

**Analyse der Genregulation des
Kohlenhydratstoffwechsels 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
Thomas Christian Montforts
aus Bad Homburg v.d.H.

April 2009

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| A | Zusammenfassung..... | 1 |
| B | Einleitung..... | 3 |
| B.1 | Das Bodenbakterium <i>Xanthomonas campestris</i> pathovar <i>campestris</i> | 3 |
| B.2 | Die Oberflächenpolysaccharide LPS und EPS und ihre genetische Regulation in <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> | 8 |
| B.3 | Familie der bakteriellen transkriptionellen Regulatoren einschließlich der LacI-Regulatoren..... | 12 |
| B.4 | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> B100 Genomprojekt..... | 14 |
| B.4.1 | Kohlenhydrataufnahme und Zentralstoffwechselwege in Xcc B100 | 15 |
| B.4.2 | Überrepräsentation an TonB-abhängigen Rezeptoren (TBDR)..... | 17 |
| B.4.3 | Sekretionssysteme in <i>Xanthomonas</i> | 18 |
| B.5 | Transkriptomische Analyse mittels Microarray Technologie..... | 19 |
| B.6 | Zielsetzung dieser Arbeit..... | 21 |
| C | Material und Methoden..... | 22 |
| C.1 | Material..... | 22 |
| C.1.1 | Bakterienstämme, Plasmide, Oligonukleotide, Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Enzyme und Software..... | 22 |
| C.1.2 | Nährmedien und Zusätze | 29 |
| C.1.3 | Lösungen und Puffer..... | 32 |
| C.2 | Methoden..... | 34 |
| C.2.1 | Bakterienkultivierung und –anzucht..... | 34 |
| C.2.1.1 | Bakterienkonservierung in einer Glycerinkultur..... | 34 |
| C.2.1.2 | Bakterienanzucht im Flüssigmedium..... | 35 |
| C.2.2 | Konstruktion der markerfreien Deletionsmutanten mittels „gene-SOEing“ und Plasmidintegrationsmutagenese | 34 |
| C.2.2.1 | „gene SOEing“ zur markerfreien Deletion | 35 |
| C.2.2.2 | Plasmidintegrationsmutagenese..... | 37 |
| C.2.2.3 | Polymerasenkettenreaktion (PCR)..... | 37 |
| C.2.2.4 | Isolierung von Plasmid-DNA..... | 38 |
| C.2.2.5 | Quantifizierung und Lagerung der Plasmid-DNA..... | 39 |
| C.2.2.6 | Reinigung von PCR-Produkten..... | 40 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| C.2.2.7 | Nachweis der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese..... | 40 |
| C.2.2.8 | Restriktionsspaltung von DNA..... | 41 |
| C.2.2.9 | Ligation von DNA-Fragmenten..... | 42 |
| C.2.2.10 | Transformation..... | 43 |
| C.2.2.11 | Überprüfung der eingebrachten Mutationen..... | 43 |
| C.2.2.12 | Konjugation..... | 44 |
| C.2.2.13 | Selektion auf homologe Rekombinationsereignisse..... | 44 |
| C.2.3 | Xanthan-Quantifizierung über Monosaccharid-Bestimmung..... | 45 |
| C.2.4 | Microarray-Technologie..... | 46 |
| C.2.4.1 | RNA-Isolierung..... | 46 |
| C.2.4.2 | Microcon-Aufreinigung..... | 48 |
| C.2.4.3 | Reverse Transkription der RNA..... | 48 |
| C.2.4.4 | Kopplung der Proben mit Fluoreszenzfarbstoffen..... | 49 |
| C.2.4.5 | Prozessierung der Nexterion-Microarrays und Datenanalyse..... | 50 |
| C.2.5 | Motilitätstest mit Bromfeldplatten | 52 |
| C.2.6 | Biofilm-Test..... | 52 |
| C.2.7 | Kohlenstoffverwertungs-Test mit dem „Phenotype Microarray“..... | 53 |
| C.2.8 | Bioreaktor-Inokulation und Kultivierung | 54 |
| D | Ergebnisse..... | 56 |
| D.1 | Diskontinuierliche batch-Bioreaktor Kultivierung von Xcc in 13 l Kulturvolumen..... | 56 |
| D.1.1 | Probenentnahme und Wachstumsparamter erstes biologisches Replikat | 56 |
| D.1.1.2 | Probenentnahme und Wachstumsparamter zweites biologisches Replikat | 58 |
| D.1.1.3 | Probenentnahme und Wachstumsparamter drittes biologisches Replikat | 60 |
| D.1.2 | Transkriptomische Analyse der Kultivierungen mittels Microarray-Technologie..... | 62 |
| D.1.2.1 | Überprüfung der Microarray-Experimente durch „Yellow-Experimente“ und „Virtual-Slides“..... | 62 |
| D.1.2.2 | Vergleich der Experimentkanäle und Referenzkanäle der drei biologischen Replikate zum Zeitpunkt t2h | 63 |
| D.1.2.3 | Betrachtung eines Zeitpunktes zum vorherigen Zeitpunkt (Referenzdesign versus Loopdesign)..... | 64 |
| D.1.2.4 | Betrachtung der Experimentkanäle aller drei biologischen Replikate zu | |

| | |
|---|-----------|
| ein und demselben Referenzkanal..... | 66 |
| D.1.2.5 fdr-Test für alle Arrays eines Zeitpunktes der drei biologischen Replikate (Ein EMMA Experiment)..... | 66 |
| D.1.2.6 Principal Component Analyse (PCA) der Experimente | 67 |
| D.1.2.7 Hierarchisches Clustering (HCL) der Experimente..... | 69 |
| D.1.2.8 Gesamtzahl an detektierten differentiell exprimierten Genen in den drei biologischen Replikaten | 70 |
| D.1.2.9 Vergleich der statistisch signifikant detektierten differentiell exprimierten Genen zu bestimmten Zeitpunkten aller drei biologischer Replikate..... | 72 |
| D.1.2.10 „Clusters of Orthologous Groups“ der statistisch signifikant differentiell exprimierten Genen zu bestimmten Zeitpunkten der Kultivierungen..... | 74 |
| D.1.2.11 Darstellung des Transkriptomprofils durch Auftragung des M-Werts der Gene gegen ihre Position im Genom | 78 |
| D.1.2.12 Auffällige Genexpressionsprofile in den drei Kultivierungen und deren heatmaps..... | 80 |
| D.1.2.12.1 Einige Gene der Oxidativen Phosphorylierung (<i>nuo</i> -Gene)..... | 80 |
| D.1.2.12.2 Schwefelmetabolismus und Biosynthese der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein..... | 81 |
| D.1.2.12.3 Radical Oxygen Stress Response (ROS)..... | 83 |
| D.1.2.12.4 Einige für die Eisen-Aufnahme-Proteine kodierende Gene..... | 84 |
| D.1.2.12.5 Gene des <i>gum</i> -Clusters..... | 85 |
| D.1.2.13 „k-means-clustering“ und Einteilung in COG-Klassen | 86 |
| D.1.2.13.1 Erstes biologisches Replikat | 86 |
| D.1.2.13.2 Zweites biologisches Replikat | 87 |
| D.1.2.13.3 Drittes biologisches Replikat | 89 |
| D.2 Analyse der Genregulation des Kohlenhydratmetabolismus mittels Mutationsanalyse | 90 |
| D.2.1 Auswahl der Gene zur Mutagenese..... | 90 |
| D.2.2 Wachstum der Mutanten in Schüttelkulturen (Minimal- und Vollmedium).... | 92 |
| D.2.3 Überprüfung der Plasmidintegrations-Stabilität..... | 94 |

| | | |
|---------|---|-----|
| D.2.4 | Xanthan-Quantifizierung über Monosaccharid-Bestimmung im Überstand..... | 95 |
| D.2.5 | Xcc B100 Profil der Kohlenstoffverwertung | 97 |
| D.2.6 | Charakterisierung der Mutante XccB100Δxcc-b100_4306 | 101 |
| D.2.6.1 | Transkriptomische Charakterisierung der Mutante XccB100Δxcc-b100_4306 in M9-Minimalmedium..... | 101 |
| D.2.6.2 | Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100Δxcc-b100_4306..... | 103 |
| D.2.6.3 | Transkriptomische Charakterisierung der Mutante XccB100Δxcc-b100_4306 in Xylose-haltigem M9-Minimalmedium..... | 104 |
| D.2.6.4 | Untersuchung der Mutante XccB100Δxcc-b100_4306 zur Fähigkeit der Biofilm-Produktion..... | 107 |
| D.2.7 | Charakterisierung der Mutante XccB100Δxcc-b100_0785..... | 108 |
| D.2.7.1 | Transkriptomische Charakterisierung der Mutante XccB100Δxcc-b100_0785 in M9-Minimalmedium..... | 108 |
| D.2.7.2 | Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100Δxcc-b100_0785..... | 110 |
| D.2.8 | Charakterisierung der Mutante XccB100Δ <i>rpoN</i> 2..... | 111 |
| D.2.8.1 | Transkriptomische Charakterisierung der Mutante XccB100Δ <i>rpoN</i> 2 in M9-Minimalmedium..... | 111 |
| D.2.8.2 | Kohlenstoffverwertung der Mutante..... | 114 |
| D.2.8.3 | Kohlenstoffverwertung der Doppelmutante <i>rpoN</i> | 114 |
| D.2.8.4 | Motilitätstests der Mutanten <i>rpoN</i> | 116 |
| D.2.9 | Charakterisierung der Mutante XccB100Δxcc-b100_1019..... | 117 |
| D.2.8.1 | Transkriptomische Charakterisierung der Mutante XccB100Δxcc-b100_1019 in M9-Minimalmedium..... | 118 |
| D.2.8.2 | Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100Δxcc-b100_1019..... | 120 |
| D.2.9 | Charakterisierung der Mutante XccB100Δxcc-b100_0167..... | 120 |
| D.2.9.1 | Transkriptomische Charakterisierung der Mutante XccB100Δxcc-b100_0167 in M9-Minimalmedium..... | 121 |
| D.2.8.2 | Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100Δxcc-b100_0167..... | 123 |
| D.2.11 | Charakterisierung der Mutante XccB100::pK19Ωxcc-b100_2513..... | 124 |
| D.2.12 | Charakterisierung der Mutante XccB100Δxcc-b100_1703..... | 125 |

| | | |
|----------|--|------------|
| D.2.13 | Charakterisierung der Mutante XccB100Δxcc-b100_1971..... | 126 |
| D.2.14 | Charakterisierung der Mutante XccB100Δ <i>suxR</i> | 127 |
| D.2.15 | Charakterisierung der Mutante XccB100::pK19Ω <i>ihfA</i> | 128 |
| D.2.16 | Charakterisierung der Mutante XccB100::pK19Ωxcc-b100_1711..... | 129 |
| D.2.17 | Charakterisierung der Mutante XccB100Δxcc-b100_1803..... | 130 |
| D.2.18 | Charakterisierung der Mutante XccB100Δ <i>rbsR</i> | 131 |
| E | Diskussion..... | 133 |
| E.1 | Genomweites Transkriptionsprofil der diskontinuierlichen batch-Bioreaktor Kultivierung von Xcc..... | 133 |
| E.1.1 | Expression der Gene für die Sauerstoff-Radikal-Detoxifikation..... | 135 |
| E.1.2 | Expression der ribosomalen Gene..... | 136 |
| E.1.3 | Expression der <i>gum</i> -Gene..... | 137 |
| E.1.4 | Gene der Aminosäure-Biosynthese und des Schwefelmetabolismus..... | 137 |
| E.1.5 | Regulatorische Netzwerke..... | 138 |
| E.2 | Charakterisierung der generierten Mutanten und Kohlenstoffverwertung des Wildtyps | 142 |
| E.2.1 | Wildtyp Xcc B100 Kohlenstoffverwertungs-Profil..... | 142 |
| E.2.2 | Deletionsmutante XccB100Δxcc-b100_4306..... | 145 |
| E.2.3 | Mutante XccB100::pK19Ωxcc-b100_2513..... | 148 |
| E.2.4 | Mutante XccB100::pK19Ω <i>rpoN1</i> und Mutante XccB100Δ <i>rpoN2</i> | 150 |
| E.2.5 | Deletionsmutante XccB100Δxcc-b100_0167..... | 151 |
| E.2.6 | Deletionsmutante XccB100Δxcc-b100_1703 | 152 |
| E.3 | Ausblick..... | 152 |
| F | Abkürzungsverzeichnis | 154 |
| G | Literaturverzeichnis | 157 |
| H | Danksagung..... | 169 |
| I | Anhang..... | 170 |
| I.1 | Eidesstattliche Erklärung | 170 |
| I.2 | CD-Inhalt..... | 170 |

Zusammenfassung A

Die Infektion von Kreuzblütengewächsen durch das pflanzenpathogene Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* stellt ein erhebliches Problem in der Landwirtschaft dar, das zu hohen Ernteverlusten führt. Auf der anderen Seite hat *Xanthomonas* große wirtschaftliche Bedeutung für die biotechnische Produktion seines Oberflächenpolysaccharids Xanthan im industriellen Maßstab. Xanthan ist eines der wichtigsten industriell hergestellten Polysaccharide, das Anwendungen in der Lebensmittel-, Kosmetik- und Ölindustrie findet.

In dieser Arbeit wurde die Genregulation der Biosynthese des Kohlenhydratmetabolismus von *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* untersucht. Dazu wurden Kultivierungen, die den industriellen Produktionsverfahren ähnlich sind, in drei biologischen Replikaten in Bioreaktoren durchgeführt. Mittels Microarray-Technologie wurde dabei ein globales Transkriptionsprofil erstellt, wobei mehrere Genregionen identifiziert werden konnten, die eine koordinierte Expression zeigten. Als prominenteste Regionen konnten Gene aufgeklärt werden, die für die Eisenaufnahme verantwortliche Proteine, ROS-Detoxifikationsenzyme und der oxidativen Phosphorylierung kodieren. Zudem wurden zu den charakteristischen Phasen einer diskontinuierlichen „batch“-Kultivierung Stoffwechsel-Antworten auf transkriptomischer Basis aufgefunden. So kommt es in der lag-Phase zu einer starken Induktion solcher Gene, die ribosomale Proteine kodieren, in der exponentiellen Phase zu einer indifferenten Genexpression, die als „steady-state“ interpretiert wird. In der stationären Phase, die mit einer vermehrten Ausscheidung des Polysaccharids Xanthan einhergeht, fand eine generelle Reprimierung sämtlicher Gene statt, die den zellulären Stoffwechsel kennzeichnen. Auf der Basis der Transkriptomdaten wurde mittels „Reverse Engineering“ ein Netzwerk der Genregulation der *gum*-Gene aufgestellt. Dabei wurde für die Regulation einzelner Gene die kontinuierliche Veränderung ihrer Expression einschließlich des Levels ihrer Expression berücksichtigt.

Des Weiteren wurden Mutanten in potentiellen Regulatoren des Kohlenhydratmetabolismus kodierenden Genen konstruiert, mittels Microarray-Experimenten untersucht und in einem Kohlenhydratverwertungs-Assay der Phänotyp charakterisiert. Es konnten Mutanten hergestellt werden, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Xanthan-Produktion

aufweisen. Die Mutante XccB100 Δ xcc-b100_4306 mit der höchsten Steigerung an Xanthanproduktion zeigt eine Exopolysaccharid, Exoenzym und Chemotaxis koregulierte Expression der kodierenden Gene.

Zusätzlich zu diesen Studien wurde das Wachstum des Wildtyps *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B 100 auf 95 verschiedenen Kohlenstoffquellen getestet und anhand des annotierten Genoms ein Modell der Verwertungsmaschinerie für die unterschiedlichen Kohlenstoffquellen entworfen.

Einleitung *B*

B.1 Das Bodenbakterium *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*

Xanthomonas campestris pathovar *campestris* (Xcc) zählt zu den γ -Proteobakterien und innerhalb dieser zu der Familie der *Pseudomonaceae* (Vorhölter et al., 2008). Die Gattung *Xanthomonas* gliedert sich in 20 Arten, darunter zum Beispiel *Xanthomonas oryzae* und *Xanthomonas axonopodis*. Das pflanzenpathogene Bakterium *Xanthomonas campestris* wurde in bislang 141 Pathovaren unterteilt (He und Zhang, 2008), wobei sich diese Unterteilung nach ihrer Wirtsspezifität richtet. Xanthomonaden sind Gram-negative Stäbchen mit einer Größe von $0,4\pm 0,7$ μm in der Breite und einer Länge von $0,7\pm 1,8$ μm (vgl. Abb. B1). Die Zellen sind mittels eines polaren Flagellums motil (Leigh und Coplin, 1992).

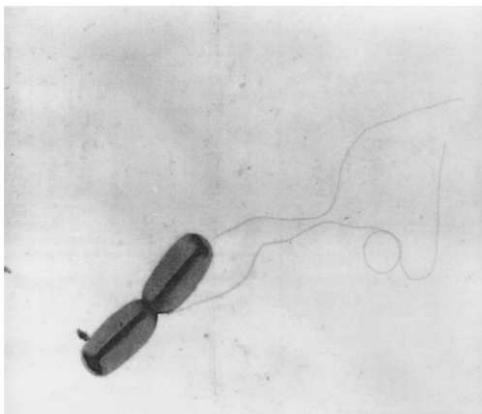


Abb.B.1: **Transmissions-Elektronenmikroskopie von *Xanthomonas campestris*** (12000x Vergrößerung) (Garcia-Ochoa et al., 2000)

Xcc ist chemorganotroph und strikt aerob, da es bei der oxidativen Endphosphorylierung Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor nutzt. Zudem ist *Xanthomonas campestris* Katalase-positiv und Oxidase-negativ (Dempfle, 1991). Durch die Biosynthese eines gelben Pigments namens Xanthomonadin sind die Bakterien auffällig gefärbt (Poplawsky und Chun, 1997). Diese gelben Pigmente liegen membrangebunden vor und sind bromhaltig. Es konnten sieben Gene (*pigA* bis *pigG*) identifiziert werden, die für die Pigmentsynthese kodieren (Poplawsky und Chun, 1997). Als eine mögliche Funktion wird der Schutz vor Photodamage (Rajagopal et al., 1997) und eine Verbindung zur Pathogenität diskutiert (Chou et al., 1997).

Xanthomonas pathovaren infizieren die Pflanzenfamilie der Kreuzblütengewächse, zu der auch die landwirtschaftlich bedeutende Gattung *Brassica* (Kohl) zählt (Vorhölter et al., 2003). Große Ernteinbußen werden an den Kulturpflanzen *Brassica oleracea* L. var. *italica* (Brokkoli), *Brassica oleracea* var. *gemmifera* (Rosenkohl), *Brassica oleracea* var. *botrytis* (Blumenkohl) verursacht. (Daniels, 1992; Leigh und Coplin, 1992).

Man unterscheidet je nach der Art des Wirts zwei mögliche Reaktionen: zum einen die „Kompatible Interaktion“ und zum anderen die „Nichtkompatible Interaktion“ oder „Hypersensitive Response“ (Wiggerich und Pühler, 2000). Die „Kompatible Interaktion“ ist charakterisiert durch einen suszeptiblen Wirt und der Ausbildung der Schwarzaderfäule mit Austrocknung des Blattgewebes und weiteren Symptomen bis hin zum Absterben der Zellen. Die „Nicht-kompatible Interaktion“ (Hypersensitive Response HR) wird in resistenten Pflanze oder einer Nicht-Wirtspflanze induziert. Dabei kommt es zu Nekrosen in dem infizierten Gewebe (Wiggerich und Pühler, 2000; Alvarez et al., 1994; Daniels, 1992). Die ersten sichtbaren Symptome nach erfolgreicher Infektion beim Kohl sind V-förmige Chlorosen am Blattrand und schwarze Verfärbungen der Blattadern (vgl. folgende Abb. B.2).



Abb.B.2: **Typische Symptome an Kohl verursacht durch *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*.** (A) Ernteausschlag auf einem Kohlfeld durch die Infektion mit Xcc (<http://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/whri/about/staff/jvicente/blackrot/cabbagefield.jpg>). (B) V-förmige Schwarzaderfäule-Läsionen am Blattrand von Kohl (<http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/3125.html>). (C) V-förmige chlorotische Läsionen mit nekrotischer Schwarzaderfäule an einem Kohlblatt verursacht durch *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (<http://www.apsnet.org/education/AdvancedPlantPath/Topics/Xanthomonandins/Images/xtra1.htm>).

Pflanzen können durch Xcc auf verschiedene Weisen infiziert werden, wobei die Infektion hauptsächlich durch die sogenannten Hydathoden, aber auch an der Wurzel oder durch Wunden des Pflanzengewebes erfolgt (Cook et al., 1952; Hugouvieux et al., 1998).

Bei der Infektion über die Hydathoden der Pflanzen dringt Xcc in das Vaskulärsystem der Pflanzen ein (vgl. Abb. B.3). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ist dabei im Xylem der infizierten Pflanzen lokalisiert und verursacht dort die typischen Symptome wie Schwarzaderfäule und die V-förmigen Chlorosen und Nekrosen (Hugouvieux et al., 1998).

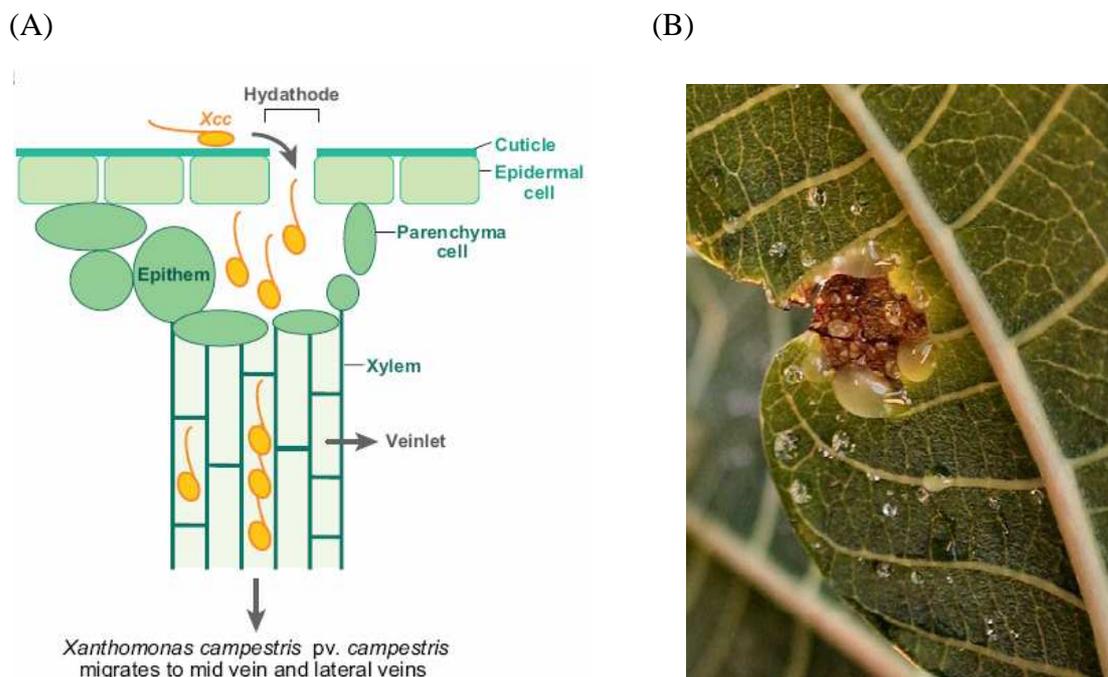


Abb.B.3: (A) Schematische Darstellung des Eindringens von *Xanthomonas campestris* über Hydathoden in das Blattgewebe (Chatterjee et al., 2008). *X. campestris* pv. *campestris* dringt in der Natur vornehmlich durch am Blattrand lokalisierte Öffnungen namens Hydathoden in die Pflanze ein. Dies ist möglicherweise ein Flagella beteiligter Chemotaxis Prozeß. (B) Typisches Symptom Blattfleck an Poinsettie hervorgerufen durch *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola* und deutliche Produktion von Exopolysacchariden (http://www.landwirtschaft-bw.info/servlet/PB/show/1168553_11/Xanthomonas-Blattflecken%20an%20Weihnachtssternen.pdf).

In der Bakterien-Pflanzen Interaktion konnte gezeigt werden, daß Xanthan für die Infektion der Wirte nicht essentiell ist (Leigh und Coplin, 1992; Wiggerich et al., 2000, Ramirez et al., 1988). Vielmehr kommt es durch die Xanthanproduktion der Bakterien im Blattgewebe und innerhalb des Xylems von *Brassica oleracea* zur Verstopfung der Leitelemente, was in einer

verminderten Wasserversorgung des umgebenden Gewebes, zu einem Verlust des Turgors und des Elektrolythaushalts führt (Bretschneider, 1989; Sutton et al., 1970). Diese Auswirkungen machen sich unter anderem in der Ausbildung der schwarzen Nekrosen im Blattgewebe bemerkbar, der sogenannten „Schwarzen Aderfäule“ oder auch „black rot“. Eine weitere Ursache der Schwarzfärbung ist neben der Verstopfung der Leitelemente und der damit verbundenen Kappung der Wasserversorgung die Einlagerung des Pigments Melanin (Sutton et al., 1970).

Neben den landwirtschaftlich bedeutenden Ausfällen in der Ernte ist *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* durch die Produktion vieler Exoenzyme und Oberflächenpolysaccharide gekennzeichnet. Diese Oberflächenpolysaccharide sind Lipopolysaccharide (LPS) und ein Exopolysaccharid (EPS) namens Xanthan. Deren Biosynthesen sind sowohl genetisch als auch mikrobiologisch gut untersucht (Becker et al., 1998; Chou et al., 1997; Dow et al., 2003; Lu, G.-T. et al., 2007; Vorhölter et al., 2001). Von Xcc sekretierte extrazelluläre Enzyme die auch in der Pathogenität eine Rolle spielen sind Proteasen, Endoglukanasen, Pektatlyasen und Amylasen (Daniels, 1992; Schröter et al., 2001). Das Exopolysaccharid Xanthan wird industriell in vielfältiger Weise genutzt und steht deshalb in besonderem Interesse der Untersuchungen (vgl. Tab. B.1).

Tab.B.1: **Breite Anwendungsmöglichkeiten des Xanthans in der Industrie** (nach Garcia-Ochoa et al., 2000). In der Lebensmittelindustrie wird Xanthan als Lebensmittelzusatzstoff mit der E-Nummer 415 gekennzeichnet.

| Anwendung | Konzentration (% w/w) | Funktion |
|---------------------------------------|-----------------------|---|
| Salat Dressing | 0,1- 0,5 | Emulsionsstabilisator |
| Backwaren | 0,1- 0,4 | Stabilisator |
| Tiefkühlware | 0,05- 0,2 | Verbessert Frier-Auftau Zyklen |
| Pharmazie (Cremes) | 0,1- 1 | Emulsionsstabilisator |
| Kosmetik (Shampoos, Lotionen) | 0,2- 1 | Verdickungsmittel und Stabilisator |
| Landwirtschaft (Zusatz in Tierfutter) | 0,03- 0,4 | Suspensionsstabilisator |
| Textilindustrie | 0,2- 0,5 | Kontrolle der rheologischen Eigenschaften |
| Keramikbeschichtungen | 0,3- 0,5 | Verhindert Verklumpen |

Aufgrund der hohen Viskosität und Pseudoplastizität kann Xanthan zum Beispiel in der Lebensmittelindustrie als Verdickungsmittel, aber auch in der Ölindustrie als Schmiermittel

für Bohrer verwendet werden. (Ochoa *et al.*, 2000 , Becker *et al.*, 1998; Peters *et al.*, 1989).
Tabelle B.1 umfaßt die vielseitigen Möglichkeiten der industriellen Anwendung.

Die rheologischen Eigenschaften des Xanthans machen dieses Polysaccharid als Verdickungsmittel wäßriger Lösungen über einen sehr weiten pH-Wertbereich, sowie über einen weiten Temperatur-, Salzkonzentrations- und Druckbereich geeignet (Vorhölter *et al.*, 2008). Zudem ist Xanthan aufgrund der Cellulose-Struktur durch den Menschen energetisch nicht verwertbar und somit besonders für Diätprodukte der Lebensmittelindustrie interessant.

Das biotechnologisch durch Fermentation produzierte Xanthan ist ein saures Heteropolymer mit einem hohen Molekulargewicht von 2 bis $20 \cdot 10^6$ Dalton (Milas und Rinaudo, 1979), wobei das Molekulargewicht Stamm-spezifisch variieren kann. Die Primärstruktur des Xanthans wurde 1977 aufgeklärt (Holzwarth und Prestridge, 1997; Jansson *et al.*, 1975). Die vorkommenden Zucker sind D-Glukose, D-Mannose und D-Glucuronsäure. Das Rückgrat besteht aus einer Cellulosehauptkette in der D-Glukose β -1,4-glykosidisch miteinander verknüpft ist (vgl. Abb.B.4). Alternierend trägt jede Glukose eine kurze Trisaccharidkette aus D-Mannose-(1,4)- D-Glucuronsäure (1,2)- D-Mannose. Die terminale Mannoseeinheit kann an der C₄ und C₆ Position pyruvylt sein, während die interne Mannose am C₆-Atom acetyliert sein kann (Stankowski *et al.*, 1993). Abhängig vom *Xanthomonas campestris* Stamm kann der Grad der Pyruvylierung und Acetylierung variieren (Becker *et al.*, 1998; Garcia-Orchoa *et al.*, 2000).

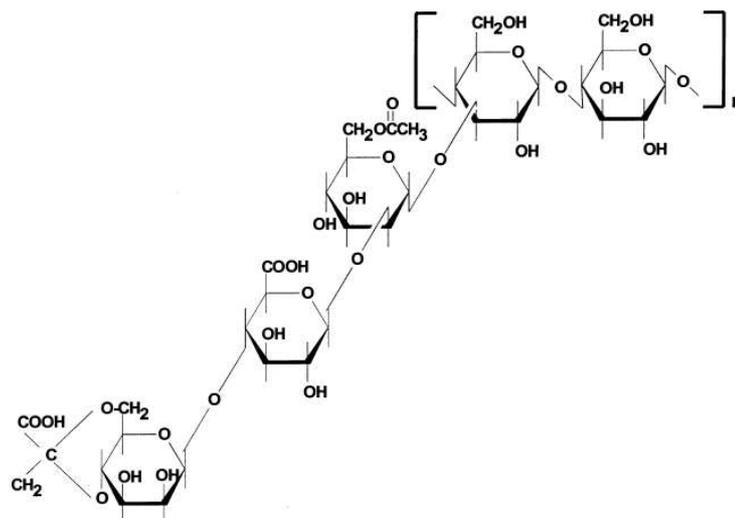


Abb.B.4: **Aufbau der sich wiederholenden Pentasaccharid-Einheit des Xanthans (Becker *et al.*, 1998).** Jedes Pentasaccharid besteht aus einer Hauptkette in der D-Glukose β -1,4-glykosidisch miteinander verknüpft ist. Alternierend trägt jede Glukose eine kurze Trisaccharidkette aus D-Mannose-(1,4)- D-Glucuronsäure (1,2)- D-Mannose. Die terminale Mannoseeinheit kann an der C₄ und C₆ Position pyruvylt sein, während die interne Mannose am C₆ Atom acetyliert sein kann.

Polysaccharide stellen neben den Proteinen und der Nucleinsäuren, die dritte große Klasse an Biopolymeren dar. Im Gegensatz zu der exakt determinierten Struktur in der Sequenz der Proteine und Nucleinsäuren, variieren Polysaccharide hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades und sind damit polydispers (Jansson et al., 1975). In der nativen Form liegt Xanthan als rechtsdrehende Doppelhelix vor (Holzwarth und Prestridge, 1977). Die Größe konnte mit Elektronenmikroskopie auf etwa 4 nm Breite und 2-10 µm Länge bestimmt werden. In wässriger Lösung nimmt Xanthan relativ starre regelmäßige, doppelhelicale Strukturen an (Seeger, 1981; Holzwarth und Prestridge, 1977). In Ruhe werden so sehr viskose Lösungen erreicht, da die Helices ein dreidimensionales Netzwerk ausbilden. Xanthan ist stärker pseudoplastisch als andere bekannte Hydrokolloide und bildet Gele mit hoher Gefrier-Tau-Stabilität, was für die Lebensmittelindustrie von Bedeutung ist. Neben der Geschmacksneutralität und der Diät-Eignung durch das für den Menschen unverdauliche Cellulose-Rückgrat eignet sich Xanthan somit sehr gut für die Lebensmittelindustrie. Die Pseudoplastizität, die Abnahme der Viskosität von fließenden Stoffen unter dem Einfluß zunehmender Scherkräfte, resultiert aus der gleichmäßigen Ausrichtung der vorher ungeordneten Molekülknäuel. Denaturierung durch Erhitzen aber auch Scherkräfte während der Fermentation führen zu kürzeren und flexibleren Einzelhelices (Holzwarth und Prestridge, 1977; Seeger, 1981).

B.2 Die Oberflächenpolysaccharide von *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* und ihre Regulation auf genetischer Ebene

Bei Gram-negativen Bakterien findet man assoziiert mit der Zellhülle einen Oberflächenpolysaccharid-Komplex, der in enger Verbindung mit Pathogenese und Symbiose der Bakterien steht (Whitfield und Valvano, 1993). Diese Oberflächenpolysaccharide bestehen im Wesentlichen aus Lipopolysacchariden (LPS), Kapseln und Exopolysacchariden (Schlegel, 1981). Die meisten Oberflächenpolysaccharide teilen eine gemeinsame Organisation in ihrer Biosynthese.

LPS als „pathogen associated molecular pattern“ (PAMP) ist Bestandteil der Gram-negativen Zellhülle mit der es über die aliphatischen Lipid-A Ketten in der Äußeren Membran verankert ist (Patil et al., 2007). Die Core-Oligosaccharide des LPS tragen häufig Art-spezifische Polysaccharide, sogenanntes O-spezifisches Antigen, O-Polysaccharide oder aber auch O-

Antigen genannt (Raetz und Whitfield, 2002; Caroff et al., 2003). Daher spielen sie auch in der bakteriologischen Diagnostik eine große Rolle (Schlegel, 1981). Die Biosynthese des LPS-O-Antigens läßt sich in zwei Abschnitte unterteilen: (a) Nukleotidzucker-Biosynthese die als Vorstufen für den zweiten Abschnitt dienen. (b) Der nächste Schritt in der Biosynthese ist der stufenweise Aufbau der sich wiederholenden Pentasaccharid-Untereinheiten am Isoprenoid-Carrier-Lipid. Isoliertes LPS von *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* induziert einen „Oxidative Burst“, aktiviert die Expression von „Pathogenesis-Related“ (PR) Genen und löst weitere Abwehrreaktionen der Pflanze aus (Chan und Goodwin, 1999).

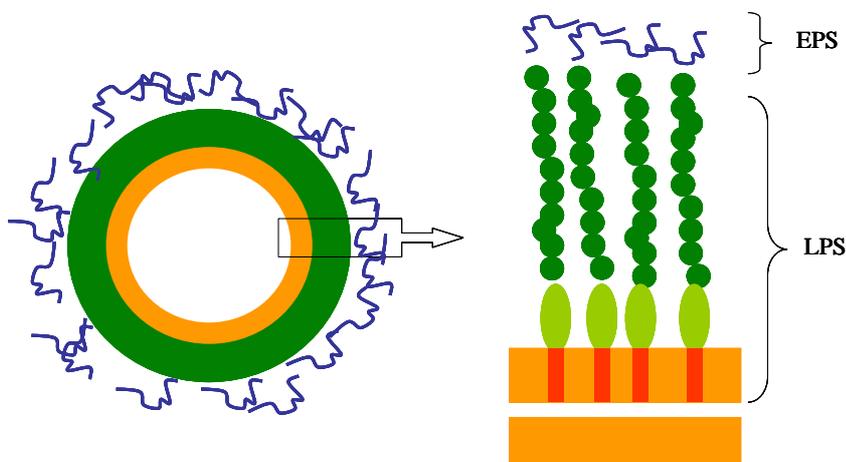


Abb.B.5: Schematische Darstellung der Oberflächenpolysaccharide in *Xanthomonas campestris* **pv. campestris**. Während das LPS mit der bakteriellen Zellhülle assoziiert ist, wird das EPS aus der Zelle sekretiert und steht nicht in fester Verbindung mit der Zellhülle. Orange= Äußere Membran, grün= Lipopolysaccharide (LPS), blau= Exopolysaccharide (EPS), rot= Lipid- A, hellgrün = Coreregion Polysaccharid, dunkelgrün= O-spezifisches Antigen.

Die bakteriellen Oberflächenpolysaccharide stellen einen wirksamen Schutz vor Austrocknung der Zelle dar. Die Funktion des LPS kann in der Aufrechterhaltung und Beschränkung der Membranpermeabilität und der Herstellung einer Kontaktfläche zum Wirt bestehen. Die Haftung an Oberflächen ist eng mit der Biofilmproduktion über die Synthese von Exopolysacchariden verbunden. In diesen Biofilmen können Resistenzen gegen Abwehrmechanismen des Wirts vermittelt werden.

Die komplette Biosynthese des Xanthans ausgehend von der Synthese der Nukleotidzucker-Vorstufen bis hin zur Polymerisation und Sekretion aus der Zelle ist in Abbildung B.6 dargestellt. Nach Aktivierung der Nukleotidzucker im Cytoplasma durch die Enzyme der von

xanA und *xanB* kodierten Gene (Köplin et al., 1992) zu UDP-Glucose, GDP-Mannose und UDP-Glucuronsäure werden diese aktivierten Nucleotidzuckervorstufen von der Zelle für die Synthese zahlreicher Kohlenhydrate genutzt. Darunter auch die Synthese der Lipopolysaccharide, des Glycogens und des Exopolysaccharids Xanthan.

Tabelle B.2: **Mittlere prozentuale Zusammensetzung des Xanthans verschiedener *Xanthomonas* Arten** (Garcia-Orchoa et al., 2000).

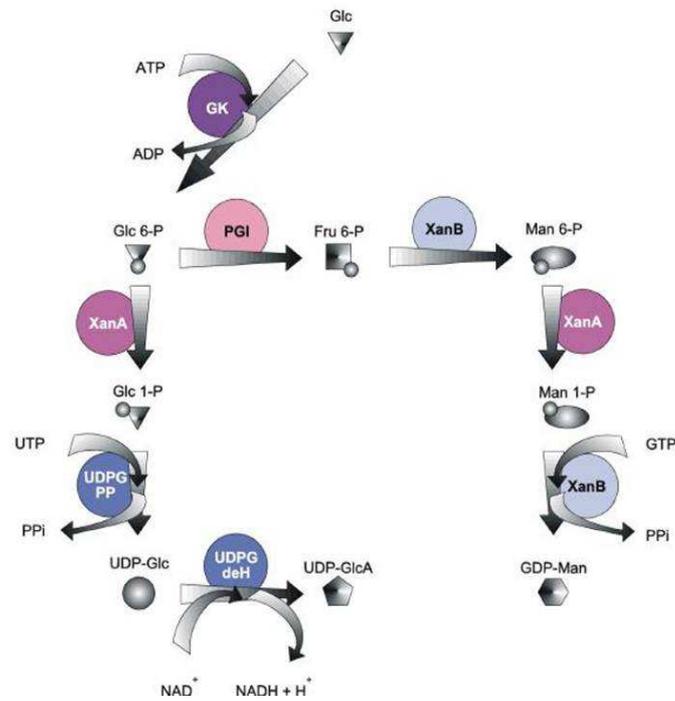
| Bakterium | D-Glukose | D-Mannose | D-Glucuronsäure | Pyruvat | Acetat |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------------|---------|--------|
| <i>X. campestris</i> | 30,1 | 27,3 | 14,9 | 7,1 | 6,5 |
| <i>X. fragaria</i> 1822 | 24,6 | 26,1 | 14,0 | 4,9 | 5,5 |
| <i>X. gummisudans</i> 2182 | 34,8 | 30,7 | 16,5 | 4,7 | 10,0 |
| <i>X. juglandis</i> 411 | 33,2 | 30,2 | 16,8 | 6,9 | 6,4 |
| <i>X. phaseoli</i> 1128 | 30,9 | 28,6 | 15,3 | 1,8 | 6,4 |
| <i>X. vasculorum</i> 702 | 34,9 | 30,2 | 17,9 | 6,6 | 6,3 |

Die Biosynthese der Oberflächenpolysaccharide setzt die Produktion von Nucleotidzuckern voraus, die aktivierte Monosaccharide als Vorstufen der Biosynthese bereitstellen (Barreras et al., 2004). Die für die Synthese der Nucleotidzucker GDP-Mannose, UDP-Glukose, UDP-GlcA kodierenden Gene sind *xanA* und *xanB*. Die Nucleotidzucker stehen auch weiteren Syntheseprozessen wie die der Lipopolysaccharide zur Verfügung (Vorhölter et al., 2001). Für die LPS-Biosynthese ist zusätzlich GDP-D-Rhamnose erforderlich. Das Gen *xanA* kodiert für ein Enzym mit Phosphoglucomutase- und Phosphomannomutase-Aktivität, während *xanB* für ein bifunktionales Enzym mit Phosphomannose Isomerase- und GDP-Mannose Phosphorylase-Aktivität kodiert (Köplin et al., 1992).

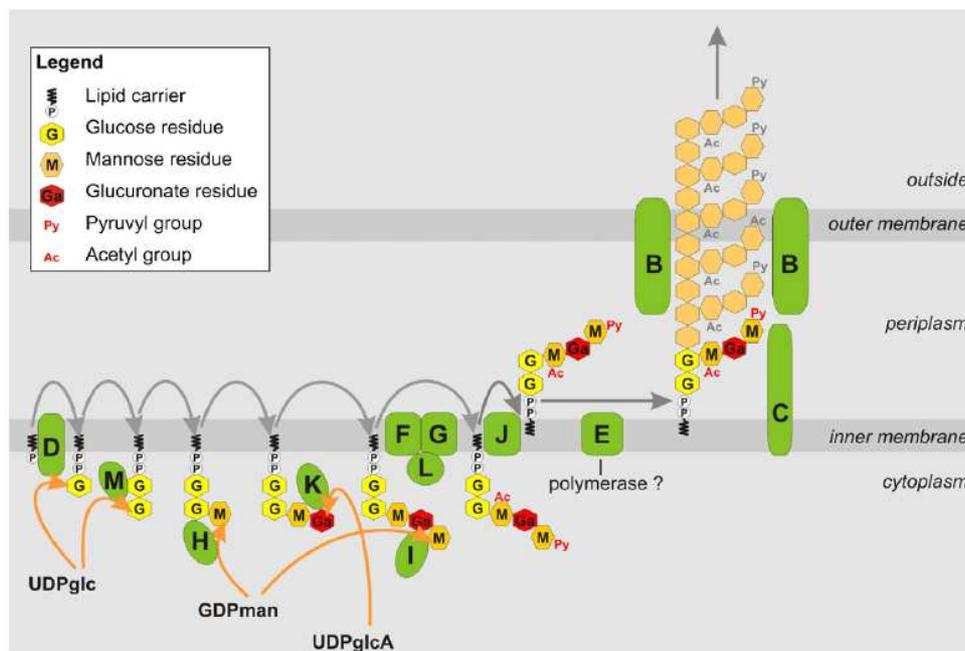
Die für die Xanthan Biosynthese erforderlichen Proteine werden von dem *gum*-Cluster kodiert. Die *gum*-Gene sind in einem 16 kb großen Cluster lokalisiert, welches 12 ORFs mit den Namen *gumB* bis *gumM* enthält und als ein Operon transkribiert wird (Katzen et al., 1996). Der initiale Schritt in der Xanthan-Biosynthese ist der stufenweise Aufbau der sich wiederholenden Pentasaccharid-Untereinheiten am Isoprenoid-Carrier-Lipid durch die Glykosyltransferasen kodiert von *gumDMHKI* (Becker et al., 1998). GumD katalysiert dabei den Transfer von UDP-Glucose unter UMP-Abspaltung in Form von Glukose-1-phosphat an den Polyisoprenol-P-Akzeptor. Die Proteine GumMHI katalysieren die sequentiellen Anlagerungen der weiteren Monosaccharide. Die Dekoration des Heteropolymers erfolgt durch Acetylierung und Pyruvylierung der internen oder auch terminalen Mannose durch Anlagerung von Acetyl- und

Pyruvyl-Resten. Diese Schritte werden durch die Genprodukte der Gene *gumFG* katalysiert (Vojnov et al., 2001). Der finale Schritt in der Xanthan-Biosynthese ist der Export der Untereinheiten aus der Zelle ins umgebende extrazelluläre Milieu und die Polymerisation des Polysaccharids an dem die Gene *gumBCEJ* beteiligt sind (Ielpi et al., 1993).

A



B



C

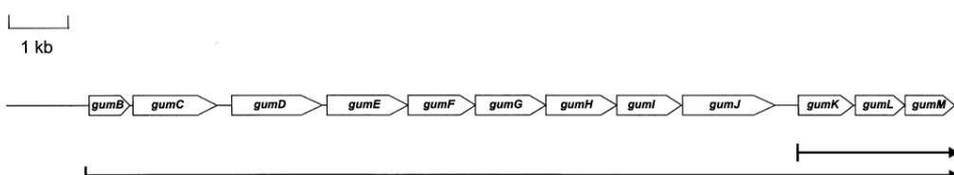


Abb.B.6

D



Abb.B.6: **Schematische Darstellung der Xanthanbiosynthese mit den involvierten Enzymen und des für die Biosynthese wichtigen *gum*-Clusters.** (A) Synthese der Nucleotidzucker-Vorstufen (Becker et al., 1998; Katzen et al., 1998). 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. (B) Schematische Repräsentation der Xanthansynthese an der bakteriellen Zellwand und Export in die extrazelluläre Umgebung durch Genprodukte des *gum*-Clusters. Nach Aufbau der Xanthan-Untereinheiten an einem Carrier-Lipid wird es auf die Außenseite transloziert und außerhalb der Zelle polymerisiert. (Vorhölter et al., 2008). (C) Genetische Organisation der Gene im *gum*-Cluster. Schwarze Kästen repräsentieren Promotoren, grüne Pfeile die 12 offenen Leseraster und schwarze Pfeile die Größe und Richtung der Transkription (Becker et al., 1998). (D) Genetische Organisation der von dem *gum*-Cluster physikalisch separiert lokalisierten *xan*-Gene. *xanA* und *xanB* sind für die Aktivierung der Nucleotidzuckervorstufen notwendig. (Vorhölter et al., 2008).

B.3 Familie der bakteriellen transkriptionellen Regulatoren einschließlich der LacI-Regulatoren

Die Genexpression wird in Prokaryoten hauptsächlich auf der Ebene der Transkription reguliert. Die bakteriellen Regulatoren der Transkription sorgen beispielsweise dafür, daß Abbauenzyme erst synthetisiert werden, wenn ein neues Substrat auftritt. Zudem wird die Enzymproduktion umgehend eingestellt, wenn dieses Substrat nicht mehr verfügbar ist. Diese effektive Regulation erlaubt eine adäquate Adaption an sich wechselnde Milieubedingungen.

Die meisten prokaryotischen Regulatorproteine regulieren die Transkription, indem sie mittels einer DNA-bindenden Domäne, zum Beispiel dem Helix-Turn-Helix Motiv (HTH) spezifisch an eine DNA-Sequenz binden und auf vielfältige Art und Weise ihr regulatorisches Potential entfalten (Perez-Rueda und Collado-Vides, 2000).

Generell kann man die Äußerung treffen, daß Regulator-Proteine deren HTH-Motiv vornehmlich am N-Terminus lokalisiert ist als Repressoren fungieren, während Aktivatoren dieses Motiv meist nahe am C-Terminus aufweisen. Dabei wird davon ausgegangen, daß das erste Helix-Motiv der nicht-spezifischen Bindung der DNA dient und das zweite Motiv der spezifischen Erkennung (Perez-Rueda und Collado-Vides, 2000).

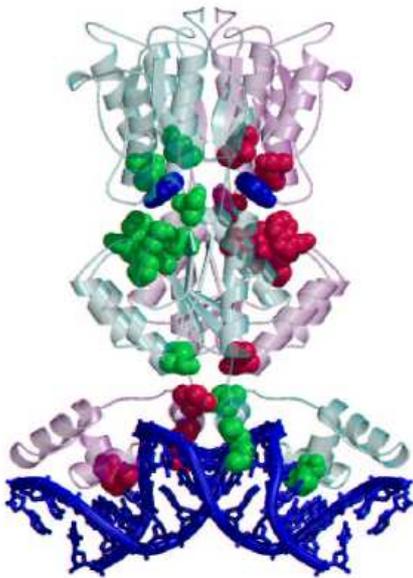


Abb.B.7: **Kristallstruktur des PurR-DNA-Komplexes (Mirny und Gelfand, 2002).** PurR ist ein transkriptioneller Regulator der LacI-Familie und besteht aus zwei strukturellen Domänen, einer N-terminalen HTH-DNA-Bindedomäne und einer C-terminalen Effektorbindedomäne.

Die Kristallstruktur des PurR-DNA-Komplexes zeigt die dimerische Natur des Proteins (vgl. Abb.B.7). Eine Untereinheit umschließt die DNA, während die andere um den Liganden liegt. LacI-Regulatoren fungieren typischerweise als transkriptionelle Repressoren abhängig von der Anwesenheit oder Abwesenheit von bestimmten kleinen Molekülen, wie zum Beispiel von Zuckern und Nukleotiden in der Zelle (Mirny und Gelfand, 2002).

Mehr als fünf Prozent der Gene aus *E.coli* codieren Regulatorproteine, wobei einige spezifische Regulatoren wenige Gene regulieren können, während so genannte globale Regulatoren die Expression von hunderten von Genen kontrollieren können. Weit verbreitete Familien von Regulatoren sind zum Beispiel die Familien AraC, LysR, GntR und XylS. Neben diesen Regulator-Familien sind ebenso die Regulatoren des Zwei-Komponentensystems bedeutsam (Galvao und de Lorenzo, 2006).

Eine Familie der bakteriellen transkriptionellen Regulatoren ist die LacI-Familie. Mitglieder dieser Regulatoren reagieren auf transkriptioneller Ebene auf veränderte Umweltbedingungen mit stoffwechselabhängiger Genregulation (Jacob und Monod, 1961). Die LacI-Regulatoren tragen zwei strukturelle Domänen, eine N-terminale HTH-DNA-Bindedomäne und eine C-terminale Effektorbindedomäne (Schuhmacher et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, daß der NH₂-Terminus ungefähr 60 Aminosäure und der COOH-Terminus ungefähr 260 Aminosäuren umfaßt. Die Mitglieder der LacI-Familie sind meist Dimere, die an den 16-18

bp langen Operator mit hoher Spezifität binden. Dabei erhöht die Ausbildung von Dimer- oder Multimeren die Bindungsspezifität des Regulators, da jedes HTH-Motiv einen Teil der Sequenz erkennt (Weickert und Adhya, 1992). Da das HTH-Motiv zumeist am N-Terminus lokalisiert ist kann man die LacI-Regulatoren generell als Repressoren einstufen (Perez-Rueda und Collado-Vides, 2000). Kommt es beispielsweise zur Bindung eines Effektors durch die C-terminale Bindedomäne eines Repressors, kann dies zur Konformationsänderung des Regulatorproteins führen und einer Dissoziation des Repressors von der DNA, womit dieses Gen wieder exprimiert werden kann.

Durch Sequenz- und Strukturanalysen konnten Regulatoren der LacI-Familie generell als potentielle Regulatoren des Kohlenhydrat- und Nukleotidzuckermetabolismus klassifiziert werden (Weickert und Adhya, 1992; Perez-Rueda und Collado-Vides, 2000). Regulatorische Proteine der LacI-GalR-Familie der transkriptionellen Regulatoren sind häufig mit der Kohlenhydrat-Verwertung verbunden, indem sie die Expression der Strukturgene in Substrat-abhängiger Weise entweder ermöglichen oder reprimieren (Reid und Abratt, 2005). Von sämtlichen in der Kohlenhydrataufnahme beteiligten Regulatoren in *E. coli* K-12 sind 20% Mitglieder der GalR/LacI-Familie (Perez-Rueda und Collado-Vides, 2000). Weitere an der Kohlenhydrataufnahme beteiligte Regulatoren sind die der IlcR-Familie. Am Zuckermetabolismus sind Regulatoren der DeoR-Familie und am Kohlenhydratmetabolismus GntR-Regulatoren beteiligt (Perez-Rueda und Collado-Vides, 2000). LacI-Regulatoren stellen somit ideale Ziele zur Mutagenese dar, weil sie mögliche Kandidaten der Regulation im Kohlenhydratmetabolismus repräsentieren können.

B.4 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 Genomprojekt

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden sechs *Xanthomonas* Stämme sequenziert. Darunter der in dieser Arbeit verwendete Xcc B100 Stamm (Vorhölter et al., 2008), Xcc 8004 (Qian et al., 2005) und Xcc ATCC33913 (Da Silva et al., 2002). *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Thieme et al., 2005), *Xanthomonas axinipodis* pv. *citri* (Da Silva et al., 2002) sowie zwei *Xanthomonas orizae* pv. *orizae* Stämme KACC10331 (Lee et al., 2005) und MAFF311018 (Ochiai et al., 2005).

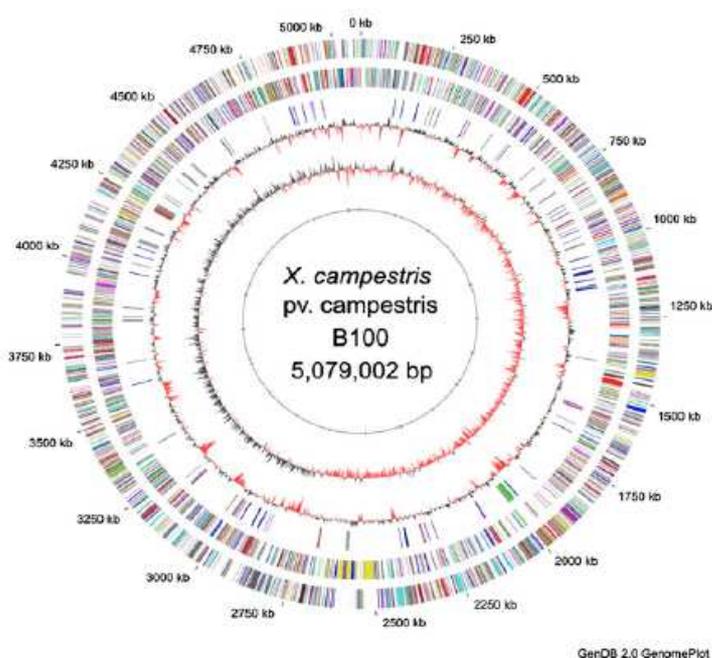


Abb.B.8: **Zirkuläre Repräsentation des Xcc B100 Genoms (Vorhölter et al., 2008)**. In den beiden äußeren Ringen sind die Protein-kodierenden Gene (CDS) für beide Ableserrichtungen anhand ihres Genproduktes und der Zugehörigkeit dieser zu den COG-Kategorien abgebildet. Im dritten Ring von außen sind alle Gene mit Bezug zum Stoffwechsel und Transport von Kohlenhydraten und Polysacchariden dargestellt. Gene der Xanthan-Biosynthese *gumBCDEFGHIJKLM* (grün), CDS der Nukleotidzucker-Synthese (rot), CDS der LPS und cyclischen Glukane (grau), CDS des Kohlenstoff-Metabolismus wie zum Beispiel Glykolyse, Pentosephosphat-Weg, Entner-Doudoroff-Weg (dunkelblau), Zuckertransporter (violett). Im fünften Ring von außen ist der GC-Plot dargestellt. Im sechsten Ring der GS-Skew.

Das Genom von Xcc B100 wurde mit der „Whole-Genome-Shotgun-Sequencing-Methode“ sequenziert (Vorhölter et al., 2008). Das Genom ist 5,079,003 bp groß und der G+C Gehalt liegt bei 65.0%, wobei 4471 Protein-kodierende Gene (CDS) wovon 2878 eine Funktion zugewiesen werden konnte, annotiert sind (vgl. Abb.B.8). Des weiteren wurden 62 RNA Gene und 2 ribosomale RNA Operons (rRNA) annotiert. Transfer-RNAs liegen 54 vor, Insertions-Sequenzelemente 59. Auf Basis der Genomannotation wurde der in dieser Arbeit verwendete Oligo-Microarray konstruiert.

B.4.1 Kohlenhydrataufnahme und Zentralstoffwechselwege in Xcc B100

In Gram-negativen Bakterien gibt es eine Vielzahl an Transport-Mechanismen, um Kohlenhydrate in die Zelle zu translozieren. Neben dem passiven Transport durch Membranporine ist der aktive Transport durch ABC-Transporter, das Phosphoenolpyruvat-

System oder Symporter und Antiporter von Bedeutung. Folgende Abbildung B.9 stellt schematisch die wichtigsten Kohlenhydrat-Aufnahme-Systeme in Gram-negativen Bakterien dar.

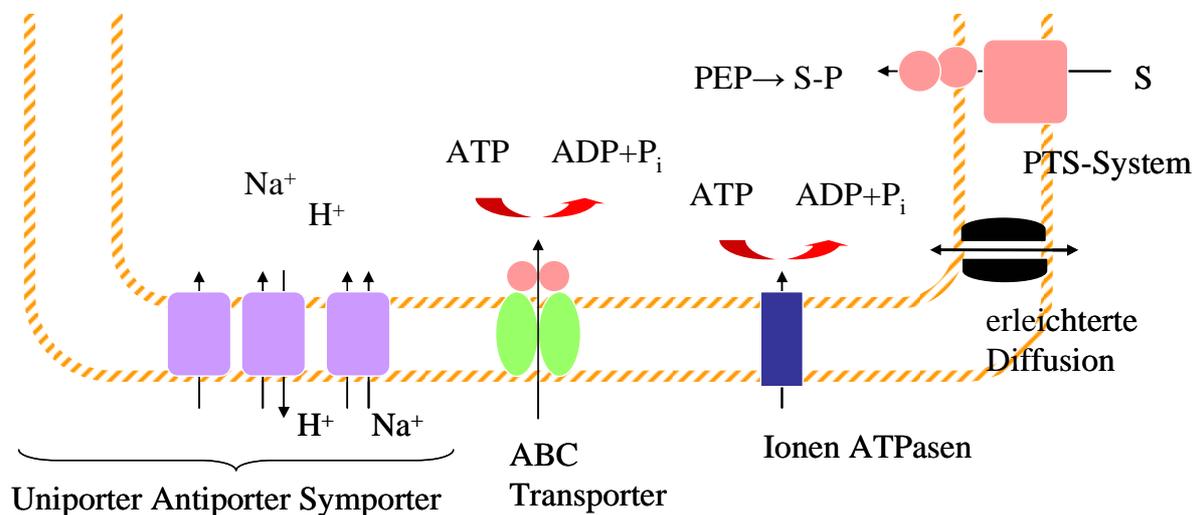


Abb.B.9: **Schematische Darstellung der wichtigsten Kohlenhydrat-Aufnahme-Systeme in Gram-negativen Bakterien.** Glycerin kann durch erleichterte Diffusion mittels Uniporter in die Zelle aufgenommen werden. Symporter und Antiporter erfordern einen Stoffgradienten zum Beispiel Na^+ und H^+ . ABC Transporter benötigen ATP, um Stoffe wie Mono- oder Disaccharide zu transportieren, ebenso die Ionen ATPasen, die bei der Entgiftung der Zellen eine Rolle spielen. Beim Phosphoenolpyruvat-System dient das energiereiche Enolpyruvat als Energiequelle und der importierte Stoff wird gleichzeitig phosphoryliert.

Für Xcc B100 konnten neben den Zuckeraufnahmesystemen auch die beteiligten Zentralstoffwechselwege und ihre Enzyme identifiziert werden (Vorhölter et al., 2008). So wurden 15 Aufnahmesysteme für Monosaccharide und Disaccharide aufgrund von Sequenzvergleichen mit TCDB gefunden. Die Aufnahmesysteme umfassen die Familie der Glycoside-Hexuronide Transporter (GPH), die Solute: Na^+ Symporter (SSS), das Phosphotransferase-System (PEP) und die ATP-binding cassette (ABC) Superfamilie. Wobei es bei Sequenz-basierten Homologie-Vergleichen für Zucker-Transporter aufgrund der strukturellen Diversität gilt, diese mit Vorsicht zu betrachten (Vorhölter et al., 2008).

Die „Major Facilitator Superfamily“ (MFS) ist eine der größten und diverssten Superfamilie der Transporter. Innerhalb dieser Superfamilie existieren 28 Familien mit einer vielfältigen Substratspezifität. Einige MFS Proteine fungieren als Rezeptoren an der Zellhülle, die die Genexpression beeinflussen (Saier, 2000). Die Zuckertransporter-Familie ist mit über 200 sequenzierten Mitgliedern die größte Familie der MFS. Die transportierten Zucker sind unter

anderem Glukose, Fruktose, Mannose, Galactose, Arabinose, Xylose, Maltose und Lactose. Der Transport kann als Uniport oder Kation-Transport erfolgen. Drei kleine für Bakterien spezifische MFS Familien sind an der Aufnahme von Zuckern beteiligt. Die Oligosaccharid:H⁺ Symporter Familie (OHS), Fucose:H⁺ Symporter (FHS) und Sialat:H⁺ Symporter.

Die Mitglieder der „Glykosid-Hexuronide Family“ (GPH) transportieren eine Vielfalt an Di- und Trisacchariden.

Der Transport über das Phosphotransferase-System (PTS) erfolgt über eine Phosphorylierungskette, die den Zuckertransport an eine Zuckerphosphorylierung koppelt. Die Phosphatgruppe wird von Phosphoenolpyruvat (PEP) auf den importierten Zucker übertragen. Phosphoenolpyruvat fungiert dabei neben Energiequelle für den Transport auch als Phosphatdonor für die Phosphorylierung des Zuckers. PEP phosphoryliert das erste Energiekopplungsenzym I (EI), wonach das Phospho-Enzym I (P-EI) die Phosphatgruppe auf das zweite Energiekopplungsenzym HPr überträgt. Beide Proteine sind allgemeine Proteine des PTS und nicht spezifisch für einen Zucker. Phospho-HPr (P-HPr) phosphoryliert in der Phosphorylierungskette eine Anzahl an Zucker-spezifischen Proteinen des PTS, die als Enzym II bzw. Enzym III bezeichnet werden. Das Mannit-PTS verfügt in *E. coli* als einfachstes System über ein Zucker-spezifisches Enzym (EII^{mtl}), das Glucose-PTS über zwei (EIII^{glc} und EII^{glc}) und das Fructose-PTS über drei (Saier und Deutscher, 1988). Über das PTS können Monosaccharide, Glykoside und Disaccharide transportiert werden (Saier, 2000; Saier und Deutscher, 1988).

Die Familie der „ATP-Binding Cassette Superfamily“ (ABC) ist neben der MFS eine der großen Superfamilien an Transporten. Zwei für einfache Kohlenhydrate spezifische Zuckeraufnahmesysteme der ABC Superfamilie sind die CUP1 und CUP2 Familien. Mitglieder der CUP1-Familie transportieren Di-, Tri- und Oligosaccharide, während die CUP2-Familie Monosaccharide transportieren kann (Saier, 2000).

Als Zuckerverwertung gelang in Xcc B100 neben den schon bekannten Entner-Doudoroff-Weg und des Pentosephosphat-Wegs der Nachweis eines kompletten Satzes der Glykolyse-Gene (Vorhölter et al., 2008). Glukose wird über den Entner-Doudoroff-Weg katabolisiert und zu einem geringen Anteil durch den Pentosephosphat-Weg. Es konnte in *Xanthomonas* gezeigt werden, daß der Anteil durch den Pentosephosphat-Weg bei 8-16% liegt (Garcia-Ochoa et al., 2000).

B.4.2 Überrepräsentation an TonB-abhängigen Rezeptoren (TBDR)

Im Xcc B100 Genom konnte eine Überrepräsentation an TonB-abhängigen Rezeptor (TBDR) kodierenden Genen festgestellt werden (Vorhölter et al., 2008). Dies stimmt mit der in der Literatur beschriebenen Überrepräsentation an TBDR als ein Phänomen von vielen *Xanthomonas* Arten überein (Blanvillain et al., 2007). TonB-abhängige Rezeptoren sind Proteine der Äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien, die für den aktiven Transport von Eisen-Siderophor-Komplexen verantwortlich sind (Blanvillain et al., 2007). Bei *Xanthomonas* Arten sind über 60 TBDR im Genom zu finden. Im Vergleich zu anderen Gram-negativen Bakterien, die üblicherweise 1-5 TBDRs im Genom tragen, ist dies eine deutliche Überrepräsentation an TBDRs (vgl. Tab.B.3).

Tab.B.3 : Anzahl der TonB-abhängigen Rezeptoren (TBDRs) in Xcc und anderen Bakterien. (Blanvillain et al., 2007).

| Bakterium | Anzahl an TBDRs im Genom |
|-------------------------------------|--------------------------|
| <i>Xcc</i> 8004 | 65 |
| <i>Xcc</i> ATCC33913 | 64 |
| <i>Xcv</i> 85-10 | 52 |
| <i>E. coli</i> O6 | 18 |
| <i>E. coli</i> K-12 | 9 |
| <i>Rhizobium etli</i> CFN 42 | 2 |
| <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF30309 | 1 |

Eine gut untersuchte und in der Literatur beschriebene Funktion der TBDRs ist der Transport von Eisensiderophor-Komplexen und von Vitamin B12 (Wiggerich et al., 1997). Die TBDRs unterliegen dabei der Kontrolle des „ferric-uptake-regulators“ FurR, der unter Eisenmangel zu einer Induktion der TBDRs-Gene in der Zelle führt (Bagg und Neilands, 1987). Neben diesen Funktionen wird jedoch auch eine Rolle der TBDR in der Kohlenhydrataufnahme diskutiert. Für die Sucrose-Aufnahme in Xcc konnte dies schon gezeigt werden (Blanvillain et al., 2007). Dabei wird Sucrose von SuxA über die bakterielle Äußere Membran unter Beteiligung weiterer, von den *sux*-Genen kodierender, Proteine ins Zytoplasma transloziert.

B.4.3 Sekretions-Systeme in *Xanthomonas*

In Gram-negativen Bakterien sind verschiedene Sekretions-Systeme beschrieben (Hueck, 1998; Büttner und Bonas, 2002; Chan und Goodwin, 1999). Die Typ-II und Typ-IV sec-abhängigen Sekretions-Systeme beinhalten einen Transport über die Innere Membran, bevor es zur Sekretion außerhalb der bakteriellen Zellhülle kommt. Im Gegensatz zu den Typ-II und Typ-IV-Sekretions-Systemen sind die System I und III vom sec-System unabhängig und eine aminoternale Prozessierung der sekretierten Proteine kommt nicht vor. Das Typ-I Sekretions-System benötigt drei sekretorische Proteine: eine Innere Membran gebundene Transport ATPase (ABC Protein für ATB- bindende Kasette) für Energie der Sekretion, ein Äußeres Membranprotein und ein Membranfusionsprotein, welches an der Inneren Membran gebunden ist und den periplasmatischen Raum umspannt. Das Typ-III-Sekretions-System besteht aus etwa 20 Proteinen, die zum größten Teil Bestandteile der Inneren Membran sind und benötigt eine zytoplasmatische ATPase. Die Proteine zeigen Homologien zu Komponenten des Flagellar-Apparats. Codiert werden die Typ-III-Sekretions-System Proteine von einem *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity)-Cluster (Hueck, 1998).

Über das Typ-III-Sekretions-System werden bakterielle Effektor-Proteine sec-unabhängig über die Innere und Äußere Membran in die Wirtszelle transloziert. Der TTSS Basalkörper durchspannt sowohl die Innere als auch die Äußere Membran. An ihm assoziiert ist der extrazelluläre Hrp-Pilus, der die etwa 200 nm dicke pflanzliche Zellwand durchspannen kann. Der Hrp-Pilus verbindet dabei den Typ-III-Sekretions-Apparat mit dem Translokon in der Zytoplasmamembran der pflanzlichen Zellwand und ermöglicht den Transport der bakteriellen Effektorproteine in die pflanzliche Wirtszelle. Effektorproteine können in dem pflanzlichen Zytoplasma zum Beispiel an den Zellkern vielleicht aber auch an die Chloroplasten transloziert werden. In suszeptiblen Wirten unterdrücken Effektorproteine vermutlich die Pflanzenabwehr, während in nicht-suszeptiblen (resistenten) Wirten bestimmte Effektorproteine (Avr Proteine) erkannt werden und zu einer Abwehrreaktion der Pflanze (hypersensitive response HR) führen (Pühler et al., 2004).

B.5 Transkriptomische Analyse mittels Microarray Technologie

Die Microarray-Technologie ist seit Mitte der 1990er Jahre durch die Entwicklung von Glaschips als Ersatz von Filtern als Träger der immobilisierten Sonden eine nicht mehr wegzudenkende Methode in der Genomforschung und Biotechnologie (Shena et al., 1995;

Lockhardt et al., 1996; Lennon und Lehrach, 1991). Ziel ist die Erstellung von Genexpressionsprofilen zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle. Da nur von exprimierten Genen die transkribierte mRNA in der Zelle vorliegt, stellt die Isolierung der mRNA, ihre reverse Transkription zu cDNA und die anschließende Hybridisierung auf einem Zweikanal-Array eine effektive Methode dar, ein Genexpressionsprofil zu einem bestimmten Zeitpunkt zu erstellen. Es bestehen unterschiedliche Arten einen Zweikanal-Array zu designen. Zum einen gibt es verschiedene Sonden die auf dem Array aufgebracht werden, wie zum Beispiel längere DNA-Fragmente die in einer Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) generiert werden oder auch kürzere Oligonukleotide (50-70mer).

Der in dieser Arbeit verwendete Array Xcc5kOLI wurde am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld konstruiert und in der Literatur beschrieben (Serrania et al., 2008). Er basiert auf der Genomsequenz des Xcc B100 Stammes mit 4484 annotierten Genen, zu denen 50-70mer Oligonukleotide auf einem Epoxyglasobjektträger gespottet wurden. Des Weiteren enthält der Array 15 Stringenz Kontrollen mit den Genen *gapA*, *rpsA*, *rpsB*, *rpsL*, and *rpmI* (70 %, 80 %, und 90 % Sequenzabdeckung zur nativen Sequenz), 12 „Alien DNA Oligonukleotide“ und fünf „Spiking Kontroll-Oligonukleotide“.

Für eine transkriptomische Analyse wird zunächst die mRNA der beiden zu vergleichenden Zustände isoliert und mittels der Reversen Transkriptase zu cDNA transkribiert. Die cDNA wird mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen, in diesem Fall mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cyanin Cy3 und Cy5, markiert und gemeinsam auf einem Microarray hybridisiert (vgl. Abb. B.10). Die markierten Proben hybridisieren mit den auf dem Glasträger immobilisierten Oligonukleotid-Sonden. Mit einem Fluoreszenz-Scanner kann anhand der Fluoreszenzunterschiede ein relatives Expressionsprofil tausender Gene im Parallelverfahren aufgenommen werden. Durch Überlagerung der beiden Emissionsbilder kann eine indirekte Quantifizierung der Transkripte unter den beiden untersuchten Konditionen erfolgen.

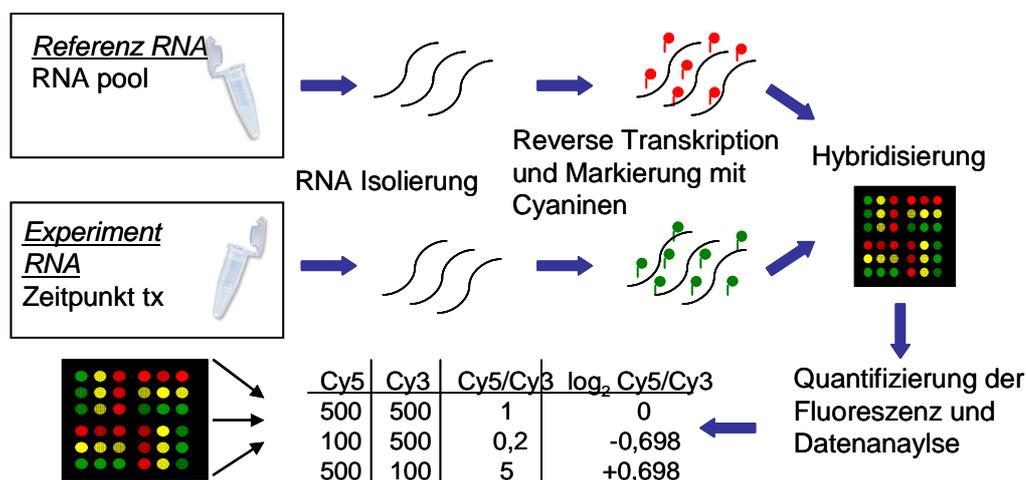


Abb.B.10

Abb.B.10: **Ein mögliches Design zur Durchführung eines Microarray-Experiments.** Nach erfolgter RNA-Isolierung wird die RNA mittels der Reversen Transkriptase revers transkribiert und mit Farbstoffen markiert. In diesem Fall die Referenzprobe mit dem Cyanin Cy3 die Experimentprobe mit Cy5. Nach der Hybridisierung der beiden Proben auf einem Array werden die Fluoreszenzen quantifiziert, normalisiert und mit entsprechender Software ausgewertet.

Bei einem Zeitreihen-Experiment macht es zum Beispiel Sinn einzelne Zeitpunkte mit einem Pool aus RNA sämtlicher Zeitpunkte zu vergleichen, während im Fall einer Mutationsanalyse die Mutante mit dem Wildtyp zum Beispiel in verschiedenen Wachstumsphasen verglichen wird. Durch bioinformatische Auswertung mit der Software EMMA (Dondrup et al., 2003), kann jedem Spot eine Identifizierung zugewiesen werden und systematische, nicht biologische Varianz entfernt werden.

B.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist in zwei Teile aufgeteilt. Zum einem ist es das Ziel die Genregulation des Kohlenhydratmetabolismus anhand von Mutagenese von Genen, die potentielle Regulatoren des Kohlenhydratmetabolismus kodieren, aufzuklären. Dazu wurden die Gene mittels „gene-SOEing“ oder Plasmidintegration mutagenisiert und auf transkriptomischer Ebene mit dem Wildtyp verglichen. Die weitere phänotypische Charakterisierung wurde unter anderem mit einem Kohlenstoffverwertungs-Assay durchgeführt. Ein Schwerpunkt war dabei das Erstellen des Xcc B100 Wildtyp Kohlenstoffverwertungs-Profiles.

Zum anderen wurde eine 13 l-Kultivierung des *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* Wildtyps in einem Bioreaktor in drei biologischen Replikaten durch Zeitreihen-Analyse auf transkriptomischer Ebene untersucht. Das Ziel der Zeitreihen-Analyse ist dabei temporäre Prozesse zu messen, um Sets von Genen zu bestimmen, die unter diesen dem industriellen Produktionsverfahren vergleichbaren Bedingungen differentiell exprimiert werden. Dabei sollen Gene die koordiniert exprimiert werden oder Genexpressions-Muster identifiziert werden. Mit der Verknüpfung der in dieser Arbeit generierten Transkriptomdaten mit Metabolomdaten und dem Aufstellen von regulatorischen Netzwerken durch ein „Reverse Engineering Approach“ wurde ein systembiologischer Ansatz verfolgt.

Material und Methoden C

C.1.1 Bakterienstämme, Plasmide, Oligonukleotide, Chemikalien und Verbrauchsmaterial, Enzyme und Software

Bakterienstämme

| Bakterienstamm | Referenz/Herkunft |
|--|--------------------------------|
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> B100 | Hötte et al. (1990) |
| <i>Escherichia coli</i> S17-1 | Simon et al. (1983) |
| <i>Escherichia coli</i> DH5 α | Bethesda Research Laboratories |

Plasmide

| Plasmid | Relevante Eigenschaft | Referenz |
|-----------------------|---|----------------------|
| pK19mob2 Ω HMB | Km ^r , lacZ α , <i>gusA</i> , <i>mob</i> , Terminator | Luo et al. (2005) |
| pK18mobGII | Km ^r , lacZ α , <i>gusA</i> | Katzen et al. (1999) |

Oligonukleotide Gene-SOEing

| Zielgen | Bezeichnung | Sequenz 5'→3' |
|----------------------------------|-------------|--|
| xcc-b100-4306 | 343 1 J | 5'Tgg gTC AAgC TTT CCA gTg ggT Cgg Cgg TCT |
| | 343 2 J | 5'ACT ACg Cgg ATC CTC ggT gCC Tgg TgC ggC ggA CCg ATT T |
| | 3-343 | 5'gCA CCg Agg ATC CgC gTA gTg ACg ATT CgC gCC AAg gAg C |
| | 4-343 | 5'CCT ggA ATT CgC TAC gCC TgC CTg CAC AAC |
| xcc-b100_4342 (<i>rbsR</i>) | 1-345 | 5'gCT gAA gCT TgC gCT gCT CCg gTT ggT AgT |
| | 2-345 | 5'AgC CAC ggg ATC CTg ATg Cgg Cgg CgT gAT gCg ggA TgT A |
| | 3-345 | 5'CgC ATC Agg ATC CCg Tgg CTC ATC gCA CTg gCC ggT TTC g |
| | 4-345 | 5'gCT CgA ATT CCT CTg CTg CTg ACC ggA CAC |
| xcc-b100_0785 | 1-0603 | 5'gCg CAA gCT TTC ACg CgC TgA Tgg gCA TCT |
| | 2-0603 | 5'ACT Acg Cgg ATC CAg CCA Cgg CgT ggC CTg CAT CAC TgA A |
| | 0603 3 J | 5'CgT ggC Tgg ATC CgC gTA gTA gCg ACg CCT ACg ACg ACC AA |
| | 0603 4 J | 5'TgC CgC gAA TTC TgC CTg CgC Cgg TTT CAT CC |

| | | |
|-----------------------------------|----------|---|
| xcc-b100_1019 | 1-0801 | 5'gCC gAA gCT TgC ACA CCg gCA TCA CCC gTT |
| | 2-0801 | 5'TAC TgC ggg ATC CTC ggT gCC ACC CgC ACC CgC Atg TCT T |
| | 3-0801 | 5'gCA CCg Agg ATC CCg CAg TAA CCA TCT ggC CCg AAC TCA C |
| | 4-0801 | 5'CgC gAA TTC Cgg TTC CAg CAC gCT gAT TCC |
| xcc-b100_0841 (<i>suxR</i>) | 1-0653 | 5'CgT gAA gCT TTg gTg gCC ggg TgT ggT CCT |
| | 2-0653 | 5'ACT AgC ggg ATC CAg CCA CgC CTT gCg gTg gCg gTC gCT T |
| | 3-0653 | 5'CgT ggC Tgg ATC CCg CTA gTA CCg CgT gCC gCA ggA CAT T |
| | 4-0653 | 5'gCg TgA ATT CgT gCg CgA CAT gCC ACC gAC AA |
| xcc-b100_1971 | 1551 1 k | 5'CgC ggA AgC TTg gTg CAg gAC CAT gCT ggT T |
| | 1551 2 s | 5'ACC TAC Agg ATC CgT Cgg CCg CgA TAC CgT ggC AAT ggA g |
| | 1551 3 s | 5'gCC gAC ggA TCC TgT Agg TgA Cgg CAT CCg CCA ATT gCT |
| | 1551 4 k | 5'CgC ggC gAA TTC TAC gTC gCg TTC TCg gAg gT |
| xcc-b100_1703 | 1324 1 s | 5'CgC CAA gCT TTg CCg TCg ggA AgC gTA ATg |
| | 1324 2 s | 5'gCT gCA Tgg ATC CgT CAC gCC Tgg Cgg gTg TCC TCg TTC A |
| | 1324 3 s | 5'gCg TgA Cgg ATC CAT gCA gCg ACC AgC AgT ggC CTg CAA C |
| | 1324 4 s | 5'CgT gCg AAT TCC ATg Cgg gCA TgA CgC AgA C |
| xcc-b100_1803 | 1406 1 s | 5'gCg TgA AgC TTg gCg CAg CAg ggT gAT gTg g |
| | 1406 2 s | 5'CgT CAg Cgg ATC CAT gCA gCg ACC gTT CCC gCT CCA TAT T |
| | 1406 3s | 5'gCT gCA Tgg ATC CgC TgA CgC CCg CAg gAC ggC TAT CTg A |
| | 1406 4s | 5'gCC gCg AAT TCT gCA gCg ACg AAC ggg ATA C |
| xcc-b100_0167 | 1-0115 | 5'CTC gAA gCT TgC TaC gAg CAC ggC TTC Tgg |
| | 2-0115 | 5'ACT AgC ggg ATC CAg CCA Cgg CAT CAg CgC CTC gAC CTT C |
| | 3-0115 | 5'CgT ggC Tgg ATC CCg CTA gTC gCg CCg gCA TCA ACA TCC C |
| | 4-0115 | 5'CgC TgA ATT CCC gCA TCg gCg ACg AAC Agg |
| xcc-b100_2232 (<i>rpoN2</i>) | 1813 1 s | 5'gCg gCA AgC TTC ATg AgC CAC CTC ACC TgA C |
| | 1813 2 s | 5'TgT CAg Agg ATC CCg TCg CCT gCC AgC Agg gCg TAg TCg T |
| | 1813 3 s | 5'ggC gAC ggg ATC CTC TgA CAg ggC ggg ATA Agg ACT ACT A |
| | 1813 4 s | 5'gCA Cgg AAT TCA gCC CAC CAT CAC CgC CAT C |

Oligonukleotide Plasmidintegration

| Zielgen | Bezeichnung | Sequenz 5'→3' |
|-----------------------------------|-------------|---|
| xcc-b100_1358 (<i>rpoN1</i>) | 1050 1 | 5'gCC Tgg AAT TCg CCC ggC TCC AgA CAT CgT T |
| | 1050 2 | 5'AgC gTg TAC Agg TgA gCA CTT Cgg CCT CgT |
| xcc-b100_1710 (<i>ihfA</i>) | 3-S3 1331 | 5'TCg gCC TgA ACA AgC gTg Ag |
| | 4-S3 1331 | 5'CgA gCC TgC AgC CTC CAC CCg TTC CTT gAg T |
| xcc-b100_1711 | 1-S2 1332 | 5'ggC CgA ATT CCg ggC AgT AAT CgC gAg CTA |
| | 2-S2 1332 | 5'gCC ACT gCA gAg CTC CAT gCg CAC CTg CTT |
| xcc-b100_2513 | 5-S4 2513 | 5'Tgg gCg AgC Tgg AAT TCg Ag |
| | 2513 BsrGI | 5'CgT gTg TAC ATC CAT CCg CAC gCC CAA TTC |

Oligonukleotide

| Bezeichnung | Sequenz 5'→3' |
|---------------|--------------------------------------|
| M13 uni (-43) | 5'Agg gTT TTC CCA gTC ACg ACg TT 3' |
| M13 rev (-49) | 5'gAg Cgg ATA ACA ATT TCA CAC Agg 3' |

Konstruierte Plasmide

| Bezeichnung | Eigenschaft | Referenz |
|--------------------------------------|---|---------------------------------|
| pK18mobGIIΔ <i>xcc</i> -b100_1803 | <i>Bsr</i> GI- <i>Eco</i> RI Fragment der Kodierregion <i>xcc</i> -b100_1803 | Bachelorarbeit J. Nikolaidis |
| pK18mobGIIΔ <i>suxR</i> | enthält ein 2-kb <i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III Fragment der Kodierregion von Nukleotid 1128 bis 2019 relativ zu TSS | diese Arbeit |
| pK18mobGIIΔ <i>xcc</i> -b100_0785 | enthält ein 2-kb <i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III Fragment der Kodierregion von Nukleotid 1123 bis 1970 relativ zu TSS | diese Arbeit |
| pK18mobGIIΔ <i>xcc</i> -b100_4306 | enthält ein 2,1-kb <i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III Fragment der Kodierregion von Nukleotid 1170 bis 2092 relativ zu TSS | diese Arbeit |
| pK18mobGIIΔ <i>xcc</i> -b100_0167 | enthält ein 2-kb <i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III Fragment der Kodierregion von Nukleotid 1184 bis 1841 relativ zu TSS | diese Arbeit |
| pK18mobGIIΔ <i>xcc</i> -b100_1703 | enthält ein 1,1-kb <i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III Fragment der Kodierregion von Nukleotid 1126 bis 2029 relativ zu TSS | diese Arbeit |
| pK18mobGIIΔ <i>xcc</i> -b100_1971 | enthält ein 1-kb <i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III Fragment der Kodierregion von Nukleotid 1071 bis 1949 relativ zu TSS | diese Arbeit |
| pK18mobGIIΔ <i>rbsR</i> | <i>Pst</i> I- <i>Eco</i> RI Fragment mit einer Deletion in der Kodierregion <i>xcc</i> -b100_1803 | Bachelorarbeit J. Nikolaidis |
| pK18mobGIIΔ <i>xcc</i> -b100_1019 | enthält ein 2-kb <i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III Fragment der Kodierregion von Nukleotid 1141 bis 1871 relativ zu TSS | diese Arbeit |
| pK18mobGIIΔ <i>rpoN2</i> | enthält ein 2-kb <i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III Fragment der Kodierregion von Nukleotid 1141 bis 1871 relativ zu TSS | diese Arbeit |
| pK19mob2ΩHMB:: <i>ihfA</i> | enthält ein 0,27 kb <i>Pst</i> I- <i>Eco</i> RI Fragment aus der Kodierregion von Nukleotid 16 bis 280 | diese Arbeit |
| pK19mob2ΩHMB:: <i>xcc</i> -b100_2513 | enthält ein 0,4 kb <i>Pst</i> I- <i>Bsr</i> GI Fragment aus der Kodierregion von Nukleotid 1571 bis 1931 relativ zu TSS | diese Arbeit |

| | | |
|------------------------------|--|--------------|
| pK19mob2ΩHMB::xcc-b100_1711 | enthält ein 0,3 kb <i>PstI-EcoRI</i> Fragment aus der Kodierregion von Nukleotid 11 bis 311 relativ zu TSS | diese Arbeit |
| pK19mob2ΩHMB :: <i>rpoNI</i> | Enthält ein 0,5 kb <i>EcoRI-BsrGI</i> Fragment aus der Kodierregion von Nukleotid 1007 bis 1500 relativ zu TSS | diese Arbeit |

Konstruierte Stämme

| Bezeichnung | Eigenschaft | Referenz |
|--|---|---------------|
| XccB100Δxcc-b100_4306 | Markerfreie Deletion in xcc-b100_4306 Sm ^R | diese Arbeit |
| XccB100Δxcc-b100_1803 | Markerfreie Deletion in xcc-b100_1803 Sm ^R | J. Nikolaidis |
| XccB100Δ <i>suxR</i> | Markerfreie Deletion <i>suxR</i> Sm ^R (xcc-b100_0841) | diese Arbeit |
| XccB100Δ xcc-b100_0785 | Markerfreie Deletion xcc-b100_0785 Sm ^R | diese Arbeit |
| XccB100Δ xcc-b100_1019 | Markerfreie Deletion xcc-b100_1019 Sm ^R | diese Arbeit |
| XccB100Δ xcc-b100_0167 | Markerfreie Deletion xcc-b100_0167 Sm ^R | diese Arbeit |
| XccB100Δ xcc-b100_1703 | Markerfreie Deletion xcc-b100_1703 Sm ^R | diese Arbeit |
| XccB100Δ <i>rbsR</i> | Markerfreie Deletion in <i>rbsR</i> Sm ^R (xcc-b100_4342) | J. Nikolaidis |
| XccB100Δxcc-b100_1971 | Markerfreie Deletion in xcc-b100_1971 Sm ^R | diese Arbeit |
| XccB100::pK19Ω <i>ihfA</i> | Plasmidintegration <i>ihfA</i> Sm ^R + Km ^R (xcc-b100_1019) | diese Arbeit |
| XccB100::pK19Ωxcc-b100_1711 | Plasmidintegration xcc-b100_1711 Sm ^R + Km ^R | diese Arbeit |
| XccB100::pK19Ωxcc-b100_2513 | Plasmidintegration xcc-b100_2513 Sm ^R + Km ^R | diese Arbeit |
| XccB100Δ <i>rpoN2</i> | Markerfreie Deletion in <i>rpoN2</i> (xcc-b100_1711) Sm ^R | diese Arbeit |
| XccB100::pK19Ω <i>rpoNI</i> | Plasmidintegration <i>rpoNI</i> Sm ^R + Km ^R (xcc-b100_1358) | diese Arbeit |
| XccB100Δ <i>rpoN2</i> ::pK19Ω <i>rpoNI</i> | Doppelmutante: markerfreie Deletion in <i>rpoN2</i> (xcc-b100_1711) und Plasmidintegration xcc-b100_1358 <i>rpoNI</i> Sm ^R + Km ^R | diese Arbeit |

Chemikalien und Verbrauchsmaterial

| Chemikalien/Verbrauchsmaterial | Hersteller/Bezugsquelle |
|--------------------------------|-------------------------|
| 2-Mercaptoethanol | Roth |
| β- Mercaptoethanol | Sigma |
| Aceton | Roth |
| Agarose | Life technologies |
| Agar | Invitrogen |
| Agarose | Peqlab |
| Ammoniumchlorid | Merck |

| Chemikalien/Verbrauchsmaterial | Hersteller/Bezugsquelle |
|---|--------------------------------|
| Ammoniumcarbonat | Merck |
| Ammoniumhydrogencarbonat | Fluka |
| Antibiotika Serva | Antibiotika Serva |
| Borsäure | Merck |
| BSA | Sigma |
| BPB (Bromphenolblau) | Serva Electrophoresis GmbH |
| Brenztraubensäure | Fluka |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O Calciumchlorid | Merck |
| Ca-Panthenat/ Panthothensäure | Sigma |
| Casaminoacids | DIFCO Laboratories |
| Casein (hydrolysiert) | Merk |
| Dialyse Slide-A-Lyzer MINI Einheiten | Thermo Scientific |
| DNA Längenmarker | MBBL Dr. Bartling GMBH |
| Dimethylformamid DMF | Merck |
| dNTPs | PeqLab |
| EDTA Titriplex | Merck |
| Essigsäure | Roth |
| Ethidiumbromid | Serva |
| Einwegküvetten | Brand, Sarstedt |
| Ethanol | Roth |
| FeCl ₃ · 6H ₂ O (Eisen(III)chlorid) | Merck |
| FeSO ₄ | Merck |
| Formaldehyd 37% (v/v) | Roth |
| Fructose | Serva |
| Glucose | Merck |
| Glycin | Bio Rad |
| Glycerin | Merck |
| Harnstoff | Merck |
| Hefeextrakt | Oxoid LTD |

| Chemikalien/Verbrauchsmaterial | Hersteller/Bezugsquelle |
|---|----------------------------|
| IPTG | Roth |
| Iodacetamid | Sigma |
| Kalium-Acetat | Merck |
| Kanamycin | Serva |
| K_2HPO_4 (Dikaliumhydrogenphosphat) | Merck |
| KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat) | Merck |
| KNO_3 Kaliumnitrat | Merck |
| Kristallviolett | Sigma |
| LB | Invitrogen |
| L-Cystein HCl | Merck |
| Natriumhydroxid | Merck |
| $(NH_4)_2SO_4$ | Merck |
| Magnesium- Acetat | Merck |
| Malzextrakt | Fluka |
| $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Magnesiumchlorid) | Merck |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Magnesiumsulfat) | Merck |
| Microcon YM30 Filter | Millipore |
| Methanol | Roth |
| Mikrotiterplatte | Greiner Labortechnik |
| Na-Acetat | Merck |
| Na_2CO_3 (Natriumcarbonat) | Merck |
| NaCl (Natriumchlorid) | Merck |
| Na_2HPO_4 (Natriumdihydrogenphosphat) | Merck |
| NaOH | Merck |
| NH_4Cl (Ammoniumchlorid) | Merck |
| Nitrozelluloseacetatfilter 0,2 μ m | Sartorius AG |
| Parafilm | Pechiney Plastic Packaging |
| PCR ReaktionsgefäÙe | Biozym, Starlab |
| Pepton | Difco |

| Chemikalien/Verbrauchsmaterial | Hersteller/Bezugsquelle |
|---|--------------------------------|
| Petrischalen | Greiner |
| PE-Röhrchen (12 und 50 ml) | Greiner, Sarstedt |
| Phenotype Micro Array Kohlenstoffverwertung | Biolog |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml | Brand, Sarstedt |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml RNase frei | Eppendorf |
| Salzsäure | Roth |
| Schwefelsäure p.a. | Roth |
| SDS (Sodium Dodecylsulfat) | Serva Electrophoresis GmbH |
| Sterilfilter | Whatman |
| Stärke löslich | Merck |
| Streptomycin | Serva Electrophoresis GmbH |
| Silbernitrat AgNO ₃ | Merck |
| Thiamin | Sigma |
| Thioharnstoff | Merck |
| Thiosulfat | Merck |
| Tris (hydroxymethyl)-aminomethan | MP Biomedicals |
| Triton X-100 | Sigma |
| Trypton | Oxoid LTD |
| X-Gal | Roth |
| Xylose | Merck |
| Zinkchlorid | Merck |

Enzyme

| Enzyme und Proteine | Hersteller/Bezugsquelle |
|--|--------------------------------|
| BioScript Reverse Transkriptase | Bioline |
| Phusion DNA Polymerase und Puffer | Finnzymes |
| Restriktionsendonukleasen- und Puffer | New England Biolabs, Fermentas |
| RNase freie DNase | Qiagen |
| RNaseOUT rekombinanter RNase-Inhibitor | Invitrogen |
| T4 DNA Ligase und Puffer | Fermentas |
| Taq-Polymerase | Peqlab |

Verwendete Kits

| Kit | Hersteller |
|-------------------------------------|---------------|
| CyScribe™ GFX Purification Kit | GE Healthcare |
| Microcon Centrifugal Filter Devices | Millipore |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | Qiagen |
| QIAquick PCR Purification Kit | Qiagen |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen |
| Biolog Phenotype Array PM1 | Biolog |

Software

| Programm | Verwendung/ Referenz |
|---|---|
| EMMA 2.4 Centrum für Biotechnologie, Universität Bielefeld | Programm zur Microarray-Datenauswertung, Dondrup et. al. 2003 |
| GenDB Centrum für Biotechnologie, Universität Bielefeld | Genomdatenbank, Meyer et. al. 2003 |
| Genesis 1.6 Institut für Genomik und Bioinformatik, TU Graz, | Programm zur Clusteranalyse, Sturn et. al. 2002 |
| ImaGene 6.0 Biodiscovery Inc. | Programm zur Microarray-Datenauswertung |
| Dialign | Alignments, Morgenstern et al., 2004 |
| Clone Manager , Scientific Educational Software | & Oligonukleotid Design |
| Office 2002 | Programmpaket zur Bearbeitung von Tabellen, Grafiken und Word-Dokumenten, Microsoft |

C.1.2 Nährmedien und Zusätze

Bioreaktor Medium

| | |
|---------------------------------------|-------------------------|
| Glukose Monohydrat | 10-20 g·l ⁻¹ |
| K ₂ HPO ₄ | 1 g·l ⁻¹ |
| MgSO ₄ * 7H ₂ O | 0,15 g·l ⁻¹ |

| | |
|--------------------------------|--------------------------|
| CaCl ₂ | 0,01 g·l ⁻¹ |
| ZnCl ₂ | 0,0033 g·l ⁻¹ |
| H ₃ BO ₃ | 0,003 g·l ⁻¹ |
| FeCl ₃ | 0,001 g·l ⁻¹ |
| NH ₄ Cl | 1,6 g·l ⁻¹ |

(Kolben mit M9 Minimalmedium 0,5% (w/v) Glukose, 4l Bioreaktor 10 g·l⁻¹ Glucose, 13l Bioreaktor 20 g·l⁻¹ Glukose)

M9 Minimal Medium

Lösung A

0,5 % (w/v) Glucose in 873 ml mehrfach deionisiertem Wasser (H₂O MilliQ)

Lösung B

| | |
|----------------------|----------------------------------|
| 85 g·l ⁻¹ | Na ₂ HPO ₄ |
| 30 g·l ⁻¹ | KH ₂ PO ₄ |
| 5 g·l ⁻¹ | NaCl |
| 10 g·l ⁻¹ | NH ₄ Cl |

Lösung C

| | |
|-----|-------------------|
| 1 M | MgSO ₄ |
|-----|-------------------|

Lösung D

| | |
|-------|-------------------|
| 0,1 M | CaCl ₂ |
|-------|-------------------|

Lösung E

2 % (w/v) Casaminoacids

Alle Lösungen werden einzeln autoklaviert und wie folgt zusammengegeben:

Lösung A + 100 ml Lösung B + 1 ml Lösung C + 1ml Lösung D + 25 ml Lösung E

Malzextrakt-Medium

| | |
|----------------------|-------------|
| 11 g·l ⁻¹ | Glukose |
| 5 g·l ⁻¹ | Pepton |
| 3 g·l ⁻¹ | Malzextrakt |
| 3 g·l ⁻¹ | Hefeextrakt |

TY- Medium

| | |
|---------------------|-------------|
| 5 g·l ⁻¹ | Trypton |
| 3 g·l ⁻¹ | Hefeextrakt |

0,7 g·l⁻¹ CaCl₂

LB(G)

10 g·l⁻¹ Trypton

5 g·l⁻¹ NaCl

3 g·l⁻¹ Hefeextrakt

(1 g·l⁻¹ Glukose)

R2A Medium

0,5 g·l⁻¹ Pepton

0,5 g·l⁻¹ Casaminoacids

0,5 g·l⁻¹ Hefeextrakt

0,5 g·l⁻¹ Glukose

0,5 g·l⁻¹ lösliche Stärke

0,3 g·l⁻¹ K₂HPO₄

0,05 g·l⁻¹ MgSO₄·7H₂O

0,3 g·l⁻¹ Brenztraubensäure

15 g·l⁻¹ Agar

pH Wert 7,2 ± 0,2 bei 25°C

Bromfieldplatten

400 mg·l⁻¹ Trypton

100 mg·l⁻¹ Hefeextrakt

67 mg·l⁻¹ CaCl₂

3 g·l⁻¹ Agar

Medienzusätze

| Zusatz | Konzentration |
|---------------|---------------------------|
| Streptomycin | 800 mg·l ⁻¹ |
| Kanamycin | 50 mg·l ⁻¹ |
| X-Gluc | 50- 80 mg·l ⁻¹ |

C.1.3 Lösungen und Puffer

Bioreaktor-Kultivierung

2M NaOH

4% (v/v) HCl

0,75% (w/v) KCl

Restriktionsspaltung

TAM-Spaltungspuffer (10x)

660 mM Ka-Acetat

100 mM Mg-Acetat (214,46 g/ mol)

330 mM Tris

5 mM DTT

1 mg· ml⁻¹ BSA

pH 7,9 mit Essigsäure einstellen

sterilfiltrieren

10x TAM-Spaltungspuffer (10ml)

0,65 g Ka-Acetat

0,21 g Mg-Acetat

0,4 g Tris

0,0077 g DTT

10 mg BSA

pH 7,9 mit Essigsäure einstellen

sterilfiltrieren

Agarose- Gelelektrophorese

Agaroselösung 1% (w/v)

1 g Agarose

100 ml TA-Puffer

Tris- Acetat Puffer (TA)

40 mM Tris- HCl

10 mM Na- Acetat

1 mM EDTA

pH 7,8

DNA- Ladepuffer

50 % (v/v) Glycerin in TA- Puffer

1 mM EDTA

2 mg · ml⁻¹ Bromphenolblau BpB

Ethidiumbromid- Färbelösung:

1 mg · l⁻¹ Ethidiumbromid

Transformation und Konjugation

100 mM IPTG in H₂O

20 mM X-Gal in DMF

Lösungen für die Xanthan-Quantifizierung über Monosaccharid-Bestimmung

H₂SO₄/L-Cystein-HCL

auf Eis stellen, abkühlen

+ 70 mg L-Cystein-HCl

86 ml H₂SO₄ 95-97% (v/v)

14 ml H₂O

Lösungen für den Biofilm-Test

1% (w/v) Kristallviolett

Lösungen für Microarray-Analyse

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 H₂O MP

250 µl Triton X-100

5 min bei 80 °C, danach auf Raumtemperatur (RT) abkühlen lassen

Waschpuffer 2

500 ml H₂O MP

50 µl 32 % (v/v) HCl

Waschpuffer 3

225 ml H₂O MP

Blocking-Puffer

150 ml H₂O MP

40 µl 32 % (v/v) HCl, 50 °C

+50 ml 4 x Nexterion Block E (Schott)

25 ml 1 M KCl

Methoden **C**

C.2.1 Bakterienkultivierung und -anzucht

C.2.1.1 Bakterienkonservierung in einer Glycerinkultur

Von einer in TY-Medium über Nacht („ü/N-Kultur“) bei 30°C inkubierten Kultur überführt man 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß und zentrifugiert 2 min bei 8000 rpm. Das Zellpellet wird in 500 µl TY-Medium resuspendiert und auf einer TY-Festmedium-Agarplatte ausgestrichen und wiederum im Brutschrank bei 30° C inkubiert. Der halbe Bakterienrasen wird steril in

500 µl TY-Medium und 500 µl Glycerin aufgenommen und bei -80°C gelagert. Um aus dieser Kultur neu anzupfen, reichen 100 µl Probe verteilt auf einer Petrischale mit Festmedium aus.

C.2.1.2 Bakterienanzucht im Flüssigmedium

Xanthomonas campestris pv. *campestris* B100 wird in Erlenmeyerkolben angezogen. Das Flüssigvolumen beträgt $\frac{1}{4}$ des Kolbenvolumens. Angeimpft werden die Kolben mit vorher kultivierten 10 ml „ü/N-Kulturen“ in Selektivmedium (Streptomycin $800\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Inokuliert wurde, wenn nicht anders angegeben mit einer Start- $\text{OD}_{580\text{nm}}$ von 0,02. Die Wachstumsparameter im orbitalen Schüttelinkubator betragen 30°C und 180 rpm.

C.2.2 Konstruktion der markerfreien Deletionsmutanten mittels „gene-*Splicing by Overlap Extensions (gene SOEing)*“ und Plasmidintegrationsmutagenese

C.2.2.1 „gene SOEing“ zur markerfreien Deletion

Zur Konstruktion der Deletionsmutanten in dem Wildtypstamm *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 wurde die Methode des „gene SOEing“ verwendet. In einer ersten PCR werden hierzu die stromaufwärts und stromabwärts flankierenden Sequenzbereiche des zu deletierenden Gens amplifiziert. Zunächst designt man die beiden äußeren Primer (forward-Primer der stromabwärts und reverse-Primer der stromaufwärts gelegenen Sequenz) so, daß sie je eine Restriktionsschnittstelle in der Sequenz generieren, um das PCR-Produkt in den Vektor klonieren zu können. Die beiden inneren Primer bestehen aus je einer 20nt langen „Annealing-Sequenz“ die komplementär zu dem zu amplifizierenden DNA-Bereich ist und einer 20nt langen „Extension-Sequenz“, die komplementär zu der jeweils anderen „Extension“ des inneren Primer ist. Dadurch besitzen die PCR-Produkte eine 20bp lange Überlappungsregion, in die eine Restriktionsschnittstelle eingefügt werden kann und die es in einer PCR ermöglicht aus den beiden einzelnen Amplifikaten ein fusioniertes PCR-Produkt herzustellen. In der ersten Amplifikationsrunde ohne weitere Zugabe der Primer dienen sich dabei die beiden Amplifikate gegenseitig als Primer und erzeugen so die gewünschte Matrize,

die dann nach Zugabe der beiden äußeren Primer amplifiziert wird. Die Restriktionsschnittstelle innerhalb der „Extensions“ dient zum Beispiel dem Einfügen einer Antibiotika-Kassette.

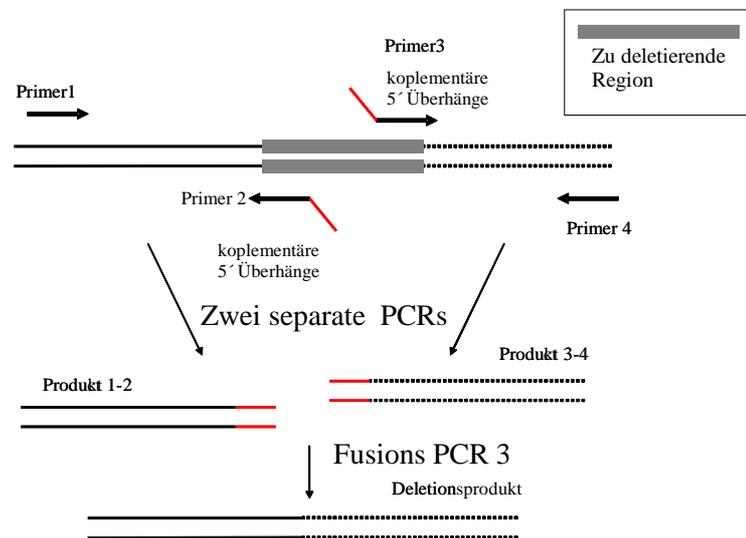


Abb.C.1: Schema zur Deletion der Gene mittels „gene-SOEing“ und den vier Primern zur Konstruktion der Deletionsmutanten (nach Iannelli und Pozzi, 2004). Primer 2 und 3 tragen komplementäre 5'-Extensions, die es ermöglichen die Amplifikate in einer weiteren PCR zu fusionieren.

Die PCR-Produkte wurden in den in *Xanthomonas* nicht replizierbaren Vektor pK18mobGII kloniert und dieses Plasmid durch Konjugation aus *E. coli* S17-1 in den Wildtyp mobilisiert. Nach Selektion auf die Streptomycin-Resistenz (Wildtypresistenz) und die durch den Vektor vermittelte Kanamycin-Resistenz sollte das Plasmid in den Transkonjuganten durch Einfachrekombination (*single cross over*) im Chromosom integriert vorliegen. Diese Transkonjuganten wurden in TY-Flüssigmedium ohne Antibiotikum angezogen und auf mit dem Cyclohexylammoniumsalz der 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Beta-D-Glucuronsäure (X-gluc) supplementierten TY-Platten mit dem Ziel kultiviert, den nicht integrierten Vektoranteil zu verlieren. Aus den Kulturen können Einzelkolonien isoliert werden, die keine β -Glucuronidase (GUS) Aktivität und Kanamycin-Resistenz aufweisen und somit den Vektoranteil verloren haben.

C.2.2.2 Plasmidintegrationsmutagenese

Bei der Plasmidintegrations-Mutagenese wird ein DNA-Fragment aus der Kodierregion des zu deletierenden Gens mittels PCR amplifiziert und in einen in *E. coli* mobilisierbaren Vektor kloniert. Durch Konjugation kann dieser Vektor nach Xcc transferiert werden. Da die verwendeten Vektoren in Xcc nicht repliziert werden, kann durch eine Selektion auf die Vektor vermittelte Antibiotika- Resistenz Kanamycin auf eine Integration des Vektors durch ein einfaches homologes Rekombinationsereignis in das Genom von Xcc selektioniert werden. Die Integration des Vektors unterbricht das Zielgen und verursacht somit eine Plasmidintegrations-Mutante.

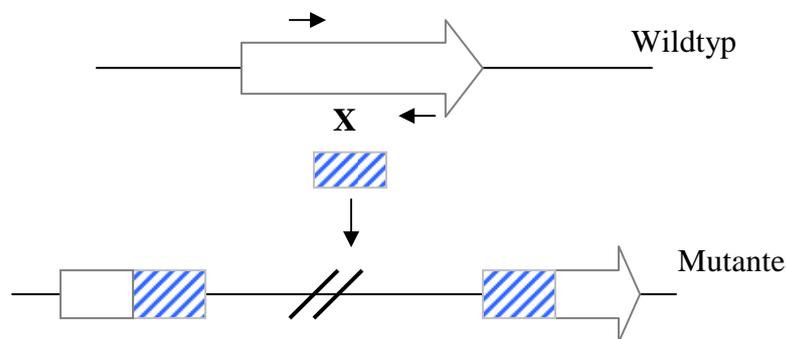


Abb.C.2: **Plasmidintegrations-Mutagenese.** Das zu mutierende Gen ist als offener Pfeil dargestellt, die Primer als schwarze, geschlossene Pfeile. Durch einfaches homologes cross-over integriert der Vektor ins Genom und unterbricht dabei die Kodierregion des Gens.

C.2.2.3 Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Die Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) erlaubt den Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte im Genom eines Organismus. Dazu benötigt man gerade soviel Sequenzinformation, um zwei Oligonukleotide (Primer) mit einer Länge von ca. 20 Nukleotiden herzustellen, deren Enden an dem zu amplifizierenden Fragment liegen. Des Weiteren benötigt man ein Template, die vier Desoxynukleotide, eine DNA-Polymerase (z.B. die Taq von *Thermophilus aquaticus*) und einen Puffer, der Mg^{2+} -Ionen als Cofaktor enthält. Im ersten Schritt wird das Template zunächst denaturiert. Im nächsten Schritt erfolgt die Hybridisierung („Annealing“) der Primer an das nun einzelsträngige Template. Dies geschieht bei einer um ca. 5°C niedrigeren Schmelztemperatur der Primer, da dies das effizienteste Ergebnis liefert. Beim Temperaturoptimum der Taq-Polymerase von 72°C erfolgt die Polymerisation. Durch einen

nukleophilen Angriff des 3'-OH Endes der Primer wird ein zur Matrize komplementärer Strang synthetisiert. Dieser Zyklus wird 35-mal wiederholt, was eine exponentielle Zunahme der nachzuweisenden DNA zur Folge hat.

PCR Ansatz:

| | |
|-------------------------------|----------|
| <i>X. campestris</i> Zellysat | : 1,0 µl |
| 10fach TA-Puffer: | 5,0 µl |
| DMSO | 4,0 µl |
| dNTPs (10 mM): | 2,0 µl |
| Primer 1 (0,25 µM) : | 1,0 µl |
| Primer 2 (0,25 µM): | 1,0 µl |
| Taq, Thermolase: | 2U |
| H ₂ O (steril): | = 50 µl |

PCR Protokoll:

95°C 03:00 min,
95°C 01:00 min,
55°C 01:00 min,
72°C 02:00 min,
Zurück zu Stufe 2 (20 bis 35-mal),
72°C 7:00 min,
bei 8°C lagern.

Alternativ zum „gene-SOEing“ (Horton et al., 1989) und der dem Prinzip zu Grunde liegenden Fusion der Einzel-PCR-Fragmente in einer dritten Fusions-PCR, wurde für einige Gene jedes Fragment nacheinander in den Vektor kloniert oder die Plasmidintegration als Mutagenese gewählt.

C.2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem „Plasmid DNA Purification Kit“ von Macherey-Nagel (Düren)

Plasmid-DNA aus *E. coli*-Suspensionskulturen wurden mit dem Nucleospin Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) isoliert. Es wurden die mitgelieferten Puffer und Lösungen

des Herstellers benutzt. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt hierbei prinzipiell durch Bindung an eine Kieselgelmatrix in Spinsäulchen.

- 1-5 ml einer ü./N.-Kultur 30 sek bei 11000 g zentrifugieren, den Überstand möglichst komplett verwerfen.
- Pellet vollständig in 250 µl Puffer A1 durch kräftiges Vortexen resuspendieren.
- Zugabe von 250 µl Puffer A2, 6-8 mal invertieren (keinesfalls vortexen) (Puffer A2 evtl. einige Minuten bei 30-40°C erwärmen und gut schütteln).
- Inkubation von maximal 5 min bei RT.
- Zugabe von 300 µl Puffer A3, 6-8 mal invertieren (keinesfalls vortexen).
- Zentrifugation für 5-10 min bei 11000 g bei RT.
- Die Nucleo Spinsäulchen in ein 2 ml Sammelröhrchen stecken und den Überstand auf die Säulchen geben. Zentrifugation für 1 min bei 11000 g.
- Das Eluat verwerfen und 600 µl Puffer A4 auf die Säulchen geben, erneutes zentrifugieren für 1 min bei 11000 g.
- Das Eluat verwerfen und die Säulchen durch erneute Zentrifugation für 2 min bei 11000 g trocknen.
- Die Säulchen in ein 1,5 ml Mikrozentrifugationsröhrchen stecken und 50 µl Puffer AE zugeben. Inkubation für 1 min bei RT und anschließende Zentrifugation für 1 min bei 11000 g (dieser Schritt kann wiederholt werden, um die absolute Menge an Plasmid-DNA zu steigern, die Konzentration sinkt jedoch).

C.2.2.5 Quantifizierung und Lagerung der Plasmid-DNA

Um die Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung zu bestimmen, kann die Absorption eines geeignet verdünnten Aliquots (20- bis 50fach) bei 260 nm und 280 nm gemessen werden. Eine A_{260} -Einheit entspricht dabei 50 µg DNA/ml. Die Konzentration berechnet sich demnach wie folgt:

$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}) = \text{Absorption}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

C.2.2.6 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des *QIAquick-spin PCR Purification Kits* (Qiagen). Die verwendeten Lösungen stammen alle aus dem Kit.

- 5 Volumen Puffer PB zu 1 Volumen PCR-Reaktionsansatz geben.
- QIAquick Säule in 2 ml Sammelgefäß einsetzen.
- Gemisch aus Puffer PB und Reaktionsansatz auf die Säule geben, 30-60 s bei 13000 rpm zentrifugieren (Bindung der DNA).
- Durchlauf verwerfen, Säule in selbes Sammelgefäß setzen.
- zum Waschen 750µl Puffer PE auf die Säule geben, 30-60 s bei 13000 rpm zentrifugieren.
- Durchlauf verwerfen, Säule in selbes Sammelgefäß zurücksetzen und 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren.
- Säule in neues Eppendorfgefäß setzen.
- DNA mit 50 µl Puffer EB oder H₂O von der Säule eluieren, dazu 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren (alternativ für erhöhte DNA Konzentration 30 µl Puffer direkt auf die Membran der Säule geben, 1 min inkubieren und dann für 1 min zentrifugieren).

C.2.2.7 Nachweis der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese

Plasmid-DNA, DNA-Fragmente und PCR-Produkte können in Agarose-Gelen ihrer Größe nach aufgetrennt und durch anschließende Färbung mit Ethidiumbromid und UV-Licht Detektion sichtbar gemacht werden. Die Wandergeschwindigkeit eines DNA-Fragments in einem Gel ist umgekehrt proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichts. Die Größenbestimmung erfolgte durch einen Vergleich mit den Laufstrecken der DNA-Fragmente eines DNA-Längenstandards. Die angelegte Spannung richtet sich nach Größe und Agarosekonzentration des Gels und variiert zwischen 60 und 80 V. Die Laufdauer richtet sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente und liegt zwischen 30 min und 3 h.

- Taschenformer in den Gelträger positionieren und die aufgekochte Agaroselösung in den Gelträger gießen.
- Gelträger mit erstarrter Agarose in die Gelkammer legen und mit TA-Puffer

überschichten.

- Den Taschenformer aus dem Gel ziehen und die DNA-Proben zusammen mit DNA- Ladepuffer in die entstandenen Taschen pipettieren, anschließend Spannung anlegen.
- Nach beendeter Elektrophorese das Agarosegel aus dem Gelträger entfernen und für 1 bis 2 min in der Ethidiumbromid- Färbelösung färben.
- Das Agarosegel wird für 5 bis 10 min im Wasserbad entfärbt.
- Die gefärbten DNA-Banden werden unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und mit einer CCD-Kamera dokumentiert.

C.2.2.8 Restriktionsspaltung von DNA

Für die jeweiligen Restriktionsenzyme idealen Pufferbedingungen werden durch Zugabe von 10fach konzentriertem Restriktionspuffer hergestellt. Wenn die jeweiligen Restriktionsenzyme im selben Restriktionspuffer arbeiten können Doppel- und Mehrfachspaltungen in der Regel gleichzeitig durchgeführt werden. Ansonsten wird zwischen den einzelnen Reaktionsschritten der Spaltungspuffer nach einer Ethanol-Fällung gewechselt. Die Spaltung von Plasmid- bzw. Gesamt-DNA erfolgt nach Empfehlung des Herstellers der entsprechenden Restriktionsendonukleasen.

Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 10 µl):

250 ng - 1 µg DNA

1 µl 10x Puffer

0,3 - 0,5 µl Enzym (2-5 U)

auf 10 µl H₂O bidest. auffüllen.

- 1-2 h bei 37°C inkubieren.
- Zur Inaktivierung 20 min bei 65°C inkubieren und durch wiederholtes Einfrieren bei -80 °C (*Bam*HI 80°C, *Hind*III und *Eco*RI 65°C).

Ethanol-fällung

- Zugabe von $\frac{1}{20}$ Vol. 4M LiCl₂ zum DNA-Ansatz in Lösung.
- Zugabe von 3 Vol. an EtOH (LiCl₂- Fällung, -20°C) gründlich mischen.

- 30-60 min bei -20°C inkubieren.
- 20 min bei 13000 rpm bei RT zentrifugieren.
- EtOH quantitativ abziehen und Pellet bei 65°C trocknen, 5 min.
- DNA in gewünschter Menge H₂O aufnehmen.

DNA-Fällung von Spaltungsansätzen

- x µl Vektor- Spaltungsansatz.
- x µl Insert-Spaltungsansatz.
- $\frac{1}{20}$ Vol 4 M LiCl₂
- 3 bis 4 Vol absolut EtOH (-20°C)
- 10 min bei -70°C
- 15 min bei 13000 rpm.
- Überstand abziehen und DNA bei 60°C trocknen (5-10 min).
- In entsprechendem Vol H₂O lösen für Ligation:

17,5 µl H₂O

2 µl Lig-Puffer

0,5 µl Ligase

C.2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Gespaltene DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden, können durch das Enzym T4-Ligase miteinander verknüpft werden. Dazu wird die zu ligierende DNA in einem geeigneten Verhältnis gemischt: Vektor- und Insert-DNA sollten in einem Verhältnis von 1:2 vorliegen.

Ligationsansatz (Gesamtvolumen 20 µl):

20 ng Vektor-DNA

X ng Insert-DNA („sticky ends“: 3-fache Stoffmenge der Vektor-DNA; „blunt ends“: 5-fache Stoffmenge)

2,0 µl 10x T4-Ligase-Puffer

1,0 µl T4-Ligase (1-2 U)

auf 20µl H₂O bidest. auffüllen

Der Ligationsansatz wird für mindestens 2-3 h bei RT inkubiert oder ü./N. in einem Temperaturgradienten (20°C → 14°C).

C.2.2.10 Transformation

Durch Transformation können kompetente *E. coli* Zellen freie zirkuläre Plasmid-DNA aufnehmen. Die *E. coli* Zellen müssen durch eine CaCl_2 -Behandlung kompetent gemacht werden.

Herstellen kompetenter Zellen (*E. coli*)

- 10 ml einer logarithmischen *E. coli*-Kultur ($\text{O.D.}_{600} = 0,6$) 5 min. bei 6000rpm abzentrifugieren.
- Pellet in 100 mM CaCl_2 -Lösung (4°C) resuspendieren.
- Inkubation bei 0°C für 30 min.
- 5 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugieren.
- Pellet in 1 ml 100mM CaCl_2 -Lösung (4°C) resuspendieren.
- für eine Lagerung kompetenter Zellen bei -70°C werden zu 850 μl kompetenter Zellen 150 μl 87% (w/v) Glycerin zugegeben.

Transformation

- 200 μl kompetente Zellen werden mit 20-100 ng der zu transformierenden Plasmid-DNA vermischt, Ansatz 30 min auf Eis stehen lassen.
- Hitzeschock: Ansatz 3 min bei 43°C im Wasserbad inkubieren.
- Zugabe von 700 μl LBG Medium, vermischen.
- Regenerieren der Zellen bei 37°C für ca. 45 min.
- Ausplattieren der Suspension in geeigneten Verdünnungen auf Selektionsmedium mit IPTG und X-Gal (Blau-Weiß-Selektion)
- Inkubation bei 37°C ü./N.

C.2.2.11 Überprüfung der eingebrachten Mutationen

Nach Transformation der Plasmide mit entsprechendem Insert nach *E.coli* DH5 α werden die Klone durch Blau-Weiß-Selektion auf Kanamycin-Selektionsmedium isoliert. Nach erfolgter Plasmidisolierung, Einfach- und Mehrfachrestriktion z.B. mit den Endonucleasen *Eco*RI und *Hind*III werden die Plasmide mit korrekter Restriktionsanalyse sequenziert (one-shot, uni und rev primer bei pUC Derivat). Durch Alignment überprüfte Plasmide werden zur

Transformation nach *E. coli* S17-1 und Konjugation nach *Xanthomonas campestris* eingesetzt.

C.2.2.12 Konjugation

Der Transfer eines Plasmids von einer Donor- in eine Rezipientenzelle wird als Konjugation bezeichnet. Voraussetzung für die Konjugation sind Transferfunktionen und eine Mobilisierungsregion (*mob*-Region). Plasmide, die nur über eine *mob*-Region verfügen, können durch einen Donorstamm mobilisiert werden, der die Transferfunktionen zur Verfügung stellt. Ein solcher Donor ist *E. coli* S17-1, der ein im Chromosom integriertes RP4-Derivat trägt, das die Transferfunktion vermittelt (Simon et al., 1983).

- Mischen von $5 \cdot 10^7$ Zellen logarithmischer Donorkultur mit $2 \cdot 10^8$ Zellen stationärer Rezipientenkultur.
- Abzentrifugieren der Zellen bei 4000 rpm.
- Überstand abgießen und Zellen im Rücklauf resuspendieren.
- Kreuzungsgemisch auf Nitrocellulosefilter (Porengröße: 0,45 μm) auf LBG Festmedium auftragen.
- Inkubation bei 30°C ü./N.
- Abschwemmen der Kreuzungsfilter in 1 ml TY-Flüssigmedium.
- Verdünnungsreihe anlegen und auf Selektionsmedium ausplattieren.
- Inkubation bei 30°C.

| Bakteriengattung | O.D. ₆₀₀ = 0,1 entspricht |
|-------------------------------|--------------------------------------|
| <i>E. coli</i> | $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml |
| <i>Xanthomonas campestris</i> | 10^8 Zellen/ml |

C.2.2.13 Selektion auf homologe Rekombinationsereignisse

Nach Selektion auf die Streptomycin-Resistenz (Wildtypresistenz) und die Kanamycin-Resistenz des Vektors sollte das Plasmid in den Transkonjuganten durch

Einfachrekombination (*single cross over*) im Chromosom integriert vorliegen. Diese Transkonjuganten werden in TY-Flüssigmedium ohne Antibiotikum angezogen mit dem Ziel den nicht integrierten Vektoranteil zu verlieren und auf mit Cyclohexylammoniumsalz der 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Beta-D-Glucuronsäure (X-Gluc) supplementierten TY-Platten kultiviert.

- TY Platten mit Streptomycin $800 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ und $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ X-Gluc.
- Verdünnungsreihe: 10^{-6} bis 10^{-8} .
- Platten für ca. eine Woche bei 4°C lagern bis eine Farbveränderung zu erkennen ist.

Aus den Kulturen konnten Einzelkolonien isoliert werden, die keine β -Glucuronidase-Aktivität und keine Kanamycin-Resistenz aufwiesen und somit den Vektoranteil verloren hatten. Die Zeitspanne von einer Woche bis zu einer erkennbaren Farbveränderung bei *Xanthomonas* könnte an der Zellhüllkomposition liegen, die es chromogenen Substanzen erschwert diese Zellhülle zu passieren.

Die korrekte Homogenisierung wird mit aussenliegenden Oligonukleotiden in einer PCR und über die eingebrachte Restriktionsschnittstelle *Bam*HI überprüft.

C.2.3 Xanthan-Quantifizierung über Monosaccharid-Bestimmung

In zellfreiem Überstand einer Xcc Kultur kann nach Dialyse mittels Säurehydrolyse der Monosaccharidgehalt der Probe bestimmt werden. Der Monosaccharidgehalt ist direkt proportional zu dem Xanthangehalt in der Probe und wird im folgenden als Xanthangehalt gleichgesetzt.

- Zellen abzentrifugieren 20 min 8000 rpm
- 10- 20 ml Überstand für 4 Tage bei 4°C gegen MilliQ-Wasser dialysieren (Dialyseschläuche MWCO 14000 Da). Wasser täglich wechseln.
- Kohlenhydratbestimmung im dialysierten Überstand (Für quantitative Vergleiche Volumenänderungen während der Dialyse beachten)
- 100 μl dialysierter Überstand + 2 ml $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{L}$ -Cystein-HCL, vortexen
- auf Eis stellen, 4 min bei 100°C , dann auf Eis abkühlen

- Probe kurz an RT anpassen und o.D._{415 nm} gegen Blindprobe messen
- Kalibrierkurve mit Glukose-Lösungen bekannter Konzentration

Für die Bioreaktor- Kultivierung wurde die Dialyse in Thermo Scientific Slide-A-Lyzer MINI Dialyse Einheiten durchgeführt.

- 1,5 ml Zellkultur werden für 5min. bei 13000 rpm zentrifugiert
- 100 µl zellfreier Überstand in Reaktionsgefäß überführen und 48h gegen H₂O MilliQ bei 4°C dialysieren
- Als Kontrolle dient das im Bioreaktor benutzte Medium

C.2.4 Microarray-Technologie

C.2.4.1 RNA-Isolierung

- Zellpellet in 200 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8, 0) resuspendieren
- Zellsuspension in vorgekühlte FastPROTEIN™ BLUE tubes (Q BIOgene) gefüllt mit 700 µl RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) und β-Mercaptoethanol (10 µl/ml RLT-Puffer) überführen
- Zellen werden im Ribolyser (Hybaid) 30 sek. bei Stufe 6,5 aufgeschlossen
- Inkubation für 3 min. auf Eis
- Zentrifugation für 3 min. bei 13000 x g und 4°C
- Überstand in neue Minireaktionsgefäße überführen
- Zentrifugation für 3 min. bei 13000 x g und 4°C
- Überstand in 12 ml PE- Röhrchen überführen und das 0,55 fache Volumen 98 % (v/v) EtOH hinzugeben
- 700 µl auf RNeasy-Säule geben und Zentrifugation für 30 sek. bei 13000 x g
- Durchfluß verwerfen und Säule in ein neues Auffanggefäß überführen
- 500 µl RW1- Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) auf die Säule geben
- Zentrifugation für 30 sek. Bei 13000 x g und Durchfluß verwerfen
- 500 µl RPE-Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) auf die Säule geben

- Zentrifugation für 30 sek. bei 13000 x g und Durchfluß verwerfen
- 500 µl RPE-Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) auf die Säule geben
- Zentrifugation für 30 sek. bei 13000 x g und Durchfluß verwerfen
- Säulchen trocknen indem man für 2 min. bei 13000 x g zentrifugiert
- Säule in ein neues Minireaktionsgefäß überführen
- 30 µl RNase freies Wasser auf die Säule geben, 1 min. bei Raumtemperatur inkubieren und dann 1 min. bei 13000 x g eluieren
- Eluation wiederholen
- Mix aus 3 µl DNase (RNase free DNase Set, Qiagen) und 6 µl RDD-Puffer (RNase free DNase Set, Qiagen) zu 60 µl eluierter RNA hinzufügen
- Inkubation für 1 Stunde bei 30°C
- Eluate selber Proben können nun zusammengeführt werden
- zu 120 µl RNA werden 420 µl RLT-Puffer und 300 µl 98 % EtOH hinzugegeben
- 700 µl auf eine RNeasy-Säule geben und Zentrifugation für 30 sek. bei 13000 x g
- Durchfluß verwerfen
- Vorgang wiederholen bis kompletter Mix aus RNA, RLT-Puffer und EtOH über die Säule gegeben wurde
- 350 µl RW1-Puffer auf die Säule geben
- Zentrifugation für 30 sek. bei 13000 x g
- 10 µl DNase in 70 µl RDD-Puffer auf jede Säule geben und 15 min. bei Raumtemperatur inkubieren
- 350 µl RW1-Puffer auf die Säule geben und Zentrifugation für 30 sek. bei 13000 x g
- Durchfluß verwerfen und Säule in ein neues Auffanggefäß überführen
- 500 µl RPE-Puffer auf die Säule geben und Zentrifugation für 30 sek. bei 13000 x g
- Durchfluß verwerfen und 500 µl RPE-Puffer auf die Säule geben
- Zentrifugation für 30 sek. bei 13000 x g und Durchfluß verwerfen
- Säule in ein neues 1,5 ml Minireaktionsgefäß überführen
- 50 µl RNase-freies Wasser auf die Säule geben und 1 min. bei Raumtemperatur inkubieren
- Zentrifugation für 1 min. bei 13000 x g
- RNA kann bei - 80°C gelagert werden

Zur Kontrolle der Reinheit der RNA-Proben, kann diese auf ein 1 % Agarosegel, dem ein Tropfen Ethidiumbromid hinzugegeben wurde, aufgetragen werden. Die Auftrennung erfolgt bei 100 V für 15 Minuten. Die RNA Konzentration wird am Spectrophotometer (NanoDrop ND-1000) ermittelt, indem 1,2 µl der RNA-Probe eingesetzt wird. Neben der RNA-Konzentration ist das Gerät in der Lage die Reinheit der Probe zu bestimmen, indem neben der Konzentration auch das Absorptionsverhältnis 260/230 (Organische Komponenten, > 1,8) und 260/280 (Proteine, ~ 2,0) angezeigt wird.

C.2.4.2 Microcon Aufreinigung

- Für jede RNA-Probe ein Microcon-Säulchen präparieren
- Auffüllen der isolierten RNA auf ein Volumen von 500 µl mit RNase freiem DEPC behandeltem Wasser und auf die Microcon-Säule überführen
- Zentrifugation für 8,5 min. bei 12000 rpm, so daß am Ende der Zentrifugation 10 -30 µl auf der Säule verbleiben
- Durchfluß verwerfen
- wenn notwendig (weniger als 10 µl auf der Säule) müssen erneut 10 µl auf die Säule gegeben werden, 1 min. bei Raumtemperatur inkubieren und anschließend kurz zentrifugieren
- Säulchen umdrehen und in ein neues Auffanggefäß überführen
- Eluation für 1 min. bei 10000 rpm

Die RNA Konzentration wird wiederum am Spectrophotometer (NanoDrop ND-1000) ermittelt, indem 1 µl der isolierten RNA-Probe eingesetzt wurde.

C.2.4.3 Reverse Transkription der RNA

- 10 µg RNA-Probe werden mit RNasen freiem DEPC-behandeltem Wasser auf ein Volumen von 18,8 µl aufgefüllt
- 2 µl NH-Hexamere hinzugeben und für 10 min. bei 70°C inkubieren
- 5 min. auf Eis inkubieren

Während die Proben auf Eis inkubieren, wird ein Nukleotid-Mix, bestehend aus folgenden Komponenten, hergestellt:

- | | | |
|------------------------|-----|----|
| • 5 x Bioscript Puffer | 6 | µl |
| • RNase Out | 0,5 | µl |
| • Bioscript | 1,5 | µl |
| • 25 x dNTP's | 1,2 | µl |

- Proben kurz anzentrifugieren und 9,2 µl des Nukleotid-Mixes zu jeder Probe geben
- Inkubation für 1 Stunde bei 42°C (→ *cDNA Synthese*)
- 15 µl 0,2 M NaOH zu jeder Probe geben und für 10 min. bei 70°C inkubieren
- Proben kurz anzentrifugieren und 15 µl 0,2 M HCl zu jeder Probe geben, sofort 450 µl Capturebuffer hinzugeben und auf ein GFX- Säulchen überführen
- Zentrifugation für 30 sek. bei 13000 rpm und Durchlauf verwerfen
- 600 µl 80 % EtOH hinzugeben
- Zentrifugation für 30 sek. bei 13000 rpm, Durchlauf verwerfen
- Waschvorgang 3 x wiederholen
- Säulchen trocknen indem man 1 min. bei 13000 rpm zentrifugiert
- Säulchen in ein neues Minireaktionsgefäß (braun) überführen
- 60 µl Natriumbicarbonat (0,1 M/ pH 9,0) auf die Säule geben, 5 min. bei Raumtemperatur inkubieren und für 1 min. bei 13000 rpm eluieren
- Kopplung oder Aufbewahrung der Proben bei - 20°C

C.2.4.4 Kopplung der Proben mit Fluoreszenz-Farbstoffen

- Farbstoffe in 60 µl Eluat lösen
- Inkubation für 1-2 Stunden im Dunkeln
- 4,5 µl 4 M Hydroxylamin hinzugeben und für 15 min. im Dunkeln inkubieren

Die Proben wurden wiederum mit Hilfe des CyScribe™ GFX Purification Kits von den zuvor verwendeten Reagenzien aufgereinigt:

- 600 µl Capturebuffer zur Cy5 Probe geben, sofort Cy3 Probe aufnehmen und auf eine GFX Säule überführen
- Zentrifugation für 30 sek. bei 13000 rpm und Durchlauf verwerfen
- 600 µl Washbuffer hinzugeben, Zentrifugation für 30 sek. bei 13000 rpm und Durchlauf verwerfen
- Waschvorgang 3 x wiederholen
- Säule trocknen indem man für 10 sek. bei 13000 rpm zentrifugiert
- GFX Säule in ein neues Minireaktionsgefäß (braun) überführen
- 60 µl Elutionspuffer hinzugeben, für 5 min. bei Raumtemperatur inkubieren und durch Zentrifugation für 1 min. bei 13000 rpm eluieren
- Aufbewahrung der Proben bei - 20°C

C.2.4.5 Prozessierung der Nexterion Microarrays und Datenanalyse

Für die Hybridisierungen wurde der Xcc5kOli-Microarray verwendet. Der Microarray besteht aus 4518 50-70meren, 15 Stringenz Kontrollen, 12 Alien-DNA Oligos sowie 5 Spiking Kontrollen. Vor einer Hybridisierung müssen die Arrays prozessiert werden um freie Epoxy-Gruppen zu blockieren:

- Xcc5kOli-Arrays für 5 min. bei Raumtemperatur vorwärmen
- Oligonukleotid-Microarrays in einem Plastikständer plazieren
- Folgende Waschschrte durchführen:
 1. 5 min. bei Raumtemperatur in 250 ml Waschpuffer 1 waschen
 2. 2 min. bei Raumtemperatur in 250 ml Waschpuffer 2 waschen
 3. Wiederholen von Schritt 2
 4. 10 min. bei Raumtemperatur in 250 ml Waschpuffer 3 waschen
- Inkubation der Oligonukleotid-Microarrays für 15 min. bei 50°C in 200 ml vorgewärmtem Nexterion BlockE 4 x Blockingpuffer
- 1 min. bei Raumtemperatur in 250 ml ddH₂O waschen
- Zentrifugation für 3 min. bei 12000 rpm

- Markierte cDNA-Probe in einem Vakuumkonzentrator auf ein Volumen von unter 10 µl einengen (ca. 15 min.)
- DIG Easy Hyb-Lösung (Roche) bis zu einem Volumen von 100 µl zur cDNA-Probe geben
- 1,5 µl Lachsperma (5 µg/µl) dazu geben
- cDNA-Probe bei 65°C für 5 min inkubieren
- Xcc5kOLI-Microarray nach Herstellerangaben in der HS4800 Hybridisierungsstation (Tecan) plazieren
- 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 1200 rpm für 3 min. zentrifugieren
- Xcc5kOLI-Microarray mit LS Reloaded Microarray Scanner (Tecan) scannen

Die Signalintensität und Hintergrundintensität wird mittels der ImaGene 6.0 Software (Biodiscovery Inc.) für jeden Spot auf dem Array detektiert. Der \log_2 -Wert der Verhältnisse der Intensitäten, auch M-Wert genannt, wird dabei nach folgender Formel berechnet:

$$M_i = \log_2 (R_i / G_i) \quad | \quad R_i = I_{ch1i} - Bg_{ch1i} \quad | \quad G_i = I_{ch2i} - Bg_{ch2i}$$

I_{ch1i} und I_{ch2i} = Intensitäten der Spots bei Anregung mit Laser 1 bzw. Laser 2

Bg_{ch1i} und Bg_{ch2i} = Hintergrundintensitäten der Spots bei Anregung mit Laser 1 bzw. Laser 2

Ein M-Wert von 1 oder -1 entspricht einem zweifachen Unterschied in der Intensität der Signale beider Kanäle zueinander. Die Intensität jedes Spots, auch A-Wert genannt, wird mit folgender Formel berechnet:

$$A_i = \log_2(R_i \cdot G_i)^{0,5} \quad \text{(Dudoit et al., 2002)}$$

Die Fehlerwahrscheinlichkeit einer falschen Detektion eines Gens wird mittels des p-Wertes angegeben.. 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/; Dondrup et al., 2003). Für die Clusteranalysen „k-means“ und Hierarchisches Clustering (HCK) wird die Software Genesis 1.6 verwendet. Zur Berechnung der Distanzen wird der Euklidische Algorithmus verwendet. Zur „k-means“ Clusteranalyse wurde die Clusteranzahl auf 15 Cluster festgelegt. Die Berechnung wurde mit 50 Iterationen durchgeführt.

C.2.5 Motilitätstests mit Bromfieldplatten

Nähragarplatten mit geringen Konzentrationen an Agar können zur Untersuchung der Motilität von Bakterien genutzt werden. Diese so genannten Bromfieldplatten enthalten weniger Nährstoffe und Agar im Vergleich zu herkömmlichen Agarplatten. Bei den Bromfieldplatten unterscheidet man je nach Agarkonzentration zwischen „Swimming“- und „Swarming“-Platten. Die „Swimming“- Platten haben eine Agarkonzentration von 0,3% (w/v), während die „Swarming-Platten“ typischerweise Agarkonzentrationen von 0,6% (w/v) enthalten. Zehn technische Replikate dienen zur reproduzierbaren Datengeneration, wobei darauf zu achten ist, daß immer dieselbe Anzahl an Bakterienzellen im selben Volumen auf die Platten gegeben wird.

- 3µl einer ü./N- Kultur in Selektivmedium in die Mitte der Platte pipettieren
- Inkubation für 3-5 Tage bei 30°C

C.2.6 Biofilm-Test

Mittels eines semiquantitativen Tests zur Adhärenz an einer abiotischen Kunststoffoberfläche durch Färbung mit Kristallviolett, Wasch- und Entfärbeschritten und anschließender photometrischer Bestimmung bei Abs.595_{nm} wurde eine Quantifizierung der Biofilmproduktion durchgeführt.

- 10 ml Bakterien ü/N- Kultur in selektivem Medium
- Animpfen von 5 ml M9-Medium, so daß eine optische Dichte von 0,1 erreicht wird
- 2 h bei 30°C auf einem Roller inkubieren
- Mikrotiterplatte mit 100 µl der Bakterienzellen für 20 Stunden bei 30°C inkubieren
- 10 µl 1% (w/v) Kristallviolett hinzugeben und 10 min. bei RT inkubieren
- 4xmaliges Waschen der Mikrotiterplatte mit ddH₂O
- Entfärbung erfolgt mit 150 µl EtOH p.a. bei 4°C
- Messung der Abs.595_{nm}

C.2.7 Kohlenstoffverwertungs-Tests mit dem „Phenotype Microarray“ (Biolog)

Zur phänotypischen Charakterisierung der generierten Mutanten wurde die Verwertung von 95 verschiedenen Kohlenstoffquellen mittels des „Phenotype Microarrays“ der Firma Biolog untersucht. Der Farbumsatz des Tetrazolium violett zu Formazan ist linear mit der Zeit und unter physiologischen Bedingungen irreversibel. Daher kann die Reduktion des Farbstoffs und die kolometrische Bestimmung als direktes Maß der Respiration der Zellen dienen.

- Wachstum der Zellen auf R2A-Agarplatten
- Resuspendieren der Zellen in 8 ml IF-0 Flüssigkulturen (o.D._{590nm} = 0,5)
- 20 ml IF-0- Farbstoff- Reagenz mit 4 ml IF-0- Bakteriensuspension vermischen
- Inokulieren der Platten mit 100µl/ well dieser Bakterien/ Farbstoffsuspension (zwei biologische Replikate) und Inkubation der PMs bei 30°C
- Messen der Absorption bei 590nm bis kein weiterer Farbumschlag mehr erkennbar ist

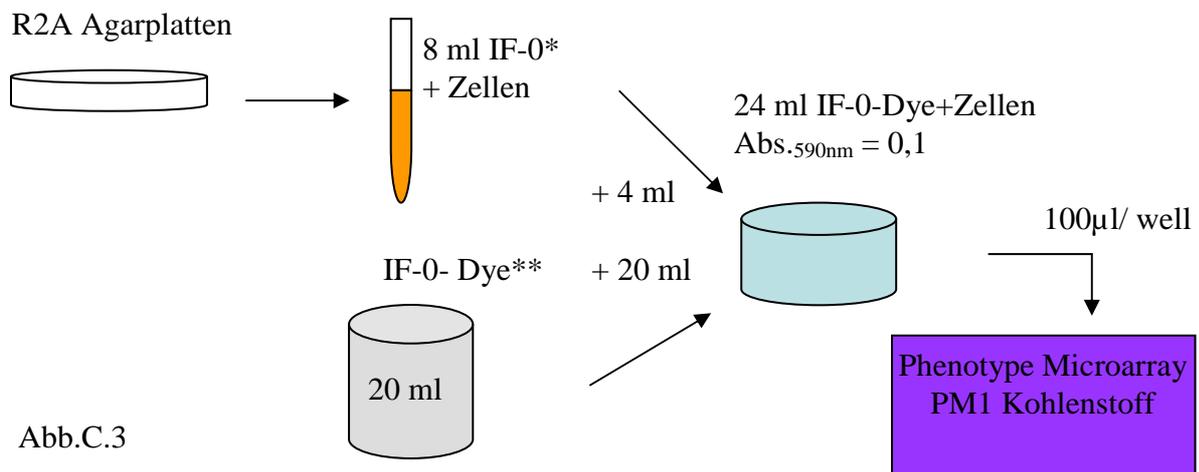


Abb.C.3

Abb.C.3: **Schematischer Ablauf des Inokulations-Prozedere des Phenotype Microarray Kohlenstoffverwertungs-Tests.** Ausgehend vom Wachstum auf R2A-Agarplatten, wird eine 8 ml Inokulationskultur mit einer optischen Dichte von 0,5 (Abs._{590nm}) hergestellt. Von dieser werden 4 ml mit der Farbstoffreagenz vermischt und 100 µl in jedes well der Kohlenstoffquellen-Mikrotiterplatte gegeben. Der Farbumsatz ist linear mit der Zeit und dient der Charakterisierung des Metabolismus der Zelle. Von jedem Stamm werden zwei Replikate durchgeführt. * IF-0= Inokulationsflüssigkeit, ** IF-0= Inokulationsflüssigkeit mit Farbstoffreagenz.

C.2.8 Bioreaktor-Inokulation und Kultivierung

Für die Inokulation des Bioreaktors wurde das Prinzip des „Up-scalens“ verwendet. Aus einer Glycerin-Kultur wurde eine 10 ml ü./N.-Kultur in Selektivmedium inokuliert. Diese 10 ml dienten der Inokulation einer 100 ml Schüttelkultur mit dem in der Bioreaktorkultivierung verwendeten Medium. Die Glukosekonzentration betrug 0,5% (w/v). Aus dieser Kultur wurden 4 x 250ml Kolben inokuliert, die wiederum zum Animpfen des 4 l-Bioreaktor-Vorkultur dienten, von der 2 l- in den 13 l-Bioreaktor überführt wurden. Die Glukosekonzentration der 4 l-Kultivierung betrug 10 g·l⁻¹ respektive 20 g·l⁻¹ Glukose im 13 l-Bioreaktor.

Für die 13 l-Kultivierung wurde Leitungswasser benutzt und 5 ml Antifoam-Mittel wurde vor der Inokulation hinzugegeben. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 4% (v/v) HCl und 2M NaOH während der Kultivierung konstant bei 7,0 ±0,2 kontrolliert. Weitere Parameter sind pO₂ ≥ 35% reguliert über den kaskadischen Rührer mit einem Minimum von 400 rpm. Der Druck wurde konstant bei 0,2 bar, der Airflow bei 1 l⁻¹·min⁻¹ gehalten. Die Kultivierung wurde bei 28°C durchgeführt.

Die Probenentnahme wurde in kleine und große Proben unterteilt. Die kleinen Proben dienen der Glukose-, Acetat-, Lebendzellzahl-, optischen Dichte, Xanthan- und Trockenmasse-Bestimmung. Diese Proben wurden mindestens alle vier Stunden über die Kultivierungsdauer isoliert.

Die großen Proben dienen der Transkriptom-Analyse. Sie wurden gleichmäßig über den Verlauf der Kultivierung isoliert, indem die Zellbrühe in 50 ml-PE-Röhrchen gefüllt wurde und für 3 min. bei 13000 rpm zentrifugiert wurde. Die isolierten Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff gelagert und nach mind. 5 min. bei -80°C. Bei zu starker Viskosität der Zellbrühe wurde mit 0,75% (w/v) Natriumchlorid verdünnt. Bei Übergängen von einer

Wachstumsphase in eine andere, wurden mindestens vier Proben mit einem zeitlichen Abstand von exakt einer Stunde isoliert.

Kleine Proben:

- 4 x 1,5 ml Zellbrühe in autoklavierten, gewogenen Mikroreaktionsgefäßen bei 5 min. 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand bei -20°C für Dialyse, Glukose- und Acetat-Bestimmung lagern
- Pellet bei 65°C trocknen und für Trockengewicht wiegen
- Überstand dient zur Messung der o.D._{580nm}, Lebendzellzahl durch Ausplattieren auf TY-Platten Sm800

Proben zur RNA-Isolierung:

- 50 ml Zellbrühe bei 13000 rpm bei RT für 3 min. zentrifugieren
- Pellet sofort für mind. 5 min. in flüssigen Stickstoff dann bei -80°C lagern
- Evtl. Verdünnung mit 0,75 % (w/v) NaCl

Ergebnisse *D*

D.1 Diskontinuierliche batch-Bioreaktor Kultivierung von Xcc in 13 l Kulturvolumen

D.1.1 Probenentnahme und Bestimmung der Wachstumsparameter der ersten Kultivierung (erstes unabhängiges biologisches Replikat)

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm Xcc B100 wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, ein 19 l Bio-Engineering Bioreaktor mit einem Kulturvolumen von 13 l inokuliert und kultiviert. Neben den Transkriptom-Proben wurden auch Proben zur Messung der optischen Dichte (Abs.580_{nm}), der Xanthanbiosynthese, des Trockengewichts und der Lebendzellzahl isoliert. Es wurden drei Kultivierungen als unabhängige biologische Replikate durchgeführt. Die Probenentnahme erfolgte durch Zentrifugation der Zellbrühe für 3 min. bei 13000 rpm, um die Zellen von dem Medium zu trennen. Bei steigender Viskosität der Zellbrühe aufgrund der hohen Xanthanproduktion zum Ende der Kultivierung wurde die Zellbrühe mit 1% KCl (w/v) verdünnt werden. Die Proben wurden nach der Zentrifugation in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufreinigung bei -80°C gelagert.

In den Übergängen von den einzelnen Wachstumsphasen ineinander wurden jeweils mindestens vier Proben in einem Abstand von exakt 1h isoliert. Ebenso wurden 2h nach der Inokulation und in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase Proben isoliert. Die Isolierung von mehreren stationären Proben verhinderte die Viskosität der Zellbrühe, da eine ausreichende Sauerstoffversorgung und Durchmischung der Zellbrühe in diesem Bioreaktor mit dessen Rührer nicht möglich war. Zudem wäre z.B. neben einem Propeller-Rührer, der eine effektivere Durchmischung gewährleistet, auch ein Hochdruck-Bioreaktor von Vorteil gewesen. Der hier angelegte Druck von 0,2 bar ist nicht vergleichbar mit den industriell genutzten Bioreaktoren, die einen Druck von bis zu 10 bar ermöglichen. Diese mangelnde Durchmischung der Zellbrühe verhindert nicht zuletzt nach 70h Kultivierungsdauer sogar eine gleichmäßige Temperatur, da sich im Bioreaktor an den Schikanen eine mehrere cm-dicke Xanthanschicht bildet. Der pH-Wert kann dementsprechend in den letzten Stunden der

Kultivierung nicht mehr konstant bei pH 7 gehalten werden, unter Umständen auch durch eventuelle Xanthan-Absetzungen an der Sonde. Dieses Problem besteht für sämtliche Sonden im Bioreaktor wie z.B. der Sauerstoff-Sonde. Aus diesen Gründen ist eine längere Kultivierung in der stationären Wachstumsphase in diesem Bioreaktor äußerst problematisch. In Abbildung D.1.A ist die Probenentnahme zur Transkriptom-Analyse über die gesamte Dauer der ersten Kultivierung (erstes biologisches Replikat) gezeigt. Man sieht daß die Probe der mittleren lag-Phase zeitlich zu nah am Übergang zur exponentiellen Phase liegt.

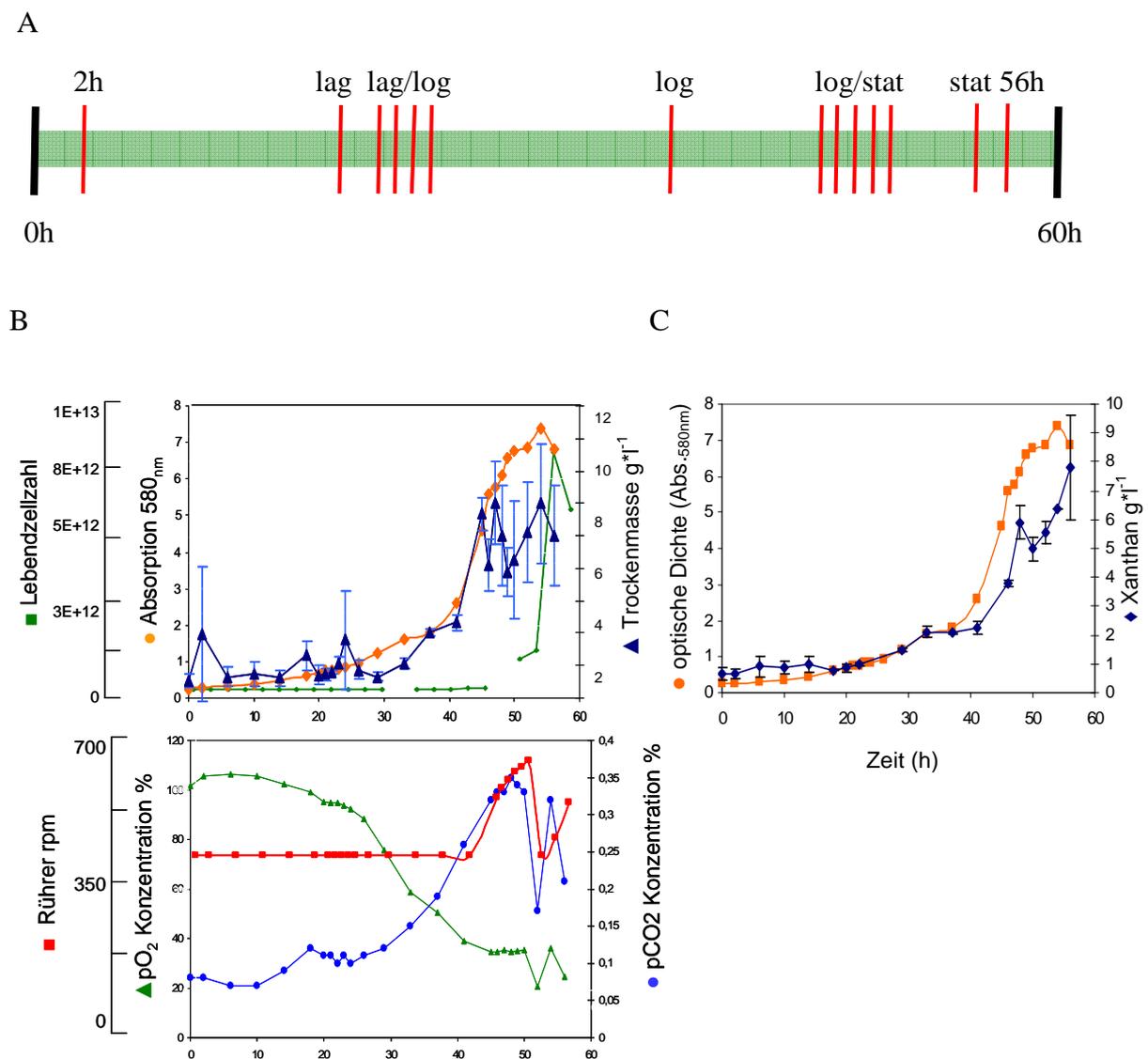


Abb.D.1: Die aufgenommenen Wachstumsparameter des ersten biologischen Replikats. (A) Die über die Dauer der Kultivierung isolierten Proben zur Transkriptom-Analyse mittels Microarray-Technologie. (B) Parameter der ersten Kultivierung, wie optische Dichte (Absorption_{580nm}), Lebendzellen und Trockenmasse und Rührerdrehzahl, pO₂- und pCO₂-Konzentrationen. (C) Xanthan-Bestimmung nach Säurehydrolyse über Monosaccharidgehalt im dialysierten Überstand und optische Dichte der Zellbrühe (Abs._{580nm}).

Die in Abbildung D.1.B gezeigten optische Dichte- (Abs_{580nm})-Werte, Lebendzellen- und Trockenmasse-Daten korrelieren gut miteinander. In der lag-Phase kommt es zu keiner signifikanten Zunahme an Trockenmasse oder Lebendzellen, während in der Mitte der exponentiellen Phase beide Parameter stark zunehmen. Die Rührerdrehzahl dargestellt in Abbildung D.1.B (rot) steigt am Ende der exponentiellen Phase beim Übergang in die stationäre Phase kaskadisch bis zu einem Maximum von 680 rpm, um die pO_2 -Konzentration von mindestens 35 % in der Zellbrühe aufrechtzuhalten. Die Xanthan-Produktion (Abb.D.1.C) liegt bei dieser Kultivierung bei einem Maximum von $8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Die Produktivität im Vergleich zu den anderen Kultivierungen ist in Tabelle D.1. dargestellt.

D.1.2 Probenentnahme und Bestimmung der Wachstumsparameter der zweiten Kultivierung (zweites unabhängiges biologisches Replikat)

Im Vergleich zur ersten Kultivierung ist die Probenentnahme der mittleren lag-Phasen Probe bei dieser Kultivierung zeitlich näher in der Mitte dieser Phase gelegen. Die Probe liegt exakt in der Mitte der Phase (vgl. Abb. D.2.A und D.1.A). Im Übergang zur stationären Phase wurden fünf Proben mit einem Abstand von 1h isoliert und in der stationären Phase insgesamt drei Proben, wobei die erste Probe der stationären Wachstumsphase zeitlich noch sehr nah an der Übergangsphase liegt (2h Abstand zur letzten Übergangsprobe).

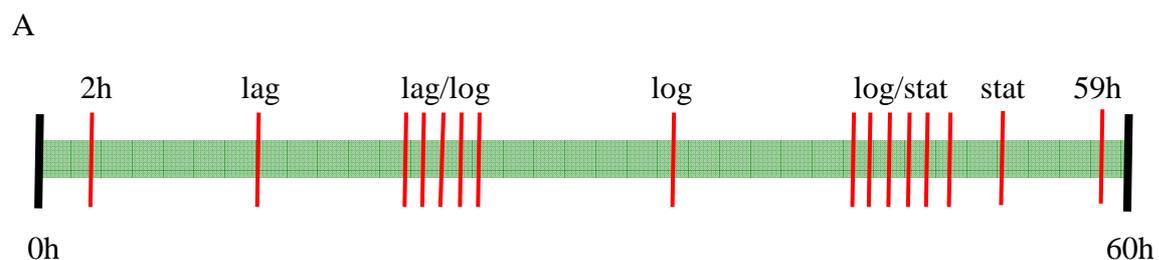
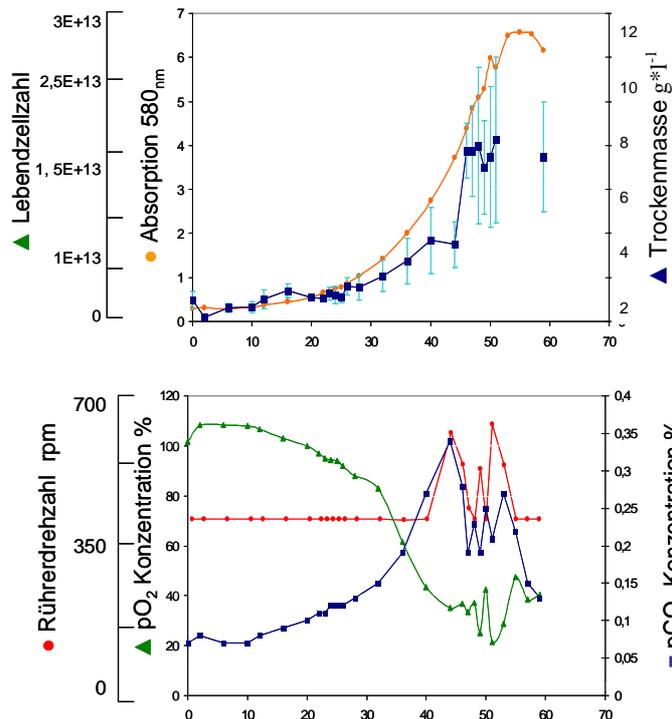


Abb.D.2.A

B



C

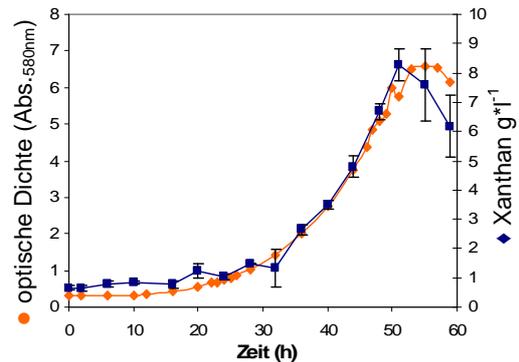


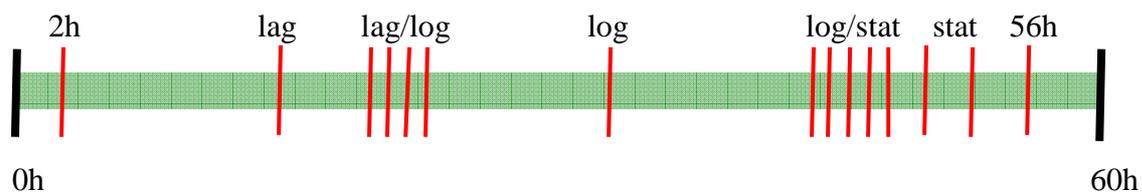
Abb.D.2: **Die aufgenommenen Wachstumsparameter des zweiten biologischen Replikats.** (A) Die über die Dauer der Kultivierung isolierten Proben zur Transkriptom-Analyse mittels Microarray. (B) Parameter der ersten Kultivierung, wie optische Dichte (Abs._{580nm}), Lebendzellen, Trockenmasse und Rührerdrehzahl, pO₂- und pCO₂-Konzentrationen. (C) Xanthan-Bestimmung nach Säurehydrolyse über Monosaccharidgehalt im dialysierten Überstand und optische Dichte (Abs._{580nm}) der Zellbrühe.

Die weiteren Parameter, wie optische Dichte (Abs._{580nm}), pO₂- und pCO₂-Konzentration dieser Kultivierung sind in Abbildung D.2.B dargestellt. Auch hier korrelieren die optische Dichte (Abs._{580nm})-Werte, Lebendzellen- und Trockenmasse-Daten gut miteinander. Die Trockenmasse ist beim zweiten biologischen Replikat etwas geringer ($\sim 9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ zu $\sim 8 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), die Lebendzellzahl liegt jedoch höher. Die Xanthanproduktion liegt auch bei dieser Kultivierung bei $8 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

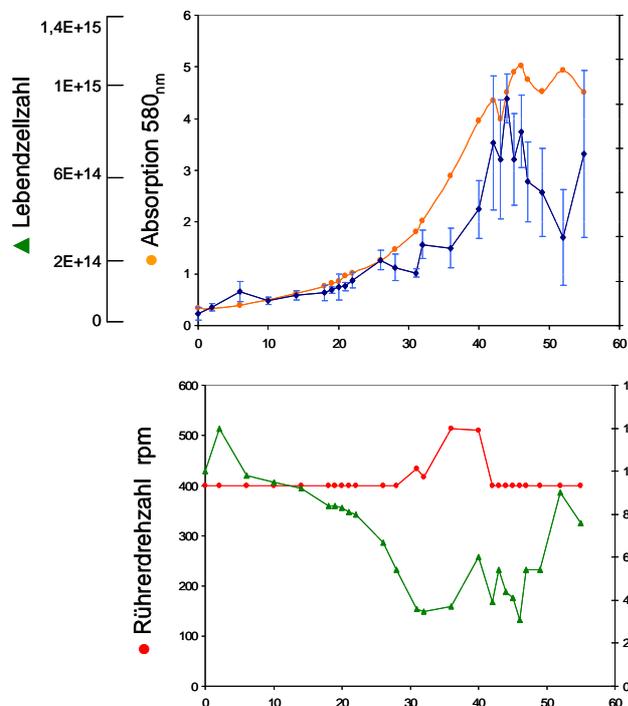
D.1.3 Probenentnahme und Bestimmung der Wachstumsparameter der dritten Kultivierung (drittes unabhängigs biologische Replikat)

Die Probenentnahme dieser Kultivierung erfolgte wie bei den beiden anderen Kultivierungen durch Zentrifugation der Zellbrühe für 3 min. bei 13000 rpm, um die Zellen von dem Medium zu trennen. Bei steigender Viskosität der Zellbrühe aufgrund der hohen Xanthanproduktion zum Ende der Kultivierung mußte die Zellbrühe mit 1% KCl (w/v) verdünnt werden. Die Proben wurden nach der Zentrifugation sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Probenentnahme der lag-Phasen Probe liegt zeitlich etwas zu nah an dem Übergang zur exponentiellen Phase.

A



B



C

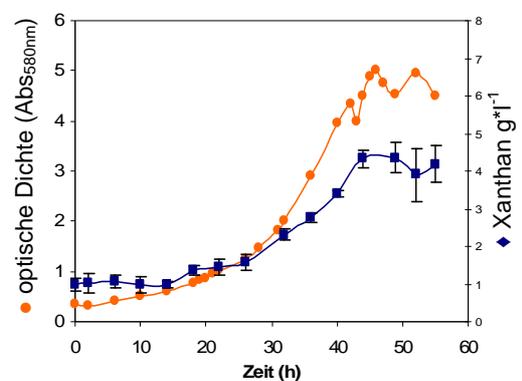


Abb.D.3

Abb.D.3: **Die aufgenommenen Wachstumsparameter des zweiten biologischen Replikats.** (A) Die über die Dauer der Kultivierung isolierten Proben zur Transkriptom-Analyse mittels Microarray. (B) Parameter der ersten Kultivierung, wie optische Dichte (Abs._{580nm}), Lebendzellen, Trockenmasse und Rührergeschwindigkeit, pO₂-Konzentrationen. (C) Xanthan-Bestimmung mittels Säurehydrolyse über Monosaccharidgehalt im dialysierten Überstand und optische Dichte (Abs._{580nm}) der Zellbrühe.

Verglichen mit den anderen beiden Kultivierungen, lassen sich bei dieser Kultivierung einige Abweichungen feststellen. So wird lediglich eine optische Dichte (Abs._{580nm}) von ~ 5 erreicht, während die der anderen biologischen Replikate bei etwa 6-7 liegt (vgl. Abb. D.1.B, D.2.B und D.3.B). Jedoch konnte in dieser Kultivierung ein schnelleres Wachstum beobachtet werden. Die optische Dichte (Abs._{580nm}) =3 wird in der dritten Kultivierung schon nach 36h erreicht, in den beiden anderen biologischen Replikaten erst nach 42h. Da die pO₂-Konzentration während dieser Kultivierung auch nicht in diesem Maße sinkt wie bei den anderen Replikaten, ist die Rührerdrehzahl deutlich geringer, da der Sauerstoff nicht über die Rührerdrehzahl eingetragen werden muß um den Grenzwert von 35% zu halten. Die Xanthanproduktion liegt unterhalb der vorher erreichten 8 g·l⁻¹, nämlich bei knapp 4,5 g·l⁻¹. Der Vergleich der Produktivitäten aus den drei Kultivierungen ist in Tabelle 3.1.1 dargestellt.

Tab.D.1: **Xanthanproduktion in den drei Kultivierungen.** Berechnungen nach in der Literatur abgegebenen Formeln (Jana et al., 1999; Rajeshwari et al., 1995).

| | Max. Xanthan (g·l ⁻¹) | Kultivierungsdauer (h) | Xanthan-Ausbeute (in %) | Produktivität (g·l ⁻¹ ·h ⁻¹) |
|----------------|--------------------------------------|---------------------------|----------------------------|--|
| Kultivierung 1 | 7,79 | 56 | 38,9 | 0,139 |
| Kultivierung 2 | 8,28 | 59 | 41,4 | 0,128 |
| Kultivierung 3 | 4,35 | 55 | 21,7 | 0,079 |

Der maximale Wert der Xanthanproduktion liegt bei den ersten beiden Kultivierungen nahezu identisch bei ca. 8 g·l⁻¹ (Tab.D.1). Dementsprechend ergibt sich bei 20 g·l⁻¹ Glukose eine prozentuale Umwandlung von Glukose in Xanthan von ca. 40%. Auch die Produktivität (g·l⁻¹·h⁻¹) beider Kultivierungen ist mit etwa 0,13 g·l⁻¹·h⁻¹ vergleichbar. Etwas abweichend von diesen Ergebnissen sind die des dritten Replikats. Es wird nur 4,35 g·l⁻¹ Xanthan gebildet, was bei einer Kultivierungsdauer von 55h in einer geringen Produktivität von 0,079 g·l⁻¹·h⁻¹ resultiert. Auch die prozentuale Ausbeute aus Glukose von 21,7% ist nahezu nur die Hälfte verglichen mit den Werten aus den anderen Kultivierungen.

Tab.D.2: **Vergleich der Kultivierungsparameter der drei unabhängigen biologischen Kultivierungen.** Angegeben sind die pCO₂-Konzentrationen, die gesamte Kultivierungsdauer, die erreichte optische Dichte (Abs._{580nm}), die maximale Xanthanmenge und die maximale Lebendzellzahl.

| | pCO ₂ (%) | Dauer (h) | Optische Dichte (Abs. _{580nm}) | Xanthan (g·l ⁻¹) | Lebend- zellzahl | EPS / Zellzahl |
|------------|-------------------------|--------------|---|---------------------------------|---------------------|-------------------|
| Replikat 1 | 0,35 | 56 | 7,37 | 6,85 | 1,74E+17 | 0,929 |
| Replikat 2 | 0,27 | 59 | 6,57 | 6,58 | 2,5E+17 | 0,998 |
| Replikat 3 | n.a. | 55 | 4,9 | 5,02 | 1,2E+15 | 1,024 |

Die Abweichungen in der optischen Dichte (Abs._{580nm}) und der Xanthanbiosynthese bei der dritten Kultivierung betragen zum Mittelwert der beiden anderen Kultivierungen 30% respektive 25%. Insgesamt wurden drei ähnlich verlaufende diskontinuierliche batch-Kultivierungen in einem Bioreaktor durchgeführt, die im folgenden in ihrem Transkriptom durch Microarray-Technologie untersucht werden.

D.1.2 Transkriptomische Analyse der Kultivierungen im Bioreaktor mittels Microarray-Technologie

D.1.2.1 Überprüfung der Microarray-Experimente durch „Yellow-Experimente“ und „Virtual-Slides“

Zur Überprüfung der Microarray-Daten wurden neben „Yellow-Experimenten“, bei denen die Proben ein und desselben Zeitpunktes auf einem Array hybridisiert werden, auch „Virtual Slides“ Kontrollen durchgeführt. Hierzu werden die bei einem Referenzdesign generierten Emissionsbilder des Referenzkanals genutzt. Die Emissionsbilder des jeweiligen Referenzkanals werden in der Microarray-Auswertungs-Software EMMA auf einem virtuellen Slide überlagert und prozessiert, was eine Überprüfung auf Reproduzierbarkeit der in der Zeitreihe eingesetzten Referenz ermöglicht. Zum Beispiel kann der Referenzkanal eines frühen Zeitpunktes mit dem eines späten Zeitpunktes verglichen werden, oder aber auch die Referenzkanäle aller drei Replikate untereinander. In beiden Kontrollen, sowohl des „Yellow-Experiments“, als auch beim „Virtual-Slide“ sollten keine Gene als statistisch signifikant exprimiert detektiert werden, da praktisch die identischen Proben hybridisiert bzw. analysiert werden.

Tab.D.3: Anzahl der als statistisch signifikant differentiell exprimierten Gene in den „Yellow-Experimenten“ und Referenzkanal-Vergleichen („Virtual Slides“) der drei biologischen Replikate. Angegeben ist jeweils die Zahl der als signifikant exprimierten detektierten Gene.

| | Yellow- Experiment | „Virtual Slide“: lag + stat Zeitpunkte | “Virtual Slide”: lag + log + stat Zeitpunkte |
|------------|-----------------------|---|---|
| Replikat 1 | 0 | 0 | 5 |
| Replikat 2 | 0 | 0 | 3 |
| Replikat 3 | 0 | 8 | 1 |

Die „Yellow-Experimente“, die für jedes Replikat durchgeführt wurden, führten in keiner der Kontrollen zu statistisch signifikant differentiell exprimierten Genen. Bei jeder Kultivierung wurde ein „Yellow-Experiment“ zu unterschiedlichen Zeitpunkten in drei technischen Replikaten durchgeführt. Auch bei den „Virtual-Slide“-Kontrollen, bei der die Referenzkanäle überprüft werden, konnten beim Vergleich der frühen und späten Phase einer Kultivierung keine statistisch signifikant differentiell exprimierten Gene detektiert werden. Bei dem Vergleich lag, log und stationärer Referenzkanäle wurden für die erste Kultivierung fünf, für die zweite Kultivierung drei Gene und für die dritte Kultivierung ein Gen detektiert, die alle drei Kriterien erfüllen ($M < -1$ und > 1 , $A > 8$, $p \leq 0,05$).

Dies entspricht einer falsch-positiv Detektion von 0,002% in der ersten Kultivierung, 0,001 % der Gene in der zweiten Kultivierung und 0,0002% in der dritten Kultivierung. Verglichen mit anderen Microarray-Experimenten liegt dies in der Toleranzgrenze (Serrania et al., 2008; Hüser et al., 2003; Rüberg et al., 2003; Loos et al., 2001).

Bei der dritten Kultivierung wurde eine höhere Anzahl von acht Genen im Vergleich der Referenzen t2h und t55h detektiert. Dies kann seine Ursache auch in der Tatsache haben, daß zum Zeitpunkt t55h nur zwei technische Replikate bei der Hybridisierung der Proben auf dem Array zur Verfügung standen.

D.1.2.2 Vergleich der Experimentkanäle und Referenzkanäle der drei biologischen Replikate zum Zeitpunkt t2h

Um die Vergleichbarkeit der drei Kultivierungen zu überprüfen, wurden auf virtuellen Slides die Experimentkanäle und Referenzkanäle des Zeitpunkts t2h aller drei Kultivierungen analysiert. Alle Experiment- und Referenzkanäle des Zeitpunkts t2h der drei Kultivierungen

wurden auf virtuellen Slides analysiert. Dies dient der Untersuchung der intra- und interspezifischen Varianz der Kanäle und der Kultivierungen.

Tab.D.4: **Anzahl der als statistisch signifikant exprimierten detektierten Gene des Referenzkanals bzw. Experimentkanals zum Zeitpunkt t2h aller drei biologischer Replikate.** Auf einem virtuellen Slide wurden die Referenzkanäle und Experimentkanäle des jeweiligen Zeitpunkts untersucht.

| | Referenzkanal t2h aller Replikate | Experimentkanal t2h aller Replikate |
|---|--|--|
| Anzahl der als statistisch signifikant differentiell exprimierten Gene | 218 | 41 |

Betrachtet man die Ergebnisse der Virtual-Slide-Analyse der Referenzkanäle bzw. der Experimentkanäle der drei Kultivierungen zum Zeitpunkt t2h, so läßt sich feststellen, daß die Referenzen der drei Kultivierungen zu einer größeren Anzahl an statistisch signifikant differentiell exprimierten Genen führt als der Vergleich der Experimentkanäle zum Zeitpunkt t2h. Die interspezifische Varianz der Transkriptomdaten ist zu diesem Zeitpunkt höher als die intraspezifische Varianz innerhalb der einzelnen Replikate. Zum Zeitpunkt t2h scheint die Zusammensetzung des Referenzpools jeder Kultivierung variabler zu sein, als die Experimentkanäle der Kultivierungen.

D.1.2.3 Betrachtung eines Zeitpunkts zum vorherigen Zeitpunkt (Referenzdesign versus Loopdesign)

Die Ergebnisse aus dem Experimentkanal-Vergleich führten zu der Überlegung, das Experimentdesign zu untersuchen. Eine weitere Möglichkeit ein Microarray-Experiment zu designen ist die Verwendung des sogenannten Loopdesigns statt des Referenzdesigns. Dabei wird die zu untersuchende Probe nicht gegen eine externe Referenz auf dem Array hybridisiert, sondern der vorherige Zeitpunkt als Referenz genutzt, und somit die Veränderung vom letzten Zeitpunkt zu dem aktuellen betrachtet.

Als eine Abwandlung des Loopdesigns wurden die Experimentkanäle eines Zeitpunkts aus dem Referenzdesign auf einem virtuellen Slide zu dem Experimentkanal des vorherigen Zeitpunkts analysiert. Für die erste Kultivierung ergab die Analyse des t37h

Experimentkanals (exponentielle Probe) gegen die vorherige t24h (lag-Phase) eine Detektion von 38 als statistisch signifikant differentiell exprimierten Genen.

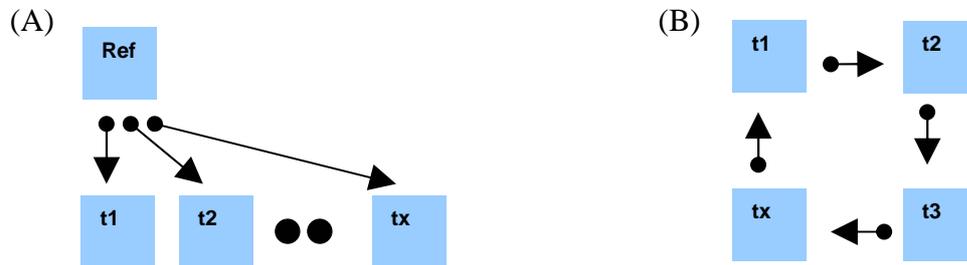


Abb.D.4: Schematische Darstellung des Referenzdesigns (A) und des Loopdesigns (B) in einem Microarray Experiment. Im Referenzdesign werden die einzelnen Zeitpunkte gegen eine allen gemeinsame Referenz untersucht, während im Loopdesign die Zeitpunkte gegeneinander untersucht werden.

Tab.D.5: Anzahl der detektierten Gene aus dem Vergleich des Experimentkanals zum vorherigen Experimentkanal („Loopdesign“) mit denen aus dem Referenzdesign. Die 38 detektierten Gene aus dem „Loopdesign“ verglichen mit den 46 aus dem Referenzdesign und die Überschneidung der Gene aus beiden Pools.

| | Anzahl an Genen | Schnittmenge |
|----------------------------------|-----------------|--------------|
| Replikat 1: t-log Referenzdesign | 46 | 22 |
| Replikat 1: t-log „Loopdesign“ | 38 | |

Diese Methode des abgewandelten Loopdesigns führt nicht zu einer höheren Zahl an statistisch signifikant differentiell exprimierten Genen. Die Anzahl an Genen die mit beiden Designs als statistisch signifikant differentiell exprimiert detektiert werden liegt bei 22 Genen. Da beim Loopdesign zwischen den Proben 10h Kultivierung liegen, sollte man eine höhere Anzahl erwarten, da beim Übergang von der lag- in die exponentielle Phase auf transkriptomischer Ebene große Änderungen auftreten können. Daher scheint die Betrachtung der Experimentkanäle zum vorherigen Experimentkanal nicht besser geeignet zu sein, als das Referenzdesign.

D.1.2.4 Betrachtung der Experimentkanäle aller drei biologischer Replikate zu ein und demselben Referenzkanal

Um die Variabilität in den Referenzen zu analysieren (vgl. Ergebnisse Yellow- und Virtual-Experimente) wurde eine identische Referenz für die Zeitpunkte aller drei biologischer Replikate untersucht. Dazu wurde der Referenzkanal des Zeitpunkts t2h der ersten Kultivierung gewählt und die Experimentkanäle der exponentiellen Phase der ersten und zweiten Kultivierungen auf einem virtuellen Slide untersucht.

Tab.D.6: Vergleich der Experimentkanäle der exponentiellen Phase des ersten und zweiten biologischen Replikats mit dem Referenzkanal des Zeitpunkts t2h der ersten Kultivierung. Gezeigt sind die statistisch signifikant differentiell exprimierten Gene in den Zeitpunkten und die Überschneidung der Gene aus beiden Zeitpunkten.

| Referenz Repl | Anzahl an Genen | Schnittmenge |
|------------------|-----------------|--------------|
| Replikat 1 t-log | 60 | 35 |
| Replikat 2 t-log | 450 | |

Benutzt man einen Referenzkanal einer Kultivierung für die Zeitpunkte der drei biologischen Replikate, so detektiert man für die Proben, die nicht aus dieser Kultivierung stammen, eine hohe Anzahl von 450 Genen, während die Proben, die aus dieser Kultivierung stammen, keine extremen Änderungen zeigen. Dies läßt vermuten, daß die Referenzen der drei Kultivierungen stärker voneinander abweichen, als zum Beispiel die Experimentkanäle untereinander, was mit den vorherigen Analysen übereinstimmt.

D.1.2.5 fdr-Test für alle Arrays eines Zeitpunkts der drei biologischen Kultivierungen (Ein EMMA Experiment)

Es besteht die Möglichkeit alle hybridisierten Arrays eines Zeitpunkts der drei biologischen Replikate zusammen zu betrachten. Faßt man die Kultivierungen zusammen, so wird der fdr-Test zur Identifizierung der statistisch signifikant differentiell exprimierten Gene im Gegensatz zu der getrennten Betrachtungsweise über alle Arrays der gemeinsamen Zeitpunkte t-2h, t-log und t-stat durchgeführt.

Tab.D.7: **Anzahl der statistisch signifikant differentiell exprimierten Gene nach gemeinsamer und getrennter fdr-Statistik für die Arrays eines Zeitpunkts.** Gemeinsamer fdr-Test in einem EMMA-Experiment und getrennter fdr-Test für die Arrays in getrennten EMMA- Experimenten.

| | Ein EMMA Exp. | Replikat 1 | Replikat 2 | Replikat 3 |
|--------|---------------|------------|------------|------------|
| t-2h | 62 | 260 | 239 | 250 |
| t-log | 6 | 46 | 22 | 46 |
| t-stat | 0 | 1 | 393 | 51 |

Die Tabelle zeigt, daß die gemeinsame fdr-Statistik über alle neun Arrays eines bestimmten Zeitpunkts, mit insgesamt 27 technischen Replikaten, zu einer geringeren Anzahl an statistisch signifikant differentiell exprimierten Genen führt, als die getrennte Statistik in drei EMMA Experimenten. Aus den vorherigen Analysen, läßt sich schließen, daß die Kultivierungen zu unterschiedlich sind, als daß man sie in einer gemeinsamen fdr-Statistik untersucht.

Im weiteren wurden für die folgenden transkriptomischen Analysen der Zeitreihen-Experimente jedes biologische Replikat für sich separat betrachtet. Für jedes biologische Replikat wurde als Referenz der Pool an RNA aus den Probenentnahmezeitpunkten der jeweiligen Kultivierung gewählt und jede Probe eines Zeitpunktes gegen diese interne Referenz hybridisiert.

D.1.2.6 Principal Component Analyse (PCA) der Experimente

Die „Principal Component Analyse“ (PCA) ist ein Clusterverfahren bei dem nach gemeinsamen Mustern in den Daten gesucht wird und es somit ermöglicht, die Expression jedes Gens oder eines Probenentnahme-Zeitpunkts als lineare Kombination dieser Muster darzustellen.

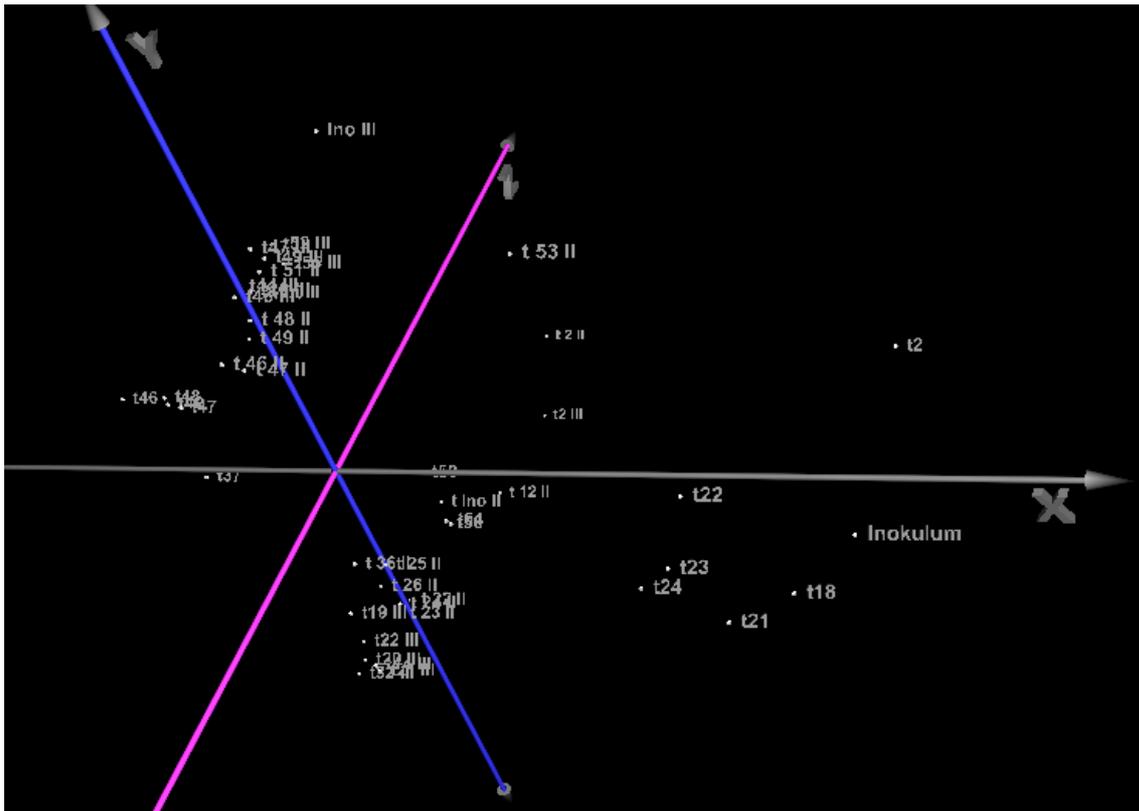


Abb.D.5 : „Principal Component Analysis“ (PCA) der Probenentnahme-Zeitpunkte der drei biologischen Replikate auf Transkriptomebene. Bei der graphischen Visualisierung der Daten werden die ersten 3 principal components auf ein 3-dimensionales Koordinatensystem aufgetragen. Die x-Achse entspricht der principal component 1, die y-Achse der principal component 2 und die z-Achse der principal component 3. I: Probenentnahme-Zeitpunkte des ersten biologischen Replikats (Kultivierung 1), II: Probenentnahme-Zeitpunkte des zweiten biologischen Replikats (Kultivierung 2), III: Probenentnahme-Zeitpunkte des dritten biologischen Replikats (Kultivierung 3).

Die Probenentnahme-Zeitpunkte des zweiten und dritten biologischen Replikats sind in der PC-Analyse näher als die Probenentnahme-Zeitpunkte des ersten biologischen Replikats. Da die Probenentnahme-Zeitpunkte der biologischen Replikate zwei und drei im dreidimensionalen Raum einen geringen Abstand zueinander aufweisen, sind sie auch in ihrem Transkriptionsprofil ähnlicher zueinander als zu dem ersten biologischen Replikat, das einen größeren Abstand im dreidimensionalen Raum zu den beiden anderen biologischen Replikaten aufweist. Gerade die lag-Phasen Proben der ersten Kultivierung sind deutlich separat im Koordinatenkreuz lokalisiert.

D.1.2.7 Hierarchisches Clustering der Experimente

Hierarchisches Clustering wird nicht nur dazu genutzt, um Gene sondern auch um die verschiedenen Probenentnahme-Zeitpunkte zu clustern. Dazu werden Cluster generiert, die in einer hierarchischen Baumstruktur angeordnet sind. Die bei der hierarchischen Clustering Methode entstehende Baumstruktur wird mit einem Dendogramm visualisiert. Dies ermöglicht den Vergleich der Distanz der einzelnen Phasen.

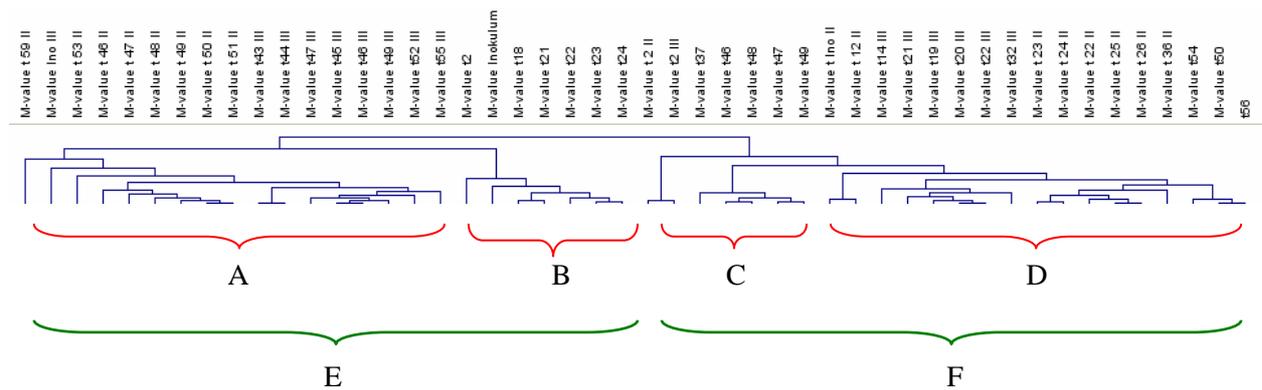


Abb.D.6: **Dendrogramm des HCL der Probenentnahme-Zeitpunkte der drei Kultivierungen.** Berücksichtigt sind die Inokulums und alle Probenentnahme-Zeitpunkte der drei Kultivierungen. I erste Kultivierung, II zweite Kultivierung, III dritte Kultivierung.

Zwei große Cluster E und F beinhalten die Subcluster A bis D. In Cluster A finden sich die Probenentnahme-Zeitpunkte der stationären Wachstumsphase der Kultivierungen zwei und drei, während Cluster D die der lag-Phase der beiden Kultivierungen enthält. In den Clustern B und C sind hauptsächlich die Probenentnahme-Zeitpunkte der ersten Kultivierung angeordnet. Wie in der „Principal Component“-Analyse verdeutlicht, sind die Kultivierungen zwei und drei auf transkriptomischer Ebene ähnlicher zueinander, als zu Kultivierung eins.

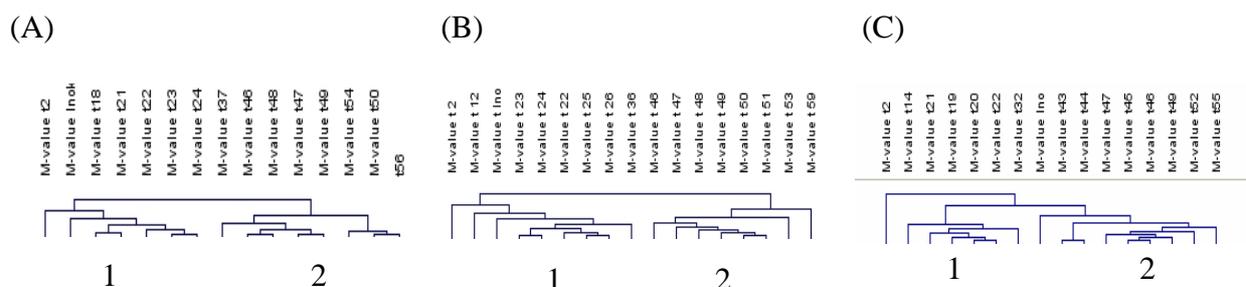


Abb.D.7: **Dendrogramm des hierarchischen Clusterings der Probenentnahme-Zeitpunkte der drei biologischen Replikate getrennt betrachtet.** (A) erste Kultivierung, (B) zweite Kultivierung, (C) dritte Kultivierung.

Betrachtet man das Ergebnis des HCL der einzelnen Kultivierungen, so ist am auffälligsten die unterschiedliche Anordnung der Probe der exponentiellen Wachstumsphase. In allen biologischen Replikaten bilden sich zwei Subcluster 1 und 2. Während in der ersten Kultivierung, in Cluster 1 die lag- Phasen Proben und das Inokulum zu finden sind, clustern die der stationären Phase in Cluster 2. Die Probe der exponentiellen Phase clustert mit den Proben der stationären Phase in Cluster 2.

Im zweiten biologischen Replikat 2 existieren zwei Cluster 1 und 2, die die Kultivierung zur Mitte hin teilen. Während die Proben aus der späten stationären Wachstumsphase t54h, t50h und t56h ein Subcluster innerhalb des zweiten Clusters 2 bilden, clustert die Probe der exponentiellen Phase zusammen mit den lag-Phase Proben und die des Inokulums in dem Cluster 1.

Im HCL Ergebnis des dritten biologischen Replikats clustert die Probe des Inokulums in Cluster 2 und scheint eher der stationären Wachstumsphase zu entsprechen, als der lag-Phase. Im Gegensatz zu den beiden ersten Kultivierungen. Die Probe der exponentiellen Phase clustert zusammen mit den lag-Phase Proben in Cluster 1.

D.1.2.8 Gesamtanzahl an detektierten differentiell exprimierten Genen in den drei biologischen Replikaten

Zur transkriptomischen Analyse des Genexpressionsprofils wurde die Microarray-Technologie mit dem Microarray Xcc5kOLI verwendet. Dabei wurde als Referenz ein RNA-Pool aller Zeitpunkte benutzt. Gegen diese Referenz wurde die RNA jedes einzelnen Zeitpunkts auf einem Microarray hybridisiert. Die Probe des Inokulums wurde zwar hybridisiert, ist aber nicht Bestandteil des Referenz-Pools. Für jeden Zeitpunkt wurden drei technische Replikate durchgeführt. Abbildung D.8 zeigt zunächst die absolute Anzahl der als statistisch signifikant differentiell exprimiert detektierten Gene zu jedem Probenentnahme-Zeitpunkt in den drei durchgeführten Kultivierungen.

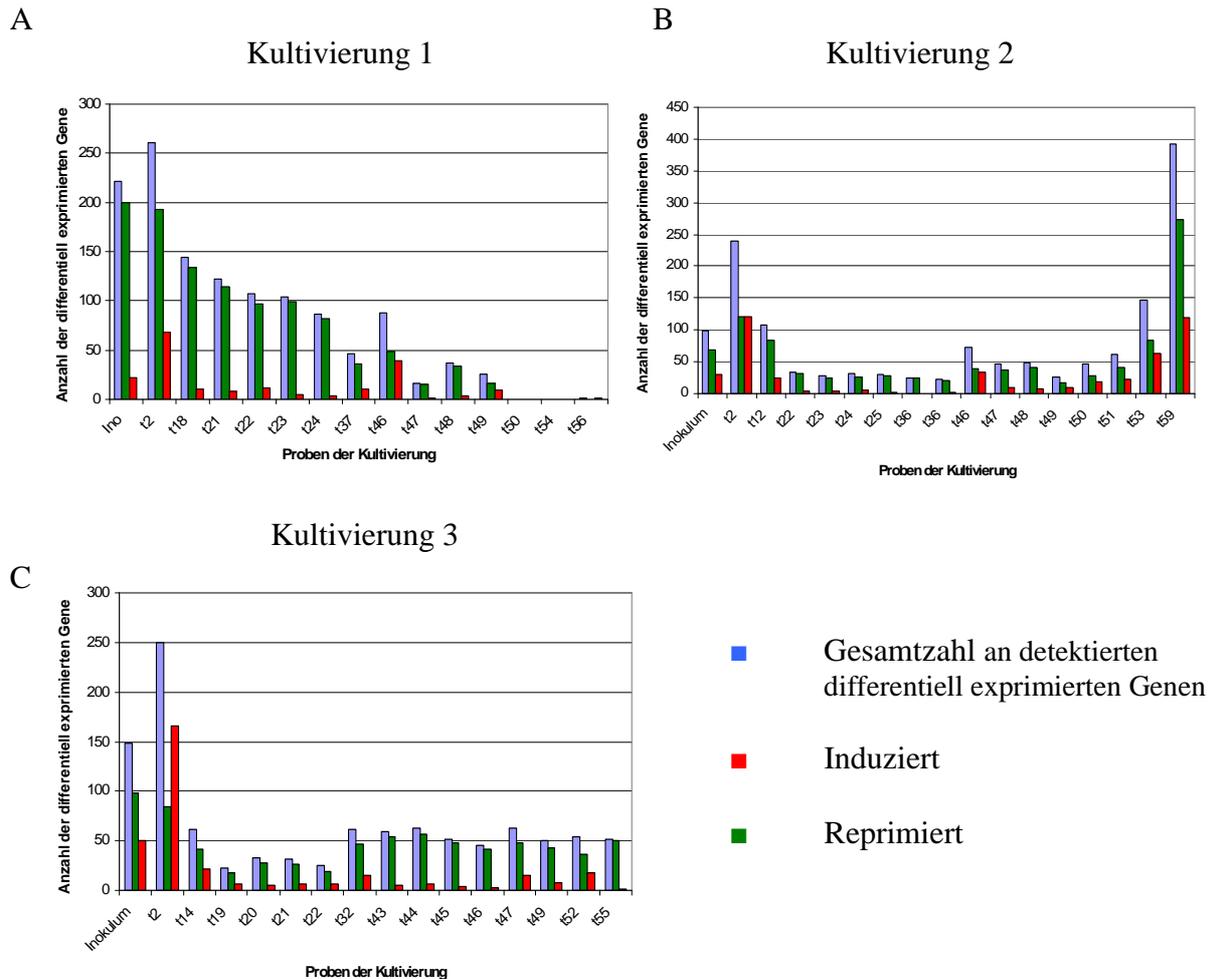


Abb. D.8: Anzahl an als statistisch signifikant differentiell exprimiert detektierten Genen zu den Zeitpunkten der Probenentnahme in den drei biologischen Replikaten. (A) Erste Kultivierung, (B) zweite Kultivierung, (C) dritte Kultivierung. Blaue Balken= Gesamtzahl an detektierten differentiell exprimierten Genen, grüne Balken= reprimierte Gene, rote Balken= induzierte Gene.

Zunächst läßt sich feststellen, daß die Verteilung der detektierten differentiell exprimierten Gene in den drei Kultivierungen unterschiedlich ist. Während im ersten biologischen Replikat (D.8.A) bei den ersten Zeitpunkten die meisten Gene differentiell exprimiert sind und man einen stetigen Rückgang in der Gesamtzahl sehen kann, kommt es in der zweiten Kultivierung (D.8.B) zu Beginn und Ende der Kultivierung zu einer hohen Anzahl an differentiell exprimierten Genen. Beim dritten biologischen Replikat sind zu Beginn der Kultivierung die meisten Gene differentiell exprimiert, aber im weiteren Verlauf ist eine konstante Zahl von etwa 50 Genen als differentiell exprimiert zu detektieren. Allen Kultivierungen gleich ist die proportionale Überrepräsentation an reprimieren Gene im Vergleich zu induzierten. Lediglich im zweiten biologischen Replikat zum Zeitpunkt t2h

findet sich eine identische Anzahl an reprimierten und induzierten Genen, während bei der dritten Kultivierung zum Zeitpunkt t2h eine größere Anzahl an Genen induziert als reprimiert ist.

D.1.2.9 Vergleich der statistisch signifikant detektierten differentiell exprimierten Gene zu bestimmten Zeitpunkten aller drei biologischer Replikate

Venn-Diagramme stellen eine gute Möglichkeit dar, die differentiell exprimierten Gene und deren Überschneidung in den drei biologischen Replikaten darzustellen. Dabei tauchen die Gene in den Schnittflächen der Kreise auf, die in den Kultivierungen übereinstimmend detektiert wurden. Zahlen in Kreisen ohne Überschneidung beziehen sich auf Gene die nur in dem jeweiligen biologischen Replikate detektiert wurden. Eine Null bedeutet dabei, daß keine Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt als differentiell exprimiert detektiert werden konnten. Die untersuchten Zeitpunkte sind das Inokulum, t2h-, die exponentielle und die stationäre Wachstumsphase.

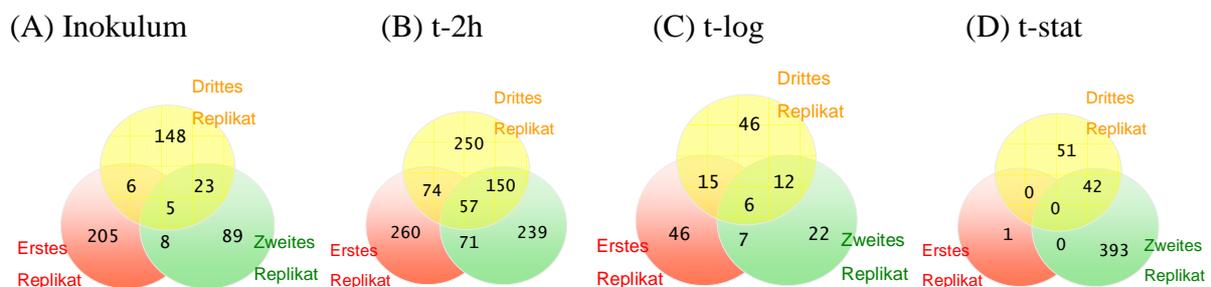


Abb.D.9: Venn-Diagramme zum Vergleich der differentiell exprimierten Gene die zu bestimmten Zeitpunkten in allen drei biologischen Replikaten detektiert werden konnten. Die Anzahl der detektierten, statistisch signifikant differentiell exprimierten Gene aller biologischer Replikate zum Zeitpunkt t2h (B), exponentielle Wachstumsphase (tlog) (C) und stationäre Wachstumsphase (tstat.) (D). Der Zeitpunkt t-log (36h bzw. 37h) und t-stat (55h bzw. 59h). Zusätzlich sind die Venn-Diagramme der zur Inokulation genutzten Inokulums (A) gezeigt. Rot= erstes biologisches Replikate, grün= zweites biologisches Replikate, gelb= drittes biologisches Replikate.

In den drei Inokulums findet man eine Schnittmenge von fünf statistisch signifikant differentiell exprimiert detektierten Genen. Während man zum Zeitpunkt t2h 57 Gene findet,

die in allen drei Replikaten statistisch signifikant differentiell exprimiert sind, findet man in der exponentiellen Wachstumsphase noch sechs Gene, wohin in der stationären Wachstumsphase keine Gene detektiert werden konnten, die in allen drei biologischen Replikate differentiell exprimiert werden. Bei diesem Zeitpunkt findet man zwischen Replikat zwei und drei jedoch eine Schnittmenge von 42 Genen.

Alle drei Inokulums wurden in der spät-exponentiellen Phase, beim Übergang in die stationäre Phase in den 13 l-Bioreaktor überführt. Zu diesem Zeitpunkt sind in allen drei Inokulums Gene der oxidativen Detoxifikation stark reprimiert. Diese Gene *ahpCF* kodieren für eine Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase, die in der Umwandlung von reaktiven Sauerstoffspezies, inklusive Superoxid-Anionen, Peroxiden und Hydroxyl Radikalen, die beim aeroben Metabolismus entstehen involviert sind. Auch die von *catB* kodierte Katalase ist bei der direkten Detoxifikation und beim Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt (Loprasert et al., 1996; Demple, 1991).

Betrachtet man die Anzahl an statistisch signifikant differentiell exprimiert detektierten Genen zum Zeitpunkt t2h in allen drei biologischen Replikaten findet man eine höhere Anzahl an Genen. Im ersten biologischen Replikat sind 260 Gene differentiell exprimiert, im zweiten 239 und im dritten 250. Dementsprechend findet man eine große Anzahl der Gene in den Schnittmengen der drei Kultivierungen von 57. Von diesen Genen sind 37 Gene als induziert und 19 als reprimiert detektiert. Neben der Induktion der Gene der oxidativen Detoxifikation (*ahpCF*, *oxyR*, *catB*) wurden zum Zeitpunkt t2h weitere induzierte Gene der oxidativen Stressantwort wie *katG*, *trxA*, *xthA1* und *ohr* detektiert. Des Weiteren sind zwei Gene *acrB* und *mexE*, die Multidrug-Efflux-Proteine kodieren induziert, sowie eine große Anzahl an ribosomalen Genen, die eine Induktion zeigen. Als reprimiert detektiert sind Gene der Aminosäurebiosynthese wie *metE* und *ilvC*. *metE* kodiert eine S-Methyltransferase die in der Methionin-Biosynthese involviert ist, während *ilvC* eine Ketol-Acid-Reductoisomerase kodiert, die zum einen in der Valin, Leucin und Isoleucin Biosynthese, aber auch in der Synthese von Vitaminen und Cofaktoren involviert ist.

Zum Zeitpunkt der exponentiellen Probenentnahme findet man sechs Gene, die in allen drei Kultivierungen statistisch signifikant reprimiert sind. Das sind zum einen die Gene die für die Enzyme der oxidativen Detoxifikation kodieren, die schon im Inokulum und zum Zeitpunkt t2h differentiell exprimiert wurden (*ahpCF*). Des Weiteren sind drei Gene mit unbekanntem Genprodukt zu diesem Zeitpunkt reprimiert (*xcc-b100_0431*, *xcc-b100_2347*, *xcc-b100_3585*, *uptF*)

In der stationären Wachstumsphase hingegen sind weniger Gene statistisch signifikant differentiell exprimiert. Während in der zweiten Kultivierung 393 Gene detektiert werden konnten, sind es in der dritten noch 51, und in der ersten nur ein Gen. So ergibt sich für die Schnittmenge dieses Zeitpunkts kein Gen, das in allen drei Kultivierungen statistisch signifikant differentiell exprimiert ist. Die Schnittmenge der Gene die in den biologischen Replikaten zwei und drei in der stationären Phase detektiert worden sind, beträgt 42, wobei bis auf ein Gen sämtliche reprimiert sind. So zum Beispiel die Gene der schwefelhaltigen Aminosäure-Biosynthese *cysI*, *cysD* und *cysP* (Methionin und Cystein). Weitere Aminosäure Biosynthese Gene die als reprimiert detektiert wurden sind *ilvC*, *metY* und *tauD*. Eine größere Anzahl an ribosomalen Genen von der Genomposition *xcc-b100_3436* bis *xcc-b100_3460* sind ebenfalls reprimiert. Als einziges Gen ist *xcc-b100_3313* induziert, dessen Genprodukt möglicherweise eine Citrat-Synthase ist.

D.1.2.10 „Clusters of Orthologous Groups“ (COG) der statistisch signifikant differentiell exprimierten Gene zu bestimmten Zeitpunkten der Kultivierungen

Die Genprodukte der als statistisch signifikant differentiell exprimiert detektierten Gene wurden nach ihrer Zugehörigkeit zu COG-Klassen prozentual ihrer Präsenz zu den verschiedenen Zeitpunkten der drei Kultivierungen dargestellt. Der Expressionsstatus und die Anzahl der zugehörigen Gene ist durch einen roten Balken (induziert) oder grünen Balken (reprimiert) für die drei biologischen Replikate dargestellt. Die ersten beiden Balken korrespondieren zum ersten biologischen Replikat, die folgenden beiden Balken zum zweiten biologischen Replikat und die letzten beiden Balken zum dritten biologischen Replikat.

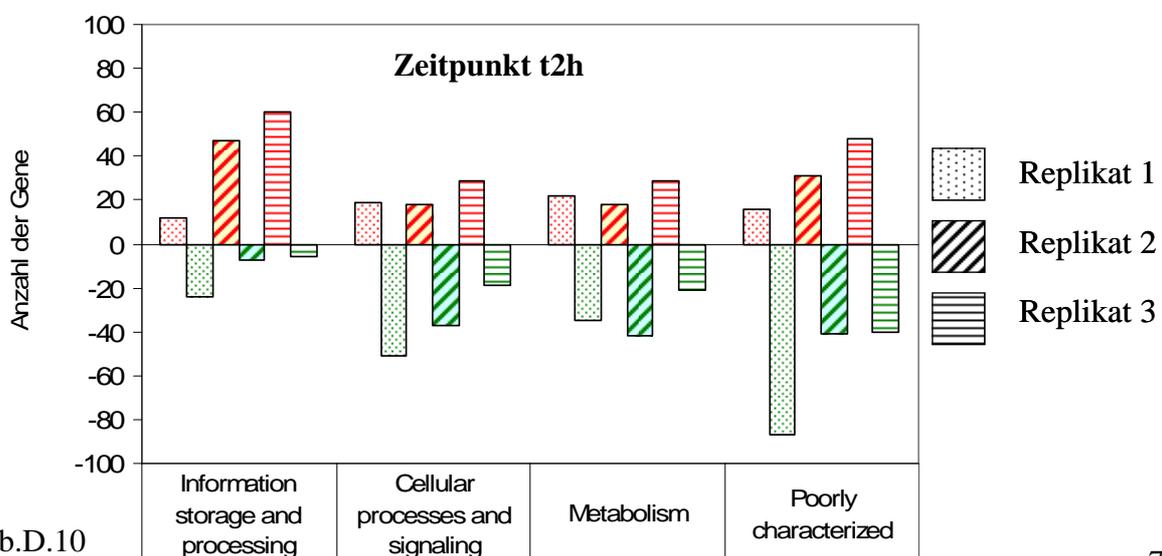


Abb.D.10

Abb.D.10: Anzahl der statistisch signifikant differentiell exprimierten Genen zum Zeitpunkt t2h der drei Kultivierungen und Zugehörigkeit der Genprodukte zu COG-Klassen. Rote Balken zeigen die Anzahl an induzierten Genen, grüne Balken die der reprimierten Gene in den drei biologischen Replikaten zum Zeitpunkt t2h an. Eingeteilt sind die Genprodukte in die COG-Klassen „Information storage and processing“, „Cellular processes and signaling“, „Metabolism“ und „Poorly characterized“ (R+S+X).

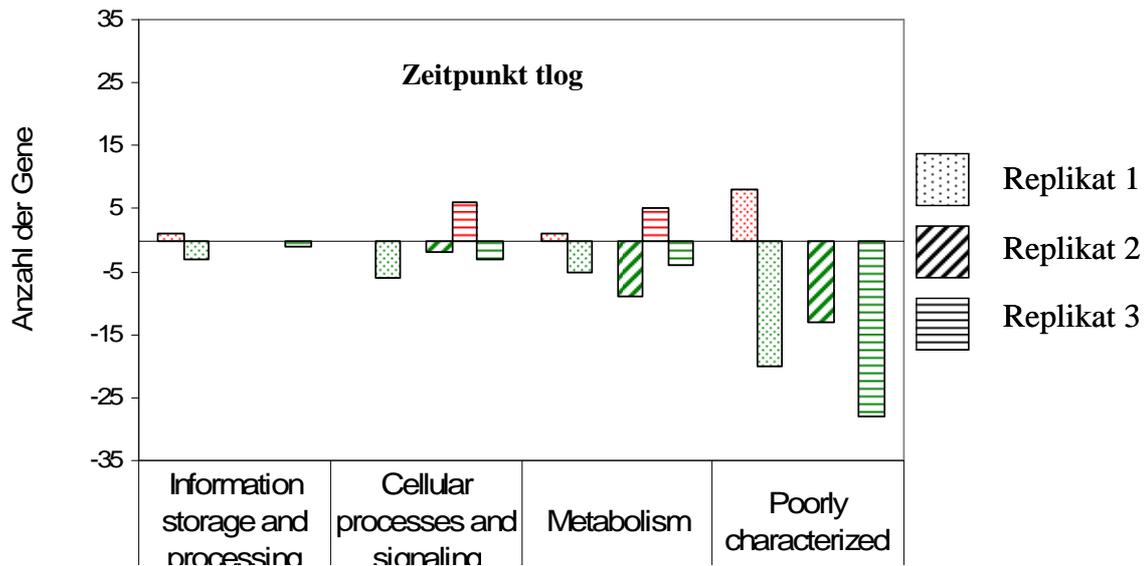


Abb.D.11: Anzahl der statistisch signifikant differentiell exprimierten Genen zum Zeitpunkte der exponentiellen Phase der drei Kultivierungen und Zugehörigkeit der Genprodukte zu COG-Klassen. Rote Balken zeigen die Anzahl an induzierten Genen, grüne Balken die der reprimierten Gene in den drei biologischen Replikaten zum Zeitpunkte der exponentiellen Phase an. Eingeteilt sind die Genprodukte in die COG-Klassen „Information storage and processing“, „Cellular processes and signaling“, „Metabolism“ und „Poorly characterized“ (R+S+X).

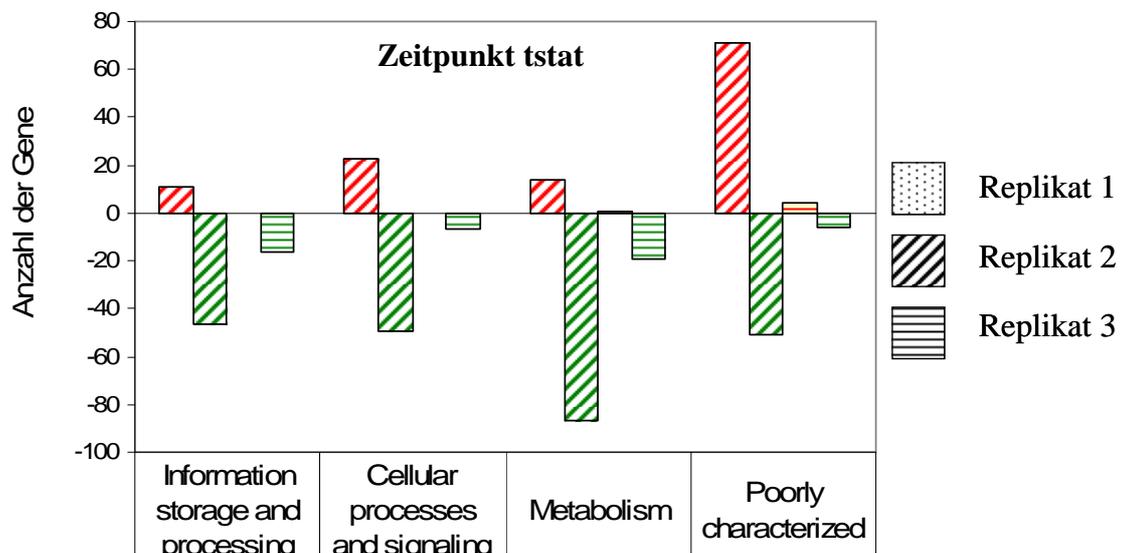


Abb.D.12

Abb.D.12: **Anzahl der statistisch signifikant differentiell exprimierten Genen zum Zeitpunkt tstat der drei Kultivierungen und Zugehörigkeit der Genprodukte zu COG-Klassen.** Rote Balken zeigen die Anzahl an induzierten Genen, grüne Balken die der reprimierten Gene in den drei biologischen Replikaten zum Zeitpunkt der stationären Wachstumsphase an. Eingeteilt sind die Genprodukte in die COG-Klassen „Information storage and processing“, „Cellular processes and signaling“, „Metabolism“ und „Poorly characterized“ (R+S+X).

Zum Zeitpunkt t2h ist ein hoher Anteil der Genprodukte der statistisch signifikant differentiell exprimierten Genen in der COG- Klasse „Information storage and processing“ zu finden. Der größte Teil dieser Gene ist induziert, dabei auch ribosomale Gene, die zum Zeitpunkt t2h als induziert detektiert wurden. Die Gene deren Genprodukte in die COG- Klasse „Cellular processes and signaling“ und „Metabolism“ einzuordnen sind, sind zum ersten Probenentnahmepunkt t2h zum größten Teil reprimiert. Die letzte Klasse der „Poorly characterized“ (R+S+X) Genprodukte, enthält Gene, die zum größten Teil reprimiert sind und zugleich die größte Klasse darstellen. Zu etwa 25% der Gene gibt es keine Klassifizierung der Genprodukte in COG- Klassen, die verifiziert werden konnten.

In der exponentiellen Phase ist nur eine geringe Anzahl an Genen statistisch signifikant differentiell exprimiert. Dementsprechend ist auch die Einteilung der Genprodukte in COG-Klassen problematisch. Zu diesem Zeitpunkt sind die meisten Gene reprimiert und die Anzahl an induzierten Genen ist drastisch zurückgegangen. Die Gruppe der „Poorly characterized“ hat einen Anteil von fast 50%. Diese sind fast ausschließlich reprimiert.

In der stationären Phase verzeichnet man eine Zunahme an statistisch signifikant differentiell exprimierten Genen. Es kommt zu einer starken Zunahme an Genen deren Genprodukte in der Klasse „Metabolism“ einzuordnen sind und zum größten Teil reprimiert sind.

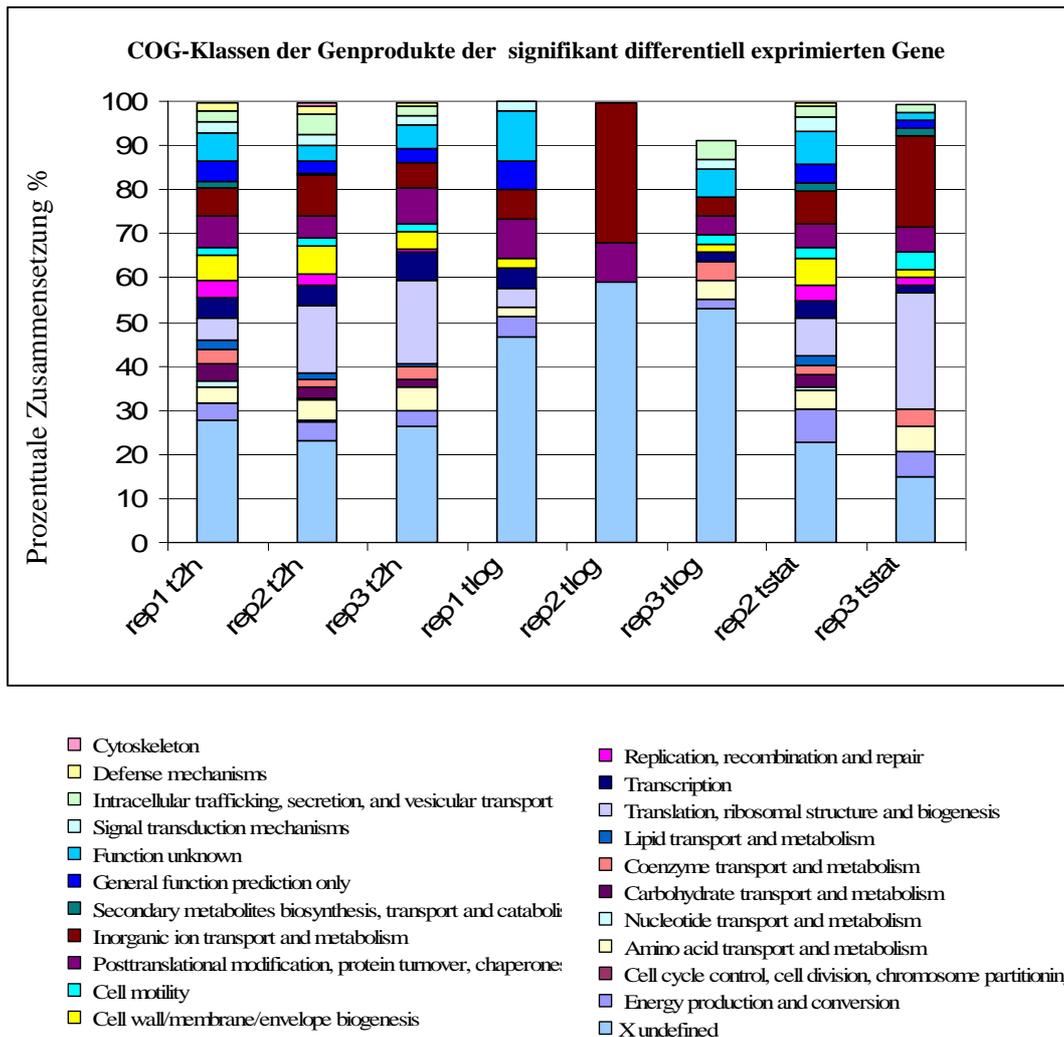


Abb.D.13: **Prozentuale Verteilung der COG-Klassen an den statistisch signifikant differentiell exprimierten Genen und deren Genprodukten zu bestimmten Zeitpunkten der drei Kultivierungen.** Gezeigt sind hier die einzelnen COG-Gruppen der COG-Klassen „Information storage and processing“, „Cellular processes and signaling“, „Metabolism“ und „Poorly characterized“ (R+S+X).

Zu dem Zeitpunkt t2h ist die Gruppe „Translation, ribosomal structure and biogenesis“ innerhalb der Klasse „Information storage and processing“ die mit dem höchsten prozentualen Anteil. In der Klasse „Metabolism“ ist die Gruppe „Inorganic ion transport“ die mit den meisten Proteinen. Zum Zeitpunkt der exponentiellen Phase sind nur wenige Gene als differentiell exprimiert detektiert worden. Die meisten Gene die hier detektiert wurden kodieren für Genprodukte die zu der Klasse „Inorganic Ion Transport“ zählen. Eine weitere große Gruppe, deren Vertreter detektiert werden konnte, ist die „Posttranslational modification, protein turnover, chaperones“, die zu der Klasse „Cellular processes and signaling“ gehört. Zum Zeitpunkt der stationären Phase ist die größte Gruppe die „Inorganic

Ion Transport“, vor der Gruppe „Energy production and conversion“. Weitere Gruppen die zu diesem Zeitpunkt vertreten sind sind „Posttranslational modification, protein turnover, chaperones“ und „Amino acid transport and metabolism“. Somit sind die Klassen mit den höchsten prozentualen Anteilen zu diesem Zeitpunkt die Klassen „Metabolism“ und „Cellular processes and signaling“.

D.1.2.11 Darstellung des Transkriptomprofils durch Auftragung des M-Werts der Gene gegen ihre Position im Genom

Eine geeignete Methode zur Darstellung des globalen Transkriptionsprofils ist die der Auftragung M-Wert gegen die Position des Gens im Genom. Dies ermöglicht die Identifizierung von Genen, die benachbart im Genom lokalisiert sind und eine koordinierte Genexpression zeigen.

In den Kultivierungen konnten durch genompositionsbasierte Scatterplots fünf Regionen identifiziert werden, die eine koordinierte Expression zeigen. Im ersten biologischen Replikat konnte derweil keine Genregion mit koordiniertem Expressionsprofil identifiziert werden. Zwei Regionen konnten in den Replikaten zwei und drei identifiziert werden, während zwei Regionen nur im dritten Replikat gefunden werden konnte und eine Region lediglich in Replikat zwei.

Tab.3.8: **Genregionen die durch Scatterplots aufgetragen mit Genomposition gegen M-Wert als koordiniert exprimiert identifiziert werden konnten.** Angegeben sind die GenDB-Identifikations-Nummern, wenn vorhanden der Gennamen der Gene in der Region, die Funktion der Genprodukte, das Zeitfenster in dem die Region koordiniert exprimiert wird, der Status der Expression und das Replikat in welchem die Region identifiziert wurde.

| Koordiniert exprimierte Region | Gene in der Region | Funktion der Gene | Zeitfenster | Status | Biologisches Replikat |
|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------------------------------|------------|--------------------------|
| 1384 bis 1389 | <i>fhuA2</i> | TonB: Siderophore | t22h bis t26h | Reprimiert | 2 |
| 3582 bis 3585 | <i>phuR</i> | TonB: Hemin | t22h bis t26h t14h bis t21h | Reprimiert | 2 3 |
| 3517 bis 3519 | <i>ahpCF</i> <i>oxyR</i> | ROS detoxification | t22h bis t26h t14h bis t21h | Reprimiert | 2 3 |

| Koordiniert exprimierte Region | Gene in der Region | Funktion der Gene | Zeitfenster | Status | Biologisches Replikat |
|--------------------------------------|--------------------------------|------------------------|---------------|------------|--------------------------|
| 3440 bis 3460 | <i>rpl, rpm,</i> <i>rps</i> | Ribosomale Proteine | t43h bis t55h | Reprimiert | 3 |
| 1946 bis 1948 | <i>cydA2B2</i> | Cytochrome | t43h bis t46h | Induziert | 3 |

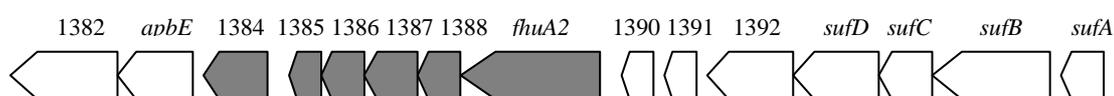
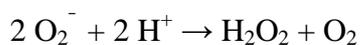


Abb.D.14: **Genorganisation der Region xcc-b100_1384 bis xcc-b100_1389 die im Verlauf der zweiten Kultivierung ein koordiniertes Expressionsprofil zeigt.** Diese Region wird in dem Zeitfenster t22h bis t26h reprimiert. Alle detektierten Gene sind grau unterlegt. Die weißen Pfeile zeigen die im Genom unmittelbar benachbart lokalisierten Gene.

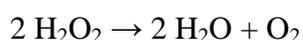
Zwei Regionen mit einem TonB-abhängigen Rezeptor, die beide bei der Eisenaufnahme involviert sind, konnten detektiert werden.

In einer weiteren detektierten Region sind die Gene die für die Detoxifikationsenzyme von Sauerstoff-Radikalen kodieren lokalisiert. Durch die Produktion von ROS werden Detoxifikations-Enzyme gebildet, die folgende Reaktionen katalysieren:

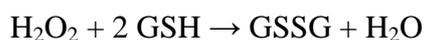
Detoxifikation



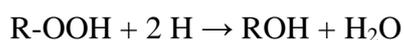
Superoxiddismutase



Katalase



Gluthathion-Peroxidase

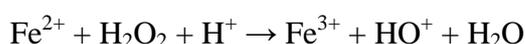


Peroxidase

ROS Produktion



Fenton Reaktion



Sauerstoff-Radikale unter anderem aus dem aeroben Stoffwechsel schädigen DNA, Fe-S-Cluster, Thiolgruppen von Proteinen und Lipide werden peroxidiert. Inaktiviert werden sie durch Superoxiddismutasen, Katalasen, Gluthathion-Peroxidasen und Peroxidasen. Die Bakterienzelle hat verschiedene Sensoren um verschiedene Redox-Signale zu überwachen. Thiol-basierte Sensoren wie z.B. OxyR, ein Regulator der LysR-Familie der Peroxidstress kontrolliert und als Tetramer in einer oxidierten und reduzierten Form in der Zelle vorliegt und Fe-S-Cluster basierte Sensoren wie Sox, die Superoxidstreß regulieren.

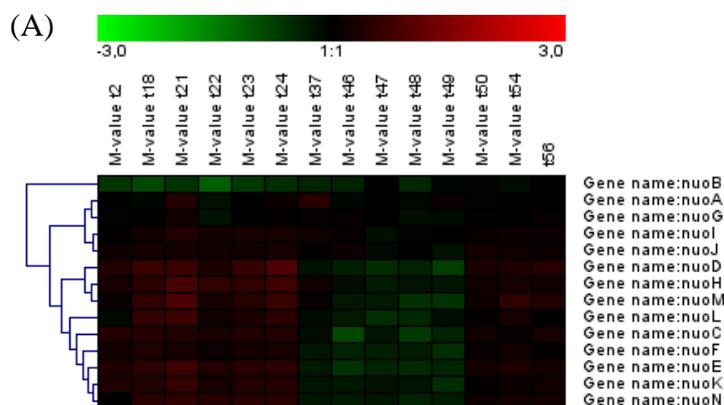
Das im Genom benachbart zur detektierten Region 1384 bis 1389 lokalisierte *suf*-Operon wird vom oxidierten OxyR reguliert, indem dessen Induktion durch Peroxid-Streß positiv reguliert wird.

Des weiteren konnte die Reprimierung von ribosomalen Genen in der stationären Phase im dritten biologischen Replikate detektiert werden. Außerdem konnte die Induktion von Cytochrom bd-I Oxidase Subunit I und II kodierenden Genen in der stationären Phase des dritten biologischen Replikats detektiert werden

D.1.2.12 Auffällige Genexpressionsprofile und deren heat-maps

Um die Veränderungen einiger Gene im Verlauf der Kultivierungen der drei biologischen Replikate zu vergleichen, wurden für einige Gene das Expressionsprofil mittels heatmaps dargestellt.

D.1.2.12.1 Einige Gene der „Oxidativen Phosphorylierung“ (*nuo* Gene)



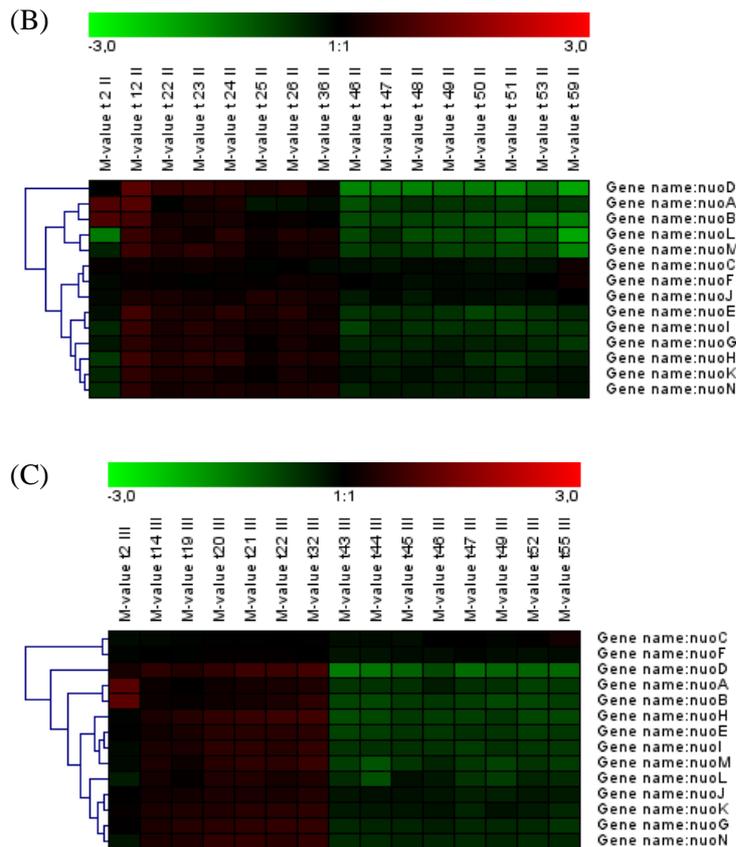


Abb.D.15: Genexpressionsprofil der *nuo*-Gene der (A) ersten, (B) zweiten und (C) dritten Kultivierung über den Verlauf der Kultivierungen. Hierarchisches Clustering und die heatmaps der *nuo*-Gene.

Einige Gene der Oxidativen Phosphorylierung (*nuo*-Gene), die eine NADH-Dehydrogenase kodieren, zeigen in allen drei Kultivierungen eine stärkere Induktion bis zu exponentiellen Wachstumsphase und im Übergang in die stationäre Wachstumsphase eine Reprimierung.

D.1.2.12.2 Schwefelmetabolismus und Biosynthese der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein

Die *cys*-Gene kodieren für die Enzyme die als Sulfate Importer im ABC Transporter System eine Rolle spielen. Zudem sind einige der *cys*-Gene in der Biosynthese der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein involviert.

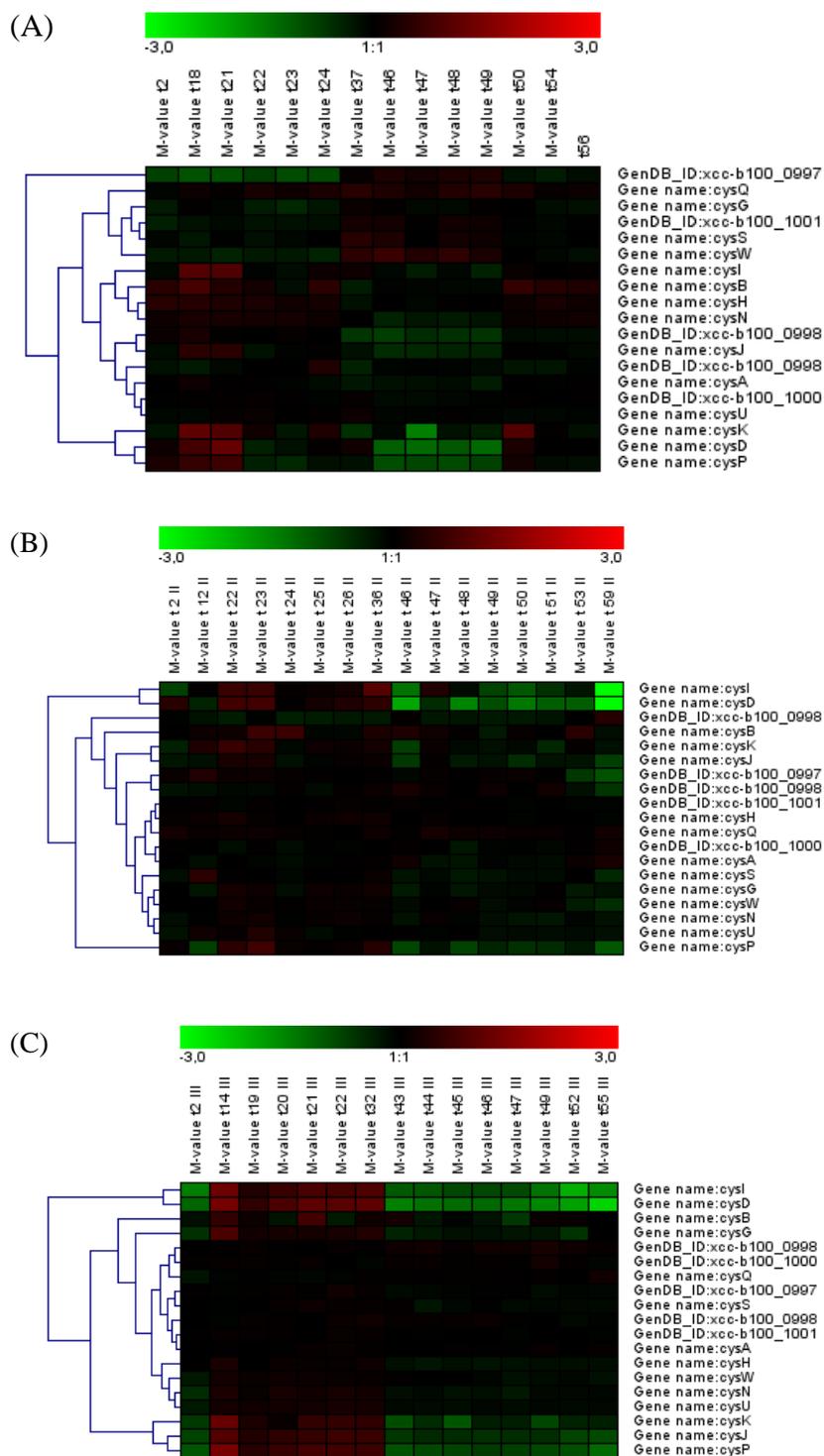


Abb.D.16: Genexpressionsprofil der *cys*-Gene der (A) ersten, (B) zweiten und (C) dritten Kultivierung über den Verlauf der Kultivierungen. Hierarchisches Clustering und die heatmaps der *cys*-Gene.

Die *cys*-Gene zeigen in den drei Kultivierungen ein sehr ähnliches Expressionsprofil, indem es zum Zeitpunkt t2h zu einer Reprimierung kommt, in der lag-Phase bis zur exponentiellen

Wachstumsphase zu einer Induktion der Gene, während es in der stationären Phase zu einer deutlichen Reprimierung der Gene kommt.

D.1.2.12.3 „Radical Oxygen Stress Response“ (ROS)

Die Streßantwort auf Sauerstoff-Radikale erfolgt in der Zelle durch die Expression von Genen, die Peroxidasen, Katalasen und Superoxiddismutasen kodieren.

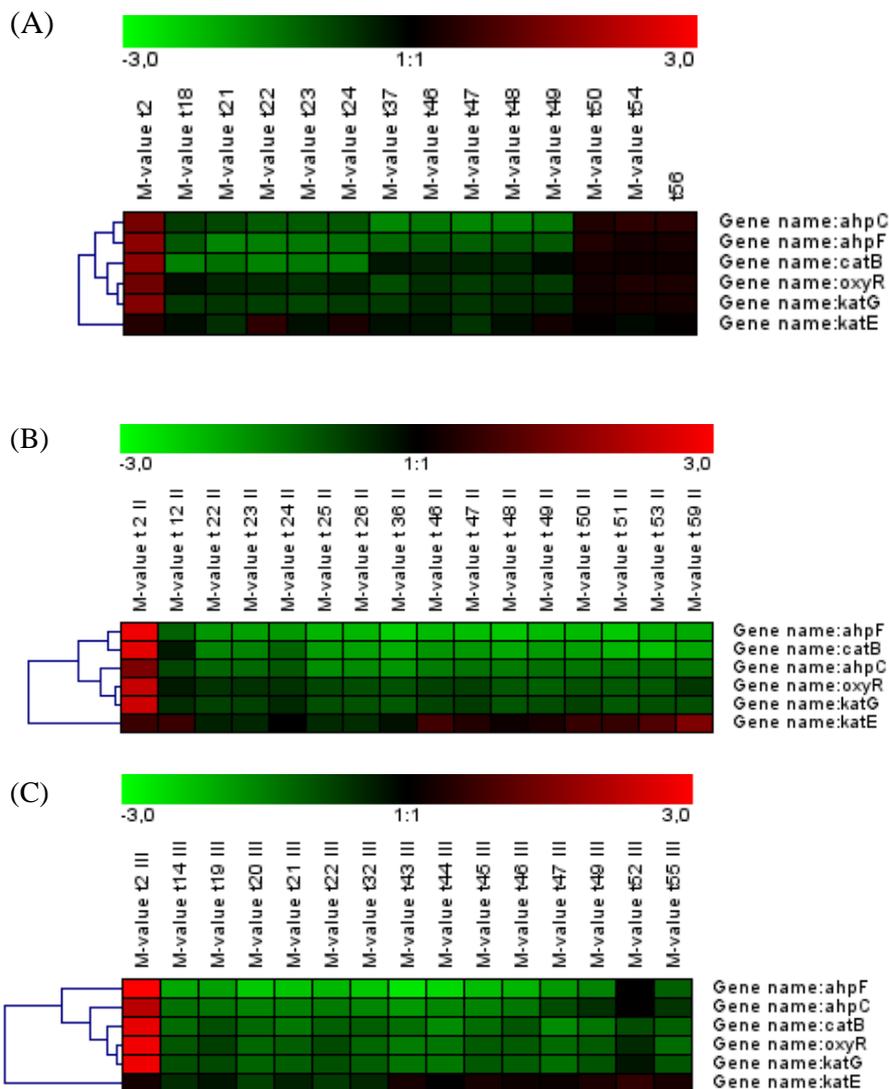


Abb.D.17: Genexpressionsprofil der „Radical Oxygen Stress Response“ Gene der (A) ersten, (B) zweiten und (C) dritten Kultivierung über den Verlauf der Kultivierungen. Hierarchisches Clustering und die heatmaps der Gene *ahpCF*, *catB*, *oxyR* und *katGE*.

In allen drei Kultivierungen sieht man eine starke Induktion dieser Gene, wonach es zu allen Zeitpunkten in den drei Kultivierungen zu einer Reprimierung dieser Gene kommt. Der Regulator OxyR zeigt dasselbe Expressionsprofil wie die der Gene *ahpCF*, *catB* und *katGE*.

D.1.2.12.4 Einige für die Eisen-Aufnahme-Proteine kodierenden Gene

Die Gene *phuR*, *fpvA*, *exbD* und *iroN* kodieren für Enzyme die über ein TonB-System die Eisen-Aufnahme der Zelle bewerkstelligen. *fpvA* kodiert für einen Rezeptor der Äußeren Membran.

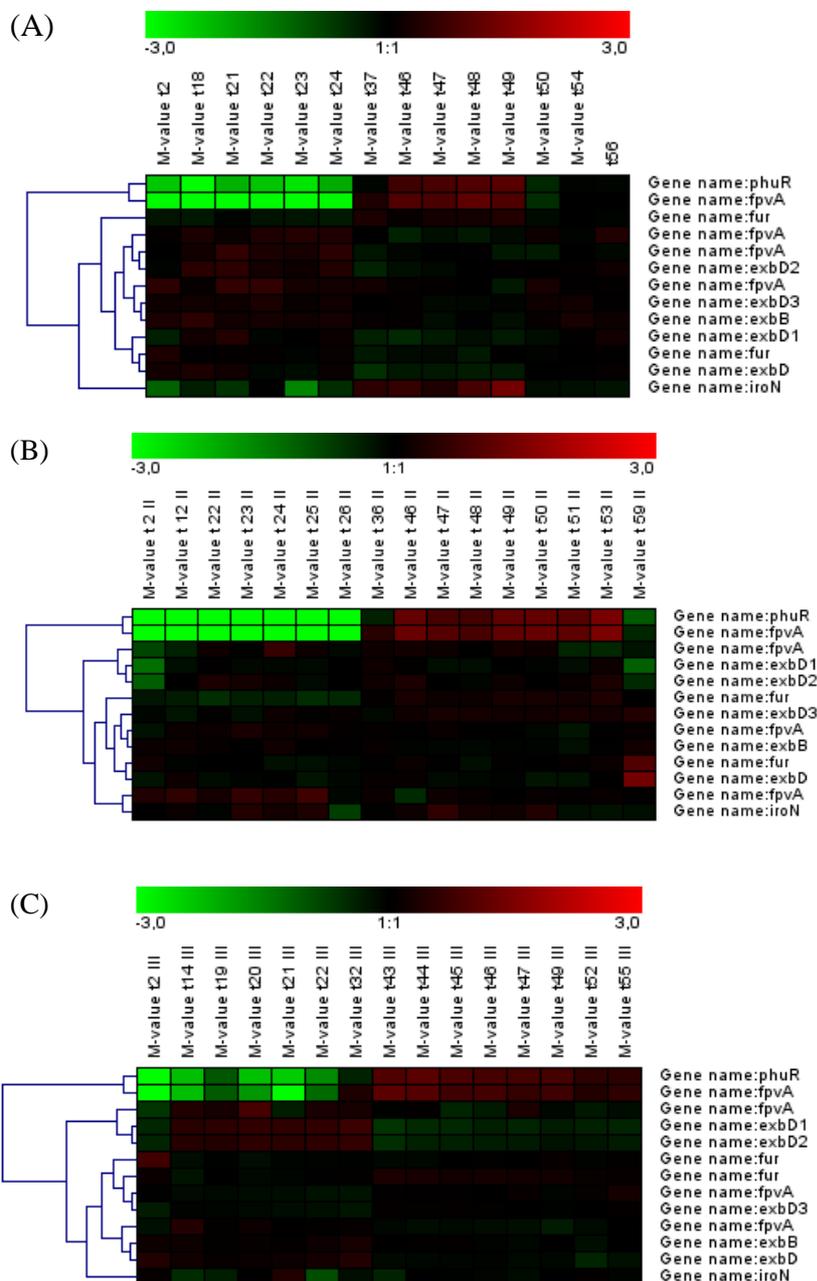


Abb.D.18

Abb.D.18: **Genexpressionsprofil einiger für die Eisen Aufnahme verantwortlichen Gene der (A) ersten, (B) zweiten und (C) dritten Kultivierung über den Verlauf der Kultivierungen.** Hierarchisches Clustering und die heatmaps der Gene *phuR*, *fpvA*, *exbD*, *fur* und *iroN*.

Die Gene *phuR*, *fpvA*, *exbD* und *iroN* kodieren für Enzyme die über ein TonB-System die Eisen-Aufnahme der Zelle bewerkstelligen. *fpvA* kodiert für einen Rezeptor der Äußeren Membran und zeigt während der lag-Phase eine starke Reprimierung, während es im Verlauf der exponentiellen Phase hin zur stationären Phase zu einer Induktion dieses Gens kommt. Ein sehr ähnliches Expressionsprofil zeigt *phuR* und etwas abgeschwächt *iroN*.

D.1.2.12.5 Gene des *gum*-Clusters

Die für die Xanthan-Biosynthese erforderlichen Gene des *gum*-Clusters zeigen kein eindeutiges und in allen drei Kultivierungen übereinstimmendes Expressionsprofil. Zum Zeitpunkt t2h sind fast alle Gene des Clusters reprimiert. Gene die in der lag-Phase leicht induziert werden sind *gumCDN*, während *gumIO* in der stationären Phase leicht induziert werden.

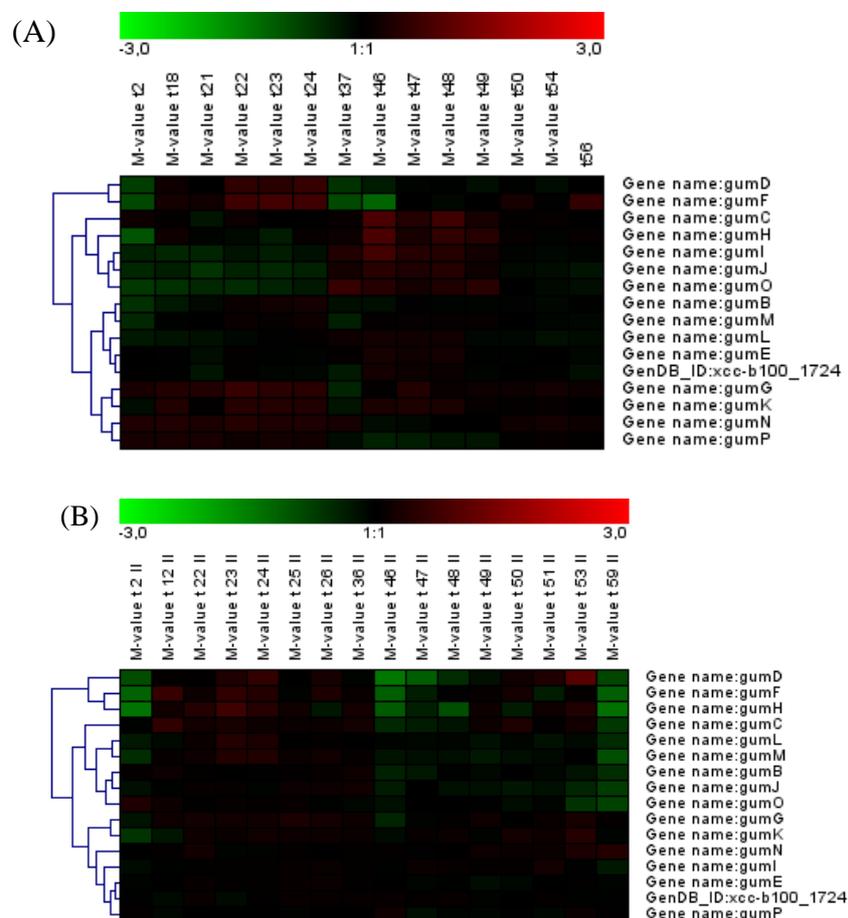


Abb.D.19

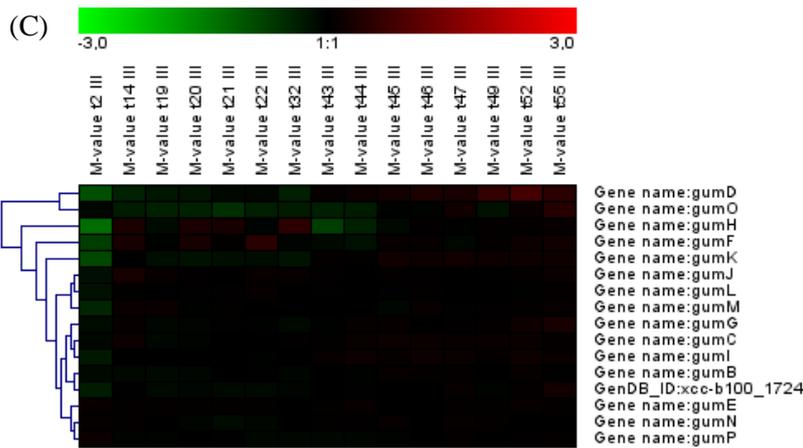


Abb.D.19: Genexpressionsprofil des *gum*-clusters der (A) ersten, (B) zweiten und (C) dritten Kultivierung über den Verlauf der Kultivierungen. Hierarchisches Clustering und die heatmaps.

D.1.2.13 „k-means clustering“ und Einteilung in COG-Klassen

Eine weitere Clustering-Methode ist das „k-means clustering“, das ausgehend von einer vorher definierten Anzahl an Clustern, Gene mit ähnlichen Expressionsprofilen über den Verlauf der Kultivierung zu Gruppen zusammenfaßt.

D.1.2.13.1 Erstes biologisches Replikat

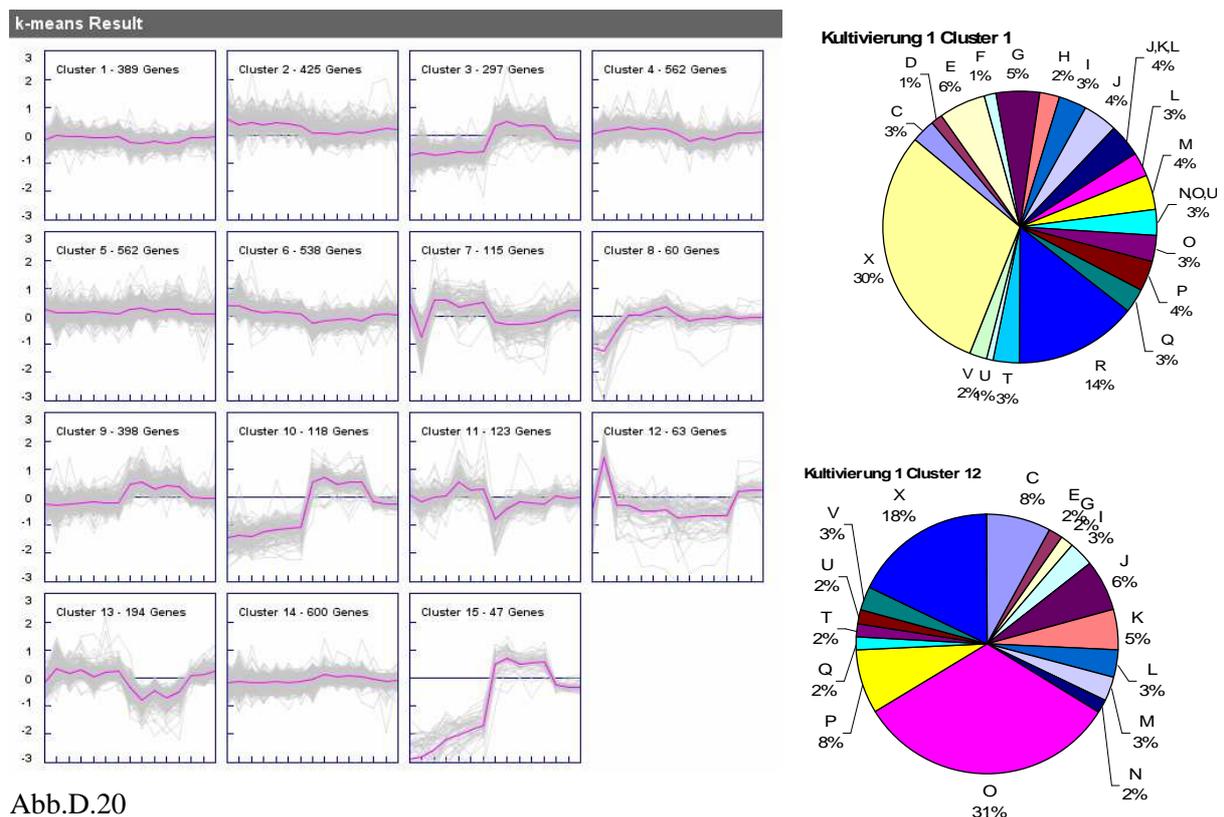


Abb.D.20

Abb.D.20: Ergebnis des „k-means clusterings“ mit n=15 Clustern der ersten Kultivierung und die Zusammensetzung ausgewählter Cluster unterschieden nach der Präsenz der Genprodukte in COG Klassen Für jedes Cluster ist die Veränderung des M-Werts über den Verlauf der drei Kultivierungen gezeigt und die Anzahl der Gene im jeweiligen Cluster. Die Kreisdiagramme zeigen den prozentualen Anteil der jeweiligen Genprodukte an COG-Klassen für bestimmte Cluster. Eine Übersicht aller Gene in allen Clustern befindet sich im Anhang auf CD.

Von den 15 Clustern zeigen die Gene der Cluster 10 und 15 ein relativ ähnliches Expressionsprofil, mit einer starken Reprimierung zu Beginn der Kultivierung und während der lag-Phase eine Induktion der Gene. Darunter sind Gene der Aminosäure-Biosynthese und des Schwefel-Metabolismus.

Für Cluster 12 ist die Zusammensetzung der Genprodukte in COG-Klassen gezeigt. Die Gene dieses Clusters zeigen eine starke Induktion zum Zeitpunkt t2h. Innerhalb dieses Clusters ist die Gruppe der Genprodukte der „Posttranslational modification, protein turnover, chaperones“ mit 31% die größte. In diesem Cluster findet man die Gene, die für die Enzyme der Sauerstoff-Radikalen-Detoxifikation kodieren. Cluster 1 beinhaltet 393 Gene, die weder ein bestimmtes Expressionsprofil, noch eine Anhäufung interessanter COG-Klassen zeigt, was jedoch für die meisten Cluster der ersten Kultivierung zutrifft.

D.1.2.13.2 Zweites biologisches Replikat

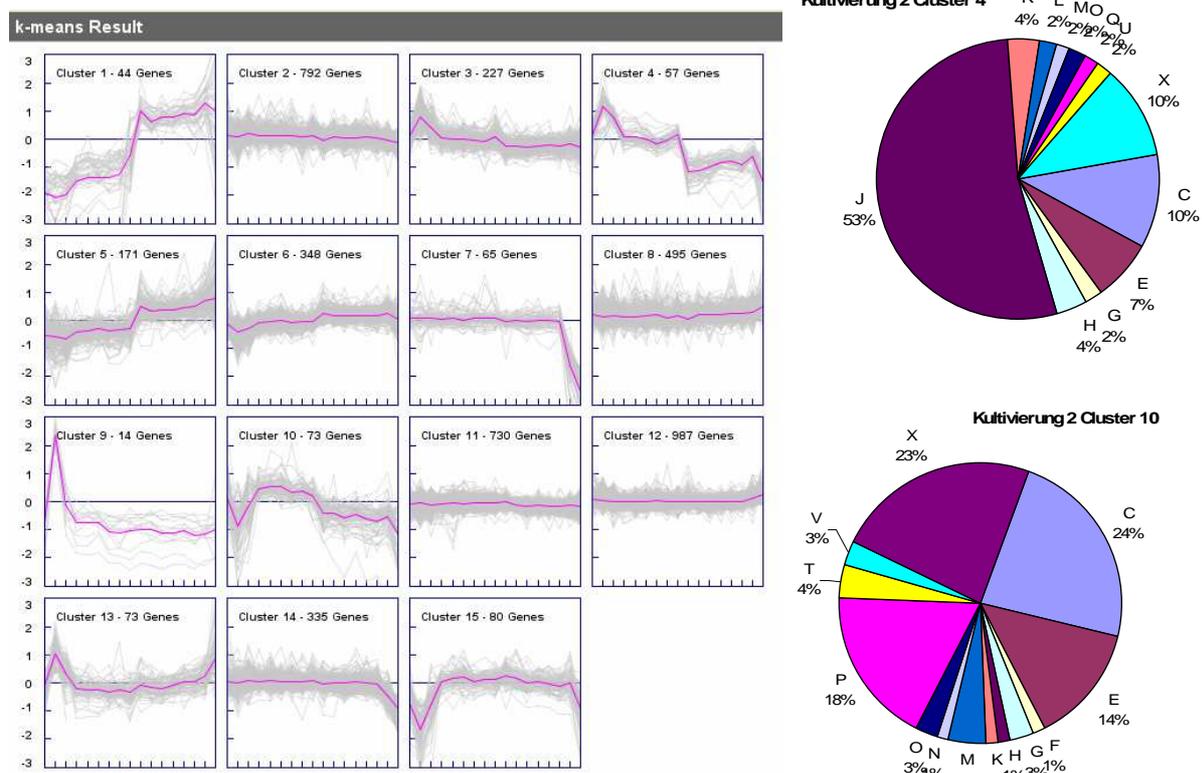


Abb.D.21

Abb.D.21: Ergebnis des „k-means clusterings“ mit n=15 Clustern der zweiten Kultivierung und die Zusammensetzung ausgewählter Cluster unterschieden nach der Präsenz der Genprodukte in COG Klassen Für jedes Cluster ist die Veränderung des M-Werts über den Verlauf der drei Kultivierungen gezeigt und die Anzahl der Gene im jeweiligen Cluster. Die Kreisdiagramme zeigen den prozentualen Anteil der jeweiligen Genprodukte an COG-Klassen für bestimmte Cluster. Eine Übersicht aller Gene in allen Clustern befindet sich im Anhang auf CD.

Bei der zweiten Kultivierung findet man zwischen den Genen der Cluster 9 und 13 ein ähnliches Expressionsprofil, mit einer starken Induktion der Gene zum Zeitpunkt t2h und im weiteren Verlauf der Kultivierung keine auffällige Expression der Gene. In diesen Cluster befinden sich hauptsächlich ribosomale Gene, die Gene der Sauerstoff-Radikalen-Detoxifikation (ROS) und einige alternative ECF-type Sigmafaktoren, von denen die meisten bei der Streßantwort der Zelle eine Rolle spielen (*rpoE*, *rpoE2*, *rpoE6*, *rpoP*, *rpoH*).

Die Gene der Cluster 10 und 15 zeigen eine starke Reprimierung zum Zeitpunkt t2h, während der Kultivierung kein auffälliges Profil und in dem jeweiligen letzten Zeitpunkt wieder eine Reprimierung. Vornehmlich sind Gene der Aminosäure-Biosynthese, die NADH-Dehydrogenase kodierenden *nuo*-Gene und einige Gene des *gum*-Clusters (*gumDFH*) in diesem Cluster zu finden. Betrachtet man die Genprodukte der Gene dieses Clusters so sind die meisten Mitglieder der Gruppe „Energy production and conversion“, „Amino acid transport and metabolism“ und „Inorganic ion transport and metabolism“.

Die Gene des Clusters 4 zeigen im Expressionsprofil eine Induktion zum Zeitpunkt t2h, im weiteren Verlauf der lag-Phase eine Reprimierung und in der exponentiellen Phase eine weitere deutliche Reprimierung. Die Genprodukte der Gruppe „Translation, ribosomal structure and biogenesis“ sind mit 53% die am häufigsten vertretenen.

D.1.2.13.3 Drittes biologisches Replikat

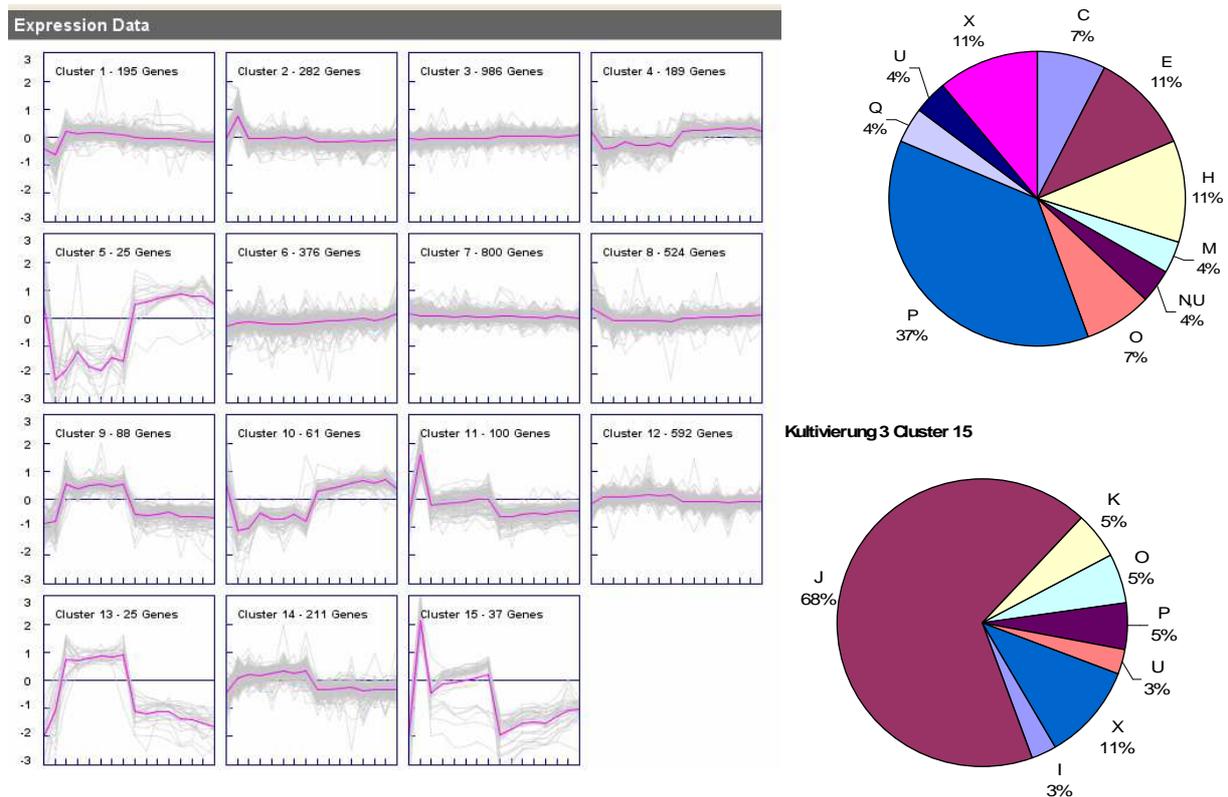


Abb.D.22: Ergebnis des „k-means clusterings“ mit n=15 Clustern der dritten Kultivierung und die Zusammensetzung ausgewählter Cluster unterschieden nach der Präsenz der Genprodukte in COG Klassen Für jedes Cluster ist die Veränderung des M-Werts über den Verlauf der drei Kultivierungen gezeigt und die Anzahl der Gene im jeweiligen Cluster. Die Kreisdiagramme zeigen den prozentualen Anteil der jeweiligen Genprodukte an COG-Klassen für bestimmte Cluster. Eine Übersicht aller Gene in allen Clustern befindet sich im Anhang auf CD.

In der dritten Kultivierung haben die Gene der mittels „k-means-clustering“ generierten Cluster 11 und 15 ein ähnliches Expressionsprofil. Es kommt zu einer starken Induktion der Gene zum Zeitpunkt t2h, während der lag-Phase liegt der M-Wert um Null, wonach es in der exponentiellen Phase zu einer starken Reprimierung dieser Gene kommt. Die meisten Genprodukte des Clusters 15 gehören in die COG-Gruppe „Translation, ribosomal structure and biogenesis“. 68% sämtlicher Genprodukte klassifiziert sich in dieser Gruppe.

Weitere Cluster deren Gene ein ähnliches Expressionsprofil aufweisen sind die Cluster 9 und 13. In Cluster 13 sind die mit 37% am häufigsten vertretenen Genprodukte die der Gruppe „Inorganic ion transport and metabolism“.

D.2 Analyse der Genregulation des Kohlenhydratmetabolismus mittels Mutationsanalyse

D.2.1 Auswahl der Regulatoren zur Mutagenese und Wachstum der generierten Mutanten

Zu Beginn der Arbeiten wurde im Xcc B100 Genom nach Genen die potentielle transkriptionelle Regulatoren des Kohlenhydratmetabolismus kodieren gesucht. Dabei wurden bereits annotierte Gene ausgewählt, deren Genprodukte im Kohlenhydrat-Metabolismus eine Rolle spielen könnten, aber auch nach Genen, deren Genprodukte noch nicht als regulatorisches Element annotiert waren. Dazu wurde die Annotationssoftware GenDB und deren integrierte Applikationen genutzt (Meyer et al., 2003). Mit den integrierten Tools wie Blast wurde nach Homologien in der DNA-Sequenz eines Gens und der Aminosäuresequenz des Genprodukts in anderen Genomen gesucht. InterPro wurde genutzt, um nach regulatorischen Motiven innerhalb des Gens zu suchen, was mit der DBD-Software validiert wurde (Kummerfeld und Teichmann 2006). DBD identifiziert Transkriptionsfaktoren durch Homologie-Vergleiche aufbauend auf einem „Hidden Markov Modell“ (HMM), indem es eine Transkriptionsfaktor Datenbank nutzt. Die Datenbank umfaßte zum Zeitpunkt der Analyse 150 sequenzierte Genome. Sämtliche zur Mutagenese ausgewählten Gene wurden mit DBD auf die Anwesenheit eines Sequenzmotivs geprüft.

Neben Regulatoren der LacI-Familie wurden zwei alternative Sigma-54-Faktoren, ein Regulator der LysR-Familie und zwei Regulatoren, deren kodierenden Gene unmittelbar upstream vor dem *gum*-cluster lokalisiert ausgewählt. Diese vor dem *gum*-Cluster lokalisierten Gene kodieren für eine Untereinheit des Integration-Host-Factors und einen Regulator der MerR-Familie. Die zur Mutagenese ausgewählten Gene sind aufgrund ihrer Sequenzmotive als Regulatoren im Xcc B100 Genom annotiert, ihre Spezifität ist in den meisten Fällen jedoch unklar.

Neben den Kriterien der Präsenz von Sequenzmotiven auf DNA- und Aminosäureebene, wurden die Gene zur Mutagenese abhängig von der Lokalisation von Genen upstream und downstream des deletierten Gens gewählt, die im Kohlenstoff-Metabolismus eine Rolle spielen könnte. So sind die deletierten Gene upstream oder downstream von Genen lokalisiert die Monosaccharid-Isomerasen, oder Monosaccharid-Porter, TonB-abhängige Rezeptoren kodieren oder allgemein nahe von Genen der Zucker-Verwertungsoperons lokalisiert sind.

Tab.D.9: Übersicht der zur Mutagenese ausgewählten potentiellen Regulatoren des Kohlenhydratmetabolismus in Xcc. Gezeigt sind die GenDB-Identifikations-Nummer, der Genname und die zugehörige Familie transkriptioneller Regulatoren.

| GenDB-Ident.-Nr. | Genname | Familie transkriptioneller Regulatoren | Mutagenese |
|------------------|--------------|--|-------------------------------------|
| xcc-b100_1803 | | LacI | Markerfreie Deletion Gene-SOEing |
| xcc-b100_0841 | <i>suxR</i> | LacI | Markerfreie Deletion Gene-SOEing |
| xcc-b100_0785 | | LacI | Markerfreie Deletion Gene-SOEing |
| xcc-b100_4306 | | LacI | Markerfreie Deletion Gene-SOEing |
| xcc-b100_0167 | | LacI | Markerfreie Deletion Gene-SOEing |
| xcc-b100_1703 | | LacI | Markerfreie Deletion Gene-SOEing |
| xcc-b100_1971 | | LacI | Markerfreie Deletion Gene-SOEing |
| xcc-b100_4342 | <i>rbsR</i> | LacI | Markerfreie Deletion Gene-SOEing |
| xcc-b100_1019 | | LacI | Markerfreie Deletion Gene-SOEing |
| xcc-b100_1710 | <i>ihfA</i> | IHF Integration Host Factor | Plasmidintegration Km ^R |
| xcc-b100_2513 | | LysR | Plasmidintegration Km ^R |
| xcc-b100_1711 | | MerR | Plasmidintegration Km ^R |
| xcc-b100_1358 | <i>rpoN1</i> | σ^{54} Sigma Faktor | Plasmidintegration Km ^R |
| xcc-b100_2232 | <i>rpoN2</i> | σ^{54} Sigma Faktor | Markerfreie Deletion Gene-SOEing |

Die Zugehörigkeit der ausgewählten Gene und ihrer Genprodukte zu Familien der transkriptionellen Regulatoren ist in Abbildung D.23 dargestellt. Es wurden insgesamt vierzehn potentielle Gene, die Regulatoren des Kohlenhydratmetabolismus kodieren, zur Mutagenese ausgewählt. Dabei sind neun Mitglieder der LacI-Familie, jeweils einer der LysR- bzw. MerR-Familie. Zudem ein „Integration-Host-Factor“ und zwei alternative Sigma-54-Faktoren. Die Mutagenese wurde wenn möglich durch eine markerfreie Deletion in der Kodierregion durch „gene-SOEing“ generiert oder alternativ durch Plasmidintegration.

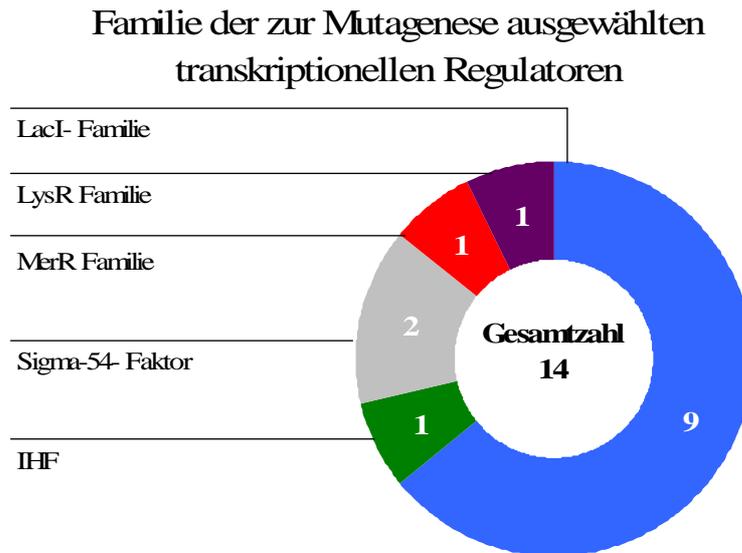


Abb.D.23: **Übersicht der zur Mutagenese ausgewählten Regulatoren und deren Zugehörigkeit zu Familien transkriptioneller Regulatoren.** Die Gesamtzahl an ausgewählten Regulatoren beträgt vierzehn. Neun Regulatoren stammen aus der Familie der LacI-Regulatoren, jeweils einer aus der LysR- bzw. MerR-Familie. Zwei Sigma-54-Faktoren sowie ein Integration-Host-Factor wurden zur Mutagenese ausgewählt.

In den ausgewählten Genen wurde wenn möglich mittels „Gene-SOEing“ eine markerfreie Deletion in der Kodierregion des Gens eingeführt. Alternativ wurde als weitere Mutagenese die Plasmidintegration verwendet. Dabei unterbricht der eingebrachte Vektor das zu mutierende Gen und trägt eine Kanamycin vermittelte Antibiotika Resistenz (vgl. Material und Methoden). Die jeweilige Mutationsart und die Lokalisation der Deletion relativ zum Transkriptionsstart sind in Material und Methoden in der Tabelle konstruierte Plasmide auf Seite 24 angegeben.

D.2.2 Wachstum der Mutanten in Schüttelkulturen (Minimal- und Vollmedium)

Zur ersten Charakterisierung der generierten Deletions- und Plasmidintegrationsmutanten, wurden Wachstumskurven in Minimal-Medium (M9 0,5 % (w/v) Glukose) und Malzextrakt enthaltendes Vollmedium ($11\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Glukose und $3\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Malz) aufgenommen. Alle Daten sind in zwei biologischen Replikaten durchgeführt worden.

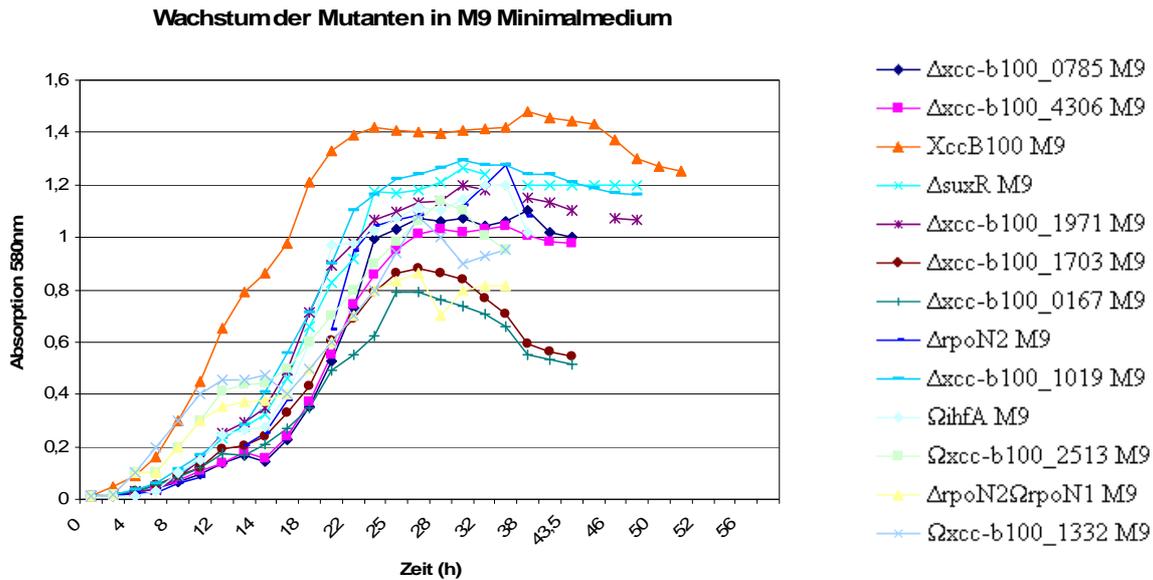


Abb.D.24: Wachstumskurven der generierten Deletions- und Plasmidintegrationsmutanten in M9-Minimal-Medium im Vergleich zum Wachstum des Wildtyps Xcc B100. Auf der y-Achse ist die Absorption_{580nm} gegen die Zeit (h) aufgetragen. Die Inkubation erfolgte in Erlenmeyerkolben in M9- Minimalmedium mit 0,5 % (w/v) Glukose in zwei biologischen Replikaten.

Die Kultivierung wurde in 500 ml Erlenmeyerkolben mit 150 ml Medium bei 30 °C und 180 rpm durchgeführt. Sämtliche Mutanten zeigen in M9-Minimalmedium, in dem Glukose als einzige Kohlenstoff-Quelle vorliegt, im Vergleich zum Wildtyp ein langsames Wachstum. Das Wachstum ist verlangsamt und erreicht nicht die finalen optische Dichte (Abs._{580nm}) des Wildtyps. Diese Wachstumstests sind vor allem für die späteren Microarray-Experimente notwendig, da alle Mutanten und der Wildtyp in derselben Phase isoliert werden müssen, um ein komparatives Bild der Genexpression zu erhalten.

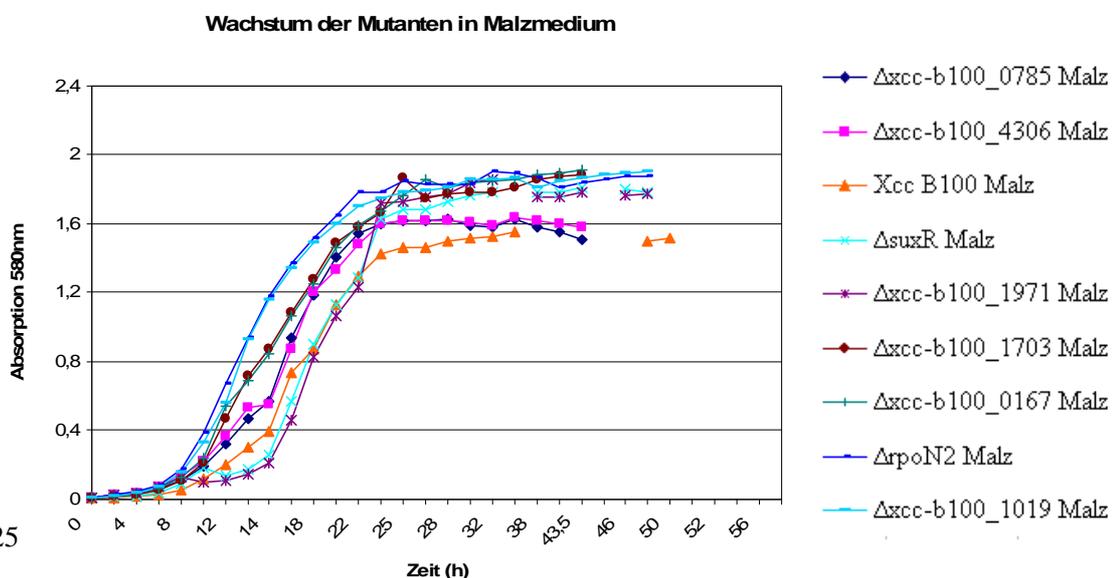


Abb.D.25

Abb.D.25: Wachstumskurven der generierten Deletions- und Plasmidintegrationsmutanten in Malz-Medium im Vergleich zum Wachstum des Wildtyps Xcc B100. Auf der y-Achse ist die Absorption_{580nm} gegen die Zeit (h) auf der x-Achse aufgetragen. Die Inkubation erfolgte in Erlenmeyerkolben in Vollmedium mit Malzextrakt und Glukose als Kohlenstoffquellen und in zwei biologischen Replikaten.

In Vollmedium, das neben Glukose als zusätzliche Kohlenstoffquelle Malzextrakt enthält, ist das Wachstum der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp besser. Die Mutanten erreichen schneller eine höhere optische Dichte (Abs._{580nm}).

D.2.3 Überprüfung der Plasmidintegrations-Stabilität

Um die Stabilität der konstruierten Plasmidintegrationen auf mögliche Desintegration hin zu überprüfen, wurden die jeweiligen Kulturen nach einer 48h Kultivierung im Erlenmeyerkolben auf Selektivmedium mit Streptomycin (Wildtyp vermittelte Resistenz) und auf Platten mit einer Kombination aus Streptomycin und Kanamycin (Plasmid vermittelte Resistenz) ausplattiert und die „Colony Forming Units“ (CFU) bestimmt. Die Relation an CFU auf beiden Selektivmedien gibt Aufschluß über Desintegration des Plasmids während der Kultivierung.

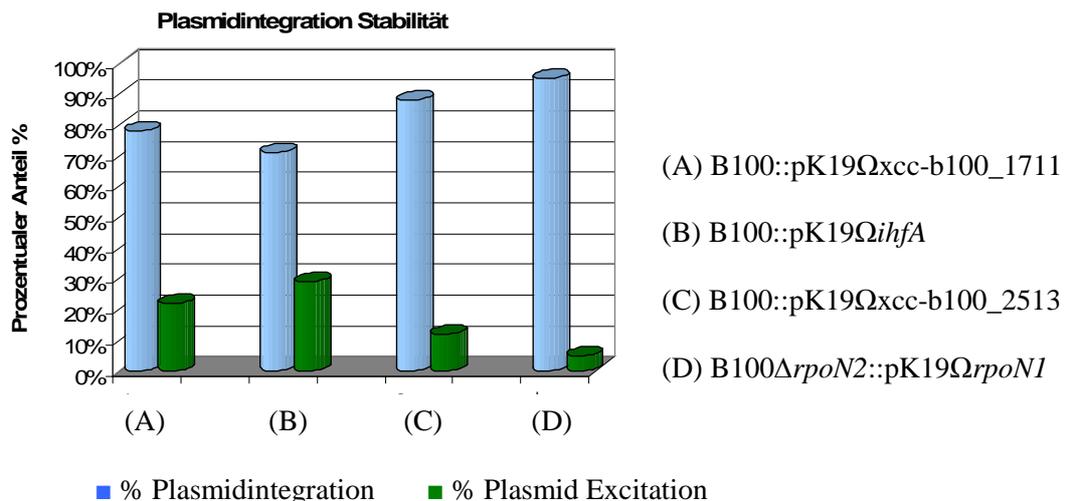
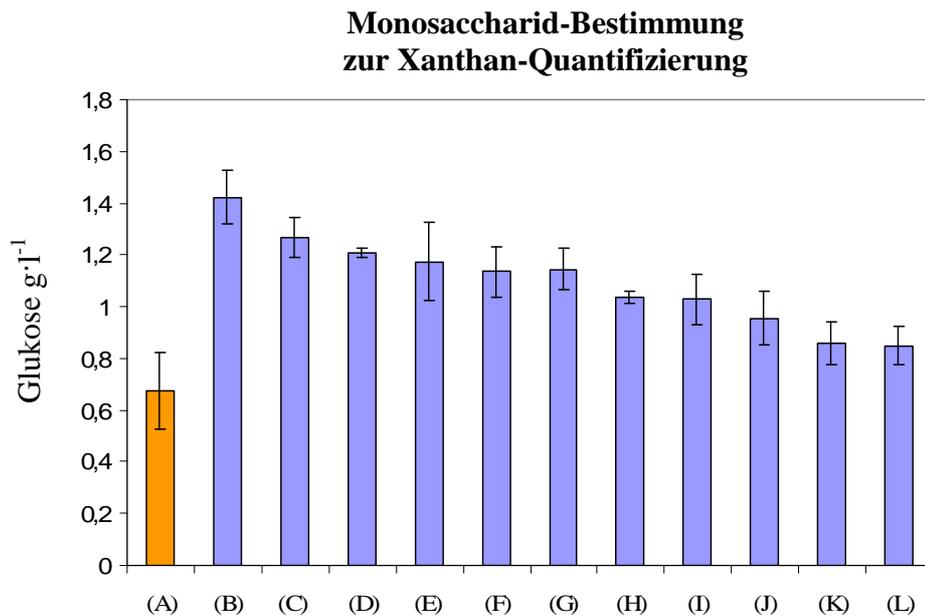


Abb.D.26: Überprüfung der Plasmidintegrations-Stabilität durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsreihen auf verschiedenen Selektivmedien. Agar-Nährplatten mit Streptomycin und einer Streptomycin und Kanamycin Kombination wurden genutzt um die Desintegration des Plasmids über die Bestimmung der CFU auf verschiedenen Selektivmedien zu bestimmen.

Zur Bestimmung der Stabilität der Plasmidintegrationskonstrukte wurde durch Ausplattieren der Zellkulturen auf verschiedenen Selektionsmedien mit Streptomycin und einer Streptomycin und Kanamycin Kombination das in Abbildung D.26 dargestellte Ergebnis erzielt. Den höchsten Verlust der Plasmidkonstrukte während einer Kultivierung wurde bei der Mutante *XccB100::pK19*QihfA** festgestellt. Nahezu 30% der Mutanten verlieren während einer Kultivierung in M9-Medium über 48h das eingebrachte Plasmid und somit die Mutation im Regulator-Gen. Am stabilsten ist das Plasmidkonstrukt in *XccB100Δ*rpoN2*::pK19*QrpoN1** mit einem Verlust von 6 %.

D.2.4 Xanthan-Quantifizierung über Monosaccharid-Bestimmung im Überstand

Mittels Säurehydrolyse des zellfreien dialysierten Überstands wurde das Exopolysaccharid Xanthan in seine Einzelbestandteile die Monosaccharide gespalten und der Monosaccharidgehalt nach einer Farbreaktion mit L-Cystein photometrisch bestimmt. Anhand einer erstellten Kalibrierkurve mit Proben bekannter Glukosekonzentrationen kann der Monosaccharidgehalt im Überstand bestimmt werden. Da durch Dialyse alle Monosaccharide und andere niedermolekulare Substanzen abgetrennt wurden, ist die Messung der Monosaccharide in diesem Assay proportional zu der Menge an synthetisiertem Xanthan. Folgende Abbildung D.27 zeigt die Ergebnisse der Monosaccharid-Bestimmung für den Wildtyp und die generierten Mutanten in M9-Minimalmedium mit 0,5 % (w/v) Glukose nach Kultivierung in Erlenmeyerkolben von 48h. Alle Kultivierungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Werte sind auf eine optische Dichte (Abs_{580nm}) von 1,0 bereinigt, so daß keine Wachstumseinflüsse die Daten verfälschen.



(A) XccB100Δxcc-100_4306, (B) XccB100Δxcc-100_1711, (C) XccB100Δxcc-100_0167, (D) XccB100::pK19Ωxcc-100_2513, (E) XccB100ΔrpoN2::pK19ΩrpoN1, (F) XccB100::pK19ΩihfA, (G) XccB100Δxcc-100_1019, (H) XccB100ΔsuxR, (I) XccB100Δxcc-100_1703, (J) XccB100Δxcc-b100_1971, (K) XccB100Δxcc-100_0785

Abb.D.27: Monosaccharid-Bestimmung im zellfreien dialysierten Überstand der generierten Deletions- und Plasmidintegrationsmutanten im Vergleich zum Wildtyp. Das Wachstum erfolgte für 48h in M9-Minimalmedium, der zellfreie Überstand wurde dialysiert und anschließend nach Säurehydrolyse der Monosaccharidgehalt bestimmt. Alle Werte sind auf eine o.D._{580nm} von 1,0 genormt.

Die in Abbildung D.27 dargestellte Monosaccharid-Bestimmung im zellfreien dialysierten Überstand der Mutanten und des Wildtyps, zeigt für alle Mutanten einen höheren Wert an Monosacchariden im Überstand verglichen mit dem Wildtyp. Die Mutante mit dem größten Wert ist XccB100Δxcc-b100_4306, bei der mehr als eine doppelte Menge an Monosacchariden im Überstand gemessen wurde, als für den genetisch unveränderten Wildtyp. Die Mutante mit der geringsten Veränderung in der Monosaccharid-Bestimmung liegt bei immerhin noch einem Plus von 26%.

D.2.5 Xcc B100 Profil der Kohlenstoffverwertung

Der Wildtyp Xcc B100 wurde in diesem Kohlenstoffverwertungs-Assay auf Verwertung von verschiedener Kohlenstoffquellen überprüft. Dabei wurden Mono- und Disaccharide, Aminosäuren, Nukleoside, Carbonsäuren, Tenside und Amine getestet. Alle Kohlenstoffe die oxidiert werden können und als Energieträger genutzt werden können, werden über die Reduktion des Farbstoffs zu Formazan visualisiert. Insgesamt wurden 95 verschiedene Kohlenstoffquellen in zwei Replikaten getestet (vgl. Abb. D.28). Die Verwertung einfacher Zucker erfordert zunächst den Import in die Zelle und dann die Umwandlung in Intermediate des Zentralstoffwechsels, um diese in diesen einzuschleusen und zu metabolisieren. Die erforderlichen Enzyme für Umwandlungen von Oligosacchariden sind unter anderem Hydrolasen, Glukosidasen, Phosphorylasen und Transglycosylasen.

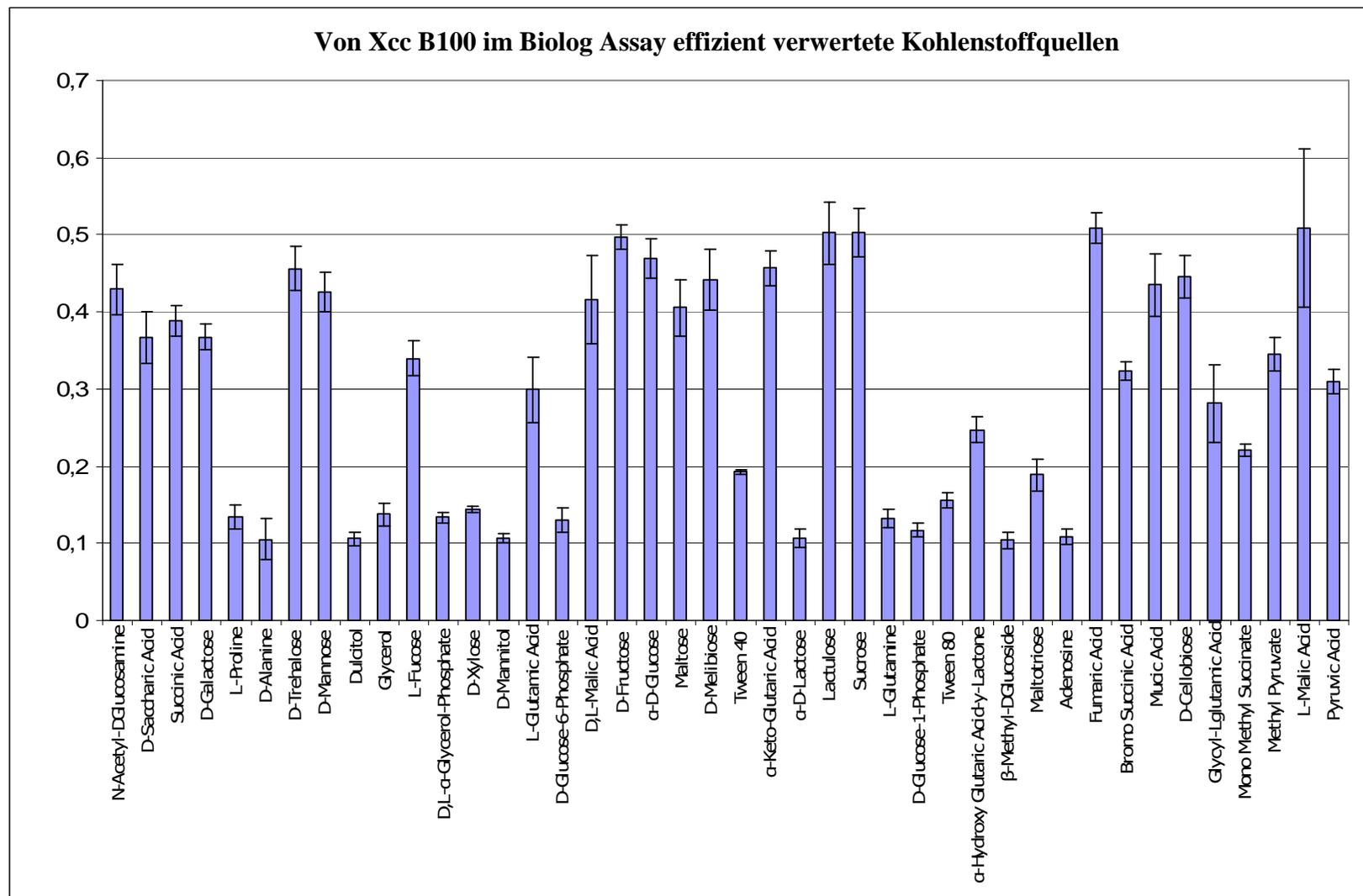


Abb.D.28: **Verwertungsprofil der von Xcc B100 effizient verwertbaren Kohlenstoffquellen auf dem Biolog Phenotype Array PM1 mit 95 verschiedenen Kohlenstoffquellen.** Dabei wurden ausgehend von der Start-o.D. von 0,01 alle Kohlenstoffquellen berücksichtigt, bei denen eine Abs._{590nm} von mindestens 0,1 erreicht wurde. Eine komplette Liste der untersuchten Kohlenstoffquellen befindet sich im Anhang dieser Arbeit. Die Rohdaten der Kohlenstoffverwertung des Wildtyps und aller Mutanten befindet sich im Anhang auf CD.

Tab.D.10 : **Kohlenstoffquellen die von Xcc B100 effizient verwertet werden können.** Dabei wurden ausgehend von der Start-o.D. von 0,01 alle Kohlenstoffquellen berücksichtigt, bei denen eine Abs._{590nm} von mindestens 0,1 erreicht wurde.

| Mono- und Disaccharide | Aminosäuren | Nukleoside | Carbonsäuren | Sonstige |
|----------------------------|------------------------|------------|------------------------------|--|
| N-Acetyl-DGlucosamine | L-Proline | Adenosine | D-Saccharic Acid | Glycerol |
| D-Galactose | D-Alanine | | Succinic Acid | D,L- α -Glycerol-Phosphate |
| D-Trehalose | L-Glutamic Acid | | D,L-Malic Acid | Tween 40 |
| D-Mannose | L-Glutamine | | α -Keto-Glutaric Acid | Tween 80 |
| Dulcitol | Glycyl-L-glutamic Acid | | Bromo Succinic Acid | α -Hydroxy Glutaric Acid- γ -Lactone |
| L-Fucose | | | Fumaric Acid | |
| D-Xylose | | | Mucic Acid | |
| D-Mannitol | | | Mono Methyl Succinate | |
| D-Glucose-6-Phosphate | | | Methyl Pyruvate | |
| D-Fructose | | | L-Malic Acid | |
| α -D-Glucose | | | Pyruvic Acid | |
| Maltose | | | | |
| D-Melibiose | | | | |
| α -D-Lactose | | | | |
| Sucrose | | | | |
| D-Glucose-1-Phosphate | | | | |
| β -Methyl-DGlucoside | | | | |
| Maltotriose | | | | |
| Lactulose | | | | |
| D-Cellobiose | | | | |

Tab.D.11: **Kohlenstoffquellen die von Xcc B100 nicht effizient verwertet werden können.** Ausgehend von einer Start-o.D von 0,01 sind in diese Gruppe alle Kohlenstoffquellen zugeteilt, bei denen eine Abs._{590nm} von 0,1 nicht erreicht wurde.

| Mono-Disaccharide | Aminosäuren | Nukleoside | Carbonsäuren | Sonstige |
|----------------------------------|------------------------|-------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| L-Arabinose | L-Aspartic Acid | Thymidine | L-Lactic Acid | D-Galactonic Acid- γ -Lactone |
| D-Ribose | D-Aspartic Acid | Uridine | Formic Acid | Tween 20 |
| L-Rhamnose | L-Serine | 2-Deoxy Adenosine | Acetic Acid | Tyramine |
| D-Fructose-6-Phosphate | L-Threonine | Inosine | D-Gluconic Acid | L-Galactonic Acid- γ -Lactone |
| D- Psicose | D-Threonine | | α -Keto-Butyric Acid | 2-Aminoethanol |
| L-Lyxose | D-Glucosaminic Acid | | M-Tartaric Acid | Phenylethylamine |
| D-Sorbitol | L-Alanyl-Glycine | | α -Hydroxy Butyric Acid | 1,2-Propanediol |
| α -Methyl-D-Galactoside | Glycyl-L-Proline | | Citric Acid | |
| Adonitol | Glycyl-L-Aspartic Acid | | Propionic Acid | |
| M-Inositol | L-Asparagine | | Glycolic Acid | |
| N-Acetyl- β -D-Mannosamine | L-Alanine | | Glyoxylic Acid | |
| Glucuronamide | D-Serine | | Tricarballic Acid | |

D-Glucuronic
Acid
D-Galacturonic
Acid

Acetoacetic Acid

D-Malic Acid

p-Hydroxy Phenyl
Acetic Acid
m-Hydroxy Phenyl
Acetic Acid

Zur Einteilung ob das Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 eine bestimmte Kohlenstoffquelle effizient verwertet wurde das Kriterium gewählt, daß mindestens eine Abs._{590nm} von $\geq 0,1$ im Assay erreicht wurde. Angeimpft wurde mit einer Start-o.D._{580nm} von $\approx 0,01$.

Betrachtet man die Mono-, Di-, Trisaccharide und Zuckeralkohole, zeigt sich daß Xcc B100 50% dieser Kohlenhydrate verwertet. Besonders Disaccharide (80%) können als Energiequelle genutzt werden. Als einziges Trisaccharid auf dem Array kann Maltotriose von Xcc B100 oxidiert werden. Bei den Zuckeralkoholen verwertet Xcc B100 besser Dulcitol und D-Mannitol, während die Verwertung von D-Sorbitol, Adonitol und dem zyklischen Alkohol M-Inositol schlechter ist. Betrachtet man einige Kohlenhydrate der Zentral-Stoffwechselwege, wie zum Beispiel D-Fruktose-6-phosphat, welches in der Glykolyse von einer Ketol-Isomerase aus D-Glukose-6-phosphat generiert wird, so ist der Wildtyp Xcc B100 nicht in der Lage, dieses Stoffwechselintermediat effizient zu nutzen. D-Glukose-1-phosphat und D-Glukose-6-phosphat, ebenfalls ein Intermediat der Glykolyse, zeigen in diesem Assay ein positives Ergebnis im Hinblick auf die Verwertung durch den Wildtyp.

Ebenso können einige Carbonsäuren als Energiequelle genutzt werden. Dabei werden höhere Carbonsäuren anscheinend bevorzugt. Die einfachsten Carbonsäuren, die eine Verwertung mit einer Abs._{590nm} $> 0,1$ erlauben besitzen einen C₃-Körper (Pyruvic acid und Methyl-Pyruvate). Alle weiteren für Xcc B100 verwertbaren Carbonsäuren sind C₄-, C₅- oder C₆-Körper. Carbonsäuren, die nicht so effizient genutzt werden, können C₁-, C₂-, C₃-, C₄- und C₆-Carbonsäuren sein. So werden von den neun C₆-Carbonsäuren zwei oxidiert, während sieben der C₆-Carbonsäuren nicht effizient verwertet werden. An C₄-Körpern können von Xcc B100 jedoch 63% der auf dem Array verwendeten Carbonsäuren genutzt werden. Von den C₄-Carbonsäuren kann L-Malic acid im Gegensatz zu D-Malic acid und einem Gemisch von D-L-Malic acid nicht effizient oxidiert werden.

An Aminosäuren sind 17 auf dem Array untersucht wurden. Dabei 12 L-Formen und 5 D-Formen. An D-Formen konnte nur D-Alanine und an L-Formen vier Aminosäuren genutzt

werden, dabei drei Derivate der nicht essentiellen proteinogenen Aminosäure Glutamin und die Aminosäure L-Proline.

Von den fünf Nucleosiden Uridine, Thymidine, Adenosine, Inosine und 2-Deoxy-Adenosine kann nur Adenosine für ein effizientes Wachstum genutzt werden.

Die Polysorbate Tween- 40 und -80 können von Xcc B100 besser genutzt werden, als Tween-20. Die Polysorbate -40 und -80 besitzen im Vergleich zu – 20 einen längeren C-Körper.

D.2.6 Charakterisierung der Mutante XccB100 Δ xcc-b100_4306

Die Mutante XccB100 Δ xcc-b100_4306 trägt eine durch „gene-SOEing“ eingebrachte markerfreie Deletion in einem Gen, welches für einen Regulator der LacI-Familie kodiert. Die Microarray-Analyse wurde in M9- Minimalmedium mit 0,5% (w/v) Glukose in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase durchgeführt.

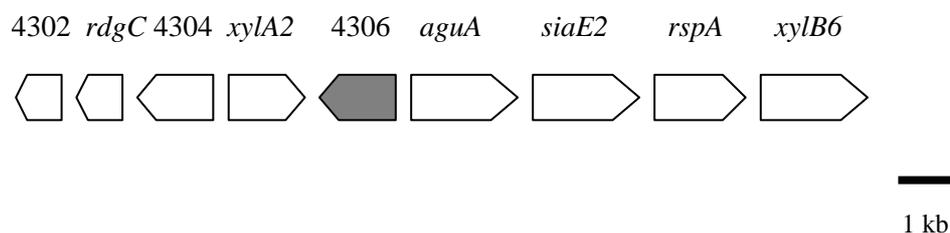


Abb. 3.29: **Genorganisation upstream und downstream des deletierten Gens (4306) im Xcc B100 Genom.** Das deletierte Gen mit der GenDB- Identifikationsnummer xcc-b100_4306 ist mit einem grauen Pfeil gekennzeichnet, während die umgebenden Gene durch einen weißen Pfeil dargestellt sind.

D.2.6.1 Transkriptomische Charakterisierung der Mutante in M9-Minimalmedium

Zur Transkriptomanalyse wurden die Mutanten simultan mit dem Wildtyp in M9-Minimalmedium angezogen. Jeweils drei biologische Replikate wurden in 500ml Erlenmeyerkolben bei 30°C und 180 rpm in einem orbitalen Schüttelbrutschrank inkubiert. Die Zellen wurden in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase abhängig von ihrem Wachstum (siehe Abb.D.24) durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 3 min. isoliert, sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

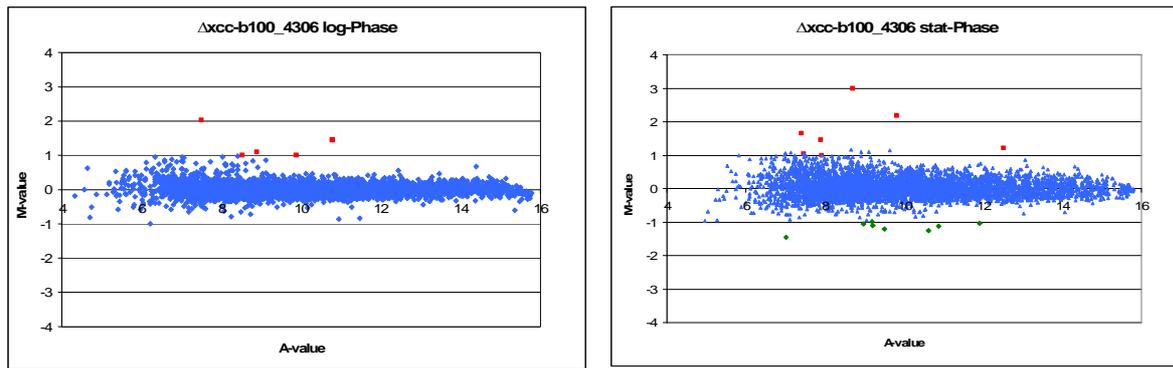


Abb.D.30: M/A-Scatterplot mit dem Verhältnis des M-Werts zu dem A-Wert aus den Hybridisierungen der Proben der Mutante XccB100 Δ xcc-b100_4306 in der exponentiellen (links) und stationären (rechts) Wachstumsphase in M9- Minimalmedium im Vergleich zum Wildtyp. Aufgetragen ist der M-Wert (log₂ der Signaldifferenz) gegen den A-Wert (log₂ der Signalintensität), wobei statistisch signifikant differentiell exprimierte Gene, die alle drei Kriterien erfüllen grün (reprimiert) oder rot (induziert) gefärbt sind. Blaue Punkte stellen die nicht differentiell exprimierten Gene der Mutante dar.

In der exponentiellen Phase sind im Vergleich zum Wildtyp fünf Gene als statistisch signifikant differentiell exprimiert detektiert worden. Sämtliche fünf Gene sind induziert. Es handelt sich dabei zum einen um zwei am Aufbau des Typ-III-Sekretionssystems beteiligte Gene *yvpA* und *hrpE* und zum anderen um eine sekretierte Polygalacturonase kodiert von *pglA*, die als Exoenzym in der Pflanzen-Bakterien Interaktion die pflanzliche Zellwand im Infektionsprozess enzymatisch verdaut. Die Gene sind in folgender Tabelle dargestellt.

Tab.D.12: Liste der statistisch signifikant differentiell exprimierten Gene in der exponentiellen Wachstumsphase der Mutante XccB100 Δ xcc-b100_4306 im Vergleich zum Wildtyp in M9-Minimalmedium. Aufgelistet sind die GenDB-Identifikations- Nummer, der Genname wenn vorhanden, das Genprodukt in englischer Sprache und der M- Wert.

| GenDB-ID | Genname | Genprodukt | M-Wert |
|---------------|--------------|--------------------------------|--------|
| xcc-b100_0738 | <i>pglA1</i> | exported polygalacturonase | 2,01 |
| xcc-b100_0460 | - | hypothetical protein | 1,44 |
| xcc-b100_3086 | <i>hrpW</i> | HrpW protein | 1,08 |
| xcc-b100_3243 | - | conserved hypothetical protein | 1,00 |
| xcc-b100_3084 | <i>hrpE</i> | HrpE protein | 0,99 |

In der stationären Phase wird das in der exponentiellen Phase induzierte Gen *pglA* reprimiert. Ebenfalls als reprimiert detektiert ist *egl*, welches für eine Zellulase kodiert und wie *pglA* auch für ein die pflanzliche Zellwand zersetzendes Exoenzym *Xanthomas* kodiert. Als

induziert detektiert ist das Gen *cheB*, das eine Protein-Glutamat-Methylesterase kodiert, die bei der Fortbewegung mittels Flagellen über das Chemotaxis-System des Bakteriums eine Rolle spielt.

Tab.D.13: Liste der statistisch signifikant differentiell exprimierten Gene in der stationären Wachstumsphase der Mutante XccB100 Δ xcc-b100_4306 im Vergleich zum Wildtyp in M9-Minimalmedium. Aufgelistet sind die GenDB-Identifikations- Nummer, der Gennamen wenn vorhanden, das Genprodukt in englischer Sprache und der M- Wert.

| GenDB-ID | Gennamen | Genprodukt | M-Wert |
|---------------|---------------|---|--------|
| xcc-b100_2299 | - | conserved hypothetical protein | 2,97 |
| xcc-b100_2321 | <i>cheB4</i> | protein-glutamate methylesterase | 2,17 |
| xcc-b100_0059 | - | putative ATP-dependent helicase | 1,64 |
| xcc-b100_0782 | <i>xcsN</i> | Exported type II protein secretion system protein N | 1,45 |
| xcc-b100_3762 | - | Conserved hypothetical protein | 1,20 |
| xcc-b100_1827 | - | hypothetical protein | 1,04 |
| xcc-b100_2654 | - | conserved hypothetical protein | -1,02 |
| xcc-b100_3538 | <i>gfo</i> | Glucose--fructose oxidoreductase | -1,05 |
| xcc-b100_3455 | <i>rpsS</i> | 30S ribosomal protein S19 | -1,09 |
| xcc-b100_1089 | <i>pilA</i> | Type IV pilus assembly protein PilA | -1,12 |
| xcc-b100_0874 | <i>ilvC</i> | ketol-acid reductoisomerase | -1,21 |
| xcc-b100_0675 | <i>engXCA</i> | exported cellulase | -1,24 |
| xcc-b100_0738 | <i>pglA1</i> | exported polygalacturonase | -1,45 |

D.2.6.2 Kohlenstoffverwertung der Mutante

Alle konstruierten Stämme wurden auf die Verwertung von 95 verschiedenen Kohlenstoffquellen im Biolog-Phenotype-Array Assay getestet. Alle vom Wildtyp abweichenden Phänotypen sind im Folgenden dargestellt. Dabei wurde der Endwert der Absorption bei 590nm der Mutante durch den Wert des Wildtyps dividiert und halblogarithmisch aufgetragen. Es wurde ein Signifikanzgrenze der Relationswerte von ≥ 2 und $\leq 0,5$ gewählt (Townsend et al., 2008). Durchgeführt wurden die Assays in zwei biologischen Replikaten.

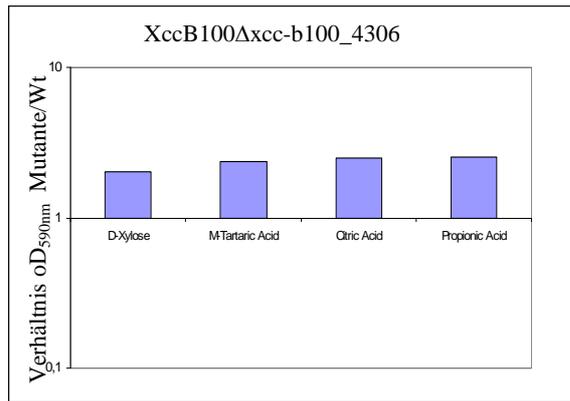


Abb.D.31: **Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100Δxcc-b100_4306 im Vergleich zum Wildtyp B100.** Dargestellt ist das Verhältnis der erreichten optischen Dichte Abs._{590nm} Mutante gegen den Wildtyp in halblogarithmischer Auftragsweise auf Kohlenstoffquellen die die Kriterien >2 oder <0,5 erfüllen.

Die markerfreie Deletionsmutante XccB100Δxcc-b100_4306 zeigt in diesem Kohlenstoff-Assay im Vergleich zum Wildtyp eine bessere Verwertung von D-Xylose, M-Tartaric acid, Citric acid und Propionic acid.

Upstream des deletierten Regulators befindet sich das Gen *xyIA2* und downstream das Gen *xyIB6*. *xyIA2* kodiert für eine Xylose-Isomerase, die die Isomerisierung von D-Xylose zu D-Xylulose katalysiert. Das Gen *xyIB6* kodiert für eine exportierte Xylan-1,4-β-Xylosidase die die Hydrolyse von β-1,4-Xylanen katalysiert.

D.2.6.3 Transkriptomische Analyse der Mutante in Xylose-haltigem M9-Minimalmedium

Aufgrund der besseren Verwertung von Xylose im Biolog Phenotype Assay wurde die Verwertung bei einer Kultivierung in Schüttelkulturen getestet. In M9-Minimalmedium mit 1% (w/v) Xylose als Kohlenstoffquelle wurden die Mutante und der Wildtyp untersucht. Die Ergebnisse sind in folgenden Abbildungen dargestellt. Nach erfolgter Überprüfung der Verwertung von Xylose in einer Schüttelkultur, wurden die Zellen der Mutante XccB100Δxcc-b100_4306 in exponentieller Wachstumsphase in Xylose-haltigem M9-Minimalmedium bei einer o.D._{580nm} von 0,3 isoliert und in einem Microarray-Experiment mit dem Wildtyp verglichen.

Xylose Wachstumstests in Schüttelkulturen

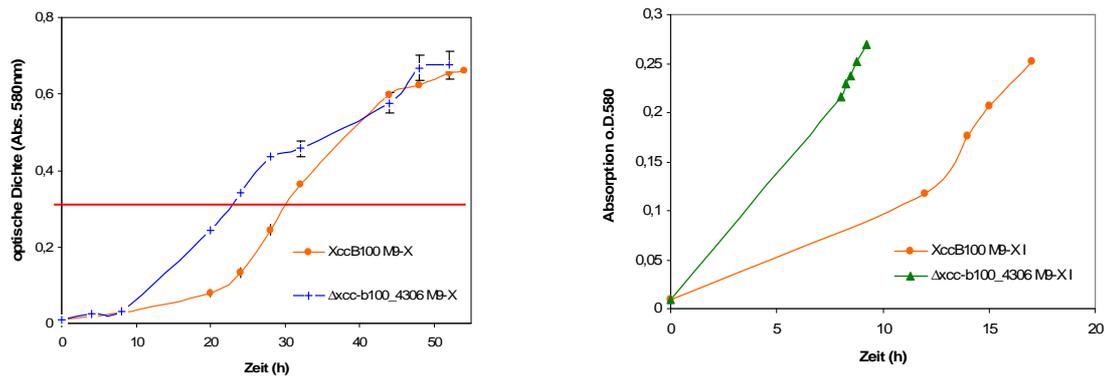


Abb.D.32.: Wachstum der Mutante $XccB100\Delta xcc-b100_4306$ und des Wildtyps in M9-Minimalmedium mit 1% (w/v) Xylose als Kohlenstoffquelle. Links dargestellt das Wachstum über 50h in Minimalmedium mit Xylose als Kohlenstoffquelle. Markiert ist die mittel-logarithmische Wachstumsphase mit einem roten Balken. Rechts das Wachstum bis zu einer o.D._{580nm} von 0,3, das für die Isolierung der Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zur Microarray-Analyse aufgenommen wurde.

Nach erfolgter Überprüfung der Verwertung von Xylose in einer Schüttelkultur, wurden die Zellen der Mutante $XccB100\Delta xcc-b100_4306$ in exponentieller Wachstumsphase in Xylosehaltigem M9-Minimalmedium bei einer o.D._{580nm} von 0,3 isoliert und in einem Microarray-Experiment mit dem Wildtyp verglichen.

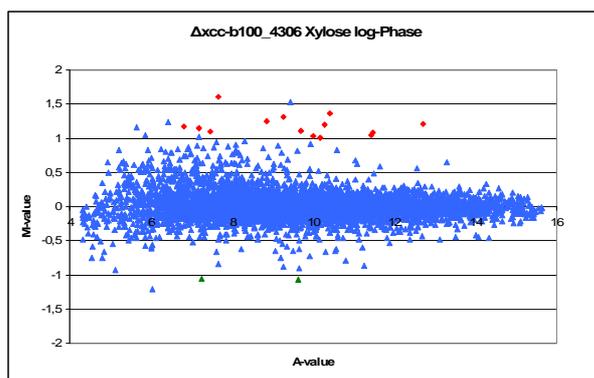


Abb.D.33: M/A-Scatterplot mit dem Verhältnis des M-Werts zu dem A-Wert aus den Hybridisierungen der Proben der Mutante $XccB100\Delta xcc-b100_4306$ in der exponentiellen Wachstumsphase in M9-Minimalmedium mit Xylose als Kohlenstoffquelle im Vergleich zum Wildtyp. Aufgetragen ist der M-Wert (\log_2 der Signaldifferenz) gegen den A-Wert (\log_2 der Signalintensität), wobei statistisch signifikant differentiell exprimierte Gene, die alle drei Kriterien erfüllen grün (reprimiert) oder rot (induziert) gefärbt sind. Blaue Punkte stellen die nicht differentiell exprimierten Gene der Mutante dar.

Tab.D.14: Liste der statistisch signifikant differentiell exprimierten Gene in der exponentiellen Wachstumsphase der Mutante XccB100Δxcc-b100_4306 im Vergleich zum Wildtyp in M9-Xylose-Minimalmedium. Aufgelistet sind die GenDB-Identifikations- Nummer, der Genname wenn vorhanden, das Genprodukt in englischer Sprache und der M- Wert.

| GenDB-ID | Genname | Genprodukt | M-Wert |
|---------------|---------------|--|--------|
| xcc-b100_4038 | - | glycosyltransferase | 1,60 |
| xcc-b100_1339 | - | Endoproteinase Arg-C (C-terminal fragment) | 1,36 |
| xcc-b100_1040 | - | hypothetical protein predicted by Gismo | 1,30 |
| xcc-b100_2321 | <i>cheB4</i> | protein-glutamate methylesterase | 1,24 |
| xcc-b100_0818 | <i>celS1</i> | exported cellulase / xyloglucan hydrolase | 1,21 |
| xcc-b100_0675 | <i>engXCA</i> | Exported Cellulase | 1,20 |
| xcc-b100_3966 | - | putative exported protein | 1,17 |
| xcc-b100_2349 | - | hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica | 1,14 |
| xcc-b100_3811 | - | conserved hypothetical protein | 1,1 |
| xcc-b100_1214 | <i>pqqC</i> | Coenzyme PQQ synthesis protein C | 1,09 |
| xcc-b100_3810 | - | Putative secreted protein | 1,08 |
| xcc-b100_2654 | - | conserved hypothetical protein | 1,04 |
| xcc-b100_2325 | - | Putative filamentous hemagglutinin-related protein | 1,02 |
| xcc-b100_3498 | - | Extracellular protease | 1,0 |
| xcc-b100_2097 | <i>hisC1</i> | Histidinol-phosphate aminotransferase, probable | -1,06 |
| xcc-b100_1807 | - | NAD-specific glutamate dehydrogenase | -1,06 |

In der exponentiellen Wachstumsphase in Xylose-haltigem M9-Minimalmedium wurden insgesamt sechzehn Gene als statistisch signifikant differentiell exprimiert detektiert. Darunter 14 als induziert und zwei als reprimiert.

Induziert sind Gene die für Cellulasen kodieren (*engXCA* und *celS*) und das Gen *cheB4*, welches für eine Protein-Glutamate-Methylesterase des Zweikomponenten Systems der Chemotaxis kodiert.

Die beiden mit einem M-Wert von -1,06 als reprimiert detektierten Gene kodieren für eine mögliche Histidinol-Phosphat-Aminotransferase (*hisC1*) und eine NAD-spezifische Glutamat-Dehydrogenase (xcc-b100_1807).

D.2.6.4 Untersuchung der Mutante XccB100 Δ xcc-b100_4306 zur Fähigkeit der Biofilmproduktion

Der Test zur Adhärenz an abiotischen Oberflächen, wie zum Beispiel an einem Kunststoff von Mikrotiterplatten und somit die Produktion adhärenter Biofilme kann semiquantitativ nach einer Farbreaktion mit Kristallviolett photometrisch bei einer o.D._{595nm} bestimmt werden. Die Mutante XccB100 Δ xcc-b100_4306 mit dem höchsten Monosaccharidgehalt im dialysierten Überstand wurde auf ihre Fähigkeit zur Biofilmproduktion hin untersucht und mit dem Wildtyp verglichen.

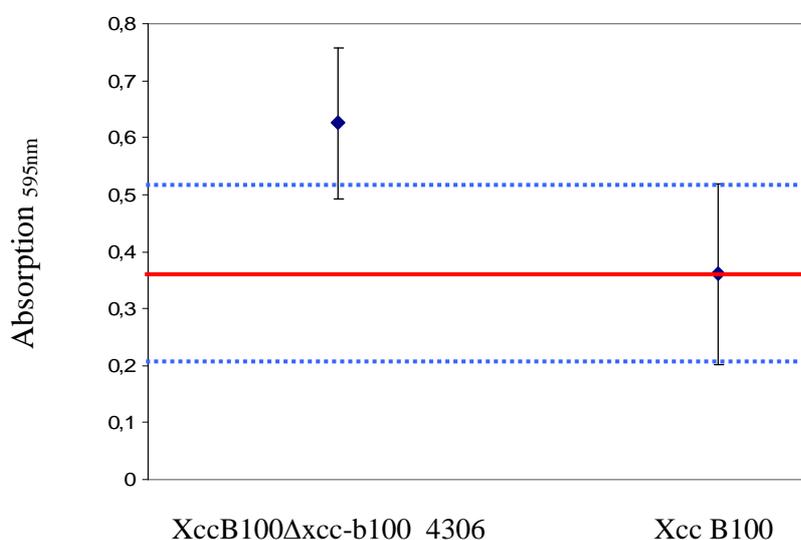


Abb.D.34: **Biofilmproduktion der Mutante XccB100 Δ xcc-b100_4306 im Vergleich zum Wildtyp.** Angegeben sind der Mittelwert, die Standard-Abweichung sowohl der Mutante, als auch des Wildtyps. Mittelwert Wildtyp (rot); Standardabweichung Wildtyp (blau).

Tab.D.15: **Biofilmproduktion der Mutante XccB100 Δ xcc-b100_4306 im Vergleich zum Wildtyp.** Angegeben sind der Mittelwert, die Standard-Abweichung sowohl der Mutante, als auch des Wildtyps und die Anzahl an durchgeführten Replikaten. +++ extrem signifikanter Unterschied.

| | Absorption _{595nm} | Std.-Abweichung | Replikate | t-Test |
|----------------------------|-----------------------------|-----------------|-----------|--------|
| XccB100 Wildtyp | 0,6 | 0,13 | 77 | |
| Xcc Δ xcc-b100_4306 | 0,42 | 0,08 | 64 | +++ |

Das Ergebnis des Nachweises der Biofilmproduktion für die Mutante Xcc Δ xcc-b100_4306 ist in Abbildung D.34 und Tabelle D.15 dargestellt. Die Mutante produziert, korrelierend zur

Monosaccharid-Bestimmung eine größere Menge an Biofilm. Der *t*-Test ergibt einen statistisch extrem signifikanten Unterschied.

D.2.7 Charakterisierung der Mutante XccB100 Δ xcc-b100_0785

Die Mutante XccB100 Δ xcc-b100_0785 trägt eine durch „gene-SOEing“ eingebrachte markerfreie Deletion in einem Gen, welches einen Regulator der LacI-Familie kodiert. Upstream sind die *xcs*-Gene lokalisiert, die für das Typ-II- Sekretionssystem kodieren. Die Microarray-Analyse wurde in M9-Minimalmedium mit 0,5% (w/v) Glukose in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase der Mutante durchgeführt.

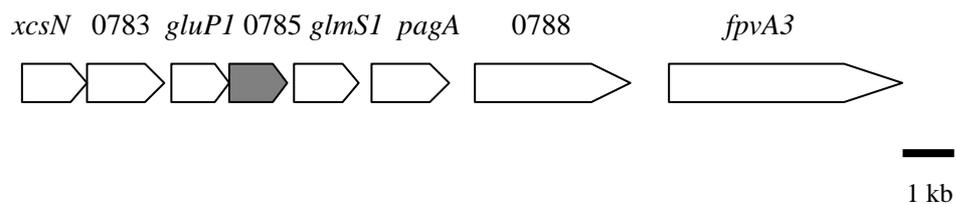


Abb.D.35: Genorganisation upstream und downstream des deletierten Gens (0785) im Xcc B100 Genom. Das deletierte Gen mit der GenDB-Identifikationsnummer xcc-b100_0785 ist mit einem grauen Pfeil gekennzeichnet, während die umgebenden Gene durch einen weißen Pfeil dargestellt sind.

D.2.7.1 Transkriptomische Charakterisierung der Mutante in M9-Minimalmedium

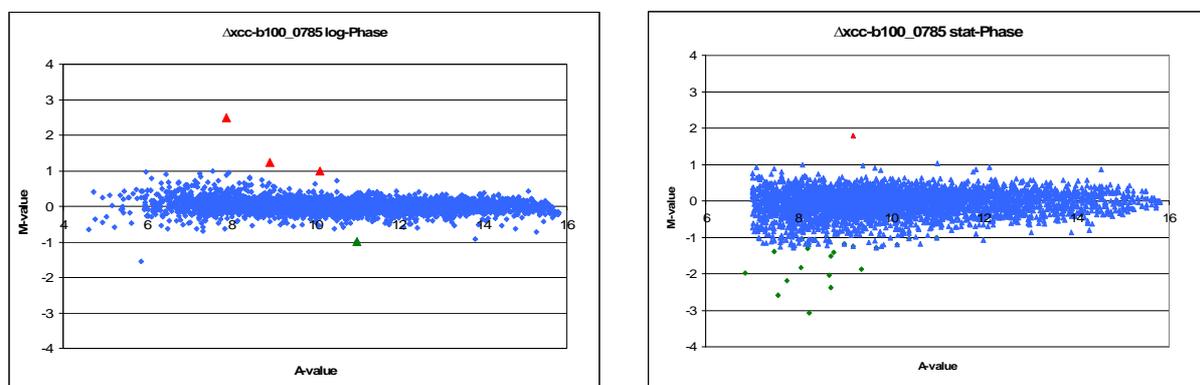


Abb.D.36: M/A-Scatterplot mit dem Verhältnis des M-Werts zu dem A-Wert aus den Hybridisierungen der Proben der Mutante XccB100 Δ xcc-b100_0785 in der exponentiellen

(links) und stationären (rechts) Wachstumsphase in M9-Minimalmedium im Vergleich zum Wildtyp. Aufgetragen ist der M-Wert gegen den A-Wert, wobei statistisch signifikant differentiell exprimierte Gene, die alle drei Kriterien erfüllen grün (reprimiert) oder rot (induziert) gefärbt sind. Blaue Punkte stellen die nicht differentiell exprimierten Gene der Mutante dar.

In der exponentiellen Phase sind im Vergleich zum Wildtyp drei Gene statistisch signifikant induziert und ein Gen statistisch signifikant reprimiert. Dabei handelt es sich bei den Genprodukten der induzierten Gene, um eine von *glk* kodierte Glukokinase, die Glukose zu Glukose-6-phosphat phosphoryliert, um eine Chitinase kodiert von *chiA*, ein Exoenzym und einen TonB-abhängigen Eisenrezeptor der Äußeren Membran kodiert von *fpvA*. Die von der Glukokinase katalysierte Phosphorylierung der Glukose zu Glukose-6-phosphat ist der initiale Schritt in der Glykolyse. Das als reprimiert detektierte Gen kodiert für ein unbekanntes Genprodukt.

Tab.D.16: Liste der statistisch signifikant differentiell exprimierten Gene in der exponentiellen Wachstumsphase der Mutante XccB100Δxccc-b100_0785 im Vergleich zum Wildtyp in M9-Minimalmedium. Aufgelistet sind die GenDB-Identifikations- Nummer, der Genname wenn vorhanden, das Genprodukt in englischer Sprache und der M- Wert.

| GenDB-ID | Genname | Genprodukt | M-Wert |
|---------------|--------------|--|--------|
| xcc-b100_1263 | <i>chiA</i> | exported chitinase | 2,48 |
| xcc-b100_1267 | <i>glk3</i> | glucokinase | 1,24 |
| xcc-b100_0789 | <i>fpvA3</i> | TonB-dependent outer membrane ferrityoverdine receptor | 0,99 |
| xcc-b100_2827 | - | hypothetical protein | -0,99 |

Tab.D.17: Liste der statistisch differentiell exprimierten Gene in der stationären Wachstumsphase der Mutante XccB100Δxccc-b100_0785 im Vergleich zum Wildtyp in M9-Minimalmedium.

| GenDB-ID | Genname | Genprodukt | M-Wert |
|---------------|-------------|--|--------|
| xcc-b100_1208 | - | TonB-dependent receptor | 1,79 |
| xcc-b100_2325 | - | Putative filamentous hemagglutinin-related protein | -1,01 |
| xcc-b100_1339 | - | Endoproteinase Arg-C (C-terminal fragment) | -1,02 |
| xcc-b100_2297 | - | Putative lipoprotein | -1,03 |
| xcc-b100_2048 | <i>sdhA</i> | Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit | -1,07 |
| xcc-b100_3927 | - | glycosyltransferase | -1,09 |

| | | | |
|---------------|-------------|--|-------|
| xcc-b100_1866 | - | hypothetical protein | -1,18 |
| xcc-b100_0122 | - | hypothetical protein | -1,19 |
| xcc-b100_2990 | <i>slyD</i> | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase | -1,2 |
| xcc-b100_3440 | <i>rplO</i> | 50S ribosomal protein L15 | -1,25 |
| xcc-b100_1016 | - | TonB-dependent outer membrane receptor (C-terminal fragment) | -1,27 |
| xcc-b100_0270 | - | putative DNA-binding protein | -1,27 |
| xcc-b100_2341 | - | conserved hypothetical protein | -1,31 |
| xcc-b100_0546 | - | conserved hypothetical protein | -1,39 |
| xcc-b100_3451 | <i>rpmC</i> | 50S ribosomal protein L29 | -1,41 |
| xcc-b100_0559 | - | putative exported protein | -1,51 |
| xcc-b100_1521 | <i>rluF</i> | Pseudouridylate synthase | -1,82 |
| xcc-b100_3465 | <i>rpoC</i> | DNA directed RNA polymerase (beta' subunit) | -1,86 |
| xcc-b100_2444 | - | Putative secreted protein | -1,97 |
| xcc-b100_3455 | <i>rpsS</i> | 30S ribosomal protein S19 | -2,04 |
| xcc-b100_3458 | <i>rplD</i> | 50S ribosomal protein L4 | -2,17 |
| xcc-b100_4338 | - | conserved hypothetical protein | -2,37 |
| xcc-b100_0294 | - | Zinc-containing alcohol dehydrogenase superfamily protein | -2,58 |
| xcc-b100_3457 | <i>rplW</i> | 50S ribosomal protein L23 | -3,08 |

In der stationären Phase konnten bei dieser Mutante vornehmlich reprimierte Gene detektiert werden. Darunter fünf ribosomale Gene und *sdhA*, das für eine Succinate-Dehydrogenase kodiert, die im Citrat-Zyklus und in der Endoxidativen Phosphorylierung involviert ist. Ein Gen welches für einen TonB-abhängigen Rezeptor kodiert ist mit einem M-Wert von 1,79, was einer nahezu 4-fachen Überexprimierung entspricht, induziert.

D.2.7.2 Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100 Δ xcc-b100_0785

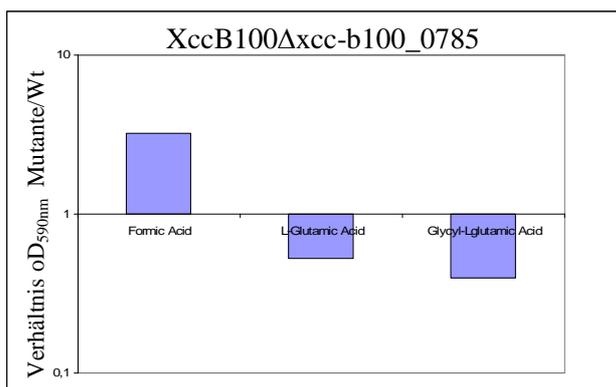


Abb.D.37

Abb.D.37: **Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100 Δ xcc-b100_0785 im Vergleich zum Wildtyp B100.** Dargestellt ist das Verhältnis der erreichten optischen Dichte Abs._{590nm} Mutante gegen Wildtyp in halblogarithmischer Auftragungsweise auf Kohlenstoffquellen die die Kriterien >2 oder <0,5 erreicht haben.

Die Mutante XccB100 Δ xcc-b100_0785 verwertet im Vergleich zum Wildtyp besser Formic acid wenn diese als einzige Kohlenstoffquelle dient, während L-Glutarric acid und Glycyl-L-glutarric acid schlechter verwertet werden. Glutarsäure ist eine Dicarbonsäure, die im Rübensaft vorkommt und ein Abbauprodukt des Lysins ist.

D.2.8 Charakterisierung der Mutante XccB100 Δ rpoN2

Die Mutante XccB100 Δ rpoN2 ist in dem Gen *rpoN2* deletiert, welches einen alternativen Sigma-54-Faktor kodiert. In einer weiteren Kopie als *rpoN1* liegt im Genom ein weiteres Gen, welches einen Sigma-54-Faktor kodiert. Die Doppelmutante wurde ebenfalls in dieser Arbeit angefertigt.

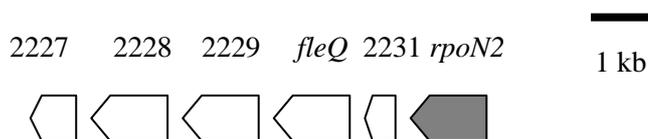


Abb.D.38: **Genorganisation upstream des deletierten Gens *rpoN2* im Xcc B100 Genom.** Das deletierte Gen ist mit einem grauen Pfeil gekennzeichnet, während die umgebenden Gene durch einen weißen Pfeil dargestellt sind.

D.2.8.1 Transkriptomische Charakterisierung der Mutante

Die Microarray-Analyse wurde in M9-Minimalmedium mit 0,5% (w/v) Glukose in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase der Mutante durchgeführt.

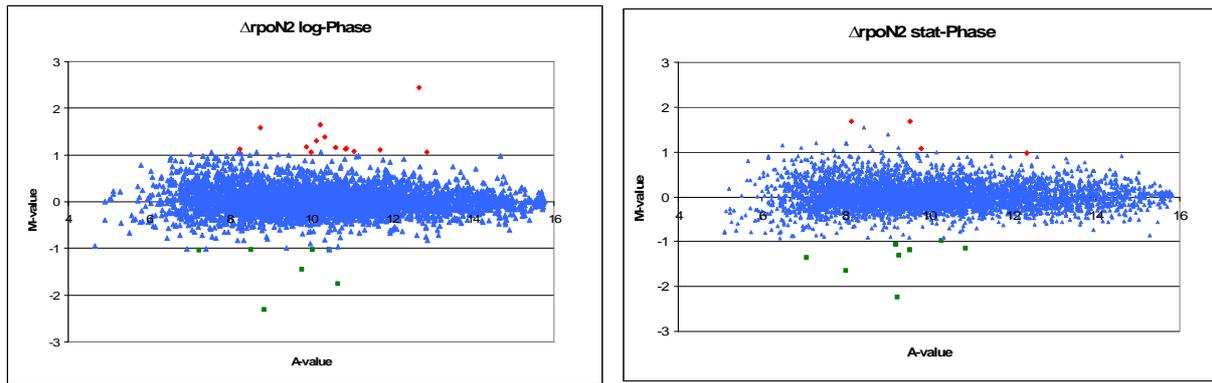


Abb.D.39: M/A-Scatterplot mit dem Verhältnis des M-Werts zu dem A-Wert aus den Hybridisierungen der Proben der Mutante *XccB100ΔrpoN2* in der exponentiellen (links) und stationären (rechts) Wachstumsphase in M9-Minimalmedium im Vergleich zum Wildtyp. Aufgetragen ist der M-Wert gegen den A-Wert, wobei statistisch signifikant differentiell exprimierte Gene, die alle drei Kriterien erfüllen grün (reprimiert) oder rot (induziert) gefärbt sind. Blaue Punkte stellen die nicht differentiell exprimierten Gene der Mutante dar.

In der exponentiellen Phase sind 22 Gene differentiell exprimiert. Darunter mit einem M-Wert von -2,3, als stark reprimiert, das deletierte Gen *rpoN2*. Die Detektion eines deletierten Gens in einem Microarray-Experiment ist nicht zwingend notwendig, da die Detektion dieses Gens die Expression des Gens in der Referenz erfordert. Weitere sieben Gene sind reprimiert und vierzehn induziert.

Unter den reprimierten Genen sind zwei für Exoenzyme kodierende Gene *celA* und *pglA*. Beide Genprodukte verdauen die pflanzliche Zellwand, als extrazelluläre Enzyme, die von dem Bakterium sekretiert werden.

Tab.D.18: Liste der statistisch differentiell exprimierten Gene in der exponentiellen Wachstumsphase der Mutante *XccB100ΔrpoN2* im Vergleich zum Wildtyp in M9-Minimalmedium.

| GenDB-ID | Genname | Genprodukt | M-Wert |
|---------------|-------------|--|--------|
| xcc-b100_2827 | - | hypothetical protein | 2,44 |
| xcc-b100_2267 | <i>infA</i> | initiation factor IF-1 | 1,65 |
| xcc-b100_1282 | - | Putative membrane protein | 1,57 |
| xcc-b100_1677 | - | conserved hypothetical protein | 1,39 |
| xcc-b100_3190 | - | excinuclease ABC subunit A | 1,30 |
| xcc-b100_1681 | - | VirB11 protein | 1,17 |
| xcc-b100_2632 | - | hypothetical protein | 1,16 |
| xcc-b100_1679 | <i>trbG</i> | Conjugal transfer protein trbG precursor | 1,13 |
| xcc-b100_1016 | - | TonB-dependent outer membrane receptor (C- | 1,13 |

| | | | |
|---------------|--------------|---|-------|
| | | terminal fragment) | |
| xcc-b100_2659 | - | hypothetical protein | 1,12 |
| xcc-b100_1691 | - | VirB4 protein | 1,1 |
| xcc-b100_1682 | <i>virB1</i> | type IV secretion system protein VirB1 | 1,07 |
| xcc-b100_1683 | - | VirB2 protein | 1,06 |
| xcc-b100_3127 | - | hypothetical protein | 1,02 |
| xcc-b100_3779 | - | Putative secreted protein | -1,02 |
| xcc-b100_1840 | - | Putative secreted protein | -1,02 |
| xcc-b100_4177 | <i>nrdB</i> | Ribonucleoside-diphosphate reductase beta chain | -1,03 |
| xcc-b100_0738 | <i>pglA</i> | exported polygalacturonase | -1,04 |
| xcc-b100_1018 | <i>celA</i> | 1,4-beta-cellobiosidase | -1,45 |
| xcc-b100_0874 | <i>ilvC</i> | ketol-acid reductoisomerase | -1,75 |
| xcc-b100_2232 | <i>rpoN2</i> | RNA polymerase sigma-54 factor | -2,31 |

Tab.D.19: Liste der statistisch differentiell exprimierten Gene in der stationären Wachstumsphase der Mutante XccB100Δ*rpoN2* im Vergleich zum Wildtyp in M9-Minimalmedium.

| GenDB-ID | Genname | Genprodukt | M-Wert |
|---------------|--------------|--------------------------------|--------|
| xcc-b100_2577 | - | Conserved hypothetical protein | 1,68 |
| xcc-b100_1260 | - | exported beta-glucosidase | 1,68 |
| xcc-b100_3762 | - | Conserved hypothetical protein | 0,98 |
| xcc-b100_1126 | <i>metY</i> | homocysteine synthase | -0,98 |
| xcc-b100_3455 | <i>rpsS</i> | 30S ribosomal protein S19 | -1,07 |
| xcc-b100_1089 | - | conserved hypothetical protein | -1,14 |
| xcc-b100_0874 | <i>ilvC</i> | ketol-acid reductoisomerase | -1,17 |
| xcc-b100_1005 | <i>cysD</i> | ATP sulfurylase, small subunit | -1,29 |
| xcc-b100_0738 | <i>pglA</i> | exported polygalacturonase | -1,35 |
| xcc-b100_3458 | <i>rplD</i> | 50S ribosomal protein L4 | -1,65 |
| xcc-b100_2232 | <i>rpoN2</i> | RNA polymerase sigma-54 factor | -2,23 |

Ebenso wie in der exponentiellen Phase ist das deletierte Gen *rpoN2* auch in der stationären Phase als reprimiert zu detektieren. Drei Gene sind als induziert und weitere neun als reprimiert detektiert.

Unter den reprimierten Genen sind ribosomale Gene und vier Gene, die in der Aminosäure-Biosynthese involviert sind (*cysD*, *ilvC*, *metY*). Zudem ist das Gen *pglA*, in der exponentiellen Phase induziert, in der stationären Phase reprimiert.

D.2.8.2 Kohlenstoffverwertung der Mutante *XccB100ΔrpoN2*

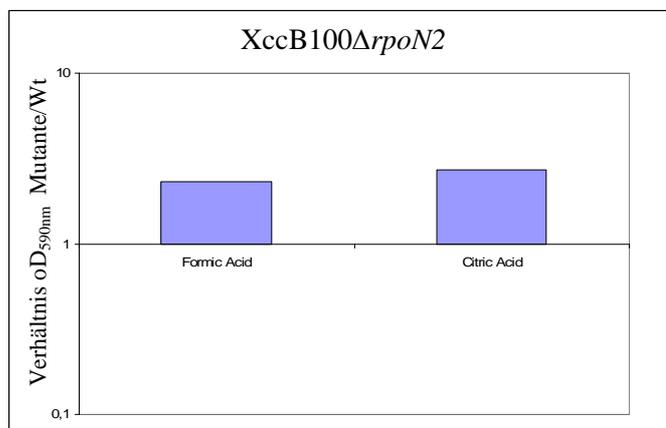


Abb.D.40: **Kohlenstoffverwertung der Mutante *XccB100ΔrpoN2* im Vergleich zum Wildtyp B100.** Dargestellt ist das Verhältnis der erreichten optischen Dichte $Abs_{.590nm}$ Mutante gegen Wildtyp in halblogarithmischer Auftragungsweise auf Kohlenstoffquellen die die Kriterien >2 oder $<0,5$ erreicht haben.

Diese Mutante verwertet im Vergleich zum Wildtyp zwei Kohlenstoffquellen besser, wenn diese als alleinige Kohlenstoffquelle angeboten werden. Zum einen Formic acid und zum anderen Citric acid. Zu beachten ist dabei die allgemeine Reduktion der Verwertung auf fast allen getesteten Kohlenstoffquellen, die jedoch nicht die festgelegten Kriterien von $\leq 0,5$ und ≥ 2 erfüllen.

D.2.8.3 Kohlenstoffverwertung der Doppelmutante *XccB100ΔrpoN2::pK19ΩrpoN1*

Der alternative Sigmafaktor RpoN liegt im Xcc B100 Genom in zwei Kopien vor. In dieser Arbeit wurde jedes Gen einzeln deletiert und eine Doppelmutante konstruiert.

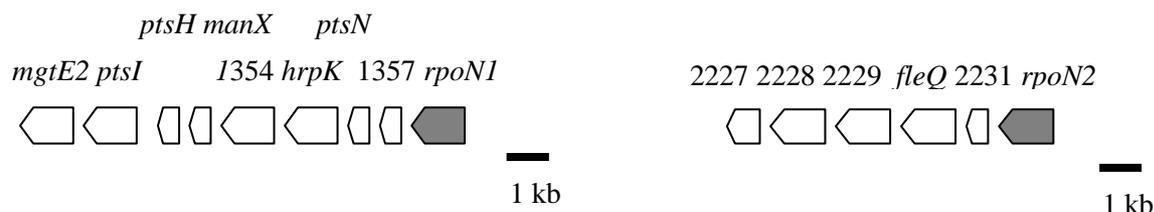


Abb.D.41: **Genorganisation upstream der deletierten Gene *rpoN1* und *rpoN2* im Xcc B100 Genom.** Die deletierten Gene sind mit einem dunklen Pfeil gekennzeichnet, während die downstream liegenden Gene mit einem weißen Pfeil dargestellt sind.

Das den Sigmafaktor RpoN1 kodierende Gen liegt downstream der *ptsHIN* Gene, die in der Kohlenhydrataufnahme als PTS Transporter eine Rolle spielen. Das Gen *rpoN2* ist downstream der Flagellar-Biosynthese Gene lokalisiert.

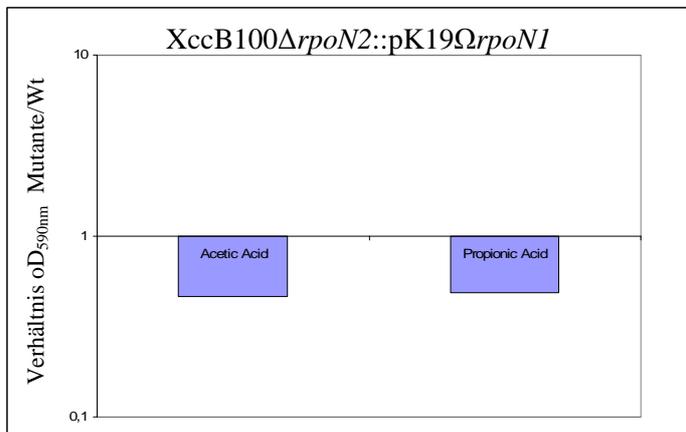


Abb.D.42: **Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100ΔrpoN2::pK19ΩrpoN1 im Vergleich zum Wildtyp B100.** Dargestellt ist das Verhältnis der erreichten optischen Dichte Abs._{590nm} Mutante gegen Wildtyp in halblogarithmischer Auftragungsweise auf Kohlenstoffquellen die die Kriterien >2 oder <0,5 erreicht haben.

Die Doppelmutante mit den deletierten Genen *rpoN1* und *rpoN2* zeigt nur auf den zwei Kohlenstoffquellen Acetic acid und Propionic acid ein im Vergleich zum Wildtyp anderes Verwertungsprofil, welches die Kriterien > 2 oder < 0,5 erfüllt. Betrachtet man alle 95 Kohlenstoffquellen sieht man eine allgemeine Reduktion der Verwertung auf nahezu allen Kohlenstoffquellen, die jedoch nicht die Grenzkriterien erfüllen. Diese Beobachtung ist vergleichbar mit dem Ergebnis der Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100ΔrpoN2.

D.2.8.4 Motilitätstest der Mutanten *XccB100ΔrpoN2* und *XccB100ΔrpoN2::pK19ΩrpoN1*

Mit Bromfeldplatten, Nährstoffagarplatten die nur einen geringen Anteil an Agar ($0,3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) und geringere Mengen an Nährstoffen enthalten, ist es möglich die Fortbewegung von Bakterien mittels ihrer Flagellen (Swimming) zu untersuchen. Dazu wird in die Mitte der Platten Bakterien gegeben und das Ausschwärmen der Bakterienkolonie auf der Agarplatte beobachtet. Motile Bakterien breiten sich dabei mittels ihrer Flagellen kreisförmig aus, während sich bei nicht motilen Bakterien die Kolonie nicht weiter vergrößert.

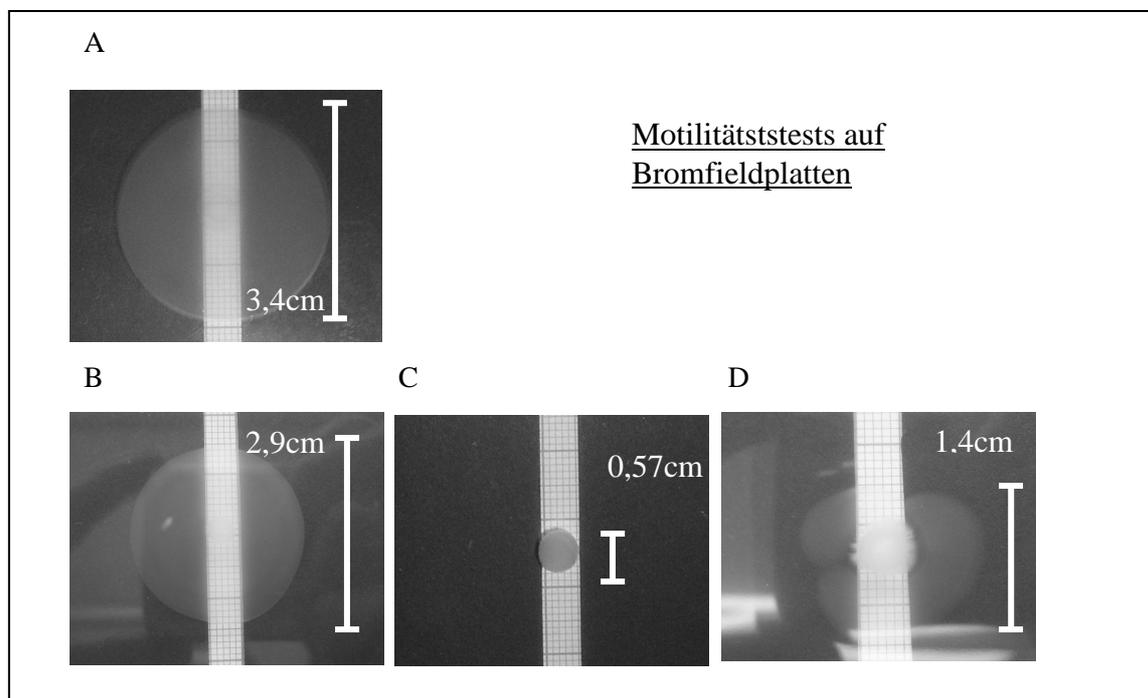


Abb.D.43: **Motilitätstests auf Bromfeldplatten mit dem Wildtyp und drei Mutanten.** (A) *XccB100* Wildtyp, (B) *XccB100::pK19ΩrpoN1*, (C) *XccB100 ΔrpoN2::pK19ΩrpoN1* (D) *XccΔrpoN2*.

Der Wildtyp zeigt einen motilen Phänotyp auf Bromfeldplatten. Er ist in der Lage mittels Swimming, der Fortbewegung durch Flagellen, sich auf der Nährstoffagarplatte kreisförmig auszubreiten. Der Durchmesser nach drei Tagen Inkubation bei 30°C beträgt 3,4 cm. Die Mutante *XccB100::pK19ΩrpoN1* zeigt im Vergleich zum Wildtyp keine signifikante Veränderung im Swimming. Einen extrem signifikanten Unterschied im Durchmesser der Swimming- Kolonie findet man bei der Einfachmutante im alternativen Sigma-54- Faktor *rpoN2* (*XccB100ΔrpoN2*) und noch deutlicher bei der Doppelmutante *XccB100ΔrpoN2::pK19ΩrpoN1*.

Tab.D.20: **Ergebnis des ungepaarten *t*-test zum Vergleich der Motilität des Wildtyps zu den untersuchten Mutanten.** Der *t*-test dient dem Vergleich zweier Mittelwerte zweier unterschiedlicher Gruppen. Gezeigt sind der Durchmesser, die Standard- Abweichung des Durchmessers in cm und das Ergebnis des *t*-test. +++ extremer Unterschied, ++ großer Unterschied, + nachweisbarer Unterschied.

| Stamm | Durchmesser (cm) | Std.- Abw. (cm) | <i>t</i> -test |
|--|------------------|-----------------|----------------|
| <i>Xcc</i> B100 | 3,425 | 0,148 | |
| <i>Xcc</i> B100::pK19Ω <i>rpoN1</i> | 2,95 | 0,41 | + |
| <i>Xcc</i> B100Δ <i>rpoN2</i> | 1,436 | 0,45 | +++ |
| <i>Xcc</i> B100Δ <i>rpoN2</i> ::pK19Ω <i>rpoN1</i> | 0,57 | 0,075 | +++ |

D.2.9 Analyse der Mutante *Xcc*B100Δ*xcc-b100_1019*

Die Mutante *Xcc*B100Δ*xcc-b100_1019* trägt eine durch „gene-SOEing“ eingebrachte markerfreie Deletion in einem Gen, welches einen Regulator der LacI-Familie kodiert. Die Microarray-Analyse wurde in M9-Minimalmedium mit 0,5% (w/v) Glukose in der exponentiellen Wachstumsphase der Mutante durchgeführt.

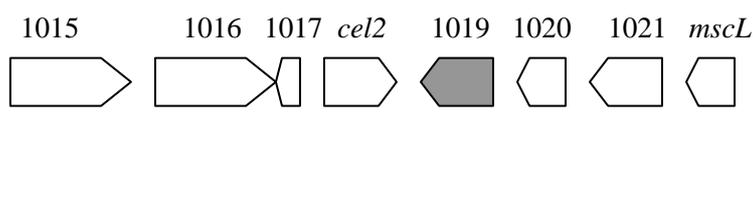


Abb. D.44: **Genorganisation upstream und downstream des deletierten Gens (1019) im *Xcc* B100 Genom.** Das deletierte Gen mit der GenDB-Identifikationsnummer *xcc-b100_1019* ist mit einem grauen Pfeil gekennzeichnet, während die umgebenden Gene durch einen weißen Pfeil dargestellt sind.

D.2.9.1 Transkriptomische Charakterisierung der Mutante

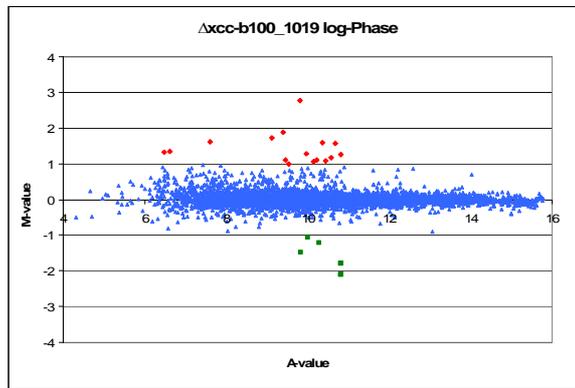


Abb.D.45: M/A-Scatterplot mit dem Verhältnis des M-Werts zu dem A-Wert aus den Hybridisierungen der Proben der Mutante *XccB100Δxcc-b100_1019* in der exponentiellen Wachstumsphase in M9-Minimalmedium im Vergleich zum Wildtyp. Aufgetragen ist der M-Wert gegen den A-Wert, wobei statistisch signifikant differentiell exprimierte Gene, die alle drei Kriterien erfüllen grün (reprimiert) oder rot (induziert) gefärbt sind. Blaue Punkte stellen die nicht differentiell exprimierten Gene der Mutante dar.

Tab.D.21: Liste der statistisch differentiell exprimierten Gene in der exponentiellen Wachstumsphase der Mutante *XccB100Δxcc-b100_1019* im Vergleich zum Wildtyp in M9-Minimalmedium.

| GenDB-ID | Genname | Genprodukt | M-Wert |
|--------------------|--------------|--|--------|
| xcc-b100_1799 | <i>rpfN</i> | carbohydrate-selective porin | 2,78 |
| xcc-b100_1018 | <i>celA2</i> | 1,4-beta-cellobiosidase | 1,87 |
| xcc-b100_0661 | <i>cel2</i> | exported cellulose 1,4-beta-cellobiosidase | 1,72 |
| xcc-b100_0738 | <i>pglA1</i> | exported polygalacturonase | 1,61 |
| xcc-b100_1040 | - | hypothetical protein | 1,59 |
| xcc-b100_1802 | <i>fruB</i> | PTS fructose porter | 1,57 |
| xcc-b100_0028 | - | putative exported peptidase | 1,34 |
| xcc-b100_1494 | - | Extracellular serine protease | 1,31 |
| xcc-b100_0460 | - | hypothetical protein predicted by Gismo | 1,27 |
| xcc-b100_1801 | <i>fruK</i> | 1-phosphofruktokinase | 1,26 |
| xcc-b100_1531 | - | Conserved hypothetical protein | 1,16 |
| xcc-b100_0431 | - | hypothetical protein | 1,1 |
| xcc-b100_3498 | - | Extracellular protease | 1,09 |
| 222xcc_050728_3735 | <i>rhgB</i> | pseudogene | 1,07 |
| xcc-b100_0460 | - | hypothetical protein | 1,04 |
| xcc-b100_0819 | <i>celS2</i> | exported cellulase / xyloglucan hydrolase | 0,98 |
| xcc-b100_1144 | - | Putative siderophore biosynthesis protein | -1,06 |
| xcc-b100_1807 | - | NAD-specific glutamate dehydrogenase | -1,21 |
| xcc-b100_1143 | - | Putative siderophore biosynthesis protein | -1,48 |

| | | | |
|---------------|---|---|-------|
| xcc-b100_1141 | - | Putative siderophore biosynthesis protein | -1,78 |
| xcc-b100_1145 | - | TonB-dependent outer membrane receptor | -2,1 |

Bei einer Gesamtzahl von 21 differentiell exprimierten Genen in M9- Minimalmedium und exponentieller Wachstumsphase, darunter sechzehn induziert und fünf reprimierten, zeigt sich in der exponentiellen Phase eine Induktion der Gene *fruB* und *fruK* (GenDB-Identifikations-Nummer xcc-b100_1802 und 1803). Ebenfalls induziert ist das Gen *rpfN* mit der GenDB-Identifikations- Nummer xcc-b100_1799. Die Gene *fruB* und *fruK* liegen im Fruktose-Operon. Das Gen *rpfN* kodiert für ein Kohlenhydrat-selektives Porin der in der bakteriellen Membran. *rpfN* ist ein Carbohydrat-selective Porin und ist vermutlich an der Äußeren Membran lokalisiert und eventuell sowohl für den Transport von Glukose, Glycerol, Mannitol, Fruktose, als auch Maltose verantwortlich.

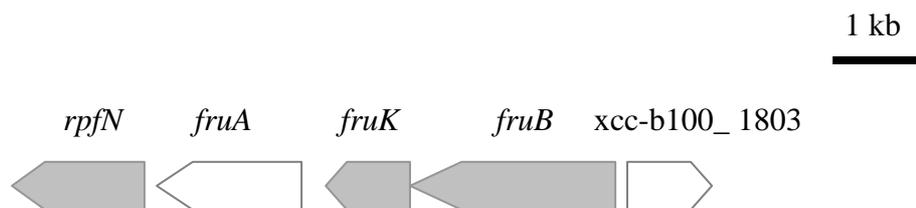


Abb.D.46: **Genorganisation des Fruktose-Operons in Xcc B100.** Dunkle Pfeile kennzeichnen die als statistisch signifikant reprimierten induzierte Gene des Operons.

Weitere Gene die differentiell exprimiert werden, ist das für die Siderophor-Aufnahme verantwortliche Gencluster (xcc-b100_1141 bis xcc-b100_1145), das in der exponentiellen Phase eine Reprimierung zeigt.

D.2.9.2 Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100Δxcc-b100_1019

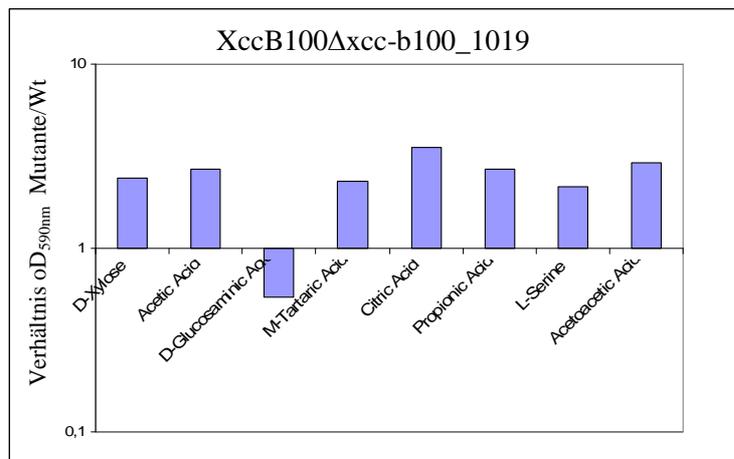


Abb.D.47: **Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100Δxcc-b100_1019 im Vergleich zum Wildtyp B100.** Dargestellt ist das Verhältnis der erreichten optischen Dichte Abs._{590nm} Mutante gegen Wildtyp in halblogarithmischer Auftragsungsweise auf Kohlenstoffquellen die die Kriterien >2 oder <0,5 erreicht haben.

Die Mutante XccB100Δxcc-b100_1019 zeigt bei sieben Kohlenstoffquellen eine bessere Verwertung als der Wildtyp (D-Xylose, Acetic acid, M-Tartaric acid, Citric acid, Propionic acid, L-Serine und Acetoacetic acid). D-Glucosaminic acid wird als einzige Kohlenstoffquelle im Vergleich zum Wildtyp von der Mutante schlechter verwertet.

D-Glucosaminic acid (2-amino-2-deoxy-D-gluconic acid) ist ein Bestandteil des bakteriellen Lipopolysaccharids (LPS).

D.2.10 Charakterisierung Mutante XccB100Δxcc-b100_0167

Die Mutante XccB100Δxcc-b100_0167 ist in einem Gen, welches für einen Regulator der LacI-Familie kodiert, durch „gene-SOEing“ markerfrei deletiert. Die Microarray-Analyse wurde in M9-Minimalmedium mit 0,5% (w/v) Glukose in der exponentiellen Wachstumsphase der Mutante durchgeführt.

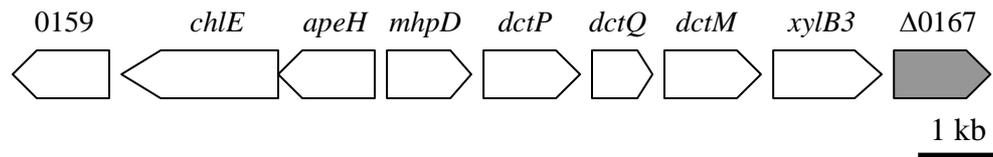


Abb.D.48: **Genorganisation upstream des deletierten Gens (0167) im Xcc B100 Genom.** Das deletierte Gen mit der GenDB-Identifikationsnummer *xcc-b100_0167* ist mit einem grauen Pfeil gekennzeichnet, während die umgebenden Gene durch einen weißen Pfeil dargestellt sind.

D.2.10.1 Transkriptomische Charakterisierung der Mutante

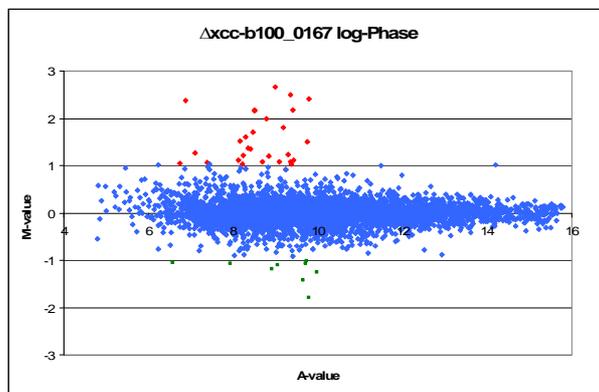


Abb.D.49: **M/A-Scatterplot mit dem Verhältnis des M-Werts zu dem A-Wert aus den Hybridisierungen der Proben der Mutante XccB100Δxcc-b100_0167 in der exponentiellen Wachstumsphase in M9-Minimalmedium im Vergleich zum Wildtyp.** Aufgetragen ist der M-Wert gegen den A-Wert, wobei statistisch signifikant differentiell exprimierte Gene, die alle drei Kriterien erfüllen grün (reprimiert) oder rot (induziert) gefärbt sind. Blaue Punkte stellen die nicht differentiell exprimierten Gene der Mutante dar.

In der exponentiellen Wachstumsphase zeigt sich bei dieser Mutante eine Induktion von zwei Regionen, die benachbart im Genom lokalisiert sind. Einmal die der Gene *hrpF*, *hpaB* und *yvpA*, die beim Aufbau des Typ-III-Sekretionssystems beteiligt sind. Zum anderen die Induktion einer Region in der die Gene des Dicarboxylat Transport-Systems lokalisiert sind (*chlE*, *dctP*, *apeH*). Das Dicarboxylat-System ist für die Aufnahme von Dicarboxylaten wie Succinat, Malat und Fumarat verantwortlich. Des Weiteren wird die Expression von vier Genen, die für die pflanzliche Zellwand zersetzende Exoenzyme kodieren induziert (*cel*, *pglA*, *celA* und *celS*).

Tab.D.22: Liste der statistisch differentiell exprimierten Gene in der exponentiellen Wachstumsphase der Mutante XccB100Δxcc-b100_0167 im Vergleich zum Wildtyp in M9-Minimalmedium.

| GenDB-ID | Genname | Genprodukt | M-Wert |
|---------------|--------------|--|--------|
| xcc-b100_0133 | - | hypothetical protein | 2,65 |
| xcc-b100_0160 | <i>chlE</i> | exported cholinesterase | 2,48 |
| xcc-b100_0163 | <i>dctP</i> | dicarboxylate transport system, periplasmic substate binding component | 2,41 |
| xcc-b100_1494 | - | Extracellular serine protease | 2,38 |
| xcc-b100_0661 | <i>cel</i> | exported cellulose 1,4-beta-cellobiosidase | 2,17 |
| xcc-b100_0738 | <i>pglA1</i> | exported polygalacturonase | 2,17 |
| xcc-b100_0159 | - | exported esterase& | 2,15 |
| xcc-b100_0161 | <i>apeH</i> | exported acylaminoacyl-peptidase | 1,99 |
| xcc-b100_1018 | <i>cel2</i> | 1,4-beta-cellobiosidase | 1,81 |
| xcc-b100_3065 | <i>hpa1</i> | Hpa1 protein | 1,7 |
| xcc-b100_0424 | - | hypothetical protein | 1,6 |
| xcc-b100_3243 | - | conserved hypothetical protein | 1,51 |
| xcc-b100_0819 | <i>celS2</i> | exported cellulase / xyloglucan hydrolase | 1,49 |
| xcc-b100_2179 | <i>motA1</i> | Flagellar motor component MotA | 1,37 |
| xcc-b100_3058 | - | conserved hypothetical protein | 1,27 |
| xcc-b100_3085 | <i>hpaB</i> | HpaB protein | 1,23 |
| xcc-b100_3327 | - | putative phage tail assembly protein I | 1,22 |
| xcc-b100_1596 | - | leucin rich protein | 1,2 |
| xcc-b100_3256 | - | transducer protein car | 1,12 |
| xcc-b100_0431 | - | hypothetical protein | 1,1 |
| xcc-b100_3086 | <i>hrpW</i> | HrpW protein | 1,08 |
| xcc-b100_3388 | <i>phoB</i> | two-component system regulatory protein | 1,07 |
| xcc-b100_3232 | - | hypothetical protei | 1,07 |
| xcc-b100_2337 | - | Metallopeptidase | 1,07 |
| xcc-b100_3064 | <i>hpa2</i> | Putative transglycosylase HpaH | 1,04 |
| xcc-b100_1786 | <i>upp</i> | Uracil phosphoribosyltransferase | 1,03 |
| xcc-b100_3088 | <i>hrpF</i> | HrpF protein | 1,03 |
| xcc-b100_2655 | - | conserved hypothetical protein | 0,93 |
| xcc-b100_3083 | <i>hrpD6</i> | HrpD6 protein | 0,92 |
| xcc-b100_1230 | <i>pilH</i> | Type IV pilus response regulator PilH | -0,91 |
| xcc-b100_3931 | - | Putative secreted protein | -1,01 |
| xcc-b100_4137 | - | hypothetical protein | -1,04 |
| xcc-b100_0792 | - | TonB-dependent outer membrane receptor iron complex | -1,06 |
| xcc-b100_3779 | - | Putative secreted protein | -1,09 |
| xcc-b100_1388 | - | Conserved hypothetical protein | -1,18 |
| xcc-b100_1144 | - | Putative siderophore biosynthesis protein | -1,25 |

| | | | |
|---------------|---|---|-------|
| xcc-b100_1015 | - | Putative O-Glycosyl hydrolase | -1,42 |
| xcc-b100_1143 | - | Putative siderophore biosynthesis protein | -1,78 |

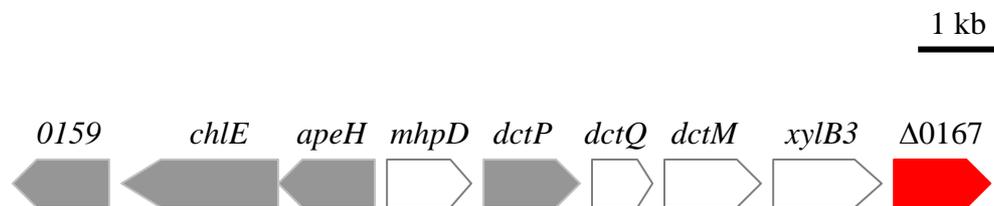


Abb.D.50: **Genorganisation der für das Dicarboxylat Transport-System kodierenden Gene in Xcc B100.** Als induziert detektierte Gene sind mit einem dunklen Pfeil markiert, das deletierte Gen downstream der für das Dicarboxylat Transport-System kodierenden Gene ist rot markiert.

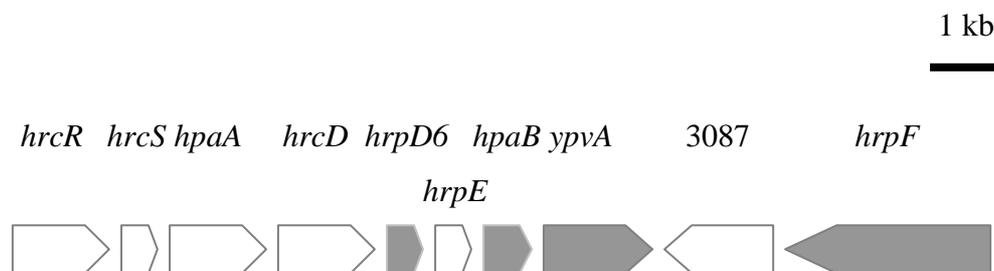


Abb.D.51: **Genorganisation der für das Typ-III-Sekretions-System kodierenden Gene in Xcc B100.** Als induziert detektierte Gene sind mit einem dunklen Pfeil markiert.

D.2.10.2 Kohlenstoffverwertung der Mutante

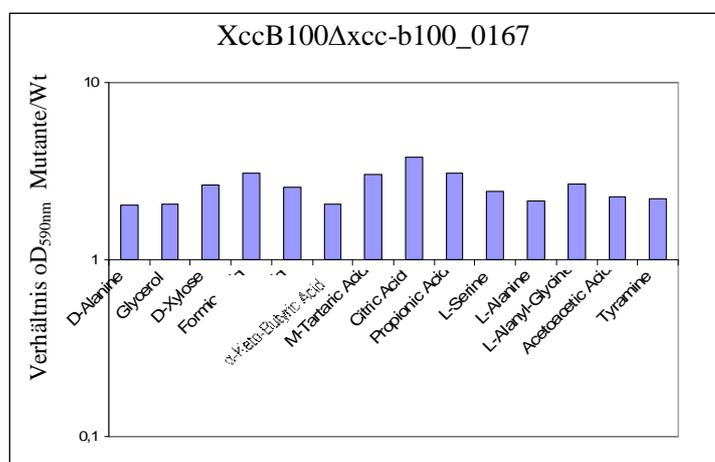


Abb.D.52: **Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100Δxcc-b100_0167 im Vergleich zum Wildtyp B100.** Dargestellt ist das Verhältnis der erreichten optischen Dichte Abs._{590nm} Mutante gegen

Wildtyp in halblogarithmischer Auftragungsweise auf Kohlenstoffquellen die die Kriterien >2 oder $<0,5$ erreicht haben.

Vierzehn Kohlenstoffquellen können von dieser Mutante besser verwertet werden als vom Wildtyp. Diese Kohlenstoffquellen sind D-Alanine, Glycerol, D-Xylose, Formic acid, α -Keto-Butyric acid, M-Tartaric acid, Citric acid, Propionic acid, L-Serine, L-Alanine, L-Alanyl-Glycine, Acetoacetic acid und Tyramine.

Diese Mutante verwertet zudem einige Mono-Carbonsäuren wie Formic acid, Acetic acid und Propionic acid besser als der Wildtyp. Ebenso einige Ketosäuren wie α -Keto-butyrac acid und Acetoacetic acid.

D.2.11 Charakterisierung der Mutante XccB100 Δ xcc-b100_2513

Die Mutante XccB100 Δ xcc-b100_2513 trägt eine durch Plasmidintegration eingebrachte Mutation in einem Gen, welches einen möglichen Regulator der LysR-Familie dessen Spezifität nicht geklärt ist, kodiert.



Abb.D.53: **Genorganisation upstream und downstream des deletierten Gens (2513) im Xcc B100 Genom (Serrania et al., 2008).** Das deletierte Gen mit der GenDB-Identifikationsnummer xcc-b100_2513 ist mit einem gestrichelten Pfeil gekennzeichnet.

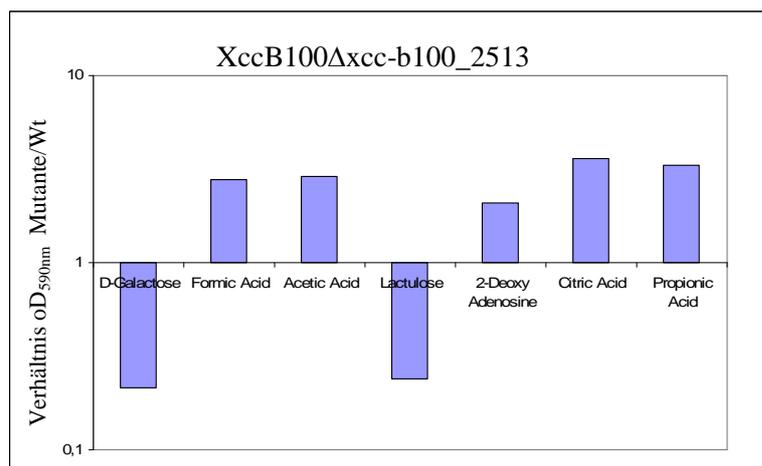


Abb.D.54: **Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100Δxcc-b100_2513 im Vergleich zum Wildtyp B100.** Dargestellt ist das Verhältnis der erreichten optischen Dichte Abs._{590nm} Mutante gegen Wildtyp in halblogarithmischer Auftragsweise auf Kohlenstoffquellen die die Kriterien >2 oder <0,5 erreicht haben.

Die Mutante verwertet die beiden Kohlenstoffquellen D-Galaktose und Lactulose schlechter als der Wildtyp. Lactulose ist ein Disaccharid bestehend aus D-Galaktose und Fruktose. Das deletierte Gen, welches einen möglichen Regulator der LysR-Familie kodiert, ist in Transkriptionsrichtung der Galaktose-Verwertungsregion 2 im Xcc B100 Genom lokalisiert (Serrania *et al.*, 2008).

D.2.12 Charakterisierung der Mutante XccB100Δxcc-b100_1703

Die Deletion in diesem Gen, welches einen Regulator der LacI-Familie kodiert, ist mittels „gene-SOEing“ eingebracht und deletiert die Kodierregion.

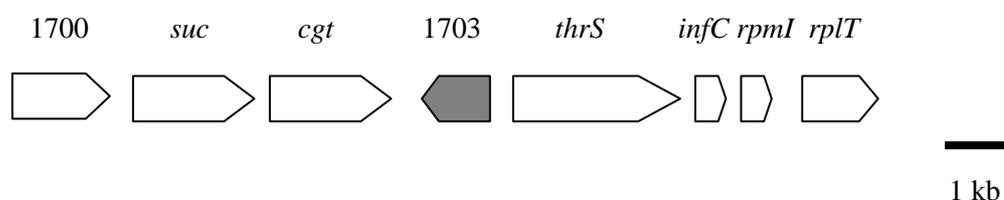


Abb.D.55: **Genorganisation upstream und downstream des deletierten Gens (1703) im Xcc B100 Genom.** Das deletierte Gen mit der GenDB-Identifikationsnummer xcc-b100_1703 ist mit einem dunklen Pfeil gekennzeichnet, während die umgebenden Gene mit einem weißen Pfeil dargestellt sind.

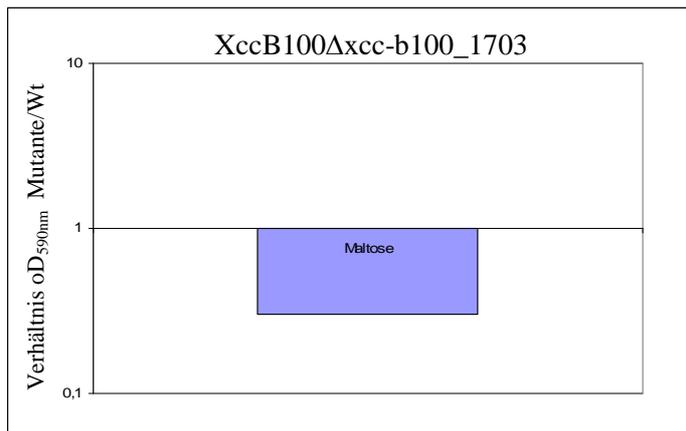


Abb.D.56: **Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100Δxcc-b100 im Vergleich zum Wildtyp B100.** Dargestellt ist das Verhältnis der erreichten optischen Dichte Abs_{590nm} Mutante gegen Wildtyp in halblogarithmischer Auftragungsweise auf Kohlenstoffquellen die die Kriterien >2 oder $<0,5$ erreicht haben.

Die Verwertung von Maltose, einem Disaccharid und Spaltprodukt der Stärke, ist bei dieser Mutante im Vergleich zum Wildtyp verschlechtert. Das diesen Regulator kodierende Gen liegt upstream des Gens *cgt* welches für eine exportierte Cyclomaltodextrin Glucotransferase kodiert.

D.2.13 Charakterisierung der Mutante XccB100Δxcc-b100_1971

Das Gen, welches diesen Regulator der LacI-Familie kodiert, liegt upstream der Gene *malEFG* und wurde mittels „gene-SOEing“ deletiert.

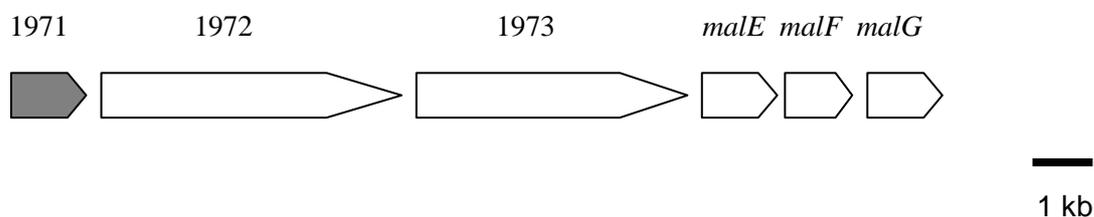


Abb.D.57: **Genorganisation downstream des deletierten Gens (1971) im Xcc B100 Genom.** Das deletierte Gen mit der GenDB-Identifikationsnummer *xcc-b100_1971* ist mit einem dunklen Pfeil gekennzeichnet, während die umgebenden Gene mit einem weißen Pfeil dargestellt sind.

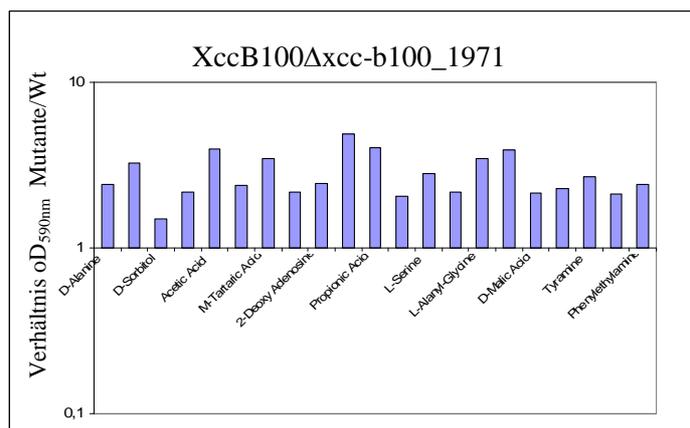


Abb.D.58: **Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100Δxcc-b100_1971 im Vergleich zum Wildtyp B100.** Dargestellt ist das Verhältnis der erreichten optischen Dichte Abs._{590nm} Mutante gegen Wildtyp in halblogarithmischer Auftragsweise auf Kohlenstoffquellen die die Kriterien >2 oder <0,5 erreicht haben.

Die Kohlenstoffquellen auf denen diese Mutante eine bessere Verwertung zeigt sind D-Alanine, D-Serine, D-Sorbitol, Glycerol, Acetic Acid, α-Keto-Butyric Acid, M-Tartaric Acid, D-Fructose-6-Phosphate, 2-Deoxy Adenosine, Citric Acid, Propionic Acid, Inosine, L-Serine, L-Threonine, L-Alanyl-Glycine, Acetoacetic Acid, D-Malic Acid, Glycyl-L-Proline, Tyramine, L-Lyxose und Phenylethylamine. Die upstream des deletierten Gens liegenden Gene *malEFG* kodieren für einen ABC-Transporter Aufnahme Komplex für Lactose/ L-Arabinose.

D.2.14 Charakterisierung der Mutante XccB100Δ*suxR*

Die Deletion in dem Gen *suxR* wurde mittels „gene-SOEing“ eingebracht. *suxR* kodiert einen Regulator der LacI-Familie.

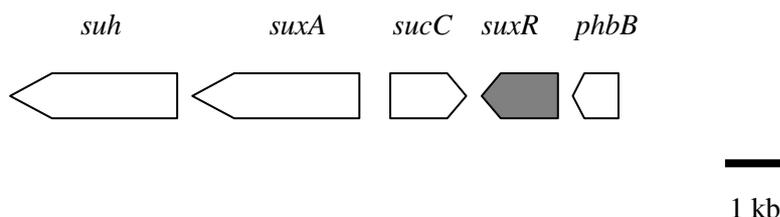


Abb.D.59: **Genorganisation upstream und downstream des deletierten Gens *suxR* im Xcc B100 Genom.** Der deletierte Regulator *suxR* ist mit einem dunklen Pfeil gekennzeichnet, während die umgebenden Gene mit einem weißen Pfeil dargestellt sind.

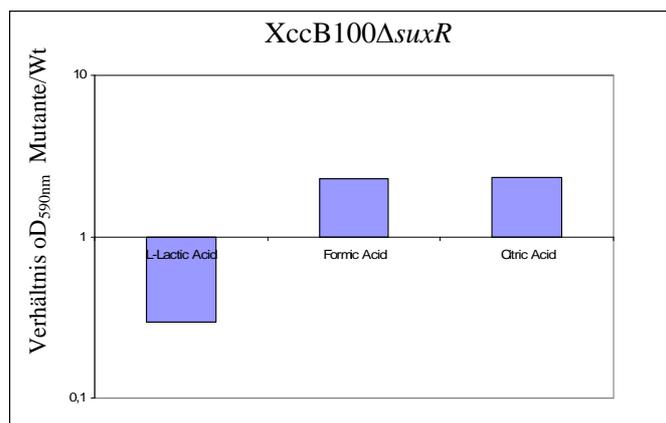


Abb.D.60: **Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100ΔsuxR im Vergleich zum Wildtyp B100.** Dargestellt ist das Verhältnis der erreichten optischen Dichte Abs._{590nm} Mutante gegen Wildtyp in halblogarithmischer Auftragsweise auf Kohlenstoffquellen die die Kriterien >2 oder <0,5 erreicht haben.

Die Mutante XccB100ΔsuxR verwertet im Vergleich zum Wildtyp schlechter L-Lactic acid, zeigt jedoch eine bessere Verwertung von Formic acid und Citric acid. Alle drei Verbindungen sind Carbonsäuren.

D.2.15 Charakterisierung der Mutante XccB100::pK19*ihfA*

Das die α-Untereinheit des Regulators IhfA kodierende Gen *ihfA* liegt upstream des *gum*-Clusters. Das Gen wurde mittels Plasmidintegration mutagenisiert.

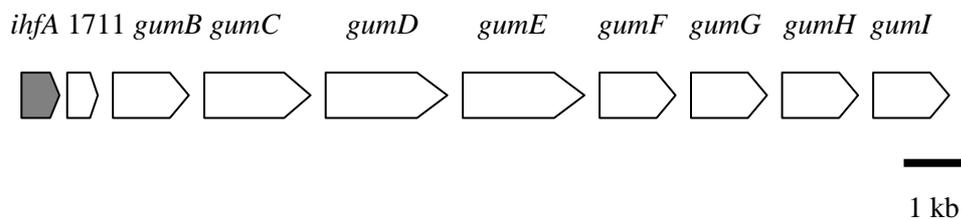


Abb.D.61: **Genorganisation downstream des deletierten Gens *ihfA* im Xcc B100 Genom.** Das deletierte Gen *ihfA* ist mit einem dunklen Pfeil gekennzeichnet, während die downstream liegenden Gene mit einem weißen Pfeil dargestellt sind.

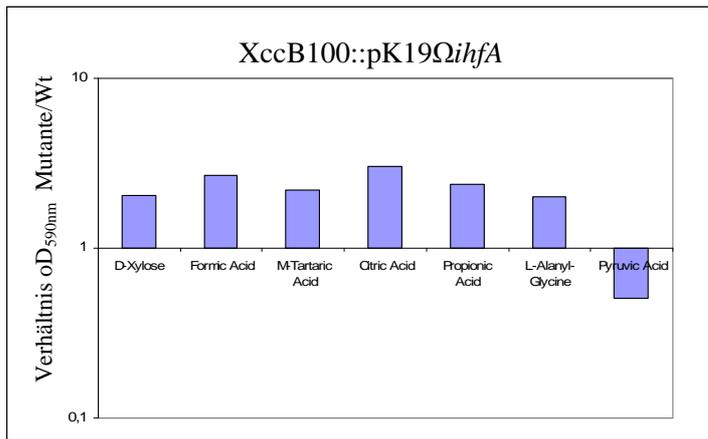


Abb.D.62: **Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100::pK19ΩihfA im Vergleich zum Wildtyp B100.** Dargestellt ist das Verhältnis der erreichten optischen Dichte Abs._{590nm} Mutante gegen Wildtyp in halblogarithmischer Auftragungsweise auf Kohlenstoffquellen die die Kriterien >2 oder <0,5 erreicht haben.

Die Mutante zeigt in diesem Assay eine bessere Verwertung der Kohlenstoffquellen D-Xylose, Formic acid, M-Tartaric acid, Citric acid, Propionic acid, L-Alanyl-Glycine. Eine schlechtere Verwertung zeigt sich auf Pyruvic acid einer α -Ketosäure.

D.2.16 Charakterisierung der Mutante XccB100::pK19Ωxcc-b100_1711

Das Gen mit der GenDB-Identifikations-Nummer xcc-b100_1711 kodiert einen Regulator der MerR-Familie und ist unmittelbar upstream des *gum*-Clusters lokalisiert. Dieses Gen wurde durch die Integration eines Plasmids unterbrochen.

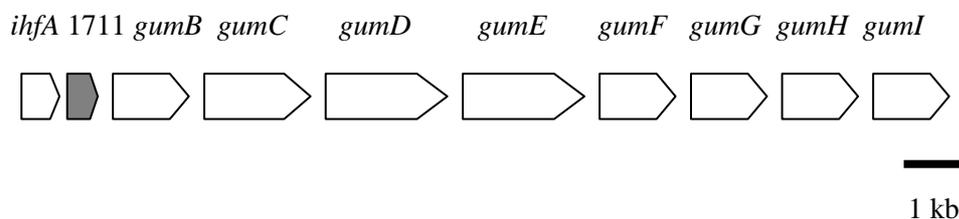


Abb.D.63: **Genorganisation downstream des deletierten Gens (1711) im Xcc B100 Genom.** Der deletierte Regulator mit der GenDB-Identifikations-Nummer xcc-b100_1711 ist mit einem dunklen Pfeil gekennzeichnet, während die downstream liegenden Gene mit einem weißen Pfeil dargestellt sind.

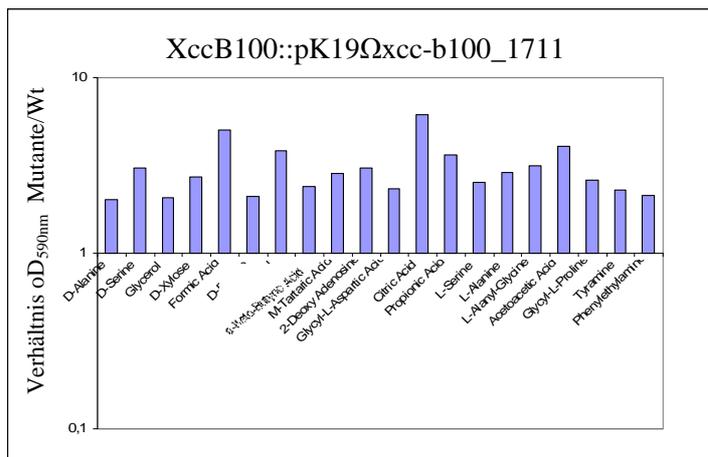


Abb.D.64: **Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100::pK19 Ω xcc-b100_1711 im Vergleich zum Wildtyp B100.** Dargestellt ist das Verhältnis der erreichten optischen Dichte Abs._{590nm} Mutante gegen Wildtyp in halblogarithmischer Auftragsweise auf Kohlenstoffquellen die die Kriterien >2 oder <0,5 erreicht haben.

Die Mutation in diesem Gen hat im Vergleich zum Wildtyp eine bessere Verwertung der folgenden Kohlenstoffquellen zu folge: D-Alanine, D-Serine, Glycerol, D-Xylose, Formic Acid, D-Ribose, Acetic Acid, α -Keto-Butyric, Acid, M-Tartaric Acid, 2-Deoxy Adenosine, Glycyl-L-Aspartic Acid, Citric Acid, Propionic Acid, L-Serine, L-Alanine, L-Alanyl-Glycine, Acetoacetic Acid, Glycyl-L-Proline, Tyramine und Phenylethylamine. Darunter einige Aminosäuren wie L-Serine, L-Alanine, D-Alanine und D-Serine.

D.2.17 Charakterisierung der Mutante XccB100 Δ xcc-b100_1803

Diese Mutante ist in einem Gen deletiert, welches einen Regulator der LacI-Familie kodiert. Es wurde mittels „gene-SOEing“ deletiert und ist downstream des Fruktose-Operons lokalisiert.

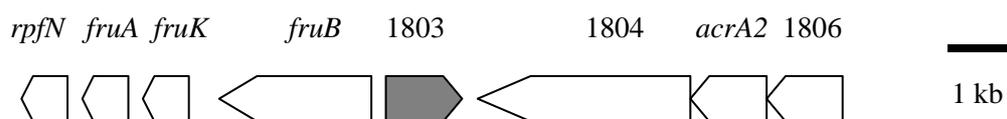


Abb.D.65: **Genorganisation downstream und upstream des deletierten Gens (1803) im Xcc B100 Genom.** Das deletierte Gen mit der GenDB-Identifikations-Nummer xcc-b100_1803 ist mit einem dunklen Pfeil gekennzeichnet, während die umgebenen Gene mit einem weißen Pfeil dargestellt sind.

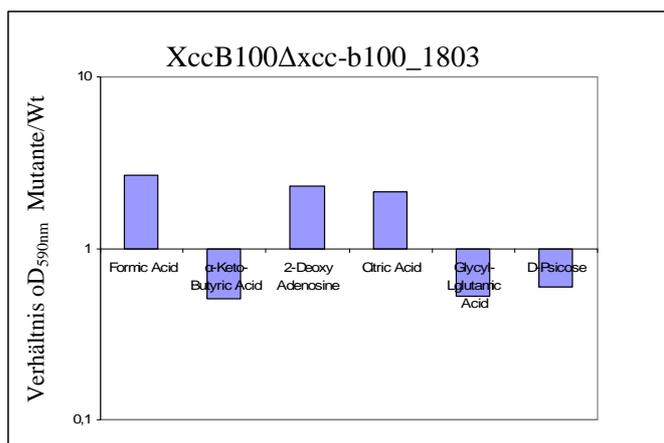


Abb.D.66: **Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100Δxcc-b100_1803 im Vergleich zum Wildtyp B100.** Dargestellt ist das Verhältnis der erreichten optischen Dichte Abs._{590nm} Mutante gegen Wildtyp in halblogarithmischer Auftragsweise auf Kohlenstoffquellen die die Kriterien >2 oder <0,5 erreicht haben.

Die Mutante verwertet die Kohlenstoffquellen Formic Acid, 2-Deoxy Adenosine und Citric Acid besser als der Wildtyp, während die Verwertung von α-Keto-Butyric Acid, Glycyl-L-glutamic Acid und D-Psicose schlechter ist. D-Psicose ist ein C₃-Epimer der D-Fruktose, vor dessen Aufnahme-Operon (*fruABK*) das deletierte Gen lokalisiert ist.

D.2.18 Charakterisierung der Mutante XccB100Δ*rbsR*

Das Gen *rbsR* kodiert einen Regulator der LacI-Familie und wurde durch „gene-SOEing“ deletiert. Er ist upstream zweier TonB-abhängiger Rezeptoren im Xcc Genom lokalisiert (vgl. Abb.D.67).

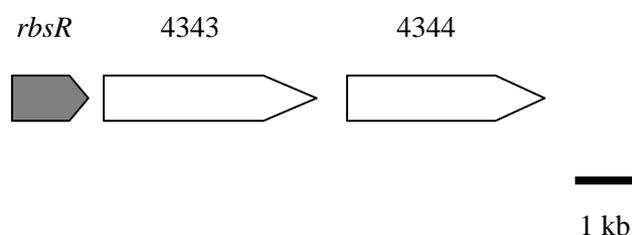


Abb.D.67: **Genorganisation downstream des deletierten Gens *rbsR* im Xcc B100 Genom.** Das deletierte Gen *rbsR* ist mit einem dunklen Pfeil gekennzeichnet, während die umgebenen Gene mit einem weißen Pfeil dargestellt sind.

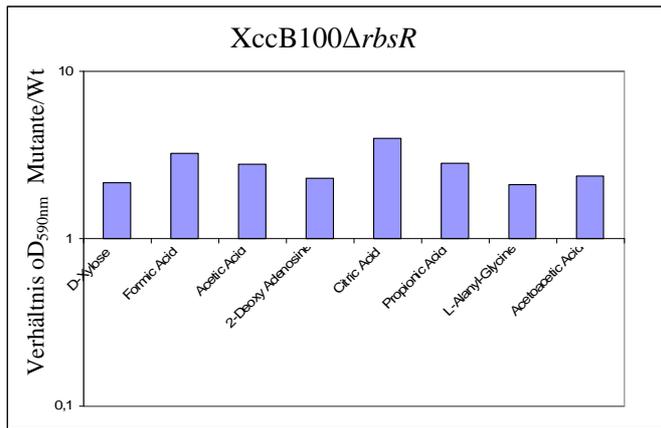


Abb.D.68: **Kohlenstoffverwertung der Mutante XccB100ΔrbsR im Vergleich zum Wildtyp B100.** Dargestellt ist das Verhältnis der erreichten optischen Dichte Abs._{590nm} Mutante gegen Wildtyp in halblogarithmischer Auftragsweise auf Kohlenstoffquellen die die Kriterien >2 oder <0,5 erreicht haben.

Die Mutante XccB100ΔrbsR verwertet die Kohlenstoffquellen D-Xylose, Formic Acid, Acetic Acid, 2-Deoxy Adenosine, Citric Acid, Propionic Acid, L-Alanyl-Glycine und Acetoacetic Acid im Vergleich zum Wildtyp in diesem Assay besser.

Diskussion *E*

E.1 Genomweites Transkriptionsprofil der diskontinuierlichen batch-Bioreaktor-Kultivierung von Xcc

Die Wachstumsparameter der drei unabhängigen biologischen Replikate zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf. Die biologischen Replikate eins und zwei korrelieren aufgrund ihrem fast nahezu identischem Kultivierungsverlauf, bezogen auf die optische Dichte, die Trockenmasse, die Lebendzellzahl, die Xanthanproduktion und die Kultivierungsdauer sehr gut miteinander. Das dritte biologische Replikat weicht etwas von diesem Kultivierungsverlauf bezogen auf die optische Dichte und die Xanthanproduktion ab. So wird beim dritten Replikat im Vergleich zum Mittel der anderen beiden Kultivierungen nur eine optische Dichte von 70% und bei der Xanthanproduktion nur ein Wert von rund 75% erreicht. Verglichen mit in der Literatur publizierten Xanthan-Ausbeuten liegen die Kultivierungen mit einem Mittel von 6,8 g·l⁻¹ und einer Umwandlung von Glukose in Xanthan von 34 % im unteren Bereich untersuchter Kultivierungen (Garcia-Ochoa et al., 2000). Ein Grund dafür können die bereits beschriebenen Probleme mit dem Rührer im Bioreaktor und die damit verbundene mangelnde Aufrechterhaltung der Kultivierungsparameter, wie der Sauerstoff-Konzentration sein. Dies beeinflusst die Wachstumsphasen erheblich, was eine längere Kultivierung in der Stationärphase nicht ermöglichte.

Die Validierung der Microarray-Experimente mittels „Yellow-Experimenten“ und „Virtual Slides“ zur Untersuchung der Konstanz in der Referenzprobe, ergab eine gute Vergleichbarkeit der Hybridisierungen innerhalb eines Replikats. Somit konnte bei der Hybridisierung derselben Zeitpunkte auf einem Array („Yellow-Experiment“) kein Gen als statistisch signifikant differentiell exprimiert detektiert werden.

Der Vergleich der Referenzproben innerhalb eines Replikats auf einem virtuellen Array lag in einem tolerierbaren Bereich (Serrania et al., 2008; Hüser et al., 2003; Rüberg et al., 2003; Loos et al., 2001). Bei der Untersuchung der Referenzen zwischen den drei biologischen Replikaten, konnte festgestellt werden, daß sich die drei Kultivierungen in der

Zusammensetzung des Referenzpools unterscheiden. So konnten beim Vergleich des Referenzkanals t2h aller drei Replikate 218 Gene als statistisch signifikant differentiell exprimiert detektiert werden. Beim Vergleich des Experimentkanals t2h der Replikate 41 Gene als statistisch signifikant differentiell exprimiert detektiert werden. Zusammenfassend läßt sich darlegen, daß die Replikate intraspezifisch eine geringe Varianz aufweisen, während die interspezifische Varianz deutlich durch die virtuellen Hybridisierungen der Referenzen gezeigt werden konnte. Ebenso konnte sich durch die unterschiedlichen statistischen Tests der Auswertung zeigen lassen, daß die Varianz nicht technischer Natur ist, sondern vielmehr eine biologische Varianz in den Experimenten und der Kultivierung vorliegt, die durch die drei unterschiedlichen Kultivierungen bedingt ist.

Durch die „Principial Component Analyse“ (PCA) und das „Hierarchische Clustering“ (HCL) der Experimente konnte gezeigt werden, daß die biologischen Replikate zwei und drei auf transkriptioneller Ebene eine engere Relation zueinander aufweisen, als zum ersten biologischen Replikat. Die Proben der lag- und Stationärphase der beiden Replikate zwei und drei bilden ein Cluster, während die Proben des ersten Replikats ein separates Cluster bilden. Dies ist ein konträres Profil zu dem der Wachstumsparameter, bei dem die Replikate eins und zwei ein ähnliches Verhalten zeigen. Die als statistisch signifikant differentiell exprimierten Gene, die in den Replikaten durch Microarray-Analyse detektiert werden konnten sind für alle drei biologischen Replikate, vornehmlich als reprimiert detektiert. Eine Ausnahme bildet der Zeitpunkt t2h bei dem eine Induktion vor allem der Gene, die ribosomale Proteine kodieren, detektiert werden konnte.

Faßt man die Expressionsprofile der Gene zusammen läßt sich ein „Cell-Cartoon“ als allgemeines Modell mit den für die jeweiligen Gruppen repräsentativen Genexpressionsprofilen erstellen.

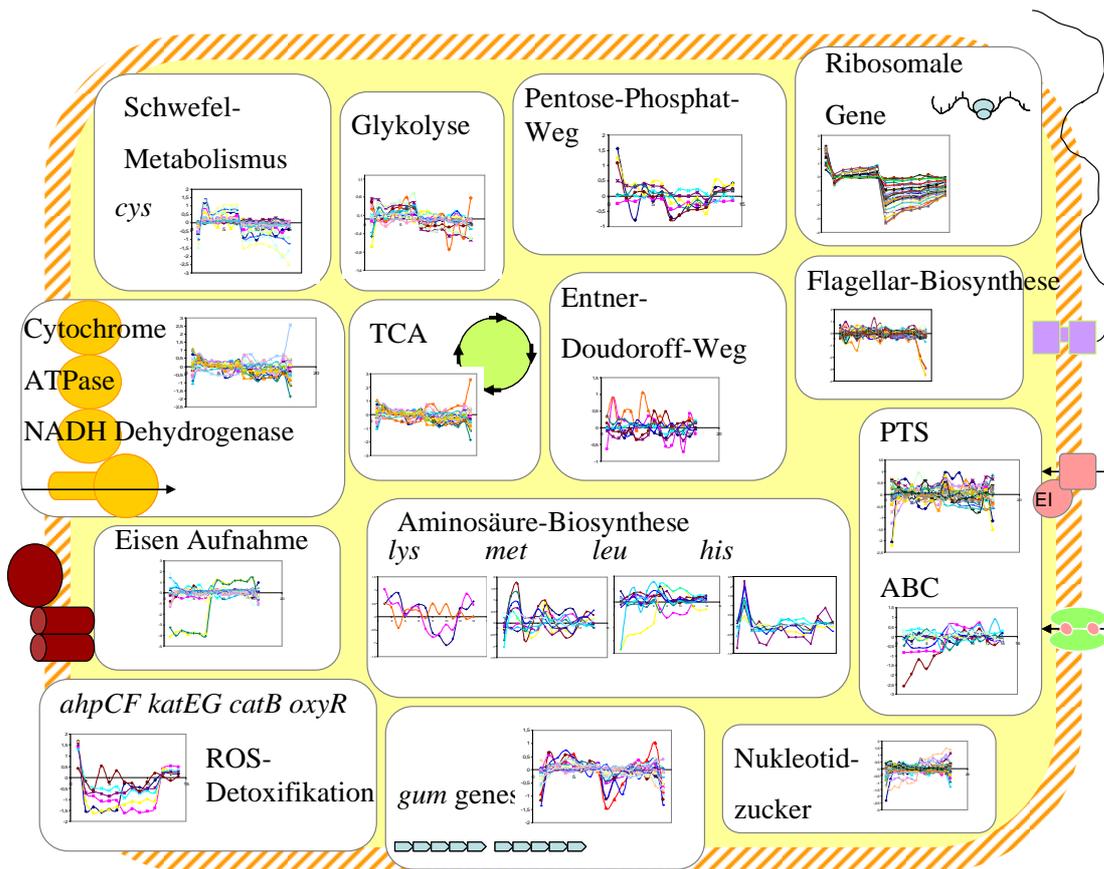


Abb.E.1.: Allgemeines Modell dargestellt als „Cell-Cartoon“ mit den für die jeweiligen Gruppen repräsentativen Genexpressionsprofilen der drei biologischen Replikate. Auffällige Genexpressionsprofile sind exemplarisch für die Gene der ROS-Detoxifikation, *gum*-Gene, Nukleotidzucker-Biosynthese, Aminosäure-Biosynthese, Eisen-Aufnahme, Oxidative Phosphorylierung, Zitronensäurezyklus, ribosomale Gene, Schwefel-Metabolismus, Glykolyse, Entner-Doudoroff-Weg, Pentose-Phosphat-Weg und die Flagellar-Biosynthese gezeigt.

E.1.1 Induktion der Gene für die Sauerstoff-Radikal-Detoxifikation

Die starke Induktion der ROS-Enzyme kodierenden Gene zum Zeitpunkt t2h in allen drei biologischen Kultivierungen und die Reprimierung des Expressionslevels während der Kultivierung, zeigt eine konträre Entwicklung zu einer fed-batch *E. coli* Kultivierung, bei der das Expressionsniveau zu späteren Zeitpunkten der Kultivierung steigt (Yoon et al., 2003). Die Sauerstoff-Radikale aus der spät-exponentiellen Phase des 2L Inokulum, das in den 13L-Bioreaktor überführt wurde könnten zusätzlich zum Start-Sauerstoff-Gehalt von $pO_2=100\%$ einen oxidativen Streß ausgelöst haben. Die Inokulum-Probe zeigt indes keine Induktion der ROS-Detoxifikations Gene, sondern eine starke Reprimierung dieser Gene mit einem M-Wert von maximal -2,3 des Gens *ahpF* in dem dritten biologischen Replikat. Der Ursprung der

Sauerstoff-Radikale in diesen Kultivierungen könnte das Inokulum sein, mit der Produktion der Radikalen in der oxidativen Phosphorylierung oder der Start-Sauerstoff-Gehalt von $pO_2=100\%$. Des weiteren spielt unter Umständen das Referenz-Design des Microarray-Experiments eine Rolle. Der Referenzpool aus den einzelnen Zeitpunkten der Kultivierungen könnte dieses Expressionsprofil erklären. Das relativ hohe Expressionslevel zum Zeitpunkt t_{2h} könnte das Level dieser Gene in der Referenz allgemein anheben, so daß die restlichen Zeitpunkte im Vergleich zur Referenz reprimiert erscheinen, tatsächlich jedoch eine biologisch erklärbare konstitutive Expression der Gene vorherrscht.

E.1.2 Expression der ribosomalen Gene

Die Expression von Genen deren Genprodukte Proteine der Translation (ribosomale Protein Untereinheiten, Elongationsfaktoren und tRNA Synthetasen) sind, zeigt eine Induktion zum Beginn der Kultivierung und eine Reprimierung der Transkription zum Ende der Kultivierungen in der stationären Wachstumsphase (vgl. Ergebnisse 3.13). Die Induktion dieser Gene zu Beginn der Kultivierungen ist durchaus sinnvoll, da die Prozesse in nahezu unbegrenztem Nährstoffangebot zu Beginn der Kultivierungen induziert werden und beim Übergang aus der exponentiellen Wachstumsphase in die stationäre Phase es zu einer Limitierung der Nährstoffangebote kommt und zu einer verlangsamten Wachstumsrate. Das Level der ribosomalen Proteine nimmt üblicherweise mit Übergang in die stationäre Wachstumsphase aufgrund der langsameren Wachstumsraten ab (Yoon et al., 2003). Zudem sind ribosomale Proteine translationale Repressoren ihrer eigenen Biosynthese (Watson et al., 2004). Änderungen in der Wachstumsrate führen schnell zu einer Abnahme der Synthese aller ribosomaler Komponenten. Dabei binden ribosomale Proteine nahe der Translations Initiation Sequenz des ersten Gens eines ribosomalen Operons und verhindern die Anlagerung des Ribosoms und der Translation aller Gene des Operons.

E.1.3 Expression der *gum*-Gene

Interessanterweise wurde eine Reprimierung aller Gene des *gum*-Clusters zum Zeitpunkt t2h detektiert, während es in der lag-Phase zu einer Induktion dieser Gene kommt. In der exponentiellen Phase konnte eine Reprimierung der Gene *gumDHF* detektiert werden.

Der initiale Schritt in der Xanthan Biosynthese ist der stufenweise Aufbau der sich wiederholenden Pentasaccharid-Untereinheiten am Isoprenoid-Carrier-Lipid durch die Glykosyltransferasen kodiert von *gumDMHKI* (Becker et al., 1998). GumD katalysiert dabei den Transfer von UDP-Glucose unter UMP-Abspaltung in Form von Glukose-1-phosphat an dem Polyisoprenol-P-Akzeptor. Die Proteine GumMHI katalysieren die sequentiellen Anlagerungen der weiteren Monosaccharide. Die Dekoration des Heteropolymers erfolgt durch Acetylierung und Pyruvylierung der internen oder auch terminalen Mannose durch Anlagerung von Acetyl- und Pyruvyl-Resten. Diese Schritte werden durch die Genprodukte der Gene *gumFG* katalysiert (Vojnov et al., 2001).

E.1.4 Gene der Aminosäure-Biosynthese und des Schwefelmetabolismus

Die Gene des Schwefelmetabolismus und der Biosynthese der schwefelhaltigen Aminosäuren *cys*, *met* und *his* zeigen eine Reprimierung zum Zeitpunkt t2h, in der lag-Phase eine Induktion und zum Ende der Kultivierung eine Induktion auf ein Expressionlevel um einen M-Wert von Null herum.

Für das Wachstum benötigt jeder Organismus Schwefel, der in der Proteinbiosynthese in die proteinogenen Aminosäuren Cystein und Methionin eingebaut wird. Ebenso spielt Schwefel in Cofaktoren wie Thiamin, Biotin, den Coenzymen A und M oder Liponsäure eine essentielle Rolle. In der Regulation des Organoschwefel-Metabolismus spielt der transkriptionelle Aktivator CysB und weitere nahverwandte Regulatoren der LysR-Familie eine zentrale Rolle (Kertesz et al., 2001).

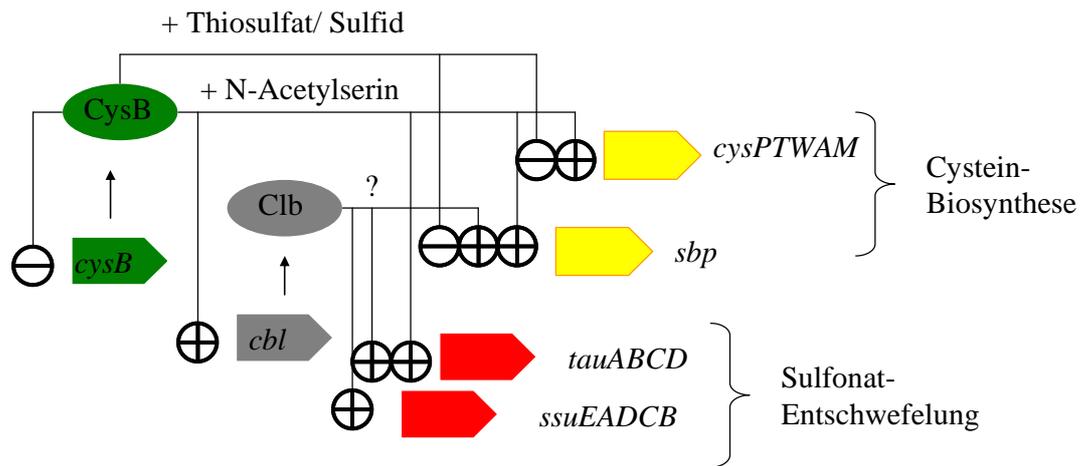


Abb.E.2: **Regulation des Organoschwefel-Metabolismus in *Escherichia coli* (nach Kertesz et al., 2001).** Das Regulatorprotein CysB aktiviert die Transkription der Gene der Cysteinbiosynthese sowie des Regulatorproteins Cbl. Das Cbl-Protein seinerseits agiert als Aktivator der *tau*- und *ssu*-Gene, deren Genprodukte für die Alkansulfonatspaltung zuständig sind.

Das transkriptionelle Aktivatorprotein CysB reguliert in *E.coli* nicht nur die Gene des Cysteinbiosyntheseweges sondern zusammen mit Cbl die Expression der *tau*- und *ssu*-Gene. TauD, eine Taurin-Dehydrogenase desulfoniert Taurin, während Ssu andere Sulfonate desulfoniert. Die Expression von *cbl* wird von CysB kontrolliert.

E.1.6 Regulatorische Netzwerke

Durch alleiniges Erstellen von Genexpressionsprofilen kann keine Regulation der Gene erkannt werden. Dies trifft ebenfalls für die wenig stark exprimierten *gum*-Gene und die Gene der Zentralstoffwechselwege zu. Die Gene der Zentralstoffwechselwege zeigen in ihrer Art als „house-keeping“ Gene eine konstitutive Genexpression mit einem konstanten Expressions-Level, ohne signifikante Änderungen im Expressionsprofil im Verlauf der Kultivierungen. Für die Analyse dieser geringen Änderungen im Expressionsprofil wurde von Kooperationspartnern des Helmholtz Instituts für Infektionsbiologie ein regulatorisches Netzwerk basierend auf „Change trend“ und dem Level der Genexpression zwischen zwei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten konstruiert (Feng He und An-Ping Zeng, 2006).

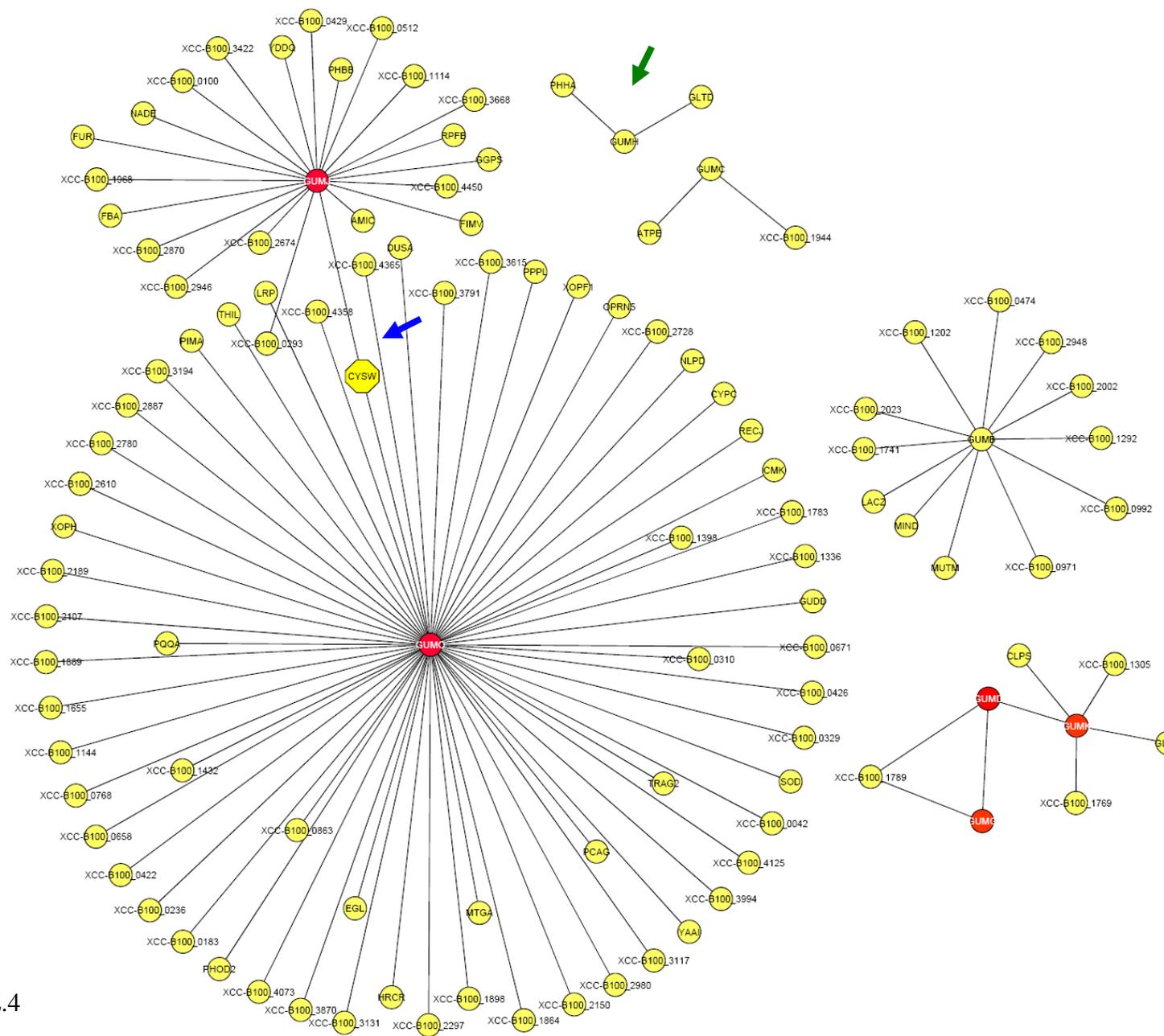


Abb.E.4

Abb.E.4: **Abgeleitetes funktionales Netzwerk der *gum*-Gene.** Die die *gum*-Gene umgebenden Gene könnten eine für die Xanthan-Biosynthese wichtige Rolle spielen. Das Gen *cysW* (blauer Pfeil) verbindet die Gene *gumO* und *gumL*, während die weiteren Gene *phhA* und *gltD* zum Beispiel *gumH* (grüner Pfeil) verbinden.

Die Abbildung des Subnetzwerks aller *gum*-Gene (abb.E.4) zeigt die umgebenden Gene, die eine interessante Rolle in der Xanthan-Biosynthese spielen können. Auffällig ist das Gen *cysW*, da es *gumO* und *gumL* miteinander verbindet. Zudem scheinen die Gene *phhA* und *gltD* und ihre Verbindung zu *gumH* interessant zu sein. Das Gen *cysW* kodiert für ein Transmembran-Protein das einen Sulfate/ Thiosulfat ABC-Transporter darstellt, dessen Regulation in *E. coli* bereits beschrieben ist (Kertesz et al., 2001). Das Gen *phhA* kodiert für eine Phenylalanin-4-Hydroxylase mit einem Eisen-Atom als aktivem Zentrum. Das Gen *gltD* kodiert für eine Glutamat-Dehydrogenase, ein Iron-Sulfur Flavoprotein (FMN).

Die der Analyse zugrunde liegende Betrachtung des „Change trend“ und dem Level der Genexpression zwischen zwei aufeinanderfolgenden Zeitpunkte ermöglicht die Aufstellung von funktionalen Netzwerken und die Aufklärung zusammenhängender temporaler Genexpressionsprofile in einem Zeitreihen-Experiment. Dabei werden zeitversetzte und/ oder umgekehrte Genexpressionsprofile verschiedener Genpaare in Betracht gezogen. Hier sind die ersten Berechnungen aufgestellt und im folgenden ist eine systembiologische Analyse durch die Integration der simultan generierten Metabolit-Daten durch die Kooperationspartner der Abteilung für „Proteome und Metabolome Research“ an der Universität Bielfeld geplant. Die Verlässlichkeit der Netzwerke konnte in ersten Untersuchungen durch das Aufstellen des funktionalen Netzwerks für die Gene der ribosomalen Proteine validiert werden. Durch die Integration der Metabolit-Daten soll die Verlässlichkeit der Netzwerke erhöht und eine globale Analyse auf systembiologischer Basis durchgeführt werden.

E.2 Charakterisierung der generierten Mutanten und Kohlenstoffverwertung des Wildtyps

E.2.1 Wildtyp B100 Kohlenstoffverwertungs Profil

Der Wildtyp *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 wurde auf 95 verschiedenen Kohlenstoffquellen im Hinblick auf die Verwertung dieser Kohlenstoffquellen untersucht. Dabei konnten in diesem Assay Monosaccharide und Disaccharide besonders effizient oxidiert werden. Ebenso einfache Carbonsäuren mit C₄- und C₆-Körpern.

Die Aufnahme und Verwertung von einfachen Kohlenstoffquellen erfordert Aufnahmesysteme und ihre Umwandlung zu Intermediaten des Glukose-Verwertungs-Stoffwechsels. Dies wird durch Enzyme erreicht die eine Isomerisierung oder Phosphorylierung der Zucker zu Intermediaten des Zentralstoffwechsels katalysieren. Komplexere Kohlenstoffe wie Oligosaccharide müssen durch enzymatische Spaltungen der glykosidischen Bindungen in die Monomere zerlegt werden. Solche Enzyme sind typischerweise Hydrolasen, Glykosidasen, Phosphorylasen und Transglycosylasen. Des weiteren findet man im Xcc Genom eine Vielzahl an Cellulasen, Polygalacturonasen und Chitinasen kodierender Gene, die die Spaltung von Polysacchariden pflanzlichen Ursprungs in Monosaccharide und Oligosaccharide katalysieren.

Betrachtet man die Verwertung einzelner Kohlenstoffquellen und vergleicht diese mit der Annotation von möglichen Genen, die Enzyme für die Verwertungs-Stoffwechselwege kodieren, so findet man in der Genomsequenz von *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 in Bezug auf N-Acetyl-D-Glucosamine ein Phosphotransferase-System das ebenso wie Fruktose auch N-Acetyl-D-Glucosamine aufnehmen könnte. Dabei wird N-Acetyl-D-Glucosamine phosphoryliert und durch GlmMU (eine Phosphoglucosamine-Mutase und ein bifunktionales Enzym mit Glucosamine-1-phosphat-N-acetyltransferase und UDP-N-acetylglucosamine Pyrophosphorylase Aktivität) umgewandelt, wonach diese Vorstufen zur Mureinbiosynthese zur Verfügung stehen.

Für Trehalose existiert auf Basis der Genomdaten nur eine partielle Verwertungsmaschinerie. Durch TreA, eine Trehalase, könnte Trehalose im Periplasma zu Glukose hydrolysiert werden. Für den Kohlenstoff Mannose existiert ein Phosphotransferase-System (PTS) durch welches Mannose zu Mannose-1-phosphat oder Mannose-6-phosphat phosphoryliert werden kann. Die kodierenden Gene sind *manX*, *ptsHIN* und *hprK*. Die phosphorylierten Zucker stehen dann

der Nukleotidzuckerbiosynthese oder der weiteren Umwandlung zu Fruktose-6-phosphat zur Verfügung.

Für Fucose läßt sich anhand der Genomsequenz und der bereits annotierten Gene eine Verwertung über Fucone-Lactone durch FucP ableiten. *fucP* kodiert eine L-Fucose Permease.

Der Holzzucker Xylose wird vergleichbar mit dem Zucker Fucose zu dem Xylose-Lacton umgesetzt und durch XylABP zu Xylose-5-phosphat phosphoryliert. Dieser steht dann dem Pentosephosphat-Weg zur Verfügung.

Mannitol kann durch das Phosphotransferase-System Mannose aufgenommen werden.

Der Zucker Maltose kann über zwei verschiedene Wege verwertet werden. Zum einen kann er durch das Sucrose-Phosphotransferase-System aufgenommen und phosphoryliert werden. Die α -Glucosidase AglA1 spaltet den Zucker zu Glukose. Oder zum anderen die Phosphorylierung durch TreS zu Trehalose-6-phosphat und dann zu Glykogen.

Das Disaccharid Melibiose wird im Periplasma durch AglA2, eine Mannose-1-phosphat-Guanylyltransferase, zu Galaktose und Glukose.

D-Glukose-1-phosphat wird vermutlich über einen Glukose Transporter in die Zelle transportiert und kann dann ebenso wie Glukose-6-phosphat verwertet werden.

Maltotriose kann als Trisaccharid in die Monomere gespalten werden und diese dann verwertet werden.

Cellobiose wird analog zu Maltotriose in die Monomere gespalten. Da für diesen Prozeß intrazelluläre Enzyme Cel, Bgl1 und Bgl2 (Cellulase und beta-Glucosidase) existieren, wäre ein Importsystem für diese Kohlenstoffe logisch. Der Transport von Galaktose und Galaktosehaltigen Kohlenhydraten über die äußere Membran wird möglicherweise durch die von *xcc-b100_2511* und *xcc-b100_3045* kodierten TonB-abhängigen Rezeptoren durchgeführt. Die ins Cytoplasma translozierte Galaktose kann zu Pyruvat und D-Glyceraldehyd-3-Phosphat (GAP) abgebaut werden, welches dann in der Glykolyse ebenfalls zu Pyruvat umgesetzt werden kann (Serrania et al., 2008).

Die von Xcc B100 verwertbaren Carbonsäuren könnten durch GarP und GlrA prozessiert werden. Die weiteren Schritte zu Pyruvat, 3P-glyA und die Verwertung erfolgt dann möglicherweise über die Glykolyse.

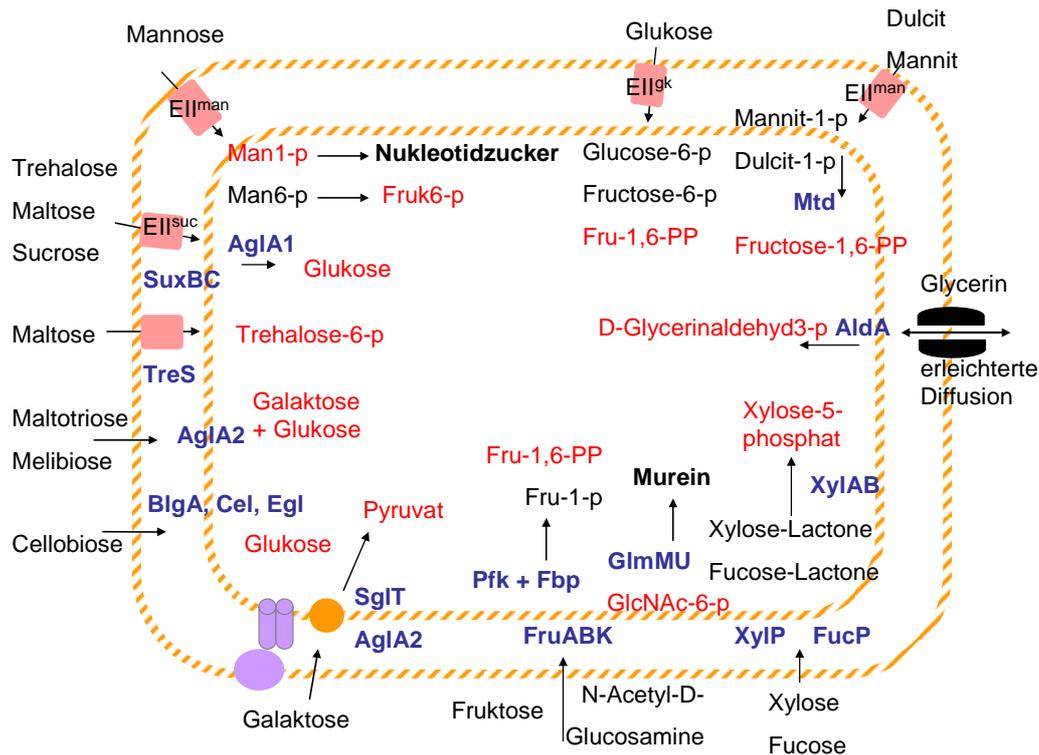


Abb.E.5: Aus dem Kohlenhydrat-Verwertungs-Assay und dem annotierten Genom vorgeschlagenes Modell der Aufnahme und Umwandlung der durch Xcc B100 effizient verwertbaren Kohlenhydrate in Intermediate des Zentralstoffwechsels. Dargestellt sind die möglichen Transporter der Kohlenhydrate, die daran beteiligten Enzyme (blau), weitere mögliche Stoffwechselwege, in die die Intermediate eingeschleust werden könnten (schwarz) und die Intermediate des Zentralstoffwechsels (rot).

Xcc B100 nutzt nur wenige der untersuchten Aminosäuren, wenn sie als alleinige Kohlenstoffquellen in diesem Assay vorliegen. Da intrazelluläre Stoffe nicht importiert werden müssen, wäre das Fehlen von solchen Importsystem für Aminosäuren nicht unwahrscheinlich. Dies trifft auch für die weiteren nicht effizient verwertbaren Kohlenstoffquellen zu.

Verniere et al. (1993) untersuchten 148 Stämme von *Xanthomonas campestris* pv. citri aus 24 Ländern mit dem Biolog Substrat-Verwertungs-Assay. Dabei konnten elf Kohlenhydrate identifiziert werden, die von allen 148 Stämmen verwertet werden konnten. Von diesen elf Kohlenhydraten (Cellobiose, D-Fruktose, α -D-Glucose, Maltose, D-Mannose, Sucrose, Monomethylsuccinate, α -Ketoglutaric acid, Succinic acid, Bromosuccinic acid und Glycyl-L-glutamic acid) kann Xcc B100 alle effizient verwerten. Diese Kohlenhydrate scheinen damit einen Core-Pool an Kohlenhydraten darzustellen, die von allen untersuchten Stämmen

verwertet werden können. Die durch Xcc B100 vorgeschlagenen Verwertungs-Wege sind auf Basis des annotierten Genoms in Abb.E.5 dargestellt.

Betrachtet man die untersuchten Carbonsäuren, konnte eine generell bessere Verwertung von C₄- und C₆-Körpern festgestellt werden. Tang *et al.* (2005) spekulieren, daß C₄-Dicarboxylate als primäre Kohlenstoffquelle über die Gluconeogenese *via* des Malic-Enzyms PpsA Wegs von Xcc *in planta* verwertet werden und die prinzipielle Kohlenstoffquelle während des Infektionsprozesses darstellen. Dies könnte die effizientere Verwertung der C₄-Dicarboxylate in diesem Assay erklären. Analog dazu wurde für *R. meliloti* beschrieben, daß C₄-Dicarboxylate die Energiequelle für das Bakterium in der Leguminosen-Symbiose darstellen (Engelke *et al.*, 1989).

E.2.2 Deletionsmutante XccB100 Δ xcc-b100_4306

Die Mutation befindet sich bei dieser Mutante in einem für einen Regulator der LacI-Familie kodierenden Gen. Upstream des deletierten Gens ist das Gen *xyIA2* lokalisiert, das eine Xylose-Isomerase kodiert. Diese Mutante zeigt in M9-Minimal-Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle mit +111 % die höchste Xanthanbiosynthese im Vergleich zum Wildtyp. *xyIA2* kodiert für eine Xylose-Isomerase, die D-Xylose zu D-Xylulose isomerisiert, deren Phosphorylierung zu Xylose-5-phosphat zu einem Intermediat des Pentosephosphat-Wegs führt. Eine weitere katalysierte Reaktion ist die Umwandlung von D-Glucose zu D-Fructose:

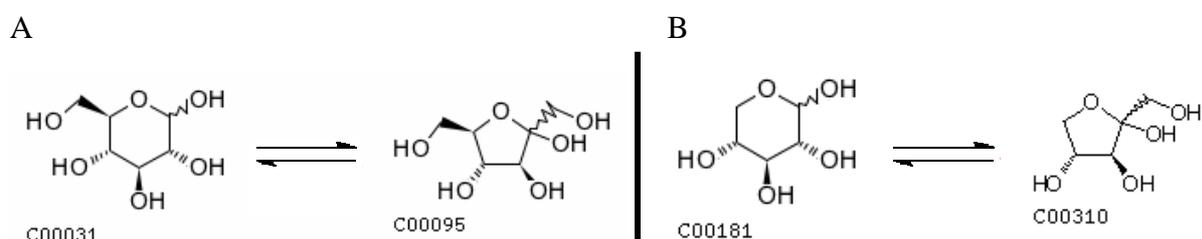


Abb.E.6: (A) Isomerisierung von D-Glucose (C00031) zu D-Fructose (C00095) (<http://www.genome.ad.jp/fig/reaction/R00307.gif>) und (B) die Isomerisierung von D-Xylose (C00181) zu D-Xylulose (C00310) (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?rn+R01432) katalysiert durch das Enzym XylA1.

Die Induktion von Genen, die Cellulasen und Xyloglucan-Hydrolasen kodieren, im Xylose-haltigen Medium in der exponentiellen Wachstumsphase im Vergleich zum Wildtyp korreliert mit der Induktion von Polygalacturonasen kodierenden Genen in der exponentiellen Wachstumsphase in Glukose-Medium. In der stationären Phase kommt es zu einer Reprimierung der Exocellulasen kodierenden Gene. Das in Xylose-Medium induzierte Gen *engXCA* kodiert für die Cellulase mit „Major-Aktivität“ in Xcc 8004/ FC2 dar (Schröter et al., 2001). Korrelierend dazu konnte die Induktion von zwei *hrp* Genen in der exponentiellen Wachstumsphase in Glukose-Medium detektiert werden.

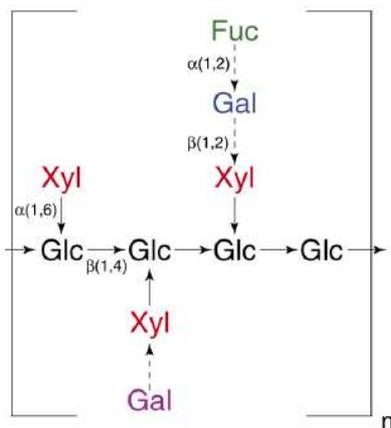


Abb.E.7: Die Strukturformel des *Arabidopsis*-Xyloglucan mit der Cellulose Hauptkette und den verknüpften Monosacchariden (Lerouxel et al., 2006). Fuc, fucose; Gal, galactose; Glc, glucose; Xyl, xylose.

Xylose kann gebunden an Xyloglucan als Bestandteil der pflanzlichen Zellwand angesehen werden. Xyloglucan ist ein Heteropolysaccharid bestehend aus einer Hauptkette aus 1,4-glykosidisch verknüpfter β -D-Glucose, an die sich in 0-6 Stellung α -D-Xylose Reste heften. Zusätzlich können noch weitere Zucker wie β -D-Galactose oder α -L-Fucose mit den Xylose-Resten verknüpft sein. Man findet Xyloglucan in der Primärwand von Pflanzenzellen zusammen mit Cellulose und Pektin zum Beispiel in den Samen von Bohnen oder auch Raps. Nach Cellulose ist das Xyloglucan das zweithäufigste Kohlenhydrat in der Natur. Als Hemicellulose hat es in der Pflanze neben Stütz- auch Reservefunktion (Lerouxel et al., 2006). Bei Stickstoff-fixierenden Bakterien ist es in den Membranen der Heterocysten zu finden (Schlegel, 1981).

Zudem konnte die Induktion von *cheB4* in der exponentiellen Phase in Xylose-Medium und die Induktion in Glukose-Medium in der stationären Phase detektiert werden. CheB ist eine Protein-Glutamat Methylsterase und in der Zwei-Komponenten Signal-Transduktion der bakteriellen Chemotaxis und der Motilität von *Xanthomonas* involviert.

Sekretions-System führt. Die Regulation ist nur bislang nur schlecht verstanden. Die Induktion von *cheB* könnte im Zwei-Komponenten-Signal-Transduktions-System zu einer Regulation der Exoenzym- und Exopolysaccharid-Biosynthese führen, die der deletierte Regulator im Wildtyp negativ reguliert.

Die meisten Mutanten mit hoher Xanthan-Biosynthese verglichen zum Wildtyp zeigen eine Induktion der Gene kodierend für extrazelluläre Enzyme. Für die Mutante XccB100Δ*xcc-b100_4306* konnte mit +111% eine Verdopplung der Xanthan-Biosynthese gemessen werden. Zusätzlich konnte die Induktion von *cheB* detektiert werden, was möglicherweise im Regulations-Netzwerk von Xcc eine Verbindung zwischen der Produktion von extrazellulären Enzymen und dem EPS durch Cell-to-Cell Kommunikation darstellt.

E.2.3 Deletionsmutante XccB100::pK19Ω*xcc-b100_2513*

Das deletierte Gen kodiert einen Regulator der LysR-Familie und ist downstream der Galaktose-Verwertungsregion 2 lokalisiert (Serrania et al., 2008). Die Mutante zeigt bei der Bereitstellung von zwei Galaktose-haltigen Kohlenstoffquellen, zum einen D-Galaktose und zum anderen Lactulose, im Vergleich zum Wildtyp eine schlechtere Verwertung dieser beiden Zucker. Die *gal*-Gene in *E. coli* werden nur exprimiert, wenn Galaktose im Medium präsent ist und Glucose abwesend ist. Zwei Signale werden in *E. coli* durch zwei Regulatoren auf das Genlevel kommuniziert- ein Repressor kodiert von *galR* und ein Aktivator, das Catabolite Activator Protein CAP.

Die Deletion des Gens in Xcc, welches für einen LysR-Regulator kodiert, resultiert in einer mangelnden Verwertung von Galaktose im Vergleich zum Wildtyp. Lokalisiert ist das kodierende Gen unmittelbar downstream der in Xcc B100 beschriebenen Galaktose-Verwertungsregion 2 (Serrania et al., 2008). Dieses Gen konnte aufgrund von Sequenz-Vergleichen als ähnlich zu *gbrR* von *Agrobacterium tumefaciens* identifiziert werden, welches in diesem Organismus in Abwesenheit von Galactose als transkriptioneller Repressor fungiert und in Anwesenheit von Galactose als Aktivator (Doty et al., 1993).

Der Transport von Galaktose und Galaktose-haltigen Kohlenhydraten über die Äußere Membran wird möglicherweise durch die von *xcc-b100_2511* und *xcc-b100_3045* kodierten TonB-abhängigen Rezeptoren durchgeführt. Die ins Cytoplasma translozierte Galaktose kann

zu Pyruvat und D-Glyceraldehyd-3-Phosphat (GAP) abgebaut werden, welches dann in der Glykolyse ebenfalls zu Pyruvat umgesetzt werden kann (Serrania *et al.*, 2008).

Somit läßt sich darauf schließen, daß der Regulator in Anwesenheit von Galaktose und dem Galaktose-haltigen Disaccharid Lactulose die Verwertung dieser Zucker in Xcc B100 positiv reguliert. Ohne den Regulator kann Xcc B100 die Galaktose Kohlenhydrate nicht mehr effizient verwerten. Da in Bakterien die LysR-Familie die am weitesten verbreitete Familie an positiven Regulatoren mit Coinducer abhängigen Aktivatoren ist (Schell, 1993), wäre es vorstellbar, daß Galaktose als Coinducer des LysR-Regulators dienen könnte, und somit die Transkription der Gene positiv reguliert.

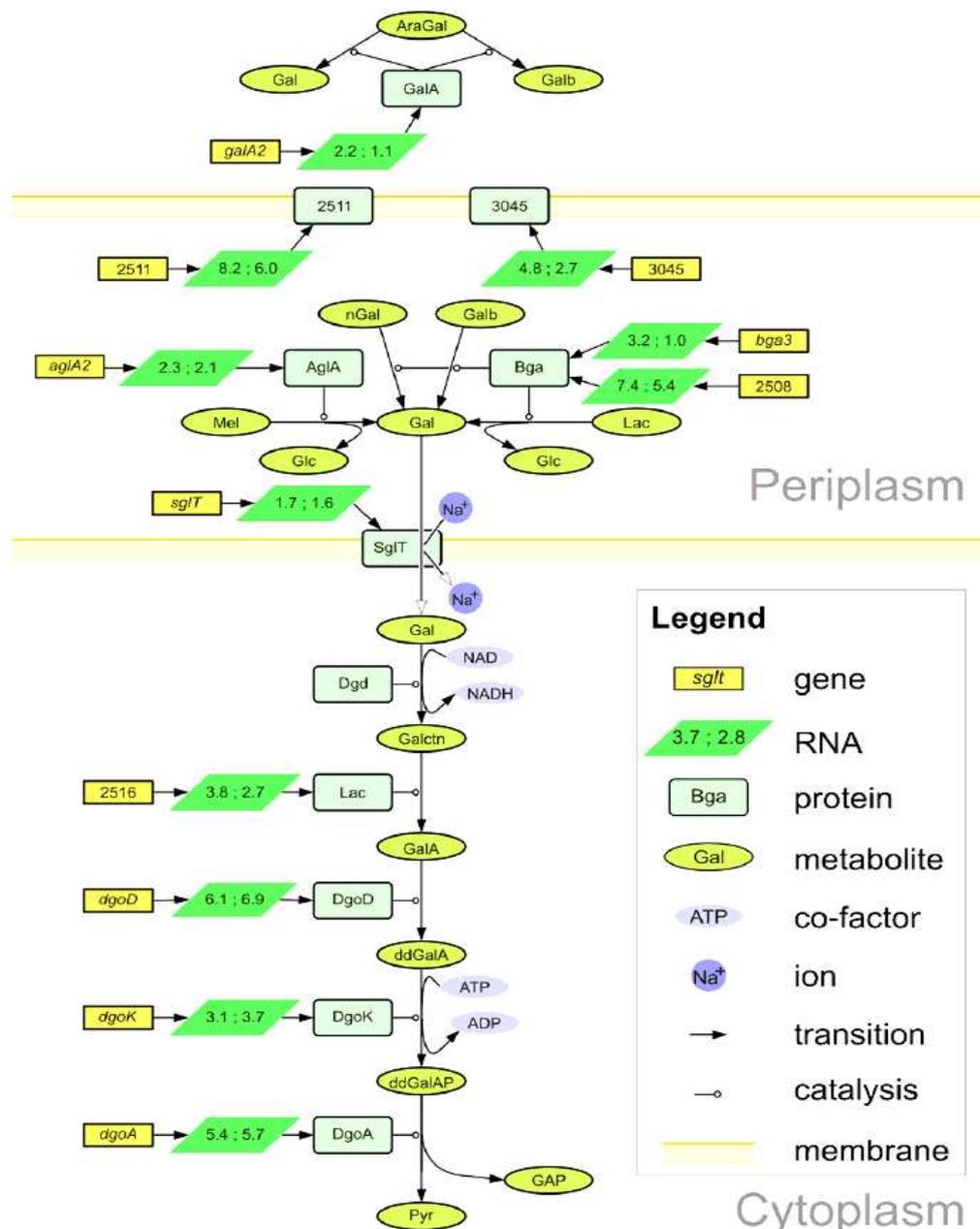


Abb.E.9

Abb.E.9: **Modell der Galactoseverwertung in Xcc B100 (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. Der Transport durch die innere Membran wird möglicherweise durch das Membranprotein des Gens *sglT* katalysiert. 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.2.4 Mutante XccB100::pK19 Ω *rpoN1* und Mutante XccB100 Δ *rpoN2*

Die beiden im Xcc B100 Genom annotierten Gene die die Sigma54-Faktoren RpoN1 und RpoN2 kodieren wurden im Wildtyp deletiert. Das Gen *rpoN1* ist downstream einer Kohlenhydrataufnahme Region lokalisiert, während das Gen *rpoN2* downstream einiger Flagellar-Biosynthese Gene lokalisiert ist.

Seit ungefähr 25 Jahren wird eine enge Verbindung zwischen der Stickstoff- und Kohlenhydrataufnahme diskutiert (Tchieu et al., 2001). In *R. meliloti* ist die *rpoN* Mutante nicht mehr in der Lage C₄-Dicarboxylate zu transportieren (Engelke et al., 1989). Daher wurden die Auswirkungen der Deletion dieser beiden Gene in Xcc untersucht. Die Microarray-Analyse der Mutante XccB100 Δ *rpoN2* in Glukose-Minimalmedium in der exponentiellen Phase führte zu der Detektion einer Reprimierung der Gene *celA* und *pglA*. Zudem sind mehrere Gene des Typ-IV-Sekretionsystems als induziert detektiert. In der stationären Phase konnten einige Gene deren Genprodukte in der Aminosäure-Biosynthese eine Rolle spielen, als reprimiert detektiert werden (*cysD*, *ilvC*, *metY*).

Tab.E.1: **Liste der statistisch differentiell exprimierten Gene, die Proteine des Typ-IV-Sekretionssystems kodieren.** Detektiert in der exponentiellen Wachstumsphase der Mutante XccB100 Δ *rpoN2* im Vergleich zum Wildtyp in M9- Minimalmedium.

| GenDB-ID | Genname | Genprodukt | M-Wert |
|---------------|---------|--------------------------------|--------|
| xcc-b100_1677 | - | Conserved hypothetical protein | 1,39 |

| GenDB-ID | Gename | Genprodukt | M-Wert |
|---------------|--------------|--|--------|
| xcc-b100_1679 | <i>trbG</i> | Conjugal transfer protein TrbG precursor | 1,14 |
| xcc-b100_1681 | - | VirB11 protein | 1,17 |
| xcc-b100_1682 | <i>virB1</i> | Type IV secretion system protein VirB1 | 1,08 |
| xcc-b100_1683 | - | VirB2 protein | 1,06 |
| xcc-b100_1691 | - | VirB4 protein | 1,1 |

Das Gen *rpoN2* ist downstream einiger Gene der Flagellar-Biosynthese lokalisiert und die Deletion dieses Gens resultiert in einer mangelnden Motilität verglichen mit dem Wildtyp. Das Gen *rpoN1* ist downstream der PTS Mannose Systems kodierenden Gene lokalisiert. Kamoun und Kado (1990) untersuchten neun *Xanthomonas* Stämme auf die Fähigkeit der Chemotaxis gegenüber Sucrose oder Hefeextrakt auf „swarm plates“. Dabei stellten sie fest daß der Wildtyp in den ersten Tagen des Assays einen nicht motilen, nicht chemotaktischen Phänotyp ausbildet. Nach einigen Tagen bildeten sich Blasen um die Kolonie herum, welche als motile und chemotaktische Varianten der Population identifiziert werden konnten. Diese waren zudem Exopolysaccharid defizient was den Zusammenhang zwischen Chemotaxis und EPS-Defizienz zeigt. Die Mutante *XccB100ΔrpoN2* zeigt in dem in dieser Arbeit durchgeführten Swimming-Assay ebenfalls die chemotaktischen Blasen um die Kolonie herum.

Somit läßt sich vermuten, daß für eine vollständige Motilität in *Xcc* beide Kopien des alternativen Sigmafaktors RpoN notwendig sind. In *Xanthomonas campestris* konnte gezeigt werden, daß RpoN2 essentiell für die Flagellar-Biosynthese ist, indem die Expression von FliA einem zweiten alternativen Sigmafaktor beeinflusst wird, der essentiell für die Expression von *fliC* ist (Yang, Tsey-Chiung et al., 2009). Da die Doppelmutante einen kompletten Rückgang der Verwertung der Kohlenhydrate zeigt, scheinen die RpoN-Proteine neben der Chemotaxis auch eine wichtige Rolle im Kohlenhydrat-Metabolismus zu spielen.

E.2.5 Deletionsmutante *XccB100Δxcc-b100_0167*

Die Mutante *XccB100Δxcc-b100_0167* trägt eine Deletion in der Kodierregion in einem für einen Regulator der LacI-Familie kodierenden Gen, welches durch „gene-SOEing“ deletiert wurde. Upstream ist das Gen *xyIB3* lokalisiert, welches eine Xylose-Isomerase kodiert und

zudem die Gene des Dicarboxylat-Aufnahme-Systems. In der exponentiellen Phase konnte in Glukose-haltigem Minimalmedium eine Induktion der Gene *chlE*, *dctP* und *xcc-b100_0159* detektiert werden, die für das Dicarboxylat-Aufnahme-System kodieren. Zudem sind einige Gene des Hrp-Sekretionssystems induziert. Bei der Verwertung der Kohlenhydrate zeigt die Mutante eine bessere Verwertung der Monocarbonsäuren Formic acid, Acetic acid und Propionic acid. Der Regulator kodiert von *xcc-b100_0167* könnte ein Repressor des Dicarboxylat-Aufnahme-Systems oder der Xylose-Verwertung sein. Beide Systeme sind zusammen mit der Induktion der *hrp*-Gene für die Bakterien-Pflanzen-Interaktion interessant, da die C₄-Dicarboxylate wahrscheinlich die primäre Energiequelle für die Bakterien in der Pathogenese darstellen und Xylose ein Bestandteil des Xyloglucans der pflanzlichen Zellwand ist.

E.2.6 Deletionsmutante XccB100Δ*xcc-b100_1703*

Das deletierte Gen mit der GenDB-Identifikations-Nummer *xcc-b100_1703* kodiert für einen Regulator der LacI-Familie. Upstream des deletierten Gens sind einige im Kohlenhydrat-Metabolismus involvierte Gene lokalisiert, während downstream ribosomale Gene liegen. Upstream liegt das Gen *suc*, welches einen Sucrose/Maltose Symporter kodiert. Die schlechtere Verwertung des Zuckers Maltose im Vergleich zum Wildtyp, läßt darauf schließen, daß der Regulator die Verwertung des Zuckers Maltose reguliert. Das ebenfalls upstream lokalisierte Gen *cgt* kodiert eine exportierte Cyclomaltodextrin Glucanotransferase, welche zu der Familie der Glykosyltransferasen zählt und ebenfalls bei der Verwertung von Maltose eine Rolle spielt.

E.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte in drei biologischen Replikaten ein globales Transkriptionsprofil von *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 unter Industrie-ähnlichen Produktionsbedingungen erstellt werden. Dabei wurden Daten generiert, die weiterer bioinformatischer Auswertung zur Verfügung stehen. So können durch einen „Reverse Engineering“ Ansatz regulatorische Netzwerke der Genregulation aufgestellt werden, dies es

in Zukunft ermöglichen können, die Regulation nicht nur der Xanthan-Biosynthese unter den dem Produktionsverfahren ähnlichen Bedingungen aufzuklären. Des Weiteren wurde in Kooperation mit der an der Universität Bielefeld ansässigen Abteilung für „Proteome und Metabolome Research“ unter Leitung von Prof. Dr. Karsten Niehaus ein systembiologischer Ansatz verfolgt, in dem Metabolom-Daten dieser Kultivierungen aufgenommen wurden, die mit den Transkriptom-Daten verknüpft werden und in die regulatorischen Netzwerke einberechnet werden können. Nach Auswertung der Ergebnisse des „Reverse Engineering“-Ansatzes und der Erstellung von regulatorischen Netzwerken ist das Ziel die Aufklärung der Genexpression in den durchgeführten Zeitreihen-Experimenten und die Aufklärung regulatorischer Vorgänge in *Xcc*.

Weiterhin wurden Gene, die potentielle Regulatoren des Kohlenhydratmetabolismus kodieren, mutagenisiert. Diese Mutanten zeigten zum größten Teil eine Erhöhung der Xanthan-Ausbeute im Vergleich zum Wildtyp. Im folgenden wäre die Validierung der Microarray-Ergebnisse mit qualitativer Reverser Transcriptase-PCR (qRT-PCR) zur Bestimmung der RNA-Mengen erforderlich. Ein Pathogenitätstest mit *Brassica oleracea* (Kohlpflanzen) könnte bei der allgemeinen Induktion der Exoenzyme kodierenden Gene interessant sein. Die Mutante mit der höchsten Xanthan-Ausbeute im Vergleich zum Wildtyp böte sich für eine Kultivierung in einem Bioreaktor unter Industrie-ähnlichen Produktionsbedingungen an, um den Effekt der erhöhten Xanthan-Produktion zu validieren.

Abkürzungsverzeichnis *F*

| Abkürzung | Bedeutung |
|--------------------|---|
| % | Prozent |
| % (v/v) | Volumenprozent |
| % (w/v) | Gewichtsprozent |
| °C | Grad Celsius |
| μl | Mikroliter (10^{-6}) |
| μg | Mikrogramm |
| μM | Mikromolar |
| aa | Aminoallyl |
| Abb. | Abbildung |
| Abs. | Absorption |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BpB | Bromphenolblau |
| BSA | bovine serum albumine |
| bzw. | Beziehungsweise |
| ca. | Circa |
| CCD- Kamera | Charge- Coupled- Device- Kamera |
| Da (kDa) | Dalton (Kilodalton) |
| d.h. | das heißt |
| dH ₂ O | deionisiertes Wasser |
| diH ₂ O | zweifach hydratisiertes Wasser |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DSF | <i>cis</i> -11-methyl-2-dodecenoic acid |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EPS | Exopolysaccharid |
| et al. | et alii (lat.) und andere |
| EtOH | Ethanol |

| Abkürzung | Bedeutung |
|-------------------------|--|
| g | Gramm |
| Glc | Glucose |
| Glc 1-P | Glucose-1-phosphat |
| Glc 6-P | Glucose-6-phosphat |
| GlcA | Glucuronsäure |
| GMP | Guanosinmonophosphat |
| h | Stunden |
| IEP | isoelektrischer Punkt |
| IPTG | Isopropylthiogalactosid |
| K | Tausend |
| k | Kilo |
| l | Liter |
| log-Phase | Exponentielle Phase |
| Km | Kanamycin |
| mg | Milligramm (10^{-3}) |
| ml | Milliliter |
| M | Mol, molar |
| MCS | Multiple Cloning Site, Polylinker |
| MilliQ H ₂ O | mehrfach deionisiertes Wasser |
| min. | Minuten |
| MOPS | Morpholinopropionsäure |
| nm | Nanometer |
| MW | Molekulargewicht |
| Nr. | Nummer |
| nt | Nukleotid |
| o.D. | optische Dichte |
| ORF | Open reading frame, offenes Leseraster |
| PCR | Polymerasenkettenreaktion |
| pv. | pathovar |
| RBS | Ribosomenbindungstelle |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAse | Ribonuklease |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| sek. | Sekunden |
| Sm | Streptomycin |

| Abkürzung | Bedeutung |
|------------------|--|
| sog. | Sogenannt |
| Tab. | Tabelle |
| TBDR | TonB-dependent receptor |
| TEMED | Tetra-Methyl-Ethylen-Diamin |
| TY | Trypton-Yeast |
| ü.N. | über Nacht |
| UV- Licht | Ultraviolettes Licht |
| V | Volt |
| W | Watt |
| Xac | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri |
| Xcv | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. campestris |
| Xoo | <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. oryzae |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indoyl- β -D-galactosid |
| X-Gluc | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure |
| z.B. | Zum Beispiel |

Literaturverzeichnis **G**

Alvarez, Benedict, Mizumoto, Hunter and Gabriel (1994)
“Serological, Pathological and Genetic Diversity Among Strains of *Xanthomonas campestris* infecting Crucifers”

Molecular Plant Pathology, **84**(12)

Bagg, Anne and J. B. Neilands (1987)

Biochemistry, **26** (17): 5471-5477

Barreras M, Abdian PL und Ielpi L (2004)

“Functional characterization of GumK, a membrane-associated beta-glucuronosyltransferase from *Xanthomonas campestris* required for xanthan polysaccharide synthesis”

Glycobiology, **14**(3): 233-41

Becker, A., Katzen, F., Pühler, A. und Ielpi, L. (1998)

“Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective”

Appl Microbiol Biotechnol, **50**: 145-152

Becker, A. and F.J. Bruijn (2003)

“Transcriptomics in *Sinorhizobium meliloti*”

R. Palacios and W.E. Newton (eds.) Nitrogen Fixation: 1888-2001 Volume VI: Genomes and Genomics of Nitrogen-fixing Organisms. 2003 Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Becker, Anke (2004)

“Design of microarrays for genome-wide expression profiling”

Kowalchuk GA, de Bruijn FJ, Head IM, Akkermans ADL, van Elsas JD (eds.).

Molecular Microbial Ecology Manual 2nd edition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Blanvillain, Servane, Damien Meyer, Alice Boulanger, Martine Lautier, Catherine Guynet, Nicolas Denance, Jacques Vasse1, Emmanuelle Lauber, Matthieu Arlat (2007)

“Plant Carbohydrate Scavenging through TonBDependent Receptors: A Feature Shared by Phytopathogenic and Aquatic Bacteria”

PLoS ONE, **2**(2): e224. doi:10.1371/journal.pone.0000224

Brandford PA and Baird J (1983)

“Industrial utilization of polysaccharide”

The polysaccharides, **Vol 2**: 411-490

- Bretschneider, Karin E. , Michael P. Gonella and David J . Robeson (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
- Büttner, Daniela and Ulla Bonas (2002)
“Getting Across - the bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell”
The EMBO Journal, **21**(20): 5313-5322
- Capage MA, Doherty DH, Betlach MR and Vanderslice RW (1987)
“Recombinant-DNA mediated production of xanthan gum”
International patent WO87/05938
- Caroff und Karibian (2003)
“Structure of bacterial lipopolysaccharides”
Carbohydrate Research, **338**(23): 2431-2447
- Chan JW and Goodwin PH. (1999)
“The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*”
Biotechnol Adv., **17**(6): 489-508
- Chatterjee, Subhadeep, Rodrigo P. P. Almeida and Steven Lindow (2008)
“Living in two Worlds: The Plant and Insect Lifestyles of *Xylella fastidiosa*”
Annu. Rev. Phytopathol., **46**: 243–71
- Chou FL, Chou HC, Lin YS, Yang BY, Lin NT, Weng SF, Tseng YH (1997)
“The *Xanthomonas campestris* gumD gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot”
Biochem Biophys Res Commun., **233**(1): 265-269
- Cook, A.A., Walker, J.C., Larson, R.H. (1952)
“Studies on the disease cycle of black rot of crucifers”
Phytopathology, **42**: 162-167
- Coplin D.L. and Cook D. (1990)
“Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria”
Mol Plant-Microbe Interact, **3**: 271-279
- Costerton,J., Cheng, K.-J., Geesey, G., Ladd, T., Nickel,J., Dasgupta,M. and Marrie, T. (1987)
“Bacterial Biofilms In Nature and Disease”,
Ann. Rev. Microbiol., **41**: 435-464
- Daniels, M.J. (1992)
“Interaction of *Xanthomonas* with crucifers”
Neth. J. PI. Path., **98**(2): 147-155

- 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
- Demple B. (1991)
 „ Regulation of bacterial oxidative stress genes”
Annu Rev Genet., **25**: 315-337
- Dondrup, Michael , Alexander Goesmann, Daniela Bartels , Jörn Kalinowski , Lutz Krause , Burkhard Linke , Oliver Rupp, Alexander Sczyrba , Alfred Pühler , Folker Meyer (2003)
 “EMMA: a platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data“
Journal of Biotechnology, **106** :135–146
- Dondrup, M., S.P. Albaum, T. Griebel, K. Henckel, S. Jünemann, T. Kahlke, C.K. Kleindt, H. Küster, B. Linke, D. Mertens, V. Mittard Runte, H. Neuweger, K.J. Runte, A. Tauch, F. Tille, A. Pühler, A. Goesmann (2009)
 “EMMA 2 - A MAGE-compliant system for the collaborative analysis and integration of microarray data”
BMC Bioinformatics, **10**(1): 50
- Dow JM, Crossman L, Findlay K, He YQ, Feng JX, Tang JL. (2003)
 “Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants”
Proc Natl Acad Sci U S A, **100**(19): 10995-11000
- 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
- Engelke, Thomas, Doris Jording, Dieter Kapp and Alfred Pühler (1989)
 “Identification and Sequence Analysis of the *Rhizobium meliloti* dctA Gene Encoding the C4-Dicarboxylate Carrier”
Journal Of Bacteriology, **171** (10): 5551-5560
- Feng He und An-Ping Zeng (2006)
 “In search of the functional association from time-series microarray data based on the change trend and level of gene expression”
BMC Bioinformatics, **7**: 69

- Ferguson, A.D. and J. Deisenhofer (2002)
“TonB-dependent receptors - structural perspectives”
Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes, **1565** (2): 318-332
- Fraenkel, D.G. and R. T. Vinopal (1973)
„Carbohydrate Metabolism in Bacteria“
Annu. Rev. Microbiol., **27**:69-100
- Galiotou-Panayotou, Maria, Ourania Kalantzi and George Aggelis (1989)
“Modelling of simultaneous production of polygalacturonase and exopolysaccharide by *Aureobasidium pullulans* ATHUM 2915”
Antonie van Leeuwenhoek, **73**: 155–162
- Galperin, Michael Y. (2006)
“Structural Classification of Bacterial Response Regulators: Diversity of Output Domains and Domain Combinations”
Journal of Bacteriology, **188**(12): 4169-4182
- Garcia-Ochoa, V.E. Santosa, J.A. Casas and E. Gomez (2000)
“Xanthan gum: production, recovery, and properties”
Biotechnology Advances, **18**: 549-579
- Harding NE, Ra.o S, Raimondi A, Cleary JM and Ielpi L (1993)
“Identification, genetic and biochemical analysis of genes involved in synthesis of sugar nucleotide precursors of xanthan gum”
J Gen Microbiol ,**139**: 447-457
- He YW, Zhang LH (2008)
“Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*”
FEMS Microbiol Rev., **32**(5):842-57
- Hendrickson, E. L., Pablo Guevera, Alejandro Penaloza-Vazquez, Jing Shao, Carol Bender and Frederick M. Ausubel (2000)
“Virulence of the Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola* Is *rpoN* Dependent”
Journal of Bacteriology, **182** (12): 3498–3507
- Holzwarth G, Prestridge EB. (1977)
„ Multistranded helix in xanthan polysaccharide”
Science, **197**(4305): 757-759
- Horton, Robert M., Henry D. Hunt, Steffan N. Ho, Jeffrey K. Pullen and Larry R. Pease (1989)
“Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension”
Gene, **77** :61-68
- 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

- Hueck, C. J. (2004)
“Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants”
Microbiology and Molecular Biology Reviews, **62**(2): 379- 433
- Hugouvieux, Véronique, Christine E. Barber, and Michael J. Daniels (1998)
“Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into *Hydathodes* of *Arabidopsis thaliana* Leaves: A System for Studying Early Infection Events in Bacterial Pathogenesis”
MPMI, **11** (6): 537–543
- Hüser, Andrea T., Anke Becker, Iris Brune, Michael Dondrup, Jörn Kalinowski, Jens Plassmeier, Alfred Pühler, Iris Wiegräbe and Andreas Tauch (2003)
„Development of a *Corynebacterium glutamicum* DNA microarray and validation by genome-wide expression profiling during growth with propionate as carbon source”
Journal of Biotechnology, **106** :269–286
- Iannelli, F. und Pozzi, G. (2004)
“Method for introducing specific and unmarked mutations into the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*”
Molecular Biotechnology, **26**: 81-86
- Ielpi L, Couso RO, Dankert MA (1993)
“Sequential assembly and polymerization of the polyprenol linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*”
J Bacteriol ,**175**: 2490-2500
- Jacob und Monod (1961)
“Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins”
J Mol Biol., **3**: 318-356
- Jana, Asim K. and Purnendu Ghosh (1999)
“Effect of citric acid on the biosynthesis and composition of xanthan”
J. Gen. Appl. Microbiol., **45**: 115–120
- Jansson, Lennart Kenne and Bengt Lindberg (1975)
"Structure Of The Extracellular Polysaccharide From *Xanthomonas campestris*"
Carbohydrate Research, **45** :275-282
- Kamoun, S. and Clarence I. Kado (1990)
“Phenotypic Switching Affecting Chemotaxis, Xanthan Production and Virulence in *Xanthomonas campestris*”
Applied And Environmental Microbiology, **56** (12): 3855-3860
- Katzen, F., Anke Becker, Angeles Zorreguieta, Alfred Pühler and Luis Ielpi (1996)
“Promoter Analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* *gum* Operon Directing Biosynthesis of the Xanthan Polysaccharide”
Journal Of Bacteriology, **178**(14): 4313–4318

- Katzen F, Ferreiro DU, Oddo CG, Ielmini MV, 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., A. Becker, M. Veronica Ielmini, C.G. Oddo and Luis Ielpi (1999)
“New Mobilizable Vectors Suitable for Gene Replacement in Gram-Negative Bacteria and Their Use in Mapping of the 39 End of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum Operon“
Applied and Environmental Microbiology, 65(1): 278-282
- Kertesz and Kahnert (2001)
“Organoschwefel-Metabolismus in Gram-negativen Bakterien”
Biospektrum , 4/01(7): 325-329
- Köplin, R., W. Arnold, B. Hotte, R. Simon, Ge Wang and A. Pühler (1992)
“Genetics of Xanthan Production in *Xanthomonas campestris*: the xanA and xanB Genes Are Involved in UDP-Glucose and GDP-Mannose Biosynthesis“
Journal Of Bacteriology, **174**(1): 191-199
- Kummerfeld SK, Teichmann SA. (2006)
“DBD: a transcription factor prediction database”
Nucleic Acids Res., **34**(Database issue):D74-81
- Lee BM, Park YJ, Park DS, Kang HW, Kim JG, Song ES, Park IC, Yoon UH, Hahn JH, Koo BS, Lee GB, Kim H, Park HS, Yoon KO, Kim JH, Jung CH, Koh NH, Seo JS, Go SJ. (2005)
“The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice”
Nucleic Acids Res., **33**(2): 577-586
- Leigh JA, Coplin DL. (1992)
„ Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions”
Annu Rev Microbiol., **46**: 307-46
- Lerouxel, O., David M Cavalier, Aaron H Liepman, and Kenneth Keegstra (2006)
"Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process”
Current Opinion in Plant Biology, **9**: 621–630
- Lewin, “Genes VIII”, Pearson Prentice Hall/ London (2004)
- Loprasert, Suwit, Paiboon Vattanaviboon , Wipa Praituan, Sangpen Chamnongpol and Skorn Mongkolsuk (1996)
“Regulation of the oxidative stress protective enzymes, catalase and superoxide dismutase in *Xanthomonas*- a review”
Gene, **179**: 33-37
- Lu, Guang-Tao, Zheng-Jiu Yang, Fang-Yin Peng, Yi-Ning Tan, Yong-Qin Tang, Jia-Xun Feng, Dong-Jie Tang, Yong-Qiang He and Ji-Liang Tang (2007)
“The role of glucose kinase in carbohydrate utilization and extracellular polysaccharide production in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*“
Microbiology , **153**: 4284–4294

- Luo L, Yao SY, Becker A, Rüberg S, Yu GQ, Zhu JB, Cheng HP. (2005)
“Two new Sinorhizobium meliloti LysR-type transcriptional regulators required for nodulation”
J Bacteriol., **187**(13): 4562-4572
- Meyer, Goesmann, McHardy, Bartels, Bekel, Clausen, Kalinowski, Linke, Rupp, Giegerich und Pühler (2003)
„GenDB- an open source genome annotation system for prokaryote genomes“
Nucleic Acids Research, **31**, 8: 2187-2195
- Milas M, Rinaudo M. (1979)
„ Conformational investigation on the bacterial polysaccharide xanthan”
Carbohydr Res., **76**: 189-96
- Mirny LA, Gelfand MS. (2002)
„Using orthologous and paralogous proteins to identify specificity determining residues”
Genome Biol., 3(3): PREPRINT0002
- Mole, Beth M., David A. Baltrus, Jeffery L. Dang and Sarah R. Grant (2006)
“Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria”
Trends in Microbiology, Vol.**15**(8)
- Morgenstern B. (2007)
„Alignment of genomic sequences using DIALIGN”
Methods Mol Biol., **395**: 195-204
- Neuweger, Heiko, Stefan P. Albaum, Michael Dondrup, Marcus Persicke, Tony Watt, Karsten Niehaus, Jens Stoye and Alexander Goesmann (2008)
„MeltDB: A software platform for the analysis and integration of metabolomics experiment data“
Bioinformatics, **24**(23): 2726-2732
- Nordhoff, Krogdram, Jørgensen, Kallipolitis, Clark, Roepstorff and Karsten Kristiansen (1999)
„ Rapid identification of DNA-binding proteins by mass spectrometry”
Nature Biotechnology, **17**
- Norton, I.T. and D. M. Goodall (1984)
“Mechanism and Dynamics of Conformational Ordering in Xanthan Polysaccharide”
J. Mol. Biol., **175**: 371-394
- 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 Research Quarterly, **39**: 275-287
- Ophir T. und Gutnick D.L. (1994)
„A Role for Exopolysaccharides in the Protection of Microorganisms from Desiccation”, *Appl Environ Microbiol.*, **60**(2): 740-745

- Pareja,E., Pareja-Tobes,P., Manrique,M., Pareja-Tobes,E., Bonal,J. and Raquel Tobes (2006)
“ExtraTrain: a database of Extragenic regions and Transcriptional information
in prokaryotic organisms”
BMC Microbiology, **6**: 29
- Patil PB, Bogdanove AJ, Sonti RV. (2007)
“The role of horizontal transfer in the evolution of a highly variable lipopolysaccharide
biosynthesis locus in xanthomonads that infect rice, citrus and crucifers
BMC Evol Biol., **7**: 243
- Perez-Rueda, E. und Collado-Vides, J. (2000)
“The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *E. coli* K-12”
Nucleic Acids Research, **28**: 1838-1847
- Peters, Hans-Udo, Holger Herbst, Paul G. M. Hesselink, Heinrich Lünsdorf, Adrian Schumpe,
and Wolf-Dieter Deckwer (1989)
“The Influence of Agitation Rate on Xanthan Production by *Xanthomonas campestris*”
Biotechnology and Bioengineering, **34**: 1393-1397
- Poplawsky, A. R. and W. Chun (1997)
“*pigB* Determines a Diffusible Factor Needed for Extracellular Polysaccharide Slime and
Xanthomonadin Production in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*”
Journal of Bacteriology, **179**(2): 439–444
- Pühler, A., Matthieu Arlat, Anke Becker, Michael Göttfert, John P. Morrissey and Fergal
O’Gara (2004)
“What can bacterial genome research teach us about bacteria–plant interactions?”
Current Opinion in Plant Biology, **7**: 137–147
- Qian, W., Yantao Jia, Shuang-Xi Ren, Yong-Qiang He, Jia-Xun Feng, Ling-Feng Lu, Qihong
Sun, Ge Ying, Dong-Jie Tang, Hua Tang, Wei Wu, Pei Hao, Lifeng Wang, Bo-Le Jiang,
Shenyang Zeng, Wen-Yi Gu, Gang Lu, Li Rong, Yingchuan Tian, Zhijian Yao, Gang Fu,
Baoshan Chen, Rongxiang Fang, Boqin Qiang, Zhu Chen, Guo-Ping Zhao, Ji-Liang Tang,
and Chaozu He (2005)
“Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen
Xanthomonas campestris pv. *campestris*”
*Genome Res.***15**: 757-767
- Raetz CR, Whitfield C. (2002)
“Lipopolysaccharide endotoxins”
Annu Rev Biochem., **71**: 635-700
- Rajagopal L, Sundari CS, Balasubramanian D, Sonti RV. (1997)
“The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage”
FEBS Lett., **415**(2): 125-128
- Ramirez, Maria Eugenia, Leopoldo Fueikovskiy , Federico Garcia-Jimenez, Rodolfo Quintero
and Enrique Galindo (1988)
“Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *Xanthomonas campestris*”
Appl Microbiol Biotechnol, **29**:5-10

- Saier, MH Jr. (2000)
“Families of transmembrane sugar transport proteins”
Mol Microbiol., **35**(4):699-710
- Saier, M. H. Jr. und Josef Deutscher (1988)
„Die Rolle des bakteriellen Phosphotransferase-Systems im Zuckermetabolismus“
Biologie in unserer Zeit, **18** (1)
- Sanderson, G. R. (1981)
“Applications of xanthan gum”,
Br. Polym. J. **13**: 71-75
- Sandford PA, Laskin A (eds)
“Extracellular microbial polysaccharides”
Am Chem Soc Symp Ser, **45**: 242-264
- Sandvik EI, Maerker JM (1977)
“Application of xanthan gum for enhanced oil recovery”
- Seeger (1981)
„Zwei unterschiedliche Sekundärstrukturen bei Xanthomonas Polysaccharid“
Die Nahrung, **25**(7): 655-666
- Schell MA. (1993)
„Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators”
Annu Rev Microbiol., **47**: 597-626
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. (1995)
“Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray”
Science, **270**(5235): 467-470
- Schlegel, „Allg. Mikrobiologie“, Thieme/ Stuttgart, **1981**
- 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**(6): 727-33
- Schuhmacher, Choi, Zalkin und Brennan (1994)
“Crystal Structure of LacI member, PurR, bound to DNA: Minor Groove Binding by α -Helices”
Science, **266**: 763-770
- Serrania J, Vorhölter FJ, Niehaus K, Pühler A, Becker A. (2008)
„Identification of Xanthomonas campestris pv. campestris galactose utilization genes from transcriptome data”
J Biotechnol., **135**(3): 309-17

- Simon, R., Priefer, U.B. and Pühler, A. (1983)
“A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria”
Biotechnology, 1: 784- 791
- Stankowski JD, Mueller BE, Zeller SG. (1993)
„Location of a second O-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method”
Carbohydr Res., **241**: 321-326
- Sutherland I. W. (1985)
“Biosynthesis and composition of Gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides”
Ann. Rev. Microbiol., **39**: 243-270
- Sutton J.C. and Paul H. Williams (1970)
“Relation of xylem plugging to black rot lesion development in cabbage”
Canadian Journal of Botany, **48**: 391- 401
- Swings und Civerolo, “Xanthomonas”, Chapman und Hall/ London, (1993)
- Tang, Yong-Qiang He, Jia-Xun Feng, Bao-Ren-He, Bo-Le Jiang, Guang-Tao Lu, Baoshan Chen and Ji-Liang Tang (2005)
“Xanthomonas campestris pv. campestris Possesses a Single Gluconeogenic Pathway That Is Required for Virulence”
Journal of Bacteriology, **187**(17): 6231-6237
- Tchieu JH, Norris V, Edwards JS, Saier MH Jr. (2001)
“The complete phosphotransferase system in Escherichia coli”
J Mol Microbiol Biotechnol., **3**(3): 329-346
- 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”
Journal of Bacteriology, **187**: 7254-7266
- Torres PS, Malamud F, Rigano LA, Russo DM, Marano MR, Castagnaro AP, Zorreguieta A, Bouarab K, Dow JM, Vojnov AA. (2007)
“Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in Xanthomonas campestris”
Environ Microbiol., **9**(8): 2101-2109
- Verniere, Pruvost, Civerolo, Gambin, Jacquemoud-Collet and Luisetti (1993)
“Evaluation of the Biolog Substrate Utilization System To Identify and Assess Metabolic Variation among Strains of Xanthomonas campestris pv. citri”
Applied and Environmental Microbiology, **59**(1): 243-249

- Vojnov, Adrian A., Holly Slater, Michael J. Daniels, and J. Maxwell Dow (2001)
“Expression of the *gum* Operon Directing Xanthan Biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and Its Regulation In Planta”
MPMI, **14**(6): 768–774
- Vorhölter FJ, Niehaus K, Pühler A. (2001)
„Lipopolysaccharide biosynthesis in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: a cluster of 15 genes is involved in the biosynthesis of the LPS O-antigen and the LPS core”
Mol Genet Genomics, **266**(1): 79-95
- Vorhölter FJ, Thias T, Meyer F, Bekel T, Kaiser O, Pühler A, Niehaus K. (2003)
„Comparison of two *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* genomes revealed differences in their gene composition”
J Biotechnol., **106**(2-3): 193-202
- Vorhölter FJ, Schneiker S, Goesmann A, Krause L, Bekel T, Kaiser O, Linke B, Patschkowski T, Rückert C, Schmid J, Sidhu VK, Sieber V, Tauch A, Watt SA, 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**(1-2): 33-45
- Watson, Baker, Bell, Gann, Levine und Losick, “Molecular Biology of the Gene”, 5th Edition, Addison-Wesley Longman/ Amsterdam (2004)
- Wiggerich, H.G., B. Klauke, R. Köplin, U.B. Priefer and A. Pühler (1997)
„Unusual Structure of the *tonB-exb* DNA Region of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: *tonB*, *exbB*, and *exbD1* Are Essential for Ferric Iron Uptake, but *exbD2* Is Not”
Journal Of Bacteriology, **179** (22): 7103–7110
- Wiggerich HG, Pühler A. (2000)
„The *exbD2* gene as well as the iron-uptake genes *tonB*, *exbB* and *exbD1* of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* are essential for the induction of a hypersensitive response on pepper (*Capsicum annuum*)”
Microbiology, **146** (Pt 5): 1053-1060
- Winkelmann, G., “Microbial Transport Systems”, Wiley-VCH/ Weinheim, (2001)
- 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
- Yang, Tsuey-Ching, Yu-Wei Leu, Hui-Chen Chang-Chien, and Rouh-Mei Hu (2009)
„Flagellar biogenesis of *Xanthomonas campestris* requires alternative sigma factors RpoN2 and FliA and is temporally regulated by FlhA, FlhB and FlgM”
J. Bacteriol., doi:10.1128/JB.01152-08

He YQ, Zhang L, Jiang BL, Zhang ZC, Xu RQ, Tang DJ, Qin J, Jiang W, Zhang X, Liao J, Cao JR, Zhang SS, Wei ML, Liang XX, Lu GT, Feng JX, Chen B, Cheng J, Tang JL. (2007) „Comparative and functional genomics reveals genetic diversity and determinants of host specificity among reference strains and a large collection of Chinese isolates of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*”
Genome Biol., **8**(10): R218

Yoon, Sung Ho, Mee-Jung Han, Sang Yup Lee, Ki Jun Jeong, Jong-Shin Yoo (2003)
“Combined Transcriptome and Proteome Analysis of *Escherichia coli* During High Cell Density Culture”
Biotechnology and Bioengineering, **81**(7): DOI: 10.1002/bit.10626

Danksagung *H*

An dieser Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Alfred Pühler für die Aufnahme an dem Lehrstuhl für Genetik und die Möglichkeit diese Arbeit durchführen zu können.

Prof. Dr. Anke Becker danke ich für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof Dr. Karsten Niehaus, Dr. Frank-Jörg Vorhölter und Tony Watt danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe Exopol Dr. Birgit Baumgarth, Dr. Elizaveta Krol, Dr. Matthew McIntosh, Manuela Meyer, Dr. Javier Serrania, Dr. Christelle Bahlawane, Stefan Meyer, Jan-Philip Schlüter, Eva Schulte-Berndt, Anika Tauchen, Sabrina Klein, Julia Nikolaidis und Benjamin Frage danke ich für die angenehme Zusammenarbeit.

Besonders möchte ich mich bei Manuela Meyer und Eva Schulte-Berndt für die technische Unterstützung bei den zahlreichen Hybridisierungen danken.

Nicht zuletzt gilt mein großer Dank meiner Familie, die mich immer unterstützt und Verständnis entgegengebracht hat.

Anhang *I*

Mit meiner Unterschrift versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit Hilfe der angegebenen Materialien und Methoden verfaßt habe.

Bielefeld, 22.04.2009

Thomas Christian Montforts

CD:

k-means-Clustering Genlisten

Phenotype Kohlenstoffquellenverwertung

EMMA Rohdaten