b100_0420	-	IS1481 transposase
xcc-b100_0612	<i>IS1481</i>	IS1481 transposase
xcc-b100_0691	-	hypothetical protein
xcc-b100_0851	<i>oprO</i>	phosphate-selective outer membrane porin O
xcc-b100_1548	<i>tonB</i>	TonB protein.
xcc-b100_1569	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2209	-	GGDEF family protein
xcc-b100_2419	-	IS1481 transposase
xcc-b100_2438	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_2556	<i>ispF</i>	2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase
xcc-b100_2632	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_2831	-	hypothetical protein
xcc-b100_2833	-	ISXcc1 transposase ORFB
xcc-b100_3056	-	ISXcc1 transposase ORFA
xcc-b100_3117	-	hypothetical protein
xcc-b100_3603	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_3723	-	hypothetical protein
xcc-b100_3852	-	putative aromatic ring-opening dioxygenase
xcc-b100_4098	-	putative two-component system sensor kinase, ATP-binding region
xcc-b100_4240	-	hypothetical protein
xcc-b100_4250	-	ankyrin-like protein
xcc-b100_4256	-	PpiC-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
xcc-b100_4321	-	small exported protein
xcc-b100_4406	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica

**Tabelle H. 2:** Cluster B Genliste

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_0005	-	putative membrane protease
xcc-b100_0009	<i>exbB</i>	macromolecule import protein
xcc-b100_0085	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0105	<i>fbp</i>	fructose-1,6-bisphosphatase
xcc-b100_0160	<i>chlE</i>	exported cholinesterase
xcc-b100_0195	-	conserved exported protein
xcc-b100_0320	-	putative MFS purine transporter
xcc-b100_0330	<i>fhuA</i>	exported ferrichrome-iron receptor
xcc-b100_0385	<i>glpF</i>	glycerol uptake facilitator
xcc-b100_0395	<i>pcaB</i>	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase
xcc-b100_0445	-	hypothetical protein
xcc-b100_0447	-	oxidoreductase
xcc-b100_0499	<i>trpD</i>	anthranilate phosphoribosyltransferase
xcc-b100_0501	-	membrane-anchored dehalogenase-like hydrolase
xcc-b100_0506	<i>rplM</i>	50S ribosomal protein L13
xcc-b100_0509	-	ferredoxin-like protein
xcc-b100_0570	-	hypothetical protein
xcc-b100_0631	-	putative membrane protein
xcc-b100_0643	-	putative exported protein
xcc-b100_0669	<i>mutM</i>	DNA-formamidopyrimidine glycosylase

## H Anhang

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_0675	<i>egl</i>	exported cellulase
xcc-b100_0686	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0738	<i>pglA</i>	exported polygalacturonase
xcc-b100_0742	-	putative exported protein
xcc-b100_0756	-	putative exported protein
xcc-b100_0780	<i>xcsL</i>	type II protein secretion system protein L
xcc-b100_0781	<i>xcsM</i>	exported type II protein secretion system protein M
xcc-b100_0785	-	transcriptional regulator, LacI family
xcc-b100_0786	<i>glmS</i>	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing)
xcc-b100_0793	<i>betA</i>	choline dehydrogenase
xcc-b100_0821	-	hypothetical protein
xcc-b100_0844	<i>oprP</i>	phosphate-selective outer membrane porin P
xcc-b100_0944	-	porin
xcc-b100_0931	-	HAM1 protein homolog
xcc-b100_1018	<i>celA</i>	1,4-beta-cellobiosidase
xcc-b100_1023	-	Fumarylacetoacetate hydrolase family protein
xcc-b100_1082	<i>colS</i>	Two-component system sensor protein
xcc-b100_1120	-	Glutathione S-transferase, probable
xcc-b100_1202	-	Putative two-component system response regulator
xcc-b100_1212	<i>pqqE</i>	Coenzyme PQQ synthesis protein E
xcc-b100_1230	<i>pilH</i>	Type IV pilus response regulator PilH
xcc-b100_1270	<i>nudE</i>	ADP compounds hydrolase
xcc-b100_1295	<i>prfC</i>	Peptide chain release factor 3
xcc-b100_1330	-	TonB-dependent outer membrane receptor
xcc-b100_1359	-	ABC transporter ATP-binding protein
xcc-b100_1398	-	DJ-1/PfpI family protein
xcc-b100_1415	<i>pyrB</i>	Aspartate carbamoyltransferase
xcc-b100_1431	-	Putative signal transduction protein
xcc-b100_1432	-	Putative alcohol dehydrogenase
xcc-b100_1451	<i>nfi</i>	Deoxyribonuclease V
xcc-b100_1456	<i>cheB2</i>	Chemotaxis response regulator
xcc-b100_1464	-	N-acetyltransferase family protein
xcc-b100_1494	-	Extracellular serine protease
xcc-b100_1593	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_1698	-	TonB-dependent outer membrane receptor
xcc-b100_1732	<i>dxs</i>	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase
xcc-b100_1798	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_1799	<i>rpfN</i>	carbohydrate-selective porin
xcc-b100_1860	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_1894	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_1955	<i>ccmG2</i>	Thiol:disulfide interchange protein (c-type cytochrome biogenesis protein CcmG)
xcc-b100_1971	-	transcriptional regulator, LacI family
xcc-b100_1989	-	putative peptide glycosyltransferase
xcc-b100_2009	-	Putative non-heme chloroperoxidase
xcc-b100_2023	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2030	-	hypothetical protein
xcc-b100_2080	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2426	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_2409	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_2315	-	glucose-1-phosphate nucleotidyltransferase
xcc-b100_2260	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2240	<i>flgL</i>	Flagellin and related hook-associated proteins
xcc-b100_2196	-	hypothetical protein
xcc-b100_2149	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2147	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_2482	-	lipid phosphate phosphatase
xcc-b100_2487	-	signaling protein
xcc-b100_2488	<i>sglT</i>	glucose or galactose:Na <sup>+</sup> symporter
xcc-b100_2549	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_2570	-	Putative HlyC/CorC family transporter
xcc-b100_2594	<i>rpoE4</i>	RNA polymerase ECF-type sigma factor
xcc-b100_2633	-	IS1477 transposase ORFB
xcc-b100_2730	<i>cynT2</i>	Carbonic anhydrase
xcc-b100_2763	<i>scrK</i>	fructokinase
xcc-b100_2918	<i>papC</i>	PapC family outer membrane usher protein
xcc-b100_2930	-	Probable membrane-associated zinc metalloprotease
xcc-b100_2937	<i>rnhB</i>	Ribonuclease HII
xcc-b100_2963	<i>rpoE3</i>	RNA polymerase ECF-type sigma factor
xcc-b100_2980	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_2999	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3006	-	putative exported protein

## H Anhang

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_3007	-	Putative secreted protein
xcc-b100_3084	<i>hrpE</i>	HrpE protein
xcc-b100_3152	-	Putative two-component system response regulator
xcc-b100_3259	-	Putative phosphodiesterase
xcc-b100_3261	-	Putative thioredoxin reductase
xcc-b100_3263	-	Putative short chain dehydrogenase
xcc-b100_3299	-	Putative bacterioferritin
xcc-b100_3301	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_3312	<i>acnA</i>	Aconitate hydratase
xcc-b100_3350	-	disrupted glycosyltransferase
xcc-b100_3418	-	OmpA family outer membrane protein
xcc-b100_3472	<i>secE</i>	Preprotein translocase subunit SecE
xcc-b100_3557	<i>imp</i>	putative lipopolysaccharide exporter
xcc-b100_3719	-	ABC transporter permease
xcc-b100_3725	-	Putative flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase
xcc-b100_3761	<i>ptpS</i>	6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase
xcc-b100_3799	<i>atpE</i>	ATP synthase C chain
xcc-b100_3826	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3831	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3863	-	Putative two-component system sensor kinase
xcc-b100_3866	<i>yaal</i>	isochorismatase-like protein
xcc-b100_3867	<i>yciE</i>	conserved hypothetical protein
xcc-b100_3875	-	transcriptional regulator, Fis family
xcc-b100_3878	<i>cioB</i>	Cyanide-insensitive ubiquinol oxidase, subunit II
xcc-b100_3884	<i>glf</i>	UDP-galactopyranose mutase
xcc-b100_3976	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_4001	<i>gcp</i>	O-sialoglycoprotein endopeptidase
xcc-b100_4038	-	glycosyltransferase
xcc-b100_4109	<i>trpS</i>	tryptophanyl-tRNA synthetase
xcc-b100_4112	<i>ecnA</i>	entericidin A
xcc-b100_4158	<i>natB</i>	Na <sup>+</sup> extrusion ABC transporter permease
xcc-b100_4229	<i>rpmG</i>	50S ribosomal protein L33
xcc-b100_4287	-	Putative membrane protein
xcc-b100_4309	<i>rspA</i>	starvation sensing protein
xcc-b100_4420	<i>recC</i>	exodeoxyribonuclease V gamma chain
xcc-b100_4444	-	Putative membrane protein
xcc-b100_0025	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0153	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_0186	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0354	-	putative exported protein
xcc-b100_0497	<i>trpG</i>	anthranilate synthase component II
xcc-b100_0670	-	putative exported protein
xcc-b100_0733	-	truncated NTPase
xcc-b100_0970	-	precursor of a protein similar to exported endopeptidases or/ lipoproteins
xcc-b100_1077	-	hypothetical protein
xcc-b100_1690	-	hypothetical protein with peptidoglycan-binding domain
xcc-b100_1691	-	VirB4 protein
xcc-b100_1742	-	hypothetical protein
222xcc_050728_3957	-	pseudogene
xcc-b100_1950	<i>msbA</i>	lipooligosaccharide ABC exporter
xcc-b100_2204	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_2678	<i>hutC</i>	Histidine utilization repressor.
xcc-b100_2754	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_2824	-	IS1477 transposase ORFB
xcc-b100_2828	-	predicted transcriptional regulator
xcc-b100_3127	-	hypothetical protein
xcc-b100_3397	-	hypothetical protein
xcc-b100_3403	-	putative membrane protein
xcc-b100_3485	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_3758	<i>uptB</i>	maleylacetoacetate isomerase
xcc_try_5097	-	-
xcc-b100_3888	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_3890	-	Zn-dependent dehydrogenase
xcc-b100_4253	<i>fecA</i>	Transferrin-binding protein 1 precursor.

**Tabelle H. 3:** Cluster D Genliste

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_0026	-	putative exported protein
xcc-b100_0036	<i>glfD</i>	glutamate synthase (NADPH), beta subunit
xcc-b100_0038	-	putative exported protein

## H Anhang

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_0077	-	putative deaminase
xcc-b100_0080	-	hypothetical protein
xcc-b100_0098	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0200	-	hypothetical protein
xcc-b100_0225	<i>gpsA</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD(P)(+))
xcc-b100_0232	-	putative exported protein
xcc-b100_0249	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0257	-	transcriptional regulator, AraC family
xcc-b100_0265	-	exported prolyl oligopeptidase
xcc-b100_0293	-	aldo-keto reductase family oxidoreductase
xcc-b100_0332	<i>namA</i>	NADPH dehydrogenase
xcc-b100_0389	<i>vanA</i>	vanillate O-demethylase oxygenase subunit
xcc-b100_0409	<i>aspH</i>	putative aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase
xcc-b100_0414	-	hypothetical protein
xcc-b100_0416	<i>bioB</i>	biotin synthase
xcc-b100_0449	-	putative exported protein
xcc-b100_0488	-	DnaJ-related protein
xcc-b100_0504	-	small multidrug resistance family membrane protein
xcc-b100_0532	-	putative membrane protein
xcc-b100_0538	-	putative Fis family DNA-binding protein
xcc-b100_0593	<i>mdcG</i>	Phosphoribosyl-dephospho-CoA transferase
xcc-b100_0605	<i>aceE</i>	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)
xcc-b100_0642	-	glycosyltransferase
xcc-b100_0657	-	putative transporter
xcc-b100_0663	<i>cycA</i>	D-serine/D-alanine/glycine transporter
xcc-b100_0671	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0684	-	two-component system response regulator
xcc-b100_0687	-	putative DNA-binding protein
xcc-b100_0693	<i>aspC</i>	aspartate aminotransferase
xcc-b100_0710	-	putative membrane-anchored diguanylate cyclase
xcc-b100_0728	<i>ftsW</i>	septum-peptidoglycan biosynthetic protein
xcc-b100_0744	<i>lipB</i>	lipoyltransferase
xcc-b100_0832	-	lipolytic enzyme
xcc-b100_0917	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_0966	<i>tkt</i>	transketolase
xcc-b100_0951	<i>gltA</i>	Citrate synthase
xcc-b100_0928	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_0995	<i>cysG</i>	Siroheme synthase, probable
xcc-b100_1012	-	tRNA/rRNA methyltransferase
xcc-b100_1021	-	Peptidase M28 family protein
xcc-b100_2081	-	Transcriptional regulator, LysR family
xcc-b100_1095	<i>pilS</i>	Two-component system sensor protein PilS
xcc-b100_1122	<i>ssuB</i>	ABC transporter ATP-binding subunit
xcc-b100_1152	-	TonB-dependent outer membrane receptor
xcc-b100_1159	<i>phlN2</i>	Phospholipase C
xcc-b100_1183	-	Putative transcriptional regulator, ExsB family
xcc-b100_1228	<i>gshB</i>	Glutathione synthetase
xcc-b100_1237	<i>rpoE6</i>	RNA polymerase ECF-type sigma factor
xcc-b100_1242	-	Putative sulfotransferase
xcc-b100_1246	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_1292	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_1305	-	Putative cytochrome B561
xcc-b100_1306	-	Putative membrane protein
xcc-b100_1329	-	hypothetical protein
xcc-b100_1356	<i>ptsN</i>	PTS mannitol importer
xcc-b100_1391	-	Acetyltransferase (GNAT) family protein
xcc-b100_1393	<i>sufD</i>	ABC transporter-associated protein involved in Fe-S cluster assembly
xcc-b100_1399	-	Putative secreted protein
xcc-b100_1412	<i>yhgE</i>	conserved hypothetical protein
xcc-b100_1445	<i>yjiX</i>	conserved hypothetical protein
xcc-b100_1447	-	Pirin-related protein
xcc-b100_1450	-	Pirin-related protein
xcc-b100_1509	<i>ada</i>	DNA methylation and regulatory protein (methylated-DNA--[protein]-cysteine S-methyltransferase)
xcc-b100_1527	-	Monovalent cation:proton antiporter-2 family protein
xcc-b100_1558	<i>pmbA</i>	Putative modulator of DNA gyrase; peptidase U62 protein PmbA
xcc-b100_1567	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_1579	<i>slyD</i>	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD
xcc-b100_1613	<i>asd</i>	Aspartate semialdehyde dehydrogenase
xcc-b100_1661	-	Glutaredoxin-related protein
xcc-b100_1713	<i>gumC</i>	xanthan chain-length determinant

## H Anhang

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_1718	<i>gumH</i>	mannosyltransferase
xcc-b100_1806	-	transcriptional regulator, TetR family
xcc-b100_1822	-	putative response regulator
xcc-b100_1880	<i>mutL</i>	DNA mismatch repair protein MutL
xcc-b100_1902	-	tRNA/rRNA methyltransferase
xcc-b100_1926	-	Major facilitator superfamily protein, probable
xcc-b100_1929	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_2027	-	Putative RNA-binding protein
xcc-b100_2032	-	Putative cytochrome
xcc-b100_2049	-	hypothetical protein
xcc-b100_2412	<i>topB</i>	DNA topoisomerase III
xcc-b100_2388	-	Putative membrane protein
xcc-b100_2343	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2340	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2332	-	sensor histidine kinase
xcc-b100_2266	<i>clpA</i>	ATP-dependent Clp protease subunit
xcc-b100_2259	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2207	-	Putative sensor protein
xcc-b100_2112	<i>serA</i>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
xcc-b100_2111	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2517	<i>dgoK</i>	2-dehydro-3-deoxygalactonokinase
xcc-b100_2586	-	glycosyltransferase
xcc-b100_2668	<i>tonB2</i>	TonB-like protein
xcc-b100_2699	<i>asnS</i>	asparaginyl-tRNA synthetase
xcc-b100_2703	<i>paiB</i>	protease synthase
xcc-b100_2704	-	Carbonic anhydrase
xcc-b100_2731	-	Hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_2761	<i>meth</i>	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase (fragment)
xcc-b100_2954	-	hypothetical protein
xcc-b100_2960	-	Putative ferredoxin
xcc-b100_2963	<i>rpoE3</i>	RNA polymerase ECF-type sigma factor
xcc-b100_2970	-	Putative membrane protein
xcc-b100_2982	-	putative sugar efflux porter
xcc-b100_2990	<i>slyD</i>	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
xcc-b100_3042	-	Acyl-CoA dehydrogenase
xcc-b100_3053	<i>bglX</i>	beta-glucosidase
xcc-b100_3063	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_3153	-	Putative two-component system sensor protein
xcc-b100_3190	-	excinuclease ABC subunit A
xcc-b100_3209	-	Putative membrane protein
xcc-b100_3215	-	Putative acetyltransferase
xcc-b100_3240	-	Putative dipeptidyl peptidase
xcc-b100_3250	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3297	-	low molecular weight heat shock protein
xcc-b100_3355	<i>slp</i>	Slp family outer membrane protein
xcc-b100_3375	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_3376	<i>ppiD</i>	Peptidylprolyl isomerase
xcc-b100_3416	<i>riuB1</i>	Pseudouridylyl synthase
xcc-b100_3433	<i>dsbB</i>	Protein-disulfide reductase (glutathione)
xcc-b100_3445	<i>rpsH</i>	30S ribosomal protein S8
xcc-b100_3560	<i>ksgA</i>	Dimethyladenosine transferase
xcc-b100_3579	-	ABC transporter ATP-binding protein
xcc-b100_3606	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3616	<i>metF</i>	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase
xcc-b100_3617	-	Putative secreted protein
xcc-b100_3653	<i>kdpA</i>	Potassium-transporting ATPase A chain
xcc-b100_3657	-	antitermination factor, NusB family
xcc-b100_3730	<i>xanB</i>	phosphomannose isomerase / GDP-mannose pyrophosphorylase
xcc-b100_3752	-	Cys/Met metabolism PLP-dependent enzyme
xcc-b100_3753	-	Cystathionine beta-synthase, probable
xcc-b100_3755	<i>uptE</i>	Outer membrane protein UptE
xcc-b100_3773	-	Putative secreted protein
xcc-b100_3809	<i>ompW3</i>	OmpW family outer membrane protein
xcc-b100_3846	-	ATP-binding component of a sulfate / thiosulfate import ABC transporter
xcc-b100_3880	-	putative membrane protein
xcc-b100_3892	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3909	-	Putative secreted protein
xcc-b100_3930	<i>def2</i>	Peptide deformylase
xcc-b100_3992	-	Putative secreted protein
xcc-b100_4056	<i>speE</i>	Spermidine synthase, probable

## H Anhang

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_4060	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_4069	<i>ung</i>	DNA polymerase-related protein
xcc-b100_4086	-	Histone H1-like protein
xcc-b100_4119	-	transcriptional regulator, AraC family
xcc-b100_4208	-	Putative AMP-dependent synthetase and ligase family protein
xcc-b100_4295	<i>tatC</i>	Sec-independent protein translocase TatC
xcc-b100_4319	-	Putative secreted protein
xcc-b100_4320	<i>gnl</i>	exported gluconolactonase
xcc-b100_4334	<i>xylB</i>	xylan 1,4-beta-xylosidase / alpha-N-arabinofuranosidase
xcc-b100_4342	<i>rbsR</i>	transcriptional regulator, Lacl family
xcc-b100_4430	-	Periplasmic ABC-type transport system auxiliary component
xcc-b100_4431	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_4432	-	Putative outer membrane lipoprotein
xcc-b100_4452	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0253	-	hypothetical protein
xcc-b100_0357	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_0362	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc_try_4899	-	-
xcc-b100_0526	<i>purD</i>	phosphoribosylamine-glycine ligase
xcc-b100_0558	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0619	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0850	-	putatively exported sensor histidine kinases / response regulator fusion protein
222xcc_050728_3752	-	no similarity
xcc-b100_0889	-	hypothetical protein
xcc-b100_1056	<i>radC_1</i>	DNA repair protein radC homolog.
xcc-b100_1060	-	adenine specific DNA methylase
xcc-b100_1668	<i>pilV</i>	pre-pilin leader sequence
xcc-b100_1962	<i>aspC</i>	probable pyridoxal phosphate aminotransferase protein
xcc-b100_2186	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_2425	-	IS1479 transposase-like
xcc-b100_2644	-	IS1478 transposase
xcc-b100_3004	-	Extracellular serine protease precursor family protein
xcc-b100_3118	-	hypothetical protein predicted
xcc-b100_3119	-	putative membrane protein
xcc-b100_3119	-	putative membrane protein
xcc-b100_3232	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_3633	<i>mraY</i>	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase
xcc-b100_4194	-	hypothetical protein
xcc-b100_4222	-	transcriptional regulator, LysR family
xcc-b100_4238	<i>phoD</i>	phosphodiesterase/alkaline phosphatase D
xcc-b100_4298	-	conserved putative secreted protein
xcc-b100_4388	-	conserved putative secreted protein
xcc-b100_4450	-	avirulence protein

**Tabelle H. 4:** Cluster E Genliste

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_0224	<i>secB</i>	protein-export protein
xcc-b100_0380	-	benzaldehyde dehydrogenase (NAD(+))
xcc-b100_0516	-	putative Iron-sulfur cluster assembly protein
xcc-b100_0552	<i>groES</i>	10 kDa chaperonin
xcc-b100_0553	<i>groEL</i>	60 kDa chaperonin
xcc-b100_0702	<i>hslV</i>	proteasome-like complex protease subunit
xcc-b100_0703	<i>hslU</i>	proteasome-like complex chaperone subunit
xcc-b100_1123	<i>clpB2</i>	ATP-dependent Clp protease subunit
xcc-b100_1289	-	HSP33 family chaperone
xcc-b100_1476	<i>fur</i>	transcriptional regulator, Fur family
xcc-b100_1779	<i>htpG</i>	Heat shock protein G
xcc-b100_1886	<i>htpX</i>	Heat shock induced protease HtpX
xcc-b100_1965	-	putative exported protein
xcc-b100_2397	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_2524	-	PhoH-like protein
xcc-b100_2535	<i>alaS</i>	Alanyl-tRNA synthetase
xcc-b100_2698	-	Putative iron-sulfur cluster assembly accessory protein
xcc-b100_2799	<i>dnaK</i>	DnaK protein
xcc-b100_2801	<i>hrcA</i>	heat-inducible transcriptional repressor
xcc-b100_2875	<i>pcp</i>	Outer membrane lipoprotein
xcc-b100_3035	-	Putative negative regulator of sigma E activity
xcc-b100_3036	<i>rpoE2</i>	RNA polymerase ECF-type sigma factor
xcc-b100_3135	<i>hslR</i>	heat shock protein 15 homolog
xcc-b100_3294	<i>hflK</i>	Putative integral membrane protease subunit HflK

## H Anhang

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_3295	-	Putative two-component system response regulator, PilH family
xcc-b100_3378	<i>lon</i>	Endopeptidase La
xcc-b100_3381	<i>clpP</i>	ATP-dependent Clp protease
xcc-b100_3386	-	Putative glutaredoxin
xcc-b100_3501	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3521	<i>tal</i>	transaldolase
xcc-b100_3524	<i>pms</i>	Protein-methionine-S-oxide reductase
xcc-b100_3576	-	ABC transporter permease, probable
xcc-b100_3693	<i>xpsG</i>	Type II secretory pathway pseudopilin
xcc-b100_3832	-	Putative secreted protein
xcc-b100_3837	<i>msrB</i>	Peptide methionine sulfoxide reductase
xcc-b100_3917	<i>rpoD</i>	RNA polymerase sigma-70 factor
xcc-b100_3918	<i>dtd</i>	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase
xcc-b100_3959	<i>trxA</i>	thioredoxin
xcc-b100_4014	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0405	-	putative exported protein
xcc-b100_0464	<i>pdhA</i>	pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit
xcc-b100_2573	-	hypothetical protein
xcc-b100_3840	<i>motB</i>	Chemotaxis motB protein (Motility protein B).

**Tabelle H. 5:** Cluster F Genliste

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_0007	-	putative exported protein
xcc-b100_0114	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0212	<i>sod</i>	exported superoxide dismutase
xcc-b100_0305	<i>uriC</i>	urate oxidase
xcc-b100_0659	-	hypothetical protein
xcc-b100_1537	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2306	<i>nasA</i>	Nitrate uptake porter
xcc-b100_3235	<i>katE</i>	Catalase
xcc-b100_3868	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3869	-	Putative manganese-containing catalase
xcc-b100_3996	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_4073	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_4110	<i>yjbJ</i>	conserved hypothetical protein
xcc-b100_3870	-	hypothetical protein
xcc-b100_3997	-	Putative membrane protein

**Tabelle H. 6:** Cluster G Genliste

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_0037	<i>gltB</i>	glutamate synthase (NADPH), alpha subunit
xcc-b100_0226	-	putative exported protein
xcc-b100_0294	-	Zinc-containing alcohol dehydrogenase superfamily protein
xcc-b100_0370	<i>ilvD</i>	dihydroxy-acid dehydratase
xcc-b100_0585	-	putative NADH dehydrogenase/NAD(P)H nitroreductase
xcc-b100_0588	-	transcriptional regulator, PadR-like family
xcc-b100_0757	<i>gnd</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase
xcc-b100_0810	-	bifunctional alcohol dehydrogenase
xcc-b100_0829	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0938	-	transcriptional regulator, LysR family
xcc-b100_0994	<i>cysK</i>	Cysteine synthase
xcc-b100_1004	<i>cysJ</i>	NADPH-sulfite reductase flavoprotein subunit
xcc-b100_1114	-	TonB-dependent outer membrane receptor
xcc-b100_1126	<i>metY</i>	homocysteine synthase
xcc-b100_1251	<i>hdsM1</i>	Type I site-specific deoxyribonuclease (modification subunit)
xcc-b100_1298	<i>metB</i>	Cystathionine gamma-synthase
xcc-b100_1357	-	sigma-54 modulation protein
xcc-b100_1394	<i>sufC</i>	ABC transporter ATPase involved in Fe-S cluster assembly
xcc-b100_1395	<i>sufB</i>	ABC transporter-associated protein involved in Fe-S cluster assembly
xcc-b100_1401	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_1457	<i>cheR3</i>	Methylase of chemotaxis methyl-accepting proteins
xcc-b100_1889	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_1939	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2029	-	Two-component system regulatory protein
xcc-b100_2444	-	Putative secreted protein
xcc-b100_2236	<i>fliS</i>	Flagellin-specific chaperone FliS
xcc-b100_2563	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2760	<i>metH</i>	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase (fragment)
xcc-b100_2858	<i>mexE</i>	Membrane fusion protein MexE

## H Anhang

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_2882	-	Putative fumarate hydratase
xcc-b100_2908	<i>asnB</i>	Asparagine synthase B
xcc-b100_2467	-	IS1595 transposase
xcc-b100_3168	<i>xenA</i>	xenobiotic flavin oxidoreductase A
xcc-b100_3205	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_3502	-	Putative membrane protein
xcc-b100_3592	<i>metK</i>	Methionine adenosyltransferase
xcc-b100_3668	-	Putative membrane protein
xcc-b100_3756	<i>uptD</i>	Outer membrane protein UptD
xcc-b100_3763	<i>bioD</i>	Dethiobiotin synthetase
xcc-b100_3772	-	Putative cysteine synthase
xcc-b100_3833	<i>alr</i>	Alanine racemase
xcc-b100_3854	-	Flavodoxin, probable
xcc-b100_4002	<i>rpsU</i>	30S ribosomal protein S21
xcc-b100_4058	-	Putative kinase
xcc-b100_4152	<i>gst7</i>	Putative glutathione transferase
xcc-b100_4168	-	ABC transporter ATP-binding protein
xcc-b100_4276	-	conserved membrane protein
xcc-b100_4293	<i>guaA</i>	Putative GMP synthase
xcc-b100_0427	<i>tbp</i>	exported TonB-dependent transferrin-binding receptor
xcc-b100_0586	-	conserved exported protein
xcc-b100_1238	-	putative secreted protein
xcc-b100_1337	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_2074	-	putative IS1595-like transposase, fragment
xcc-b100_2137	-	hypothetical protein
xcc-b100_2237	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_2274	-	hypothetical protein
xcc-b100_2283	<i>pilF</i>	fimbrial biogenesis protein
xcc-b100_2324	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_2857	<i>acrB</i>	Acriflavin resistance protein, efflux pump
xcc-b100_3107	-	hypothetical protein with glutamine-rich central domain
xcc-b100_3581	-	putative membrane protein, DUF486
xcc-b100_3689	<i>xpsK</i>	General secretion pathway protein K
xcc-b100_3841	-	hypothetical protein

**Tabelle H. 7:** Cluster H Genliste

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_0010	<i>exbD1</i>	macromolecule import protein
xcc-b100_0011	<i>exbD2</i>	macomolecule import protein
xcc-b100_0014	<i>pdxJ</i>	pyridoxal phosphate biosynthetic protein
xcc-b100_0035	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0159	-	exported esterase
xcc-b100_0373	-	putative membrane protein
xcc-b100_0461	<i>pdhC</i>	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase
xcc-b100_0466	<i>tdo</i>	tryptophan 2,3-dioxygenase
xcc-b100_0546	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0630	-	oxidoreductase
xcc-b100_0661	<i>cel</i>	exported cellulose 1,4-beta-cellobiosidase
xcc-b100_0676	<i>sulP</i>	sulfate permease
xcc-b100_0705	<i>codA</i>	cytosine deaminase
xcc-b100_0739	<i>mltB</i>	murein-degrading transglycosylase
xcc-b100_0797	<i>dsbA</i>	exported thiol:disulfide interchange protein
xcc-b100_0800	<i>engB</i>	GTP-binding protein
xcc-b100_0860	<i>raxC</i>	type I secretion system outer membrane protein
xcc-b100_0980	-	Endonuclease S1
xcc-b100_0984	<i>gapA</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
xcc-b100_0990	<i>pykA</i>	pyruvate kinase
xcc-b100_0991	<i>fba</i>	fructose-bisphosphate aldolase
xcc-b100_1096	<i>sucC</i>	Succinyl-CoA synthetase beta subunit
xcc-b100_1180	<i>pal</i>	PAL family outer membrane lipoprotein
xcc-b100_1181	-	Putative secreted protein
xcc-b100_1205	<i>dpsA</i>	DNA-binding related protein
xcc-b100_1281	<i>ampC3</i>	Beta-lactamase
xcc-b100_1286	-	transcriptional regulator, TetR family
xcc-b100_1314	<i>aroB</i>	3-dehydroquinate synthase
xcc-b100_1324	-	hypothetical protein
xcc-b100_1373	-	Putative permease (PerM) family protein
xcc-b100_1407	<i>pilU</i>	Tfp pilus assembly protein ATPase
xcc-b100_1413	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_1416	-	OsmC-like protein

## H Anhang

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_1507	<i>enpP</i>	phosphodiesterase-nucleotide pyrophosphatase
xcc-b100_1584	-	Rhomboid family membrane protein
xcc-b100_1585	-	Metallopeptidase
xcc-b100_1587	-	Metallopeptidase
xcc-b100_1611	<i>aroC</i>	Chorismate synthase
xcc-b100_1622	-	Acetyl-CoA carboxylase beta subunit
xcc-b100_1629	-	Putative membrane protein
xcc-b100_1633	<i>nuoA</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO7 subunit
xcc-b100_1634	<i>nuoB</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO6 subunit
xcc-b100_1653	<i>pnp</i>	polyribonucleotide nucleotidyltransferase
xcc-b100_1721	<i>gumK</i>	glucuronosyltransferase
xcc-b100_1749	<i>ftsY</i>	Cell division protein FtsY
xcc-b100_1786	<i>upp</i>	Uracil phosphoribosyltransferase
xcc-b100_1820	-	metabolite transport protein
xcc-b100_1824	<i>glnA3</i>	Putative glutamine synthase
xcc-b100_1829	<i>potF</i>	ABC transporter putrescine-binding protein
xcc-b100_1852	<i>sspB</i>	Stringent starvation protein B
xcc-b100_1872	<i>md</i>	Ribonuclease D
xcc-b100_1891	<i>capB</i>	major cold shock protein
xcc-b100_1895	<i>apt</i>	Adenine phosphoribosyltransferase
xcc-b100_1952	<i>metX</i>	Homoserine O-acetyltransferase, probable
xcc-b100_1968	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_2016	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_2040	<i>pgl</i>	6-phosphogluconolactonase
xcc-b100_2046	-	Putative succinate dehydrogenase
xcc-b100_2047	-	Putative succinate dehydrogenase membrane anchor subunit
xcc-b100_2048	<i>sdhA</i>	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit
xcc-b100_2050	-	Putative succinate dehydrogenase iron-sulfur protein
xcc-b100_2064	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_2377	-	Putative F pilin acetylation protein
xcc-b100_2337	-	Metallopeptidase
xcc-b100_2270	<i>trxB1</i>	Thioredoxin-disulfide reductase
xcc-b100_2267	<i>infA</i>	initiation factor IF-1
xcc-b100_2265	<i>clpS</i>	ATP-dependent Clp protease adaptor protein ClpS
xcc-b100_2170	<i>tsr</i>	chemotaxis protein
xcc-b100_2142	<i>rpfG</i>	Two-component system response regulator RpfG
xcc-b100_2120	<i>mvaB</i>	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase
xcc-b100_2100	<i>hisA</i>	Phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotid
xcc-b100_2099	<i>hisH</i>	Glutamine amidotransferase
xcc-b100_2096	<i>hisD</i>	Histidinol dehydrogenase
xcc-b100_2090	<i>thrC</i>	Threonine synthase
xcc-b100_2493	<i>panD</i>	Aspartate 1-decarboxylase
xcc-b100_2562	<i>pyrG</i>	CTP synthetase
xcc-b100_2577	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_2665	-	transcriptional regulator, LysR family
xcc-b100_2666	<i>serS</i>	seryl-tRNA synthetase
xcc-b100_2696	<i>rpsR</i>	30S ribosomal protein S18
xcc-b100_2714	<i>ppnK</i>	probable inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase
xcc-b100_2739	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_2785	<i>sucA</i>	oxoglutarate dehydrogenase
xcc-b100_2802	<i>recN</i>	Recombination protein N
xcc-b100_2884	-	Putative ferredoxin-NADP reductase
xcc-b100_2926	<i>frr</i>	ribosome recycling factor
xcc-b100_2939	<i>accA</i>	Acetyl-CoA carboxylase, alpha subunit
xcc-b100_3047	<i>lacZ</i>	exported beta-galactosidase
xcc-b100_3058	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_3157	-	Putative two-component system regulatory protein
xcc-b100_3200	-	Putative secreted protein
xcc-b100_3210	-	Putative membrane protein
xcc-b100_3225	-	Putative peptidyl dipeptidase
xcc-b100_3339	<i>acpP</i>	acyl carrier protein
xcc-b100_3343	<i>rpmF</i>	50S ribosomal protein L32
xcc-b100_3344	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3358	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3377	<i>hupB</i>	histone-like protein
xcc-b100_3438	<i>rpsM</i>	30S ribosomal protein S13
xcc-b100_3440	<i>rplO</i>	50S ribosomal protein L15
xcc-b100_3441	<i>rpmD</i>	50S ribosomal protein L30
xcc-b100_3463	<i>rpsG</i>	30S ribosomal protein S7
xcc-b100_3476	<i>rplY</i>	50S ribosomal protein L25
xcc-b100_3600	-	Putative phosphoenolpyruvate carboxylase
xcc-b100_3637	<i>ftsL</i>	Cell division protein FtsL

## H Anhang

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_3643	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3775	<i>copB</i>	Copper resistance protein B
xcc-b100_3776	<i>gloA</i>	Lactoylglutathione lyase
xcc-b100_3813	-	Outer membrane lipoprotein
xcc-b100_3843	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3893	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_3960	<i>rho</i>	transcription termination factor Rho
xcc-b100_3965	<i>icd</i>	Isocitrate dehydrogenase
xcc-b100_4167	-	Putative phenol hydroxylase component
xcc-b100_4190	<i>fabF</i>	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] synthase II
xcc-b100_4230	<i>rpmB</i>	50S ribosomal protein L28
xcc-b100_0008	<i>tonB</i>	macromolecule import protein
xcc-b100_1130	<i>btuR</i>	cob(II)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase
xcc-b100_1133	<i>cobC</i>	cobalamin biosynthetic protein
xcc-b100_1420	<i>lysC</i>	aspartate kinase / diaminopimelate decarboxylase
xcc-b100_1605	-	Lytic mureine transglycosylase, probable
xcc-b100_1664	<i>oar</i>	oar, putative outer membrane receptor protein, tonB-dependent conserved hypothetical protein, probably polyhydroxyalkanoate synthesis repressor PhaR
xcc-b100_1883	-	
xcc-b100_2166	<i>tsr</i>	Methyl-accepting chemotaxis protein II
xcc-b100_2180	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_2275	-	ATPase
xcc-b100_2661	-	IS1478 transposase
xcc-b100_2931	-	outer membrane protein
xcc-b100_4409	-	Sir2-like protein
xcc-b100_4410	-	hypothetical protein
xcc-b100_4418	<i>recD</i>	exodeoxyribonuclease V alpha chain

**Tabelle H. 8:** Cluster I Genliste

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_0122	-	hypothetical protein
xcc-b100_0150	<i>glgB</i>	1,4-alpha-glucan branching enzyme
xcc-b100_0206	<i>glnB</i>	nitrogen regulatory protein P-II
xcc-b100_0218	-	exported heme biosynthesis enzyme
xcc-b100_0303	-	transthyretin-like protein
xcc-b100_0304	-	oxidoreductase
xcc-b100_0306	-	hypothetical protein
xcc-b100_0308	-	putative serine-pyruvate aminotransferase
xcc-b100_0322	<i>vanB</i>	vanillate monooxygenase reductase subunit
xcc-b100_0417	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0423	<i>sod</i>	exported superoxidase dismutase
xcc-b100_0428	<i>nifS</i>	exported cysteine desulfurase
xcc-b100_0486	-	putative exported protein
xcc-b100_0510	<i>bfr</i>	bacterioferritin
xcc-b100_0683	-	two-component system sensor histidine kinase
xcc-b100_0820	-	hypothetical protein
xcc-b100_0871	<i>trpB</i>	tryptophan synthase beta subunit
xcc-b100_0907	-	putative cytochrome c551
xcc-b100_0964	-	Putative membrane protein
xcc-b100_0937	<i>spoT</i>	guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase
xcc-b100_1108	-	Methyl-accepting chemotaxis protein
xcc-b100_1196	-	Putative GNAT family acetyltransferase
xcc-b100_1200	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_1264	<i>fucA</i>	exported alpha-L-fucosidase
xcc-b100_1265	-	TonB-dependent outer membrane receptor
xcc-b100_1284	<i>fadE</i>	Putative acyl-CoA dehydrogenase
xcc-b100_1367	-	Putative secreted protein
xcc-b100_1404	<i>proC</i>	Pyroline-5-carboxylate reductase, probable
xcc-b100_1436	-	Putative xanthine dehydrogenase molybdenum binding subunit
xcc-b100_1440	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_1443	-	putative phospholipase accessory protein
xcc-b100_1470	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_1480	-	RND superfamily protein
xcc-b100_1485	-	Putative secreted protein
xcc-b100_1490	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_1493	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_1499	<i>cioB</i>	cytochrome D oxidase subunit B
xcc-b100_1529	-	Putative secreted protein
xcc-b100_1532	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_1560	-	extracellular protease
xcc-b100_1625	-	Putative secreted protein

## H Anhang

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_1649	<i>infB</i>	protein chain initiation factor IF-2
xcc-b100_1673	-	Putative type IV pilus assembly protein FimT
xcc-b100_1697	<i>aglA</i>	alpha-glucosidase
xcc-b100_1804	-	RND superfamily protein
xcc-b100_1809	<i>yddQ</i>	conserved hypothetical protein
xcc-b100_1904	-	Putative sensor protein
xcc-b100_1934	<i>argB</i>	Acetylglutamate kinase
xcc-b100_2463	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_2406	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_2338	-	hydroxylase
xcc-b100_2299	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2279	-	transcriptional regulator, TetR family
xcc-b100_2162	-	Methyl-accepting chemotaxis protein
xcc-b100_2158	-	putative exported protein
xcc-b100_2110	-	Putative NUDIX hydrolase family protein
xcc-b100_2101	<i>hisF</i>	Imidazoleglycerol phosphate synthase, cyclase subunit
xcc-b100_2506	-	conserved exported protein
xcc-b100_2606	-	Response regulator
xcc-b100_2808	-	Putative subtilase family serine protease
xcc-b100_2890	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2897	-	Major facilitator superfamily protein
xcc-b100_2899	<i>oprN3</i>	Outer membrane efflux protein
xcc-b100_2900	-	transcriptional regulator, MarR family
xcc-b100_2967	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3013	-	ATP-dependent DNA ligase, probable
xcc-b100_3072	<i>hrcJ</i>	HrcJ protein
xcc-b100_3185	-	Putative Mouse Virulence Factor family protein
xcc-b100_3223	-	Putative membrane protein
xcc-b100_3224	-	Putative membrane-associated hydrolase
xcc-b100_3244	<i>dnaE1</i>	DNA polymerase III alpha chain protein
xcc-b100_3283	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3311	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_3528	-	two-component system regulatory protein
xcc-b100_3684	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3779	-	Putative secreted protein
xcc-b100_3789	-	putative exported protein
xcc-b100_3916	-	hypothetical protein
xcc-b100_3932	-	DNA processing chain A
xcc-b100_3986	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0624	-	hypothetical protein
xcc-b100_4062	<i>blc3</i>	Putative lipocalin
xcc-b100_4063	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_4124	<i>birA</i>	BirA bifunctional protein [Includes: Biotin operon repressor; Biotin--[acetyl-CoA-carboxylase] ligase]
xcc-b100_4127	-	Putative secreted protein
xcc-b100_4146	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_4273	<i>fucP</i>	fucoase permease
xcc-b100_4282	<i>adh</i>	exported alcohol dehydrogenase (acceptor)
xcc-b100_4308	<i>siaE</i>	exported putative sialate O-acetyltransferase
xcc-b100_4310	<i>xylB</i>	exported xylan 1,4-beta-xylosidase / alpha-N-arabinofuranosidase
xcc-b100_4318	-	putative DNA-binding protein
xcc-b100_4339	<i>mecR</i>	trans-2-enoyl-CoA reductase (NADPH)
xcc-b100_4373	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_4423	-	Putative microcystin-dependent protein
xcc-b100_4439	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_4443	-	TonB-dependent outer membrane receptor
xcc-b100_0138	-	putative exported protein
xcc-b100_0161	<i>apeH</i>	exported acylaminoacyl-peptidase
222xcc_050728_3700	-	pseudogene
xcc-b100_0959	<i>moxR</i>	methanol dehydrogenase regulatory protein
xcc-b100_1050	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_1058	-	hypothetical protein
xcc-b100_1128	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_1442	-	Phospholipase A1
xcc-b100_1677	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2190	-	hypothetical protein
xcc-b100_2246	<i>flgF</i>	Flagellar basal-body rod protein flgF
xcc-b100_2454	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_2645	-	putative membrane protein
xcc-b100_2829	-	hypothetical protein
xcc-b100_2837	-	ISxac3 transposase
xcc-b100_2941	-	conserved putative membrane protein

## H Anhang

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_3108	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_3497	-	extracellular protease
xcc-b100_3568	-	hypothetical protein
xcc-b100_3865	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_4218	-	hypothetical protein
xcc-b100_4353	-	putative transposase, fragment

**Tabelle H. 9: Cluster J Genliste**

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_0040	-	methyltransferase
xcc-b100_0217	-	membrane-anchored conserved protein
xcc-b100_0422	-	hypothetical protein
xcc-b100_0431	-	hypothetical protein
xcc-b100_0556	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0637	-	exported aminopeptidase
xcc-b100_0660	<i>egl</i>	cellulase
xcc-b100_0678	<i>fhuE</i>	TonB-dependent outer membrane siderophore receptor
xcc-b100_0743	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_0746	<i>prc</i>	exported C-terminal processing peptidase
xcc-b100_0755	-	putative exported protein
xcc-b100_0812	<i>fghA</i>	S-formylglutathione hydrolase
xcc-b100_0866	<i>leuC</i>	3-isopropylmalate dehydratase, large subunit
xcc-b100_0870	<i>leuA</i>	2-isopropylmalate synthase
xcc-b100_1249	<i>hsdS</i>	type I restriction enzyme (specificity chain) homolog
xcc-b100_1258	<i>ams</i>	exported alpha-mannosidase
xcc-b100_1267	<i>glk</i>	glucokinase
xcc-b100_1307	-	Two-component system sensor histidine kinase-response regulator hybrid protein
xcc-b100_1309	-	Two-component system sensor histidine kinase-response regulator hybrid protein
xcc-b100_1368	-	Putative secreted protein
xcc-b100_1385	-	conserved exported protein
xcc-b100_1387	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_1403	-	Bacterial DNA-binding protein
xcc-b100_1439	-	hypothetical protein
xcc-b100_1462	-	Putative anti-anti-sigma factor
xcc-b100_1639	<i>nuoG</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO3 subunit
xcc-b100_1722	<i>gumL</i>	pyruvyltransferase
xcc-b100_1723	<i>gumM</i>	glucosyltransferase
xcc-b100_1739	-	hypothetical protein
xcc-b100_1791	<i>argD</i>	acetylmithine aminotransferase
xcc-b100_1855	<i>lhr</i>	ATP-dependent DNA helicase Lhr, probable
xcc-b100_1858	<i>cheW2</i>	Chemotaxis signal transduction protein
xcc-b100_1874	-	Type IV secretion system VirJ-like protein
xcc-b100_1933	<i>argE</i>	acetylmithine deacetylase
xcc-b100_1947	<i>cydB</i>	Cytochrome D ubiquinol oxidase, subunit II
xcc-b100_1973	-	Putative secreted protein
xcc-b100_2443	-	Putative membrane protein
xcc-b100_2396	<i>avrBs1</i>	Avirulence protein AvrBs1
xcc-b100_2350	-	TonB-dependent outer membrane receptor
xcc-b100_2276	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2273	<i>lolA</i>	Outer membrane lipoprotein-sorting protein LolA
xcc-b100_2210	<i>fliR</i>	Flagellar biosynthesis pathway component FliR
xcc-b100_2193	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_2156	<i>cheR2</i>	Methylase of chemotaxis methyl-accepting proteins
xcc-b100_2144	<i>rpfC</i>	Sensory/regulatory protein RpfC
xcc-b100_2127	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_2483	<i>ispG</i>	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase
xcc-b100_2845	-	hypothetical protein
xcc-b100_2670	<i>pheA</i>	P-protein, probable
xcc-b100_2672	-	Putative oxidoreductase
xcc-b100_2673	-	Putative YedZ family protein
xcc-b100_2676	-	Putative poly(hydroxyalcanoate) granule associated protein
xcc-b100_2716	-	ABC transporter ATP-binding protein (fragment)
xcc-b100_2862	-	OmpA family outer membrane lipoprotein
xcc-b100_2866	<i>asnB2</i>	Asparagine synthase, probable
xcc-b100_3052	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3088	<i>hrpF</i>	HrpF protein
xcc-b100_3179	<i>cyoB</i>	Cytochrome O ubiquinol oxidase subunit I
xcc-b100_3264	-	Conserved hypothetical protein

## H Anhang

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_3277	<i>hsdR2</i>	Type I site-specific deoxyribonuclease (restriction subunit)
xcc-b100_3286	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3415	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3450	<i>rpsQ</i>	30S ribosomal protein S17
		Riboflavin biosynthesis protein RibD (Diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase/5-amino-6-[5-phosphoribosylamino]uracil reductase)
xcc-b100_3664	<i>ribD</i>	
xcc-b100_3690	<i>xpsJ</i>	General secretion pathway protein J
xcc-b100_3704	-	Predicted YjgP/YjgQ family permease
xcc-b100_3777	-	Putative secreted protein
xcc-b100_3784	-	ABC transporter permease
xcc-b100_3839	<i>motA2</i>	Flagellar motor component MotA
xcc-b100_3859	-	Putative membrane protein
xcc-b100_3953	<i>rpoH</i>	RNA polymerase sigma-32 factor
xcc-b100_3991	<i>tcbD</i>	Putative chloromuconate cycloisomerase
xcc-b100_4262	-	Two-component system response regulator, LuxR family
xcc-b100_0770	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_0906	<i>lao</i>	L-amino-acid oxidase
xcc-b100_1069	<i>mobL</i>	Conjugal transfer protein traA.
xcc-b100_1862	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2372	<i>tsr</i>	tsr, chemotaxis protein
xcc-b100_2375	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_2400	<i>yeeA</i>	Site-specific DNA-methyltransferase (adenine-specific)
xcc-b100_2435	<i>pcrA</i>	DNA helicase II
xcc-b100_2481	<i>proP</i>	osmo-regulated MFS family proline/glycine-betaine transporter
xcc-b100_2638	-	hypothetical protein
xcc-b100_2655	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2694	-	predicted hydrolase
xcc-b100_2706	-	putative membrane protein
xcc-b100_2820	-	hypothetical protein
xcc-b100_2845	-	hypothetical protein
xcc-b100_3126	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_3582	-	putative exported protein
xcc_try_5089	-	-
xcc-b100_3742	<i>wxcO</i>	integral membrane protein
xcc-b100_4292	-	hypothetical protein
xcc-b100_4417	-	hypothetical protein

**Tabelle H. 10:** Cluster K Genliste

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_0148	-	putative alpha-amylase
xcc-b100_0158	<i>fdh</i>	exported D-threo-aldose 1-dehydrogenase
xcc-b100_0323	<i>vanA</i>	vanillate monooxygenase oxygenase subunit
xcc-b100_0386	<i>glpD</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase
xcc-b100_0879	<i>thiC</i>	thiamine biosynthesis protein
xcc-b100_0971	-	Putative secreted protein
xcc-b100_0992	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_1112	<i>cga</i>	glucan 1,4-alpha-glucosidase
xcc-b100_1300	-	exported alpha/beta hydrolase
xcc-b100_1496	<i>yrhE</i>	formate dehydrogenase related protein
xcc-b100_1497	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_1531	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_1870	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2291	-	conserved hypothetical protein
		putative NADPH-dependent FMN reductase / NADPH:quinone oxidoreductase
xcc-b100_2865	-	
xcc-b100_3248	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3498	-	Extracellular protease
xcc-b100_3573	-	Two-component system regulatory protein
xcc-b100_3802	-	Putative secreted protein
xcc-b100_4077	-	hypothetical protein
xcc-b100_4078	-	hypothetical protein
xcc-b100_4245	-	membrane protein
xcc-b100_4265	-	hypothetical protein
xcc-b100_4437	-	Putative oxidoreductase
xcc-b100_0483	-	putative lytic enzyme
xcc_try_4944	-	-
xcc-b100_0881	-	TonB-dependent outer membrane receptor
xcc-b100_1682	<i>virB1</i>	type IV secretion system protein VirB1
xcc-b100_2152	<i>pcaD</i>	beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase
xcc-b100_2347	-	hypothetical protein

## H Anhang

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_3828	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_3966	-	putative exported protein
xcc-b100_3994	-	putative membrane protein

**Tabelle H. 11:** Cluster L Genliste

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_0028	-	putative exported peptidase
xcc-b100_0090	-	putative thioredoxin
xcc-b100_0115	<i>dnl</i>	DNA ligase (ATP)
xcc-b100_0149	<i>treS</i>	maltose alpha-D-glucosyltransferase
xcc-b100_0191	-	putative auxin efflux membrane protein
xcc-b100_0227	<i>poxB</i>	pyruvate dehydrogenase (cytochrome)
xcc-b100_0242	-	putative exported peptide
xcc-b100_0299	-	conserved small membrane protein
xcc-b100_0384	<i>glpK</i>	glycerol kinase
xcc-b100_0440	<i>glgA</i>	glycogen synthase
xcc-b100_0442	<i>glgZ</i>	4-alpha-D-((1->4)-alpha-D-glucano)trehalose trehalohydrolase
xcc-b100_0446	<i>glgX</i>	glycogen debranching enzyme
xcc-b100_0474	-	putative exported lectin/glucanase
xcc-b100_0484	-	putative exported protein
xcc-b100_0485	-	hypothetical protein
xcc-b100_0759	-	putative exported protein
xcc-b100_0789	<i>fpvA</i>	TonB-dependent outer membrane ferripyoverdine receptor
xcc-b100_0816	-	hypothetical protein
xcc-b100_1022	<i>mscL</i>	large-conductance mechanosensitive channel
xcc-b100_1078	<i>glgX</i>	glycogen debranching enzyme
xcc-b100_1113	<i>otsB</i>	trehalose-phosphatase
xcc-b100_1188	<i>exsG</i>	Two-component system sensor protein, probable
xcc-b100_1190	-	Putative secreted lipase
xcc-b100_1336	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_1434	-	Putative xanthine dehydrogenase iron-sulfur binding subunit
xcc-b100_1435	-	Putative xanthine dehydrogenase FAD binding subunit
xcc-b100_1551	-	Putative outer membrane protein
xcc-b100_1702	<i>cgt</i>	cyclomaltodextrin glucanotransferase
xcc-b100_1744	-	Sensory box histidine kinase/response regulator
xcc-b100_1817	-	Putative formate dehydrogenase-associated protein
xcc-b100_1818	-	Putative oxidoreductase
xcc-b100_1830	-	Membrane fusion protein
xcc-b100_1914	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_1916	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_1946	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_1992	<i>galU</i>	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase
xcc-b100_2382	-	Putative membrane protein
xcc-b100_2362	-	hypothetical protein
xcc-b100_2333	-	Putative membrane protein
xcc-b100_2320	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_2314	-	NAD dependent epimerase/dehydratase
xcc-b100_2298	<i>xthA1</i>	Exodeoxyribonuclease III
xcc-b100_2297	-	Putative lipoprotein
xcc-b100_2294	-	Putative secreted protein
xcc-b100_2218	<i>fliK</i>	Flagellar hook-length control protein FliK
xcc-b100_2148	<i>rfpA</i>	aconitase
xcc-b100_2667	<i>tonB3</i>	TonB-like protein
xcc-b100_2685	<i>gcd</i>	quinoprotein glucose dehydrogenase
xcc-b100_2766	-	hypothetical protein
xcc-b100_2795	-	hypothetical protein
xcc-b100_2959	-	Putative phosphatase
xcc-b100_2989	-	Cation diffusion facilitator family protein
xcc-b100_3253	-	Putative xanthine dehydrogenase, FAD-binding subunit
xcc-b100_3522	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3873	-	Putative two-component system response regulator
xcc-b100_3876	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3883	-	glycosyltransferase
xcc-b100_3967	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_3982	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_4079	-	Putative secreted protein
xcc-b100_4088	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_4089	-	putative membrane protein
xcc-b100_4090	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_4095	-	Putative cytochrome B561
xcc-b100_4192	-	glycosyltransferase

## H Anhang

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_4386	-	Metabolite:H+ symporter family protein
xcc_try_4918	-	-
xcc-b100_0734	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_1074	-	hypothetical protein
xcc-b100_2319	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2782	-	conserved hypothetical protein

**Tabelle H. 12:** Cluster N Genliste

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_0006	-	putative exported peptidase/protease
xcc-b100_0029	<i>egl</i>	exported cellulase
xcc-b100_0101	-	putative modulator of DNA gyrase
xcc-b100_0110	<i>aldA</i>	aldehyde dehydrogenase (NAD(+))
xcc-b100_0205	<i>glnA</i>	glutamate-ammonia ligase
xcc-b100_0296	-	exported methyltransferase
xcc-b100_0325	<i>tatD</i>	deoxyribonuclease
xcc-b100_0498	-	flavodoxin family enzyme
xcc-b100_0792	-	TonB-dependent outer membrane receptor
xcc-b100_0996	<i>cysB</i>	transcriptional regulator, LysR family
xcc-b100_1014	-	Putative secreted protein
xcc-b100_1015	-	Putative O-Glycosyl hydrolase
xcc-b100_1165	-	Putative secreted protein
xcc-b100_1229	<i>pilG</i>	Type IV pilus response regulator PilG
xcc-b100_1245	<i>rebB</i>	RebB protein
xcc-b100_1260	-	exported beta-glucosidase
xcc-b100_1280	-	Hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_1349	-	Putative phospholipase/carboxylesterase family protein
xcc-b100_1360	-	putative exported protein
xcc-b100_1360	-	putative exported protein
xcc-b100_1389	-	TonB-dependent outer membrane receptor
xcc-b100_1452	<i>gpm</i>	phosphoglycerate mutase
xcc-b100_1475	<i>gluS</i>	Glutamyl-tRNA synthetase
xcc-b100_1582	-	Putative glutathione reductase
xcc-b100_1589	-	TonB-dependent outer membrane receptor
xcc-b100_1619	<i>trpB</i>	Tryptophan synthase, beta chain
xcc-b100_1640	<i>nuoH</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO8 subunit
xcc-b100_1641	<i>nuoI</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO9 subunit
xcc-b100_1645	<i>nuoM</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO13 subunit
xcc-b100_1646	<i>nuoN</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO14 subunit
xcc-b100_1704	<i>thrS</i>	threonyl-tRNA synthetase
xcc-b100_1735	-	Putative secreted protein
xcc-b100_1768	-	Putative xylosidase
xcc-b100_1781	<i>coaD</i>	Pantetheine-phosphate adenyltransferase
xcc-b100_1782	-	Putative secreted protein
xcc-b100_1795	<i>yajC</i>	Preprotein translocase subunit YajC
xcc-b100_1807	-	NAD-specific glutamate dehydrogenase
xcc-b100_1808	-	transcriptional regulator, AraC family
xcc-b100_1837	<i>corA</i>	Magnesium and cobalt transport protein
xcc-b100_1849	<i>petB</i>	Ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome b subunit
xcc-b100_1869	<i>hns1</i>	Histone-like nucleoid-structuring protein
xcc-b100_1937	<i>argH</i>	Argininosuccinate lyase
xcc-b100_1948	<i>cydA</i>	Cytochrome D ubiquinol oxidase, subunit II
xcc-b100_1974	<i>malE</i>	periplasmic binding protein precursor of a sugar import ABC transporter
xcc-b100_1976	<i>malG</i>	permease component of a sugar import ABC transporter
xcc-b100_1983	-	Putative membrane protein
xcc-b100_1988	-	putative membrane protein
xcc-b100_2011	<i>mntR</i>	Manganese-dependent transcriptional regulator, MarR family
xcc-b100_2039	<i>edd</i>	phosphogluconate dehydratase
xcc-b100_2058	<i>exbB</i>	biopolymer transport protein
xcc-b100_2059	<i>exbD</i>	biopolymer transport protein
xcc-b100_2060	<i>msbA</i>	lipid A ABC exporter
xcc-b100_2341	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2249	<i>flgC</i>	Flagellar basal body rod protein
xcc-b100_2245	<i>flgG</i>	Flagella basal body rod protein
xcc-b100_2244	<i>flgH</i>	Flagellar basal body L-ring protein
xcc-b100_2242	<i>flgJ</i>	Muramidase (flagellum-specific)
xcc-b100_2232	<i>rpoN</i>	RNA polymerase sigma-54 factor
xcc-b100_2231	-	putative response regulator
xcc-b100_2229	-	putative NDP-sugar aminotransferase
xcc-b100_2228	-	ATP-binding putative carboxyltransferase

## H Anhang

GenDB-Ident.Nr.	Genname	Genprodukt (in englischer Sprache)
xcc-b100_2223	<i>fliF</i>	Flagellar biosynthesis lipoprotein FliF
xcc-b100_2219	<i>fliJ</i>	Flagellar biosynthesis chaperone FliJ, probable
xcc-b100_2215	<i>fliN</i>	Flagellar motor switch/type III secretory pathway protein FliN
xcc-b100_2202	<i>fleN</i>	Flagellar synthesis regulator FleN
xcc-b100_2181	-	TonB-dependent outer membrane receptor
xcc-b100_2175	-	Putative anti-sigma factor antagonist
xcc-b100_2146	<i>rpfB</i>	long-chain-fatty-acid-CoA ligase
xcc-b100_2118	<i>efP1</i>	Elongation factor P
xcc-b100_2097	<i>hisC2</i>	Histidinol-phosphate aminotransferase, probable
xcc-b100_2777	-	Putative secreted protein
xcc-b100_2787	<i>lpd</i>	dihydrolipoyl dehydrogenase
xcc-b100_2789	-	Conserved hypothetical protein
xcc-b100_2886	<i>dcp</i>	Peptidyl-dipeptidase, probable
xcc-b100_2923	<i>tsf</i>	elongation factor Ts
xcc-b100_2957	<i>btuB</i>	TonB-dependent receptor
xcc-b100_3017	<i>scoF</i>	cold shock protein
xcc-b100_3038	<i>czcD</i>	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein
xcc-b100_3077	<i>hpaC</i>	HpaC protein
xcc-b100_3242	-	Oligopeptide transporter family protein
xcc-b100_3313	-	Putative citrate synthase
xcc-b100_3334	-	Tfp pilus assembly protein, probable
xcc-b100_3338	<i>fabF</i>	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] synthase II
xcc-b100_3406	<i>phlN1</i>	Phospholipase C
xcc-b100_3435	<i>rpoA</i>	DNA directed RNA polymerase (alpha subunit)
xcc-b100_3436	<i>rpsD</i>	30S ribosomal protein S4
xcc-b100_3448	<i>rplX</i>	50S ribosomal protein L24
xcc-b100_3468	<i>rplJ</i>	50S ribosomal protein L10
xcc-b100_3480	-	Putative secreted protein
xcc-b100_3517	<i>ahpC</i>	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C
xcc-b100_3627	<i>ftsA</i>	Cell division protein FtsA
xcc-b100_3685	<i>xpsD</i>	Type II secretory pathway component
xcc-b100_3715	-	Putative secreted protein
xcc-b100_3780	-	hypothetical protein
xcc-b100_3800	<i>atpB</i>	ATP synthase A chain
xcc-b100_3874	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_3931	-	Putative secreted protein
xcc-b100_4015	-	Cytochrome c oxidase, subunit III
xcc-b100_4066	-	Putative linoleoyl-CoA desaturase
xcc-b100_4093	<i>pepA2</i>	Putative leucine aminopeptidase
xcc-b100_4115	-	Putative secreted protein
xcc-b100_4134	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_4305	<i>xyIA</i>	xylose isomerase
xcc-b100_4314	-	putative restriction endonuclease
xcc-b100_4344	-	TonB-dependent outer membrane receptor (C-terminal fragment)
xcc-b100_0019	<i>fadL</i>	outer membrane fatty acid porin
xcc-b100_0140	-	hypothetical protein
xcc-b100_0175	<i>fpvA</i>	TonB-dependent ferripyoverdine receptor precursor
xcc-b100_0251	-	hypothetical protein
xcc-b100_1185	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_1427	-	Outer membrane protein ompV precursor
xcc-b100_1463	<i>mfd</i>	Transcription-repair coupling factor (TRCF).
xcc-b100_1644	<i>nuoL</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase NQO12 subunit
xcc-b100_1681	-	VirB11 protein.
xcc-b100_1797	<i>secF</i>	Protein-export membrane protein subunit
xcc-b100_2201	<i>fliA</i>	RNA polymerase sigma factor rpoD (Sigma-70).
xcc-b100_2213	<i>fliP</i>	Flagellar biosynthetic protein fliP.
xcc-b100_2384	<i>rne</i>	ribonuclease E
xcc-b100_2469	-	conserved hypothetical protein
xcc-b100_2752	-	hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica
xcc-b100_2955	-	Hypothetical protein yaeR.
xcc-b100_4461	-	hypothetical protein

## **H.2 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich Prof. Dr. Alfred Pühler dafür danken, dass ich diese Arbeit am Lehrstuhl für Genetik durchführen konnte.

Ganz besonders danke ich Prof. Dr. Anke Becker für die wissenschaftliche Betreuung und dafür, dass sie mir dieses interessante Thema überlassen hat. Ihr persönlichen Einsatz und die ständige Diskussionsbereitschaft haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Dr. Frank-Jörg Vorhölter danke ich für die Zusammenarbeit bei der Analyse der Galactoseverwertung.

Den Kooperationspartnern des BmBF-Projektes „Entwicklung von Verfahren zur Herstellung mikrobieller Exopolysaccharide als wasserlösliche Verdicker auf Basis nachwachsender Rohstoffe“ danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dr. Christelle Bahlawane, Dr. Birgit Baumgarth, Sabrina Klein, Dr. Elizaveta Krol, Dr. Matthew McIntosh, Manuela Meyer, Stefan Meyer, Thomas Montforts, Ioulia Nikolaidis, Dr. Nataliya Pobigaylo, Jan-Phillip Schlüter, Eva Schulte-Berndt und Anika Tauchen möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit danken und dass sie mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Mein besonderer Dank gilt Dr. Birgit Baumgarth für ihre freundschaftliche und hilfreiche Unterstützung. Eva-Schulte Berndt und Manuela Meyer danke ich für die technische Unterstützung.

Nicht zuletzt gilt mein großer Dank meiner Familie, die mich in jeder Hinsicht unterstützt hat.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig unter Verwendung der beschriebenen Methoden angefertigt habe.

Bielefeld, 15.07.2008

Javier Serrania Vallejo