

Transkriptomanalysen zur Interaktion von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* mit seiner Wirtspflanze

---

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
der Fakultät für Biologie  
der Universität Bielefeld

vorgelegt von  
**Monika Flügel**

März 2010

Success consists of going from failure to failure without loss of enthusiasm.  
Winston Churchill (1874-1965)

.... *für meine Familie*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
2.1	Resistenzmechanismen von Pflanzen .....	3
2.2	Virulenzfaktoren phytopathogener Bakterien .....	6
2.2.1	Extrazelluläre Polysaccharide.....	6
2.2.2	Toxine .....	7
2.2.3	Extrazelluläre Enzyme (Degradierung der Zellwand).....	8
2.2.4	TypIII-Sekretionssystem .....	9
2.2.5	Quorum Sensing .....	10
2.3	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	12
2.3.1	Charakteristika von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPFB382.....	13
2.4	Microarray-Analysen (Genomweite Analyse des Transkriptoms) .....	17
2.5	Zielsetzung.....	18
<b>3</b>	<b>Material</b> .....	<b>19</b>
3.1	Bakterienstämme .....	19
3.2	Plasmide und Vektoren .....	20
3.3	Pflanzenmaterial .....	20
3.4	Enzyme und Chemikalien .....	21
3.4.1	Enzyme .....	21
3.4.2	Restriktionsendonukleasen und -Puffer.....	21
3.4.3	Oligonukleotidprimer für PCR .....	22
3.4.4	Oligonukleotidprimer für <i>real-time</i> -RT-PCR.....	23
3.4.5	Chemikalien und Kits .....	25
3.5	Nährmedien.....	25
3.5.1	Zusätze zu Nährmedien.....	26
3.5.2	Antibiotika .....	27
3.5.3	$\alpha$ -Tomatin .....	27
3.6	Puffer und Lösungen .....	27
3.6.1	Agarosegelelektrophorese .....	27
3.6.2	Resuspendierung von Zellen .....	27
3.6.3	Puffer für Microarray-Analysen .....	28
3.6.4	DNA-Isolierung .....	28
3.6.4.1	Plasmidisolierung .....	28
3.6.4.2	Gesamt-DNA-Isolierung.....	28

3.6.5	Behandlung von Agarosegelen für Southern Hybridisierungen .....	29
3.6.6	Hybridisierungen .....	29
3.7	Software .....	30
3.8	Geräte.....	31
<b>4</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>32</b>
4.1	Kultivierung von Bakterienstämmen.....	32
4.2	Konservierung von Bakterienstämmen (Glycerinkultur) .....	32
4.3	Titerbestimmung von Bakterien in Flüssigkultur .....	32
4.4	RNA-Isolierung aus <i>Cmm</i> mit dem "SV Total RNA Isolation Kit" .....	32
4.4.1	Kultivierung von <i>Cmm</i> für RNA-Isolierung .....	32
4.4.2	RNA-Isolierung aus <i>Cmm</i> - Zellen aus Flüssigkultur .....	33
4.4.3	RNA-Isolierung aus <i>Cmm</i> - Zellen aus infizierten Pflanzen .....	34
4.5	Konzentrierung der RNA mit Microcon-30 Filtern .....	36
4.6	Genexpressionsanalysen mittels Microarray .....	36
4.6.1	Herstellung des für NCPPB382 spezifischen Microarrays Cmm3kOLI .....	36
4.6.2	Reverse Transkription von Gesamt RNA und Aufreinigung der Aminoallyl- cDNA.....	36
4.6.3	Fluoreszenzfärbung und Aufreinigung der markierten cDNA.....	38
4.6.4	Hybridisierung der Cy3- und Cy5-markierten cDNA gegen den Cmm3kOLI- Microarray .....	38
4.6.5	Microarray-Datenanalyse.....	39
4.7	<i>real-time</i> -RT-PCR mit dem "SensiMix-One-Step Kit" .....	40
4.8	DNA-Isolierung .....	41
4.8.1	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Cmm</i> .....	41
4.8.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	41
4.8.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA mit dem „Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System“ .....	41
4.8.2.2	HB-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA (Klonanalyse) .....	42
4.8.3	Isolierung von DNA aus Agarosegelen mit dem „NucleoSpin® Extract II“ .....	42
4.9	DNA-Reinigung und -Konzentration .....	43
4.9.1	Phenolisierung.....	43
4.9.2	Isopropanolfällung .....	43
4.9.3	Ethanol-fällung .....	43
4.9.4	Sephadex-Behandlung.....	44
4.9.5	Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem „NucleoSpin® Extract II“ .....	44
4.10	Techniken zur Charakterisierung von DNA-Molekülen.....	44
4.10.1	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	44

4.10.2	Agarosegelelektrophorese .....	45
4.10.3	Bestimmung des Molekulargewichts .....	46
4.11	Klonierung von DNA-Fragmenten .....	46
4.11.1	Dephosphorylierung von DNA mit der <i>Antarctic Phosphatase</i> .....	46
4.11.2	Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten .....	46
4.11.3	Shotgun-Klonierung.....	47
4.11.4	$\alpha$ - $\omega$ -Komplementation (Blau-Weiß-Selektion).....	47
4.12	DNA-Transfer .....	47
4.12.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	47
4.12.2	Elektroporation von <i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i> .....	48
4.13	DNA-DNA-Hybridisierung .....	49
4.13.1	Markierung der Hybridisierungssonde.....	49
4.13.2	Überprüfung der Markierungsreaktion (Dot Blot).....	50
4.13.3	Southern-Hybridisierung .....	50
4.14	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	52
4.14.1	PCR mit Gesamt-DNA als Template.....	52
4.14.2	PCR mit ganzen Zellen als Template .....	52
4.15	Isolierung von Xylemsaft .....	53
4.16	Herstellung von Tomatenblatthomogenat .....	53
4.17	Analyse des Xylemsafts mittels GC-MS .....	54
4.18	Kultivierung von <i>Cmm</i> zur Überprüfung einer Populationsdichte-abhängigen Genexpression ( <i>Quorum-Sensing</i> ).....	55
4.19	Filterkreuzungsmethode (Konjugation) .....	55
4.20	Methoden zur Analyse des Pathogenitätsverhaltens von <i>Cmm</i> .....	56
4.20.1	Pflanzentests mit der Wirtspflanze <i>Solanum lycopersicum</i> .....	56
4.20.1.1	Wurzelinfektion .....	56
4.20.1.2	Ermittlung des Welkeindex und des Welkeverlaufs .....	56
4.20.1.3	Gewichts- und Größenbestimmung der Pflanzen.....	56
4.20.1.4	Kolonisationstest .....	57
4.20.1.5	Infektion mittels Punktieren des Fiederblattstiels.....	57
4.20.2	Test zur Auslösung der Hypersensitiven Reaktion (HR) bei <i>Mirabilis jalapa</i> , <i>Nicotiana benthamiana</i> bzw. <i>Nicotiana tabaccum</i> cv. Samsun.....	59
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>60</b>
5.1	Eigenschaften des Microarrays Cmm3kOLI.....	60
5.2	Einteilung der <i>Cmm</i> -Gene in funktionelle Gruppen.....	61
5.3	Etablierung der Transkriptommethodik für <i>Clavibacter</i> .....	64
5.3.1	Analyse des Microarrays Cmm3kOLI bezüglich seiner technischen Varianz .....	64

5.3.2	Vergleich der Genexpression in zwei verschiedenen Wuchsphasen.....	66
5.4	Veränderung des Expressionsmusters von <i>Cmm</i> bei Supplementierung des Mediums mit Tomatenblatthomogenat bzw. Xylemsaft .....	71
5.4.1	Analyse des Xylemsafts der Tomate mittels GC-MS .....	71
5.4.1.1	Modifizierung der Metabolitkonzentrationen des Xylemsafts durch <i>Cmm</i> unter <i>in vitro</i> Bedingungen.....	71
5.4.1.2	Analyse des Xylemsafts infizierter und uninfizierter Tomatenpflanzen .....	74
5.4.2	Differentielle Genexpression nach Supplementierung des Mediums mit Tomatenblatthomogenat oder Xylemsaft.....	77
5.5	Transkriptionsprofil der <i>dtxR</i> <sup>-</sup> -Mutante im Vergleich zu CMM101.....	87
5.6	Charakterisierung des TetR-Regulators CMM_1624.....	91
5.6.1	Sequenzanalyse des ORFs CMM_1624 .....	91
5.6.2	Erzeugung einer CMM_1624 <sup>-</sup> -Mutante .....	92
5.6.3	Phänotypische Charakterisierung der CMM_1624 <sup>-</sup> -Mutanten.....	94
5.7	Einfluss von $\alpha$ -Tomatin auf die Genexpression.....	99
5.7.1	Expressionsprofil von NCPPB382 nach Zugabe von $\alpha$ -Tomatin .....	100
5.7.2	Expressionsprofil der Regulatormutante <i>CmmCatR7<math>\beta</math></i> im Vergleich zu NCPPB382.....	104
5.7.2.1	Plasmidtransfer in der <i>catR</i> <sup>-</sup> -Mutante.....	106
5.8	Untersuchung einer möglicherweise Populationsdichte-abhängigen Expression von Virulenzfaktoren .....	110
5.9	Expressionsmuster von <i>Cmm</i> <i>in planta</i> .....	115
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>122</b>
6.1	Überprüfung der Funktionalität des Microarrays Cmm3kOLI .....	122
6.2	Expressionsmuster von <i>Cmm</i> in einem <i>in vitro</i> -System und <i>in planta</i> .....	123
6.2.1	Charakterisierung des TetR-Regulators CMM_1624.....	124
6.2.2	Analyse der Genexpression <i>in planta</i> .....	126
6.2.2.1	<i>In planta</i> induzierte Gene mit möglicher Funktion in der pathogenen Interaktion .....	129
6.3	Xylemsaft - das natürliche Habitat von <i>Cmm</i> .....	132
6.3.1	Veränderung der Genexpression durch Xylemsaft und Rolle von DtxR .....	135
6.4	Ausblick .....	138
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>139</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>158</b>
8.1	Plasmidkarten.....	158
8.2	Einteilung der <i>Cmm</i> -Gene in funktionelle Gruppen.....	159

---

8.3	Differentielle Genexpression in der spät-logarithmischen Wachstumsphase .....	163
8.4	Bestimmung der Metabolitmengen in Xylemsaft .....	165
8.5	Differentielle Genexpression von <i>Cmm</i> in Gegenwart von Tomatenhomogenat oder Xylemsaft .....	167
8.6	Differentielle Genexpression der <i>dtxR</i> <sup>-</sup> -Mutante nach Zugabe von 10 % Xylemsaft .....	172
8.7	Daten zum Pflanzentest mit den CMM1624 <sup>-</sup> -Mutanten.....	175
8.8	Differentielle Genexpression nach $\alpha$ -Tomatinzugabe .....	177
8.9	Daten zu den CatR-Experimenten .....	179
8.10	Daten zu den <i>Quorum-Sensing</i> Experimenten QS-10min und QS-6h.....	182
8.11	<i>Cmm</i> -Expressionsmuster <i>in planta</i> .....	188
8.12	Funktionelle Gruppen der <i>Cmm</i> -Gene .....	189
8.13	Abkürzungsverzeichnis.....	190

## 1 Zusammenfassung

Mit der Microarraytechnologie kann das komplette Transkriptom eines Organismus unter zwei verschiedenen Bedingungen miteinander verglichen werden. In dieser Arbeit wurde diese Technologie erstmals bei einem phytopathogenen Gram-positiven Bakterium, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), eingesetzt. Dabei wurde das Expressionsprofil von *Cmm* *in planta* bzw. unter verschiedenen gut reproduzierbaren *in vitro* Bedingungen mit dem in Minimalmedium verglichen. *In planta* trat ein komplexes Expressionsmuster auf, bei dem 10 Tage nach Infektion, einem Zeitpunkt, an dem bereits die ersten Symptome bei Tomatenpflanzen auftreten, 42 % aller *Cmm*-Gene (1325) im Vergleich zu *in vitro*-Bedingungen (Minimalmedium, log-Phase) differentiell exprimiert vorlagen. Unter anderem zeigten auch Gene der EPS-Biosynthese und ein Gen, das für ein Perforin codiert (CMM\_2283), in der Pflanze ein anderes Expressionsprofil. Das Haupt-EPS (EPS-IV) scheint sowohl *in planta* als auch *in vitro* ähnlich stark synthetisiert zu werden. Aufgrund der Induktion von EPS-II und der Repression von EPS-III ist allerdings eine veränderte Oberflächenstruktur der Bakterien innerhalb der Pflanze zu erwarten. Perforine können Poren in Membranen von Eukaryonten bilden, so eine Lyse der Zelle hervorrufen, aber auch den Transport von Proteinen (Virulenzfaktoren/Effektoren) ins Cytosol der Wirtszelle ermöglichen. Die verstärkte Expression des Perforins *in planta* könnte ein Indiz dafür sein, dass dieses Protein an der Bakterien-Pflanzen-Interaktion beteiligt ist.

Entgegen der Erwartung, dass Virulenzfaktoren in der Pflanze verstärkt exprimiert werden, waren bekannte und potentielle Virulenzfaktoren von *Cmm* wie z.B. *celA* (Cellulase), *pat-1*, *chpC* oder *ppaC* (Serinproteasen) *in planta* reprimiert. Die Repression dieser Gene, die alle für extrazelluläre Enzyme codieren, war auch *in vitro* nach Supplementierung mit Tomatenblatthomogenat nicht-infizierter Pflanzen zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass sie in späten Infektionsphasen nicht oder nur noch vermindert exprimiert werden. Eventuell wirken cytoplasmatische Komponenten der Pflanze, die durch die zunehmende Mazerierung pflanzlichen Gewebes freigesetzt werden, reprimierend. Die Expression dieser Virulenzfaktoren kann demnach mit dem *in vitro*-Modellsystem (Minimalmedium mit Tomatenblatthomogenat) gut widerspiegelt werden.

In Gegenwart von Tomatenblatthomogenat konnten zwei Gene für Transkriptionsregulatoren als differentiell exprimiert eingestuft werden, darunter *sigY*, das für einen Sigmafaktor codiert. Das zweite Gen (CMM\_1624) codiert einen Transkriptionsregulator der TetR-Familie und zeigte in Gegenwart von Tomatenblatthomogenat und auch *in planta* ebenso wie die Virulenzfaktoren eine Repression. Mittels *gene-replacement* erzeugte CMM\_1624<sup>-</sup>-Mutanten wiesen im Pflanzentest mit der Wirtspflanze eine im Vergleich zum Kontrollstamm reduzierte Virulenz auf. Dabei war die Abschwächung der Virulenz bei CMM101\_1624 (pCM1<sup>+</sup>, pCM2<sup>-</sup>), der Mutante, die nur eins der beiden endogenen Plasmide des Wildtypstamms enthält, stärker als bei der Mutante mit beiden Plasmiden (*Cmm*1624). Allerdings ist noch unklar, welche Gene von CMM\_1624 reguliert werden und zu dem veränderten Virulenzphänotyp führen.

Die Zugabe von Xylemsaft nicht-infizierter Pflanzen führte u.a. zu einer Repression von Genen des Eisenmetabolismus (Hydroxamatbiosynthese und verschiedene Eisentransporter), die eine vorhergesagte Bindestelle für den Eisenregulator DtxR aufweisen. Bei einer DtxR<sup>-</sup>-Mutante allerdings waren die gleichen Gene in mit Xylemsaft supplementiertem Medium im Vergleich zum Wildtyp induziert. Es wurden also Gene identifiziert, die bei der DtxR<sup>-</sup>-Mutante unter erhöhten Eisenkonzentrationen zu einer deregulierten Siderophorbildung führen. Zudem kann aufgrund der differentiellen Expression dieser Gene in Medium mit Xylemsaft eine erhöhte Konzentration leicht zugänglicher Eisenverbindungen im Xylemsaft angenommen werden. Ein Transporter der CitMHS-Familie, der an der Aufnahme von Fe<sup>3+</sup>-Citrat beteiligt sein könnte, war ebenfalls nach Zugabe von Xylemsaft induziert. Da zudem die mittels GC-MS bestimmte Citratkonzentration im Xylemsaft (nicht) infizierter Pflanzen bei 50-120 µM lag, scheint innerhalb des Xylems Citrat als Eisenkomplexbildner in genügend hoher Menge vorhanden zu sein, um die Eisenversorgung von *Cmm* zu gewährleisten. Zusätzlich kann das Citrat als C- und Energie-Quelle verwendet werden. GC-MS-Messungen des Überstands einer *Cmm*-Kultur in unverdünntem Xylemsaft zeigten jedoch, dass Carbonsäuren wie Citrat und Malat von *Cmm* erst nach den offenbar bevorzugten Zuckern, Glucose und Fructose, verwertet werden.

In dieser Arbeit konnten mit der Microarraytechnologie neue Erkenntnisse zur Interaktion von *Cmm* mit seiner Wirtspflanze gewonnen werden. Auch in Zukunft kann diese Technik zur weiteren Aufklärung der molekularen Mechanismen, die an dieser Bakterien-Pflanzen-Interaktion beteiligt sind, beitragen.

## 2 Einleitung

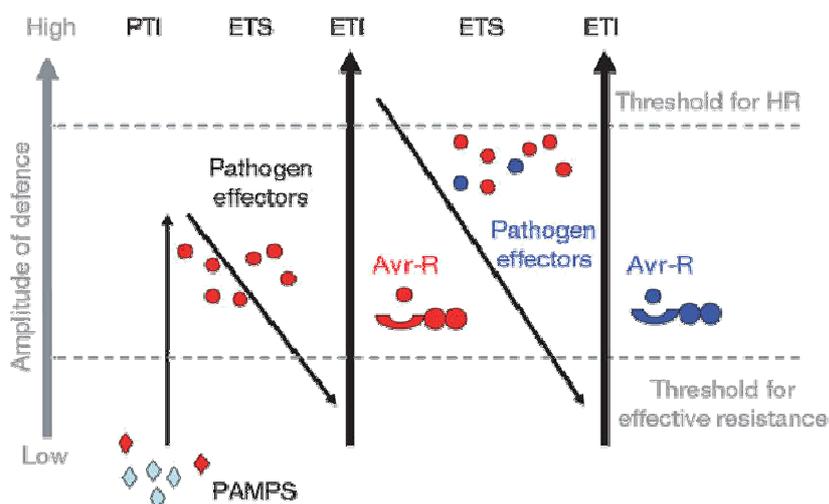
Neben zahlreichen abiotischen Faktoren wie Temperatur, Feuchtigkeit und Intensität der Sonneneinstrahlung spielen auch biotische Faktoren eine wesentliche Rolle in der Physiologie von Pflanzen. Sowohl in der Rhizosphäre als auch epiphytisch sind Bakterien Bestandteil der mikrobiellen Gemeinschaft von Pflanzen, die zudem noch eine eukaryotische Mikroflora/-fauna (filamentöse Pilze, Hefen, Algen, Protozoen, Nematoden) sowie Viren enthält. Die zahlenmäßige Dominanz liegt in dieser Gemeinschaft bei den Bakterien. Ebenso wie die abiotischen Faktoren können die gesamte mikrobielle Gemeinschaft oder auch nur einzelne Mitglieder dieser einen positiven, negativen oder auch neutralen Einfluss auf die Pflanzenphysiologie haben (Beattie, 2006). Im Gegensatz zu den Kommensalen (kein messbarer Einfluss auf Pflanzen), deren Vertreter diversen Gruppen der *Bacteria* und *Archaea* zuzuordnen sind, stammen alle bislang identifizierten Phytosymbionten (mit positivem Effekt) und Phytopathogenen (mit negativer Wirkung) aus nur 4 Stämmen der *Bacteria*. Symbionten sind in den Stämmen der *Cyanobacteria*, *Proteobacteria* und *Actinobacteria* zu finden, Pathogene ebenfalls in den Stämmen der *Proteobacteria* und *Actinobacteria* aber auch in dem Stamm der *Firmicutes* (Bergey, 2004). Um insbesondere die Qualität und Quantität der Erträge von Nutzpflanzen zu erhöhen, ist es von Interesse die Interaktion von Pflanzen sowohl mit symbiotischen als auch mit pathogenen Organismen zu erforschen.

### 2.1 Resistenzmechanismen von Pflanzen

Sowohl symbiotische als auch pathogene Bakterien müssen sich innerhalb der Pflanze vermehren, um ihre jeweilige Wirkung zu erzielen. Die erfolgreiche Besiedlung der Oberflächen von Pflanzengewebe im oberirdischen Bereich ist nur wenigen epiphytisch lebenden Bakterien möglich. Wasser- und Nährstoffmangel sind hierfür sicherlich als Hauptgründe anzusehen. In der Rhizosphäre dagegen kommen hohe Bakterienpopulationen vor, Wasser- und Nährstoffmangel sind hier nicht ausgeprägt, und zusätzlich geben die Pflanzen Nährstoffe in Form von Wurzelexsudaten und abgestorbenen Zellen in die Umgebung ab.

Eine erste Schutzbarriere gegenüber dem Eindringen von Bakterien in die Pflanze sind die konstitutiv vorhandenen Auflagerungen, z.B. von Suberin, auf den jeweiligen Epidermisgeweben. Damit Bakterien in die Pflanze eindringen können, müssen sie die Epidermis entweder enzymatisch, über natürliche Öffnungen, wie Spaltöffnungen und Hydathoden, oder über Wunden durchdringen. Gegenüber den meisten (potentiell phytopathogenen) Bakterien sind Pflanzen resistent. Dabei wird zwischen verschiedenen Resistenzarten unterschieden (Abbildung 2.1). Kann ein Pathogen die Pflanze aufgrund basaler Abwehrmechanismen nicht effektiv besiedeln, spricht man von Inkompatibilität bzw. Nichtwirts-Resistenz. Sowohl konstitutive als auch induzierbare strukturelle und biochemische Mechanismen, wie z.B. die Lignifizierung der Zellwände, die Synthese reaktiver Sauerstoffspezies, antimikrobieller Substanzen und/oder hydrolytischer Proteine, führen hierbei zu einer dauerhaften Resistenz (Schlösser, 1997; Nürnberger et al., 2004). Weitere

Abwehrmechanismen können durch die Erkennung sogenannter MAMPs/PAMPs (*microbial/pathogen-associated molecular patterns*) über an der Zelloberfläche lokalisierte PRRs (*pattern recognition receptors*) induziert werden (Jones & Dangl, 2006; Bittel & Robatzek, 2007). MAMPs/PAMPs sind Verbindungen, die normalerweise nicht in der Wirtszelle vorkommen, meist eine essentielle Funktion bei vielen Mikroorganismen übernehmen und eine konservierte Struktur aufweisen (Nürnberg et al., 2004; Bittel & Robatzek, 2007). Als Beispiele für MAMPs/PAMPs können Lipopolysaccharide (Dow et al., 2000; Zeidler et al., 2004), das Hauptprotein der Geißel, Flagellin (Gomez-Gomez & Boller, 2002), und Kälteschock-Proteine (Felix & Boller, 2003) genannt werden. Zudem können sie auf Pflanzenbestandteilen basieren, die durch Bakterien in Verbindungen degradiert wurden, die normalerweise nicht in der Pflanze vorkommen (Klarzynski et al., 2000; Yamaguchi et al., 2000).



**Abbildung 2.1:** Modell der Pflanzenabwehr nach Jones & Dangl (2006). Bei der Nichtwirts-Resistenz (PTI: PAMP-triggered immunity) kann der Wirt die Ausbreitung des Pathogens u.a. durch Erkennen der MAMPs/PAMPs (rote Rauten) verhindern. Ist das Pathogen allerdings z.B. durch Bildung geeigneter Effektoren (rote, blaue Kreise) dazu in der Lage, die Pflanzenabwehr zu überwinden, kommt es zu einer kompatiblen Interaktion (ETS: effector-triggered sensibility). Werden von einer Wirtspflanze zu den Avr-Proteinen korrespondierende R-Proteine synthetisiert, das Pathogen also spezifisch erkannt, folgt daraus die wirtsspezifische Resistenz (ETI: effector-triggered immunity).

Ist ein Pathogen in der Lage, die basalen Resistenzmechanismen der Pflanze zu überwinden, kommt es zu einer kompatiblen Interaktion zwischen Pathogen und Wirtspflanze (Abbildung 2.1). Für viele phytopathogene Proteobakterien ist beschrieben, dass sie Effektormoleküle produzieren, die die Effekte der durch MAMPs ausgelösten Abwehrreaktionen reduzieren oder unterdrücken (Jones & Dangl, 2006). Werden diese als Avr-Proteine (**Avirulenz**) bezeichneten Effektoren von Produkten eines entsprechenden/korrespondierenden R-Gens (**Resistenz**) der Pflanze spezifisch erkannt (Gen-für-Gen-Hypothese; Flor, 1955 und 1971), werden weitere Abwehrmechanismen der Pflanze induziert und es kommt zu einer wirtsspezifischen Resistenz (Abbildung 2.1; Jones & Dangl, 2006; Bittel & Robatzek, 2007). In diesem Zusammenhang ist insbesondere das sogenannte TypIII-Sekretionssystem von

Bedeutung, das mit Ausnahme von *Xylella fastidiosa* (Simpson et al., 2000) und *Agrobacterium tumefaciens* (Cornelis & Van Gijsegem, 2000) in allen bislang untersuchten phytopathogenen Proteobakterien identifiziert werden konnte. Über dieses Sekretionssystem werden Avr-Proteine und weitere bakterielle Proteine in die Pflanzenzelle transloziert und können dort zur Virulenz des Pathogens beitragen oder lösen nach Erkennen durch ein R-Protein weitere pflanzliche Abwehrmechanismen wie z.B. die Hypersensitive Reaktion (HR) aus (Leach & White, 1996). Die HR ist eine schnelle lokale Abwehrreaktion, bei der die Ausbreitung des Pathogens durch den programmierten Zelltod des infizierten Gewebes (Greenberg et al., 1994) und die Verstärkung der Zellwände (Lignifizierung; Einlagerung von Callose) des angrenzenden Gewebes (Kauss, 1987; Brisson et al., 1994) unterbunden wird. Zudem erfolgt eine Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies, die Anreicherung phenolischer Komponenten und weiterer Abwehrstoffe, wie Phytoalexine und PR(*pathogen related*)-Proteine (Klement et al., 1964; Greenberg et al., 1994; Alvarez, 2000; Bolwell et al., 2002). Nach der Gen-für-Gen-Hypothese von Flor (1955 und 1971) ist für eine Hypersensitive Reaktion die Erkennung eines Avr-Proteins über ein R-Protein der Wirtspflanze essentiell. Allerdings wurden auch nach Infiltration sowohl Gram-negativer als auch Gram-positiver phytopathogener Bakterien in Gewebe von Nicht-Wirtspflanzen HR-ähnliche Reaktionen beschrieben (Gitaitis, 1990; Atkinson & Williams, 2009; Nissinen et al., 1997; Kim et al., 2004).

Obwohl in einer kompatiblen Interaktion die basalen Abwehrreaktionen der Wirtspflanze von dem Pathogen überwunden werden müssen, sind dieselben Reaktionen zum Teil auch erforderlich, um die Krankheitssymptome im vollen Ausmaß auszulösen. So haben z.B. die Pflanzenhormone Ethylen, Salicylsäure (SA) und Jasmonsäure (JA), die an Pflanzenabwehrreaktionen beteiligt sind (Feys & Parker, 2000; Kunkel & Brooks, 2002), in einigen kompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktionen eine wesentliche Funktion. Ethylen-insensitive *Arabidopsis*- und Tomaten-Mutanten weisen nach Infektion mit pathogenen *Pseudomonas*- und *Xanthomonas*-Stämmen schwächere Krankheitssymptome auf als die Wildtyppflanzen (Bent et al., 1992; Lund et al., 1998; Cohn & Martin, 2005). Ein ähnlicher Effekt war bei Tomatenpflanzen zu beobachten, die einen Defekt in der JA- bzw. SA-Synthese aufweisen. Nach Infektion mit *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) zeigten auch diese Pflanzen deutlich geringere Symptome. Nur bei Verwendung der JA<sup>-</sup>-Mutanten war zudem eine verminderte Kolonisierung der Wirtspflanze durch *Xcv* festzustellen (O'Donnell et al., 2001 und 2003). Auch bei der Interaktion des Gram-positiven Actinomyceten *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) mit der Tomate konnte nachgewiesen werden, dass die Inaktivierung der Ethylen-Synthese oder der -Signalweiterleitung zu einer Verringerung der Krankheitssymptome führt. Ein Einfluss dieser Mutationen auf die Kolonisierung der Pflanzen durch *Cmm* oder die Expression einiger Abwehrgene der Tomate, die nach Infektion des Wildtyps mit *Cmm* induziert wurden, war hingegen nicht zu beobachten (Balaji et al., 2008).

## 2.2 Virulenzfaktoren phytopathogener Bakterien

Pflanzenpathogene haben eine Vielzahl an Mechanismen entwickelt, um ihren Wirt erfolgreich zu infizieren, zu kolonisieren, die Pflanzenabwehr zu überwinden und spezifische Krankheitssymptome auszulösen. Auch die Anpassung des Metabolismus an das jeweilige wirtsspezifische und auch vom Habitat innerhalb des Wirts abhängige Nährstoffangebot ist entscheidend. Abhängig vom Pathogen und seinem Infektionsprozess sind verschiedenste Virulenzfaktoren an diesen Prozessen beteiligt. Oberflächenstrukturen, wie **extrazelluläre Polysaccharide**, bilden die Kontaktfläche zu den Wirtszellen. Sie können ein primärer Angriffspunkt pflanzlicher Abwehrreaktionen sein und vermitteln häufig eine für die Kolonisierung des Wirts wichtige Anheftung an pflanzliche Oberflächen. Weitere wichtige Virulenzfaktoren stellen z.B. **Toxine** und **hydrolytische extrazelluläre Enzyme** dar. Toxine können gegen den Wirt gerichtet sein, aber z.B. auch einen Selektionsvorteil gegenüber konkurrierenden Mikroorganismen darstellen. Sekretierte Enzyme mit hydrolytischer Aktivität sind meist an der Degradierung des Wirtsgewebes beteiligt, tragen so zur Ausbildung der Krankheitssymptome und/oder der Erschließung weiterer Nährstoffquellen bei. Für viele Proteobakterien wurde zudem gezeigt, dass über das **TypIII-Sekretionssystem** in das Cytoplasma der Wirtszelle transportierte Proteine/Effektoren wesentlich zu der Virulenz des Pathogens beitragen (Abramovitch & Martin, 2004; Mudgett, 2005). Ebenso wie für alle anderen Bakterien ist es auch für phytopathogene Bakterien essentiell, die Expression von Genen zu regulieren, um sich wechselnden Umweltbedingungen anzupassen und durch gezielte Expression der Virulenzfaktoren z.B. die Auslösung von Krankheitssymptomen zu ermöglichen. Ein für viele Pflanzenpathogene Bakterien beschriebener Regulationsmechanismus ist z.B. das **Quorum Sensing**, ein von der Zelldichte abhängiges Regulationsystem.

### 2.2.1 Extrazelluläre Polysaccharide

Die Bildung von Exopolysacchariden (EPS) ist bei Boden- und pflanzenassoziierten Bakterien sehr stark verbreitet. Aufgrund ihres anionischen Charakters fungieren EPS als hydratisierte Matrix, die die Bakterien vor Dehydrierung schützt und die Aufnahme von Nährstoffen sowie wichtigen Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  erleichtert. Zudem sind sie an der Adhäsion an inerte oder biologische Oberflächen wie Bodenpartikel oder Pflanzenzellwände beteiligt, können den Zell-Zellkontakt zwischen einzelnen Bakterienzellen vermitteln und sind so auch an der Bildung von Biofilmen beteiligt. Bei phytopathogenen Bakterien kann die EPS-Bildung zusätzlich von Vorteil sein, indem sie den direkten Kontakt mit pflanzlichen Oberflächen minimieren, die Erkennung des Pathogens durch die Wirtspflanze vermeiden und einen Schutz vor pflanzlichen Abwehrstoffen bieten (Leigh & Coplin, 1992; Niehaus et al., 1993; Kiraly et al., 1997).

Für mehrere Pflanzenpathogene wurde gezeigt, dass das EPS ein wichtiger Virulenzfaktor sein oder die Aggressivität des Pathogens gegen den Wirt erhöhen kann. Die Inaktivierung der meisten Gene des *gum*-Clusters von *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, die für Proteine der Xanthanbiosynthese codieren, führte zu einem vermindert virulenten Phänotyp

der untersuchten Mutanten (Katzen et al., 1998). Der stärkste Effekt war bei der *gumD*<sup>-</sup>-Mutante zu beobachten. *gumD* codiert für eine UDP-Glucosylphosphat-Transferase, die den ersten Schritt der Xanthan-Biosynthese (Übertragung des Glucose-1-Phosphats aus UDP-Glucose unter Abspaltung von UMP auf den Polyisoprenol-P Akzeptor) katalysiert (Chou et al., 1997; Katzen et al., 1998). Allerdings führen auch leichte Änderungen in den Xanthan-Intermediaten, wie die Verkürzung der Untereinheiten auf vier Zuckerreste, zu einer deutlichen Abschwächung der Virulenz (Katzen et al., 1998).

Ebenso wurde bei *Pantoea* (früher *Erwinia*) *stewartii* subsp. *stewartii* eine Korrelation zwischen Virulenz und EPS-Produktion festgestellt. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* besiedelt das Xylem von Mais und verursacht eine vaskuläre Welke seiner Wirtspflanze. Die hochtitrige Kolonisierung des Xylems und die Sekretion großer Mengen des EPS Stewartan werden als Hauptursache der Welkesymptome angenommen. Mutanten, die kein EPS produzieren, sind avirulent und in der Kolonisierung des Wirts eingeschränkt (Dolph et al., 1988; Nimtz et al., 1996). Offenbar blockiert das Stewartan zudem zellwandständige Agglutinine des Wirts und verhindert so eine Immobilisierung des Bakteriums (Bradshaw-Rouse et al., 1981).

Bei *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosum* (Erreger der bakteriellen Welke bei *Medicago sativa*) konnte ebenfalls festgestellt werden, dass eine reduzierte EPS-Produktion eine Abschwächung der Virulenz bedingt (Fulkerson, 1960). Welkesymptome können bei Mutanten, deren EPS-Mengen reduziert sind, nicht oder nur noch in abgeschwächter Form beobachtet werden (Van Alfen et al., 1987). Bei *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* hingegen zeigen EPS-Mutanten, die nur noch maximal 10 % der EPS-Menge des Wildtyps produzieren, nach wie vor einen virulenten Phänotyp. Infizierte Pflanzen erreichen eine leicht erhöhte Biomasse und es ist nur eine minimale Reduktion der Welkesymptome zu erkennen. Allerdings war die Konstruktion einer komplett EPS-freien Mutante bislang nicht erfolgreich (Berpohl et al., 1996; Schauer, 2004).

### 2.2.2 Toxine

Toxine können zum einen gegen den Wirt gerichtet sein oder zum anderen einen Selektionsvorteil gegenüber konkurrierenden Mikroorganismen darstellen.

Phytopathogene *Streptomyces*-Arten, die Schorfkrankheiten (Scabiose) bei ihren Wirten auslösen, sekretieren das Phytotoxin Thaxtomin (Loria et al., 2006). Das von *Streptomyces scabies* gebildete Thaxtomin ist ein nitrifiziertes Dipeptid, welches die Cellulosebiosynthese in wachsendem Pflanzengewebe inhibiert, einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom ins Cytoplasma stimuliert und einen programmierten Zelltod hervorruft (Lawrence et al., 1990; Scheible et al., 2003; Duval et al., 2005; Tegg et al., 2005). Die Biosynthese des Dipeptids erfolgt durch Nichtribosomale Peptidsynthetasen, die Nitrifizierung wird durch eine NO-Synthase vermittelt. Mutanten, die kein Thaxtomin synthetisieren können, sind avirulent (Healy et al., 2000; Healy et al., 2002; Kers et al., 2004).

Auch viele Pathovaren von *Pseudomonas syringae* produzieren Toxine wie das Polyketid Coronatin, das monozyklische  $\beta$ -Lactam Tabtoxin oder das Sulfodiaminophosphinyltripeptid

Phaseolotoxin. Die Toxine sind meist nicht essentiell für die Pathogenität, tragen aber zur Stärke der Symptomausprägung und der Vermehrung im Wirt bei (Bender et al., 1999). Coronatin, das von einigen Pathovaren von *Pseudomonas syringae* gebildet wird, ist ein Virulenzfaktor, der einen positiven Effekt auf die Ausbildung von Chlorosen und das Wachstum des Pathogens in der Pflanze ausübt (Bender et al., 1998). Mittlerweile wurde durch die Behandlung von *Arabidopsis*-Pflanzen mit Coronatin oder Methyl-Jasmonat gezeigt, dass Coronatin als Methyl-Jasmonat Analogon wirkt und durch Aktivierung der Jasmonat-Signalwege die Salicylsäure-abhängige Abwehr der Pflanze unterdrückt (Mittal & Davis, 1995). Salicylsäure vermittelt z.B. die Expression antimikrobieller saurer PR-Proteine und ist an der Auslösung der „systemic acquired resistance“ beteiligt (Klesig & Malamy, 1994; Kunkel & Brooks, 2002; Durrant & Dong, 2004). Mutanten von *Arabidopsis* und der Tomate, die einen Defekt in der Jasmonat vermittelten Signalübertragung aufweisen, zeigen eine erhöhte Resistenz gegen *Pseudomonas syringae* (Feys et al., 1994; Kloeck et al., 2001; Zhao et al., 2003). Zudem konnte durch Microarray-Analysen die Induktion einiger Jasmonsäure-abhängiger Gene nach Coronatin-Behandlung von Tomaten bestätigt werden (Zhao et al., 2003). In *Arabidopsis* inhibiert Coronatin neben der Unterdrückung der Wirtsabwehr das Schließen der Stomata und erleichtert dadurch das Eindringen in den Apoplasten (Melotto et al., 2006).

### 2.2.3 Extrazelluläre Enzyme (Degradierung der Zellwand)

Um den pflanzlichen Wirt zu infizieren und ihn erfolgreich zu kolonisieren, sind phytopathogene Bakterien darauf angewiesen, auch strukturelle Barrieren wie die pflanzliche Zellwand zu überwinden. Vielfach ist ein Eindringen in die Pflanze durch Wunden oder natürliche Öffnungen wie Stomata oder Hydathoden möglich oder erfolgt wie bei *Xylella* durch Xylemsaugende Insektenvektoren (Hopkins, 1989). Allerdings ist oftmals auch für die weitere Besiedlung des Wirts die Degradierung dieser Barrieren unumgänglich. Zudem können durch den Abbau dieser Polymere auch zusätzliche Nährstoffquellen erschlossen werden.

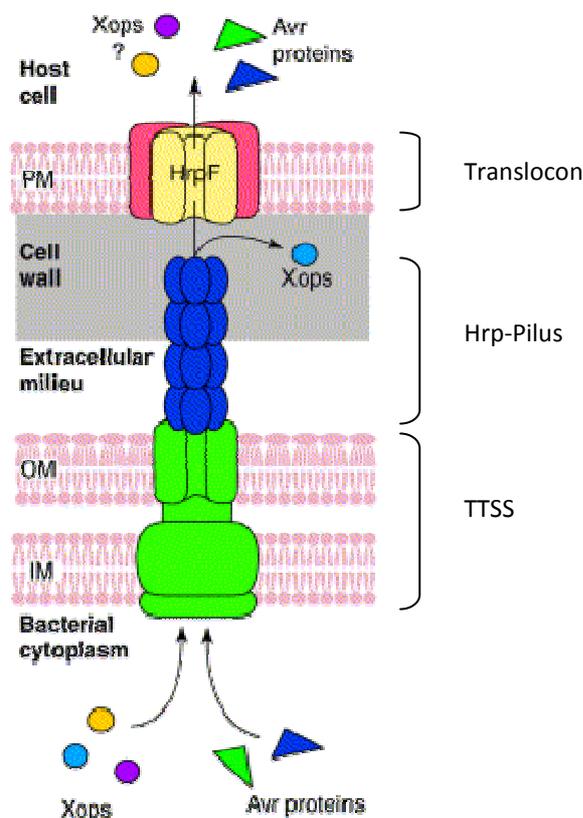
Für viele Gram-negative und Gram-positive Bakterien konnten extrazelluläre Enzyme identifiziert werden, die den Abbau der pflanzlichen Zellwand ermöglichen und oftmals auch wichtige Virulenzfaktoren darstellen. Primär sind hier Endo-Glucanasen, Polygalacturonasen sowie Pectatlyasen zu nennen, die Cellulose spalten bzw. den Abbau von Pektin, einem weiteren wichtigen Bestandteil von Zellwänden und der Mittellamelle, ermöglichen (Daniels et al., 1988; Alfano & Collmer, 1996).

In *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und in *Cm* subsp. *sepedonicus* ist z.B. eine Cellulase, die neben der katalytischen- und der Cellulose-Bindedomäne eine Expansindomäne aufweist, ein wichtiger Virulenzfaktor (Jahr et al., 2000; Laine et al., 2000). Die *Ralstonia solanacearum* Stämme AW und K60 produzieren jeweils fünf Exoenzyme (eine  $\beta$ -1,4-Endoglucanase: Egl, eine Endopolygalacturonase: PehA bzw. PglA, zwei Exopolygalacturonasen: PehB und PehC, eine Pectinmethyl-Esterase: Pme). Deletionsmutanten von *egl*, *pehA* und *pehB* zeigten einen abgeschwächt virulenten Phänotyp, Mutationen in den

anderen Genen hatten keinen Einfluss auf die Virulenz von *Ralstonia solanacearum*. Ein avirulenter Phänotyp war bei keiner der Mutanten festzustellen (Denny et al., 1990; Huang & Allen, 2000; González & Allen, 2003; Liu et al., 2005). Besonders intensiv untersucht wurden die Zellwand-degradierenden Enzyme von Enterobacteriaceen, die bis 1998 in der Gattung *Erwinia* zusammengefasst wurden (Hauben et al., 1998) und bei vielen wichtigen Kulturpflanzen Weichfäulen hervorrufen. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum* und *Dickeya chrysanthemi* zum Beispiel produzieren große Mengen dieser Enzyme, wodurch die Integrität der Zellwand gestört, das Gewebe aufgelöst und so die Auslösung der Weichfäule ermöglicht wird (Collmer et al., 1985; Pirhonen et al., 1991; Bell, et al., 2004; Toth & Birch, 2005).

#### 2.2.4 TypIII-Sekretionssystem

Wie bereits erwähnt, verfügen die meisten phytopathogenen Proteobakterien, wie z.B. *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum* und verschiedene Xanthomonaden über ein TypIII-Sekretionssystem (TTSS) (Cornelis & Van Gijsegem, 2000). Auch bei der Symbiose von Rhizobien und Leguminosen spielt dieses System eine zentrale Rolle (Viprey et al., 1998; Marie et al., 2001).



**Abbildung 2.2:** Modell des TypIII-Sekretionssystems am Beispiel von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (nach Büttner & Bonas, 2002). HrpF: Translokation-Protein. IM: innere bakterielle Membran, OM: äußere bakterielle Membran, PM: Plasmamembran, Xops: *Xanthomonas outer proteins*.

Der TypIII-Sekretionsapparat (Abbildung 2.2) durchspannt die innere- und die äußere Zellmembran des Bakteriums und ist mit dem extrazellulären Hrp-Pilus assoziiert, der den Sekretionsapparat mit dem Translokon in der Zellmembran der Wirtszelle verbindet. Über das Translokon erfolgt letztlich der Transfer bakterieller Proteine in das Cytosol der Pflanzenzelle. Die Gene, die für Proteine des TTSS codieren, werden in phytopathogenen Bakterien aufgrund ihrer Bedeutung für die Virulenz und die Auslösung der Hypersensitiven Reaktion als *hrp*-(*hypersensitive response and pathogenicity*) und *hrc*-Gene (*hrp conserved*) bezeichnet (Bogdanove et al., 1996).

Ebenso wie bei Tier-Pathogenen werden über das TTSS bakterielle Proteine/Virulenzfaktoren (TTSS-Effektoren) über die Zellmembranen und die Zellwand des Bakteriums in das Cytosol der Wirtszelle (z.B. Avr-Proteine) oder auch in das umgebende Medium (z.B. Harpin-Proteine) transloziert (Van Gijsegem et al., 1993; Hueck, 1998). Die TTSS Effektoren fördern das Wachstum des Pathogens im Wirt, indem sie die Abwehr des Wirts inaktivieren und/oder Nährstoffe aus der Pflanzenzelle freisetzen (He et al., 2004; Mudgett, 2005). Die Inaktivierung des TTSS führt z.B. bei Bakterien der Gattungen *Pseudomonas*, *Xanthomonas* und *Ralstonia* zu einem avirulenten Phänotyp. Zudem können sich die Mutanten im Wirt nur noch schwach vermehren und lösen bei resistenten Wirtspflanzen keine HR mehr aus (Alfano & Collmer, 2004).

### 2.2.5 Quorum Sensing

Unter *Quorum-Sensing* (QS) werden Systeme zusammengefasst, bei denen Bakterien die Expression von Genen in Abhängigkeit von ihrer Populationsdichte regulieren (Fuqua et al., 1994). QS basiert auf der Interaktion eines kleinen diffusiblen extrazellulären Signalmoleküls (Autoinducer), dessen Konzentration mit zunehmender Populationsdichte ansteigt, mit einem regulatorischem Element. Erreicht die Konzentration des Autoinducers einen bestimmten Schwellenwert, wird ein Regulator direkt oder indirekt über eine Signalkaskade aktiviert und führt zur Induktion oder Repression der Zielgene (Cámara et al., 2002; Williams, 2007; Williams et al., 2007). Die meisten bisher identifizierten Autoinducer Gram-negativer Bakterien gehören zur Familie der N-Acylhomoserinlactone (AHLs). Bei Gram-positiven Bakterien handelt es sich hingegen meist um posttranslational modifizierte Peptide. Aber z.B. auch  $\gamma$ -Butyrolactone, Furanone oder Derivate langkettiger Fettsäuren können als *Quorum-Sensing*-Signale fungieren (Winzer et al., 2002; Williams, 2007; Schaefer et al., 2008; Atkinson & Williams, 2009).

Die Produktion der Autoinducer kann durch Wachstumsparameter wie die Temperatur oder die Zusammensetzung des Mediums beeinflusst werden und kann auch mit anderen Regulationsmechanismen verknüpft sein (Lazazzera, 2000; Brelles-Marino & Bedmar, 2001). In *Ralstonia solanacearum* wird z.B. das AHL-Signalmolekül nur in Gegenwart des  $\sigma^S$ -Faktors, welcher unter Hungerbedingungen maximal aktiv ist, synthetisiert (Flavier et al., 1997). In *Pseudomonas aeruginosa* hingegen wird die Transkription des  $\sigma^S$ -Faktors durch AHL positiv reguliert (Latifi et al., 1996). Bei *Vibrio fischeri* konnte bei Anzucht in komplexem Medium ein *Quorum-Sensing*-Inhibitor nachgewiesen werden, aber nicht, wenn die Zellen in einem

definiertem Minimalmedium wuchsen (Eberhard, 1972). Für *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* wiederum wurde das Haupt-AHL nach Anzucht in komplexem Medium identifiziert (Lithgow et al., 2000).

Das Autoinducer vermittelte *Cell-cell signaling* spielt unter anderem eine Rolle bei der Regulation der Antibiotikasythese, der EPS-Biosynthese, dem Plasmidtransfer und der Produktion von Virulenzfaktoren (Brelles-Marino & Bedmar, 2001). Bei *Pectobacterium carotovora* und *P. atrosepticum* werden u.a. die Synthese extrazellulärer Enzyme, die das Wirtsgewebe degradieren, durch *Quorum-Sensing* reguliert. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass die Bakterienpopulation genügend Enzym synthetisiert, um das Gewebe erfolgreich zu zerstören, und so der Wechsel von der biotrophen Invasions- in die nekrotrophe Mazerationsphase vollzogen werden kann (de Kievit & Iglewski, 2000; Smadja et al., 2004).

Für Gram-positive phytopathogene Bakterien wurde bislang noch keine QS-abhängige Genregulation beschrieben. In anderen Gram-positiven Bakterien, wie z.B. *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum* sowie verschiedenen Clostridien oder Streptomyceten ist diese populationsdichteabhängige Genregulation hingegen z.T. sehr gut untersucht (Folcher et al., 2001a; Folcher et al., 2001b; Wuster & Babu, 2008). Das Agr (*accessory gene regulator*) System ist ein unter Gram-positiven *Firmicutes* weit verbreitetes QS-System und wurde zuerst in *Staphylococcus aureus* identifiziert. In *S. aureus* ist das Agr-System wichtig für das Überleben des Pathogens in Epithel und Endothel-Zellen (Qazi et al., 2001) und ist an der Regulation der Virulenzgene und der Biofilmbildung beteiligt (Chan et al., 2004; Cheung et al., 2004; Novick & Geisinger, 2008). Bei dem Signal-Molekül handelt es sich um ein posttranslational modifiziertes Peptid, das von *agrD* codiert wird. Nach Prozessierung des AgrD-Proteins durch die membrangebundene Endopeptidase AgrB wird das resultierende Peptid-Thiolacton (AIP: *autoinducing peptide*), bei dem ein zentraler Cystein-Rest kovalent mit der C-terminalen Carboxylgruppe verbunden ist (zyklischer Thioester), sekretiert (Chan, Coyle, & Williams, 2004; Novick & Geisinger, 2008). Die AIP-abhängige Regulation wird durch einen Zwei-Komponenten-Regulator vermittelt. Nach Bindung von AIP an die Sensorkinase AgrC phosphoryliert diese den *Response-Regulator* AgrA, durch den die Transkription der Zielgene aktiviert wird (Ji et al., 1995; Chan et al., 2004; Novick & Geisinger, 2008).

### 2.3 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) ist ein Gram-positives, nicht-sporenbildendes Bakterium, das aufgrund von Analysen der 16S-rRNA und des Zellwandaufbaus in die Familie der *Microbacteriaceae* (Ordnung *Actinomycetales*) eingruppiert wird (Stackebrandt et al., 1997). Es gehört zu der sehr kleinen Gruppe Gram-positiver Pflanzenpathogene mit hohem GC-Gehalt, weist eine coryneforme Morphologie auf und ist unbegeißelt (Gartemann et al., 2008; Davis, 1984). Neben *Cmm* werden bislang nur vier weitere *Clavibacter michiganensis* Subspezies der Gattung *Clavibacter* zugeordnet, die alle phytopathogen sind. Weitere Arten sind für diese Gattung nicht beschrieben. Allen Subspezies gemein ist, dass sie systemische Infektionen auslösen und das vaskuläre System ihrer jeweiligen Wirtspflanze besiedeln (Vidaver, 1982). Eine Übersicht der verschiedenen Subspezies, ihrer Wirtspflanzen und der charakteristischen Krankheitssymptome kann Tabelle 2.1 entnommen werden.

**Tabelle 2.1:** Wirtspflanzen der verschiedenen *Clavibacter michiganensis* Subspezies und charakteristische Krankheitssymptome der Pflanzen nach Pathogenbefall (Vidaver, 1982).

<b>Cm-Subspezies</b>	<b>Wirtspflanze</b>	<b>Krankheitssymptome</b>
<i>insidiosus</i>	<i>Medicago sativa</i> (Luzerne)	bakterielle Welke
<i>michiganensis</i>	<i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate)	bakterielle Welke
<i>nebraskensis</i>	<i>Zea mays</i> (Mais)	Blatt- und Stängelfäule
<i>sepedonicus</i>	<i>Solanum tuberosum</i> (Kartoffel)	Bakterienringfäule
<i>tesselarius</i>	<i>Triticum aestivum</i> (Weizen)	Blattflecken

Das coryneforme, unbegeißelte Bakterium *Cmm* löst bei seiner Wirtspflanze (*Solanum lycopersicum*, Tomate) eine als bakterielle Welke oder auch als *bacterial wilt and canker* bezeichnete Tracheobakteriose aus (Davis et al., 1984). In den meisten Anbaugebieten für Tomaten wurden bereits Infektionen mit *Cmm* nachgewiesen (EPPO/CABI, 2005), die zu Ernteverlusten von bis zu 80 % führen können (Strider, 1969). Eine Infektion kann sowohl über infiziertes Saatgut als auch über Wunden des äußeren Pflanzengewebes (Strider, 1969) oder Hydathoden (Carlton et al., 1998) erfolgen. *Cmm* ist ein biotrophes und nur moderat nekrotrophes Bakterium. Nach Infektion besiedelt es die Xylemgefäße (Abbildung 2.3, D), breitet sich systemisch aus und kann Titer von bis zu  $1 \times 10^{10}$  Bakterien pro Gramm Frischgewicht der Pflanze erreichen (Berpohl, 1990). Erst in späteren Infektionsphasen kann *Cmm* z.B. auch im Parenchymgewebe nachgewiesen werden (Benhamou, 1991). Die hochtitrige Besiedlung des Xylemsafts auch durch nicht virulente *Cmm*-Stämme ist erstaunlich, da der Xylemsaft keine hohen Nährstoffkonzentrationen enthält (Purcell & Hopkins, 1996).



**Abbildung 2.3:** Mit *Cmm* infizierte Tomatenpflanzen 4 Wochen nach Infektion mit *Cmm*. A-C: Durch *Cmm* hervorgerufene Krankheitssymptome. A: Fiederblattwelke, B und C: Sprossläsion, D: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme: Querschnitt eines mit *Cmm* besiedelten Xylemgefäßes (REM-Aufnahme: T. Trapphoff).

Das erste Symptom der Krankheit ist die unifasciale Fiederblattwelke, bei der sich die Fiederblätter von den Blatträndern her einrollen und ihre Turgeszenz verlieren. Im weiteren Krankheitsverlauf nimmt die Intensität der Welke zu und es treten Sprossläsionen (*canker*) auf (Abbildung 2.3, A-C), die die Pflanze in ihrer Standfestigkeit beeinträchtigen können (Wallis, 1977). In diesem Stadium werden auch Zellwände des das Xylem umgebenden Gewebes degradiert, so dass *Cmm* das Xylem verlassen und in das Parenchymgewebe vordringen kann (Benhamou, 1991). Zudem kann beobachtet werden, dass *Cmm* über Sprossläsionen an die Oberfläche infizierter Pflanzen gelangen kann (Abbildung 2.3, C). Abhängig von der Virulenz des *Cmm*-Stamms und der Intensität der Infektion kann die Pflanze schließlich absterben (Wallis, 1977). Verläuft eine Infektion relativ mild, so dass keine oder nur schwache Krankheitssymptome zu erkennen sind (latente Infektion) und eine Fruchtbildung möglich ist, kann kontaminiertes Saatgut entstehen, da *Cmm* auch in die Samen gelangen kann (Tsiantos, 1987). Im Erdreich kann *Cmm* nur dann mehrere Jahre persistieren, wenn es mit abgestorbenem Pflanzenmaterial assoziiert ist (Fatmi & Schaad, 2002).

### 2.3.1 Charakteristika von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382

Das Genom des *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Stamms NCPPB382 umfasst das etwa 3,3 Mb große zirkuläre Chromosom und die beiden endogenen zirkulären Plasmide pCM1 (27,4 kb) und pCM2 (70,0 kb) (Gartemann et al., 2008). *Cmm* gehört wie bereits erwähnt zu der Familie der *Microbacteriaceae* und weist dementsprechend mit 72,6 (Chromosom), 66,5 bzw. 67,6 % (pCM1 und pCM2) einen sehr hohen GC-Gehalt der DNA auf. Erste Analysen zur Virulenz dieses Stamms ergaben, dass jedes der beiden Plasmide wesentlich für die Ausbildung von Krankheitssymptomen ist (Meletzus et al., 1993). Derivate von NCPPB382, die nur eins der beiden Plasmide enthalten (CMM101, nur pCM1; CMM102, nur pCM2), zeigen einen deutlich verringert virulenten Phänotyp als der Wildtypstamm. Die Infektion von Tomaten mit einem plasmidfreien Derivat (CMM100) führt lediglich zu einer leicht verringerten Biomasse der Pflanzen. Die Ausbildung von Krankheitssymptomen kann nicht beobachtet werden, allerdings ist die Kolonisierung der Tomate nach dem Verlust

beider Plasmide nicht eingeschränkt. *In planta* werden ebenso hohe Titer erreicht wie nach Infektion mit NCPPB382. Auch die für *Cmm* typische Bildung großer Mengen an Exopolysacchariden (EPS), die auf Festmedien eine mucoide Koloniemorphologie bedingt, ist bei CMM100 festzustellen. Alle Gene, die die Infektion und hochtitrige Besiedlung des Wirts ermöglichen, sind folglich auf dem Chromosom lokalisiert. Die Annahme, dass die Welkesymptome vor allem durch eine Verstopfung der Xylemgefäße durch die Bakterien und das von ihnen gebildete EPS hervorgerufen werden, konnte verworfen werden. Denn zum einen ist der EPS-produzierende CMM100 avirulent und zum anderen sind Mutanten, die eine stark reduzierte EPS-Produktion aufweisen und beide Plasmide enthalten, nur minimal in ihrer Virulenz eingeschränkt (Bermpohl et al., 1996; Schauer, 2004). Im Vergleich zu Pflanzen, die mit dem Wildtyp infiziert wurden, weisen mit EPS<sup>-</sup>-Mutanten infizierte Pflanzen allerdings eine höhere Biomasse auf. Das EPS trägt offenbar durch Erzeugung von zusätzlichem Wasserstress zur Intensivierung der Welkesymptome bei, ist aber kein essentieller Virulenzfaktor.

### **CelA und Pat-1 - essentielle Virulenzfaktoren von NCPPB382**

Bei den auf pCM1 und pCM2 lokalisierten Virulenzfaktoren handelt es sich um *celA* und *pat-1*. Die Komplementation des avirulenten CMM100 mit einem dieser beiden Gene führt zu einem virulenten Phänotyp (Dreier et al., 1997; Jahr et al., 2000).

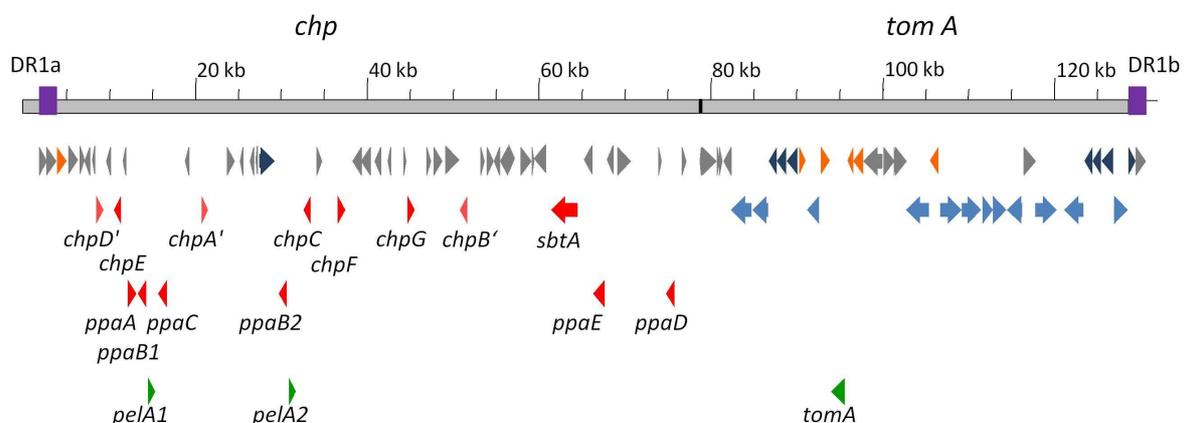
*celA* (pCM1) codiert für eine  $\beta$ -1,4-Endoglucanase (Cellulase). Neben der für bakterielle Endoglucanasen typischen katalytischen Domäne und einer Cellulose-Bindedomäne weist CelA eine C-terminale Domäne auf, die homolog zu pflanzlichen  $\alpha$ -Expansinen ist. Eine chromosomal codierte Cellulase (CelB, CMM\_2443), die keine Expansindomäne aufweist, und ein ebenfalls chromosomal codiertes Expansin (CMM\_1480) scheinen nicht an der Ausbildung der Krankheitssymptome beteiligt zu sein. Auch konnte die Zersetzung kristalliner Cellulose nur für CelA nachgewiesen werden. Expansine bewirken vermutlich durch Auflösung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Polysacchariden der Zellwand eine Auflockerung der Zellwand und erleichtern so das Streckungswachstum der Pflanze (Shcherban et al., 1995; Cosgrove, 1998). CMM100, der mit einem modifizierten *celA* (deletierte Expansindomäne) komplementiert wurde, ist immer noch avirulent und auch nicht in der Lage, kristalline Cellulose zu zersetzen. Die Expansindomäne von CelA ist also essentiell für die Auslösung der Welkesymptome und (eventuell durch die Auflockerung des Cellulosepolymers) für die Degradierung kristalliner Cellulose (Jahr et al., 2000). Neben der Cellulaseaktivität (CelA) konnte für *Cmm* eine Polygalacturonase- (Hildebrandt, 1971; Beimen et al., 1992), eine Pectinmethylesterase- (Strider, 1969) und eine Xylanaseaktivität (Beimen et al., 1992) nachgewiesen werden. Diese chromosomal codierten Enzyme, die ebenso wie CelA Komponenten der pflanzlichen Zellwand degradieren, sind eventuell auch an der Auslösung der Welkesymptome beteiligt. Allerdings reicht die Aktivität dieser Enzyme nicht aus, um in Abwesenheit von CelA und Pat-1 die Krankheitssymptome auszulösen.

*pat-1* (pCM2) codiert für eine mögliche Serinprotease des Trypsintyps (Serinprotease-Familie S1A). Aufgrund eines N-terminalen Leaderpeptids wird eine Sekretion von Pat-1 vermutet. Im Gegensatz zu CelA konnte bislang weder die Sekretion noch die katalytische Aktivität von

Pat-1 nachgewiesen werden (Dreier et al., 1997). Allerdings ist eine Mutante (ohne pCM1), bei der das Serin-Codon der möglichen katalytischen Triade von Pat-1 gegen ein Threonin-Codon ausgetauscht wurde, avirulent. *pat-1* scheint demnach eine funktionale Serinprotease zu codieren (Niermann, 1997; Burger, et al., 2005). Neben Pat-1 konnten neun weitere extrazelluläre Serinproteasen der S1A-Familie für NCPPB382 identifiziert werden, die als Chp-Familie bezeichnet werden. *phpA* und *phpB* (*plasmidial homology of pat-1*) liegen wie *pat-1* auf pCM2 (Pieper, 2001), die weiteren sieben Gene, *chpA-chpG* (*chromosomal homology of pat-1*) sind auf dem Chromosom lokalisiert (Melkonyan, 1993; Burger et al., 2005; Stork et al., 2008). *chpA*, *chpB* und *chpD* sind allerdings Pseudogene, da sich innerhalb der codierenden Sequenzen *frameshifts* und/oder Stoppcodons befinden (Stork et al., 2008). Vierzehn weitere extrazelluläre Serinproteasen konnten der Ppa- (S1X-Familie) bzw. der Subtilase-Familie zugeordnet werden. *ppaJ* ist das einzige der elf *ppa*-Gene, das auf pCM1 lokalisiert ist. Alle weiteren *ppa*'s und die drei *sbt*-Gene befinden sich auf dem Chromosom (Gartemann et al., 2008).

### Die *chp/tomA*-Region und ihre Bedeutung für die pathogene Interaktion

Bei einem Screening von Transposonmutanten wurde eine avirulente CMM101-Mutante (CMM101β330-18) identifiziert, die die Tomate nur noch eingeschränkt kolonisieren kann (maximaler Titer:  $2,8 \times 10^4$  Bakterien/g Pflanzenhomogenat) (Kirchner, 2003). Der Versuch den Phänotyp dieser Mutante durch Einbringen einer intakten Kopie des Gens, welches durch das Transposon inaktiviert wurde (CMM\_0135: konserviert hypothetisches Protein, mögliche GTP-Pyrophosphokinase), zu komplementieren, schlug fehl (Abt, 2003). Eine genauere Charakterisierung von CMM101β330-18 ergab, dass eine etwa 130 kb große chromosomale Genregion deletiert war (Schott, 2004; Gartemann et al., 2008). Diese als *chp/tomA*-Region (Abbildung 2.4) bezeichnete Pathogenitätsinsel weist einen niedrigen GC-Gehalt (*chp*-Region: 64,6 %, *tomA*-Region: 66,8 %) auf und ist von 1,9 kb großen *direct repeats* flankiert.



**Abbildung 2.4:** Physikalische Karte der *chp/tomA*-Region von NCPPB382. Die flankierenden *direct repeats* sind als violette Rechtecke dargestellt. Farblich besonders hervorgehoben sind Gene, die für folgende Proteine codieren: **rot: extrazelluläre Serinproteasen** der Chp-, Ppa- und der Subtilase-Familie; **grün: extrazelluläre Enzyme**; **blau: Glycosidasen**; **dunkelblau:** weitere Proteine des Zuckermetabolismus und Zuckertransporter; **orange:** Transkriptionsregulatoren.

In der *chp*-Region sind alle sieben *chp*-Gene, sechs der zehn chromosomalen *ppa*-Gene sowie zwei für Pectatlyasen codierende Gene (*peIA1*, *peIA2*) lokalisiert. Die in der *tomA*-Region lokalisierten Gene codieren überwiegend Proteine des Zuckertransports und -metabolismus, darunter auch 12 Glycosidasen. *tomA* codiert für eine Tomatinase, die an der Detoxifizierung von  $\alpha$ -Tomatin, einem Alkaloid der Tomate, beteiligt ist (Kaup et al., 2005). Eine der *chp/tomA*-Region entsprechende Genregion liegt im ebenfalls sequenzierten *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*)-Typstamm nicht vor (Bentley et al., 2008). Auch konnten zu vielen aber nicht allen der in dieser Region lokalisierten Gene keine entsprechenden Orthologe in *Cms* identifiziert werden.

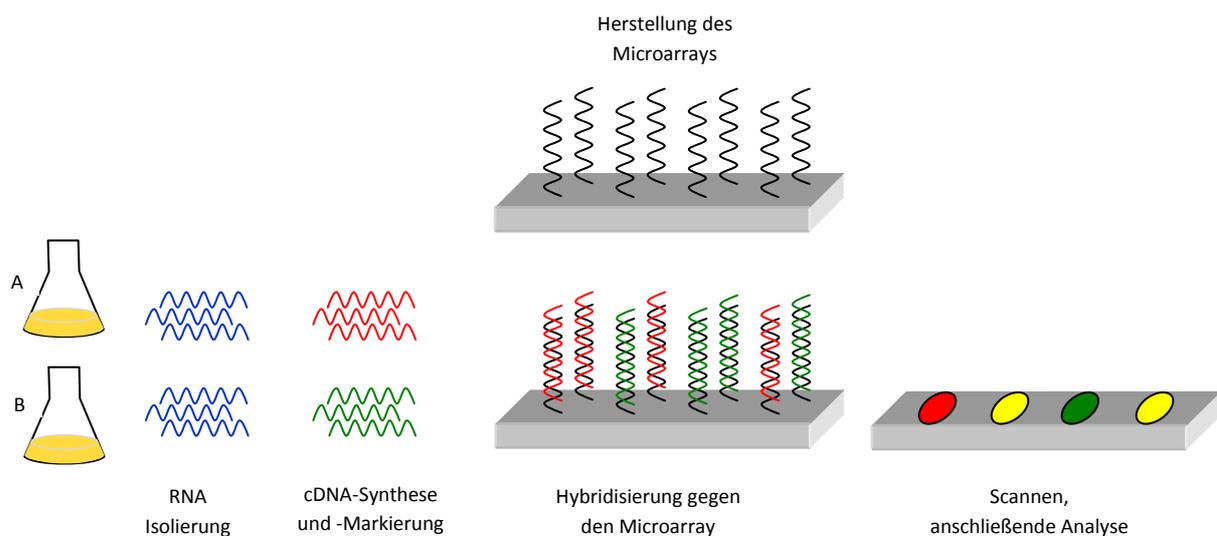
Aufgrund des Phänotyps der Deletionsmutante CMM101 $\beta$ 330-18 war also anzunehmen, dass Gene der *chp/tomA*-Region essentiell für die effektive Kolonisierung der Wirtspflanze sind und an der Ausbildung der Welkesymptome beteiligt sein können. Allerdings ist nicht bekannt, welche Gene dieser 130 kb großen Region an der pathogenen Interaktion von *Cmm* mit seinem Wirt beteiligt sind. *tomA*, welches das  $\alpha$ -Tomatin der Tomate spaltet, scheint keine wesentliche Bedeutung in der Interaktion mit der Tomate zu haben. Eine entsprechende CMM101-Mutante war ebenso virulent wie der Kontrollstamm CMM101 (Kaup et al., 2005). Die Analyse von *Cmm*-Stämmen, die zwischen 1994 und 2007 aus infizierten Tomatenpflanzen in Israel und den Niederlanden isoliert wurden, zeigte hingegen, dass der Phänotyp von CMM101 $\beta$ 330-18 möglicherweise durch das Fehlen der *chp*-Gene erklärt werden kann. Einige dieser Stämme sind avirulent, obwohl sie *pat-1* und *celA* enthalten, und erreichen in der Pflanze einen deutlich geringeren Titer als NCPPB382 ( $1 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^7$ /g Pflanzenhomogenat). Allerdings konnte in jedem dieser Stämme durch Hybridisierungen und/oder PCR nur maximal eins der *chp*-Gene nachgewiesen werden. Die untersuchten virulenten Isolate enthalten dagegen Homologe zu allen 7 *chp*-Genen (Steingröver, 2003; Gräfen, 2005; Kleitman et al., 2008).

Letztlich wurde durch gezielte Inaktivierung von *chpC*, *ppaA* und *ppaC* gezeigt, dass diese Gene benötigt werden, um *in planta* einen für NCPPB382 typischen Titer von  $1 \times 10^9$  bis  $1 \times 10^{10}$ /g Pflanzenhomogenat zu erreichen. Alle drei Mutanten erreichten in Pflanzentests nur noch einen maximalen Titer von  $1 \times 10^7$  bis  $5 \times 10^8$ /g Pflanzenhomogenat und zeigten einen verringerten Virulenzgrad. Der stärkste Effekt war bei der *chpC*-Mutante zu erkennen (Schott, 2004; Stork et al., 2008; Abt & Eichenlaub, unveröffentlicht). Unklar ist, ob die Deletion dieser Gene neben einer Reduktion der Kolonisierungsfähigkeit auch einen direkten Einfluss auf die Virulenz hat. Währenddessen zeigte eine *chpG*-Mutante keine Veränderung bezüglich der Interaktion mit der Tomate. Allerdings war im Gegensatz zu den anderen Mutanten die Fähigkeit, bei der Nichtwirtspflanze *Mirabilis jalapa* eine Hypersensitive Reaktion auszulösen, nicht mehr vorhanden (Stork et al., 2008).

## 2.4 Microarray-Analysen (Genomweite Analyse des Transkriptoms)

Vergleicht man die Expression aller Gene eines Organismus unter zwei verschiedenen Wuchsbedingungen so können alle Gene identifiziert werden, deren Expression unter einer der beiden gewählten Bedingungen modifiziert wird. Dadurch können z.B. Rückschlüsse auf die Funktion der differentiell exprimierten Gene gezogen und zeitliche Abläufe oder Zusammenhänge zwischen verschiedenen physiologischen Prozessen aufgeklärt werden.

Die Microarraytechnologie (Abbildung 2.5) bietet die Möglichkeit solche vergleichenden Genexpressionsanalysen durchzuführen. Eine wesentliche Voraussetzung für die Nutzung dieser Technologie besteht darin, dass das Genom des zu untersuchenden Organismus sequenziert und annotiert ist. Erst dann ist die Herstellung genspezifischer Oligonukleotide, die meist eine Länge von 50-70 bp haben, für einen genomweiten Microarray möglich. Die Oligonukleotide werden als *spots* an genau definierten Positionen auf Epoxyglasobjektträgern aufgetragen, auf denen bis zu  $1 \times 10^4$  *spots* pro  $\text{cm}^2$  enthalten sein können, und über chemisch aktive Gruppen kovalent an diesen gebunden. Über die jeweilige Position eines *spots* auf dem Array kann jedem *spot* das entsprechende Gen zugeordnet werden. (Schna et al., 1995; Ye et al., 2001).



**Abbildung 2.5:** Schematische Übersicht eines Microarrayexperiments.

Zur vergleichenden Analyse der Genexpression eines Organismus unter zwei verschiedenen Bedingungen wird zunächst die RNA beider Proben isoliert und revers in cDNA transkribiert. Nach Markierung der cDNAs mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen können diese zusammen gegen den Microarray hybridisiert werden (Eisen & Brown, 1999) und die Signalintensitäten beider Farbstoffe für jeden *spot* mittels eines entsprechenden Fluoreszenz-Scanners und geeigneter Software ermittelt werden (Abbildung 2.5). Anhand der Unterschiede der Signalintensitäten beider Farbstoffe kann nun für jedes Oligonukleotid und somit für das dadurch repräsentierte Gen das Verhältnis der Genexpression zwischen Kontroll- und Versuchsbedingung bestimmt werden.

## 2.5 Zielsetzung

Die Microarraytechnologie ermöglicht genomweite Analysen des Transkriptoms eines Organismus unter verschiedensten Bedingungen. Nach der vollständigen Sequenzierung und Annotation des Genoms des *Cmm*-Stamms NCPPB382 waren die Voraussetzungen zur Nutzung dieser Technologie gegeben und sollte nun auch für dieses Gram-positive, phytopathogene Bakterium etabliert werden. Durch Microarrayanalysen sollten Gene identifiziert werden, die für die Pathogenität von *Cmm* relevant sind. Des Weiteren wäre es für das Verständnis der molekularen Mechanismen der Interaktion von *Cmm* mit seiner Wirtspflanze von Vorteil, wenn auch erste Einblicke in die daran beteiligten Regulationsmechanismen gewonnen werden würden. Für diesen Zweck sollte sowohl das Expressionsmuster von *Cmm in planta* als auch in verschiedenen die Pflanzenumgebung simulierenden *in vitro*-Systemen untersucht werden. *In vitro*-Systeme haben den Vorteil, dass die verwendeten Bedingungen besser reproduziert werden können als *in planta*. Zudem kann die Reaktion von *Cmm* z.B. auf einzelne Komponenten der Pflanze genauer untersucht werden.

Neben den Microarrayexperimenten war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, den Xylemsaft der Tomate zu analysieren. Zum einen sollte geklärt werden, welche Substanzen des Xylemsafts von *Cmm* verwertet werden können und ob sich eine unterschiedliche Verwertung der einzelnen Nährstoffe auch in den Microarraydaten widerspiegelt. Zum anderen war es von Interesse, herauszufinden, inwiefern sich die Zusammensetzung des Xylemsafts infizierter und nicht-infizierter Pflanzen voneinander unterscheidet. Hierbei sollte durch Verwendung verschiedener *Cmm*-Stämme auch untersucht werden, ob die Virulenz und die Kolonisationsfähigkeit dieser Stämme einen Einfluss auf die Metabolitkonzentrationen im Xylemsaft haben.

### 3 Material

#### 3.1 Bakterienstämme

##### *Escherichia coli*

**Tabelle 3.1:** In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme.

Stamm	Genotyp, wichtige Eigenschaft	Referenz
DH5 $\alpha$ mcr	F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> $\lambda$ <i>recA1</i> , <i>gyrA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , <i>mcrA</i> , $\Delta$ ( <i>lacXYA-argF</i> )- <i>U169</i> $\Phi$ 80 <i>dlacZM15</i> , $\Delta$ ( <i>mrr hsdMS mcrBC</i> )	(Grant et al., 1990)
GM119	F <sup>-</sup> , <i>dcm-6</i> , <i>dam-3</i> , <i>met<math>\beta</math>1</i> , <i>galk2</i> , <i>galT22</i> , <i>lacY1</i> , <i>tsx-78</i> , <i>supE44</i>	(Marinus & Morris, 1973)

##### *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

**Tabelle 3.2:** In dieser Arbeit verwendete *Cmm*-Stämme.

Stamm	Genotyp, wichtige Eigenschaft	Referenz
<i>Cmm</i> NCPPB382	virulent, <i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate)	NCPPB
CMM100	Curing-Derivat von <i>Cmm</i> NCPPB382, plasmidfrei	(Meletzus & Eichenlaub, 1991)
CMM101	Curing-Derivat von <i>Cmm</i> NCPPB382, pCM1	(Meletzus & Eichenlaub, 1991)
CMM102 <sub>Nm</sub>	Nm <sup>R</sup> , pCM2 <sub>Nm</sub> Kointegrat pCM2/pHJ21	(Jahr, 2000; Abt, 2008)
CMM100white <sub>Cm</sub>	CMM100, Cm <sup>R</sup> , <i>crtBI::cmx</i> ; Carotinoid-Mutante, weißer Phänotyp, plasmidfrei	(Abt, 2008)
CMM100white <sub>Cm/Sm</sub>	CMM100white <sub>Cm</sub> , Sm <sup>R</sup> , Spontanresistenz	(Winter, 2008)
<i>Cmm</i> CatR7 $\beta$	<i>Cmm</i> NCPPB382, Cm <sup>R</sup> , <i>catR::cmx</i>	(Mayer, 2006)
<i>Cmm</i> CatR7 $\beta$ pCM2 <sub>Nm</sub>	<i>Cmm</i> CatR7 $\beta$ , Cm <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup> , pCM1, pCM2 <sub>Nm</sub> : Kointegrat pCM2/pHJ21	(Winter, 2008)
CMM101 <i>dtxRA1</i>	CMM101, Cm <sup>R</sup> , <i>dtxR::cmx</i>	(Kraz, 2004)
CMM101 <i>chpC<math>\beta</math></i>	CMM101, Cm <sup>R</sup> , <i>chpC::cmx</i> , pCM1	(Gräfen, 2005)
<i>Cmm</i> 1624	<i>Cmm</i> NCPPB382, Cm <sup>R</sup> , CMM_1624::cmx	diese Arbeit
CMM101_1624	CMM101, Cm <sup>R</sup> , CMM_1624::cmx	diese Arbeit

### 3.2 Plasmide und Vektoren

**Tabelle 3.3:** In dieser Arbeit verwendete Plasmide und Vektoren.

Plasmid / Vektor	relevante Eigenschaften	Referenz
pUC18	lacZ $\alpha$ -Komplementationssystem, Ap <sup>R</sup>	(Vieira & Messing, 1982; Yanisch-Perron et al., 1985)
pSmart	Klonierungsvektor, Ap <sup>R</sup>	Lucigen Corp., Middleton, WI, USA
pOKUcmB $\alpha$	pUC19::1,5 kb BamHI ( <i>cmx</i> ); Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	(Kirchner, 2003)
Cmis2p0159d05	geschertes 2,3 kb Fragment aus <i>Cmm</i> NCPPB382, kloniert in pSMART, flankiert von <i>Eco</i> RI-Schnittstellen; CMM_1624, CMM_tRNA_0026 (tRNA-Val(TAC)), CMM_1623; Ap <sup>R</sup>	Genomprojekt <i>Cmm</i> NCPPB382, IIT Bielefeld, (Gartemann et al., 2008)
pMF1624 $\beta$	Cmis2p0159d05 mit in <i>Bam</i> HI-Deletion kloniertem <i>cmx</i> -Gen (1,5 kb- <i>Bam</i> HI-Fragment) aus pOKUcmB $\alpha$ ; <i>cmx</i> in entgegengesetzter Richtung wie CMM_1624; Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit

### 3.3 Pflanzenmaterial

**Tabelle 3.4:** In dieser Arbeit verwendete Pflanzensamen.

Pflanzensamen	Herkunft
<i>Solanum lycopersicum</i> cv. "Moneymaker" (Tomate)	Erfurter Saatgut, N. L. Chrestensen, Erfurter Samen- und Pflanzenzucht GmbH
<i>Mirabilis jalapa</i> , gelbe Naturform	Gärtnerei der Universität Bielefeld
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Gärtnerei der Universität Bielefeld
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun	Gärtnerei der Universität Bielefeld

### 3.4 Enzyme und Chemikalien

#### 3.4.1 Enzyme

**Tabelle 3.5:** In dieser Arbeit verwendete Enzyme.

Bezugsquelle	Enzym
New England Biolabs	Antarktische Phosphatase, Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase
Serva	RNaseA
Sigma	Lysozym
Bioline	BioScript Reverse Transkriptase

#### Ligase-Puffer (Firma New England Biolabs)

1xT4-DNA-Ligase-Puffer	50 mM	Tris-HCl	
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>	
	10 mM	Dithiothreitol	
	1 mM	ATP	
	25 mg/ml	BSA	→ pH 7,5

#### 3.4.2 Restriktionsendonukleasen und -Puffer

**Tabelle 3.6:** In dieser Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen; / gibt die Schnittstelle an.

Enzym	Restriktionspuffer	Erkennungssequenz 5'→3'
<i>Bam</i> HI	NEBuffer 3	G/GATCC
<i>Bgl</i> II	NEBuffer 3	A/GATCT
<i>Eco</i> RI	NEBuffer EcoRI	G/AATTC
<i>Fsp</i> I	NEBuffer 4	TGC/GCA
<i>Hind</i> III	NEBuffer 2	A/AGCTT
<i>Msc</i> I	NEBuffer 4	TGG/CCA
<i>Nco</i> I	NEBuffer 3	C/CATGG
<i>Pst</i> I	NEBuffer 3	CTGCA/G
<i>Sma</i> I	NEBuffer 4	CCC/GGG
<i>Sph</i> I	NEBuffer 2	GCATG/C
<i>Xba</i> I	NEBuffer 4	T/CTAGA

## Zusammensetzung der verwendeten Restriktionspuffer (10x konzentriert)

NEBuffer 2	10 mM	Tris-HCl	
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>	
	50 mM	NaCl	
	1 mM	Dithiothreitol	→ pH 7,9
NEBuffer 3	50 mM	Tris-HCl	
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>	
	100 mM	NaCl	
	1 mM	Dithiothreitol	→ pH 7,9
NEBuffer 4	20 mM	Tris-Acetat	
	10 mM	Mg-Acetat	
	50 mM	K-Acetat	
	1 mM	Dithiothreitol	→ pH 7,9
NEBuffer <i>EcoRI</i>	100 mM	Tris-HCl	
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>	
	50 mM	NaCl	
	0,02 %	Triton X-100	→ pH 7,5

## 3.4.3 Oligonukleotidprimer für PCR

Tabelle 3.7: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotid-Primer.

Amplifikat / Annealingtemp.	Größe des Amplifikats [bp]	Primer	Nukleotidsequenz
<i>celA</i> / 55°C	502	PFC1	gtctgagctctggtacacat
		PRC3	tcgtctcgaacttcgtaccg
<i>pat-1</i> / 55°C	851	P6	cgtcaggaggtcgctaata
		<i>pat-1</i> fwd	gctactatgcagttcatgtc

### 3.4.4 Oligonukleotidprimer für *real-time*-RT-PCR

Die Auswahl geeigneter Primer für die *real-time*-RT-PCR erfolgte in Zusammenarbeit mit Burkhard Linke (CeBiTec, Uni Bielefeld). Die Primer wurden mit dem Programm "primer3" generiert und ihre Eindeutigkeit mittels Blastn-Vergleichen überprüft. Die Primer sollten möglichst 18-21 bp umfassen und eine Schmelztemperatur von etwa 60°C aufweisen. Es sollte zudem möglichst ein Bereich im ersten Drittel des jeweiligen Gens amplifiziert werden und optimalerweise ein Amplifikat von etwa 200 bp synthetisiert werden.

**Tabelle 3.8:** In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotidprimer für *real-time*-RT-PCR. Die Annealingtemperatur lag bei allen verwendeten Primern bei 55°C. Die Positionsangaben der Primer sind auf die Lage der Primer innerhalb des ORFs ausgehend von der ersten Base des Startcodons bezogen.

Gen	Nukleotidsequenz	ORF [bp]	Position der Primer	Amplifikatgröße [bp]
CMM_0007 <i>gyrA</i>	agatcaccgacaagtacggc ggtggtgacgaagaagtgc	2688	1600-1620 1815-1835	235
CMM_0041 <i>ppaA</i>	ccagaagcaaagtccgtctc ctctcgggacctgatagtcg	980	260 - 280 514 - 534	274
CMM_0044 <i>ppaC</i>	tgcgcaagctccctatatct ggtggacgtcatctcctcat	1014	1 - 21 219 - 239	238
CMM_0052 <i>chpC</i>	atcgctcttgggctaattg cgcgcaacacagtgattag	861	45 - 63 250 - 268	242
CMM_0059 <i>chpG</i>	ataggggctgctcttctcg cgaggacgaggtagcgaac	834	39 - 57 252 - 270	250
CMM_0095 <i>cytB</i>	gattcgctctggacatcgac gatgccatcatcgctgctc	198	4 - 24 76 - 95	91
CMM_0100 <i>bglF</i>	aggagaccaccgacagac ggtccaatccgagaccacc	2256	502 - 520 707 - 725	242
CMM_0103 <i>bglI</i>	ggagagctcgcttcgctac agcttctccctgatggtcg	1767	347 - 365 562 - 580	252
CMM_0166 <i>fhuD</i>	gtgatcacgagacgacgaac ggtctccacgacgttccact	990	0 - 20 195 - 215	215
CMM_0601 <i>hemO</i>	cgcccagcactactcatct gaggtagcgcgtgtagtggt	663	134 - 154 372 - 392	258
CMM_0866	gacctcacgaagaagatcgc agtccgggttcttgatgatg	1365	573 - 593 781 - 801	228
CMM_0877 <i>araD</i>	ctcttcgtcatcaagccctc ggtgcttgtagtagacggt	711	141 - 161 671 - 691	550

CMM_0879	gacaaggtgcaggaccagat ctcgatggtcttctctcgg	1131	243 - 263 522 - 542	299
CMM_0880	atctccgcaagctctacaa gatgttcacgacttccggt	1530	954 - 974 1170 - 1190	236
CMM_1129	gacgagattgtcctcatcgg gagccaggtgaggttcacg	993	432 - 452 652 - 671	239
CMM_1461 <i>dpsA</i>	agttcctcgacgtcctcgt tggctgttgacgtcgtatct	486	163 - 182 393 - 412	249
CMM_1624	ctcccgacttcacatgc ggacaccctcctgccagtc	591	78 - 97 239 - 258	180
CMM_1973	cttcgtcgacaaggtgttcc gactgcagctgtccgtagc	1332	773 - 793 975 - 994	221
CMM_2094 <i>alcA</i>	ctcgacctcgacctcgtc gaagaagtctcgcgggatg	1371	87 - 104 269 - 287	219
CMM_2095	gtcaacacgtcgtatggacac gctcttctccacgtgaagt	1611	396 - 416 636 - 656	260
CMM_2804	cagagatcgctcacactgct gtgacgtacccgaagacctc	495	6 - 26 230 - 250	244
CMM_2878	ctcgcttacgtcttcatggt agtagaaggcgtcgttgctc	1452	912 - 932 1183 - 1203	291
CMM_PSEUDO_0008 <i>chpA</i>	gataggcctttgtttgtggc gttgatatgggggtgattcg	294	12 - 32 227 - 247	235
pCM1_0020 <i>celA</i>	tcaagcagatgggggtcac ctccggatactgcgatgtg	2241	355 - 373 569 - 587	251
pCM1_0023 <i>ppaI</i>	cgtctgttacctcccagg cgccgagactgttgatctc	942	73 - 91 261 - 279	225
pCM2_0024 <i>trbL</i>	tcagatggtcgacggcttc ttgcgagtaagcatcggag	1293	131 - 149 410 - 428	316
pCM2_0030	tctggctctcactccttgggt agtccactgcagccatctct	669	414 - 434 598 - 618	204
pCM2_0035 <i>rhsA</i>	tcgatctcaacctcaagcg tcgaccttggtgagctgtc	3405	778 - 796 988 - 1006	247
pCM2_0052 <i>phpB</i>	agcaciaaattcccaccacc gtggcaacgtaccgaacag	855	9 - 27 265 - 283	293
pCM2_0053 <i>phpA</i>	atcgatctctcgattgtccg ccaattgcacatgagtccag	834	351 - 371 573 - 593	242

### 3.4.5 Chemikalien und Kits

**Tabelle 3.9:** In dieser Arbeit verwendete Chemikalien.

Bezugsquelle	Chemikalien / Material
Amersham Bioscience	CyScribe GFX Purification Kit, Hybond N-Filter, Sephadex
Bioline	dNTPs (je 10 mM)
Biozym	Agarose Seakem LE
Eurogentec, Equibio	Elektroporations-Küvetten (2 mm Elektrodenabstand)
GE Healthcare	Cy-3-NHS-Ester, Cy-5-NHS-Ester
GibcoBRL	Select Agar, Select Tryptone 140, Select Yeast Extract
Macherey und Nagel	Porablot NY amp, 0,2 µm
Merck	alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien
Millipore	Microcon-Filter (Ultracel YM-30), Millex®-GV, 0,22 µm (Sterilfilter)
Peqlab	10x Reaktionspuffer S, PCR-Puffer
Promega	SV Total RNA Isolation Kit, Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System
Quantace	SensiMix One-Step Kit
Roche	DIG DNA Labeling and Detection Kit, NBT/BCIP Stock Solution (8,75 mg/ml / 9,4 mg/ml in 67 % (v/v) DMSO), Blocking Reagenz
Roth	Ampicillin, Glasperlen, Glycerin, Glycin, Natriumchlorid, Tween80, X-Gal
Sartorius	Nitrocellulose Nitrat Filter (Porengröße, 0,45 µm)
Schott	4 x Nexterion Block E, Nexterion Slide E
Serva	Bromphenolblau, N-Laurylsarkosyl, Silicon
Sigma	Chloramphenicol, Dimethylformamid, EDTA, EGTA, Kanamycin, Lysozym, Mineralöl, Natriumhydroxid, Neomycin, Sorbitol, Tris-HCl, Triton-X-100
Whatman	3 MM Papier

### 3.5 Nährmedien

Die Mengen der einzuwiegenden Substanzen beziehen sich jeweils auf 1 L H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub>.

<b>C-Medium</b>	10 g	Trypton	
	5 g	<i>Yeast Extract</i>	
	5 g	NaCl	
	5 g	Glucose	→ pH 7,5

<b>SB-Medium</b>	10 g	Trypton	
	5 g	<i>Yeast Extract</i>	
	5 g	NaCl	
	15 g	Agar (bei Festmedium)	add. 600 ml H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub>
	92 g	Sorbitol	
	5 ml	5 M CaCl <sub>2</sub>	
	20 ml	1 M MgCl <sub>2</sub>	add. 400 ml H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub>
		Nach dem Autoklavieren zusammengeben.	
<b>TBY-Medium</b>	10 g	Trypton	
	5 g	<i>Yeast Extract</i>	
	5 g	NaCl	→ pH 7,5
<b>M9-Medium</b>	6 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	3 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	0,5 g	NaCl	
	1 g	NH <sub>4</sub> Cl	→ pH 6,5 (mit KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> einstellen)
			<u>Nach Autoklavieren Zugabe folgender Komponenten:</u>
	20 ml	20 % Glucose	autoklaviert
	2 ml	1 M MgSO <sub>4</sub>	autoklaviert
	100 µl	0,1 M CaCl <sub>2</sub>	autoklaviert
	2,5 µl	200 mg/ml Thiamin	sterilfiltriert
	50 µl	10 mg/ml Nicotinsäure	sterilfiltriert
	100 µl	Spurenelementelösung	sterilfiltriert
	1 ml	30 mM Methionin	sterilfiltriert

### 3.5.1 Zusätze zu Nährmedien

Festmedium:	15 g	Agar pro 1 L Medium
<i>lacZ</i> -α-ω-Komplementation:	3 %	(v/v) X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid) in DMF (Dimethylformamid) gelöst
Spurenelemente-lösung (100 ml)	2 g	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O
	10 mg	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
	10 mg	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·4H <sub>2</sub> O
	10 mg	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> M <sub>6</sub> O <sub>24</sub> ·10H <sub>2</sub> O
	40 mg	ZnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O
	10 mg	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O

### 3.5.2 Antibiotika

**Tabelle 3.10:** In dieser Arbeit verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Abkürzung	Lösungsmittel	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	
			<i>E. coli</i>	<i>Cmm</i>
Ampicillin	Ap	H <sub>2</sub> O	150	-
Chloramphenicol	Cm	70 % (v/v) EtOH	10	10
Kanamycin	Km	H <sub>2</sub> O	30	-
Neomycin	Nm	H <sub>2</sub> O	50	80
Streptomycin	Sn	H <sub>2</sub> O	300	300

### 3.5.3 $\alpha$ -Tomatin

$\alpha$ -Tomatin-Lösung                      3 mM       $\alpha$ -Tomatin in 50 mM K-Acetate (pH 4,5)  
→sterilfiltrieren

## 3.6 Puffer und Lösungen

### 3.6.1 Agarosegelelektrophorese

Agarose-Lösung                      0,8-1,5 %      (w/v) Agarose in TBE (1x), aufkochen

Ethidiumbromid-Lösung              10 mg/ml      in H<sub>2</sub>O

Gel-Lade-Puffer                      0,03 %      (w/v) Bromphenolblau  
40 %      Glycerin  
117 mM      EDTA

TBE (10x)                              108 g      Tris-Base  
9,3 g      EDTA  
55 g      Borsäure  
mit H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> auf 1 L auffüllen

### 3.6.2 Resuspendierung von Zellen

PS-Puffer                              7 g      Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O  
5 g      NaCl  
3 g      KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                              → pH 7,0

TE-Puffer                              1 M      Tris-Base  
100 mM      EDTA                              → pH 8,0

Für die RNA-Isolierung wird Tris-Base und EDTA in DEPC-behandeltem Wasser gelöst.

### 3.6.3 Puffer für Microarray-Analysen

50 x dNTP-Stammlösung (4:1 aa-dUTP/dTTP)	25 mM 25 mM 25 mM 5 mM 20 mM	dATP dCTP dGTP dTTP Aminoallyl-dUTP (aa-dUTP)	
Waschpuffer 1	250 ml 250 µl	H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub> Triton X-100	5 min bei 80°C, dann auf RT abkühlen lassen
Waschpuffer 2	500 ml 50 µl	H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub> 32 % HCl	
Waschpuffer 3	225 ml 25 ml	H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub> 1 M KCl	
Blocking-Puffer	150 ml 40 µl 50 ml	H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub> 32 % HCl auf 50°C vorwärmen 4 x Nexterion Block E	

### 3.6.4 DNA-Isolierung

#### 3.6.4.1 Plasmidisolierung

P1	50 mM 10 mM 100 µg/ml	Tris-HCl EDTA RNase A	→ pH 8,0
P2	200 mM 1 %	NaOH SDS	
P3	3 M	K-Acetat	→ pH 5,5

#### 3.6.4.2 Gesamt-DNA-Isolierung

AK I	6,7 % 50 mM 1 mM	(w/v) Sucrose Tris-HCl, pH 8 EDTA	
------	------------------------	---	--

### 3.6.5 Behandlung von Agarosegelen für Southern Hybridisierungen

Depurinierungslösung (Blot I)	0,25 M	HCl
Denaturierungslösung (Blot II)	1,5 M	NaCl
	0,5 M	NaOH
Neutralisierungslösung (Blot III)	1 M	NH <sub>4</sub> -Acetat
	0,02 M	NaCl

### 3.6.6 Hybridisierungen

DIG-Färbelösung	80 µl	NBT/BCIP <i>Stock Solution</i> add. 10 ml DIG-Puffer 3
DIG-Hybridisierungslösung	7 ml	DIG-Prähybridisierungslösung mit DIG-markierter DNA-Probe
DIG-Prähybridisierungs- lösung	5 x 0,5 % 0,1 % 0,02 %	SSC (w/v) DIG Blocking-Reagenz N-Laurylsarkosyl SDS in DIG-Puffer 1
DIG-Puffer 1	0,1 M 0,15 M	Maleinsäure NaCl
DIG-Puffer 2	2 %	(w/v) DIG Blocking-Reagenz in DIG-Puffer 1
DIG-Puffer 3	100 mM 100 mM 50 mM	Tris-HCl, pH 9,5 NaCl MgCl <sub>2</sub>
DIG-Waschpuffer	0,3 %	(v/v) Tween80 in DIG-Puffer 1
20 x SSC	3 M 0,3 M	NaCl Na-Citrat
		→ pH 7
Waschpuffer I	2 x 0,1 %	SSC SDS
Waschpuffer II	0,1 x 0,1 %	SSC SDS

### 3.7 Software

**Tabelle 3.11:** Verwendete Software.

<b>Bezeichnung</b>	<b>relevante Eigenschaften</b>	<b>Hersteller/Referenz</b>
BlastP und PSI-Blast	Vergleich von Aminosäuresequenzen mit Proteinsequenzen der NCBI Datenbank	(Altschul et al., 1997)
Conserved Domain Database	Suche konservierter Proteindomänen gegen die NCBI Datenbank	(Marchler-Bauer et al., 2009); NCBI
ArrayLIMS	Programm zum Erfassen und Speichern aller Rohdaten und Informationen zu Microarrayexperimenten	CeBiTec, Universität Bielefeld
Clone-Manager 7.11	Erstellung und Bearbeitung von Plasmidkarten und weiteren DNA- aber auch Proteinsequenzen	Scientific and Educational Software
ClustalX	Programm zur Erstellung multipler Alignments von Aminosäuresequenzen	(Thompson et al., 1997)
EMMA 2.8.2	Programm zur Microarray-Datenauswertung	CeBiTec, Universität Bielefeld, (Dondrup et al., 2003 und 2009)
GenDB 2.4	Genomdatenbank	CeBiTec, Universität Bielefeld, (Meyer et al., 2003)
GeneDoc	Darstellung und Bearbeitung von multiplen Protein-Alignments	(Nicholas et al., 1997)
Genesis 1.7.5	Programm zur Clusteranalyse	Institut für Genomik und Bioinformatik, TU Graz, (Sturn et al, 2002)
ImaGene 6.0	Programm zur Microarray-Datenauswertung	Biodiscovery Inc.
OligoDesigner Software	Software zur Berechnung von Oligonukleotidsequenzen für Microarrays	CeBiTec, Universität Bielefeld
Opticon Monitor 1.08	Programm zur qRT-PCR Datenauswertung	Bio-Rad
R 2.9.1	Statistikprogramm, <a href="http://www.R-project.org">http://www.R-project.org</a>	(R-Development-Core-Team, 2009)
Xcalibur 2.0 Software	Evaluierung von GC-MS-Chromatogrammen	Thermo Finnigan

### 3.8 Geräte

**Tabelle 3.12:** Verwendete Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Firma
Elektroporationsgerät	Gene Pulser	Bio-RAD
Hybridisierungssofen	OV2	Biometra
Kühlzentrifuge	Sorvall RC5B Plus	Sorvall
Kühlzentrifuge	Sigma 3-18K	Sigma
Megafuge	Megafuge 10	Heraeus Sepatech
PCR-Gerät	RoboCycler Gradient 96	Stratagene
Schüttler	KS10	Laborgerätebau, Glastechnik, Umwelttechnik Edmund Bühler
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 D	Eppendorf
UV-VIS-Spektrometer	UV-1202	Shimadzu
NanoDrop	ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop Technologies
Hybridisierungsstation für Microarrays	HS4800 Hybridisierungsstation	Tecan
Microarray Scanner	LS Reloaded Microarray Scanner	Tecan
Real-Time PCR Detektions System	DNA Engine Opticon 2	Bio-RAD
Microarray-Spotter	MicroGrid II 610 spotter	BioRobotics, Cambridge, UK
Gaschromatograph	TraceGC	Thermo Finnigan
Massenspektrometer mit Autosampler	PolarisQ Ion-Trap- Massenspektrometer mit AS2000 Autosampler	Thermo Finnigan

## 4 Methoden

### 4.1 Kultivierung von Bakterienstämmen

#### ***Escherichia coli***

Die Anzucht von *E. coli* erfolgt auf festem oder in flüssigem TBY-Selektionsmedium bei 37°C über Nacht im Brutschrank. Flüssigkulturen werden, um eine gleichmäßige Sauerstoffzufuhr sicherzustellen, auf dem Luftschüttler bei 180 rpm und optimaler Wuchstemperatur inkubiert.

#### ***Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Stämme werden auf festem oder in flüssigem C-, TBY- oder M9-Selektionsmedien bei 25-28°C im Brutschrank angezogen. Die Anzucht von Flüssigkulturen erfolgt wie bei *E. coli* auf dem Luftschüttler (90-180 rpm). Die Inkubation und Anzucht von elektroporierten Zellen erfolgt auf SB-Selektionsmedium.

### 4.2 Konservierung von Bakterienstämmen (Glycerinkultur)

- Bakterien von Platte in ein Eppendorfgefäß überführen
- 0,4 ml PS-Puffer hinzugeben, durch Vortexen die Zellen resuspendieren
- ggf. Antibiotika hinzufügen
- 0,6 ml 87 % Glycerin hinzugeben, vortexen
- Lagerung bei -20°C

### 4.3 Titerbestimmung von Bakterien in Flüssigkultur

Die Anzahl der Bakterien in Flüssigkulturen kann durch eine photometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 580 nm ermittelt werden. Als Referenz dient das sterile Medium, in dem die Bakterien angezogen wurden. Bis zu einer  $OD_{580} < 1,0$  entspricht hierbei eine  $OD_{580}$  von 0,1 bei *E. coli* einem Titer von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml und bei *Cmm* einem Titer von  $5 \times 10^7$  Zellen/ml.

### 4.4 RNA-Isolierung aus *Cmm* mit dem "SV Total RNA Isolation Kit"

(modifiziert nach Promega, 08/2005)

Mit Ausnahme des TE-Puffers, des Lysozyms (Sigma) und des Ethanols sind alle verwendeten Lösungen und Puffer im Kit enthalten. Während der Arbeit mit RNA Handschuhe tragen und RNase-freie Filterspitzen und Reaktionsgefäße verwenden, um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden.

#### 4.4.1 Kultivierung von *Cmm* für RNA-Isolierung

- 10 ml TBY in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 10-30 µl Glycerinkultur eines *Cmm*-Stamms inokulieren

- Inkubation auf dem Luftschtüttler (90 rpm) bei 26°C bis zu einer  $OD_{580} = 0,9-2,0$
- Zellsuspension so mit TBY verdünnen, dass eine theoretische  $OD_{580}$  von 0,3 erreicht wird
- Inkubation auf dem Luftschtüttler (90 rpm) bei 26°C bis zu einer  $OD_{580} \approx 1,0$
- Zellmenge, die benötigt wird um 10-50 ml Medium mit einer Start- $OD_{580}$  von 0,05 zu inokulieren, sedimentieren: 1 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand quantitativ entfernen, Pellet in 1 ml M9-Minimalmedium (4 % Glucose als Kohlenstoffquelle) suspendieren (Vortex)
- 1 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugieren
- Überstand quantitativ entfernen, Pellet in kleinem Volumen des zu inokulierenden Mediums suspendieren, Zellsuspension zu restlichem Medium hinzugeben
- Inkubation auf dem Luftschtüttler (90 rpm) bei 26°C bis gewünschte  $OD_{580}$  erreicht ist

#### 4.4.2 RNA-Isolierung aus *Cmm* - Zellen aus Flüssigkultur

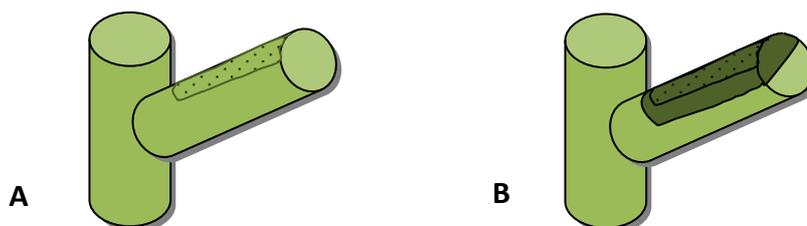
- pro RNA-Isolierung 4 Zellpellets mit je  $\approx 5 \times 10^8$  Zellen (entspricht 1 ml einer Kultur mit  $OD_{580}$  von 0,5) vorbereiten:
  - entsprechendes Volumen einer *Cmm*-Kultur in Eppendorfgefäß pipettieren, 10 s bei 13.200 rpm und RT zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf), Überstand entfernen und Pellet sofort in flüssigem Stickstoff einfrieren, Lagerung bei -80°C
- 200 µl TE-Puffer (pH 8) mit 12 mg/ml Lysozym versetzen, aliquotierte DNase auf Eis auftauen, nach Herstellerangaben *RNA Lysis buffer* mit  $\beta$ -Mercaptoethanol und *RNA Wash Solution* und *DNase Stop Solution* mit Ethanol versetzen, Säule in Sammelgefäß einsetzen
- zwei Pellets in je 50 µl TE-Puffer + 12 mg/ml Lysozym suspendieren
- 5 min bei 37°C inkubieren, anschließend die Proben sofort ins Eis stellen
  - **während des Inkubationsschritts** weitere zwei Pellets in je 50 µl TE-Puffer + 12 mg/ml Lysozym suspendieren, 5 min bei 37°C inkubieren und anschließend ins Eis stellen
- die ersten beiden Proben vereinigen und 75 µl *RNA Lysis buffer* hinzugeben; Proben auf Eis lagern
- add. 350 µl *RNA Dilution buffer*, 6 x invertieren; Proben auf Eis lagern
- add. 200 µl 95 % Ethanol, 3-4 mal durch Auf- und Abpipettieren mischen; Proben auf Eis lagern
- Lysat auf die Säule geben, 1 min bei 12.000 x g und RT zentrifugieren
  - **während des Zentrifugationsschritts** die beiden verbleibenden Proben analog zu den ersten beiden aufarbeiten (vereinigen, add. 75 µl *RNA Lysis buffer*, add. 350 µl *RNA Dilution buffer*, add. 200 µl 95 % Ethanol)
- Durchfluss verwerfen, zweites Lysat auf die Säule geben, 1 min bei 12.000 x g und RT zentrifugieren, Durchfluss verwerfen

- add. 600 µl *RNA Wash Solution*, 1 min bei 12.000 x g und RT zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
  - **während des Zentrifugationsschritts *DNase Incubation Mix* vorbereiten:**
    - 40 µl *Yellow Core buffer*
    - 5 µl 0,09 M  $MnCl_2$
    - 5 µl *DNase I*
  - durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mischen, nicht vortexen
- 50 µl *DNase Incubation Mix* direkt auf die Säulenmatrix pipettieren, 15 min bei RT inkubieren
- add. 200 µl *DNase Stop Solution*, 1 min bei 12.000 x g und RT zentrifugieren
- add. 600 µl *RNA Wash Solution*, 1 min bei 12.000 x g und RT zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- add. 250 µl *RNA Wash Solution*, 2 min bei 14.000 x g und RT zentrifugieren
- Säule in ein RNase-freies Eppendorfgefäß einsetzen
- 100 µl *Nuclease-Free Water* direkt auf die Säulenmatrix pipettieren
- 1 min bei 12.000 x g und RT zentrifugieren
- RNA in flüssigem Stickstoff einfrieren, Proben bei -80°C lagern

Die Konzentration der RNA wird mit Hilfe des NanoDrops bestimmt. Standardmäßig wurden Konzentrationen von ca. 200 ng/µl erreicht. Die Verhältnisse der Messwerte bei den Wellenlängen 260 nm/280 nm, bzw. 260 nm/230 nm lagen in der Regel zwischen 2,0 und 2,1.

#### 4.4.3 RNA-Isolierung aus *Cmm* - Zellen aus infizierten Pflanzen

Für die RNA-Isolierung aus *Cmm*-Zellen nach Infektion der Tomate wurden die Schritte von der Probengewinnung bis zur *DNase*-Behandlung modifiziert. Die Isolierung der RNA erfolgte 10 Tage nach Infektion (10 dpi) von Tomatenpflanzen mittels Punktieren des Fiederblattstiels (siehe 4.20.1.5, S. 57). Hierzu wurde das punktierte Gewebe mit einem sterilen Skalpell abgetrennt (Abbildung 4.1) und unter Zugabe von flüssigem Stickstoff möglichst fein gemörsert. Das so entstandene Pulver wurde, ohne es auftauen zu lassen, aliquotiert (≈ 60 mg/Eppendorfgefäß) und die Aliquots bei -80°C gelagert.



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung des infizierten Fiederblattstielsbereichs, der zur Isolierung von *Cmm*-RNA aus infizierten Tomaten verwendet wurde. A: Übergangsbereich Spross / Fiederblatt. Der infizierte Bereich ist gepunktet dargestellt. B: Der zur RNA-Isolierung verwendeter Bereich 10 dpi ist in dunkelgrün dargestellt.

- zwei RNA-Isolierungen parallel durchführen, pro RNA-Isolierung werden je 60 mg pulverisiertes infiziertes Tomatengewebe verwendet
- 400 µl TE-Puffer (pH 8) mit 12 mg/ml Lysozym versetzen, aliquotierte DNase auf Eis auftauen, nach Herstellerangaben *RNA Lysis buffer* mit β-Mercaptoethanol und *RNA Wash Solution* und *DNase Stop Solution* mit Ethanol versetzen, Säule in Sammelgefäß einsetzen
- ein 60 mg-Aliquot in 200 µl TE-Puffer + 12 mg/ml Lysozym suspendieren
- 5 min bei 37°C inkubieren, anschließend die Probe sofort ins Eis stellen
  - **während des Inkubationsschritts** das zweite Aliquot in 200 µl TE-Puffer + 12 mg/ml Lysozym suspendieren, 5 min bei 37°C inkubieren und anschließend ins Eis stellen
- zur ersten Probe 150 µl *RNA Lysis buffer* hinzugeben; Probe auf Eis lagern
- add. 700 µl *RNA Dilution buffer*, 6 x invertieren; Probe auf Eis lagern
- Probe kurz (10 s) bei 13.000 rpm zentrifugieren, Überstand mit möglichst wenig Pellet (Pflanzengewebe) in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- add. 400 µl 95 % Ethanol, 3-4 mal durch auf- und abpipettieren mischen; Proben auf Eis lagern
- Lysat auf zwei Säulen aufteilen, 1 min bei 12.000 x g und RT zentrifugieren
  - **während des Zentrifugationsschritts** die zweite Probe analog zur ersten aufarbeiten (add. 150 µl *RNA Lysis buffer*, add. 700 µl *RNA Dilution buffer*, Zentrifugation, Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen, add. 400 µl 95 % Ethanol)
- Durchfluss verwerfen; **sollte nicht das ganze Lysat die Säule passiert haben**, vor dem nächsten Schritt Säule mit 300 µl *RNA Wash Solution* waschen (1 min bei 12.000 x g und RT zentrifugieren, Durchfluss verwerfen)
- zweites Lysat auf die Säule geben, 1 min bei 12.000 x g und RT zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- Säule mit 300 µl *RNA Wash Solution* waschen (1 min bei 12.000 x g und RT zentrifugieren, Durchfluss verwerfen)
- add. 600 µl *RNA Wash Solution*, 1 min bei 12.000 x g und RT zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- **während des Zentrifugationsschritts** *DNase Incubation Mix* vorbereiten
- weitere Durchführung siehe 4.4.2

Die Konzentration der RNA wird mit Hilfe des NanoDrops bestimmt. Standardmäßig wurden Konzentrationen von ca. 30 ng/µl erreicht. Das Verhältnis der Messwerte bei den Wellenlängen 260 nm/280 nm war meist 2,0. Das Verhältnis der Werte bei 260 nm zu 230 nm lag in der Regel nur bei 0,8. Nach Ankonzentrierung der RNA mit Microcon-30 Filtern wurden, entsprechend zu den Werten von RNA, die aus Flüssigkulturen isoliert wurden, Werte zwischen 2,0 und 2,1 erreicht.

#### 4.5 Konzentrierung der RNA mit Microcon-30 Filtern

Zur Hybridisierung gegen den Microarray werden 10 µg RNA revers transkribiert und die cDNA anschließend mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Für die reverse Transkription soll ein maximales Volumen an RNA von 18,8 µl eingesetzt werden. Daher muss die Konzentration der eingesetzten RNA mindestens bei 0,532 µg/µl liegen.

Während der Arbeit mit RNA Handschuhe tragen und RNase-freie Filterspitzen und Reaktionsgefäße verwenden, um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden.

- Microcon-30 Filter (Millipore, Ultracel YM-30), roter Ring nach oben, in zugehöriges Sammelgefäß einsetzen, zweites Sammelgefäß beschriften
- RNA mit RNase-freiem Wasser (Promega SV Total RNA Isolation Kit) auf Gesamtvolumen von 500 µl auffüllen
- verdünnte RNA auf Microcon-30 Filter geben
- ca. 9 min bei 12.000 rpm (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf) zentrifugieren
- verbliebenes Volumen auf dem Filter abschätzen (mindestens 10 µl)
  - ist das Volumen noch zu groß, 1-3 min zentrifugieren, Volumen erneut überprüfen
  - sind weniger als 10 µl auf dem Filter, 10 µl RNase-freies Wasser auf den Filter geben
- Microcon-30 Filter mit rotem Ring nach unten in neues Sammelgefäß einsetzen
- 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Konzentration der RNA überprüfen (NanoDrop)
- RNA in flüssigem Stickstoff einfrieren und bei -80°C lagern

#### 4.6 Genexpressionsanalysen mittels Microarray

##### 4.6.1 Herstellung des für NCPPB382 spezifischen Microarrays Cmm3kOLI

Die Auswahl der auf dem Microarray repräsentierten ORFs, das Design der spezifischen Oligonukleotide sowie die Erstellung des für NCPPB382 spezifischen Microarrays Cmm3kOLI wurden im Rahmen des BMBF-Projekts *Genomik-Plus* (FKZ 0313105) von Prof. Dr. Anke Becker am Lehrstuhl für Genetik (Universität Bielefeld) durchgeführt.

- Design der Oligonukleotide mit OligoDesigner Software (CeBiTec, Universität Bielefeld)
- Oligonukleotide (40 µM) in 1,5 M Betain, 3x SSC wurden mit dem MicroGrid II 610 spotter (BioRobotics, Cambridge, UK) mit 48 SMP3 *stealth pins* (TeleChem International, Sunnyvale, CA, USA) auf *Nexterion Slides E* (Schott AG, Mainz) aufgebracht
- Vernetzung der DNA mit der Oberfläche: Inkubation der *slides* bei 90°C für 2 h

##### 4.6.2 Reverse Transkription von Gesamt RNA und Aufreinigung der Aminoallyl-cDNA

###### Reverse Transkription

Zur reversen Transkription wird BioScript Reverse Transkriptase von Bioline (5x RT-Puffer im Kit enthalten) verwendet. Die Aufreinigung der komplementären DNA (cDNA) erfolgt mit dem CyScribe Kit von Amersham-Bioscience. Der *Capture buffer* ist Bestandteil des Kits.

- 10 µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 18,8 µl auffüllen
- 2 µl Amino-modifizierte *random hexamers* (5 µg/µl) hinzugeben, mischen und kurz zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- 10 min bei 70°C inkubieren
- 5 min auf Eis inkubieren (Primer Annealing), kurz zentrifugieren
- während der Inkubation auf Eis folgende Nukleotidlösung (x1,1 pro Reaktionsansatz) vorbereiten:
  - 6 µl 5x *Reaction buffer*
  - 0,5 µl RNase Inhibitor
  - 1,5 µl BioScript (200 U/µl)
  - 1,2 µl 25x dNTP Stammlösung (4:1 aa-dUTP /dTTP Mix)
- mischen und kurz zentrifugieren; Nukleotidlösung nicht auf Eis lagern
- 9,2 µl der Nukleotidlösung zu jedem Ansatz pipettieren, mischen und kurz zentrifugieren
- 1,5 h bei 42°C inkubieren, anschließend kurz zentrifugieren

### Hydrolyse der RNA

- 15 µl 0,2 M NaOH hinzugeben (Filterspitzen verwenden, darauf achten, dass die Pipette nicht verstellt wird), durch Schnippen an das Eppendorfgefäß mischen, kurz zentrifugieren
- 10 min bei 70°C inkubieren, kurz zentrifugieren
- 15 µl 0,2 M HCl hinzugeben (Filterspitzen verwenden; die gleiche Pipette wie zuvor verwenden), durch Auf- und Abpipettieren mischen

### Aufreinigung der cDNA

- direkt nach der Neutralisierung der Proben 450 µl *Capture buffer* (Cyscribe GFX Purification Kit; Amersham Biosciences) hinzugeben, durch Auf- und Abpipettieren mischen und auf eine CyScribe GFX Säule geben; die Proben sollten nicht länger als 5 min in *Capture buffer* stehen
- 30 s bei 13.000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- 600 µl 80 % Ethanol auf die Säule geben
- 30 s bei 13.000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- Waschschrift zweimal wiederholen
- 10 s bei 13.000 rpm zentrifugieren, Säule auf ein neues Eppendorfgefäß stecken
- 60 µl 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 9,0) direkt auf das Säulenmaterial pipettieren, 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- cDNA kann bei Bedarf bei -20°C über Nacht gelagert werden

#### 4.6.3 Fluoreszenzfärbung und Aufreinigung der markierten cDNA

Zur Aufreinigung der cDNA wurde das CyScribe Kit von Amersham-Bioscience (enthält auch *Capture buffer*, *Washing buffer* und *Elution buffer*) verwendet. Die verwendeten Cy3-NHS-Ester und Cy5-NHS-Ester wurden von GE Healthcare bezogen. Die Proben müssen vor Licht geschützt werden.

##### Fluoreszenzfärbung der cDNA

- aliquotierte Cy3- bzw. Cy5-NHS Ester in der kompletten Aminoallyl-markierten cDNA lösen (braune Eppendorfgefäße zum Schutz der Fluoreszenzfarbstoffe verwenden)
- 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- 4,5 µl 4 M Hydroxylamin hinzugeben, mischen
- 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren

##### Aufreinigung der fluoreszenzmarkierten cDNA (CyScribe GFX Purification Kit; Amersham Biosciences)

- 600 µl *Capture buffer* zu der Cy5 markierten Probe geben, mischen; anschließend Cy3 markierte Probe hinzugeben und durch Auf- und Abpipettieren mischen
- Probe auf eine CyScribe GFX Säule geben; die Proben sollten nicht länger als 5 min in *Capture buffer* stehen
- 30 s bei 13.000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- 600 µl *Washing buffer* zugeben, 30 s bei 13.000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- Waschschrift zweimal wiederholen
- 10 s bei 13.000 rpm zentrifugieren, Säule auf ein neues braunes Eppendorfgefäß stecken
- 60 µl *Elution buffer* direkt auf das Säulenmaterial pipettieren, 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- bis zur weiteren Verwendung bei -20°C lagern

#### 4.6.4 Hybridisierung der Cy3- und Cy5-markierten cDNA gegen den Cmm3kOLI-Microarray

- Markierte cDNA-Proben vor Licht schützen
- Cmm3kOLI-Microarray 5 min bei RT in 250 ml Waschpuffer 1 waschen
- 2 min bei RT in Waschpuffer 2 waschen, Waschschrift wiederholen
- 10 min bei RT in Waschpuffer 3 waschen
- 1 min bei RT in H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> waschen
- 15 min in 50°C vorgewärmten *Blocking*-Puffer waschen, mindestens alle 5 min oder permanent schütteln
- 1 min bei RT in H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> waschen
- Microarray bei 1.200 rpm für 3 min zentrifugieren

- markierte cDNA-Probe in einem Vakuumkonzentrator auf ein Volumen von unter 10 µl einengen (ca. 15 min)
- DIG Easy Hyb-Lösung (Roche) und 1,5 µl Lachssperma-DNA (5 µg/µl) zur cDNA-Probe zugeben, bis ein Volumen von 100 µl erreicht ist, durch Auf- und Abpipettieren mischen
- kurz bei 13.000 rpm zentrifugieren, bis zur weiteren Verwendung im Dunkeln aufbewahren
- cDNA-Probe für 5 min bei 65°C inkubieren
- Cmm3kOLI-Microarray nach Herstellerangaben in der HS4800 Hybridisierungsstation (Tecan) platzieren
- cDNA-Probe in die Hybridisierungskammern injizieren und für 1,5 h bei 45°C inkubieren
- Cmm3kOLI-Microarray aus der Hybridisierungsstation nehmen und für 1 min in vorgewärmten Waschpuffer (2x SSC, 0,2 % (w/v) SDS; 42°C) auf einem Schüttler inkubieren
- 1 min in 0,2x SSC, 0,1 % (w/v) SDS bei RT waschen, Waschschrift 1x wiederholen
- 1 min in 0,2x SSC bei RT waschen, Waschschrift 1x wiederholen
- 1 min in 0,05x SSC (auf 18°C vorgekühlt) waschen
- Microarray bei 1.200 rpm für 3 min zentrifugieren
- Cmm3kOLI-Microarray mit LS Reloaded Microarray Scanner (Tecan) scannen

#### 4.6.5 Microarray-Datenanalyse

Die Signal- und die Hintergrundintensität wird für jeden Spot mittels der ImaGene 6.0 Software (Biodiscovery Inc.) detektiert und dem entsprechendem Gen zugeordnet. Die weitere Datenanalyse wird mit der EMMA 2.8.2 Software (<https://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/emma/>) (Dondrup et al., 2003 und 2009) durchgeführt. Zunächst werden die Rohdaten mittels des LOWESS (*locally weighted scattered plot smoothing*) Algorithmus normalisiert (Cleveland, 1979; Yang et al., 2002), um systematische Fehler zu vermeiden und insbesondere Daten mehrerer Arrays des gleichen Experiments zusammenzufassen. Die Intensität eines Spots wird als  $\log_2$  der Signalintensitäten (A-Wert) angegeben und mit der Formel  $A_i = \log_2(R_i G_i)^{0,5}$  berechnet, wobei gilt:  $R_i = I_{ch1i} - Bg_{ch1i}$  und  $G_i = I_{ch2i} - Bg_{ch2i}$ .  $I_{ch1i}$  und  $I_{ch2i}$  sind die gemessenen Intensitäten der Spots nach Anregung mit Laser 1 oder Laser 2,  $Bg_{ch1i}$  und  $Bg_{ch2i}$  sind die Hintergrundintensitäten der Spots. Der M-Wert ( $\log_2$  der Differenz der Signalintensitäten) wird nach folgender Formel berechnet:  $M_i = \log_2(R_i/G_i)$  und gibt letztlich an, um welchen Faktor das jeweilige Gen unter Versuchsbedingungen im Vergleich zu Kontrollbedingungen induziert (erhöhte Transkriptmenge) oder reprimiert (verringerte Transkriptmenge) ist (Dudoit et al., 2002). Ein M-Wert von 1 bzw. -1 bedeutet, dass das Gen zweimal so stark unter Versuchsbedingungen bzw. unter Kontrollbedingungen transkribiert wird. Um zu überprüfen, welche Gene signifikant differentiell exprimiert werden, wird die t-Test Statistik verwendet. Der aus diesem Test berechnete p-Wert gibt an, wie hoch die Wahrscheinlichkeit einer Falsch-positiven Detektion ist. Ein p-Wert von 0,05 zeigt an, dass zu 5 % die Nullhypothese anzunehmen ist (Dudoit et al., 2002).

Für Clusteranalysen wurde die Genesis 1.7.5 Software verwendet. Zur Berechnung der Distanzen wurde der Euklidische Algorithmus verwendet (Sturn et al., 2002).

#### 4.7 *real-time*-RT-PCR mit dem “SensiMix-One-Step Kit“

(modifiziert nach Quantace)

Mit der *real-time*-RT-PCR können transkriptionelle Unterschiede einzelner Gene gemessen werden. Im Gegensatz zur Microarray-Technologie, die einen Überblick über das gesamte Expressionsprofil gibt, werden mit der RT-PCR einzelne, ausgewählte Gene mit einer höheren Sensitivität analysiert. Folglich kann die *real-time*-RT-PCR auch verwendet werden, um Microarray-Ergebnisse zu überprüfen und zu verifizieren.

Der in dieser Arbeit verwendete SYBR-Green Fluoreszenzfarbstoff lagert sich in doppelsträngige DNA ein (dsDNA-SYBR-GreenI-Komplex: Absorbtion: 498 nm; Emission: 522 nm). Bei der im Anschluss an die reverse Transkription erfolgten PCR kann also nach jedem Zyklus die Fluoreszenz bei 522 nm und so die Bildung doppelsträngiger DNA gemessen werden. Die *real-time*-RT-PCR wird mittels eines Opticon Real-Time PCR Detektions Systems (Bio-Rad) durchgeführt. Die Auswahl geeigneter Primer für die *real-time*-RT-PCR erfolgte in Zusammenarbeit mit Burkhard Linke. Die Primer wurden mit “primer3“ generiert und die Eindeutigkeit mit Blast überprüft.

##### *real-time*-RT-PCR-Ansatz

10 µl	SensiMix-One-Step
0,4 µl	50x SYBR® Green I-Lösung
0,4 µl	10 U/µl RNase Inhibitor
0,8 µl	Primer-Mix (je 5 µM)
0,8 µl	DEPC-H <sub>2</sub> O
7,6 µl	RNA (100 ng pro Gesamtvolumen)
20 µl	Gesamtvolumen

##### *real-time*-RT-PCR-Programm

Zyklen	Dauer	Temperatur [°C]	Schritt
1	30 min	49	reverse Transkription
1	10 min	95	Enzymaktivierung
	15 s	95	Denaturierung
41	30 s	55	Annealing
	15 s	72	Polymerisation
			Fluoreszenzmessung
1		60 -95	Schmelzkurve berechnen*

\*Die Temperatur wird von 60°C-95°C in 1°C-Schritten erhöht. Die Temperatur wird jeweils 10 s gehalten und die Fluoreszenz gemessen. Dadurch kann die Schmelztemperatur des PCR-Produkts ermittelt werden. Weil die Schmelztemperatur großer DNA-Fragmente höher ist als die kleiner, können so spezifische PCR-Produkte von Primerdimeren unterschieden werden.

## 4.8 DNA-Isolierung

### 4.8.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus *Cmm*

(modifiziert nach Altenbuchner & Cullum, 1984)

- Bakterien von der Agar-Platte in ein Eppendorfgefäß überführen
- Pellet in 0,5 ml AK1-Lösung + 10 mg/ml Lysozym resuspendieren (schütteln, Vortex)
- 45-60 min bei 37°C inkubieren (gelegentlich invertieren)
- add. 0,2 ml 5 % SDS, mehrmals invertieren
- 10 min bei 70°C inkubieren
- langsam auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- add. 200 µl Phenol/Chloroform 1:1 (neutral), mischen, bis die Lösung homogen ist
- 20 min bei 13.200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen
- Phenolisierungsschritt wiederholen, wenn der Überstand trüb bleibt
- add. 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 8,0) und 1 Vol. Isopropanol
- Eppendorfgefäß vorsichtig invertieren
- präzipitierte DNA mit einer gelben Pipettenspitze in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- DNA 2 x mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol waschen
- DNA in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- add. x µl H<sub>2</sub>O (Volumen abhängig von Menge der isolierten Gesamt-DNA)
- zur Resuspendierung ggf. 30 min bei 37°C inkubieren
- Lagerung bei 4°C oder -20°C

### 4.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

#### 4.8.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem „Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System“

(Promega, 02/2006)

- Bakterien von der Agar-Platte in ein Eppendorfgefäß überführen
- Zellen in 250 µl *Cell Resuspension Solution* resuspendieren
- add. 250 µl *Cell Lysis Solution*, 4-6 x invertieren, 3 min inkubieren
- add. 10 µl *Alkaline Protease Solution*, 4-6 x invertieren, 5 min inkubieren
- add. 350 µl *Neutralization Solution*, 4-6 x invertieren
- 10 min bei 13.200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)

- *Spin Column* in Sammelgefäß einsetzen
- Überstand auf die Säule geben
- 1 min bei 13.200 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- Säule mit 750 µl *Column Wash Solution* waschen
- 1 min bei 13.200 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- Säule mit 250 µl *Column Wash Solution* waschen
- 2 min bei 13.200 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- Säule in ein Eppendorfggefäß einsetzen
- 100 µl Nuclease-freies Water auf die Membran der Säule geben
- 1 min bei RT inkubieren
- 1 min bei 13.200 rpm zentrifugieren
- zweiter Elutionsschritt kann angeschlossen werden
- Lagerung der DNA bei 4°C oder -20°C

#### 4.8.2.2 HB-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA (Klonanalyse)

- Zellen von Platte in ein Eppendorfggefäß überführen (z.B. von einem Stocherstrich)
- Zellen in 0,2 ml Puffer P1 resuspendieren (Vortex)
- add. 0,2 ml Lösung P2, 4-6 x vorsichtig invertieren
- 5 min bei RT inkubieren
- add. 0,2 ml vorgekühlte (4°C) Lösung P3, sofort 4-6 x invertieren
- 5 min bei 0°C inkubieren
- 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- 0,6 ml des Überstands in neue Eppendorfggefäß überführen
- add. 0,6 ml Isopropanol, vortexen
- 20 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- add. 0,5 ml 70 % (v/v) Ethanol
- 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet bei 70°C trocknen
- DNA in 20 µl H<sub>2</sub>O oder 1 x TE-Puffer lösen

#### 4.8.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen mit dem „NucleoSpin® Extract II“ (Macherey und Nagel)

- DNA-Bande aus dem Agarosegel ausschneiden und wiegen
- add. 200 µl NT-Puffer / 100 mg Gel
- 10 min bei 50°C inkubieren (alle 3 min vortexen)
- Säule auf 2 ml Sammelgefäß setzen, Ansatz auf die Säule pipettieren
- 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf), Durchlauf verwerfen
- add. 700 µl NT3-Puffer
- 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren, Durchlauf verwerfen

- 2 min bei 11.000 x g zentrifugieren
- Säule auf Eppendorfgefäß setzen
- 15-50 µl NE-Puffer oder H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> auf Mitte der Säule pipettieren
- 1 min bei RT inkubieren
- 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren
- Lagerung der DNA bei -20°C

## 4.9 DNA-Reinigung und -Konzentration

### 4.9.1 Phenolisierung

- 1 Vol. DNA-Lösung
- add. ½ Vol. Phenol/Chloroform 1:1 (neutral), mischen
- 20 min bei 13.200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- obere Phase in neues Eppendorfgefäß überführen
- Vorgang gegebenenfalls wiederholen
- Isopropanolfällung (siehe 3.2.) des Überstands anschließen

### 4.9.2 Isopropanolfällung

- 1 Vol. DNA-Lösung
- add. 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat, pH 8,0
- add. 1 Vol. Isopropanol, invertieren
- 30 min bei 13.200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand verwerfen
- Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol waschen
- 15 min bei 13.200 rpm zentrifugieren
- Pellet trocknen und in H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> oder TE-Puffer, pH 8,0, resuspendieren

### 4.9.3 Ethanolfällung

- 1 Vol. DNA-Lösung
- add. 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat, pH 8,0
- add. 2 Vol. Ethanol
- 30 min bei 13.200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand entfernen
- Pellet zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol waschen
- 15 min bei 13.200 rpm zentrifugieren
- Pellet trocknen und in H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> oder TE-Puffer, pH 8,0, resuspendieren

#### 4.9.4 Sephadex-Behandlung

- Sephadex G50 Pulver in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{MP}}$  quellen lassen, autoklavieren
- silikonisiertes Glaskügelchen ( $\varnothing$  ca. 2,5 mm) in blaue Pipettenspitze geben (Silikonisierung: Glaskügelchen in Silikonisierungslösung für 1 h bei  $100^\circ\text{C}$  backen)
- Pipettenspitze in Weichagarröhrchen stellen
- 800  $\mu\text{l}$  Sephadex-G50-Lösung in die Pipettenspitze füllen
- 15 min bei 3000 rpm zentrifugieren (Megafuge)
- Spitze in ein neues Weichagarröhrchen stellen
- DNA auf die Sephadex-Säule auftragen
- 15 min bei 3000 rpm zentrifugieren
- Lagerung bei  $4^\circ\text{C}$  oder  $-20^\circ\text{C}$

#### 4.9.5 Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem „NucleoSpin® Extract II“ (Macherey und Nagel)

- add. 200  $\mu\text{l}$  NT-Puffer / 100  $\mu\text{l}$  PCR-Ansatz
- Säule auf 2 ml Sammelgefäß setzen, Ansatz auf die Säule pipettieren
- 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf), Durchlauf verwerfen
- add. 700  $\mu\text{l}$  NT3-Puffer
- 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- 2 min bei 11.000 x g zentrifugieren
- Säule auf Eppendorfggefäß setzen
- 15-50  $\mu\text{l}$  NE-Puffer oder  $\text{H}_2\text{O}_{\text{MP}}$  auf Mitte der Säule pipettieren
- 1 min bei RT inkubieren
- 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren
- Lagerung der DNA bei  $-20^\circ\text{C}$

### 4.10 Techniken zur Charakterisierung von DNA-Molekülen

#### 4.10.1 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

##### Hydrolyse von Plasmid-DNA

###### 20 $\mu\text{l}$ Ansatz

x $\mu\text{l}$	DNA (0,2-0,5 $\mu\text{g}$ )
2 $\mu\text{l}$	10x Reaktionspuffer
0,5-1 $\mu\text{l}$	Restriktionsendonuklease
<u>y <math>\mu\text{l}</math></u>	<u><math>\text{H}_2\text{O}_{\text{MP}}</math> (auf 20 <math>\mu\text{l}</math> auffüllen)</u>
20 $\mu\text{l}$	Gesamtvolumen

- 1-2 h oder  $\infty$  bei Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms inkubieren
- 20 min bei 70°C inaktivieren

### Hydrolyse von Gesamt-DNA

#### 100 $\mu$ l Ansatz

10 $\mu$ l	Gesamt-DNA
10 $\mu$ l	10x Reaktionspuffer
1-2 $\mu$ l	Restriktionsendonuklease
78-79 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub>
<hr/>	
100 $\mu$ l	Gesamtvolumen

- $\infty$  bei Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms inkubieren
- 20 min bei 70°C inaktivieren

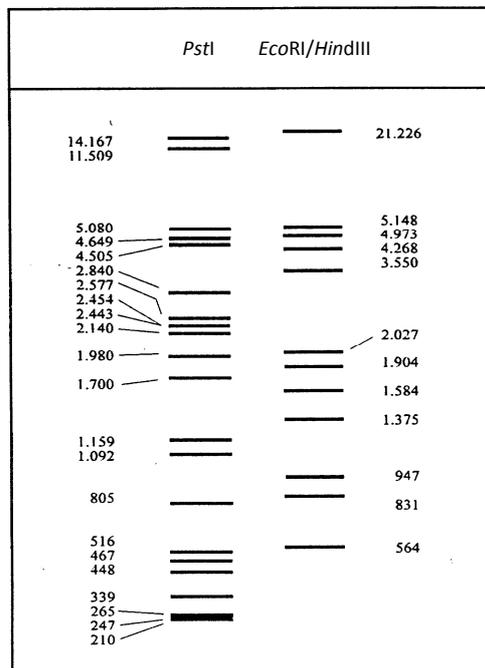
### 4.10.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Charakterisierung von DNA-Molekülen z.B. nach Amplifikation, Isolation oder Restriktion wird die Agarosegelelektrophorese verwendet. Da DNA aufgrund ihrer Phosphatreste eine negative Ladung aufweist, kann sie im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Das Agarosegel bildet hierbei die Matrix durch die sich die DNA-Moleküle bewegen. Die Wanderungsstrecke eines DNA-Moleküls ist hierbei nicht nur von seinem Molekulargewicht sondern auch von seiner Konformation (ccc, oc, linear, ds, ss) abhängig. Des Weiteren ist die Agarosekonzentration, welche die Dichte des Gelnetzwerks bestimmt, ein maßgeblicher Faktor für die Wanderungsgeschwindigkeit. Je höher die Agarosekonzentration ist, desto geringer ist die Wanderungsstrecke der DNA-Moleküle bei ansonsten gleichen Bedingungen im festgelegten Zeitintervall. In der vorliegenden Arbeit wurden Agarosekonzentrationen von 0,8 % bis 1,5 % verwendet

- Agarose in 1x TBE-Puffer unter Rühren aufkochen
- auf ca. 60°C abkühlen lassen, in einen Gelträger gießen und Kamm einsetzen
- nach Auspolymerisieren des Gels Gelträger in eine mit 1x TBE gefüllte Gelelektrophoresekammer einsetzen und den Kamm entfernen
- DNA-Proben mit Gel-Lade-Puffer (1/5 Vol.) vermischen
- Geltaschen mit Proben und Marker beladen
- Auftrennung bei einer Spannung von 90-120 Volt
- Gel anschließend 5-15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung anfärben
- Gel wässern und unter UV-Licht ( $\lambda = 320$  nm) fotografieren
- bei zu starker Färbung das Gel in 1x TBE-Puffer entfärben

### 4.10.3 Bestimmung des Molekulargewichts

Die Mobilität von DNA-Molekülen ist unter geeigneten Bedingungen umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts.



**Abbildung 4.2:** *PstI*- bzw. *EcoRI/HindIII*-hydrolysierte  $\lambda$ -Phagen-DNA.

Bestimmt man die Wanderungsstrecke von im gleichen Gel aufgetrennten Größenstandards, so kann man mit diesen Werten eine Eichgerade erstellen. Mit Hilfe einer solchen Eichgerade ist die Bestimmung des Molekulargewichts der DNA-Fragmente unbekannter Größe möglich. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Größenstandards einzeln oder in Kombination verwendet. Zwei dieser Marker, *PstI*- bzw. *EcoRI/HindIII*-hydrolysierte  $\lambda$ -Phagen-DNA, sind in der nebenstehenden Abbildung 4.2 aufgeführt. Bei dem dritten Marker handelt es sich um den 1 kb-Marker der Firma Roche mit den Fragmentgrößen 10.000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500 bp. Bei Hybridisierungsgelen wurden Digoxigenin-11-dUTP markierte *EcoRI/HindIII*-Restriktionsfragmente der  $\lambda$ -Phagen-DNA verwendet (Roche Diagnostics).

## 4.11 Klonierung von DNA-Fragmenten

### 4.11.1 Dephosphorylierung von DNA mit der *Antarctic Phosphatase*

(New England Biolabs)

#### Reaktionsansatz

1-5 $\mu$ l	gespaltene DNA (1 $\mu$ g)
1 $\mu$ l	10x <i>Antarctic Phosphatase Reaction buffer</i>
1 $\mu$ l	<i>Antarctic Phosphatase</i> (5 u)
x $\mu$ l	H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub> (auf 10 $\mu$ l Reaktionsvolumen auffüllen)

- bei 5'-Überhang oder *blunt ends* für 15 min bei 37°C inkubieren
- bei 3'-Überhang für 60 min bei 37°C inkubieren
- Spaltung inaktivieren (5 min, 70°C)

### 4.11.2 Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten

Zur Klonierung eines Restriktionsfragments in einen Vektor wird der Vektor zuvor mit geeigneten Restriktionsendonukleasen gespalten. Nach Deaktivierung des Spaltansatzes werden Vektor und Insert in einem geeigneten Verhältnis (1:3 bis 1:5) gemischt und einer

Ligasereaktion unterzogen. Im Allgemeinen empfiehlt es sich, den Vektor nach der Restriktion mit einem Enzym zusätzlich zu dephosphorylieren, um den Ringschluss des Vektors bei der Ligation zu verhindern.

#### Ligationsansatz

15-25 $\mu\text{l}$	Vektor-Insert-Gemisch
4 $\mu\text{l}$	10x T4-DNA-Ligase Puffer (1/10 Vol.)
1 $\mu\text{l}$	T4-DNA-Ligase
x $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub>
<hr/>	
40 $\mu\text{l}$	Gesamtvolumen

- $\ddot{u}$ N bei 16°C oder 2-3 h bei RT inkubieren
- 20 min bei 70°C inaktivieren

#### **4.11.3 Shotgun-Klonierung**

Die Shotgun-Klonierung ist die Ligation von Vektor-DNA mit einem Gemisch von hydrolysierten DNA-Fragmenten, die direkt nach Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen für die Klonierung verwendet werden. Das Ziel dieser Klonierung ist, dass alle oder einzelne Fragmente jeweils separat mit dem Vektor ligiert werden.

#### **4.11.4 $\alpha$ - $\omega$ -Komplementation (Blau-Weiß-Selektion)**

Die  $\alpha$ - $\omega$ -Komplementation ist eine Methode, die es ermöglicht, den Erfolg einer Klonierung in *E. coli* mit geringem Aufwand zu überprüfen. Innerhalb der *multiple cloning site* (mcs) der hierfür verwendeten Klonierungsvektoren liegt das für die  $\beta$ -Galactosidase kodierende *lacZ*-Gen. Die  $\beta$ -Galactosidase setzt bei der Spaltung des, dem Medium zugesetzten, farblosen Substrats X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid) das blaue 5-Brom-4-chlor-indigo frei. Wird in die mcs ein Insert eingebaut, kann keine intakte  $\beta$ -Galactosidase und folglich auch kein blauer Farbstoff mehr gebildet werden. Zellen, die einen Vektor mit Insert enthalten, können daher von Zellen mit einem Vektor ohne Insert anhand der Färbung unterschieden werden.

### **4.12 DNA-Transfer**

#### **4.12.1 Transformation von *Escherichia coli***

##### **Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen - CaCl<sub>2</sub>-Methode**

- *E. coli*  $\ddot{u}$ N-Flüssigkultur 1:50 in TBY überimpfen (50 ml)
- Inkubation bei 37°C auf dem Luftschüttler bis zu einer OD<sub>580</sub> = 0,5-0,8
- alle weiteren Schritte werden auf Eis durchgeführt

- 5 min bei 6000 x g und 4°C zentrifugieren (Sorvall RC5B Plus; Rotor SS-34), Überstand verwerfen
- Pellet in 5 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> (eiskalt) resuspendieren
- 30 min auf Eis inkubieren
- 5 min bei 6000 x g zentrifugieren
- Pellet in 1 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> mit 20 % Glycerin (eiskalt) resuspendieren
- Zellen zu 100 µl Aliquots in vorgekühlte Eppendorfggefäße portionieren
- Lagerung bei -80°C

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

- 200 µl kompetente Zellen auf Eis auftauen
- add. 10 µl des Ligationsansatzes bzw. 2 µl der Plasmid-DNA
- 30 min auf Eis inkubieren
- 2 min Hitzeschock bei 42°C
- 1 min auf Eis inkubieren
- add. 0,7 ml TBY-Medium, invertieren
- 30 min (bei Ampicillin-Resistenz vermittelnden Plasmiden) bzw. 45-90 min (bei allen anderen Antibiotika-Resistenz vermittelnden Plasmiden, wie Chloramphenicol und Kanamycin) bei 37°C inkubieren
- Zellen 1 min bei 13.200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Zellen im Rücklauf resuspendieren und auf Selektionsmedium ausplattieren
- Inkubation ün bei 37°C

#### **4.12.2 Elektroporation von *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis***

(Kirchner et al., 2001)

##### **Herstellung kompetenter *Cmm*-Elektroporationszellen**

- 250 ml TBY-Kultur mit *Cmm* animpfen
- Inkubation im Schüttler bei 28°C ün bis zu einer OD<sub>580</sub> = 1,0-1,2
- mit TBY auf eine OD<sub>580</sub> = 0,3 verdünnen
- von dieser Verdünnung 218,5 ml in neuem Kolben im Schüttler bei 28°C bis zu einer OD<sub>580</sub> = 0,6 anziehen (2-2,5 h)
- add. 31,5 ml 20 % Glycin (entspricht Endkonzentration von 2,5 % Glycin)
- Inkubation für 2 h im Schüttler bei 25°C
- alle weiteren Schritte auf Eis durchführen, alle Lösungen auf 0°C vorkühlen
- Zellsuspension in 500 ml Zentrifugenbecher überführen
- 10 min bei 7000 x g (Sorvall RC5B Plus, Rotor SLA3000) zentrifugieren, Überstand verwerfen, Rücklauf abziehen
- Pellet in 5 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O (Millipore) resuspendieren
- Suspension in 40 ml Zentrifugenröhrchen überführen
- add. 25 ml eiskaltes H<sub>2</sub>O (Millipore), gut vortexen

- 10 min bei 8000 x g und 4°C (Sorvall RC5B Plus, Rotor SS-34) zentrifugieren, Überstand verwerfen, Rücklauf abziehen
- Pellet in 1 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O (Millipore) resuspendieren (Vortex)
- add. 25 ml eiskaltes H<sub>2</sub>O (Millipore), vortexen
- 10 min bei 8000 x g und 4°C zentrifugieren, Überstand verwerfen, Rücklauf abziehen
- Waschvorgang zweimal mit eiskaltem 10 % Glycerin wiederholen
- add. 1 ml 15 % eiskaltes Glycerin, gut vortexen
- Zellen á 100 µl in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotieren
- Zellen sofort verarbeiten oder Lagerung bei -70°C
- (Bei eingefrorenen Zellen wird die Effektivität auf bis zu 50 % reduziert)

### Elektroporation kompetenter *Cmm*-Zellen

- Einstellungen des Gene Pulser (Firma Bio-RAD):
  - Kapazität: 25 µF
  - Parallelwiderstand: 600 Ω
  - Spannung: 12,5 kV/cm (2,5 kV bei 2 mm Küvetten)
- Zellen auf Eis auftauen. DNA und Küvetten (d = 2 mm) auf Eis stellen
- 400 µl SB-Medium in ein Eppendorfgefäß pipettieren
- 1-5 µl salzfreie DNA zu 100 µl kompetenten *Cmm*-Zellen geben und mischen
- Ansatz in vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettieren
- Küvette von außen abtrocknen, in die Apparatur stellen und Puls auslösen
- direkt nach dem Puls 150 µl SB-Medium in die Küvette geben und mischen danach den kompletten Küvetteninhalt in das Eppendorfgefäß mit den verbliebenen 250 µl SB-Medium geben
- 3 h bei 25°C inkubieren (Regeneration)
- 1 min bei 13.200 rpm zentrifugieren, Überstand z.T. abgießen
- Pellet im restlichen Überstand resuspendieren
- Zellen auf SB-Selektionsmedium ausplattieren
- Inkubation 3-6 Tage bei 25°C

## 4.13 DNA-DNA-Hybridisierung

### 4.13.1 Markierung der Hybridisierungssonde

(Firma Roche Diagnostics, Mannheim)

- 1 µg DNA (10 µl) mit H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> auf 16 µl auffüllen
- 10 min bei 100°C inkubieren
- sofort im Eis/Ethanol-Bad abkühlen lassen
- auf Eis dazugeben:
  - 2 µl Hexanucleotid Mix (10 x)
  - 2 µl dNTP *Labeling Mixture*
  - 1 µl Klenow-Polymerase
- mischen und kurz zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)

- 1-20 h bei 37°C inkubieren
- Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) und / oder 10 min Inkubation bei 70°C stoppen
- add. 2 µl 3 M Na-Acetat (pH 7,5) und 75 µl EtOH
- 2 h bei -20°C inkubieren
- 15 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit 50 µl 70 % EtOH waschen
- Pellet trocknen
- resuspendieren in 30 µl TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub>
- Sonde vor Gebrauch in 7 ml DIG-Prähybridisierungslösung lösen
- Lagerung bei -20°C

#### 4.13.2 Überprüfung der Markierungsreaktion (Dot Blot)

- 1 µl Sonde und je 2 µl markierte und nicht-markierte Kontroll-DNA (Dig-DNA Labeling Kit) auf Nylonmembran auftragen
- bei RT trocknen lassen, anschließend 5 min unter UV-Licht quervernetzen ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ )
- 1 min in DIG Puffer 1 waschen
- 30 min in DIG Puffer 2 inkubieren (Schüttler)
- 1 min in DIG Puffer 1 waschen
- 30 min in DIG Puffer 2 mit Antikörperkonjugat (1:10.000) inkubieren (Schüttler)
- zweimal 15 min mit DIG-Waschpuffer waschen (Schüttler)
- 2 min mit DIG Puffer 3 äquilibrieren
- Nylonmembran in DIG Färbelösung im Dunkeln färben
- zum Stoppen der Färbereaktion Nylonmembran 5 min in 1x TE-Puffer (pH = 7,5) oder H<sub>2</sub>O legen

#### 4.13.3 Southern-Hybridisierung

##### DNA-Transfer auf eine Nylonmembran durch Passiv Blot

- restringierte DNA-Proben im Agarosegel elektrophoretisch auftrennen
- DNA mit Ethidiumbromid anfärben, unter UV-Licht ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) fotografieren, Gel entfärben
- das Gel 5 min in Depurinierungslösung (Blot I) inkubieren, Lösung abgießen
- 2 x 15 min in Denaturierungslösung (Blot II) inkubieren, Lösung abgießen
- 2 x 15 min in Neutralisierungslösung (Blot III) inkubieren, Lösung abgießen

##### Blot-Aufbau

- Frapan faltenfrei auf der Unterlage befestigen
- Gel mit der Oberseite nach unten blasenfrei auf das Frapan legen
- Nylonmembran luftblasenfrei auf das Gel legen
- 5 Lagen mit Blotpuffer III getränktes Whatmanpapier auf die Membran legen

- ca. 10 cm dicken Stapel Einmal-Papierhandtücher auf das Whatmanpapier legen
- Glasplatte auf den Stapel legen und mit einem Gewicht beschweren
- Transfer der DNA über Nacht bei RT
- DNA auf der Nylonmembran 5 min unter UV-Licht ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) quervernetzen
- Membran zur Hybridisierung einsetzen

### **Prähybridisierung und Hybridisierung unter stringenten Bedingungen**

- Nylonmembran mit der DNA-Seite nach innen in einen Hybridisierungszylinder überführen
- add. 20 ml DIG-Prähybridisierungslösung
- mindestens 2 h bei 68°C im Hybridisierungsofen inkubieren (Rollvorrichtung)
- Digoxigenin-markierte DNA-Probe (Sonde) zu 7 ml DIG-Prähybridisierungslösung geben und 10-20 min bei 100°C denaturieren
- Prähybridisierungslösung abgießen und Sonde zugeben
- üN bei 68°C im Hybridisierungsofen inkubieren (Rollvorrichtung)

### **Immunologische Nachweisreaktion unter stringenten Bedingungen**

- Sonde abgießen und für eine Wiederverwendung bei -20°C lagern
- Membran 2 x 5 min mit jeweils 100 ml Waschpuffer I bei RT waschen (Rollvorrichtung), Lösung abgießen
- Membran 2 x 15 min mit jeweils 100 ml Waschpuffer II bei 68°C waschen (Rollvorrichtung), Lösung abgießen
- Membran in eine Hybridisierungsschale überführen (während der Inkubation mit den folgenden Lösungen wird die Hybridisierungsschale auf einen Schüttler gestellt)
- 1 min in 50 ml DIG-Puffer 1 bei RT inkubieren, Lösung abgießen
- 30 min in 100 ml DIG-Puffer 2 bei RT inkubieren, Lösung abgießen
- 1 min in 50 ml DIG-Puffer 1 bei RT inkubieren, Lösung abgießen
- 30 min in 25 ml DIG-Puffer 2 und 2,5  $\mu\text{l}$  Antikörperkonjugat (1:10.000) bei RT inkubieren, Lösung abgießen
- 2 x 15 min in jeweils 100 ml DIG-Waschpuffer bei RT inkubieren, Lösung abgießen
- Membran 2 min in 50 ml DIG-Puffer 3 inkubieren. Lösung abgießen
- add. DIG-Färbelösung
- im Dunkeln inkubieren, bis deutliche Banden zu sehen sind
- Reaktion durch Zugabe von H<sub>2</sub>O stoppen
- Membran trocknen und im Dunkeln aufbewahren

## 4.14 Polymerasekettenreaktion (PCR)

### 4.14.1 PCR mit Gesamt-DNA als Template

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für einen PCR stripe á 8 Tubes:

#### 225 µl Ansatz

22,5 µl	10x Reaktionspuffer S (Peqlab)
4,5 µl	dNTPs (je 10 mM) (Bioline)
4,5 µl	Primer 1 (50 µM)
4,5 µl	Primer 2 (50 µM)
6,75 µl	Taq-Polymerase
9 µl	Gesamt-DNA (1/50 verdünnt)
14,4 µl	DMSO
158,85 µl	H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub>
<hr/>	
225,0 µl	Gesamtvolumen

- den Reaktionsansatz auf 8 PCR-Tubes verteilen
- jeden Ansatz mit 25 µl PCR-Öl beschichten, um ein Verdampfen zu verhindern
- Reaktionsansätze in den RoboCycler Gradient 96 (Firma Stratagene) stellen
- Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Programm:

Zyklen	Dauer [min]	Temperatur [°C]
1	4	94
	1	94
35	1	Annealingtemperatur
	1	72
1	10	72

- Lagerung der PCR-Produkte bei 4°C oder -20°C bis zur Weiterverarbeitung
- Charakterisierung der PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese

Die für die einzelnen PCRs eingestellten Annealingtemperaturen sind in Tabelle 3.7 bzw. für die *real-time*-RT-PCR Primer in Tabelle 3.8 aufgeführt.

### 4.14.2 PCR mit ganzen Zellen als Template

#### Präparation der Template-DNA

- Zellen von Platte mit gelber Spitze in Eppendorfgefäß überführen
- in 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> lösen
- 5 min bei 13.200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand verwerfen

- Zellen im Rücklauf resuspendieren
- 1 µl für PCR (je 25 µl Ansatz) verwenden

Die Amplifikation erfolgt mit Ausnahme des ersten Denaturierungsschritts entsprechend der PCR mit Gesamt-DNA (8.1.). Der erste Denaturierungsschritt des PCR-Programms wurde von 4 min auf 10 min verlängert, damit die Zellen lysieren und die DNA zugänglich wird.

#### **4.15 Isolierung von Xylemsaft**

Für die Isolierung von Xylemsaft wurden je nach Verwendungszweck 6 bis 8 Wochen alte Tomatenpflanzen verwendet.

- Aussaat und Anzucht der Tomatenpflanzen in steriler Erde (Pikiererde)
- Pflanzen im Zwei-Blatt-Stadium (2 Wochen nach der Aussaat) entnehmen und in vorbereitete Pflanztöpfe (Durchmesser: 12 cm) mit steriler Topferde einpflanzen
- Anzucht der Pflanzen für zwei bis vier Wochen im Pflanzenraum bei 40-50 % relativer Luftfeuchtigkeit im Tag-Nacht-Rhythmus bei 25°C (Tag 16 h bei 12.000 Lux, Nacht 8 h im Dunkeln)
- Pflanzen ggf. nach zwei Wochen entnehmen und über Wurzelinfektion infizieren (4.20.1.1), dann weiter im Pflanzenraum anziehen
- Pflanzen unterhalb des ersten Fiederblattes mit einem sterilen Skalpell abtrennen
- Schnittfläche mit autoklaviertem H<sub>2</sub>O<sub>MP</sub> abspülen und mit einem Kimwipe trocken tupfen
- Xylemsaft innerhalb der folgenden 1-2 h, je nach Verwendungszweck, von der Schnittfläche pipettieren
- entnommenen Xylemsaft zunächst auf Eis lagern, anschließend bei -20°C oder für die GC-MS-Analysen nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C lagern

#### **4.16 Herstellung von Tomatenblatthomogenat**

Zur Herstellung von Tomatenblatthomogenat wurden 6 Wochen alte Tomatenpflanzen verwendet, die 2 Wochen nach Aussaat vereinzelt wurden und im Pflanzenraum bei 40-50 % relativer Luftfeuchtigkeit im Tag-Nacht-Rhythmus bei 25°C (Tag 16 h bei 12.000 Lux, Nacht 8 h im Dunkeln) angezogen wurden.

- Fiederblätter vom Spross trennen und Gewicht bestimmen
- Fiederblätter mit Mörser und Pistill bearbeiten, so dass möglichst viel Flüssigkeit gewonnen wird
- flüssigen Anteil des Homogenats 1 min bei 13.000 rpm (Kühlzentrifuge Sigma 3-18K, Rotor 12156) zentrifugieren
- Überstand 1 x über einen Faltenfilter filtrieren, gegebenenfalls etwas PS-Puffer hinzugeben; das Filtrat sollte maximal 5 % PS-Puffer enthalten
- Filtrat mit PS-Puffer auffüllen (5 % PS-Puffer, 95 % Tomatenblatthomogenat)
- Filtrat 2 x sterilfiltrieren (0,45 µm Porengröße)
- Lagerung des Tomatenblatthomogenats bei -20°C

#### 4.17 Analyse des Xylemsafts mittels GC-MS

Die GC-MS-Analysen wurden von Aiko Barsch (AG für Proteom- und Metabolomforschung, Universität Bielefeld) durchgeführt.

##### **Metabolitderivatisierung** (modifiziert nach Roessner et al., 2000)

- 10 µl Ribitol (1 mM) als internen Standard zu 10 µl Xylemsaft pipettieren
- bei -80°C einfrieren, anschließend lyophilisieren
- Derivatisierung der Carbonyl-Reste:
  - add. 50 µl 20 mg/ml Methoxyamin-Hydrochlorid in Pyridin
  - unter ständigem Rühren 90 min bei 37°C inkubieren
- Derivatisierung mit Trimethylsilan
  - add. 50 µl N,N-Bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid (BSTFA)
  - 30 min bei 37°C inkubieren

##### **GC-MS**

Die GC-MS-Analysen wurden mit einem TraceGC Gaschromatographen und einem PolarisQ Ion-Trap-Massenspektrometer mit AS2000 Autosampler (Thermo Finnigan, Dreieich) durchgeführt.

- 1 µl derivatisierte Xylemsaftprobe bei 250°C Injektortemperatur injizieren
  - Gas-Chromatograph mit:
    - 30-m x 25-mm Equity-5-Säule mit 0,25-µm 5% Diphenyl/95 % Dimethylsiloxan-Beschichtung (Supelco, Bellfonte, Californien)
    - Interface-Temperatur: 250°C
    - Temperatur der Ionenquelle: 200°C
    - Helium-Trägergas: 1 ml/min
- nach 3 min konstanter Erhitzung bei 80°C Ofentemperatur in 5°C/min Schritten auf 325°C erhöhen
- zur Äquilibrierung des Systems für die nächste Injektion Temperatur für 5 min auf 80°C einstellen
- Massenspektren mit 2 Scans/s (Scanbereich: 50-550 m/z) aufzeichnen
- Evaluierung der Chromatogramme und automatische Peakquantifizierung ausgewählter Metabolite mit Xcalibur 2.0 Software (Thermo Finnigan). Um die Messungen der verschiedenen Proben miteinander vergleichen zu können, erfolgte eine Normalisierung der Peakfläche jeder Substanz gegen die Peakfläche von Ribitol, das als interner Standard eingesetzt wurde.
- Identifizierung der Metabolite durch Vergleich mit der NIST 98-Datenbank (NIST, Gaithersburg, MD, USA) und durch Vergleich mit gereinigten Standards

#### 4.18 Kultivierung von *Cmm* zur Überprüfung einer Populationsdichte-abhängigen Genexpression (*Quorum-Sensing*)

- *Cmm*-Kultur aus der stationären Wachstumsphase (42 h nach Beimpfen des M9-Minimalmediums) 10 min bei 8000 rpm (Sigma 3-18K) zentrifugieren
- Überstand sterilfiltrieren (Filter: 0,22 µm Porengröße)
- 100 µl des sterilfiltrierten Überstands auf C-Medium ausplattieren, um nachzuweisen, dass keine Bakterien aus der stationären Kultur enthalten sind (Nachweisgrenze: 10 Bakterien/ml)
- um einen Tag versetzt angeimpfte Kulturen 18 h nach Beimpfen des Mediums (logarithmische Wachstumsphase) 10 min bei 8000 rpm zentrifugieren
- Überstand der ersten (logarithmischen) Kultur verwerfen und quantitativ durch sterilfiltrierten Überstand der stationären Kultur ersetzen, Zellen suspendieren
- sedimentierte Zellen der zweiten (logarithmischen) Kultur in ihrem ursprünglichen Überstand resuspendieren
- Kulturen auf dem Luftschüttler bei 90 rpm und 26°C inkubieren

#### 4.19 Filterkreuzungsmethode (Konjugation)

(Abt, 2008)

- separate Anzucht einer  $\Delta$ N-Flüssigkultur von Donor und Rezipient in TBY
- mit TBY auf eine  $OD_{580}$  von 0,2 bis 0,5 verdünnen
  - alternativ: mit M9-Minimalmedium waschen, auf eine  $OD_{580}$  von 0,05-0,08 verdünnen
- Inkubation auf dem Luftschüttler (90 rpm) bei 26°C bis zu einer  $OD_{580}$  von 1-2
- Zellsuspension so mit TBY bzw. M9-Minimalmedium verdünnen oder ankonzentrieren, dass sie eine theoretische  $OD_{580}$  von 1,5 hat
- Donor und Rezipient im gewünschten Verhältnis (1:1) mischen
- Nitrocellulosefilter (Porengröße: 0,45 µm, Durchmesser: 25 mm, Firma Sartorius) auf C-Medium- bzw. M9-Medium-Agar-Platten legen
- 200 µl des Donor-Rezipient-Gemischs auf den Filter auftragen, trocknen lassen
- Inkubation bei 26°C für 20 h (C-Medium) bzw. 22 h (M9-Medium)
- Zellen abschwemmen, dazu den Filter mit den Zellen nach Innen in ein Eppendorfgefäß geben, 1,2 ml TBY hinzugeben und für 1 min vortexen
- Verdünnungsreihe anlegen, entsprechend der Selektion auf Donor, Rezipient und Transkonjugant auf Antibiotika-haltigen Platten ausplattieren (C-Med bzw. M9-Med)
- 3-5 Tage bei 26°C inkubieren
- Anzahl der *colony forming units* (cfu) von Donor, Rezipient und Transkonjugant bestimmen, Titer (cfu/Filter) berechnen
- Transferhäufigkeit (Transkonjuganten pro reisoliertem Rezipienten) berechnen

## 4.20 Methoden zur Analyse des Pathogenitätsverhaltens von *Cmm*

### 4.20.1 Pflanzentests mit der Wirtspflanze *Solanum lycopersicum*

#### 4.20.1.1 Wurzelinfektion

Die Wurzelinfektion wurde in dieser Arbeit hauptsächlich dazu verwendet, die Virulenz von *Cmm*-Mutanten im Vergleich zu entsprechenden Kontrollstämmen zu ermitteln. Indizien für den Virulenzgrad sind der Welkeindex, der Anteil an Pflanzen mit Welkesymptomen über den gesamten Testzeitraum sowie der Bakterientiter und das Gewicht der infizierten Pflanzen am Ende des Testzeitraums.

- Aussaat und Anzucht der Tomatenpflanzen in steriler Erde (Pikiererde)
- Pflanzen im Zwei-Blatt-Stadium (ca. 2 Wochen nach der Aussaat) entnehmen und anhaftende Erde entfernen
- *Cmm* in sterilem Leitungswasser in einem Reagenzglas resuspendieren und eine OD<sub>580</sub> von 8 bis 10 einstellen
- 0,5-1 ml dieser Suspension in ein Eppendorfgefäß füllen
- Pflanzen 20 min in *Cmm*-Bakteriensuspension inkubieren (3-4 Pflanzen pro Eppendorfgefäß)
- Pflanzen in vorbereitete Pflanztöpfe mit steriler Erde einsetzen
- Anzucht der Pflanzen im Pflanzenraum bei 40-50 % relativer Luftfeuchtigkeit im Tag-Nacht-Rhythmus bei 25°C (Tag 16 h bei 12.000 Lux, Nacht 8 h im Dunkeln)
- Welkesymptome über einen Zeitraum von 28 Tagen protokollieren

#### 4.20.1.2 Ermittlung des Welkeindex und des Welkeverlaufs

Als Welkeindex eines *Cmm*-Stamms wird der Zeitraum bezeichnet, zu dem 50 % der infizierten Pflanzen deutliche Welkesymptome aufweisen (Bermpohl, 1990).

Der Welkeverlauf gibt Aufschluss über den genauen Welkestatus aller Pflanzen. Hierzu werden täglich die Welkesymptome der einzelnen Pflanzen nach einem vierstufigen Schema protokolliert. Pflanzen mit einer sich leicht einkrümmenden Blattspitze werden mit „(+)“, eindeutige Welkesymptome (mindestens ein deutlich welkendes Blatt) mit „+“ gekennzeichnet. Sehr starke Welke, bei der mehr als 2/3 der Blätter einer Pflanze welken, werden mit „++“ bewertet. Sind alle Blätter einer Pflanze durch die Welke so stark beeinträchtigt, dass sie nicht mehr zur Photosynthese befähigt sind, werden die Pflanzen als „tot“ bezeichnet.

#### 4.20.1.3 Gewichts- und Größenbestimmung der Pflanzen

Zur Bestimmung des Frischgewichts und der Größe der Tomatenpflanzen den Spross direkt oberhalb der Erde mit einem sterilen Skalpell oder einer sterilen Schere abtrennen. Anschließend die Pflanze wiegen und mit einem Lineal die Größe der Pflanze, von der Schnittfläche bis zum obersten Punkt der Pflanze, bestimmen.

#### 4.20.1.4 Kolonisationstest

##### Reisolierung von *Cmm* aus Pflanzenhomogenat

- Mörser und Pistill mit 70 % (v/v) Ethanol sterilisieren
- Pflanze mit einer sterilen Schere direkt oberhalb der Erde abschneiden, Größe und Gewicht (siehe 4.20.1.3) bestimmen, in kleine Stücke zerschneiden und in den Mörser geben
- den Mörser soweit mit flüssigen Stickstoff befüllen, dass alle Pflanzenteile bedeckt sind und mit dem Pistill sorgfältig zerkleinert werden können (Schutzbrille tragen)
- PS-Puffer hinzugeben (1 ml PS-Puffer/1 g Frischgewicht)
- solange mörsern, bis eine homogene Suspension entstanden ist
- von der Suspension eine Verdünnungsreihe anlegen und je 100 µl der ausgewählten Verdünnungsstufen ausplattieren
- 3-5 Tage bei 25°C inkubieren
- Anzahl der *colony forming units* (cfu) und gewichtetes Mittel bestimmen.

##### Berechnung des gewichteten Mittelwerts

Zur Berechnung des Bakterientiters einer Bakteriensuspension, wird eine Verdünnungsreihe der Suspension angelegt. Von geeigneten Verdünnungsstufen werden 100 µl auf den jeweiligen Bakterien entsprechenden Agar-Platten ausplattiert. Die Platten werden bei 25-28°C (*Clavibacter michiganensis* sp.) bebrütet und die Kolonienzahl (*colony forming units*, cfu) wird bestimmt.

Verdünnungsreihen sind immer mit Fehlern, die zum größten Teil aus Pipettierungenauigkeiten resultieren und sich von Verdünnungsstufe zu Verdünnungsstufe vervielfachen, behaftet. Folglich ist der cfu-Wert der niedrigsten Verdünnungsstufe, die noch ausgezählt werden kann, immer der Genaueste. Aus diesem Grund berechnet man nicht den arithmetischen Mittelwert der einzelnen Verdünnungsstufen sondern das gewichtete Mittel. Das bedeutet, dass die niedrigste ausgezählte Verdünnungsstufe mit 100 %, die nächste mit 10 %, die folgende mit 1 % usw. gewertet wird.

Rechnerisch wird dies so umgesetzt, dass die Summe der ausgezählten Kolonien aller Verdünnungsstufen je nach Anzahl der einbezogenen Verdünnungsstufen durch 1,1 (2 Verdünnungsstufen), 1,11 (3 Verdünnungsstufen) oder 1.111 (4 Verdünnungsstufen) dividiert wird.

#### 4.20.1.5 Infektion mittels Punktieren des Fiederblattstiels

Diese Infektionsart wurde in dieser Arbeit hauptsächlich verwendet, um *Cmm*-RNA aus infizierten Pflanzen zu gewinnen. Im Gegensatz zur Wurzelinfektion ist die inokulierte Zellmenge definiert und die Isolierung von *Cmm* kann direkt aus dem Infektionsbereich erfolgen. Bei der Wurzelinfektion werden die Pflanzen mit einer *Cmm*-Suspension mit einem definiertem OD<sub>580</sub>-Wert infiziert, die Anzahl der Zellen, die tatsächlich in die Pflanze eindringen, ist allerdings schwer zu bestimmen und kann stark variieren.

- Aussaat und Anzucht der Tomatenpflanzen in steriler Erde (Pikiererde)
- Pflanzen im Zwei-Blatt-Stadium (2 Wochen nach der Aussaat) entnehmen und in vorbereitete Pflanztöpfe (Durchmesser: 12 cm) mit steriler Topferde einpflanzen
- Anzucht der Pflanzen für zwei Wochen im Pflanzenraum bei 40-50 % relativer Luftfeuchtigkeit im Tag-Nacht-Rhythmus bei 25°C (Tag 16 h bei 12.000 Lux, Nacht 8 h im Dunkeln)
- Bakterien von einer C-Medium-Platte in ein 12 ml Greinerröhrchen überführen und in PS-Puffer resuspendieren,  $OD_{580}$  von 2 einstellen ( $10^9$  Zellen/ml)
- Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$  bis  $10^{-7}$  anlegen
- je 100  $\mu$ l der Verdünnungsstufen  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  auf Nährmedien ausplattieren, Inkubation für 3-5 Tage bei 25°C, Anzahl der *colony forming units* (cfu) bestimmen und Titer berechnen
- mit steriler Kanüle 5- bis 10-mal an der Basis eines Fiederblattstiels 4 Wochen alter Pflanzen (Abbildung 4.3) vorsichtig einstechen (punktieren), so dass das Fiederblatt nicht abknickt aber die Verletzung durch Verfärbung (dunkelgrün) des punktierten Bereichs sichtbar ist
- 5 bis 10  $\mu$ l der  $10^{-3}$  Verdünnung (ca. 5000 bis 10.000 Bakterien) auf die punktierte Fläche pipettieren und einziehen lassen
- weitere Anzucht der Pflanzen im Pflanzenraum bei 40-50 % relativer Luftfeuchtigkeit im Tag-Nacht-Rhythmus bei 25°C (Tag 16 h bei 12.000 Lux, Nacht 8 h im Dunkeln)
- an einer Pflanze kann diese Infektion an mehreren Fiederblättern gleichzeitig durchgeführt werden



**Abbildung 4.3:** Infektion von Tomatenpflanzen mittels Punktieren. A: Totalansicht Tomate 4 Wochen alt. B: Detailansicht der Infektionsstelle an der Basis des Blattstiels des 2. Fiederblatts.

Für die Isolierung von *Cmm*-RNA aus infizierten Tomaten wurde 10 Tage nach Infektion das punktierte Gewebe mit einem sterilen Skalpell abgetrennt und unter Zugabe von flüssigem Stickstoff sehr fein gemörsert. Das so entstandene Pulver wurde, ohne es auftauen zu lassen, aliquotiert ( $\approx$  60 mg/Eppendorfgefäß) und diese bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **4.20.2 Test zur Auslösung der Hypersensitiven Reaktion (HR) bei *Mirabilis jalapa*, *Nicotiana benthamiana* bzw. *Nicotiana tabaccum* cv. Samsun**

- *Mirabilis jalapa* (*Nyctaginaceae*) bzw. die Solanaceen *Nicotiana benthamiana* oder *Nicotiana tabacum* cv. Samsun bis zu einer Größe von 30-60 cm anziehen (ca. 6 Wochen)
- Bakterien in sterilem PS-Puffer, pH 7,0, in einem Reagenzglas resuspendieren
- OD<sub>580</sub> von 8,0 einstellen
- Bakteriensuspension mit einer Spritze aufziehen
- Spritze (Durchmesser der Spritzenöffnung: 3 mm) im Interzellularraum an die Hinterseite eines Blattes fest ansetzen und mit dem Finger von der Vorderseite des Blattes leicht dagegen drücken (Spritze nicht in unmittelbarer Nähe eines Leitbündels ansetzen!)
- mit mittelstarkem Druck die Bakteriensuspension aus der Spritze drücken, so dass die Suspension in das Blattgewebe aufgenommen wird

Pflanzen 2-3 Tage in den Pflanzenraum, 40-50 % relative Luftfeuchtigkeit im Tag-Nacht-Rhythmus bei 25°C (Tag 16 h bei 12.000 Lux, Nacht 8 h im Dunkeln), stellen und in diesem Zeitraum Änderungen des Blattgewebes im Bereich des Spritzenansatzes (Färbung) verfolgen.

## 5 Ergebnisse

Ein neuer experimenteller Ansatz zur Untersuchung der Interaktion zwischen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) und seiner Wirtspflanze *Solanum lycopersicum* (Tomate) besteht in der Aufnahme des genomweiten Expressionsmusters von *Cmm in planta* mittels Microarraytechnologie und dem Vergleich mit dem Expressionsmuster in Flüssigkultur. Damit sollte es möglich sein, weitere Gene zu identifizieren, die z.B. an der Kolonisierung oder der Symptomausprägung beteiligt sind. Da zu Beginn dieser Arbeit noch keine Microarrayexperimente mit *Cmm* durchgeführt worden waren, war es zunächst notwendig diese Technik für das Bakterium zu etablieren. Die Auswahl der auf dem Microarray repräsentierten ORFs, das Design der spezifischen Oligonukleotide sowie die Erstellung des für *Cmm* NCPPB382 spezifischen Microarrays Cmm3kOLI wurden im Rahmen des BMBF-Projekts *Genomik-Plus* (FKZ 0313105) von Prof. Dr. Anke Becker am Lehrstuhl für Genetik (Universität Bielefeld) durchgeführt. Die Funktionalität des Microarrays wurde mittels eines sogenannten „Gelb-Experiments“ getestet, bei dem u.a. ein Schwellenwert für den M-Wert ( $\log_2$  der Differenz der Signalintensitäten) bestimmt wurde. Der M-Wert, der den quantitativen Unterschied der Genexpression zwischen zwei Versuchsbedingungen wiedergibt, muss oberhalb der durch technische Varianzen bedingten Streuung liegen, um sicher zu sein, dass eine differentielle Genexpression vorliegt. In einem zweiten Kontrollexperiment wurde überprüft, ob die gewählten Methoden zur Probenentnahme und RNA-Isolierung geeignet sind, um Unterschiede im Transkriptionslevel bestimmter Gene nachzuweisen. Vorab war es ebenfalls wichtig, die untersuchten Gene bzw. die Proteine, die durch sie codiert werden, in funktionelle Gruppen einzuordnen. Bei der Auswertung eines Microarrayexperiments kann dann überprüft werden, ob differentiell exprimierte Gene gehäuft zu bestimmten funktionellen Gruppen gehören.

### 5.1 Eigenschaften des Microarrays Cmm3kOLI

Der in dieser Arbeit verwendete Microarray Cmm3kOLI ermöglicht die Analyse des Expressionsverhaltens von 3239 ORFs von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. Neben genspezifischen 50mer- bis 70mer-Oligonukleotiden aller 3080 chromosomalen und plasmidcodierten Gene sind auch Oligonukleotide zu den zwei *rnr*-Operons (CMM\_RNA\_0001 und -\_0002) und dem die tmRNA codierenden Gen (Cmm\_fin\_1176a) auf dem Microarray vertreten. Für jedes Pseudogen, dessen Sequenz durch ein oder mehrere Stoppcodons unterbrochen ist, wurde pro „Teilsequenz“ ein spezifisches Oligonukleotid generiert. Des Weiteren sind auf dem Array 108 Oligonukleotide für zum Teil lediglich automatisch annotierte hypothetische ORFs enthalten, die in der manuellen Annotation verworfen wurden. Diese Gene wurden in die Auswertungen der Microarrayexperimente allerdings nicht mit einbezogen.

Jedes der 3239 genspezifischen Oligonukleotide ist in 4 Replikaten auf dem Microarray vertreten. Stringenzkontrollen mit je 70 %, 80 % und 90 % Sequenzidentität zu den fünf Genen *rpsA*, *rpsO*, *rpsP*, *rpmL* und *gapA* ermöglichen es, das Ausmaß der Kreuzhybridisierung zu analysieren. Zudem enthält der Microarray fünf *spiking*-Kontroll-Oligonukleotide, zu denen

Sonden mit bekannten Konzentrationen vorliegen, und zwölf *alien*-DNA-Oligonukleotide (mit Sequenzen, die nicht im *Cmm*-Genom enthalten sind). 356 Spots beinhalten lediglich den *spotting buffer*, auf den verbleibenden 384 spots wurde nichts aufgetragen („*empty*“).

## 5.2 Einteilung der *Cmm*-Gene in funktionelle Gruppen

Für die Auswertung der Microarraydaten war es sinnvoll, eine Einordnung aller untersuchten Gene aufgrund ihrer vorhergesagten Funktion vorzunehmen. Eine wichtige Grundlage für eine solche Eingruppierung sind z.B. die COG- (*Cluster of orthologues genes*, Tatusov et al., 1997; Tatusov et al., 2003) und die KEGG-Gruppen (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, (Kanehisa, 1996; Kanehisa et al., 2008). Diese waren auch die Basis für die in Zusammenarbeit mit Dr. Karl-Heinz Gartemann (Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld) erstellten funktionellen Gruppen für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Dazu war es allerdings notwendig die Gruppen an *Cmm* anzupassen und dabei insbesondere Gene, denen, zum Teil durch Experimente belegt, eine Rolle in der pathogenen Interaktion von *Cmm* mit der Tomate zugeschrieben wird, in einer separaten Gruppe zusammenzufassen. Im Gegensatz zu den COG- und KEGG-Gruppierungen wurde jedes Gen nur einer funktionellen Gruppe zugeteilt, wodurch erste Auswertungen erleichtert werden sollten, obwohl einige Gene sicherlich auch in mehrere Gruppen eingeordnet werden könnten.

Insbesondere für die Gene (41,6 % aller 3239 auf den Microarray repräsentierten Gene), die keiner COG-Gruppe (908 Gene) oder lediglich den COG-Gruppen “S” (unbekannte Funktion; 177 Gene) bzw. “R” (nur generelle Funktionszuordnung; 263 Gene) zugeordnet waren, wurde versucht durch erneute Datenbankabgleiche (mittels Blastp und cds) und/oder Untersuchung der Funktion benachbarter Gene, die eventuell in einem Operon organisiert vorliegen, eine genauere Funktionszuordnung vorzunehmen als in der mittlerweile etwa 5 Jahre alten Annotation. Insgesamt 62 Gene konnten so in Gruppen mit präziserer Funktionsbeschreibung eingruppiert werden. Nach aktuellen Abfragen ([www.genome.jp/kegg/](http://www.genome.jp/kegg/)) sind 1211 *Cmm* Gene einer KEGG-Gruppe zugeordnet. Dies entspricht 37,4 % aller auf *Cmm*3kOLI repräsentierten Gene.

Zusätzlich zu den vier COG-Hauptgruppen „Metabolismus“, „Zelluläre Prozesse“, „Informationsspeicherung und -prozessierung“ und „Schlecht charakterisiert“, die Gene umfasst, denen nur eine generelle Funktion zugeordnet werden konnte oder deren Funktion unbekannt ist, wurden die Gene einer zusätzlichen Hauptgruppe, „Potentiell relevant für die phytopathogene Interaktion“, zugeordnet (Tabelle 5.1). Diese Gruppe wurde in die Untergruppen Transporter, Proteintransport, Regulatoren, Stress, Resistenz, extrazelluläre Enzyme und intrazelluläre Proteasen aufgeteilt. Sie umfasst also 1. extrazelluläre Proteine, die direkt mit dem Wirt interagieren können, 2. Transporter, die durch Export und Import von Metaboliten an der Interaktion beteiligt sein können, 3. regulatorische Proteine, die die Anpassung an das Habitat und die jeweilige Infektionsphase vermitteln können und 4. Proteine, die Schutz oder Resistenz vor verschiedenen Stressoren vermitteln können. In der

nachfolgenden Tabelle 5.1 ist die Gruppeneinteilung und die Anzahl der Gene in den einzelnen Kategorien dargestellt.

**Tabelle 5.1:** Vereinfachte funktionelle Klassifizierung aller auf dem Microarray Cmm3kOLI repräsentierten *Cmm*-Gene. Die Gruppe „hypothetische Proteine“ enthält auch die 108 in der manuellen Annotation verworfenen ORFs. Die ausführliche Liste befindet sich im Anhang auf S. 159 (Tabelle 8.1).

<b>Gruppe</b>	<b>Anzahl</b>
<b>I Metabolismus</b>	<b>578</b>
<b>Energie-, Kohlenstoffmetabolismus</b>	<b>212</b>
Glycolyse	27
Pentose-Phosphatweg	26
Citrat Zyklus	25
oxidative Phosphorylierung	20
übrige Zucker und andere C-Verbindungen	21
Energie, Rest	2
Pyruvat, Umwandlungsreaktionen verschiedener Energieträger (ATP; PO <sub>4</sub> ; NAD(P))	5
n-Glycan (Glucosidasen)	40
Aminozucker	10
Nukleotidzucker	3
Inositol	7
Epimerasen / Isomerasen	19
Zuckeraktivierung (Phosphatasen)	7
<b>Aminosäuren</b>	<b>134</b>
Aminotransferasen	6
<b>Biosynthese</b> → 7 Untergruppen	<b>111</b>
Harnstoff	5
Katabolismus und Proteinmodifikation	12
<b>Nukleotide</b> → 3 Untergruppen	<b>60</b>
<b>Lipide</b> → 3 Untergruppen	<b>47</b>
<b>Coenzyme</b> → 11 Untergruppen	<b>83</b>
<b>Sekundärmetabolismus</b> → 4 Untergruppen	<b>42</b>
<b>II Zelluläre Prozesse</b>	<b>177</b>
<b>Zellzyklus</b> → 2 Untergruppen	<b>34</b>
<b>Zellwand</b>	<b>143</b>
<b>Biosynthese</b> → 4 Untergruppen	<b>57</b>
Zelloberfläche	19
Sortasen	2
<b>EPS</b> → 4 Untergruppen	<b>65</b>
<b>III Informationsspeicherung und -prozessierung</b>	<b>277</b>
<b>Replikation</b> → 9 Untergruppen	<b>116</b>
<b>Transkription</b> → 2 Untergruppen	<b>24</b>
<b>Translation</b>	<b>137</b>
ribosomale Proteine	54
tRNA-Prozessierung und Modifikation	23
Initiation, Elongation, Termination	12
Translation, Rest	41
GTP Bindeproteine	7

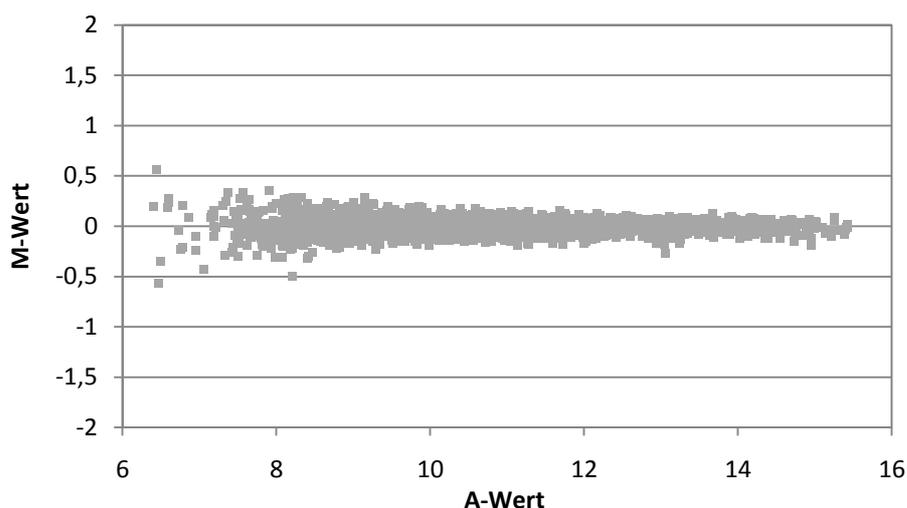
<b>IV Potentiell relevant für die phytopathogene Interaktion</b>	<b>921</b>
<b>Transporter</b>	<b>393</b>
<b>ABC</b> → 8 Untergruppen	<b>232</b>
<b>Permeasen</b> → 9 Untergruppen	<b>129</b>
Transporter, Energie	12
Kanäle	4
Phosphotransferasesysteme	16
<b>Proteintransport</b>	<b>61</b>
<b>TypII-Sekretionssystem</b> → 4 Untergruppen	<b>19</b>
Konjugation	30
Piline	12
<b>Regulatoren</b>	<b>288</b>
Transkriptionsregulatoren	179
Zwei-Komponenten-Regulatoren	59
<i>winged helix</i> DNA Bindeproteine	3
Sigmafaktoren	20
Histon ähnliche Proteine	4
Mox-Regulatoren (ATPasen, Proteinebene)	4
Serin/Threonin Protein-Phosphatasen	15
weitere Regulatoren (Proteinebene)	4
<b>Stress</b> → 6 Untergruppen	<b>36</b>
<b>Resistenz</b> → 8 Untergruppen	<b>60</b>
<b>extrazelluläre Enzyme</b>	<b>44</b>
extrazelluläre Serinproteasen	21
Pseudogene, extrazelluläre Serinproteasen	8 (3)
weitere extrazelluläre Proteine (z.B. Cellulasen, Tomatinase, Xylanasen)	15
<b>intrazelluläre Proteasen</b>	<b>39</b>
Metalloproteasen	16
Cysteinproteasen	3
Serinproteasen	17
andere Proteasen	3
<b>V Schlecht/kaum charakterisiert</b>	<b>1286</b>
<b>generelle Funktionszuordnung</b> → 7 Untergruppen	<b>244</b>
<b>Funktion unbekannt</b>	<b>1042</b>
konserviert hypothetische Proteine	501
hypothetische Proteine	502
Pseudogene	39 (23)

### 5.3 Etablierung der Transkriptomethodik für *Clavibacter*

#### 5.3.1 Analyse des Microarrays Cmm3kOLI bezüglich seiner technischen Varianz

Aufgrund technischer Varianzen, die bei Microarrayexperimenten bislang nicht weiter minimiert werden können, unterliegen die M-Werte ( $\log_2$  der Differenz der Signalintensitäten) immer einer gewissen Streuung. Um diese Streuung und somit auch einen Schwellenwert für M zu definieren und die Reproduzierbarkeit der Sondenherstellung zu überprüfen, wurde ein sogenanntes Gelb-Experiment durchgeführt. Bei diesem Experiment werden zwei Aliquots einer RNA-Probe revers in cDNA transkribiert, anschließend mit Cy5 bzw. mit Cy3 markiert und dann gemeinsam gegen den zu testenden Microarray hybridisiert. Da die gleiche Menge identischer RNA verwendet wurde, sollten sich die Signalintensitäten beider Farbstoffe nicht wesentlich unterscheiden und somit theoretisch für jedes Gen ein M-Wert von 0 zu erwarten sein (Dudoit et al., 2002).

Zur Bestimmung der technischen Varianz des Microarrays CMM3kOLI und der Reproduzierbarkeit der Sondenherstellung für *Cmm* wurde RNA aus drei unabhängigen Kultivierungen von *Cmm* NCPPB382 für die Herstellung markierter cDNA verwendet. Die Zellen wurden ca. 18,6 h nach Inokulation des M9-Minimalmediums (4 % Glucose als Kohlenstoffquelle) in der logarithmischen Wachstumsphase entnommen (vergleichbar mit dem Zeitpunkt der Probenentnahme für logarithmische Zellen, 5.3.2, Abbildung 5.2). Nach Hybridisierung der Cy3- und Cy5-markierten Sonden, die jeweils aus RNA des gleichen biologischen Replikats generiert wurden, konnte die technisch bedingte Varianz der M-Werte ermittelt werden. In Abbildung 5.1 sind in einem sogenannten Scatterplot die M-Werte ( $\log_2$  der Differenz der Signalintensitäten) gegen die A-Werte ( $\log_2$  der Signalintensitäten) aufgetragen.



**Abbildung 5.1:** Scatterplot des Gelbexperiments zur Überprüfung der technischen Varianz der M-Werte. M:  $\log_2$  der Differenz der Signalintensitäten, A:  $\log_2$  der Signalintensitäten. Dargestellt sind die normalisierten Werte von drei biologischen Replikaten. Gene, von denen weniger als 7 der insgesamt 12 Replikate (4 pro Array) ausgewertet werden konnten, wurden nicht berücksichtigt.

99 % aller Gene wiesen einen M-Wert zwischen -0,3 und 0,3 auf, welches einen 1,2-fachen Unterschied in der Transkriptmenge zwischen der Cy3- und der Cy5-markierten Probe wiedergibt. Deutlich zu erkennen ist, dass die Streuung der M-Werte mit abnehmender Signalintensität (A-Wert) zunimmt. So weisen die Gene mit der höchsten Streuung der M-Werte auch relativ niedrige A-Werte auf (CMM\_0318: M=-0,567, A=6,471; CMM\_1870: M=0,560, A=6,438). Die hier festgestellte technische Varianz der M-Werte ist vergleichbar mit der, die für Microarrays anderer Organismen beschrieben wurde und liegt somit im normalen Bereich (Hüser et al., 2003; Rüberg et al., 2003; Serrania et al., 2008).

Im Scatterplot nicht gezeigt sind die Werte von 10 Genen, bei denen die Signalintensitäten nur von weniger als 7 der insgesamt 12 Replikate (je 4 Replikate pro Microarray) bestimmt werden konnten (siehe Tabelle 5.2). Auffällig ist, dass fünf dieser zehn Gene zudem einen sehr niedrigen A-Wert (< 6,0) aufweisen.

**Tabelle 5.2:** Gene mit zu geringer Replikanzahl (**n**) im Gelb-Experiment (maximal mögliche Replikanzahl für jedes Gen: n = 12). **M:**  $\log_2$  der Differenz der Signalintensitäten, **A:**  $\log_2$  der Signalintensitäten, **p:** Fehlerwahrscheinlichkeit. nd: nicht detektiert.

GenDB_ID	Genname	Funktion	M	A	p	n
CMM_0705	-	konserviert hypothetisches Protein	nd	nd	nd	0
CMM_0920	-	konserviert hypothetisches Protein	nd	nd	nd	0
CMM_2503	<i>ppkA</i>	Polyphosphat-Kinase (EC 2.7.4.1)	nd	nd	nd	0
CMM_1636	<i>glnA1</i>	Glutaminsynthetase I (EC 6.3.1.2)	-2,66	5,44	nd	1
CMM_0951	-	Membranprotein	-0,49	4,80	nd	1
CMM_2826	-	Cytosin Permease, NCS1-Familie	1,63	5,24	nd	1
CMM_0707	-	Zwei-Komponenten-System, Sensor-Kinase	2,17	5,34	0,84	2
CMM_2737	<i>glpX</i>	Fructose-1,6-Bisphosphatase (EC 3.1.3.11)	2,56	5,42	0,80	2
CMM_2710	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	-0,01	10,53	0,99	3
CMM_2677	-	Transkriptionsregulator, TetR-Familie	0,53	9,73	0,85	5

Zur Vermeidung falsch-positiver Resultate ist es wesentlich, neben dem M-Wert auch Grenzwerte für die auswertbare Replikanzahl, die Signalintensität (A) und insbesondere für den p-Wert (t-Test Statistik) festzulegen. Die Replikanzahl (n) sollte bei 3 biologischen Replikaten mit je 4 Spots pro *slide* bei mindestens 7 liegen, also einen Wert von mindestens  $\frac{1}{2} n_{Max} + 1$  aufweisen. Die Signalintensität (A) sollte über dem entsprechenden Wert der Kontrollen "empty" und "spotting buffer" liegen. Daher wurde für A ein Grenzwert von  $A_{Kontrolle} + 1$  gewählt. Für p wurde ein Maximalwert von 0,05 verwendet. Das bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit einer falsch-positiven Detektion bei maximal 5 % liegt (Dudoit et al., 2002).

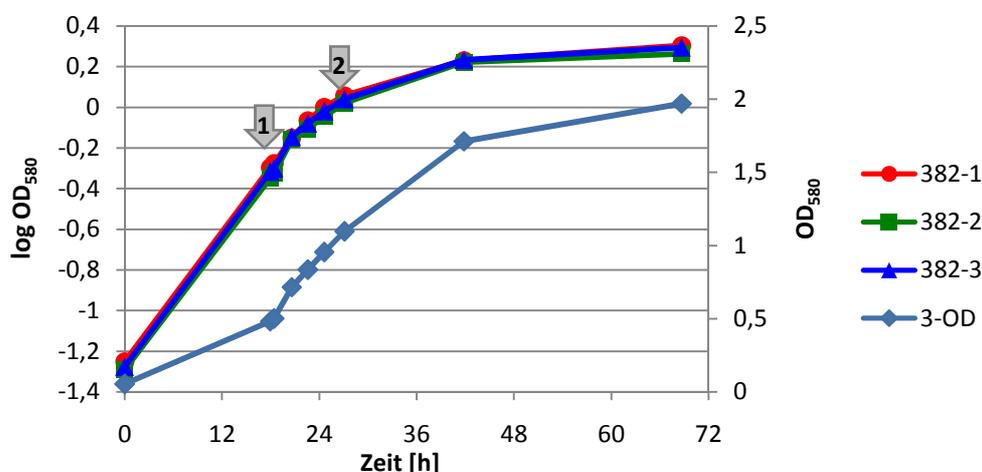
Bei den folgenden Experimenten wurden somit alle Gene als differentiell exprimiert eingestuft, die die oben genannten Bedingungen für n, A, und p erfüllen und einen M-Wert von  $M \geq 0,93$  bzw.  $\leq -0,93$  aufweisen. Zeigten nur weniger als 60 Gene eine differentielle Genexpression in diesem Ausmaß wurden auch Gene mit  $M \geq 0,7$  bzw.  $\leq -0,7$  in die Auswertung mit einbezogen.

### 5.3.2 Vergleich der Genexpression in zwei verschiedenen Wachstumsphasen

Mit Hilfe eines weiteren Kontroll-experiments wurde im nächsten Schritt überprüft, ob die gewählten Methoden zur Probenentnahme der Zellen und der RNA-Isolierung geeignet sind, um eine differentielle Genexpression nachzuweisen.

Bei beiden Schritten besteht die Möglichkeit, dass z.B. durch zu lange Inkubationszeiten das Transkriptionsprofil verändert oder mRNA degradiert wird (Conway & Schoolnik, 2003). Um dies zu überprüfen, musste ein Experiment gewählt werden, bei dem vorab gut abgeschätzt werden kann, welche Unterschiede zwischen der Versuchs- und der Kontrollbedingung zu erwarten sind. Diese Voraussetzung ist zum Beispiel bei dem Vergleich der Genexpression von Zellen in unterschiedlichen Wachstumsphasen gegeben. Vergleicht man etwa Zellen aus der spät-logarithmischen bis stationären Phase mit Zellen aus der logarithmischen Phase, so ist zu erwarten, dass insbesondere die Expression von Genen, die für Proteine der Translation oder des Energiemetabolismus codieren, verringert ist. Für *E. coli* und *Salmonella* sind diese und weitere Effekte des Übergangs in die stationäre Phase und/oder einer Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit genauer untersucht worden (Bremer & Denis, 1996; Hengge-Aronis, 1996; Grunberg-Manago, 1996; Keener & Nomura, 1996).

Für das *Cmm*-Experiment wurde RNA aus spät-logarithmischen und logarithmischen Zellen aus je 3 unabhängigen NCPPB382 Kulturen in M9-Minimalmedium mit 4 % Glucose als Kohlenstoffquelle (Abbildung 5.2) gewonnen und diese revers in cDNA transkribiert.



**Abbildung 5.2:** Wachskurve von NCPPB382 in M9-Minimalmedium. Zur Inokulation des M9-Mediums (Start- $OD_{580} \approx 0,05$ ) wurden Zellen aus einer Vorkultur in TBY-Vollmedium verwendet, die vorab einmal in M9-Medium gewaschen wurden. Die Entnahme der Zellen erfolgte 18,4 h (Pfeil 1; logarithmische Zellen) und 27,1 h (Pfeil 2; spät-logarithmische Zellen) nach Inokulation des Mediums. Auf der primären y-Achse sind die logarithmierten  $OD_{580}$ -Werte der drei *Cmm*-Kulturen aufgetragen. Zum Vergleich sind auf der sekundären y-Achse die OD-Werte der dritten Kultur, 382-3 nicht logarithmiert aufgetragen (3-OD). Die Generationszeit von *Cmm* in M9-Medium beträgt in der logarithmischen Phase etwa 6 h.

Die cDNAs der spät-logarithmischen Zellen aus Kultur 1 und 2 wurden mit Cy5 markiert, die der logarithmischen Zellen mit Cy3. Bei dem dritten biologischen Replikat wurden die cDNAs der Versuchsbedingung und der Kontrollbedingung jeweils mit dem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die cDNA der spät-logarithmischen Zellen wurde folglich mit Cy3, die der

logarithmischen Zellen mit Cy5 markiert. Dieses sogenannte *dye swapping* dient dazu, dass technische Varianzen, bedingt durch die geringere Stabilität von Cy5 gegenüber Cy3, ausgeglichen werden (Dudoit et al., 2002).

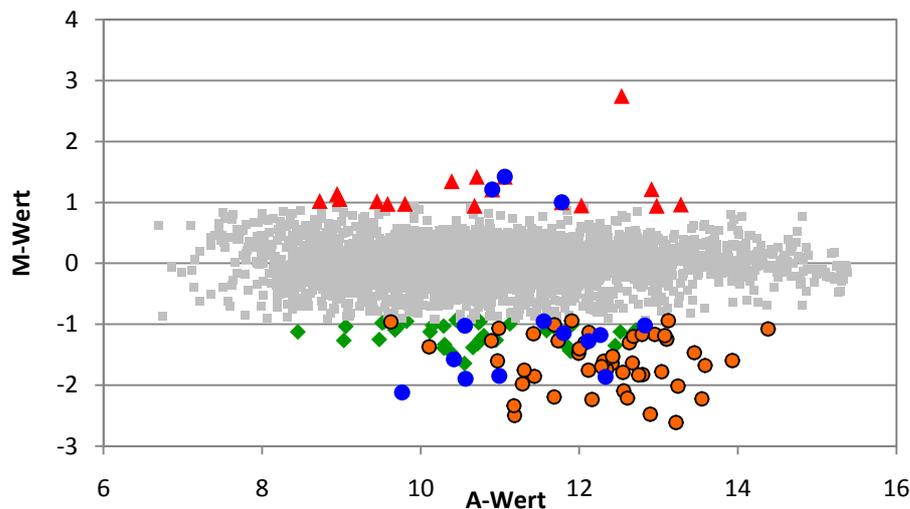
Insgesamt zeigten 99 Gene unter den Versuchsbedingungen eine verringerte ( $M \leq -0,93$ ) und 14 Gene eine verstärkte Expression ( $M \geq 0,93$ ). Nur 6 der verstärkt exprimierten Gene konnten den Gruppen I bis IV (I: Aminosäuren: 1 Gen; IV: Transporter, Proteintransport und Resistenz (Peroxisom): 3, 1 und 1 Gen(e)) zugeordnet werden. Für 6 Gene ist bislang keine Funktion bekannt, die verbleibenden 2 Gene codieren für Dehydrogenasen (Gruppe V), darunter auch das Gen mit dem höchsten positiven M-Wert (2,75; CMM\_1973: Acyl-CoA-Dehydrogenase). Bei den reprimierten Genen dagegen war nur bei 10 Genen keine Funktionszuweisung möglich (Tabelle 5.3).

**Tabelle 5.3:** Differentielle Genexpression spät-logarithmischer Zellen im Vergleich zu logarithmischen Zellen. Schwellenwerte:  $M \geq |0,93|$ ,  $A \geq 8,39$ ,  $p \leq 0,05$ ,  $n \geq 7$ .

Gruppe	Anzahl der Gene mit $M \geq 0,93$ (14) → induziert	Anzahl der Gene mit $M \leq -0,93$ (99) → reprimiert
<b>pCM1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>I Metabolismus</b>	<b>1</b>	<b>15</b>
<b>Energie-, Kohlenstoffmetabolismus</b>		
Glycolyse	-	2
Pentose-Phosphatweg	-	5
Citrat Zyklus	-	3
<b>Aminosäuren</b>		
Aminotransferasen	1	-
Lysin, Valin, Threonin	-	1
Histidin	-	1
<b>Lipide</b>		
Carotinoid-/Chinonvorstufensynthese (Steroidbiosynthese)	-	1
Lipide, Rest	-	1
<b>Sekundärmetabolismus</b>		
Eisen	-	1
<b>II Zelluläre Prozesse</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Zellwand</b>		
Zelloberfläche	-	1
<b>III Informationsspeicherung und -prozessierung</b>	<b>0</b>	<b>48</b>
<b>Replikation</b>		
Replikation	-	1
<b>Transkription</b>		
Transkription	-	2
weitere an der Transkription beteiligte Proteine	-	1
<b>Translation</b>		
ribosomale Proteine	-	39
tRNAs	-	1
Initiation, Elongation, Termination	-	3
Translation, Rest	-	1

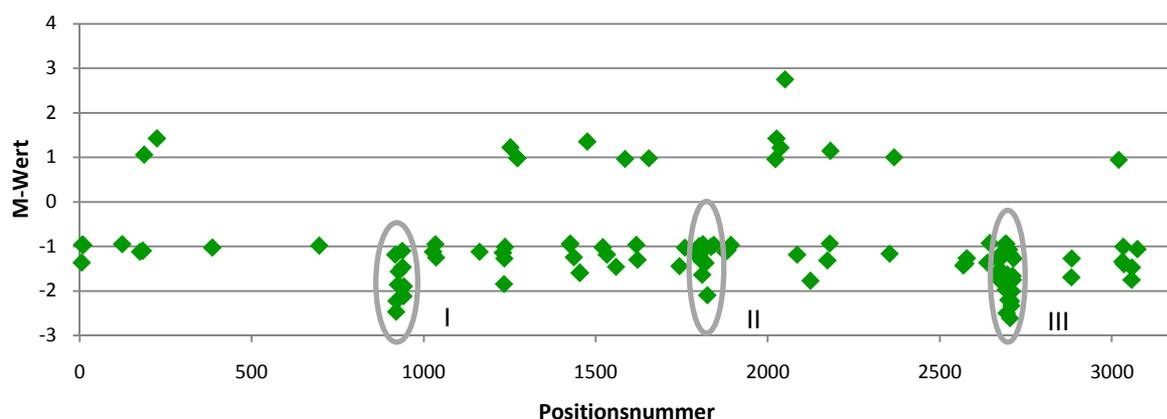
<b>IV Potentiell relevant für die phytopathogene Interaktion</b>	<b>5</b>	<b>22</b>
<b>Transporter</b>		
ABC, ohne weitere Zuordnung	-	2
ABC, Aminosäuren	1	-
ABC, Zucker	-	5
ABC, anorganische Ionen	1	-
Permeasen, ohne weitere Zuordnung	1	-
Transporter, Energie	-	4
<b>Proteintransport</b>		
Sec-System	-	2
Tat-System	-	1
Signalpeptidase	1	-
<b>Regulatoren</b>		
Transkriptionsregulatoren	-	1
Histon ähnliche Proteine	-	1
weitere Regulatoren (Proteinebene)	-	1
<b>Stress</b>		
Hitzeschock, Chaperone	-	2
Clp-Proteasen	-	1
Peptidyl-Prolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase	-	1
<b>Resistenz</b>		
Hydroperoxid	1	-
Eisen/Schwefel-Cluster	-	3
<b>V Schlecht/kaum charakterisiert</b>	<b>8</b>	<b>10</b>
<b>generelle Funktionszuordnung</b>		
Dehydrogenase	2	2
Hydrolasen	-	1
<b>Funktion unbekannt</b>		
konserviert hypothetische Proteine	3	6
hypothetische Proteine	3	1

Wie im Scatterplot (Abbildung 5.3) bereits zu erkennen, zeigten ein großer Teil der für ribosomale Proteine codierenden Gene (39 von insgesamt 54) sowie weitere Gene aus den Bereichen Transkription und Translation (als orange Kreise dargestellt) unter den gewählten Bedingungen erwartungsgemäß eine verringerte Genaktivität (48,5 % aller Gene mit  $M \leq -0,93$ ). Auch Gene aus dem Energiemetabolismus (Glycolyse, Pentose-Phosphatweg, Citrat Zyklus und Proteine für die Cytochrombiosynthese), ATPasen und Zuckertransporter (die beiden letztgenannten sind mit blauen Kreisen als Transporter gekennzeichnet) zeigten den gleichen Trend (11 % aller Gene mit  $M \leq -0,93$ ).



**Abbildung 5.3:** Vergleichendes Transkriptionsprofil spät-logarithmischer zu logarithmischen NCPPB382-Zellen in M9-Medium (Scatterplot). Grüne Rauten:  $M \leq -0,93$ , rote Dreiecke:  $M \geq 0,93$ , orange Kreise: Gruppe Informationsspeicherung und -prozessierung, blaue Kreise: Gruppe Transporter, graue Quadrate: nicht differentiell exprimierte Gene. Daten von 3 biologischen Replikaten. Schwellenwerte:  $M \leq -0,93$  bzw.  $\geq 0,93$ ;  $A \geq 8,39$ ;  $p \leq 0,05$ ;  $n \geq 7$ .

Werden die M-Werte der differentiell exprimierten Gene gegen die Position der Gene auf dem Chromosom dargestellt, können Genregionen identifiziert werden, die ein koordiniertes Verhalten in der Genexpression aufweisen. Jedem Gen wurde dazu, begonnen mit *dnaA* (CMM\_0001, Positionsnummer 1), nach der Reihenfolge, in der sie auf dem Chromosom lokalisiert sind, eine Positionsnummer zugeordnet. Gene, die gemeinsam induziert oder reprimiert werden, sind in dieser Darstellung als Punktecluster zu erkennen. Durch diese Darstellung der differentiell exprimierten Gene konnten drei Genregionen (Tabelle 8.2, S. 163 im Anhang) identifiziert werden, die in der spät-logarithmischen Wachstumsphase reprimiert waren (Abbildung 5.4).



**Abbildung 5.4:** Positionsplot der wachstumsphasenabhängig differentiell exprimierten, chromosomalen Gene. Die M-Werte ( $\log_2$  der Signalunterschiede) sind gegen die Positionsnummern der Gene, die deren Reihenfolge auf dem Chromosom wiedergeben, aufgetragen. Drei koordiniert reprimierte Genregionen (I-III) sind durch Ellipsen hervorgehoben.

Die erste Genregion (I) erstreckt sich von Positionsnummer 917 bis 942 und enthält insbesondere Gene, die für Zucker-ABC-Transporter und Proteine des Pentosephosphatwegs codieren. Weitere Gene des Pentosephosphatwegs sowie Glycolysegene und für Eisen/Schwefel-Cluster Proteine codierende Gene sind in der zweiten Region (II) lokalisiert (Positions-Nr.: 1800 - 1825). Genregion III (Positions-Nr.: 2671-2714) enthält überwiegend ORFs, die ribosomale Proteine codieren. Im Anhang befinden sich weitere Informationen zu den einzelnen Gene der drei Genregionen (Tabelle 8.2, S. 163).

Durch das Experiment konnte gezeigt werden, dass die gewählten Methoden zur Zellentnahme, -lagerung und der RNA-Isolierung geeignet sind, um differentielle Genexpression zu detektieren. Die Ergebnisse des Vergleichs spät-logarithmischer Zellen mit logarithmischen Zellen zeigen, dass mittels der verwendeten Techniken sinnvolle Expressionsprofile aufgezeichnet werden können und diese nicht durch Artefakte überlagert werden. Die weiteren Experimente wurden daher, soweit nicht anders gekennzeichnet, analog zu diesem Kontrollexperiment durchgeführt.

## 5.4 Veränderung des Expressionsmusters von *Cmm* bei Supplementierung des Mediums mit Tomatenblatthomogenat bzw. Xylemsaft

*Cmm* ist ein Phythopathogen, das das Xylem der Tomate besiedelt. Die Infektion von *Solanum lycopersicum* erfolgt über Verletzungen der Pflanze im Wurzel-, Spross- oder Blattgewebe aber auch über Hydathoden oder kontaminiertes Saatgut. *Cmm* hat folglich bei der Infektion von *Solanum lycopersicum* direkten Kontakt zu verschiedenen Gewebetypen der Tomate. Dazu gehören neben den aus toten Zellen bestehenden Xylemgefäßen auch lebende Pflanzenzellen und deren intrazellulären Bestandteile, die z.B. durch Verletzungen freigesetzt wurden. Auch nach Eindringen des Pathogens in die Xylemgefäße und insbesondere in späten Infektionsstadien, in denen das Tomatengewebe sichtbar mazeriert wird und Sprossläsionen auftreten (durch die *Cmm* z.T. auch wieder an die Oberfläche der Pflanze gelangt), hat *Cmm* Kontakt zu intrazellulären und apoplastischen Bestandteilen der Pflanze. Die Anpassung an diese Habitate (Xylem und lebende Pflanzengewebe), insbesondere die Erschließung geeigneter Nährstoffquellen, und die adäquate Reaktion auf die verschiedenen Abwehrreaktionen der Pflanze, sollten sich in einem entsprechenden Expressionsprofil widerspiegeln.

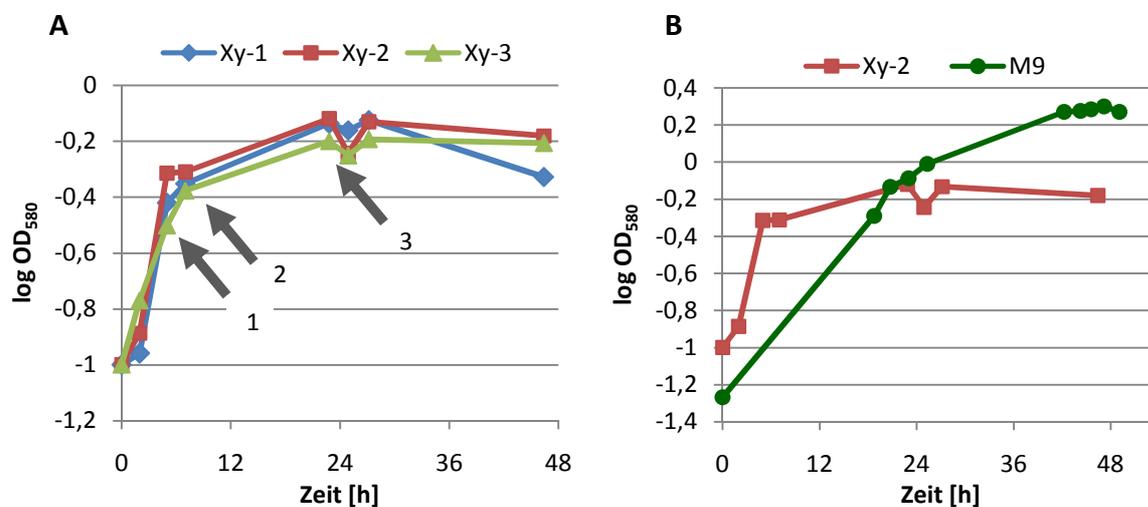
Um den Einfluss von Metaboliten der Tomatenpflanzen auf die Genexpression von *Cmm* zu untersuchen, wurde in parallel durchgeführten Ansätzen getestet, welche Effekte Xylemsaft bzw. Tomatenblatthomogenat auf *Cmm* haben. Vorab wurde in Zusammenarbeit mit Aiko Barsch (AG für Proteom- und Metabolomforschung, Universität Bielefeld) zunächst die Zusammensetzung des Xylemsafts nicht infizierter und infizierter Tomaten mittels GC-MS (Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie) untersucht und überprüft, welche Bestandteile des Xylemsafts von *Cmm* als Nährstoffquelle verwendet werden können.

### 5.4.1 Analyse des Xylemsafts der Tomate mittels GC-MS

#### 5.4.1.1 Modifizierung der Metabolitkonzentrationen des Xylemsafts durch *Cmm* unter *in vitro* Bedingungen

Im Xylem der Tomatenpflanze befindet sich *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in einem offenen System. Dem Xylemsaft werden ständig über die angrenzenden Parenchymzellen Metabolite entzogen. Zugleich gelangen über die Wurzel und die Parenchymzellen permanent neue Metabolite in das Xylem. Um zu überprüfen, wie sich die Zusammensetzung des Xylemsafts durch *Cmm* verändert, wurde einer *Cmm*-Kultur in reinem Xylemsaft (drei biologische Replikate in Aliquots einer gepoolten Xylemprobe) zu drei Zeitpunkten eine Probe entnommen (Abbildung 5.5), sterilfiltriert und die Konzentrationen eindeutig identifizierter Metabolite mit denen des unbehandelten Xylemsafts verglichen. Wie in Abbildung 5.5 B zu sehen ist, wuchs *Cmm* in Xylemsaft deutlich schneller als in M9-Minimalmedium, erreichte mit einer maximalen OD<sub>580</sub> von 0,76 aber weniger als die Hälfte der maximalen Zelldichte, die in M9-Medium möglich ist. Die Generationszeit in Xylemsaft war mit 2,3 h in der logarithmischen Phase vergleichbar mit Generationszeiten, die in Vollmedium mit und ohne Glucose (TBY, C-Medium) erreicht werden, und lag deutlich unter der Generationszeit in M9-Minimalmedium (5,6 h). Der Xylemsaft hat also einen positiven

Effekt auf die Wachstumsgeschwindigkeit von *Cmm*. Im geschlossenen *in vitro*-System scheinen allerdings essentielle Nährstoffe schnell verbraucht zu sein, so dass letztlich nur drei Teilungen möglich sind, bevor die Zellen in die stationäre Phase übergehen.



**Abbildung 5.5:** Wuchskurve von NCPPB382 in Xylemsaft. Der Xylemsaft stammt von drei uninfizierten Tomatenpflanzen (6 Wochen alt, Tropfzeit 2 h). Der Xylemsaft wurde gepoolt, sterilfiltriert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. **A:** Je 2 ml Xylemsaft wurden mit Zellen aus einer Vorkultur in TBY nach einmaligem Waschen in M9-Minimalmedium (ohne Methionin) mit einer Start- $OD_{580}$  von 0,1 beimpft. Die Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Probenentnahme für die GC-MS-Messung. **1:** 5 h; **2:** 6 h; **3:** 22,8 h. **B:** Vergleich des Wachstums von *Cmm* in Xylemsaft und in M9-Minimalmedium (4 % Glucose).

Mittels gekoppelter Gas-Chromatographie und Massenspektrometrie konnten nach Derivatisierung der Proben mit Methoxyamin-Hydrochlorid und Trimethylsilan insgesamt 30 Substanzen identifiziert und ihre Konzentrationen in relativen Einheiten (normalisierte Peakfläche jeder Substanz) bestimmt werden. In den entnommenen Proben vor und nach Anzucht von NCPPB382 konnten eindeutig die in Tabelle 5.4 aufgelisteten Aminosäuren, Carbonsäuren, Zucker sowie Uracil und Harnstoff nachgewiesen werden.

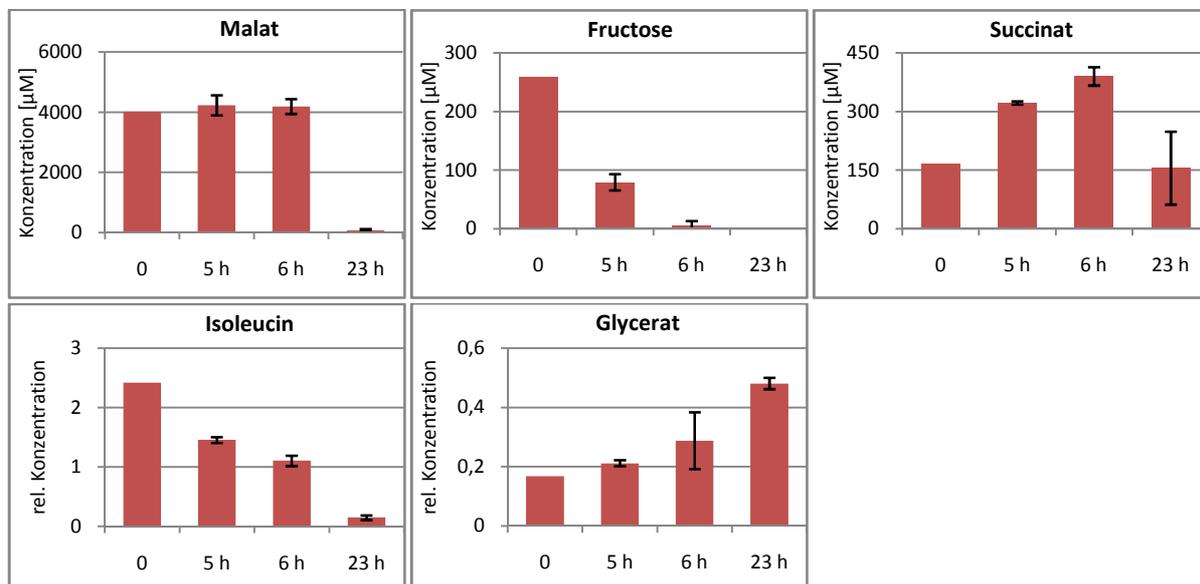
**Tabelle 5.4:** Übersicht der Metabolite, die im Xylemsaft vor oder nach Kultivierung von *Cmm* eindeutig nachgewiesen werden konnten. Alle Metabolite, deren Konzentrationen quantitativ bestimmt wurden, sind **fett gedruckt**.

Aminosäuren	$\beta$ -Alanin, Isoleucin, Leucin, <b>Lysin</b> , Serin, Threonin, Valin, $\gamma$ -Aminobutyrat (GABA)
Carbonsäuren	<b>Citrat</b> , <b>Fumarat</b> , Glycerat, <b>Malat</b> , Maleinsäure, <b>Succinat</b>
Zucker	<b>Fructose</b> , <b>Glucose</b> , <b>myo-Inositol</b> , Ribose
weitere organische Verbindungen	Uracil, <b>Harnstoff</b>

Durch Messung von Standardlösungen bekannter Konzentration (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 1 mM, 10 mM) konnten außerdem die Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] von Lysin, Citrat, Fumarat, Malat, Succinat, Fructose, Glucose, *myo*-Inositol und Harnstoff im Xylemsaft bestimmt werden (siehe Tabelle 8.3 und Tabelle 8.4 im Anhang). Dabei zeigte sich, dass Malat mit 4 mM den größten Anteil dieser Substanzen im unbehandelten Xylemsaft erreichte. Für Glucose, Fructose, Citrat und Succinat konnten Konzentrationen zwischen 375  $\mu\text{M}$  und

166  $\mu\text{M}$  gemessen werden und für Harnstoff und Fumarat Konzentrationen von 30  $\mu\text{M}$  bzw. 24  $\mu\text{M}$ . Die geringsten Konzentrationen wurden für Lysin (1,6  $\mu\text{M}$ ) und *myo*-Inositol (2,2  $\mu\text{M}$ ) nachgewiesen.

In Abbildung 5.6 ist der Verlauf der Metabolitkonzentrationen (in  $\mu\text{M}$  bzw. in relativen Einheiten) des Xylemsafts während der Inkubation mit *Cmm* beispielhaft für Malat, Fructose, Succinat, Isoleucin und Glycerat gezeigt. Anhand dieser Grafiken lässt sich der Verlauf der Konzentrationen der anderen Metabolite ableiten (siehe Abbildungslegende). Bereits nach 5 stündigem Wachstum von *Cmm* in Xylemsaft sank die Konzentration von Glucose (370  $\mu\text{M}$ ) und Fructose (260  $\mu\text{M}$ ) um 80 bzw. 70 % auf jeweils 80  $\mu\text{M}$ . Lysin konnte zu diesem Zeitpunkt bereits nicht mehr nachgewiesen werden. In der stationären Wuchsphase (nach 22,8 h) waren Glucose und Fructose nur noch in sehr geringen Mengen (0,3  $\mu\text{M}$  bzw. 0,1  $\mu\text{M}$ ) nachweisbar. Auch die Konzentrationen der Aminosäuren  $\beta$ -Alanin, GABA, Isoleucin, Leucin, Serin, Threonin und Valin fielen mit zunehmender Kultivierungsdauer ab. Die Mengen an Malat und Citrat (Messwert 23 h) sanken erst im späteren Verlauf der exponentiellen Phase nach 6 h. Für Ribose und die Carbonsäuren Fumarat, Maleinsäure und Succinat war zunächst ein Anstieg zu verzeichnen, zwischen den Messungen bei 6 und 23 Stunden nach Inokulation des Xylemsafts sank die Konzentration wieder. Die Konzentrationen von Glycerat, Uracil, Harnstoff und *myo*-Inositol stiegen mit zunehmender Kultivierungsdauer. Für Glycerat war dieser Effekt am stärksten. Nach 23-stündiger Anzucht von *Cmm* in Xylemsaft konnte fast dreimal soviel Glycerat nachgewiesen werden, wie in unbehandeltem Xylemsaft.



**Abbildung 5.6:** Verwertbarkeit von Metaboliten des Xylemsafts durch *Cmm*. Als interner Standard wurde Ribitol verwendet. Für Malat, Fructose und Succinat sind die Konzentrationen in  $\mu\text{M}$ , für die anderen Substanzen sind die Konzentrationen in relativen Einheiten angegeben. Die Standardabweichungen zwischen den Metabolitkonzentrationen der drei Kulturen sind als Fehlerindikatoren dargestellt. Einen vergleichbaren Trend der hier dargestellten Konzentrationsänderungen während der Kultivierung von *Cmm* zeigten: **Malat:** Citrat; **Fructose:** Glucose, Lysin; **Succinat:** Ribose, Fumarat, Maleinsäure; **Isoleucin:**  $\beta$ -Alanin, GABA, Leucin, Serin, Threonin, Valin; **Glycerat:** Uracil, Harnstoff, *myo*-Inositol.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Cmm* zunächst bevorzugt Zucker wie Glucose und Fructose und die meisten der nachgewiesenen Aminosäuren verbraucht. Carbonsäuren und Ribose können auch von *Cmm* verwertet werden, scheinen aber erst am Ende der exponentiellen Wachstumsphase nach Abbau der bevorzugten Kohlenstoffquellen aufgenommen zu werden.

#### 5.4.1.2 Analyse des Xylemsafts infizierter und uninfizierter Tomatenpflanzen

Sowohl virulente als auch avirulente *Cmm*-Stämme können in der Tomatenpflanze sehr hohe Titer von bis zu  $10^{10}$  Bakterien pro g Pflanzenhomogenat erreichen (Bermppohl, 1990; Meletzus et al., 1993). Es stellt sich daher die Frage, auf welche Art *Cmm* seinen Nährstoff- und Energiebedarf während der Kolonisation des Xylems deckt, um solch hohe Titer zu erreichen. Für virulente Stämme hat sicherlich die Produktion zellwandabbauender Enzyme, wie Cellulasen und Pectatlyasen, eine große Bedeutung. Allerdings ist zu überprüfen, ob dies auch für Stämme gelten kann, die die Pflanzen zwar ebenso hochtitrig kolonisieren können, aber bis auf eine leichte Senkung der Biomasse keine Krankheitssymptome auslösen.

Im vorherigen Versuch konnte gezeigt werden, dass *Cmm in vitro* im Xylemsaft sehr schnell wächst, aber nur eine maximale  $OD_{580}$  von 0,8 (ca.  $4 \times 10^8$  Bakterien/ml) erreicht. Reicht es also aus, dass *in vivo* verbrauchte Nährstoffe über die Wurzel dem Xylemsaft wieder zugeführt werden können? Oder bewirkt *Cmm* generell eine Änderung der Zusammensetzung des Xylemsafts? Um diese Fragen zu klären, wurde der Xylemsaft infizierter und *mock*-infizierter Pflanzen mittels Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) untersucht. Für die Infektion wurde der Wildtyp NCPPB382, sein avirulentes, plasmidfreies Derivat CMM100 und CMM101*chpC* $\beta$ , der aufgrund der Inaktivierung von *chpC* eine verringerte Kolonisationseffektivität *in planta* aufweist (maximaler Bakterientiter:  $2 \times 10^7$  cfu/g Pflanze) und nur noch schwach virulent ist, eingesetzt. Durch Verwendung dieser Stämme sollte untersucht werden, ob die Virulenz und/oder die Kolonisationsfähigkeit von *Cmm* mit der Stoffzusammensetzung des Xylemsafts korreliert.

In drei parallelen Ansätzen wurden je 10 vier Wochen alte Tomatenpflanzen mit NCPPB382, CMM100, CMM101*chpC* $\beta$  bzw. mit  $H_2O$  infiziert (Wurzelinfektion). 27 Tage nach Infektion wurde der Xylemsaft dieser Pflanzen isoliert. Dazu wurde jede Pflanze mit einem sterilen Skalpell unterhalb des ersten Fiederblattes abgeschnitten, die Schnittfläche mit 100  $\mu$ l autoklaviertem Millipore- $H_2O$  abgespült und mit einem Kimwipe verbleibendes Wasser entfernt. Der Xylemsaft wurde innerhalb der nächsten Stunde von den Schnittflächen abpipettiert, auf Eis gelagert und das Volumen des Xylemsafts bestimmt. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^\circ C$  gelagert. Um sicher zu stellen, dass die Infektion mit den *Cmm*-Stämmen, insbesondere bei nicht welkenden Pflanzen, erfolgreich war, wurde nach der Probenentnahme von jeder Pflanze ein weiterer Tropfen Xylemsaft auf C-Medium aufgetropft und nach 3-5 Tagen Inkubation bei  $26^\circ C$  überprüft, ob Wachstum von *Cmm* beobachtet werden konnte. Je 5  $\mu$ l der Xylemsaftproben von nachweislich infizierten

Pflanzen wurden zur Titerbestimmung verwendet und der Rest dieser Proben wurde sterilfiltriert.

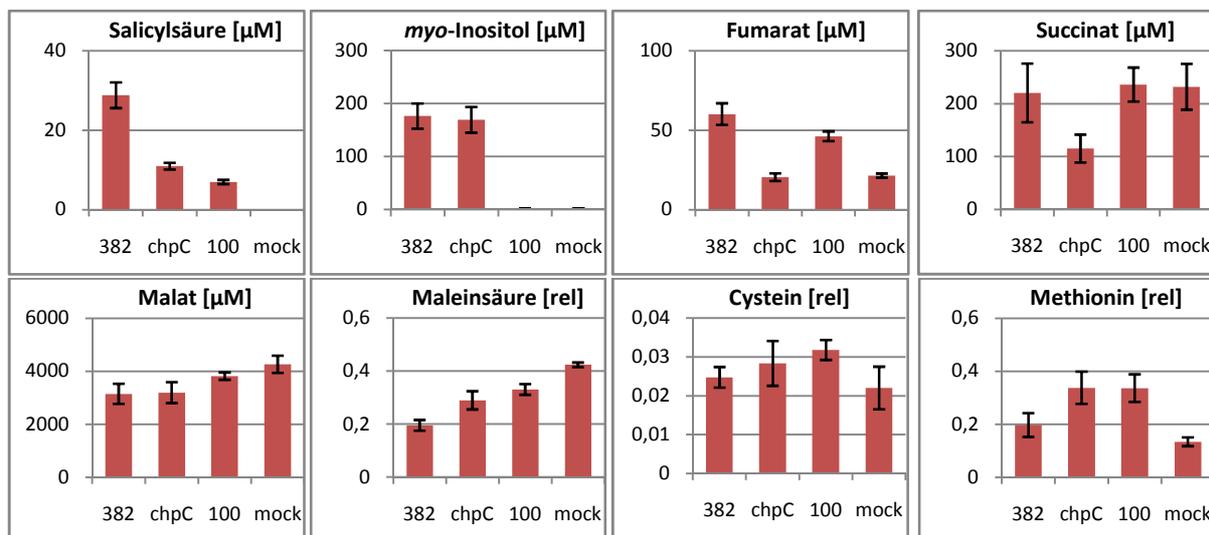
Letzlich wurde der Xylemsaft (XS) von je 15 mit NCPPB382, CMM100 bzw. CMM101*chpC* $\beta$  infizierten (je 5 Proben aus parallelen Ansätzen) und Xylemsaft von 5 *mock*(mit H<sub>2</sub>O)-infizierten Pflanzen (XS<sub>mock</sub>) für die GC-MS-Messung verwendet. Um die Messungen der verschiedenen Proben miteinander vergleichen zu können, wurde wie zuvor Ribitol als interner Standard eingesetzt. Neben der relativen Quantifizierung (normalisierte Peakflächen: Konzentration in relativen Einheiten) von 15 Substanzen (Anhang, Tabelle 8.5) konnten durch Messung von Standardlösungen (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM, 10 mM) die molaren Konzentrationen von Lysin, Citrat, Fumarat, Malat, Succinat, Harnstoff, Fructose, Glucose, *myo*-Inositol und Salicylsäure bestimmt werden (Tabelle 5.5).

**Tabelle 5.5:** Quantitativer Nachweis von Metaboliten [ $\mu$ M] aus dem Xylemsaft nicht-infizierter und mit verschiedenen *Cmm*-Stämmen infizierter Tomatenpflanzen. Der Standardfehler von fünfzehn (5 bei *mock*-infizierten) biologischen Replikaten ist in Klammern angegeben. **Grau unterlegt:** signifikanter Unterschied (t-test;  $p < 0,05$ ) zu Werten von Xylemsaft *mock*-infizierter Pflanzen (XS<sub>mock</sub>); **Fett und unterstrichen:** signifikanter Unterschied zu Werten von XS<sub>382</sub>; \*: signifikanter Unterschied zu Werten von XS<sub>100</sub>.

$\mu$ M	XS <sub>382</sub>	XS <sub>chpC</sub>	XS <sub>100</sub>	XS <sub>mock</sub>
<b>Lysin</b>	14,21 ( $\pm 3,53$ )	<b><u>3,51</u></b> ( $\pm 0,83$ )	<b><u>3,93</u></b> ( $\pm 0,51$ )	3,39 ( $\pm 0,33$ )
<b>Citrat</b>	121,44 ( $\pm 14,78$ )	<b><u>57,29</u></b> ( $\pm 8,28$ )	89,77 ( $\pm 16,55$ )	49,18 ( $\pm 8,44$ )
<b>Fumarat</b>	60,13 ( $\pm 6,79$ )	* <b><u>20,46</u></b> ( $\pm 2,44$ )	46,23 ( $\pm 3,03$ )	21,46 ( $\pm 1,31$ )
<b>Malat</b>	3145,18 ( $\pm 378,25$ )	3192,09 ( $\pm 395,16$ )	3816,07 ( $\pm 139,71$ )	4261,95 ( $\pm 324,04$ )
<b>Succinat</b>	220,32 ( $\pm 55,52$ )	* 115,32 ( $\pm 26,34$ )	236,16 ( $\pm 32,04$ )	231,84 ( $\pm 43,11$ )
<b>Harnstoff</b>	27,72 ( $\pm 3,20$ )	27,43 ( $\pm 2,88$ )	27,02 ( $\pm 2,43$ )	31,63 ( $\pm 3,11$ )
<b>Fructose</b>	441,35 ( $\pm 92,13$ )	350,75 ( $\pm 89,80$ )	534,83 ( $\pm 74,35$ )	214,03 ( $\pm 29,53$ )
<b>Glucose</b>	909,84 ( $\pm 188,62$ )	872,26 ( $\pm 353,81$ )	1089,03 ( $\pm 195,86$ )	336,98 ( $\pm 55,00$ )
<b><i>myo</i>-Inositol</b>	176,58 ( $\pm 23,88$ )	* 169,39 ( $\pm 24,17$ )	<b><u>2,07</u></b> ( $\pm 0,01$ )	2,15 ( $\pm 0,003$ )
<b>Salicylsäure</b>	28,80 ( $\pm 3,23$ )	* <b><u>10,97</u></b> ( $\pm 0,84$ )	<b><u>6,99</u></b> ( $\pm 0,51$ )	0

Die höchsten Metabolitwerte konnten wie im ersten Versuch für Malat (3,1-4,2 mM) gemessen werden. Zwischen den verschiedenen Xylemsaftproben waren für Malat ähnlich wie für Harnstoff nur geringfügige Unterschiede festzustellen. In Abbildung 5.7 sind für Malat und weitere ausgewählte Metabolite die Konzentrationen in den vier verschiedenen Xylemsaftproben dargestellt. Anhand dieser Grafiken lassen sich die Trends für alle

Metabolite (Konzentration in  $\mu\text{M}$  bzw. relativen Einheiten) ableiten. Für Glucose und Fructose wurden Werte von 0,2 mM bis 1,1 mM gemessen, wobei die Konzentrationen in  $\text{XS}_{382}$  und  $\text{XS}_{100}$  signifikant höher waren, als in *mock*-infizierten Proben. Einen ähnlichen Trend zeigten Glycerat, Citrat und Fumarat. Im Gegensatz zu Maleinsäure, deren Konzentration von  $\text{XS}_{382}$  über  $\text{XS}_{\text{chpC}}$  und  $\text{XS}_{100}$  bis zu  $\text{XS}_{\text{mock}}$  jeweils signifikant zunahm, war Salicylsäure ebenso wie Ribose, Uracil und 9 Aminosäuren (GABA,  $\beta$ -Alanin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Prolin, Serin, Threonin, Valin) am stärksten in Xylemsaft NCPPB382-infizierter Pflanzen vertreten. In *mock*-infizierten Pflanzen konnten diese Substanzen entweder wie bei Salicylsäure und  $\beta$ -Alanin nicht nachgewiesen werden oder zeigten dort die niedrigsten Werte. Methionin war in  $\text{XS}_{100}$  und  $\text{XS}_{\text{chpC}}$  ungefähr doppelt so konzentriert wie in den beiden anderen Proben. Die Werte für *myo*-Inositol waren in  $\text{XS}_{382}$  und  $\text{XS}_{\text{chpC}}$  etwa 80-mal so hoch wie im Xylemsaft *mock*- oder mit CMM100 infizierter Pflanzen. Die Succinat-Konzentration war nur in  $\text{XS}_{\text{chpC}}$  etwa um die Hälfte reduziert. Cystein konnte in ähnlichen Mengen in allen Xylemsaftproben nachgewiesen werden.



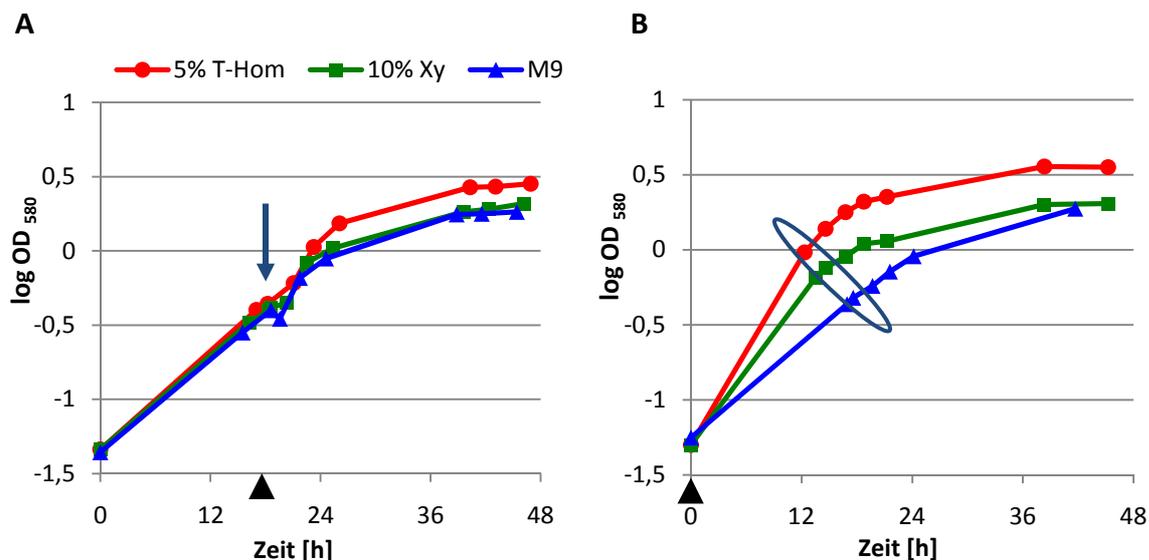
**Abbildung 5.7:** Konzentration ausgewählter Metabolite in Xylemsaft von Tomatenpflanzen 4 Wochen nach Infektion mit NCPPB382 (382), CMM101chpC $\beta$  (chpC), CMM100 (100) bzw. H<sub>2</sub>O (*mock*). Als interner Standard wurde Ribitol bei der GC-MS-Messung verwendet. Auf der y-Achse sind die Konzentrationen in  $\mu\text{M}$  (Salicylsäure, *myo*-Inositol, Fumarat, Succinat, Malat) bzw. in relativen Einheiten (rel; Maleinsäure, Cystein, Methionin) angegeben. Die Standardfehler sind als Fehlerindikatoren dargestellt. Einen vergleichbaren Trend der hier dargestellten Konzentrationsunterschiede zwischen den verschiedenen Xylemsaftproben zeigten: **Salicylsäure:** Ribose, Uracil, GABA,  $\beta$ -Alanin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Prolin, Serin, Threonin, Valin; **Fumarat:** Glycerat, Citrat, Glucose und Fructose; **Malat:** Harnstoff.

Die Ergebnisse der relativen und absoluten Metabolitquantifizierung zeigen, dass die Infektion mit *Cmm* zu einer Veränderung der Metabolitkonzentrationen des Xylemsafts führt. Die Konzentrationen an Malat und Maleinsäure waren in Pflanzen, die mit NCPPB382 infiziert wurden, niedriger als in *mock*-infizierten Pflanzen. Mit Ausnahme von Succinat, Harnstoff, Cystein und Methionin war die Konzentration aller anderen nachgewiesenen Substanzen, darunter auch Glucose und Fructose, hingegen bei den mit NCPPB382 infizierten Pflanzen signifikant erhöht. Auch zwischen Pflanzen, die mit verschiedenen *Cmm*-Stämmen

infiziert wurden, konnten Unterschiede festgestellt werden. Es scheint, dass virulente, normal kolonisierende Stämme wie NCPPB382 einen Konzentrationsanstieg (Faktor 2-82) vieler Aminosäuren, der Carbonsäuren Fumarat und Citrat und der Zucker **Fructose, Glucose** (2 bzw. 3 mal so hoch wie in *mock*-infizierten Pflanzen) und *myo*-Inositol bewirken. Ist der Stamm nur schwach virulent und weist eine eingeschränkte Kolonisationsfähigkeit auf (CMM101*chpC* $\beta$ ), sind die Carbonsäuren, die meisten Aminosäuren, Fructose und Glucose in geringeren Mengen im Xylemsaft vertreten als bei XS<sub>382</sub> und erreichen z.T. nur das Niveau *mock*-infizierter Pflanzen. Der avirulente, normal kolonisierende Stamm CMM100 hingegen bewirkt ähnlich hohe Konzentrationen an Glucose, Fructose, Citrat, Fumarat und Succinat wie der Wildtypstamm. Interessant sind auch die Konzentrationsverhältnisse zwischen den einzelnen Proben von *myo*-Inositol und dem Phytohormon Salicylsäure. In Pflanzen, die mit stark (NCPPB382) oder schwach virulenten Stämmen (CMM101*chpC* $\beta$ ) infiziert waren, war die Menge an *myo*-Inositol mit 170  $\mu$ M fast 80-mal so hoch wie in Pflanzen, die mit dem avirulenten CMM100 oder *mock*-infiziert wurden. Salicylsäure war nur in infizierten Pflanzen nachzuweisen. Die Salicylsäurekonzentration nahm mit abnehmender Virulenz der zur Infektion verwendeten *Cmm*-Stämme ab. In XS<sub>*chpC*</sub> waren 38 %, in XS<sub>100</sub> nur 24 % der Menge an Salicylsäure vorhanden, die bei mit dem Wildtypstamm infizierten Pflanzen nachgewiesen werden konnten.

#### 5.4.2 Differentielle Genexpression nach Supplementierung des Mediums mit Tomatenblatthomogenat oder Xylemsaft

In den folgenden Versuchen sollte getestet werden, welche Gene von *Cmm* durch „Signale“ der Tomatenpflanze, simuliert durch Zugabe von Tomatenblatthomogenat bzw. von Xylemsaft (als Habitat von *Cmm* in der Tomatenpflanze) uninfizierter Pflanzen zum Medium, induziert bzw. reprimiert werden. Dabei wurden die Versuche so angelegt, dass sowohl die unmittelbare Reaktion (**Ansatz I**) von *Cmm* auf die beiden Testsubstanzen (12 min nach Zugabe) als auch die Reaktion nach längerer Anzucht in supplementiertem M9-Minimalmedium ( $\approx$ 13-18 h, **Ansatz II**) untersucht werden konnten. Als Kontrolle wurde jeweils eine parallel wachsende Kultur verwendet, der statt der Testsubstanzen das entsprechende Volumen an M9-Medium zugesetzt wurde. Der Xylemsaft und das Tomatenblatthomogenat wurden wie im Methodenteil unter 4.15 und 4.16 beschrieben von 6 Wochen alten, uninfizierten Pflanzen gewonnen und mit einer Endkonzentration von 10 % (Xylemsaft) bzw. 5 % (Tomatenblatthomogenat) zur Kultur bzw. zum Medium hinzugegeben. In Abbildung 5.8 sind die Wuchskurven jeweils einer repräsentativen *Cmm*-Kultur beider Ansätze gezeigt. Im ersten Ansatz (Abbildung 5.8, A) wurden 12 min nach Zugabe von Tomatenblatthomogenat, Xylemsaft bzw. Minimalmedium, gekennzeichnet durch den Pfeil, Zellen für die RNA-Isolierung entnommen.



**Abbildung 5.8:** Wuchskurven von NCPPB382 bei 26°C in verschiedenen Minimalmedien. Dargestellt ist jeweils eine von 3 unabhängigen Wuchskurven. 5 % T-Hom: *Cmm* in M9-Medium mit 5 % Tomatenblatthomogenat, 10 % Xy: *Cmm* in M9-Medium mit 10 % Xylemsaft, M9: *Cmm* in M9-Medium. Der Zeitpunkt der Supplementierung der Minimalmedien ist durch ein schwarzes Dreieck gekennzeichnet. **A: Ansatz I:** Kultivierung in M9-Medium. Nach ca. 18,5 h erfolgte die Zugabe von Tomatenblatthomogenat und M9-Medium (Endkonzentration Tomatenblatthomogenat: 5 %), Xylemsaft (Endkonzentration: 10 %) bzw. M9-Medium. 12 min nach dieser Behandlung (gekennzeichnet durch den Pfeil) wurden Zellen für die RNA-Isolierung entnommen. **B: Ansatz II:** Kultivierung in M9-Medium bzw. in M9-Medium mit Tomatenblatthomogenat (Endkonzentration: 5 %) oder Xylemsaft (Endkonzentration: 10 %). Die Zeitpunkte der Probenentnahmen für die RNA-Isolierung sind durch die Elipse markiert.

Wie im weiteren Verlauf nach Supplementierung der Medien zu erkennen ist (Abbildung 5.8, A), bewirkt die Zugabe von Tomatenblatthomogenat eine deutliche Erhöhung des maximalen Bakterientiters (maximaler OD<sub>580</sub>-Wert: 5 % T-Hom = 2,8; M9 = 1,8) und eine Beschleunigung des Wachstums (Verringerung der Generationszeit) in der logarithmischen Phase. Durch Zugabe von Xylemsaft wird ein ähnlicher Effekt erzielt, allerdings ist der Unterschied deutlich geringer als bei Zugabe von Tomatenblatthomogenat (maximaler OD<sub>580</sub>-Wert: 10 % Xy: 2,1). Werden Zellen direkt in supplementiertem Medium (Abbildung 5.8, B) angezogen, so wird dieser Effekt verstärkt (maximaler OD<sub>580</sub>-Wert: 5 % T-Hom = 3,6; 10 % Xy = 2,1; Minimalmedium = 1,9).

Im zweiten Versuchsansatz sollte analog zu Ansatz I ebenfalls das Expressionsprofil logarithmischer Zellen untersucht werden. Allerdings wurde *Cmm* bei diesem Ansatz (Ansatz II) von Beginn an in supplementiertem Medium kultiviert. Unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Wuchsverhaltens von *Cmm* in den verwendeten Medien wurden Zellen für die RNA-Isolierung 12,3 h (5 % T-Hom), 13,5 h (10 % Xy) bzw. 17,6 h (M9) nach Inokulation der Medien entnommen (Abbildung 5.8, B), um möglichst aus jedem Ansatz Zellen aus der gleichen Wachstumsphase zu isolieren.

### Differentielle Genexpression durch Zugabe von Tomatenblatthomogenat

Die Supplementierung des Mediums mit Tomatenblatthomogenat führte zu einer differentiellen Genexpression von 69 (Ansatz I: 12 min nach Zugabe von Tomatenblatthomogenat) bzw. 85 Genen (Ansatz II: Anzucht bis zur logarithmischen Wachstumsphase, für 12,3 h in Minimalmedium<sub>5%-T-Hom</sub>). Der größte Anteil der differentiell exprimierten Gene war in beiden Fällen mit 49 % (Ansatz I) und 56 % (Ansatz II) der Gruppe IV (Potentiell relevant für phytopathogene Interaktion) zuzuordnen (Tabelle 5.6). Mehr als der Hälfte der verbleibenden Gene konnte keine oder nur eine generelle Funktion (Gruppe V) zugeordnet werden (siehe Tabelle 8.6 im Anhang).

**Tabelle 5.6:** Durch Zugabe von Tomatenblatthomogenat differentiell exprimierte Gene der Kategorie IV. **Ansatz I:** Transkriptionsprofil von Zellen 12 min nach Zugabe von 5 % Tomatenblatthomogenat. **Ansatz II:** Transkriptionsprofil logarithmischer Zellen in Minimalmedium<sub>5%-T-Hom</sub> nach 12,3 h. Daten von 3 biologischen Replikaten. Schwellenwerte:  $M \geq |0,93|$ ;  $A_{\text{Ansatz I}} \geq 7,82$ ,  $A_{\text{Ansatz II}} \geq 8,21$ ;  $p \leq 0,05$ ;  $n \geq 7$ . **Fett und unterstrichen:** Schnittmenge der differentiell exprimierten Gene stimmt unter beiden Bedingungen exakt überein. Die Anzahl aller differentiell exprimierten Gene ist in Klammern angegeben.

Gruppe	Anzahl induzierter Gene ( $M \geq 0,93$ )		Anzahl reprimierter Gene ( $M \leq -0,93$ )	
	I (31)	II (23)	I (38)	II (62)
<b>IV Potentiell relevant für phytopathogene Interaktion</b>	<b>16</b>	<b>13</b>	<b>18</b>	<b>35</b>
<b>Transporter</b>				
ABC, ohne weitere Zuordnung	-	1	1	-
ABC, Aminosäuren	5	-	-	-
<b><u>ABC, Zucker</u></b>	-	-	<b><u>4</u></b>	<b><u>1</u></b>
ABC, anorganische Ionen	4	-	-	2
ABC, Abwehr	-	-	2	-
Permeasen, ohne weitere Zuordnung	1	-	-	-
Permeasen, Energiemetabolismus	-	1	-	-
<b><u>Permeasen, Zucker</u></b>	<b><u>1</u></b>	<b><u>2</u></b>	-	-
Permeasen, anorganische Ionen	-	1	-	-
Phosphotransferasesysteme	-	1	-	-
<b>Proteintransport</b>				
Konjugation	-	-	-	7
<b>Regulatoren</b>				
<b><u>Transkriptionsregulatoren</u></b>	-	-	<b><u>1</u></b>	<b><u>1</u></b>
Sigmafaktoren	1	-	-	-
Serin/Threonin Protein-Phosphatasen	-	1	-	-
<b>Stress</b>				
Hitzeschock, Chaperone	2	4	-	-
Kälteschock	-	-	-	1
<b>Resistenz</b>				
<b><u>Radikale (Fenton)</u></b>	<b><u>1</u></b>	<b><u>1</u></b>	-	-
Antibiotika	1	-	-	-
Sonstige: Restriktionsenzym, Cytochrom, Hämoglobin	-	1	-	-
<b>extrazelluläre Enzyme</b>				
<b><u>extrazelluläre Serinproteasen</u></b>	-	-	<b><u>8</u></b>	<b><u>15</u></b>
Pseudogene, extrazelluläre Serinproteasen	-	-	-	3

<b><u>weitere extrazelluläre Proteine (z.B. Cellulasen, Tomatinase, Xylanasen)</u></b>	-	-	<b><u>2</u></b>	<b><u>3</u></b>
<b>intrazelluläre Proteasen</b>				
Metalloproteasen	-	-	-	1
Serinproteasen	-	-	-	1

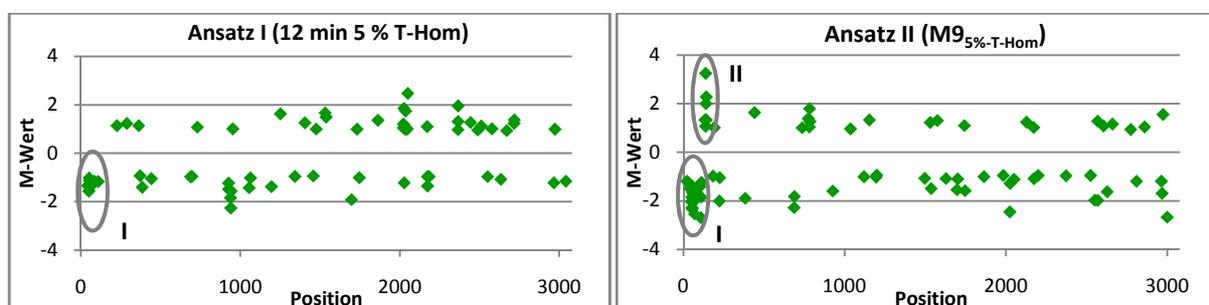
Die Anzucht in Minimalmedium<sub>5%-T-Hom</sub> führte zu einer Repression von 21 Genen, die für extrazelluläre Enzyme codieren (Tabelle 5.7). Darunter waren 9 in der *chp*-Region lokalisierte Gene für Serinproteasen der *Chp*- und *Ppa*-Familien, die 2 plasmidcodierten (pCM2) *pat-1*-Homologen *PhpA*, *PhpB* und die auf pCM1 lokalisierten Gene *celA* und *ppaJ*. Dieser Effekt war bereits nach 12 Minuten (Ansatz I) festzustellen. Allerdings waren hier nur 10 Gene dieser Gruppe reprimiert und die jeweiligen M-Werte waren niedriger als bei Ansatz II. Für einige Vertreter dieser Gruppe, wie *celA* und *chpC*, ist bereits nachgewiesen, dass sie einen Einfluss auf die Virulenz von *Cmm* haben. Mutanten, bei denen eins dieser Gene inaktiviert wurde, zeigten im Vergleich zu Kontrollstämmen, die mit Ausnahme des inaktivierten ORFs genotypisch vollkommen identisch sind, eine deutliche Reduktion der Virulenz. Daher war es erstaunlich, dass Tomatenblatthomogenat unter *in vitro* Bedingungen eine Repression dieser Gene verursacht.

**Tabelle 5.7:** In Gegenwart von Tomatenblatthomogenat differentiell exprimierte Gene, die für extrazelluläre Enzyme codieren. Angegeben sind die M-Werte der Ansätze I und II. **Fett:** M-Wert  $\leq -0,93$ ; \*: M-Wert ist nicht signifikant, da  $p > 0,05$ . Im unteren Teil der Tabelle (pCM2\_0054-CMM\_1942) sind die Werte der verbleibenden Gene der *chp*- und der *ppa*-Familie aufgeführt, deren M-Wert unter beiden Bedingungen  $> -0,93$  war.

GenDB-ID	Genname	Funktion	I	II
CMM_0052	<i>chpC</i>	extrazelluläre Serin-Protease	<b>-1,28</b>	<b>-2,54</b>
CMM_0053	<i>chpF</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-0,89	<b>-1,97</b>
CMM_0059	<i>chpG</i>	extrazelluläre Serin-Protease	<b>-1,16</b>	<b>-1,81</b>
CMM_PSEUDO_0008	<i>chpA'</i>	Pseudogen, extrazelluläre Serin-Protease	-0,74	<b>-2,33</b>
CMM_PSEUDO_0010	<i>chpA'</i>	Pseudogen, extrazelluläre Serin-Protease	-0,66	<b>-1,66</b>
CMM_PSEUDO_0018	<i>chpB'</i>	Pseudogen, extrazelluläre Serin-Protease	* -0,02	<b>-1,40</b>
pCM2_0053	<i>phpA</i>	extrazelluläre Serin-Protease	<b>-0,98</b>	<b>-2,64</b>
pCM2_0052	<i>phpB</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-0,42	<b>-1,00</b>
CMM_0041	<i>ppaA</i>	extrazelluläre Serin-Protease	<b>-1,57</b>	<b>-2,03</b>
CMM_0042	<i>ppaB1</i>	extrazelluläre Serin-Protease	<b>-1,02</b>	<b>-1,37</b>
CMM_0050	<i>ppaB2</i>	extrazelluläre Serin-Protease	<b>-1,32</b>	<b>-1,72</b>
CMM_0044	<i>ppaC</i>	extrazelluläre Serin-Protease	<b>-1,13</b>	<b>-1,84</b>
CMM_0075	<i>ppaD</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-0,71	<b>-1,24</b>
CMM_0071	<i>ppaE</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-0,42	<b>-1,42</b>
CMM_1947	<i>ppaH</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-0,87	<b>-2,45</b>
CMM_1948	<i>ppaI</i>	extrazelluläre Serin-Protease	* -0,02	<b>-1,28</b>

pCM1_0023	<i>ppaJ</i>	extrazelluläre Serin-Protease	<b>-0,97</b>	<b>-3,20</b>
CMM_2536	<i>sbtC</i>	Subtilisin-ähnliche Serin-Protease, (EC 3.4.21.-)	-0,46	<b>-1,62</b>
pCM1_0020	<i>celA</i>	Cellulase (EC 3.2.1.4)	-0,71	<b>-2,53</b>
CMM_2871	<i>pgaA</i>	Polygalacturonase (EC 3.2.1.15)	<b>-1,22</b>	<b>-1,68</b>
CMM_1673	<i>xysA</i>	Endo-1,4- $\beta$ -Xylanase A (EC 3.2.1.8)	<b>-1,02</b>	<b>-1,58</b>
pCM2_0054	<i>pat-1</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-0,21	-0,17
CMM_0039	<i>chpE</i>	extrazelluläre Serin-Protease	* -0,07	* -0,07
CMM_0764	<i>ppaF</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-0,42	-0,92
CMM_1942	<i>ppaG</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-0,16	* 0,12

Werden die M-Werte aller differentiell exprimierten chromosomalen Gene gegen die Position der Gene auf dem Chromosom aufgetragen (Abbildung 5.9), zeigen insbesondere zwei Regionen ein auffälliges Expressionsverhalten. Die erste Region zeichnet sich durch eine verringerte Genexpression aus, beinhaltet die Gene CMM\_0037 bis CMM\_0075 (Positionsnummer 41-112). Sie erstreckt sich fast über die gesamte als *chp*-Region bezeichnete (Position 35-116) Pathogenitätsinsel und enthält, neben den bereits erwähnten differentiell exprimierten *chp*- und *ppa*-Genen (Tabelle 5.7), zwei für hypothetische Proteine codierende Gene (CMM\_0037, CMM\_0045) und zwei Gene, die für eine Zn-abhängig Hydrolase (CMM\_0072) bzw. eine Acyl-CoA-Synthetase (CMM\_0073; Fettsäuremetabolismus) codieren (Tabelle 8.7, S. 168 im Anhang). Die zweite Region umfasst die Gene *cytB* bis CMM\_0104 (Positionsnummer 134-143) und erstreckt sich somit über die zweite Hälfte der *tomA*-Region (Pathogenitätsinsel; Position 117-150), die sich unmittelbar an die *chp*-Region anschließt. Die Gene dieser Region sind induziert und codieren für Glucosidasen (*bglE*, *bglF*, *bglH*, *bglI*), ein 3Fe-4S Ferredoxin (*cytB*) und eine Zuckerpermease der MFS Superfamilie (CMM\_0104) (siehe Tabelle 8.8, S. 168 im Anhang). Eine Induktion der Gene der letztgenannten Region war nur unter der zweiten Versuchsbedingung, also nach mehrstündigem (12,3 h) Wachstum in M9<sub>5%</sub>-T-Hom, zu erkennen (Abbildung 5.9).



**Abbildung 5.9:** Positionenplot der in Gegenwart von Tomatenblatthomogenat differentiell exprimierten Gene einer NCPPB382-Kultur. Die M-Werte (Differenz zwischen den Transkriptmengen unter Versuchs- und unter Kontrollbedingungen) sind gegen die Position differentiell exprimierter Gene im Chromosom aufgetragen. Cluster I: Gene der *chp*-Region, Cluster II: Gene der *tomA*-Region.

Unter beiden Versuchsbedingungen war zudem eine verstärkte Expression von zwei (Ansatz I) bzw. 4 (Ansatz II) Hitzeschockproteinen und Chaperonen sowie eines Stress-induzierten DNA-Bindeproteins (DpsA) festzustellen (Tabelle 8.9, S. 169 im Anhang). Dieser Effekt könnte möglicherweise auf eine Reaktion von *Cmm* auf Abwehrstoffe im Pflanzenhomogenat hindeuten. Die Induktion von DpsA (CMM\_1461;  $M_{\text{Ansatz I}} = 1,67$ ,  $M_{\text{Ansatz II}} = 1,23$ ) könnte ferner ein Indiz dafür sein, dass *Cmm* durch Tomatenblatthomogenat oxidativen Stress ausgesetzt ist (Almiron et al., 1992). Die Induktion bzw. Repression verschiedener Transporter insbesondere 12 min nach Zugabe des Tomatenblatthomogenats (18 Gene, Ansatz II: 9 Gene) ist im Wesentlichen sicher als Anpassung an das modifizierte Nährstoffangebot anzusehen (Tabelle 8.9 im Anhang). Aufgrund der Induktion von Genen, die einen Citrat-Transporter (CMM\_2878;  $M_{\text{Ansatz I}} = 1,00$ ,  $M_{\text{Ansatz II}} = 1,55$ ) bzw. einen 2-Oxoglutarat/Malat Translocator (CMM\_2051;  $M_{\text{Ansatz I}} = 1,67$ ,  $M_{\text{Ansatz II}} = 1,24$ ; A-Wert jeweils minimal unterhalb des Schwellenwerts) codieren, ist z.B. eine physiologisch hohe Konzentration von Citrat und Malat im verwendetem Tomatenblatthomogenat anzunehmen. Diese beiden Carbonsäuren wurden auch in Xylemsaft uninfizierter Tomatenpflanzen (Malat: 4 mM, Citrat: 270  $\mu\text{M}$ ) nachgewiesen und *in vitro* insbesondere in der spätlogarithmischen Wachstumsphase von *Cmm* abgebaut (siehe Abbildung 5.6, S. 73 und Tabelle 8.3, S. 165 im Anhang).

Um die Interaktion von *Cmm* mit der Tomate auf molekularer Ebene zu verstehen, ist es auch von Interesse, die Regulation von Genen, die wichtig für die Infektion, Kolonisation und Auslösung der Welkesymptome sind, zu analysieren. Daher war es besonders interessant, dass in Gegenwart von Tomatenblatthomogenat auch zwei Gene, die für Regulatoren codieren, eine differentielle Expression zeigten. *sigY* (CMM\_0243; ein Sigmafaktor der ECF-Subfamilie) war nur unter den Versuchsbedingungen von Ansatz I transient induziert. CMM\_1624 codiert für einen Regulator der TetR-Familie und zeigte unter beiden Bedingungen ebenso wie die *chp*- und *ppa*-Gene eine verringerte Genexpression (Ansatz I:  $M = -1,92$ ; Ansatz II:  $M = -1,54$ ). Es besteht also die Möglichkeit, dass SigY und CMM\_1624 eine Bedeutung in der Interaktion von *Cmm* mit der Tomate haben. Eine nähere Analyse von SigY bezüglich seiner Rolle für die Virulenz war bislang nicht durchführbar. Eine spezifische Promotorsequenz für SigY ist nicht bekannt und eine entsprechende *sigY*-Mutante liegt bisher nicht vor (Vogel und Gartemann, persönliche Mitteilung). Die Erzeugung und Charakterisierung von CMM\_1624<sup>-</sup>-Mutanten in Pflanzentests mit der Wirtspflanze und mit Nichtwirtspflanzen ist in Abschnitt 5.6 (S. 91) näher beschrieben.

Die Ergebnisse der Microarrayexperimente konnten durch *real-time*-RT-PCR für alle ausgewählten Gene bestätigt werden (Tabelle 5.8). Für die *real-time*-RT-PCR wurde die gleiche RNA wie für die Microarrayexperimente verwendet. Die Verhältnisse der Transkriptmengen der behandelten Probe zu der der Kontrolle wurden nach der Pfaffl-Methode berechnet (Pfaffl, 2001). Zur Normalisierung der Expressionsergebnisse wurde *gyrA* (Chalupowicz et al., 2010) verwendet. Um die Werte der Microarrays direkt mit denen der *real-time*-RT-PCR vergleichen zu können, ist in der Tabelle das Verhältnis der Signalintensitäten (M-Wert) als  $2^M$  angegeben. Ist das Verhältnis von Probe zu Kontrolle

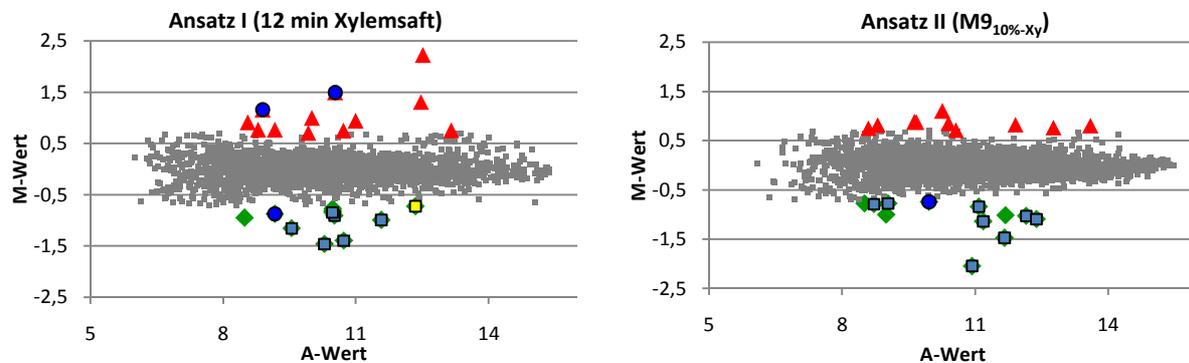
kleiner 1, ist der negative, reziproke Wert des Verhältnisses angegeben. Mittels PCR mit RNA als *template* wurde vorab nachgewiesen, dass die verwendete RNA keine DNA enthält.

**Tabelle 5.8:** Ergebnisse der *real-time*-RT-PCR zum Experiment Tomatenblatthomogenat (Ansatz I und II). Die mittels Microarray erhaltenen Werte sind als  $2^M$  angegeben. Ist die Transkriptmenge unter der Versuchsbedingung (12 min bzw. 12,3 h nach Zugabe des Tomatenblatthomogenats) verringert, ist der negative, reziproke Wert des Verhältnisses zur Kontrolle angegeben (Verhältnis: 0,5  $\rightarrow$  -2).

	GenDB-ID	Genname	mögliche Funktion	$2^M$	RT-PCR
Ansatz I	CMM_0052	<i>chpC</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-2,42	-6,76
	CMM_0059	<i>chpG</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-2,23	-3,37
	pCM2_0053	<i>phpA</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-1,98	-3,48
	CMM_0041	<i>ppaA</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-2,97	-2,15
	CMM_0044	<i>ppaC</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-2,19	-6,41
	pCM1_0023	<i>ppaJ</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-1,96	-2,81
	CMM_1624	-	Transkriptionsregulator, TetR-Familie	-3,77	-2,60
Ansatz II	CMM_0052	<i>chpC</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-5,80	-18,17
	CMM_0059	<i>chpG</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-3,51	-10,11
	pCM2_0052	<i>phpB</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-2,01	-5,49
	pCM2_0053	<i>phpA</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-6,24	-16,87
	CMM_0041	<i>ppaA</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-4,07	-9,70
	CMM_0044	<i>ppaA</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-3,58	-22,91
	pCM1_0023	<i>ppaJ</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-9,19	-12,43
	pCM1_0020	<i>celA</i>	Cellulase (EC 3.2.1.4)	-5,77	-11,67
	CMM_0100	<i>bgIF</i>	$\beta$ -Glucosidase, Glycosyl-Hydrolase-Familie 3 (EC 3.2.1.-)	9,51	14,99
	CMM_0103	<i>bgII</i>	$\beta$ -Xylosidase, Glycosyl-Hydrolase-Familie 43 (EC 3.2.1.37)	4,85	29,53
	CMM_0095	<i>cytB</i>	3Fe-4S Ferredoxin eines Cyt <sub>p450</sub> -Systems	2,53	12,76
CMM_1624	-	Transkriptionsregulator, TetR-Familie	-2,90	-3,83	

### Differentielle Genexpression nach Zugabe von Xylemsaft

In Gegenwart von 10 % Xylemsaft zeigten unter beiden Versuchsbedingungen nur 23 (Ansatz I) bzw. 22 Gene (Ansatz II) eine im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollbedingungen um mindestens 1,6-fach ( $M \geq 0,7$  oder  $\leq -0,7$ ) veränderte Genexpression (Abbildung 5.10).



**Abbildung 5.10:** Genexpression von NCPPB382 in mit 10 % Xylemsaft supplementierten M9-Medium (Scatterplot). **Ansatz I:** Transkriptionsprofil von Zellen 12 min nach Zugabe von 10 % Xylemsaft. **Ansatz II:** Transkriptionsprofil logarithmischer Zellen in M9-Minimalmedium<sub>10%-Xy</sub>. Grüne Rauten:  $M \leq -0,7$ , rote Dreiecke:  $M \geq 0,7$ , blaue Kreise: Transporter, hellblaue Quadrate: Eisenmetabolismus, gelbe Quadrate: extrazelluläre Enzyme, graue Quadrate: nicht differenziell exprimierte Gene. Schwellenwerte differenziell exprimierter Gene:  $M \geq |0,7|$ ;  $A_{\text{Ansatz I}} \geq 8,31$ ,  $A_{\text{Ansatz II}} \geq 8,23$ ;  $p \leq 0,05$ ;  $n \geq 7$ .

Etwa zwei Drittel der differenziell exprimierten Gene waren den Gruppen IV (Potentiell relevant für phytopathogene Interaktion) und V (Schlecht/kaum charakterisiert) zuzuordnen, 7 (nach 12 min, Ansatz I) bzw. 5 Gene (nach 13,5 h, Ansatz II) der Gruppe „Metabolismus“ (Tabelle 8.10 im Anhang). Die M-Werte der differenziell exprimierten Gene der Gruppen I und IV sind in Tabelle 5.9 aufgeführt.

**Tabelle 5.9:** In Gegenwart von 10 % Xylemsaft differenziell exprimierte Gen der Gruppen I und IV. **Ansatz I:** Transkriptionsprofil von Zellen 12 min nach Zugabe von 10 % Xylemsaft. **Ansatz II:** Transkriptionsprofil logarithmischer Zellen in M9-Minimalmedium<sub>10%-Xy</sub>. Daten von 3 biologischen Replikaten. Schwellenwerte:  $M \geq |0,7|$ ;  $A_{\text{Ansatz I}} \geq 8,31$ ,  $A_{\text{Ansatz II}} \geq 8,23$ ;  $p \leq 0,05$ ;  $n \geq 7$ . \*:  $p > 0,05$ . **Fett** gedruckt sind alle M-Werte  $\geq |0,7|$ . Unterstrichen: Mittels *real-time*-RT-PCR validierte Werte (Daten im Anhang, Tabelle 8.11, S. 171).

Gruppe	GenDB-ID	Genname	mögliche Funktion	Ansatz I	Ansatz II
<b>I Metabolismus</b>					
Citrat Zyklus	CMM_0970	<i>sdhA</i>	Succinat-Dehydrogenase, Flavoprotein Untereinheit (EC 1.3.99.1)	<b>0,75</b>	* 0,13
	CMM_1659	<i>acnA</i>	Aconitathyratase (EC 4.2.1.3)	<b>1,31</b>	<b>0,77</b>
Pyrimidin	CMM_1782	<i>carB</i>	Carbamoyl-Phosphat-Synthase, große Untereinheit (EC 6.3.5.5)	<b>0,71</b>	* -0,15
Hämoglobin	<b>CMM_0601</b>	<b><i>hemO</i></b>	Hämoxygenase (EC 1.14.99.3)	<b>-0,90</b>	<b><u>-1,13</u></b>
Phosphat	CMM_0373	<i>phnM</i>	Metall-abhängige Hydrolase, an Phosphonatmetabolismus beteiligt	<b>0,77</b>	* -0,03
Eisen	<b>CMM_1129</b>	-	Siderophor-interagierendes Protein	<b><u>-1,39</u></b>	<b>-1,47</b>
	<b>CMM_2094</b>	<b><i>alcA</i></b>	Siderophorbiosynthese-Enzym/Monooxygenase	<b><u>-1,46</u></b>	<b>-2,05</b>

Eisen	<b>CMM_2095</b>	-	Siderophorbiosynthese-Enzym/ L-Aminosäure Decarboxylase (EC 4.1.1.-)	-0,66	<b>-1,02</b>
<b>IV Potentiell relevant für phyopathogen Interaktion</b>					
ABC, o. weitere Zuordnung	CMM_0396	-	Na <sup>+</sup> Efflux ABC Transporter, Permease	<b>-0,87</b>	* 0,01
ABC, anorg. Ionen	<b>CMM_0166</b>	<b><i>fhuD</i></b>	Fe <sup>3+</sup> -Siderophor ABC Transporter, Substratbindeprotein	<b>-0,99</b>	<b>-1,09</b>
	<b>CMM_0363</b>	-	Fe <sup>3+</sup> -Hydroxamat ABC Transporter, Substratbindeprotein	-0,62	<b>-0,77</b>
	<b>CMM_2349</b>	<b><i>fecB1</i></b>	Fe <sup>3+</sup> -Siderophor ABC Transporter, Substratbindeprotein	-0,65	<b>-0,78</b>
	<b>CMM_2931</b>	<b><i>fecB2</i></b>	Fe-Siderophor ABC Transporter, Substratbindeprotein	<b>-0,84</b>	<b>-0,83</b>
Permeasen, Zucker	CMM_1885	<i>dctA</i>	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Dicarboxylat Symporter, DAACS-Familie	<b>1,49</b>	* -0,06
	CMM_2878	-	Citrat Transporter, CitMHS- Familie	<b>1,16</b>	* 0,69
Permeasen, anorg. Ionen	<b>CMM_2175</b>	-	Fe <sup>2+</sup> -Permease, OFeT-Familie	<b>-1,15</b>	-0,52
	CMM_2176	-	konserviertes, sekretiertes Lipoprotein	-0,53	<b>-0,74</b>
Phosphotrans- ferasesystem	CMM_1505	<i>fruB</i>	Phosphotransferasesystem, Phosphocarrier Protein HPr (EC 2.7.1.69)	<b>0,91</b>	* -0,20
Konjugation	pCM1_0015	-	sekretiertes Protein	<b>-0,95</b>	* -0,06
Hitzeschock- proteine, Chaperone	CMM_0151	<i>dnaK</i>	Chaperon (Hitzeschockprotein 70)	0,21	<b>0,80</b>
	CMM_2092	<i>hsp20</i>	Hitzeschockprotein, HSP20- Familie	0,37	<b>0,88</b>
Radikale (Fenton)	CMM_1461	<i>dpsA</i>	Stress-induziertes DNA- Bindeprotein	<b>2,22</b>	<b>0,82</b>
extrazelluläre Serinproteasen	CMM_2536	<i>sbtC</i>	Subtilisin-ähnliche Serin-Protease (EC 3.4.21.-)	<b>-0,72</b>	* -0,04
Serinproteasen	CMM_1353	-	membrangebundene Protease	<b>1,00</b>	0,18

Besonders auffällig war die Repression von Genen, die für Enzyme der Siderophorbiosynthese (Hydroxamatbiosynthese), eine Hämoxygenase, mehrere Fe<sup>3+</sup>-Siderophor-ABC-Transporter oder eine Fe<sup>2+</sup>-Permease codieren. Bei diesen in Tabelle 5.9 fettgedruckten Genen konnte im Abstand von 1 bp bis zu 62 bp vor dem Startcodon eine DtxR-Box identifiziert werden (Gartemann et al., 2008). Die Sequenzen der DtxR-Boxen waren zu 79-95 % identisch mit der von Lee und Holmes (2000) für *Corynebacterium diphtheriae* vorgeschlagenen Konsensussequenz „ttaggttagctnncctaa“. Von allen *Cmm*-Genen/Operons, vor denen eine DtxR-Box vorhergesagt wurde, zeigte lediglich *fecB* (CMM\_0435) keine differentielle Genexpression. Neben den Biosynthesegenen für ein Hydroxamatsiderophor konnten bei *Cmm* auch Gene identifiziert werden, die Proteine zur Biosynthese eines zweiten Siderophors, eines Catecholats (CMM\_0324-CMM\_0331), codieren. Eine Regulation dieses zweiten Siderophors durch DtxR scheint allerdings unwahrscheinlich, da keine entsprechenden Bindestellen vorhergesagt wurden, stattdessen

ist eine Bindestelle für Fur, einem Mitglied einer weiteren Eisenregulatorfamilie, vorhergesagt. Kraz (2004) konnte durch Erzeugung und Charakterisierung einer *dtxR*<sup>-</sup>-Mutante bereits mittels des CAS (Chrom-Azurolo-S)-Tests (Milagres et al., 1999) nachweisen, dass DtxR die Biosynthesegene mindestens eines Siderophors reprimiert. Die durch Xylemsaft bedingte Repression nahezu aller Gene mit einer möglichen Bindestelle für DtxR unterstützt die Annahme, dass DtxR der Repressor der Hydroxamatbiosynthese und -aufnahme ist.

Die Repression der Hydroxamatbiosynthesegene lässt vermuten, dass der Xylemsaft leicht aufzunehmende Eisenverbindungen in einer für *Cmm* ausreichenden Konzentration enthält. Pflanzen nehmen Eisen als Fe<sup>2+</sup> über die Wurzel auf. Innerhalb der Wurzelzellen wird Fe<sup>2+</sup> schnell wieder zu Fe<sup>3+</sup> oxidiert und an organische Säuren wie Citrat oder Malat gebunden im Xylem in obere Pflanzenregionen transportiert (Marschner, 1997; Rellán-Alvarez et al., 2010).

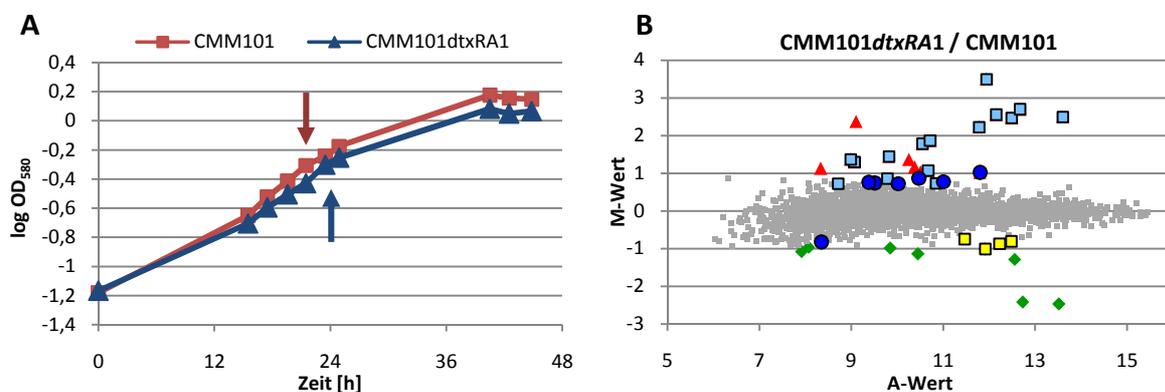
12 min nach Zugabe des Xylemsafts konnte eine Induktion von Genen, die für einen Citrat-Transporter der CitMHS-Familie (CMM\_2878) und für einen Oxoglutarat/Malat Translocator (CMM\_2051) codieren, festgestellt werden. Der A-Wert von CMM\_2051 lag allerdings mit 7,51 unterhalb des Schwellenwerts von 8,23. Bei Ansatz II war für den Citrat-Transporter der gleiche Trend festzustellen. Die Werte beider Gene (Ansatz II) waren aber nicht eindeutig ( $p > 0,05$ ). Die Induktion der Aconitat-Hydratase, welches die Isomerisierung von Citrat über *cis*-Aconitat in Isocitrat katalysiert, unter beiden Bedingungen (I: M = 1,31; II: M = 0,77) könnte in direkten Zusammenhang mit der Induktion des Citrat-Transporters und der dadurch erhöhten intrazellulären Citratkonzentration stehen.

Ähnlich wie bei dem Experiment mit Tomatenblatthomogenat war auch nach Supplementierung des Mediums mit 10 % Xylemsaft eine Induktion von *dpsA* (Stress-induziertes DNA-Bindeprotein) zu verzeichnen. Da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Gegenwart von Fe<sup>2+</sup> durch die Fenton-Reaktion zu sehr reaktiven freien Hydroxylradikalen umgesetzt werden kann und möglicherweise relativ hohe Eisenkonzentrationen in den mit Xylemsaft behandelten Zellen vorliegen, könnte die Repression der Hydroxamatbiosynthesegene, die Induktion des Citrat- und des Oxoglutarat/Malat-Transporters sowie die Induktion des Stress-induzierten DNA-Bindeproteins kausal miteinander zusammenhängen. Die Rolle von DtxR bei der durch Xylemsaft hervorgerufenen differentiellen Genexpression wurde in einem weiteren Experiment, in dem das Expressionsmuster einer *dtxR*<sup>-</sup>-Mutante mit dem von CMM101 verglichen wurde, näher untersucht.

## 5.5 Transkriptionsprofil der *dtxR*<sup>-</sup>-Mutante im Vergleich zu CMM101

Bislang war bekannt, dass der Transkriptionsregulator DtxR bei physiologischen Eisenkonzentrationen die Biosynthese mindestens eines der beiden von *Cmm* gebildeten Siderophore reprimiert (Kraz, 2004). Weiterhin konnten 9 möglicherweise durch DtxR regulierte Gene bzw. Operons identifiziert werden, die im 5'-UTR Bereich eine zur DtxR-Box von *Corynebacterium diphtheriae* homologe Sequenz aufweisen (Gartemann et al., 2008). In den vorhergehenden Microarrayexperimenten zeigte sich, dass mit Ausnahme von *fepB* alle Gene, die eine vorhergesagte Bindestelle für DtxR enthalten, durch Zugabe von Xylemsaft reprimiert wurden. Daher ist anzunehmen, dass die Repression dieser Gene, die dem Hydroxamatmetabolismus zuzuordnen sind, durch DtxR erfolgt.

Um eindeutig nachzuweisen, dass DtxR als Repressor der Hydroxamatbiosynthesegene, zugehöriger Transporter und weiterer interagierender Proteine fungiert, wurde das Transkriptionsprofil der *dtxR*-Mutante (CMM101*dtxRA1*) im Vergleich zu CMM101 bestimmt. Unter der Annahme, dass DtxR in Minimalmedium mit Xylemsaft aktiv ist, also der nötige Corepressor anwesend ist, wurden CMM101*dtxRA1* und CMM101 bis zur logarithmischen Wachstumsphase in M9-Minimalmedium kultiviert ( $OD_{580} \approx 0,5$ ) und das Medium dann mit Xylemsaft (Endkonzentration: 10 %) supplementiert. 20 min nach dieser Behandlung wurden Zellen aus je drei parallelen Kulturen für die RNA-Isolierung entnommen. Wie in Abbildung 5.11 A zu erkennen und auch schon von Kraz (2004) gezeigt wurde, wächst die *dtxR*-Mutante langsamer als CMM101 und erreicht in der stationären Wachstumsphase einen niedrigeren  $OD_{580}$ -Wert ( $OD_{580-CMM101dtxRA} = 1,2$ ;  $OD_{580-CMM101} = 1,6$ ).



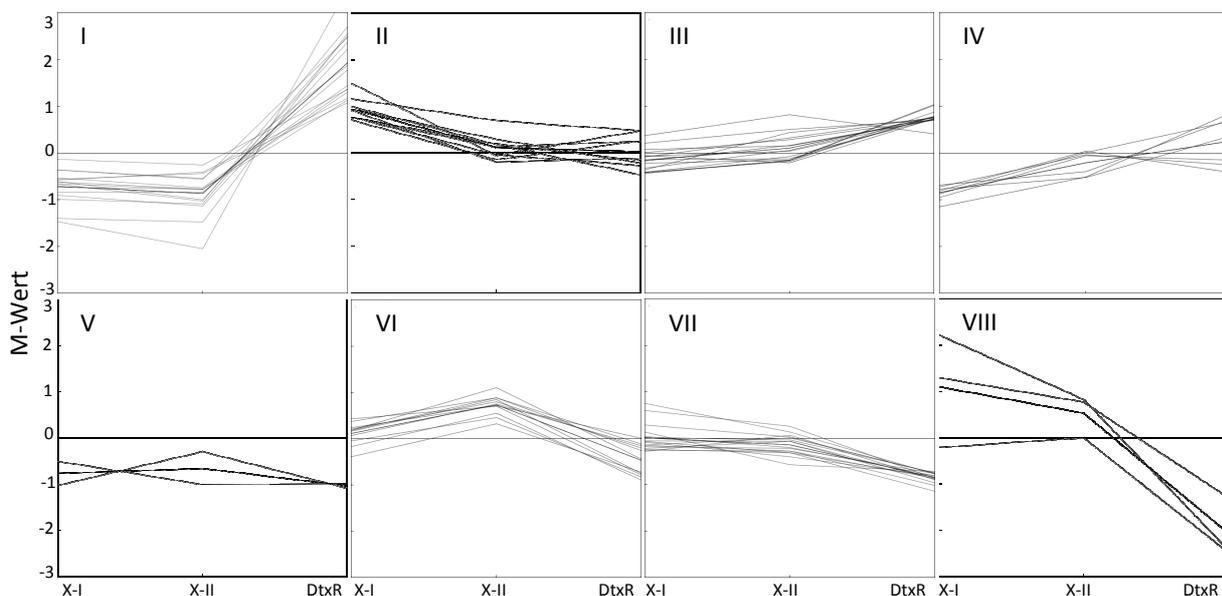
**Abbildung 5.11:** **A:** Wuchskurve von CMM101 und CMM101*dtxRA1* in M9-Minimalmedium. Dargestellt ist jeweils eine von 3 unabhängigen Wuchskurven mit einer Start- $OD_{580} \approx 0,05$ . Nach 21,5 h (CMM101; roter Pfeil) bzw. 23,5 h (CMM101*dtxRA1*; blauer Pfeil) wurde Xylemsaft (sterilfiltriert; 2 h von 6 Wochen alten uninfizierten Tomaten gesammelt) mit einer Endkonzentration von 10 % den Kulturen hinzugefügt. 20 min nach dieser Behandlung wurden Proben für die RNA-Isolierung entnommen. **B:** Scatterplot: vergleichendes Transkriptionsprofil von CMM101*dtxRA1* zu CMM101 unter den in **A** gezeigten Wachstumsbedingungen. Daten von 3 biologischen Replikaten. Grüne Rauten:  $M \leq -0,7$ , rote Dreiecke:  $M \geq 0,7$ ; blaue Kreise: Transporter, hellblaue Quadrate: Eisenmetabolismus, gelbe Quadrate: extrazelluläre Enzyme, graue Quadrate: nicht differenziell exprimierte Gene. Schwellenwerte differenziell exprimierter Gene:  $M \leq -0,7$  bzw.  $\geq 0,7$ ;  $A \geq 7,50$ ;  $p \leq 0,05$ ;  $n \geq 7$ .

Unter den gewählten Bedingungen waren 56 Gene differentiell exprimiert (31:  $M \geq 0,7$ ; 25:  $M \leq -0,7$ ). 73 % dieser Gene waren den Kategorien IV und V zuzuordnen, 12 Gene und damit knapp 21 % codierten für Proteine aus der Gruppe „Metabolismus“. Aus der Kategorie „Informationsspeicherung und -prozessierung“ zeigte kein Gen bei der *dtxR*<sup>-</sup>-Mutante ein von CMM101 abweichendes Transkriptionsprofil (Tabelle 8.12 im Anhang). In Abbildung 5.11 B ist bereits zu erkennen, dass die meisten in CMM101*dtxRA1* nach Xylemsaftzugabe induzierten Gene dem Eisenmetabolismus (hellblaue Quadrate) zuzuordnen sind. Die Gene dieser Gruppe, ihre Funktion und die M-Werte sind in Tabelle 5.10 im Einzelnen aufgelistet. Alle Gene des Eisenmetabolismus, die im Wildtyp NCPPB382 in Gegenwart von Xylemsaft im Vergleich zu nicht supplementiertem Medium reprimiert waren (in Tabelle 5.10, fett gedruckt), sind bei der *dtxR*<sup>-</sup>-Mutante induziert. Ferner zeigten 6 weitere Gene des Eisenmetabolismus, darunter ein Pseudogen, bei der *dtxR*<sup>-</sup>-Mutante den gleichen Effekt. Diese Gene liegen direkt benachbart zu den bereits bei dem Experiment mit Xylemsaft identifizierten Genen und sind wahrscheinlich mit diesen als Operon organisiert.

**Tabelle 5.10:** Nach Xylemsaftzugabe in CMM101*dtxRA1* im Vergleich zu CMM101 induzierte Gene des Eisenmetabolismus. Schwellenwerte:  $M \geq |0,7|$ ;  $A \geq 7,50$ ;  $p \leq 0,05$ ;  $n \geq 7$ . Daten von 3 biologischen Replikaten. **Fett gedruckt:** bei NCPPB382 in mit Xylemsaft versetztem Medium im Vergleich zu unbehandeltem Medium reprimierte Gene. Unterstrichene M-Werte: Mittels *real-time*-RT-PCR validierte Werte; Daten im Anhang (Tabelle 8.13, S. 173).

GenDB-ID	Genname	mögliche Funktion	M-Wert
CMM_0165	<i>fhuC</i>	Fe <sup>3+</sup> -Siderophor ABC Transporter, ATPase	1,87
<b>CMM_0166</b>	<b><i>fhuD</i></b>	Fe <sup>3+</sup> -Siderophor ABC Transporter, Substratbindeprotein	2,50
CMM_0167	<i>fhuB</i>	Fe <sup>3+</sup> -Siderophor ABC Transporter, Permease	1,07
<b>CMM_0363</b>	-	Fe <sup>3+</sup> -Hydroxamat ABC Transporter, Substratbindeprotein	1,30
<b>CMM_0601</b>	<b><i>hemO</i></b>	Hämoxygenase (EC 1.14.99.3)	<u>2,23</u>
<b>CMM_1129</b>	-	Siderophor-interagierendes Protein	<u>2,55</u>
CMM_PSEU DO_0030	-	Pseudogen, Siderophor-interagierendes Protein	-0,77
CMM_2093	<i>alcBC</i>	Siderophorbiosynthese-Protein	2,47
<b>CMM_2094</b>	<b><i>alcA</i></b>	Siderophorbiosynthese-Enzym/Monooxygenase	<u>3,50</u>
<b>CMM_2095</b>	-	Siderophorbiosynthese-Enzym/L-Aminosäure Decarboxylase (EC 4.1.1.-)	<u>2,70</u>
<b>CMM_2175</b>	-	Fe <sup>2+</sup> - Permease, OFeT-Familie	0,86
<b>CMM_2176</b>	-	konserviertes, sekretiertes Lipoprotein	1,45
CMM_2177	-	Fe-abhängige Peroxidase	0,73
<b>CMM_2349</b>	<b><i>fecB1</i></b>	Fe <sup>3+</sup> -Siderophor ABC Transporter, Substratbindeprotein	1,37
CMM_2928	<i>fecE</i>	Fe <sup>3+</sup> -Siderophor ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	0,73
<b>CMM_2931</b>	<b><i>fecB2</i></b>	Fe-Siderophor ABC Transporter, Substratbindeprotein	1,78

Zur weiteren Analyse wurde ein hierarchisches Clustering der Expressionsdaten der *dtxR*<sup>-</sup>-Mutante mit den Daten der Xylemsaftexperimente (5.4.2; S. 77) durchgeführt. Mit Hilfe von Clusteranalysen können Gene zu Gruppen zusammengefasst werden, die unter unterschiedlichen Bedingungen ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen. Dadurch können auch Gengruppen identifiziert werden, die nicht benachbart im Genom lokalisiert sind, deren Expression aber dennoch ähnlichen Regulationsmechanismen unterliegt. Für das Clustering wurden nur Gene berücksichtigt, die bei mindestens einer der jeweiligen Bedingungen hinreichende Werte für A, p und n erreichen und deren M-Werte  $\geq |0,7|$  sind. Die so ausgewählten Gene (78) wurden in acht verschiedene Cluster unterteilt (Abbildung 5.12, Gene aus Cluster I-VI in Tabelle 8.14 im Anhang).



**Abbildung 5.12:** Resultat des hierarchischen Clusterings (euklidische Distanz) der Transkriptomdaten der Experimente mit Xylemsaft und dem Stamm CMM101*dtxRA1*. **X-I:** Xylemsaft, Ansatz I; **X-II:** Xylemsaft Ansatz II; **DtxR:** CMM101*dtxRA1* / CMM101. Berücksichtigt wurden alle Gene, deren M-Wert bei mindestens einer Bedingung  $\geq 0,7$  oder  $\leq -0,7$  war und alle weiteren Kriterien für die p-, n- und A-Werte erfüllt waren. Das Clustering, bei dem die euklidische Distanz verwendet wurde, wurde mit der Genesis Software durchgeführt (Sturn et al., 2002).

In Cluster I sind 16 Gene zusammengefasst, die beim Wildtyp nach Zugabe von Xylemsaft reprimiert und bei der *dtxR*<sup>-</sup>-Mutante im Vergleich zu CMM101 nach Zugabe von Xylemsaft induziert waren. Dreizehn Gene dieses Clusters sind dem Eisenmetabolismus zugeordnet und in Tabelle 5.10 aufgelistet. Lediglich drei bei CMM101*dtxRA1* differentiell exprimierte Gene des Eisenmetabolismus (aus Tabelle 5.10) sind in Cluster IV (CMM\_2175, CMM\_2177) und in Cluster III (*fecE*) eingruppiert.

In Cluster VII und VIII enthaltene Gene (Tabelle 5.11) waren bei CMM101*dtxRA1* signifikant reprimiert, bei NCPPB382 in Gegenwart von Xylemsaft entweder induziert oder nicht differentiell exprimiert. Interessanterweise waren auch 4 Gene, die für extrazelluläre Enzyme (die extrazellulären Serinproteasen PpaB1, PpaB2, PpaC und die plasmidcodierte Cellulase CelA) codieren, in Cluster VII enthalten (in Tabelle 5.11 fett gedruckt). Sie wiesen eine bis zu 2-fach verringerte Genaktivität bei der *dtxR*<sup>-</sup>-Mutante auf. Dies könnte darauf

hindeuten, dass DtxR direkt oder indirekt in Gegenwart von Xylemsaft einen aktivierenden Effekt auf diese Gene ausübt. Da *celA* und *ppaC* an der Auslösung der Krankheitssymptome beteiligt sind (Jahr et al., 2000; Abt & Eichenlaub, unveröffentlicht), ist DtxR also wahrscheinlich auch an der Regulation pathogenitätsrelevanter Gene beteiligt. Einen zum Experiment mit Xylemsaft (5.4.2; S. 77) entgegengesetzten Effekt zeigten die Gene *acnA*, *sdhA*, *sdhC*, die Enzyme des Citratzyklus codieren, und *dpsA*, das für ein Stress-induziertes DNA-Bindeprotein codiert. Im Vergleich zu CMM101 waren diese Gene bei CMM101*dtxRA1* reprimiert (Tabelle 5.11).

**Tabelle 5.11:** Gene der Cluster VII und VIII (hierarch. Clustering), die nach Xylemsaftzugabe in CMM101*dtxRA1* im Vergleich zu CMM101 reprimiert sind. Die Gene sind nach ihrer Zuordnung in die funktionellen Gruppen sortiert. **Fett:** extrazelluläre Enzyme. \*: mindestens ein Schwellenwert für A, p und n nicht erfüllt.

GenDB-ID	Genname	mögliche Funktion	Xylemsaft		<i>dtxR</i> <sup>-</sup>
			Ansatz I	Ansatz II	
<b>Cluster VII</b>					
CMM_0970	<i>sdhA</i>	Succinat-Dehydrogenase, Flavoprotein Untereinheit (EC 1.3.99.1)	0,75	* 0,13	-0,77
CMM_0972	<i>sdhC</i>	Succinat-Dehydrogenase, Cytochrom b Untereinheit (EC 1.3.99.1)	0,60	0,25	-0,87
CMM_1951	-	Glycin-Betain-Aldehyd-Dehydrogenase (EC 1.2.1.8)	* -0,07	-0,31	-1,14
CMM_0822	<i>wcoD</i>	Glycosyltransferase	* -0,24	* -0,31	-0,83
CMM_0161	-	Transkriptionsregulator, LacI-Familie	-0,29	* 0,07	-0,90
CMM_2818	-	konserviert hypothetisches Protein, $\beta$ -Lactamase	* 0,29	* 0,03	-0,76
<b>CMM_0042</b>	<b><i>ppaB1</i></b>	extrazelluläre Serin-Protease	* 0,04	-0,20	-0,81
<b>CMM_0044</b>	<b><i>ppaC</i></b>	extrazelluläre Serin-Protease	* -0,16	-0,27	-0,87
<b>CMM_0050</b>	<b><i>ppaB2</i></b>	extrazelluläre Serin-Protease	-0,26	-0,28	-1,01
<b>pCM1_0020</b>	<b><i>celA</i></b>	Cellulase (EC 3.2.1.4)	* -0,15	* 0,01	-0,75
CMM_0249	-	konserviert hypothetisches Protein	* 0,13	* -0,57	-0,71
CMM_0466	-	konserviertes, sekretiertes Protein	* -0,19	* -0,21	-0,76
CMM_1128	-	konserviertes Membranprotein	* 0,02	* -0,03	-0,74
CMM_2743	-	konserviert hypothetisches Protein	* -0,22	* -0,07	-0,89
CMM_2358	-	hypothetisches Membranprotein	* -0,06	* -0,07	-0,96
CMM_PSEU DO_0016	<i>parB</i>	Pseudogen, <i>partitioning</i> Protein	* -0,08	-0,40	-0,81
<b>Cluster VIII</b>					
CMM_1659	<i>acnA</i>	Aconitathydratase (EC 4.2.1.3)	1,31	0,77	-1,29
CMM_2688	-	Acetyl-Xylan-Esterase	-0,21	* -0,00	-2,47
CMM_1461	<i>dpsA</i>	Stress-induziertes DNA-Bindeprotein	2,23	0,82	-2,42

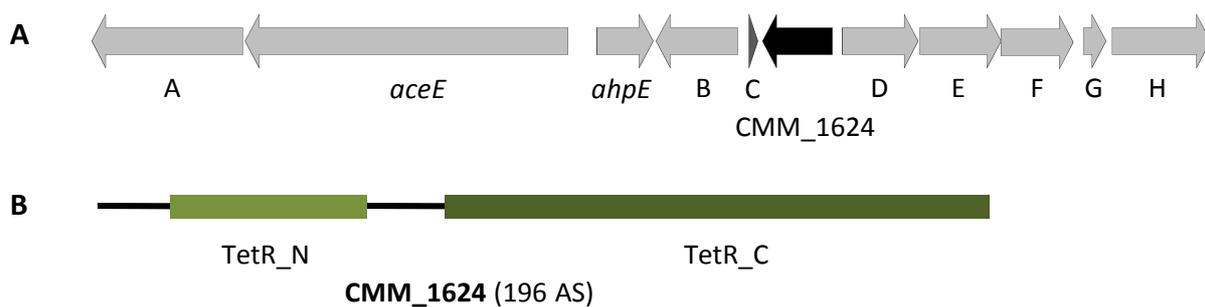
Insgesamt reprimiert DtxR die Expression der Hydroxamatbiosynthesegene sowie weiterer Gene des Eisenmetabolismus, die für eine Hämoxygenase, eine Fe-abhängige Peroxidase, zwei Siderophor-interagierende Proteine, drei Fe<sup>3+</sup>-Siderophor-Transporter und eine Fe<sup>2+</sup>-Permease codieren. Des Weiteren scheint DtxR, eventuell indirekt, da keine DtxR-Bindestellen vor diesen Genen vorhergesagt wurden, als Aktivator von *dpsA*, *acnA* und für Gene, die die Succinatdehydrogenase codieren, zu fungieren.

## 5.6 Charakterisierung des TetR-Regulators CMM\_1624

Die Zugabe von Tomatenblatthomogenat zu Minimalmedium bewirkte bei Wildtypzellen im Vergleich zu Kontrollbedingungen eine Verringerung der Transkriptmenge einiger für extrazelluläre Proteine codierender Gene, die für die Virulenz von *Cmm* relevant sind (Abschnitt 5.4.2, S.77). Das Gen CMM\_1624, welches für einen Transkriptionsregulator der TetR-Familie codiert, war unter diesen Bedingungen ebenfalls reprimiert. Dies führt zu der Vermutung, dass diese Gene coreguliert sein könnten bzw. dass CMM\_1624 an der Regulation von Pathogenitätsfaktoren beteiligt sein könnte. CMM\_1624 ist somit ein neues Kandidatengen für die Virulenz. Daher sollte nach Konstruktion einer CMM\_1624<sup>-</sup>-Mutante in anschließenden Virulenztests untersucht werden, ob die Virulenz von *Cmm* durch Inaktivierung dieses Gens modifiziert wird.

### 5.6.1 Sequenzanalyse des ORFs CMM\_1624

CMM\_1624 gehört zu einer Gruppe von 30 *Cmm*-Genen, die für Transkriptionsregulatoren der TetR-Familie codieren. TetR-Regulatoren haben meist ein Molekulargewicht von 21-25 kDa und weisen eine konservierte N-terminale DNA-Bindedomäne mit HTH-Motif (HTH: *helix turn helix*, pfam00440) auf (Bateman et al., 2004). Transkriptionsregulatoren der TetR-Familie wurden bislang bei zahlreichen Vertretern der Bacteria und Archaea identifiziert und sind z.B. an der Regulation der Expression von *multidrug efflux* Pumpen, der Antibiotikabiosynthese, osmotischem Stress, Differenzierungsprozessen und der Pathogenität beteiligt (Ramos et al., 2005). Das putative, 196 Aminosäuren (21 kDa) umfassende, CMM\_1624-Protein enthält neben der N-terminalen TetR\_N-Domäne (pfam00440; AS 17-60) eine C-terminale TetR\_C-Domäne (pfam02909; AS 77-196) (Abbildung 5.13, B), die, wie für einige Regulatoren bereits gezeigt, an der Bindung eines Induktors beteiligt sein kann (Rouch et al., 1990; Hillen & Berens, 1994; Grkovic et al., 1998; Godsey et al., 2002).



**Abbildung 5.13:** **A:** Physikalische Karte der Genregion von CMM\_1624. Schwarz: CMM\_1624. Dunkelgrau: CMM\_trRNA\_0026 (*orfC*), welches für eine tRNA für Valin codiert. *orfA* bis *orfH* sind mit den Buchstaben A-H abgekürzt. **B:** Schematische Übersicht über die Domänenstruktur des CMM\_1624-Proteins.

Stromabwärts von CMM\_1624 wird eine tRNA für Valin codiert. Des Weiteren codieren die Gene, die sich in unmittelbarer Nähe des möglichen TetR-Regulators befinden, für einen Transkriptionsregulator, eine Pyruvatdehydrogenase-Untereinheit, ein antioxidativ wirkendes Protein, einen Metall ABC Transporter, Membranproteine und für Proteine ohne weitere Funktionszuordnung (Tabelle 5.12).

**Tabelle 5.12:** Mögliche Funktionen der stromaufwärts und stromabwärts von CMM\_1624 gelegenen Gene.

Bez.	GenDB-ID	Genname	mögliche Funktion
<i>orfA</i>	CMM_1620	-	Transkriptionsregulator, CdaR-Familie
<i>aceE</i>	CMM_1621	<i>aceE</i>	Pyruvatdehydrogenase E1 Untereinheit (EC 1.2.4.1)
<i>ahpE</i>	CMM_1622	<i>ahpE</i>	Thiol-spezifisches antioxidativ wirkendes Protein (EC 1.6.4.-)
<i>orfB</i>	CMM_1623	-	Membranprotein
<i>orfC</i>	CMM_tRNA_0026	-	tRNA-Val (TAC)
<b>CMM_1624</b>	<b>CMM_1624</b>	-	<b>Transkriptionsregulator, TetR-Familie</b>
<i>orfD</i>	CMM_1625	-	konserviertes Membranprotein, BioY-Familie
<i>orfE</i>	CMM_1626	-	Metall ABC Transporter, ATP-bindendes Protein
<i>orfF</i>	CMM_1627	-	Metall ABC Transporter, Permease
<i>orfG</i>	CMM_1628	-	hypothetisches Protein
<i>orfH</i>	CMM_1629	-	konserviert hypothetisches Protein

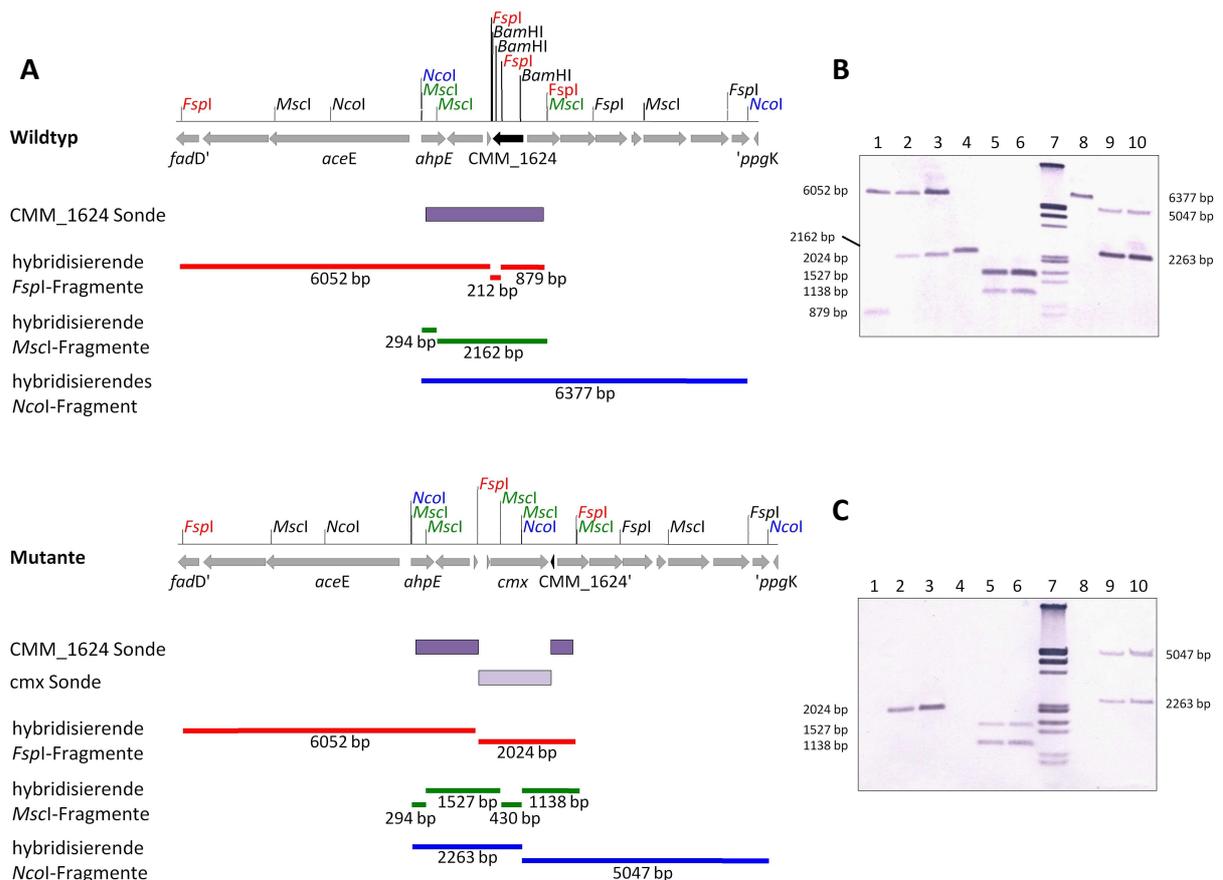
### 5.6.2 Erzeugung einer CMM\_1624<sup>-</sup>-Mutante

Zur Inaktivierung von CMM\_1624 wurde eine gerichtete Kassettenmutagenese verwendet. Zunächst wurde ein Mutageneseplasmid (pMF1624 $\beta$ ) auf Basis des aus dem Genomprojekt von NCPPB382 stammenden Sequenzierplasmids Cmis2p0159d05 erstellt (Gartemann et al., 2008). Dieses pSmart-Plasmid enthält ein 2,3 kb großes DNA-Fragment von NCPPB382, welches neben CMM\_1624, die kompletten ORFs CMM\_tRNA\_0026 (tRNA-Val) und CMM\_1625 enthält. Zur Herstellung des Mutageneseplasmids wurden zwei zusammen 545 bp große *Bam*HI-Fragmente deletiert und durch ein 1,5 kb großes *Bam*HI-Fragment aus pOKU-cm $\beta$ , das eine *cmx*-Kassette (*cmx*: Chloramphenicolexportergen aus *Corynebacterium striatum*, Tauch et al., 1998) trägt, ersetzt. Das resultierende Plasmid pMF1624 $\beta$  enthält nur noch die ersten 64 bp von CMM\_1624, der Rest des Gens ist deletiert. Die anderen ORFs wurden durch die Deletion nicht beeinträchtigt. Die *cmx*-Kassette ist in pMF1624 $\beta$  entgegengesetzt zu CMM\_1624 orientiert. Die Plasmidkarten des Mutageneseplasmids und der Plasmide, die zur Konstruktion von diesem verwendet wurden, sind im Anhang dargestellt (Abbildung 8.1, S. 158).

Der pSmart-Vektor ist wie andere pUC-Vektoren in *Cmm* nicht replikativ (*Suicide*-Vektor). Eine Chloramphenicol-Resistenz nach Transfer (mittels Elektroporation) des Mutageneseplasmids in kompetente Zellen des Wildtypstamms NCPPB382 zeigt daher die Integration in das Chromosom oder in eines der Plasmide an. Über eine zweite Rekombination kann dann ein Austausch des intakten Gens gegen das mit der Antibiotikaresistenzgen-Kassette (*cmx*) inaktivierte Gen erfolgen.

Durch Southern-Hybridisierung gegen pUC-DNA als Sonde (Daten nicht gezeigt) wurden zunächst alle chloramphenicolresistenten Klone dahingehend untersucht, ob durch illegitime Rekombination oder durch *single-crossover* Bereiche des Vektors in das Chromosom bzw. die *Cmm*-Plasmide integriert waren. Anschließend wurden alle Klone, deren DNA nicht mit der

pUC-DNA hybridisierte, durch weitere Hybridisierungen gegen das *cmx*-Fragment aus pOKU-cmBa (1,5 kb *Bam*HI) bzw. eine genspezifische Sonde (2,3 kb *Eco*RI-Insert von Cmis2p0159d05) näher charakterisiert. Die Hybridisierung *Fsp*I-, *Msc*I- bzw. *Nco*I-hydrolysierter Gesamt-DNA des Wildtyps und der Mutante mit der genspezifischen Sonde sollte zu unterschiedlichen und spezifischen Hybridisierungsmustern führen. In Abbildung 5.14 sind in A die physikalischen Karten der "CMM\_1624-Region" des Wildtyps und der Mutante dargestellt und die Fragmente hervorgehoben, die komplementäre Sequenzen zu der genspezifischen bzw. der *cmx*-Sonde aufweisen.



**Abbildung 5.14:** Hybridisierungsmuster des Wildtyps (NCPB382) und der CMM\_1624-Mutante. **A:** Physikalische Karte der CMM\_1624-Region beider Stämme. Die Sonden sowie die zu erwartenden hybridisierenden Banden sind dargestellt. **B und C:** Hybridisierung hydrolysierter DNA von NCPB382 (Spur 1/4/8) *Cmm*1624 (Spur 2/5/9) und CMM101\_1624 (Spur 3/6/9) gegen die CMM\_1624 Sonde (**B**) bzw. die *cmx*-Sonde (**C**): 1-3: *Fsp*I-hydrolysierte DNA, 4-6: *Msc*I-hydrolysierte DNA, 7:  $\lambda$ -Marker *Eco*RI/*Hind*III gespalten, 8-10: *Nco*I-hydrolysierte DNA.

Die Fragmentgrößen der hybridisierenden Banden zweier potentieller Mutanten und des Wildtyps (dargestellt in B und C) stimmen mit den berechneten Größen überein. Die Hybridisierung gegen die *cmx*-Sonde bestätigte die Ergebnisse für die beiden Mutanten. Nicht nachgewiesen werden konnten die kleineren Fragmente mit Größen unter 500 bp. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, dass bei gleicher Konzentration kleinere Fragmente bei der Hybridisierung zu einer deutlich geringeren Farbintensität führen als größere Fragmente oder die kleinen Fragmente bei der Auftrennung aus dem Gel gelaufen sind. Bei der

Elektroporation von *Cmm* wurde bereits in mehreren Arbeiten festgestellt, dass es zum Verlust beider oder eines der *Cmm*-Plasmide kommen kann (Kirchner, 2003; Abt, 2008; Kaup, 2009). Daher wurde mittels PCR überprüft, ob die beiden CMM\_1624<sup>-</sup>-Mutanten die plasmidcodierten Gene *celA* (pCM2) und *pat-1* (pCM2) enthalten (Daten nicht gezeigt). Das erwartete 502 bp große *celA*-Amplifikat konnte bei beiden Mutanten, das *pat-1*-Amplifikat (851 bp) nur bei einer nachgewiesen werden. Folglich wurden die beiden Stämme als *Cmm1624* (pCM1 und pCM2) und CMM101\_1624 (pCM1) bezeichnet.

### 5.6.3 Phänotypische Charakterisierung der CMM\_1624<sup>-</sup>-Mutanten

Zur phänotypischen Charakterisierung von *Cmm1624* und CMM101\_1624 wurden Pflanzentests mit der Wirtspflanze *Solanum lycopersicum* und zur Untersuchung der Auslösung der Hypersensitiven Reaktion Tests mit den Nichtwirtspflanzen *Mirabilis jalapa*, *Nicotiana benthamiana* und *Nicotiana tabaccum* cv. Samsun durchgeführt.

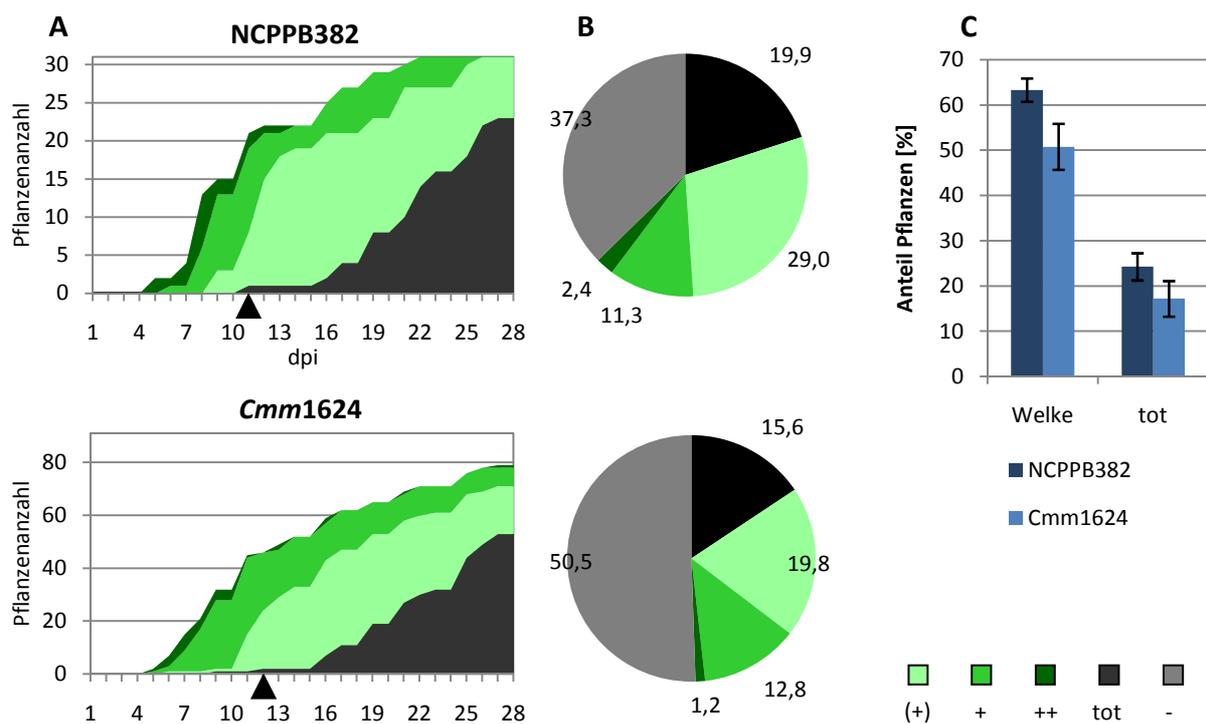
Im Pflanzentest mit der Wirtspflanze *Solanum lycopersicum* wurde die Virulenz und Kolonisationsfähigkeit der beiden CMM\_1624<sup>-</sup>-Mutanten untersucht. Um die bakterielle Welke auszulösen, muss *Cmm* in der Lage sein, die Pflanze zu infizieren, effektiv zu kolonisieren und letztlich durch Bildung von Virulenzfaktoren wie z.B. CelA und Pat-1 Krankheitssymptome hervorzurufen. Ist ein Stamm virulent, ist zu überprüfen, ob sich der Virulenzgrad von dem des entsprechenden Kontrollstamms unterscheidet. Indizien für den Virulenzgrad sind z.B. der Welkeindex, der angibt nach welchem Zeitraum die Hälfte der infizierten Pflanzen eindeutige Welkesymptome aufweisen, die Intensität der hervorgerufenen Welkesymptome ((+): beginnende Welke; +: eindeutige Welke; ++: starke Welke, mindestens 2/3 der Pflanze zeigt Welkesymptome; tot: Pflanze ist abgestorben), der Bakterientiter und auch das Gewicht der Pflanzen. Da der Plasmidstatus von *Cmm* einen Einfluss auf die Virulenz hat (Meletzus et al., 1993), ist die Virulenz einer Mutante mit der eines Kontrollstamms mit identischem Plasmidstatus zu vergleichen. Als Kontrollstamm für *Cmm1624* wurde folglich NCPPB382, für CMM101\_1624 wurde CMM101 verwendet.

Mittels Wurzelinfektion wurden je 96 Pflanzen mit den beiden Mutanten *Cmm1624* und CMM101\_1624 und je 32 Pflanzen mit den Kontrollstämmen NCPPB382 und CMM101 infiziert und die Welkesymptome der Pflanzen in den folgenden 4 Wochen protokolliert. Am Ende des Pflanzentests wurde durch Auftropfen auf Agarplatten untersucht, ob im Xylemsaft nicht welkender Pflanzen *Cmm* nachgewiesen werden kann. Alle Pflanzen, die keine Welkesymptome oder Sprossläsionen aufwiesen, größer als 20 cm waren und bei denen *Cmm* im Xylemsaft nicht nachgewiesen werden konnte, wurden als nicht infiziert eingeordnet und nicht mit in die Auswertung einbezogen. 28 Tage nach der Infektion zeigten Pflanzen, die mit einer der beiden CMM\_1624<sup>-</sup>-Mutanten (*Cmm1624*, CMM101\_1624) infiziert wurden, geringere Welkesymptome als Pflanzen, die mit den jeweiligen Kontrollstämmen (NCPPB382, CMM101) infiziert wurden (Abbildung 5.15).



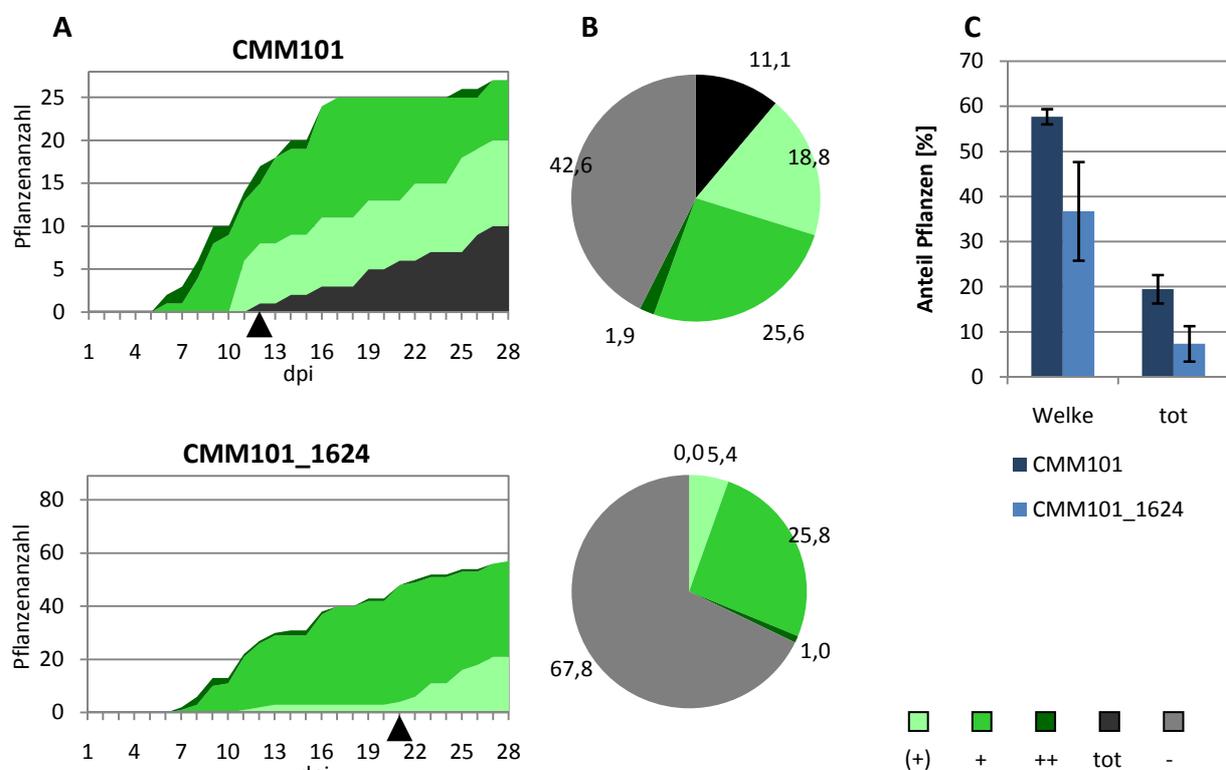
**Abbildung 5.15:** Welkesymptome von *Solanum lycopersium* 4 Wochen nach Wurzelinfektion mit *Cmm*.

In Abbildung 5.16 ist zu erkennen, dass *Cmm1624* insgesamt geringere Welkesymptome hervorrief als NCPPB382 (51 % gegenüber 63 % der Pflanzen). Des Weiteren besteht ein signifikanter Unterschied (p-Wert des t-Tests: 0,02) in der Häufigkeit, mit der während des gesamten Pflanzentests die Welkekatgorie "tot" an infizierte Pflanzen verteilt wurde. Der Unterschied im Virulenzgrad ist allerdings, wie auch durch den Welkeindex von 12 (NCPB382: Welkeindex = 11) zu erkennen ist, relativ gering.



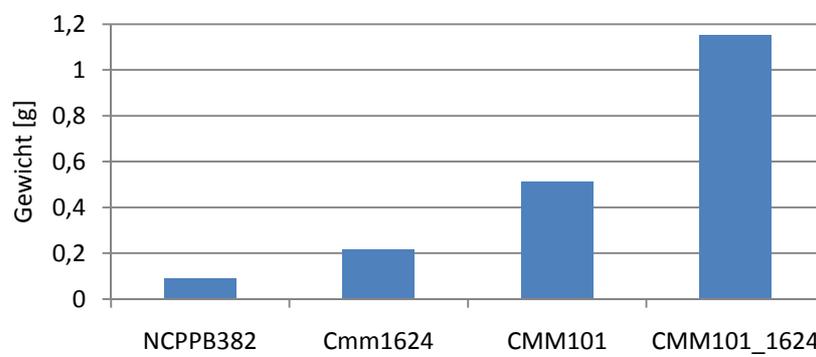
**Abbildung 5.16:** Welkeintensität der mit NCPPB382 (n=31) bzw. *Cmm1624* (n=91) infizierten Pflanzen über den vierwöchigen Testzeitraum. **A:** Welkediagramm: Anzahl welkender Pflanzen gegen die Zeit; der Welkeindex ist mit einem schwarzen Dreieck gekennzeichnet. **B:** Tortendiagramm: dargestellt ist die Häufigkeit [%] mit der während der 4 Wochen infizierte Pflanzen in die einzelnen Kategorien "tot", "++", "+", "(+)" bzw. "-" (nicht welkend) eingestuft wurden. Rohdaten hierzu im Anhang in Tabelle 8.15, S. 175. **C:** Mittelwerte des Prozentsatzes infizierter Pflanzen, die während des Testzeitraums Welkesymptome aufwiesen, bzw. der Kategorie "tot" zuzuordnen waren. Dazu wurden die Daten aus zwei weiteren Tests mit einbezogen und die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Datensätzen der einzelnen Pflanzschalen (je maximal 32 Pflanzen) berechnet. NCPPB382: 1 Schale (n=31)<sub>Test1</sub>, 1 Schale (n=31)<sub>Test2</sub>, 2 Schalen (n=32)<sub>Test3</sub>; *Cmm1624*: 3 Schalen (n=32, 31, 28)<sub>Test1</sub>, 1 Schale (n=31)<sub>Test2</sub>, 1 Schale (n=32)<sub>Test3</sub>.

Im Gegensatz zu der 1624-Mutante, die beide Plasmide trägt, zeigt CMM101\_1624 (pCM1) einen im Vergleich zum Kontrollstamm (CMM101) deutlicheren Unterschied im Virulenzgrad (Abbildung 5.17). Die Pflanzen zeigten innerhalb der vier Wochen nach Infektion mit CMM101\_1624 nur zu 32,2 % Welkesymptome, nach Infektion mit dem Kontrollstamm waren es 57,4 %. Nur 5,4 % der mit der Mutante infizierten Pflanzen wiesen starke Welkesymptome auf (CMM101: 18,8 %) und keine der Pflanzen starb. Durch Einbeziehen der Daten von zwei weiteren Pflanzentests konnte sowohl in der Häufigkeit mit der Welkesymptome protokolliert wurden (p-Wert des t-Tests: 0,005) als auch in der Häufigkeit mit der Pflanzen als "tot" eingestuft wurden (p-Wert des t-Tests: 0,01) ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Des Weiteren ist der stark erhöhte Welkeindex (21 im Vergleich zu 12 bei CMM101) ein deutliches Indiz für die abgeschwächte Virulenz dieser Mutante.



**Abbildung 5.17:** Welkeintensität der mit CMM101 (n=28) bzw. CMM101\_1624 (n=89) infizierten Pflanzen über den vierwöchigen Testzeitraum. **A:** Klassisches Welkediagramm: Anzahl welkender Pflanzen gegen die Zeit; der Welkeindex ist mit einem schwarzen Dreieck gekennzeichnet. **B:** Tortendiagramm: dargestellt ist die Häufigkeit [%] mit der während der 4 Wochen infizierte Pflanzen in die einzelnen Kategorien "tot", "++", "+", "(+)" bzw. "-" (nicht welkend) eingestuft wurden. Rohdaten hierzu im Anhang in Tabelle 8.15, S. 175. **C:** Mittelwert des Prozentsatzes infizierter Pflanzen, die während des Testzeitraums Welkesymptome aufwiesen, bzw. der Kategorie "tot" zuzuordnen waren. Dazu wurden die Daten aus zwei weiteren Tests mit einbezogen und die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Datensätzen der einzelnen Pflanzschalen (je maximal 32 Pflanzen) berechnet. CMM101: 1 Schale (n=28)<sub>Test1</sub>, 1 Schale (n=26)<sub>Test2</sub>, 2 Schalen (n=31, 28)<sub>Test3</sub>; CMM101\_1624: 3 Schalen (n=31, 29, 29)<sub>Test1</sub>, 1 Schale (n=30)<sub>Test2</sub>, 2 Schalen (n=31, 28)<sub>Test3</sub>.

Ein weiteres Indiz für die verminderte Virulenz ist das Gewicht der Pflanzen. Da das Gewicht der Pflanzen stark davon abhängig ist, wie früh und in welcher Intensität Welkesymptome auftreten und z.T. sehr große Unterschiede zwischen einzelnen Pflanzen vorkommen, wurde nicht das arithmetische Mittel sondern der Median des Gewichts aller welkenden Pflanzen berechnet (Abbildung 5.18). Es ist zu erkennen, dass die mit den Mutanten infizierten, welkenden Pflanzen ein höheres Frischgewicht aufwiesen als die mit den Kontrollstämmen infizierten. Wiederum ist der Effekt bei der Mutante ohne pCM2 stärker als bei *Cmm\_1624*. Mit dem Wilcoxon-Rangsummentest konnte in beiden Fällen der Unterschied als signifikant eingestuft werden (*Cmm1624*: p-Wert=0,04; *CMM101\_1624*: p-Wert=0,008). Der t-Test konnte nicht verwendet werden, da zum einen keine Normalverteilung (Shapiro-Test) und zum anderen bei dem Vergleich von *Cmm1624* mit *NCPPB382* auch keine Varianzhomogenität (F-Test) vorlag.

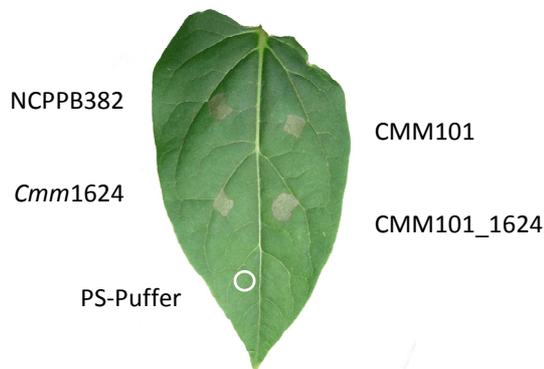


**Abbildung 5.18:** Median der Frischgewichte aller im Test 1 welkenden Pflanzen. Anzahl der welkenden Pflanzen: *NCPPB382* = 31, *Cmm1624* = 80, *CMM101* = 27, *CMM101\_1624* = 57. Der Unterschied zwischen den Mutanten und ihrem jeweiligen Kontrollstamm ist signifikant (Da keine Normalverteilung und keine Varianzhomogenität vorlagen, wurde mit dem Wilcoxon-Rangsummentest die Signifikanz überprüft. Tabelle 8.16, S. 175, im Anhang).

Da eine verringerte Kolonisationsfähigkeit, wie z.B. für die *ChpC*<sup>-</sup>-Mutante gezeigt (Gräfen, 2005), zu einer Verminderung der Symptomausprägung führen kann, wurde von je 15 mit den Mutanten und je 5 mit den Wildtypstämmen infizierten Pflanzen der Bakterientiter [cfu/g Frischgewicht<sub>Pflanze</sub>] bestimmt (Tabelle 8.17 im Anhang, S. 176). Es zeigte sich, dass lediglich *CMM101\_1624* einen leicht verringerten Titer von  $5,3 \times 10^9$  ( $\pm 1,7 \times 10^9$ ) aufwies. *CMM101*, *NCPPB382* und *Cmm1624* erzielten Titer von etwa  $1,7 \times 10^{10}$ . Der Unterschied zwischen *CMM101\_1624* und dem Kontrollstamm ist allerdings nicht signifikant. Auch in Wachstumstests der beiden *CMM\_1624*<sup>-</sup>-Mutanten in Vollmedium (TBY) und Minimalmedium trat kein Unterschied zwischen den Mutanten und *NCPPB382* oder *CMM101* auf (Daten nicht gezeigt).

Neben der Auslösung der bakteriellen Welke bei der Wirtspflanze *Solanum lycopersicum* ist es ein weiteres Charakteristikum von *Cmm* bei den Nichtwirtspflanzen *Mirabilis jalapa*, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun und *Nicotiana benthamiana* eine hypersensitive Reaktion (HR) hervorzurufen. Daher wurden Zellsuspensionen der beiden *CMM\_1624*<sup>-</sup>-Mutanten

sowie der beiden Kontrollstämme NCPPB382 und CMM101 in Blattgewebe dieser drei Pflanzenarten infiltriert und nach 2-3 Tagen überprüft, ob neben den Kontrollstämmen auch die Mutanten eine HR auslösen. Zur Kontrolle wurde jeweils auch der PS-Puffer, in dem die Zellen resuspendiert wurden, in die Blätter infiltriert.



**Abbildung 5.19:** Blatt von *Mirabilis jalapa* 3 Tage nach Infiltration mit verschiedenen *Cmm*-Stämmen und PS-Puffer. Der Bereich, in dem der PS-Puffer (Kontrolle) infiltriert wurde, ist mit einem weißen Kreis gekennzeichnet.

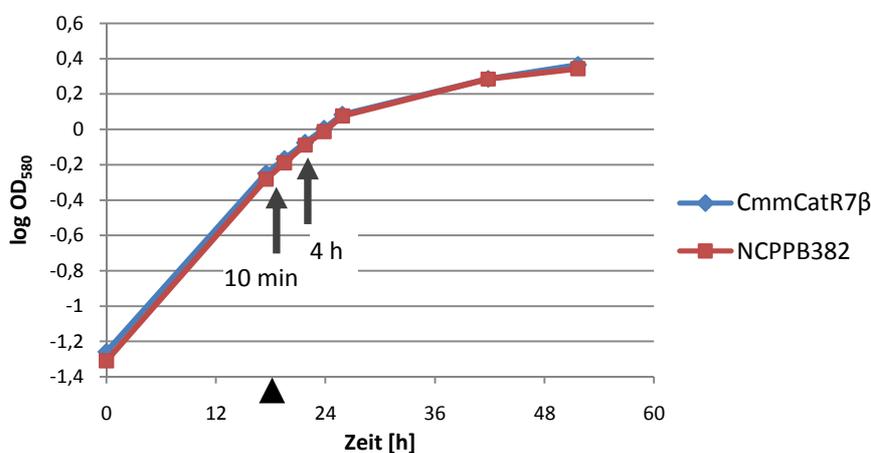
Wie in Abbildung 5.19 am Beispiel von *Mirabilis jalapa* zu sehen, ist bei diesem Test kein Unterschied zwischen den Stämmen zu erkennen. Auch bei *Nicotiana tabaccum* cv. Samsun und *Nicotiana benthamiana* lösten alle vier Stämme, aber nicht der zur Resuspendierung der Bakterien verwendete PS-Puffer eine HR aus (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Inaktivierung von CMM\_1624, insbesondere bei dem pCM2-freiem Derivat, zu einer abgeschwächten Virulenz führt. Es kann also angenommen werden, dass der Transkriptionsregulator CMM\_1624 direkt oder indirekt an der Regulation von Virulenzfaktoren beteiligt ist. Bei CMM101\_1624 konnte im Gegensatz zu der Mutante mit beiden Plasmiden eine leichte aber nicht signifikante Verringerung des Bakterientiters *in planta* nachgewiesen werden. Ob dies allerdings auf einer Verminderung der Kolonisationsfähigkeit basiert, muss in Zukunft genauer überprüft werden. Die Fähigkeit eine HR auszulösen ist bei keiner der Mutanten beeinträchtigt.

## 5.7 Einfluss von $\alpha$ -Tomatin auf die Genexpression

Pflanzen sind in der Lage, viele potentiell pathogene Organismen durch Abwehrreaktionen an einer erfolgreichen Infektion und Kolonisierung der Pflanze zu hindern. Neben physikalischen Barrieren, wie z.B. der Kutikula oder einer durch Lignifizierung verstärkten Zellwand, werden auch antimikrobielle Substanzen gebildet. Das von der Tomate synthetisierte membranaktive Saponin  $\alpha$ -Tomatin gehört z.B. neben Rishitin (Sesquiterpen) und Rutin (Flavonoid) zu diesen antimikrobiellen Substanzen. *Cmm* kann  $\alpha$ -Tomatin durch die sekretierte Tomatinase TomA (CMM\_0090) inaktivieren. Dabei hydrolysiert die Tomatinase  $\alpha$ -Tomatin zu Tomatidin und Lycotetraose, die keine membranaktive Wirkung aufweisen (Kaup, 2009; Kaup et al., 2005).

In diesem Experiment sollte überprüft werden, ob und welchen Einfluss  $\alpha$ -Tomatin auf die Genexpression von *Cmm* hat. Hierbei war von besonderem Interesse, ob diese zur Abwehr von Pathogenen gebildete Substanz direkt oder indirekt eine Anpassung von *Cmm* an seinen Wirt induziert. Des Weiteren sollte untersucht werden, inwiefern sich unter den gewählten Bedingungen das Expressionsprofil der *catR*<sup>-</sup>-Mutante (*CmmCatR7 $\beta$* , Mutation in CMM\_0089) von dem des Wildtypstamms unterscheidet. *catR*, welches in der *tomA*-Region lokalisiert ist und zwar in entgegengesetzter Orientierung direkt stromabwärts von *tomA* liegt, codiert für einen Transkriptionsregulator der LacI-Familie. Bisherige Untersuchungen einer *catR*<sup>-</sup>-Mutante und eines in *trans* mit einem intakten *catR* komplementierten Stamms dieser Mutante führten zu der Annahme, dass CatR die Expression von *tomA* positiv reguliert (Mayer, 2006; Winter, 2008; Kaup, 2009).



**Abbildung 5.20:** Wachskurve von NCPPB382 und *CmmCatR7 $\beta$*  in M9-Minimalmedium. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte an denen Proben für die RNA-Isolierung entnommen wurden. 10 min vor der ersten Probenentnahme wurde den Kulturen  $\alpha$ -Tomatin (Endkonzentration: 0,02 mM) hinzugegeben (schwarzes Dreieck). Eine von je drei unabhängigen Wachskurven ist exemplarisch dargestellt.

Zu je drei unabhängig voneinander angezogenen Kulturen von NCPPB382 bzw. *CmmCatR7 $\beta$*  in Minimalmedium wurde in der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{580} \approx 0,5$ )  $\alpha$ -Tomatin in der Konzentration (Endkonzentration: 0,02 mM) zugegeben, die zu einer Induktion der Tomatinase in *Cmm* führt (Kaup, 2009). 10 min (18,3 h nach Animpfen des Minimalmediums) und 4 h ( $OD_{580} \approx 0,8$ ) nach der  $\alpha$ -Tomatinzugabe wurden Proben für die RNA-Isolierung

entnommen (Abbildung 5.20). Zusätzlich wurde die RNA von NCPPB382 und *CmmCatR7 $\beta$*  aus einer unbehandelten Minimalmediumkultur in der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{580} \approx 0,5$ ; 18,4 h nach Animpfen des Mediums) isoliert.

Um den Effekt von Tomatin auf den Wildtypstamm zu untersuchen (Tomatin<sub>10min</sub> und Tomatin<sub>4h</sub>), wurde jeweils die cDNA einer mit  $\alpha$ -Tomatin behandelten Probe mit der cDNA einer unbehandelten NCPPB382-Kultur gegen den Cmm3kOLI-Microarray hybridisiert. Zum Vergleich des Expressionsmusters der *catR*<sup>-</sup>-Mutante mit dem des Wildtypstamms wurden die cDNAs der *catR*<sup>-</sup>-Mutante mit den cDNAs identisch behandelter Proben von NCPPB382 gegen den Microarray hybridisiert (CatR<sub>M9</sub>, CatR<sub>Tomat10min</sub>, CatR<sub>Tomat4h</sub>).

### 5.7.1 Expressionsprofil von NCPPB382 nach Zugabe von $\alpha$ -Tomatin

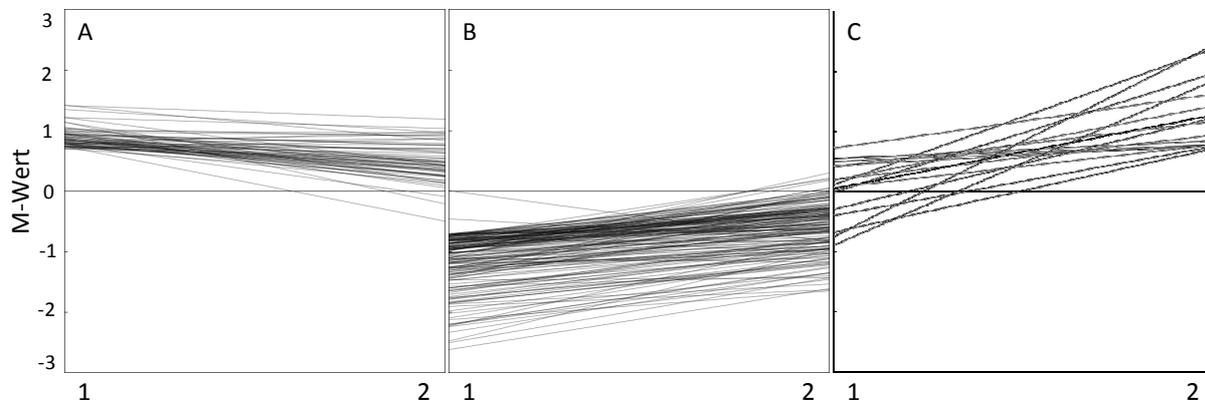
Die Kultivierung von *Cmm* in Minimalmedium mit 0,02 mM  $\alpha$ -Tomatin führte zu einer differentiellen Genexpression von 12 (10 min nach  $\alpha$ -Tomatin-Zugabe, Tabelle 5.13) bzw. 87 Genen (4 h nach Zugabe von  $\alpha$ -Tomatin; Tabelle 8.18 im Anhang). Acht der nach kurzer Inkubation mit  $\alpha$ -Tomatin differentiell exprimierten Gene waren der Gruppe IV zuzuordnen. Sieben dieser Gene codieren für Peptid- ( $M \geq 0,7$ ) oder Zucker-Transporter ( $M \leq -0,7$ ). Das achte Gen, CMM\_1365 ( $M = -0,71$ ) codiert für eine intrazelluläre membranassoziierte Serinprotease. Zwei reprimierte Gene waren dem Pentosephosphatweg (Gruppe I) zuzuordnen, zwei Gene, die für eine nicht näher charakterisierte Oxidoreduktase und ein Membranprotein (Gruppe V) codierten, waren induziert. Alle bei Tomatin<sub>10min</sub> differentiell exprimierten Gene sind sortiert nach der Gruppe, der sie zugeordnet sind, in Tabelle 5.13 aufgeführt.

**Tabelle 5.13:** Differentiell exprimierte Gene des Experiments Tomatin<sub>10min</sub>. Schwellenwerte:  $A \geq 8,23$ ;  $p \leq 0,05$ ;  $n \geq 7$ ;  $M \geq |0,7|$ . Unterstrichene M-Werte: Mittels *real-time*-RT-PCR validierter Wert; Daten im Anhang (Tabelle 8.19, S.178).

GenDB-ID	Genname	mögliche Funktion	M-Wert
CMM_0877	<i>araD</i>	L-Ribulose-5-Phosphat-4-Epimerase (EC 5.1.3.4)	-0,87
CMM_0878	<i>araA</i>	L-Arabinose-Isomerase (EC 5.3.1.4)	-1,00
CMM_0271	-	Zucker ABC Transporter, Permease	-0,72
CMM_0880	-	Zucker ABC Transporter, ATPase	-0,72
CMM_0881	-	Zucker ABC Transporter, Permease	-0,77
CMM_0866	-	$\alpha$ -Glucosid ABC Transporter, Substratbindeprotein	<u>-1,19</u>
CMM_0867	-	$\alpha$ -Glucosid ABC Transporter, Permease	-0,91
CMM_1365	-	membranassoziierte Serin-Protease, Subfamilie S1C (EC 3.4.21.-)	-0,71
CMM_0956	-	Peptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	0,84
CMM_0959	-	Peptid ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	0,70
CMM_0530	-	Oxidoreduktase	0,78
CMM_0556	-	Membranprotein	0,92

Nach 4-stündiger Inkubation mit  $\alpha$ -Tomatin waren im Vergleich zu unbehandelten Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase 33 Gene, die für ribosomale Proteine codieren, sowie 7 weitere Gene aus der Gruppe Informationsspeicherung und -prozessierung (46 % aller differentiell exprimierten Gene) reprimiert. 16 % bzw. 13 % der differentiell exprimierten Gene waren den Gruppen "Metabolismus" bzw. "Schlecht/kaum charakterisiert" zuzuordnen, 24 % der Gruppe IV.

Der hohe Anteil an reprimierten Genen, die für ribosomale Proteine codieren, lässt darauf schließen, dass aufgrund der Versuchsanordnung auch wuchsphasenabhängig exprimierte Gene nachgewiesen wurden. Um möglichst nur die Gene, die durch  $\alpha$ -Tomatin induziert oder reprimiert wurden, zu betrachten, wurde eine Clusteranalyse mit dem Datensatz zum Vergleich der Expressionsmuster spät-logarithmischer und logarithmischer Zellen (5.3.2) vorgenommen. Für das hierarchische Clustering wurden nur Gene verwendet die in einem der beiden Experimente die Kriterien für A, p und n erfüllten und einen M-Wert  $\geq 0,7$  oder  $\leq -0,7$  aufwiesen. Gene, die bei beiden Experimenten induziert oder reprimiert waren, konnten in Cluster A und B zusammengefasst werden (Abbildung 5.21). Lediglich 14 Gene (Cluster C) wiesen nur bei dem Tomatin-Experiment eine signifikant erhöhte Genaktivität auf. Die Gene aus Cluster C sowie ein Gen aus Cluster B (CMM\_1372; hypothetisches Membranprotein), das nur bei Tomatin<sub>4h</sub> eine reduzierte Transkriptmenge aufwies, wurden demnach als durch Inkubation mit  $\alpha$ -Tomatin differentiell exprimierte Gene betrachtet (Tabelle 5.14).



**Abbildung 5.21:** Resultat des hierarchischen Clusterings zur Identifizierung wuchsphasenabhängig differentiell exprimierter Gene. Verglichen wurden die M-Werte des in 5.3.2 beschriebenen wuchsphasenabhängigen Experiments (spät-logarithmische Zellen / logarithmische Zellen), mit **1** gekennzeichnet, und die M-Werte des Tomatin<sub>4h</sub>-Experiments (**2**). Für das Clustering wurden nur Gene verwendet, die mindestens bei einem Experiment die Kriterien für A, p und n erfüllten und einen M-Wert  $\geq 0,7$  oder  $\leq -0,7$  aufwiesen. Das Clustering, bei dem die euklidische Distanz verwendet wurde, wurde mit der Genesis Software durchgeführt (Sturn et al., 2002).

Es muss allerdings auch beachtet werden, dass die Expression von Genen sowohl durch die Wachstumsphase als auch durch  $\alpha$ -Tomatin beeinflusst werden kann. Um zumindest einen Teil dieser Gene mit in die Analyse einzubeziehen, wurden die Daten von Tomatin<sub>4h</sub> mit denen von Tomatin<sub>10min</sub> verglichen. Alle Gene, die unter beiden Bedingungen eine signifikant veränderte Genaktivität aufwiesen, wurden in die Analyse von Tomatin<sub>4h</sub> mit einbezogen (Tabelle 5.14).

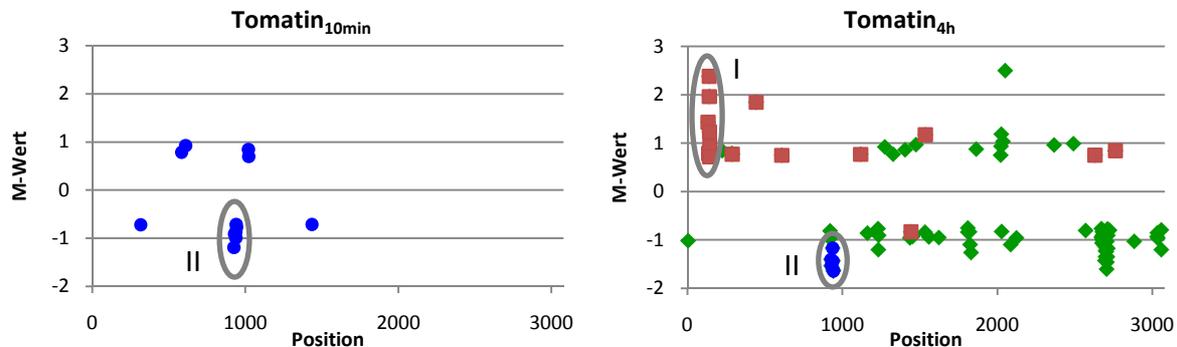
**Tabelle 5.14:** In Gegenwart von  $\alpha$ -Tomatin (Tomatin<sub>4h</sub>) differentiell exprimierte Gene. **Fett:** Gene, die keinen wuchsphasenbedingten Effekt zeigten. **Nicht fett:** Gene, die bei Tomatin<sub>10min</sub> den gleichen Trend aufwiesen. Die Gene sind jeweils nach der Gruppe, der sie zugeordnet sind, sortiert. Unterstrichen: Mittels *real-time*-RT-PCR validierte Werte; Daten im Anhang (Tabelle 8.19, S.178).

GenDB-ID	Genname	Funktion	M-Wert
<b>CMM_0099</b>	<i>bglE</i>	$\beta$ -Galactosidase/ $\beta$ -Glucuronidase	0,78
<b>CMM_0100</b>	<i>bglF</i>	$\beta$ -Glucosidase, Glycosyl-Hydrolase-Familie 3 (EC 3.2.1.-)	<u>2,38</u>
<b>CMM_0102</b>	<i>bglH</i>	$\beta$ -Galactosidase (EC 3.2.1.23)	1,23
<b>CMM_0103</b>	<i>bglI</i>	$\beta$ -Xylosidase, Glycosyl-Hydrolase-Familie 43 (EC 3.2.1.37)	<u>1,97</u>
<b>CMM_0105</b>	<i>ramA</i>	$\alpha$ -Rhamnosidase (EC 3.2.1.40)	0,72
<b>CMM_1053</b>	-	Ribosom-assoziiertes Protein	0,77
<b>CMM_0095</b>	<i>cytB</i>	3Fe-4S Ferredoxin	<u>1,43</u>
<b>CMM_0396</b>	-	Na <sup>+</sup> Efflux ABC Transporter, Permease	1,85
<b>CMM_0104</b>	-	Zucker Permease (MFS Superfamilie)	0,94
<b>CMM_1466</b>	-	Monooxygenase	1,17
<b>CMM_0246</b>	-	hypothetisches Protein	0,77
<b>CMM_0556</b>	-	Membranprotein	0,75
<b>CMM_2540</b>	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	0,75
<b>CMM_2667</b>	-	konserviert hypothetisches Protein	0,84
<b>CMM_1372</b>	-	hypothetisches Membranprotein	-0,83
CMM_0877	<i>araD</i>	L-Ribulose-5-Phosphat-4-Epimerase (EC 5.1.3.4)	<u>-1,17</u>
CMM_0878	<i>araA</i>	L-Arabinose-Isomerase (EC 5.3.1.4)	-1,43
CMM_0880	-	Zucker ABC Transporter, ATPase	-1,65
CMM_0881	-	Zucker ABC Transporter, Permease	-1,63
CMM_0866	-	$\alpha$ -Glucosid ABC Transporter, Substratbindepotein	-1,53
CMM_0867	-	$\alpha$ -Glucosid ABC Transporter, Permease	-1,40

Nach Auftragung der M-Werte aller differentiell exprimierten Gene beider Experimente gegen deren Position auf dem Chromosom ist deutlich zu erkennen, dass durch eine längere Tomatin-Exposition insbesondere Gene in der *tomA*-Region (CMM\_0095: *cytB* bis CMM\_0105: *ramA*, Position: 134-144) induziert sind (in Abbildung 5.22 als Region I gekennzeichnet). Die Induktion dieser Gene war auch nach 12-stündiger Inkubation von NCPPB382 mit Tomatenblatthomogenat zu erkennen. Daher könnte die Induktion dieser Gene durch Tomatenblatthomogenat eventuell durch das darin enthaltene  $\alpha$ -Tomatin hervorgerufen worden sein.

Sowohl nach 10-minütiger als auch nach 4-stündiger Inkubation mit  $\alpha$ -Tomatin zeigten zudem Gene aus der Genregion II (CMM\_0866-CMM\_881, Position 926-947) ein auffälliges Expressionsmuster (Tabelle 5.14). Die Gene codieren für zwei ABC-Transporter (für einen Zucker: CMM\_0879-CMM\_0881, bzw. ein  $\alpha$ -Glucosid: CMM\_0866-CMM\_0867) sowie eine Isomerase (AraA) und eine Epimerase (AraD), die an der Umwandlung von L-Arabinose in D-Xylulose-5-P, welches in den Pentosephosphatweg eingeschleust werden kann, beteiligt sind. Eine Repression dieser Gene konnte sowohl nach Supplementierung des Mediums mit

Tomatenblatthomogenat als auch beim Übergang der Zellen in die stationäre Phase beobachtet werden. Daher wäre es möglich, dass es sich hier um eine generelle Reaktion auf verschiedenste Stimuli oder um eine spezifische Reaktion, die durch einen sekundären Effekt von Tomatenblatthomogenat und  $\alpha$ -Tomatin hervorgerufen wurde, handelt.



**Abbildung 5.22:** Auftragung der M-Werte gegen die Position des differenziell exprimierten Gens im Chromosom. **Blaue Kreise:** (auch) bei Tomatin<sub>10min</sub> differenziell exprimierte Gene; **Rote Quadrate:** bei Tomatin<sub>4h</sub> differenziell exprimierte Gene ohne wuchphasenabhängigen Effekt; **Grüne Raute:** wuchphasenabhängig und durch Tomatin<sub>4h</sub> differenziell exprimierte Gene. I: *tomA*-Genregion; II: Position 926-947.

Eine erhöhte Expression der Tomatinase (TomA) war weder 10 min noch 4 h nach Zugabe des  $\alpha$ -Tomatins zu der NCPPB382-Kultur festzustellen, obwohl die Aktivität dieses Enzyms im Kulturüberstand von *Cmm* nur gezeigt werden kann, wenn das Medium  $\alpha$ -Tomatin enthält (Kaup, 2009). Da die Funktionalität des verwendeten Substrats zuvor mit einem Enzymtest bestätigt werden konnte (Kaup, persönliche Mitteilung), war es erstaunlich, dass keine Induktion der Tomatinase festgestellt werden konnte. Möglicherweise könnte das verwendete M9-Minimalmedium (4 % Glucose als C-Quelle) eine Ursache hierfür sein. Standardmäßig wurde zur Gewinnung der Tomatinase aus Kulturüberstand von *Cmm* TBV-Medium (Vollmedium) verwendet. Wurde TBV- allerdings durch C-Medium (TBV mit 5 % Glucose) ersetzt, konnte keine Tomatinaseaktivität im Zellüberstand nachgewiesen werden (Kaup, persönliche Mitteilung). Glucose scheint also die Expression von *tomA* zu beeinflussen.

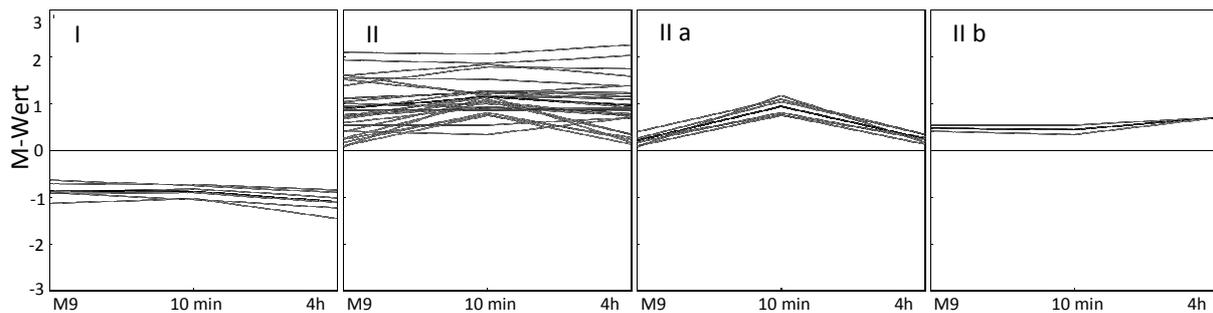
Sowohl 4 h nach Zugabe von  $\alpha$ -Tomatin als auch nach mehrstündiger Inkubation in Medium mit Tomatenblatthomogenat war eine Induktion vieler Gene aus der *tomA*-Region festzustellen, die zusammen mit der direkt benachbarten *chp*-Region eine Pathogenitätsinsel ( $\approx$  129 kb) darstellt, einen niedrigen GC-Gehalt aufweist und von *direct repeats* flankiert wird. Ein NCPPB382-Derivat, CMM101 $\beta$ 330-18, dem die komplette *chp/tomA*-Region fehlt, ist massiv in der Kolonisationsfähigkeit eingeschränkt und löst keine Krankheitssymptome bei der Tomate aus (Gartemann et al., 2008; Schott, 2004). Die Inaktivierung einzelner Gene (*chpC*, *ppaA*, *ppaC*) dieser Region führte ebenfalls zu einer verringerten Kolonisationsfähigkeit und Virulenz. Der Effekt war allerdings nicht so drastisch wie bei CMM101 $\beta$ 330-18 (Schott, 2004; Stork et al., 2008; Abt & Eichenlaub, unveröffentlicht). Folglich können auch weitere Gene dieser Region von Bedeutung für die Kolonisierung der Tomate und der Auslösung der Krankheitssymptome sein. Die *tomA*-Region, deren Gene hauptsächlich für

Proteine codieren, die an der Aufnahme und dem Metabolismus von Kohlenhydraten beteiligt sind, könnte einen besonderen Stellenwert in der Nutzung der wirtsspezifischen Nährstoffe haben und so eine effektive Besiedlung der Tomate ermöglichen. Insbesondere die Induktion der Gene *cytB*, *bglH*, *bglI* und *ramA*, die in *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Wirtspflanze Kartoffel) nicht identifiziert werden konnten, durch  $\alpha$ -Tomatin und eventuell auch durch weitere Substanzen des Tomatenblatthomogenats ist ein erstes Indiz für die Relevanz dieser Gene bezüglich der Verwertung wirtsspezifischer Substrate.

### 5.7.2 Expressionsprofil der Regulatormutante *CmmCatR7 $\beta$* im Vergleich zu NCPPB382

Die *catR*<sup>-</sup>-Mutante zeigte im Vergleich zu NCPPB382 eine um mindestens 1,6-fach ( $M \geq |0,7|$ ) veränderte Genexpression von 22 (*CatR*<sub>M9</sub>, Anzucht in M9-Minimalmedium), 33 (*CatR*<sub>Tomat10min</sub>, 10 min nach Zugabe von  $\alpha$ -Tomatin zu einer Kultur in Minimalmedium) und 29 Genen (*CatR*<sub>Tomat4h</sub>, 4 h nach der  $\alpha$ -Tomatin-Zugabe zu einer Kultur in Minimalmedium). Auffällig war, dass die Mehrzahl dieser Gene auf dem Plasmid pCM2 lokalisiert sind (mindestens 76 %) und unter allen Anzuchtbedingungen ausschließlich Gene (pCM2\_0027 bis pCM2\_0022), die zum *tra*-Operon gehören, bei der *catR*<sup>-</sup>-Mutante eine verringerte Genexpression aufwiesen. Alle übrigen Gene waren verstärkt exprimiert (Tabelle 8.20, im Anhang auf S. 179). Das *tra*-Operon (pCM2\_0027 bis pCM2\_0014) enthält Gene, die wahrscheinlich für Konjugationsproteine codieren. Für zwei dieser Gene, *trbL* (pCM2\_0024) und *traE* (pCM2\_0022), ist die Beteiligung an der Konjugation von pCM2 experimentell bewiesen. Ihre Inaktivierung (durch Insertion einer Antibiotikaresistenzgenkassette) sowie die Inaktivierung von *traA* (pCM2\_0013, Relaxase/Helicase), welches in entgegengesetzter Orientierung unmittelbar stromabwärts des *tra*-Operons lokalisiert ist, führte zum Verlust der Transferfähigkeit von pCM2 (Abt, 2008). Eine differentielle Expression von *tomA* konnte ebenso wie bei den beiden  $\alpha$ -Tomatin-Experimenten unter keiner der getesteten Bedingungen nachgewiesen werden.

Nach hierarchischem Clustering aller Gene (35 Gene), die mindestens unter einer der drei Bedingungen die jeweiligen Kriterien für A, p, n und M erfüllten, war gut zu erkennen, dass unter allen Versuchsbedingungen fast ausschließlich die gleichen Gene differentiell exprimiert waren (Abbildung 5.23). Cluster I (6 Gene) enthält die bereits erwähnten Gene des *tra*-Operons, in Cluster II sind die verbleibenden 29 Gene zusammengefasst, die in der *catR*<sup>-</sup>-Mutante eine erhöhte Genaktivität aufwiesen. 6 Gene, die nur nach 10 minütiger Inkubation in  $\alpha$ -Tomatin-haltigem Medium induziert waren und 2 Gene, die bei *CatR*<sub>Tomat4h</sub> die höchsten M-Werte aufwiesen, sind als Untergruppen von Cluster II, Cluster II a und b, besonders hervorgehoben. Weitere Informationen zu den Genen der einzelnen Cluster sind in Tabelle 8.21 (S. 179) zusammengestellt.



**Abbildung 5.23:** Resultat des hierarchischen Clusterings (euklidische Distanz) der Transkriptomdaten der Experimente mit der *catR*<sup>-</sup>-Mutante. **M9:** CatR<sub>M9</sub>, **10 min:** CatR<sub>Tomat10min</sub>, **4 h:** CatR<sub>Tomat4h</sub>. Berücksichtigt wurden alle Gene, für die mindestens unter einer Bedingung die Kriterien für die p-, n- und A-Werte erfüllt waren und für die:  $M \geq |0,7|$  zutrif (Liste aller Gene im Anhang S. 179, Tabelle 8.21). Cluster **II a** und **II b** sind Bestandteil von Cluster II. Das Clustering wurde mit der Genesis Software durchgeführt (Sturn et al., 2002)

Die Zugabe von  $\alpha$ -Tomatin führte zu einer transienten Induktion einer O-Acetylhomoserin(Thiol)-Lyase, einer Acyl-CoA-Dehydrogenase, des ECF-Sigmafaktors SigY, einer MFS-Permease und zweier Substratbindeproteine eines Peptid- und eines Metall-ABC-Transporters (Cluster II a, Tabelle 5.15). Nach 4 stündiger Kultivierung in  $\alpha$ -Tomatin-haltigem Medium wurde zusätzlich ein chromosomales Gen (CMM\_1107) und ein auf pCM2 lokalisiertes Gen induziert. Eine Funktion konnte keinem dieser Gene zugeordnet werden (Cluster II b, Tabelle 5.15).

**Tabelle 5.15:** Untergruppen des Clusters II, die hauptsächlich 10 min oder 4 h nach Zugabe von  $\alpha$ -Tomatin ein verändertes Expressionsprofil zeigten. \*: Schwellenwerte für A, p und/oder n über- bzw. unterschritten.

GenDB-ID	Gen-name	mögliche Funktion	M9	$\alpha$ -Tomatin 10 min	4 h
<b>Cluster II a</b>					
CMM_1336	<i>metY</i>	O-Acetylhomoserin(Thiol)-Lyase (EC 2.5.1.49)	* 0,10	0,75	* 0,28
CMM_1960	-	Peptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	0,40	1,10	* 0,35
CMM_2283	-	Metall ABC Transporter, Substratbindeprotein	0,26	1,05	0,34
CMM_1949	-	MFS Permease	0,24	0,76	* 0,14
CMM_0243	<i>sigY</i>	RNA-Polymerase Sigmafaktor, ECF-Subfamilie	* 0,17	0,80	* 0,23
CMM_1973	-	Acyl-CoA-Dehydrogenase	* 0,07	1,17	* 0,17
<b>Cluster II b</b>					
CMM_1107	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	0,54	0,54	0,70
pCM2_0061	-	hypothetisches Protein	0,41	0,35	0,71

Das CatR-Protein scheint in Minimalmedium unabhängig davon, ob dem Medium  $\alpha$ -Tomatin zugesetzt wurde, aktiv zu sein und direkt oder indirekt an der Regulation von mindestens 32 Genen beteiligt zu sein. Die regulierten Gene liegen mit Ausnahme von CMM\_PSEUDO\_0008 und \_0010 (codieren für zwei der drei Fragmente des Pseudogens *chpA*) auf dem Plasmid pCM2. 71 % der unter allen Bedingungen induzierten Gene wurden der Gruppe V (Schlecht/kaum charakterisiert) zugeordnet. Neben dem bereits erwähnten *chpA*-Gen waren mehrere Gene, die für ein Zelloberflächenprotein (*rhsA*, pCM2\_0035), ein Histon-ähnliches Protein (pCM2\_0036, das als Regulator ähnlich den DNA-strukturierenden Proteinen IHF bzw

HNs fungieren könnte,) sowie zwei extrazelluläre Serinproteasen codieren (*phpA*, *phpB*), induziert. Bei *phpA* und *phpB* handelt es sich um die plasmidcodierten Pat-1 homologen Serinproteasen. Aufgrund der nahen Verwandtschaft zu dem Virulenzfaktor Pat-1 könnten diese Proteine ebenfalls eine Bedeutung für die pathogene Interaktion haben. Diese hat vermutlich nur einen untergeordneten Stellenwert, da der virulente Phänotyp durch Einbringen dieser Gene *in trans* in den avirulenten Stamm CMM100 nicht wiederhergestellt werden konnte (Pieper, 2001).

### 5.7.2.1 Plasmidtransfer in der *catR*<sup>-</sup>-Mutante

Die Tatsache, dass die *catR*<sup>-</sup>-Mutante (*CmmCatR7β*) eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte Expressionsrate einiger Gene des *tra*-Operons von pCM2 aufweist, deutet darauf hin, dass die Konjugationsfähigkeit von pCM2 bei dieser Mutante eingeschränkt sein könnte. Daher wurde in Konjugationsexperimenten überprüft, ob eine Veränderung der Konjugationseffizienz von pCM2 festzustellen ist. Voraussetzung hierfür war zunächst, Donor und Rezipientenstämme mit geeigneten Selektionsmarkern zu erzeugen. Winter (2008) stellte in seiner Diplomarbeit mittels Elektroporation ein pCM2-freies Derivat der *catR*<sup>-</sup>-Mutante her (*CmmCatR7βpCM2*<sup>-</sup>) und konnte nach Konjugation mit CMM102<sub>Nm</sub> als Donor (CMM102 mit Neomycin-markiertem pCM2) Transkonjuganten isolieren, die ein markiertes pCM2 enthalten (Winter, 2008). Dieser Stamm *CmmCatR7βpCM2*<sub>Nm</sub> (NCPBP382, *catR::cmx*, pCM1, pCM2<sub>Nm</sub>) konnte nun als Donor zur Überprüfung der Konjugationseffektivität der *catR*<sup>-</sup>-Mutante eingesetzt werden.

Als Rezipient wurde bei bisherigen Konjugationsexperimenten eine CMM100 Mutante verwendet, die aufgrund der Insertion einer *cmx*-Kassette in ein Gen (*crtBI*) des Carotinoidbiosyntheseclusters im Gegensatz zum gelb gefärbten Wildtyp eine weiße Färbung aufweist (Abt, 2008). Dies hat den Vorteil, dass neben der Möglichkeit, den Rezipienten selektiv auf Chloramphenicol-haltigen Medien anzuziehen, Donor und Rezipient allein durch die unterschiedliche Färbung voneinander unterschieden werden können. Da die *catR*<sup>-</sup>-Mutante ebenfalls das Resistenz vermittelnde Gen *cmx* enthält, war es notwendig einen Rezipienten mit einem anderen Resistenzmarker zu verwenden. Andernfalls wäre keine selektive Anzucht der Transkonjuganten möglich gewesen. Nach Anzucht der weißen Chloramphenicol-resistenten Mutante auf Streptomycin-haltigem Medium konnte Winter (2008) eine spontan Streptomycin-resistente Mutante isolieren. Diese Mutante wies nun alle Eigenschaften auf, um bei einem Konjugationsexperiment mit der modifizierten *catR*<sup>-</sup>-Mutante (*CmmCatR7βpCM2*<sub>Nm</sub>) Donor (**gelb**, chromosomal codierte Chloramphenicol-Resistenz, **pCM2 codierte Neomycin-Resistenz**), Rezipient (**weiß**, **chromosomal codierte Chloramphenicol- und Streptomycin-Resistenz**) und Transkonjugant (**weiß**, **chromosomal codierte Chloramphenicol- und Streptomycin-Resistenz; pCM2 codierte Neomycin-Resistenz**) selektiv anziehen zu können.

Bei ersten Konjugationsexperimenten konnte allerdings keine Verminderung der Konjugationsfähigkeit der *catR*<sup>-</sup>-Mutante gezeigt werden (Winter, 2008). Bei diesen unter Standardbedingungen (Abt, 2008) durchgeführten *filter-mating*-Experimenten wurde im

Gegensatz zu den Kultivierungsbedingungen für die Microarrayexperimente C-Medium (Vollmedium mit 5 g/l Glucose) statt M9-Medium (Minimalmedium mit 4 g/l Glucose) verwendet. Da die Expression der Transfgene auch von dem Medium abhängen kann, wurden im Rahmen dieser Arbeit Konjugationsexperimente mit M9-Minimalmedium (für die Anzucht von Donor und Rezipient und als Festmedium für das *filter-mating*) durchgeführt. In vorangegangenen Arbeiten konnte Abt (2008) bereits zeigen, dass das verwendete Medium generell einen Einfluss auf die Konjugationsrate hat: So war ein Plasmidtransfer mittels Konjugation *in vitro* nur durch Zusatz von Glucose oder anderen Zuckern zum Vollmedium möglich. *Filter-mating*-Experimente auf Minimalmedium wurden bislang nicht durchgeführt (Abt, 2008).

Die *filter-mating*-Experimente wurden mit *CmmCatR7βpCM2<sub>Neo</sub>* als Donor und *CMM100white<sub>Cm/Sm</sub>* als Rezipient und zur Kontrolle mit *CMM102<sub>Nm</sub>* (Donor) und *CMM100white<sub>Cm</sub>* (Rezipient) durchgeführt. Alle Stämme wurden in Minimalmedium bis zu einer  $OD_{580}$  von 0,9-1,1 angezogen, die Kulturen ankonzentriert ( $7 \times 10^8$  Zellen/100  $\mu$ l) und Donor und Rezipient im Verhältnis 1:1 gemischt. Je 200  $\mu$ l der Ansätze wurden auf je 3 Nitrocellulosefilter aufgebracht, die auf M9-Minimalmedium-Platten auflagen. Die Zellen wurden nach 20-stündiger Inkubation bei 26°C vom Filter abgeschwemmt, geeignete Verdünnungsstufen dieser Suspensionen auf entsprechende Selektionsplatten (C-Medium) ausplattiert und nach 3-5 tägiger Inkubation bei 26°C der Titer von Donor, Rezipient und Transkonjugant bestimmt. Parallel zu diesem Experiment wurden aus denselben TBY-Kulturen, die zur Inokulation des Minimalmediums verwendet wurden, Proben für Konjugationsexperimente auf C-Medium-Platten entnommen. Für diese Experimente wurden nach dem standardisierten Protokoll  $1,5 \times 10^8$  Zellen (je  $7,5 \times 10^7$  Zellen von Donor und Rezipient) auf die Nitrocellulosefilter aufgebracht und ebenfalls für 20 h bei 26°C inkubiert. Bei den Ansätzen mit Minimalmedium wurde eine etwa 10-mal so hohe Zellmenge aufgebracht, um sicherzustellen, dass der für die Konjugation erforderliche Zell-Zellkontakt möglich ist. Dies scheint mit der normalerweise eingesetzten Zellmenge nicht möglich zu sein, da sich bei Vorversuchen mit *CMM102<sub>Nm</sub>* und *CMM100white<sub>Cm</sub>* herausstellte, dass nach 20-stündiger Inkubation von auf Minimalmedium aufgebrachten Filtern maximal die gleiche Menge an Donor und Rezipient reisoliert werden konnte wie zum Zeitpunkt  $t_0$  auf den Filter aufgebracht wurde. Die Zellen können unter diesen Bedingungen offensichtlich nicht oder nur sehr langsam replizieren.

Die Konjugationsexperimente auf C-Medium-Platten (Tabelle 5.16) bestätigten die Daten von Winter (Winter, 2008). Sowohl die *catR<sup>-</sup>*-Mutante als auch *CMM102<sub>Nm</sub>* transferierten *pCM2<sub>Nm</sub>* mit einer Transferhäufigkeit [Transkonjugant / reisoliertem Rezipienten] von  $1,87 \times 10^{-5}$  bzw.  $1,06 \times 10^{-5}$ . *CmmCatR7βpCM2<sub>Nm</sub>* kann *pCM2<sub>Nm</sub>* also trotz Inaktivierung von *catR* ebenso effizient wie *CMM102<sub>Nm</sub>* transferieren. Wurde die *catR<sup>-</sup>*-Mutante zusammen mit seinem Rezipienten allerdings auf Minimalmedium inkubiert, konnten keine Transkonjuganten isoliert werden (Tabelle 5.16). Auch bei dem Kontrollansatz (*CMM101<sub>Nm</sub>* / *CMM100white<sub>Cm</sub>*) war die Transferhäufigkeit 10-mal so gering wie auf C-Medium, dennoch wurden pro Filter etwa 550 Transkonjuganten nachgewiesen. Betrachtet man den Titer der reisolierten *catR<sup>-</sup>*-Mutante, fällt auf, dass dieser mehr als 2000-mal geringer war als der von

CMM102<sub>Nm</sub>. Verglichen mit der ursprünglich auf den Filtern aufgetragenen Donormenge ( $7 \times 10^8$ ) konnten nur 0,03 % dieser Zellen nach 20-stündiger Inkubation reisoliert werden. Im Gegensatz dazu teilte sich der Rezipient (CMM100white<sub>Cm/Sm</sub>) in dieser Zeit offenbar fast 3 Mal und erreichte im Mittel einen Titer von  $2,11 \times 10^9$  cfu/ml (2,53 Bakterien/Filter). Donor und Rezipient des Kontrollansatzes auf Minimalmedium vermehrten sich nicht, allerdings wurden 77,8 % (CMM102<sub>Nm</sub>) und 44,0 % (CMM100white<sub>Cm</sub>) der ursprünglich eingesetzten Zellen reisoliert.

**Tabelle 5.16:** Überprüfung der Konjugationsfähigkeit der *catR*<sup>-</sup>-Mutante auf C-Medium und Minimalmedium. Titer von Donor, Rezipient und Transkonjugant sind in cfu/ml angegeben, die Transferhäufigkeit in Transkonjugant / reisolierendem Rezipienten. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von 3 Filtern. Für die Titer sind die Standardabweichungen ( $\pm$ ) angegeben. Die Bakterienmenge pro Filter kann mit  $1,2 \text{ ml} \times \text{Titer [cfu/ml]}$  berechnet werden.

	Konjugationsansatz	Donor	Rezipient	Transkonjugant	Transferhäufigkeit
C-Medium	CmmCatR7 $\beta$ pCM2 <sub>Nm</sub> x CMM100white <sub>Cm/Sm</sub>	$6,61 \times 10^8$ $\pm 0,28 \times 10^8$	$6,11 \times 10^9$ $\pm 0,42 \times 10^9$	$1,14 \times 10^5$ $\pm 0,26 \times 10^5$	$1,87 \times 10^{-5}$
	CMM102 <sub>Nm</sub> x CMM100white <sub>Cm</sub>	$3,65 \times 10^9$ $\pm 0,24 \times 10^9$	$4,40 \times 10^9$ $\pm 0,32 \times 10^9$	$4,78 \times 10^4$ $\pm 2,71 \times 10^4$	$1,06 \times 10^{-5}$
M9-Medium	CmmCatR7 $\beta$ pCM2 <sub>Nm</sub> x CMM100white <sub>Cm/Sm</sub>	$2,01 \times 10^5$ $\pm 0,22 \times 10^5$	$2,11 \times 10^9$ $\pm 0,93 \times 10^9$	< 1	-
	CMM102 <sub>Nm</sub> x CMM100white <sub>Cm</sub>	$4,54 \times 10^8$ $\pm 0,57 \times 10^8$	$2,57 \times 10^8$ $\pm 0,28 \times 10^8$	$2,98 \times 10^2$ $\pm 1,28 \times 10^2$	$1,16 \times 10^{-6}$

Auch bei einem Testansatz auf Minimalmedium mit CMM102<sub>Nm</sub> als Donor und CMM100white<sub>Cm/Sm</sub> als Rezipient (Daten nicht gezeigt) konnten 78,3 % des Donors reisoliert werden. Ähnlich wie bei dem Konjugationsansatz mit der *catR*<sup>-</sup>-Mutante teilte sich der Rezipient auch bei diesem Ansatz etwas mehr als 2 Mal und erreichte einen Titer von  $1,44 \times 10^9$  cfu/ml ( $1,72 \times 10^9$  Bakterien/Filter). Auch bei diesem Experiment war es möglich Transkonjuganten ( $6 \times 10^3$  cfu/ml; Transferhäufigkeit:  $4,2 \times 10^{-6}$ ) zu isolieren.

Trotz Inaktivierung von *catR* kann *Cmm* pCM2 mittels Konjugation unter Standardbedingungen ebenso effizient auf einen Rezipientenstamm transferieren wie der Vergleichsstamm CMM102<sub>Nm</sub>. Wurde statt TBY (Anzucht der Stämme vor der Konjugation) bzw. C-Medium (Festmedium, auf das die Filter aufgebracht werden) M9-Minimalmedium verwendet, konnten im Gegensatz zum Kontrollansatz keine Transkonjuganten isoliert werden. Allerdings stellte sich heraus, dass nur noch 0,03 % der pro Filter eingesetzten Donorzellen nach Abschwemmen des Filters kultiviert werden konnten, obwohl

*CmmCatR7βpCM2<sub>Nm</sub>* als Reinkultur in flüssigem und auf festem Minimalmedium das gleiche Wuchsverhalten wie die anderen für die Konjugation verwendeten Stämme zeigte. Die Konjugationsfähigkeit der *catR*<sup>-</sup>-Mutante auf Minimalmedium konnte folglich nicht untersucht werden. Es stellt sich aber die Frage, warum die Vitalität der *catR*<sup>-</sup>-Mutante unter den gewählten Versuchsbedingungen (Minimalmedium) so stark beeinträchtigt wurde.

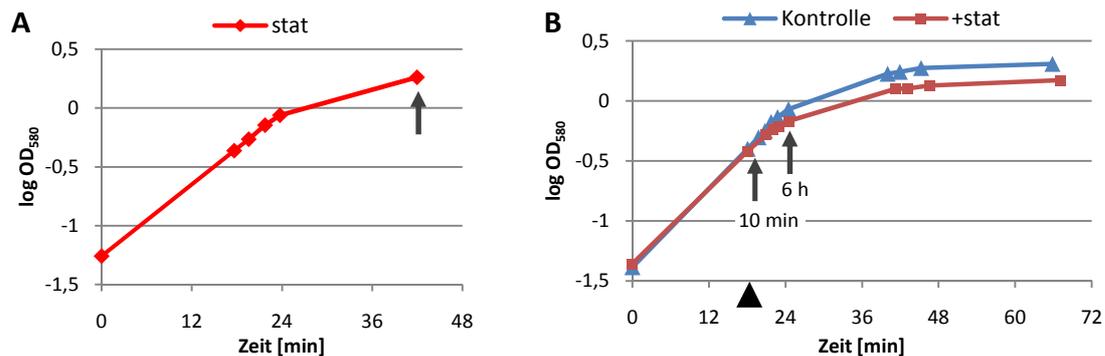
## 5.8 Untersuchung einer möglicherweise Populationsdichte-abhängigen Expression von Virulenzfaktoren

Bei einigen pathogenen Organismen ist bekannt, dass die Expression von Pathogenitätsfaktoren mittels *Quorum-Sensing*, also in Abhängigkeit von der Populationsdichte, reguliert wird. Auch bei *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* wäre es denkbar, dass *Quorum-Sensing* ein Regulationsmechanismus ist, der bei der Interaktion mit der Tomate von Bedeutung ist. So war häufig festzustellen, dass der Bakterientiter von Pflanzen, die 4 Wochen nach Infektion mit dem Wildtypstamm nur geringe Welkesymptome aufwiesen, niedriger war als der von stark welkenden Pflanzen. Betrachtet man ein typisches Welkediagramm von Pflanzen, die zwei Wochen nach Aussaat mit NCPPB382 infiziert wurden (Abbildung 5.16 A), ist zu erkennen, dass nach 4-5 Tagen einzelne Pflanzen leicht welken und erst nach 11 Tagen die Hälfte der Pflanzen deutliche Welkesymptome zeigt. Aufgrund dieser Beobachtungen kann vermutet werden, dass *Cmm* sich zunächst in der Tomatenpflanze vermehrt und erst ab einer bestimmten Zelldichte die Gene exprimiert, die letztlich zur Ausbildung der Krankheitssymptome führen. Des Weiteren sind alle bislang untersuchten *Cmm*-Mutanten, die *in planta* einen im Vergleich zum Wildtyp 100- bis  $10^6$ -fach reduzierten Titer erreichen (CMM101*chpC* $\beta$ , CMM101 $\beta$ 330-18), avirulent oder lösen nur vereinzelt schwache Welkesymptome aus (Schott, 2004; Gräfen, 2005).

Um zu überprüfen, ob zu Beginn der stationären Phase *Quorum-Sensing*-Signale (Peptide oder andere Substanzen deren Konzentration in dieser Wachstumsphase einen kritischen Wert überschritten haben) eine differentielle Genexpression bewirken, wurden NCPPB382-Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase in den Überstand einer stationären Kultur transferiert. Das Transkriptionsprofil dieser Kultur wurde 10 min und 6 h nach der Behandlung mit dem einer parallel beimpften Kontrollkultur verglichen.

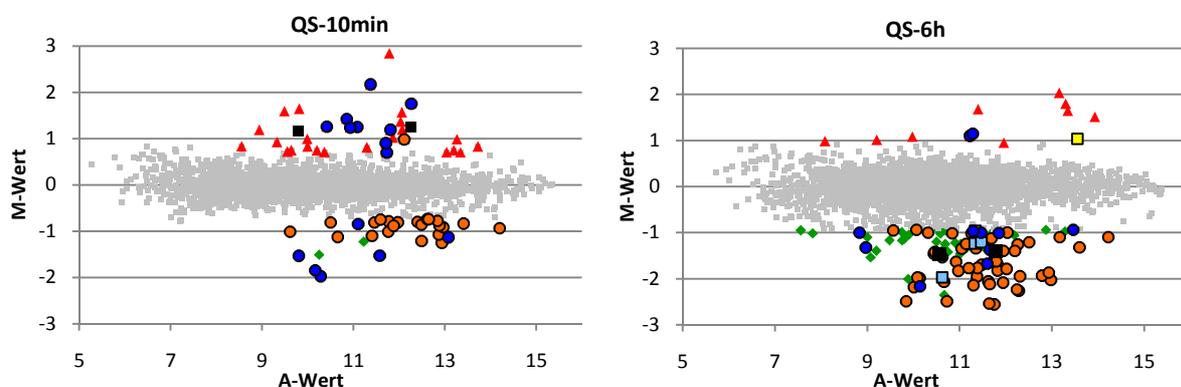
Der Überstand aus der stationären Wachstumsphase wurde nach 42 stündiger Anzucht von NCPPB382 in M9-Minimalmedium (Abbildung 5.24, A) gewonnen und direkt zur Resuspendierung logarithmischer Zellen (18 h nach Beimpfen des Mediums, Abbildung 5.24, B) verwendet. Die Zellen einer zweiten logarithmischen Kultur dienten als Kontrolle und wurden nach Zentrifugation in ihrem ursprünglichen Überstand resuspendiert. 10 min und 6 h nach Resuspendierung der Zellen und weiterer Kultivierung bei 26°C wurden Proben für die RNA-Isolierung entnommen. Verglichen wurden jeweils die Expressionsprofile von Probe und Kontrolle 10 min bzw. 6 h nach Zentrifugation und Resuspendierung der Zellen in den entsprechenden Überständen. Die Experimente werden im Folgenden als QS-10min und QS-6h bezeichnet. Für QS-10min wurden 4, für QS-6h 3 biologische Replikate verwendet.

In Abbildung 5.24 ist deutlich zu erkennen, dass der Transfer von Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase in präkonditioniertes Medium (Überstand einer stationären Kultur) spätestens nach 4,5 h (5. Messpunkt Abbildung 5.24, B) zu einer deutlichen Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit führte und im Vergleich zu den Kontrollkulturen eine maximale  $OD_{580}$  von nur 1,5 (unter Kontrollbedingungen  $OD_{580} = 2,0$ ) erreicht wurde. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf den verringerten Nährstoffgehalt des „stationären Überstands“ zurückzuführen.



**Abbildung 5.24:** Wachskurven der für QS-10min und QS-6h verwendeten NCPPB382-Kulturen in Minimalmedium. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Kultur (Start- $OD_{580} \approx 0,05$ ) der 4 biologischen Replikate. **A:** Kultur zur Gewinnung des stationären Überstands. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt, an dem die Kultur zentrifugiert wurde. **B:** Wachskurven der für das Microarrayexperiment verwendeten Kulturen. **Kontrolle:** Nach Zentrifugation im ursprünglichen Überstand resuspendiert. **+stat:** Nach Zentrifugation im sterilfiltrierten, stationären Überstand (A) suspendiert. Die Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Probenentnahmen, das schwarze Dreieck den Zeitpunkt zu dem die Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase in den jeweiligen Medien suspendiert wurden.

Unter den gewählten Bedingungen zeigten 63 (QS-10min, mit  $M \geq |0,7|$ ) bzw. 108 (QS-6h, mit  $M \geq |0,93|$ ) Gene eine differentielle Genexpression. 10 min nach Suspendierung der Zellen in die jeweiligen Überstände waren 32 Gene induziert und 31 reprimiert (QS-10min, mit  $M \geq |0,7|$ ). 6 h nach dieser Behandlung war eine Induktion von 11 und eine Repression von 95 Genen festzustellen (Tabelle 8.23, im Anhang S. 182).

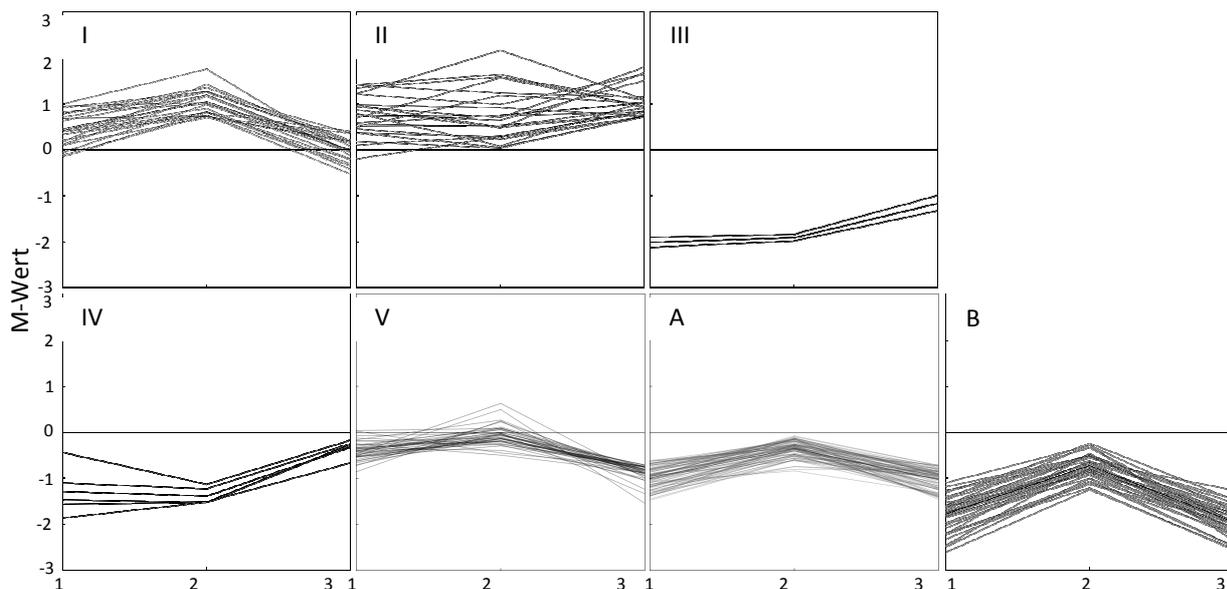


**Abbildung 5.25:** Scatterplots zu QS-10min und QS-6h. Grüne Rauten: reprimierte Gene, rote Dreiecke: induzierte Gene, orange Kreise: Gruppe Informationsspeicherung und -prozessierung, blaue Kreise: Transporter, schwarze Quadrate: Regulatoren, gelbe Quadrate: extrazelluläre Enzyme, graue Quadrate: nicht differentiell exprimierte Gene. Schwellenwerte:  $p \leq 0,05$ ; QS-10min:  $A \geq 7,65$ ,  $n \geq 9$ ,  $M \geq |0,7|$ ; QS-6h:  $A \geq 7,99$ ,  $n \geq 7$ ,  $M \geq |0,93|$ . Daten von 3 (QS-6h) bzw. 4 biologischen Replikaten (QS-10min).

Besonders auffällig war, wie bereits im Scatterplot (Abbildung 5.25) dargestellt, dass 35 % (QS-10min) bzw. 44 % (QS-6h) aller Gene zur Gruppe III (Informationsspeicherung und Prozessierung) gehörten und ein verringertes Expressionslevel aufwiesen. Lediglich ein Gen der Gruppe III, *prfA* (CMM\_1157, *peptide chain release factor 1*), war bei QS-10min induziert, zeigte aber bei QS-6h keine differentielle Expression. Der hohe Anteil reprimierter Gene der Gruppe III war insbesondere nach 6-stündiger Anzucht in dem „stationären Überstand“ zu

erwarten, da zu diesem Zeitpunkt bereits eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit festgestellt wurde. Allerdings war die Repression von 22 Genen dieser Gruppe schon nach 10 min nachweisbar, was zeigt, dass *Cmm* sehr schnell auf ein reduziertes Nährstoffangebot reagiert.

Um möglichst nur die Gene herauszufiltern, die aufgrund eines vermuteten *Quorum-Sensing*-Signals und nicht durch ein limitiertes Nährstoffangebot differentiell exprimiert waren, wurde eine Clusteranalyse (hierarchisches Clustering) der QS-Daten zusammen mit den Daten aus dem wuchsphasenabhängigem Experiment (5.3.2, S. 66) durchgeführt (Abbildung 5.26). Hierbei wurden alle 205 Gene berücksichtigt, die bei QS-10min bzw. QS-6h die Kriterien für  $p$ ,  $A$  und  $n$  erfüllten und für die ein M-Wert  $\geq |0,7|$  gemessen wurde. In Cluster A und B sind Gene eingruppiert, die hauptsächlich nach 6-stündiger Kultivierung in stationärem Überstand bzw. in einer Kultur aus der spät-logarithmischen Wachstumsphase reprimiert waren. Darunter sind zu 59 % Gene aus den Gruppen Informationsspeicherung und -prozessierung, des Energie- und Kohlenstoffmetabolismus sowie zugehöriger Transporter (Tabelle 8.23, S. 182). Daraus lässt sich schließen, dass in diesen Clustern überwiegend Gene enthalten sind, deren Expression durch die Limitierung von Nährstoffen reprimiert wurde.



**Abbildung 5.26:** Hierarchisches Clustering der Daten des wuchsphasenabhängigen Experiments (1, siehe Textmarke 5.3.2, S. 66) und der beiden *Quorum-Sensing* Experimente (2: QS-10min, 3: QS-6h). Nähere Informationen zu den Genen der einzelnen Cluster befinden sich in Tabelle 5.17 und im Anhang in Tabelle 8.25 und Tabelle 8.26. Das Clustering, bei dem die euklidische Distanz verwendet wurde, wurde mit der Genesis Software durchgeführt (Sturn et al., 2002).

Die Gene aus Cluster I, III, IV und z.T. auch aus Cluster II (Tabelle 5.17) zeigten hingegen insbesondere nach 10-minütiger Inkubation in stationärem Überstand eine Induktion (Cluster I, bei Cluster II: CMM\_0183, CMM\_1336, CMM\_1406, CMM\_1960 und CMM\_2358) bzw. eine Repression (Cluster III und IV). Bei diesen Genen besteht folglich die Möglichkeit, dass sie durch ein Signalmolekül im Überstand der stationären Kultur reguliert werden.

**Tabelle 5.17:** Cluster I, II' (ausgewählte Gene des Clusters II), III, IV des hierarchischen Clusterings der QS-Experimente und des wuchsphasenabhängigen Experiments. Die hier aufgeführten Gene des Clusters II zeigen im Vergleich zu den anderen Bedingungen bei QS-10min die stärkste Induktion. Die Gene sind nach ihrer Zugehörigkeit zu den Gruppen I bis V und nach ihrer GenDB-ID sortiert. Unterstrichene M-Werte: Mittels *real-time*-RT-PCR validierte Werte (Tabelle 8.24 im Anhang, S. 183).

GenDB-ID	Gen-name	Funktion	spät log	QS	
				10 min	6 h
<b>Cluster I</b>					
CMM_1744	<i>gapA</i>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	* -0,15	0,83	-0,30
CMM_0184	<i>metE1</i>	Methionin-Synthase II (EC 2.1.1.14)	0,40	0,75	-0,35
CMM_2400	-	O-Acetylhomoserin(Thiol)-Lyase (EC 2.5.1.49)	0,42	0,81	0,41
CMM_1788	<i>acsA2</i>	Acetyl-Coenzyme A-Synthetase (EC 6.2.1.1)	0,68	0,71	0,36
CMM_1157	<i>prfA</i>	<i>Peptide chain release factor 1</i> (RF-1)	* -0,06	0,99	* -0,05
CMM_2423	-	Peptid ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	0,72	1,26	* 0,19
CMM_2626	-	polare Aminosäuren ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	0,64	1,19	* -0,03
CMM_2627	-	polare Aminosäuren ABC Transporter, Permease	0,18	1,43	* 0,09
CMM_2628	-	polare Aminosäuren ABC Transporter, Substratbindeprotein	* 0,10	0,70	0,19
CMM_1790	-	Anion ABC Transporter, Substratbindeprotein	0,79	1,26	0,17
CMM_2282	-	Metall ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	0,44	0,90	-0,42
CMM_2283	-	Metall ABC Transporter, Substratbindeprotein	1,00	1,76	* -0,12
CMM_2804	-	Transkriptionsregulator, MarR-Familie	* 0,11	<u>1,17</u>	* -0,04
CMM_0243	<i>sigY</i>	RNA-Polymerase Sigmafaktor, ECF-Subfamilie	0,92	1,26	0,36
CMM_1466	-	Monooxygenase	0,41	1,20	* -0,02
CMM_1680	-	<i>short chain</i> Dehydrogenase/Oxidoreduktase (EC 1.1.1.-)	* -0,12	0,75	-0,52
CMM_1945	-	Acyl-CoA-Dehydrogenase	0,95	1,02	-0,20
CMM_1946	-	Oxidoreduktase/Monooxygenase	0,83	0,99	* 0,15
CMM_2401	-	konserviert hypothetisches Protein, CoA-bindend	0,79	1,36	0,21
CMM_1910	-	hypothetisches Protein	* 0,21	0,83	-0,21
CMM_2293	-	hypothetisches Protein	0,34	0,72	* 0,17
<b>Cluster II'</b>					
CMM_0183	-	Aminotransferase	1,42	1,64	0,92
CMM_1336	<i>metY</i>	O-Acetylhomoserin(Thiol)-Lyase (EC 2.5.1.49)	0,70	1,57	0,95
CMM_1960	-	Peptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	1,21	2,17	1,10
CMM_1406	-	konserviertes, sekretiertes Protein	1,35	1,59	1,08
CMM_2358	-	hypothetisches Membranprotein	0,49	1,19	1,01
<b>Cluster III</b>					
CMM_0880	-	Zucker ABC Transporter, ATPase	-2,12	<u>-1,98</u>	-1,32
CMM_0881	-	Zucker ABC Transporter, Permease	-1,90	-1,84	-0,99
<b>Cluster IV</b>					
CMM_0877	<i>araD</i>	L-Ribulose-5-Phosphat-4-Epimerase (EC 5.1.3.4)	-1,10	-1,23	-0,25
CMM_0878	<i>araA</i>	L-Arabinose-Isomerase (EC 5.3.1.4)	-1,47	-1,51	-0,66
CMM_0866	-	$\alpha$ -Glucosid ABC Transporter, Substratbindeprotein	-1,86	-1,53	-0,26
CMM_0867	-	$\alpha$ -Glucosid ABC Transporter, Permease	-1,57	-1,54	-0,27
CMM_0879	-	Zucker ABC Transporter, Substratbindeprotein	-0,43	<u>-1,13</u>	-0,17

Einem Drittel der in Cluster I und Teilen des Clusters II (Cluster II') zusammengefassten Gene, die bei QS-10min induziert waren, war keine oder nur eine generelle Funktion (Gruppe V) zuzuordnen. Die meisten Gene dieser Cluster gehören zu Gruppe IV (Potentiell relevant für phytopathogene Interaktion); darunter 8 für Peptid-, polare Aminosäuren- und anorganische Ionen ABC Transporter und zwei für Regulatoren (*sigY* und CMM\_2804) codierende Gene. Weiterhin zeigten 4 wahrscheinlich dem Methionin-Metabolismus zugehörige Gene den gleichen Effekt (Induktion nach 10 min). Die Gene der Cluster III und IV (verringerte Genaktivität) codieren für einen Zucker ABC Transporter (CMM\_0879-CMM\_0881), einen  $\alpha$ -Glucosid ABC Transporter (CMM\_0866-CMM\_0867) sowie eine Epi- (AraD) und eine Isomerase (AraA). Eine Regulation dieser Transporter und der beiden Enzyme aus dem Pentosemetabolismus durch ein *Quorum-Sensing*-Signal kann nicht ausgeschlossen werden, allerdings kann die Repression dieser Gene auch auf andere Faktoren wie die verringerte Nährstoffkonzentration im stationären Überstand zurückzuführen sein. Anzumerken ist hier, dass diese Gene in der spät-logarithmischen Wachstumsphase und nach Zugabe von Tomatenblatthomogenat oder  $\alpha$ -Tomatin ebenfalls reprimiert waren. Die Induktion der Gene aus Cluster I und II' könnte ebenso wie die Repression der Gene aus Cluster III und IV sowohl als Anpassung an das nährstoffarme Kulturmedium als auch als Reaktion auf ein Signalmolekül im Überstand der stationären Kultur interpretiert werden.

Eine mögliche Regulation pathogenitätsrelevanter Gene durch *Quorum-Sensing* konnte unter diesen Versuchsbedingungen nicht gezeigt werden. Lediglich ein Gen (*ppaC*, CMM\_0044), das an der Ausbildung eines virulenten Phänotyps beteiligt ist, zeigte nach 6-stündiger Kultivierung in stationärem Überstand eine zweifach stärkere Expression als unter den Kontrollbedingungen (Cluster II, Daten im Anhang Tabelle 8.25).

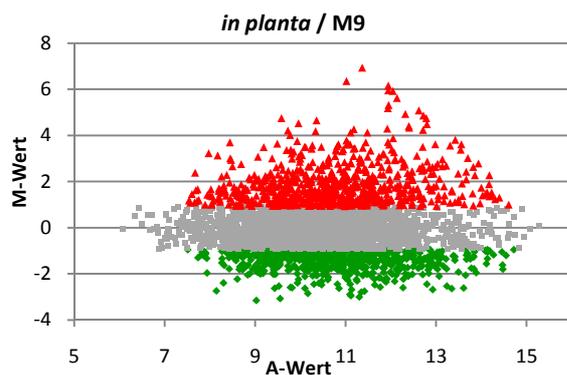
*Quorum-Sensing* ist nicht nur von der Populationsdichte der Kultur sondern auch von den jeweiligen Umweltbedingungen, wie dem verwendeten Medium, abhängig. Bei *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* kann der Haupt-Autoinducer z.B. nach Anzucht in komplexem Medium nachgewiesen werden (Lithgow et al., 2000). *Vibrio fischeri* hingegen synthetisiert in komplexen Medien einen QS-Inhibitor, so dass eine QS-abhängige Genregulation nur in Minimalmedium beobachtet werden kann (Eberhard, 1972). Für weitere Untersuchungen einer Populationsdichte-abhängigen Genregulation bei *Cmm* sollten dementsprechend verschiedene Voll- und Minimalmedien getestet werden. Auch eine Supplementierung des präkonditionierten Mediums mit Glucose und/oder weiteren Nährstoffen könnte sinnvoll sein, um eine durch das limitierte Nährstoffangebot bedingte Änderung der Genexpression zu vermindern. Zudem ist zu beachten, dass eine kritische Autoinducer-Konzentration möglicherweise schon vor Erreichen der stationären Wachstumsphase erreicht wird.

## 5.9 Expressionsmuster von *Cmm in planta*

Für eine genauere Untersuchung der Interaktion von *Cmm* mit seiner Wirtspflanze ist es notwendig, die *in planta* exprimierten Gene zu identifizieren. Da die Erstellung eines Expressionsprofils von *Cmm in planta* einige Probleme mit sich bringt, wurden auch *in vitro* Experimente durchgeführt, die sowohl eine bessere Reproduzierbarkeit als auch die Erfassung des zeitlichen Verlaufs der Expression ermöglichten. Bei diesen Experimenten wurde z.B. durch Zugabe von Xylemsaft, Tomatenblatthomogenat (5.4, S. 71) bzw.  $\alpha$ -Tomatin (5.7, S. 99) zu *Cmm*-Kulturen in M9-Minimalmedium versucht, das Habitat von *Cmm* in der Pflanze wenigstens partiell zu simulieren. Bei der Aufnahme des Expressionsmusters *in planta* ist zu beachten, dass aufgrund von Parametern wie der Infektionsmethode, der Anzahl an Zellen, die zur Infektion eingesetzt wurden, der Entfernung von der Infektionsstelle und der Bakteriendichte im Pflanzengewebe, welches zur RNA-Isolierung verwendet wurde, Unterschiede in der Genexpression zu erwarten sind. Ein nahezu identisches Expressionsprofil aller Bakterien in einer infizierten Pflanze ist im Gegensatz zu den *in vitro* Bedingungen sicherlich nur zu wenigen Zeitpunkten der Infektion (z.B. unmittelbar nach der Infektion) oder gar nicht zu erwarten. Technisch war es zudem aufwändig, die für die Durchführung eines Microarrayexperiments benötigte RNA-Menge aus infizierten Tomaten zu isolieren. Bei den *in vitro*-Experimenten wurden mindestens  $4 \times 10^9$  Zellen benötigt, um genügend RNA für einen Microarray zu gewinnen.

Für das Experiment wurden in drei unabhängigen Ansätzen je zehn 4 Wochen alte Pflanzen durch Punktieren der Fiederblattstiele (4-6 Fiederblattstiele pro Pflanze) und anschließendes Auftropfen von 10  $\mu$ l einer NCPPB382-Bakteriensuspension ( $1 \times 10^6$  Bakterien/ml) auf den punktierten Bereich infiziert (siehe 4.20.1.5, S. 57). Zehn Tage nach der Infektion wurde das punktierte Gewebe abgetrennt, unter Zugabe von flüssigem Stickstoff homogenisiert und aus dem Homogenat RNA isoliert. Als Kontrollen für das Microarrayexperiment wurden RNA-Proben verwendet, die aus drei NCPPB382-Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase isoliert wurden (M9-Minimalmedium;  $OD_{580} \approx 0,5$ ; 18,6 h nach Animpfen des Mediums). Die RNA, die aus infiziertem Pflanzengewebe isoliert wurde, kann sowohl von *Cmm* als auch von der Pflanze stammen. Da die bakterielle RNA nicht von der pflanzlichen getrennt werden kann, wurde für die cDNA-Synthese von RNA aus infizierten Pflanzen die doppelte Menge an RNA (20 statt 10  $\mu$ g) verwendet. Für die reverse Transkription der RNA-Proben, die aus Flüssigkulturen isoliert wurden, wurden standardmäßig 10  $\mu$ g RNA eingesetzt.

Im Vergleich zu den *in vitro* Bedingungen wurden 42 % aller 3131 *Cmm*-Gene *in planta* verstärkt (667 Gene) bzw. vermindert (658 Gene) exprimiert (Abbildung 5.27). Die Besiedlung des Xylems, die Replikation *in planta* und die Interaktion mit der Tomatenpflanze bewirken also ein Expressionsprofil, welches sich massiv von dem in Flüssigkultur unterscheidet.



**Abbildung 5.27:** Scatterplot des vergleichenden Expressionsprofils von NCPPB382 10 Tage nach Infektion von Tomatenpflanzen zu NCPPB382-Zellen einer M9-Minimalmedium-Flüssigkultur in der logarithmischen Wachstumsphase (4 g Glucose/L). Grüne Rauten:  $M \leq -0,93$ ; rote Dreiecke:  $M \geq 0,93$ , graue Quadrate: nicht differentiell exprimierte Gene. Schwellenwerte:  $p \leq 0,05$ ;  $n \geq 7$ ;  $A \geq 7,50$ .

Von mehr als einem Drittel der differentiell exprimierten Gene ist bislang keine oder nur eine generelle Funktion (Gruppe V) bekannt. 18,7 % der Gene wurde eine Funktion im Metabolismus (Gruppe I), 10,9 % eine Funktion in der Informationsspeicherung und -prozessierung (Gruppe III) und 5,6 % eine Beteiligung an zellulären Prozessen (Gruppe II) vorhergesagt. Von den 372 Genen (28,1 %), die der Gruppe IV (Potentiell relevant für die phythopathogene Interaktion) zugeordnet waren, codierten 163 Gene für Transporter und 107 für Regulatoren (Tabelle 5.18). Die hohe Anzahl an Transportern und Regulatoren, deren Expression *in planta* modifiziert wird, lässt darauf schließen, dass *Cmm* seinen Metabolismus sehr stark an das Habitat Xylem und insbesondere die Expression der Transporter den zur Verfügung stehenden Nährstoffen anpasst. So scheint z.B. der Phosphatgehalt 10 Tage nach Infektion im Infektionsbereich ausreichend hoch zu sein, dass Gene, die für den Phosphat-ABC-Transporter codieren (CMM\_2506-CMM\_2508), reprimiert waren, während zwei für *Low affinity*-Phosphatpermeasen codierende Gene (CMM\_0453, CMM\_2084) induziert waren (Tabelle 8.27 im Anhang, S. 188).

**Tabelle 5.18:** Differentielle Genexpression von *Cmm* 10 Tage nach Infektion 4 Wochen alter Tomatenpflanzen im Vergleich zur Genexpression in der logarithmischen Wachstumsphase in M9-Minimalmedium. Daten von 3 biologischen Replikaten. Schwellenwerte:  $M \geq |0,93|$ ;  $p \leq 0,05$ ;  $n \geq 7$ ;  $A \geq 7,50$ . Die Anzahl aller differentiell exprimierten Gene ist in Klammern angegeben.

Gruppe	Anzahl induzierter Gene: $M \geq 0,93$ (667)	Anzahl reprimierter Gene: $M \leq -0,93$ (658)
<b>I Metabolismus</b>	<b>112</b>	<b>136</b>
<b>Energie-, Kohlenstoffmetabolismus</b>		
Glycolyse	6	5
Pentose-Phosphatweg	2	8
Citrat Zyklus	2	12
oxidative Phosphorylierung	1	6
übrige Zucker und andere C-Verbindungen	4	6
Pyruvat, Umwandlungsreaktionen verschiedener Energieträger (ATP; $PO_4$ ; NAD(P))	1	1
n-Glycan (Glucosidasen)	12	4

Aminozucker	1	3
Nukleotidzucker	-	1
Inositol	-	2
Epimerasen / Isomerasen	5	2
Zuckeraktivierung (Phosphatasen)	2	1
<b>Aminosäuren</b>		
Aminotransferasen	-	1
Asparagin, Aspartat, Glutamin, Glutamat, Alanin	1	4
Prolin, Arginin	3	3
Glycin, Serin, Threonin	2	1
Lysin, Valin, Threonin	2	10
Histidin	3	3
aromatische AS (Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin)	3	6
Methionin, Cystein	7	4
Harnstoff	2	-
Katabolismus und Proteinmodifikation	4	2
<b>Nukleotide</b>		
Purin	8	9
Pyrimidin	1	4
Nukleotide, Rest	1	-
<b>Lipide</b>		
Fettsäuren	3	9
Carotinoid-/Chinonvorstufensynthese (Steroidbiosynthese)	1	2
Lipide, Rest	7	2
<b>Coenzyme</b>		
Pantothenat	4	1
Vitamin B6	1	1
Riboflavin	1	1
Nicotinsäure	-	2
Thiamin	-	1
Folsäure	3	3
Hämoglobin	4	3
Menachinon	2	4
Molybdän	2	1
Lipoat	-	1
S-Adenosyl-Methionin	-	1
<b>Sekundärmetabolismus</b>		
Phosphat	4	2
Eisen	6	3
Chalcon, Lantibiotikum	-	1
Carotinoid	1	-
<b>II Zelluläre Prozesse</b>	<b>39</b>	<b>35</b>
<b>Zellzyklus</b>		
Teilung	2	6
Partitionierung	5	4
<b>Zellwand</b>		
Peptidoglycanbiosynthese	6	2
Undecaprenol	2	1
Teichonsäuren	4	2
Glycosyltransferasen	4	3
Zelloberfläche	4	3

Sortasen	1	-
EPS-Cluster I	1	2
EPS-Cluster II	8	2
EPS-Cluster III	1	9
EPS-Cluster IV	1	1
<b>III Informationsspeicherung und -prozessierung</b>	<b>51</b>	<b>93</b>
<b>Replikation</b>		
Replikation	7	5
DNA Polymerasen	1	2
Reparatur	3	3
Glycosylasen (z.T. an Reparatur beteiligt)	4	1
Methylierung	1	-
Nukleasen	4	-
Rekombination	2	1
Transposasen etc.	2	2
Replikation, Rest	8	1
<b>Transkription</b>		
Transkription	1	7
weitere an der Transkription beteiligte Proteine	4	4
<b>Translation</b>		
ribosomale Proteine	1	44
tRNAs	3	6
Initiation, Elongation, Termination	2	4
Translation, Rest	7	11
GTP Bindeproteine	1	2
<b>IV Potentiell relevant für phytopathogene Interaktion</b>	<b>175</b>	<b>197</b>
<b>Transporter</b>		
ABC, ohne weitere Zuordnung	4	3
ABC, Energiemetabolismus	1	1
ABC, Zellteilung	-	1
ABC, Aminosäuren	6	17
ABC, Zucker	19	16
ABC, Zellwand	3	5
ABC, anorganische Ionen	7	12
ABC, Abwehr	5	2
Permeasen, ohne weitere Zuordnung	16	9
Permeasen, Energiemetabolismus	1	3
Permeasen, Aminosäuren	-	2
Permeasen, Nukleotide	1	1
Permeasen, Zucker	-	1
Permeasen, anorganische Ionen	5	3
Permeasen, Abwehr	1	3
Transporter, Energie	2	6
Kanäle	1	2
Phosphotransferasesysteme	2	2
<b>Proteintransport</b>		
Sec-System	1	4
Tat-System	-	3
Signalpeptidase	2	1
Konjugation	8	5
Piline	5	1

<b>Regulatoren</b>		
Transkriptionsregulatoren	45	23
Zwei-Komponenten-Regulatoren	9	6
Sigmafaktoren	3	5
Histon ähnliche Proteine	-	3
Serin/Threonin Protein-Phosphatasen	4	7
weitere Regulatoren (Proteinebene)	1	1
<b>Stress</b>		
Hitzeschock, Chaperone	2	3
Clp-Proteasen	-	2
Kälteschock	-	3
Peptidyl-Prolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase	-	4
Alkalischock	-	1
generelle Schockproteine	2	-
<b>Resistenz</b>		
Hydroperoxid	1	2
Thioredoxin	1	3
Kupfer	1	1
Radikale (Fenton)	1	-
Eisen/Schwefel-Cluster	-	4
Antibiotika	2	1
Sonstige: Restriktionsenzym, Cytochrom, Hämoglobin	4	1
Mycothioliol	1	2
<b>extrazelluläre Enzyme</b>		
extrazelluläre Serinproteasen	-	14
Pseudogene, extrazelluläre Serinproteasen	-	3
weitere extrazelluläre Proteine (z.B. Cellulasen, Tomatinase, Xylanasen)	-	2
<b>intrazelluläre Proteasen</b>		
Metalloproteasen	3	1
Serinproteasen	5	2
<b>V Schlecht/kaum charakterisiert</b>	<b>290</b>	<b>197</b>
<b>generelle Funktionszuordnung</b>		
Methyltransferasen	2	2
SAM abhängige Methyltransferasen	2	1
Dehydrogenasen	24	14
Acetyltransferasen	15	3
ATPasen	2	1
Hydrolasen	15	7
Nukleotid Bindeproteine	-	2
<b>Funktion unbekannt</b>		
konserviert hypothetische Proteine	116	98
hypothetische Proteine	101	66
Pseudogene	13	3

Mehr als die Hälfte der in der spät-logarithmischen Phase um mindestens 1,6-fach induzierten oder reprimierten Gene (112 von insgesamt 202 Genen mit  $M \geq |0,7|$  und Kriterien für  $p$ ,  $n$  und  $A$  erfüllt) zeigten auch bei dem wuchsphasenabhängigen Experiment den gleichen Trend. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich die aus dem Infektionsbereich reisolierten *Cmm*-Zellen, soweit sich dies mit einer Wuchskurve in Flüssigkultur vergleichen lässt, in dem Übergang von der logarithmischen in die stationäre bzw. in der stationären

Wuchsphase befinden. Es könnte aber auch möglich sein, dass dieser Effekt auf einer generell geringeren Wachstumsgeschwindigkeit *in planta* basiert.

Wichtig für die Interaktion von *Cmm* mit der Wirtspflanze könnte unter anderem sein, dass 63 Gene, deren Genprodukte wahrscheinlich an der Zelloberfläche von *Cmm* lokalisiert sind (58 hypothetische oder konserviert hypothetische Membranproteine, 4 Zelloberflächenproteine: CMM\_0150, CMM\_0430, CMM\_0501, CMM\_0912 und 1 Hämagglutinin: CMM\_0431), sowie ein für ein Perforin codierendes Gen (CMM\_2382) eine verstärkte Expression aufwiesen. An der Zelloberfläche exponierte Proteine wie Adhäsine oder andere Oberflächenstrukturen wie Exopolysaccharide (EPS) können eine Anlagerung des Pathogens an die Wirtszellen und/oder einen Zell-Zellkontakt der einzelnen Bakterien vermitteln und die Bildung eines Biofilms unterstützen. So scheint auch die EPS-Struktur von *Cmm in planta* modifiziert zu werden, da für die meisten Gene, die für EPS-Proteine der Cluster II und III, deren Regulatoren oder deren Transporter codieren, eine Induktion (EPS-II; CMM\_0819-CMM\_0837) bzw. eine Repression (EPS-III; CMM\_1006-CMM\_1030) festzustellen war (Daten im Anhang in Tabelle 8.27, S. 188). Eine differentielle Expression des Haupt-EPS (EPS-IV; CMM\_1597-CMM\_1609), dessen Zusammensetzung bereits genau analysiert wurde (Berpohl et al., 1996), war in der Pflanze nicht zu verzeichnen.

Entgegen der Erwartung, dass pathogenitätsrelevante Gene in der Pflanze stark exprimiert werden, waren alle signifikant differentiell exprimierten Gene der Gruppe „extrazelluläre Enzyme“ 10 Tage nach Infektion der Tomatenpflanzen reprimiert, unter diesen auch *celA*, *chpC* und *ppaC*, für die experimentell nachgewiesen wurde, dass sie für eine vollständige Virulenzausprägung essentiell sind (Tabelle 5.19).

**Tabelle 5.19:** Auswahl an Genen der Gruppe „extrazelluläre Enzyme“. Differentiell exprimierte Gene sowie weitere Gene, die für Serinproteasen der Chp-, Ppa- oder Sbt-Familien codieren. **Fett:** differentiell exprimierte Gene; \*: Kriterium für p nicht erfüllt.

GenDB-ID	Genname	mögliche Funktion	M-Wert
pCM2_0053	<i>phpA</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-2,48
pCM2_0052	<i>phpB</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-1,34
CMM_0052	<i>chpC</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-2,59
CMM_0059	<i>chpG</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-1,65
CMM_PSEUDO_0008	<i>chpA'</i>	Pseudogen, extrazelluläre Serin-Protease	-1,92
CMM_PSEUDO_0005	<i>chpD'</i>	Pseudogen, extrazelluläre Serin-Protease	-1,19
CMM_PSEUDO_0006	<i>chpD'</i>	Pseudogen, extrazelluläre Serin-Protease	-1,05
CMM_0042	<i>ppaB1</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-1,25
CMM_0050	<i>ppaB2</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-1,11
CMM_0044	<i>ppaC</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-1,52
CMM_0075	<i>ppaD</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-2,41
CMM_0071	<i>ppaE</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-1,13
CMM_1942	<i>ppaG</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-1,03
CMM_1948	<i>ppaI</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-0,99
pCM1_0023	<i>ppaJ</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-2,06
CMM_0070	<i>sbtA</i>	Subtilisin-ähnliche Serin-Protease (EC 3.4.21.-)	-1,36
CMM_2535	<i>sbtB</i>	Subtilisin-ähnliche Serin-Protease (EC 3.4.21.-)	-1,19
pCM1_0020	<i>celA</i>	Cellulase (EC 3.2.1.4)	-1,62
CMM_2443	<i>celB</i>	Cellulase (EC 3.2.1.4)	-0,93

pCM2_0054	<i>pat-1</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-0,88
CMM_0039	<i>chpE</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-0,31
CMM_0053	<i>chpF</i>	extrazelluläre Serin-Protease	* 0,03
CMM_PSEUDO_0009	<i>chpA'</i>	Pseudogen, extrazelluläre Serin-Protease	-0,38
CMM_PSEUDO_0010	<i>chpA'</i>	Pseudogen, extrazelluläre Serin-Protease	* -0,01
CMM_PSEUDO_0017	<i>chpB'</i>	Pseudogen, extrazelluläre Serin-Protease	-0,45
CMM_PSEUDO_0018	<i>chpB'</i>	Pseudogen, extrazelluläre Serin-Protease	-0,64
CMM_PSEUDO_0007	<i>chpD'</i>	Pseudogen, extrazelluläre Serin-Protease	* -0,20
CMM_0041	<i>ppaA</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-0,45
CMM_0764	<i>ppaF</i>	extrazelluläre Serin-Protease	-0,51
CMM_1947	<i>ppaH</i>	extrazelluläre Serin-Protease	0,77
CMM_2536	<i>sbtC</i>	Subtilisin-ähnliche Serin-Protease (EC 3.4.21.-)	0,71

Auch *pat-1*, welches neben *celA* sicherlich als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren anzusehen ist, wies einen M-Wert von -0,88 auf. Mit Ausnahme von *ppaH* und *sbtC*, die nicht in der *chp-tomA*-Region lokalisiert sind und um etwa das 1,7-fache induziert waren, zeigten alle weiteren Gene, die für Serinproteasen der Chp- bzw. der Ppa-Familie codieren aber einen M-Wert  $\geq -0,93$  aufwiesen, ebenfalls *in planta* ein leicht verringertes Transkriptlevel (Tabelle 5.19). Damit war 10 Tage nach Infektion für diese Gene weitestgehend der gleiche Effekt festzustellen wie unter *in vitro* Bedingungen durch Zugabe von Tomatenblatt-homogenat (5.4.2, S. 77). Das gleiche traf für CMM\_1624 (Transkriptionsregulator der TetR-Familie) zu, dessen Inaktivierung zu einer leichten Verminderung der Virulenz führte (5.6, S. 91). Somit scheint durch Zugabe bestimmter Pflanzenmetabolite *in vitro* zum Teil das Expressionsmuster von *Cmm in planta* widerspiegelt zu werden. Das verringerte Transkriptlevel der extrazellulären Enzyme könnte eventuell darauf zurückzuführen sein, dass diese Gene nur zu bestimmten Phasen der pathogenen Interaktion induziert oder reprimiert werden.

Obwohl die für Cellulasen codierenden Gene (*celA* und *celB*) nach 10 Tagen in der Pflanze weniger stark exprimiert wurden als in M9-Minimalmedium, war eine Induktion von CMM\_2594 (M = 1,14), das für die Cellobiose-spezifische IIB-Untereinheit des Phosphotransferasesystems codiert, zu verzeichnen. Vorausgesetzt, dass die Expression dieses Gens durch Cellobiose induziert wird, wäre anzunehmen, dass in dem verwendeten Pflanzengewebe im Gegensatz zum Minimalmedium, welches keine Cellulose oder Cellobiose enthält, physiologisch hohe Konzentrationen an Cellobiose vorliegen. Folglich wäre die Cellulaseaktivität in dem Gewebe trotz verringerter Expression von *celA* und *celB* hoch genug, um ausreichende Mengen an Cellobiose freizusetzen. Allerdings erklärt dies nicht die Repression der Cellulase-Gene. Möglich wäre, dass mit fortschreitender Degradierung des Gewebes vermehrt auch cytoplasmatische Komponenten der Pflanze freigesetzt werden, die reprimierend auf die Expression extrazellulärer Enzyme wirken.

## 6 Diskussion

### 6.1 Überprüfung der Funktionalität des Microarrays Cmm3kOLI

Zur Analyse der Expressionsmuster von *Cmm* NCPPB382 wurde in dieser Arbeit der Microarray Cmm3kOLI verwendet, der 50- bis 70mer Oligonukleotide zu 3131 manuell annotierten Genen des untersuchten Wildtypstamms enthält (siehe 5.2.) Aufgrund technischer Varianzen weisen die M-Werte ( $\log_2$  der Differenz der Signalintensitäten) bei bisher beschriebenen Experimenten immer eine gewisse Streuung auf. Bei einem für den Xanthanproduzenten *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* spezifischen Microarray (4553 annotierte Gene) wiesen z.B. bei einer Testhybridisierung 99 % aller Gene einen M-Wert zwischen -0,3 und 0,3 aber auch zwei Gene einen M-Wert  $\leq -1$  auf (Serrania et al., 2008). Ähnliche Werte wurden auch bei Microarrayanalysen für das stickstofffixierende *Sinorhizobium meliloti* (*S. meliloti*) und für die beiden Gram-positiven Corynebakterien *C. glutamicum* und *C. jeikeium* erhalten. So wiesen bei *S. meliloti* nur 2 von 5668 Genen einen M-Wert  $\geq |0,9|$  auf (Rüberg et al., 2003). Bei den Validierungsexperimenten der Microarrays für den opportunistischen Krankheitserreger *C. jeikeium*, der zur Hautflora des Menschen gehört, und den Aminosäureproduzenten *C. glutamicum* wiesen je 99 % der untersuchten Gene einen M-Wert zwischen -0,8 und 0,8 bzw. zwischen -0,59 und 0,52 auf (Hüser et al., 2003; Brune et al., 2006). Für Cmm3kOLI wurde eine vergleichbare Varianz der M-Werte bestimmt: 99 % aller Gene hatten einen M-Wert zwischen -0,3 und 0,3. Einen M-Wert  $\geq |0,6|$  wiesen lediglich vier Gene auf, bei denen allerdings auch nur maximal 2 der insgesamt 12 Replikate (4 genspezifische Spots auf je 3 Microarrays) ausgewertet werden konnten und die daher nicht in die Analyse eines Microarrayexperiments einbezogen werden würden.

In einem weiteren Testexperiment wurde überprüft, ob mit den verwendeten Methoden, die für *Cmm* im Rahmen dieser Arbeit erstmals etabliert wurden, differentiell exprimierte Gene identifiziert werden können. Denn insbesondere durch zu lange Inkubationszeiten bei der Probenentnahme und der RNA-Isolierung kann RNA degradiert und somit das Transkriptionsprofil verfälscht werden (Conway & Schoolnik, 2003). Die Auswertung des Testexperiments, in dem die Genexpression einer spät-logarithmischen mit der einer logarithmischen NCPPB382-Kultur verglichen wurde, ergab, dass überwiegend Gene der Gruppe Informationsspeicherung und -prozessierung (vor allem der Proteinbiosynthese) sowie zahlreiche Enzyme und Transporter des Energiemetabolismus reprimiert waren. Eine Repression dieser Gene war aufgrund des Verbrauchs essentieller Nährstoffe und der möglichen Anreicherung wachstumshemmender Stoffwechselprodukte, durch die der Übergang in die stationäre Phase und somit auch eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit eingeleitet wird, zu erwarten. Für *E. coli* und *Salmonella* sp. sind diese und weitere Effekte des Übergangs in die stationäre Phase und/oder einer Verringerung der Wuchsgeschwindigkeit genau untersucht (Bremer & Denis, 1996; Hengge-Aronis, 1996; Grunberg-Manago, 1996; Keener & Nomura, 1996).

Die Ergebnisse des Wuchsphasen-abhängigen Microarrayexperiments bestätigten die Funktionalität der für *Cmm* verwendeten Methoden. Zudem konnten die Daten dieses

Experiments für die Analyse anderer Versuchsbedingungen herangezogen werden, um zu überprüfen, ob aufgrund des Experimentdesigns zusätzlich zu den zu untersuchenden Variablen auch Wachstumsphasen-abhängige Effekte detektiert wurden.

## 6.2 Expressionsmuster von *Cmm* in einem *in vitro*-System und *in planta*

*In vitro* Experimente haben den Vorteil, dass sie unter genau definierten Bedingungen reproduziert, zeitliche Expressionsverläufe z.B. nach Zugabe einer bestimmten Substanz aufgezeichnet werden können und die Entnahme der Zellen und die anschließende RNA-Isolierung relativ einfach durchführbar sind. Daher wäre es von Vorteil, ein geeignetes *in vitro*-System für die Untersuchung der pathogenen Interaktion von *Cmm* mit seiner Wirtspflanze zu entwickeln. Die Herstellung eines künstlichen/artifiziellen Mediums, welches exakt die Umgebung von *Cmm in planta* widerspiegelt, ist unrealistisch. So ist z.B. die Zusammensetzung des Xylemsafts sehr komplex und von vielen Faktoren, wie dem Nährstoff- und Mineraliengehalt des verwendeten Substrats sowie deren Verfügbarkeit, der Transpirationsrate, der Tageszeit und dem Alter der Pflanze abhängig (Marschner, 1997). Des Weiteren hat *Cmm* während verschiedener Infektionsphasen auch Kontakt zu anderen Gewebetypen als dem Xylem und auch zu intrazellulären Bestandteilen der Pflanze, die z.B. durch die Mazerierung des Gewebes durch das Pathogen freigesetzt werden können. Daher wurde getestet, ob ein mit Pflanzenhomogenat supplementiertes Minimalmedium als *in vitro*-System zur Untersuchung der pathogenen Interaktion von *Cmm* mit der Tomate verwendet werden kann.

Die Analyse des Expressionsprofils einer NCPPB382-Kultur in mit 5 % Tomatenblatt-homogenat supplementiertem Minimalmedium im Vergleich zu dem einer Kultur in unbehandeltem Minimalmedium zeigte, dass sowohl 12 min nach Zugabe des Homogenats (Ansatz I) als auch nach längerer Anzucht in supplementiertem Medium (Ansatz II) der größte Anteil differentiell exprimierter Gene (50 % nach 12 min, 56 % nach 12 h) der Gruppe IV zugeordnet, also potentiell relevant für die phytopathogene Interaktion war. 10 (Ansatz I) bzw. 21 Gene (Ansatz II) dieser Gruppe, darunter auch *chpC*, *ppaA*, *ppaC* und *celA*, codieren für extrazelluläre Enzyme und wiesen im Vergleich zu der Kultur in Minimalmedium ein verringertes Transkriptlevel auf. Insbesondere die extrazellulären Enzyme scheinen für die erfolgreiche Kolonisierung und den virulenten Phänotyp von *Cmm* von großer Bedeutung zu sein, da sie außerhalb der Bakterienzelle z.B. pflanzliches Gewebe degradieren und dadurch eine verbesserte Nährstoffzufuhr ermöglichen, aber eventuell auch Signalmoleküle für die pathogene Interaktion freisetzen können (Daniels et al., 1988; Alfano & Collmer, 1996; Dreier et al., 1997; Jahr et al., 2000; Gartemann et al. 2008). Für einige dieser extrazellulären Enzyme wie die plasmidcodierten Pat-1 und CelA sowie ChpC, PpaA und PpaC (Gene in der *chp/tomA*-Region lokalisiert) wurde bereits gezeigt, dass sie für eine vollständige Virulenzausprägung essentiell sind, da entsprechende Mutanten nur noch eingeschränkt virulent waren (Meletzus et al., 1993; Dreier et al., 1997; Jahr et al., 2000; Stork et al., 2008;

Abt & Eichenlaub, unveröffentlicht). Die Repression dieser Gengruppe in mit Tomatenblatt-homogenat supplementiertem Medium war daher zunächst sehr verwunderlich. Es war anzunehmen, dass entweder das gewählte *in vitro*-System nicht geeignet ist, die Genexpression während der Interaktion von *Cmm* mit der Tomate widerzuspiegeln oder nur eine bestimmte Phase dieser Interaktion repräsentiert wird. Möglich wäre z.B., dass die extrazellulären Enzyme insbesondere in den frühen Phasen der Interaktion, also der Infektion und der anfänglichen Besiedlung des Xylems, verstärkt gebildet werden. Die Anreicherung degradierten Pflanzenmaterials in späteren Infektionsphasen, die *in vitro* eventuell durch Tomatenblatthomogenat simuliert wurde, könnte hingegen zu einer Repression der entsprechenden Gene führen. Zum Beispiel könnten Endprodukte der Enzymreaktionen als Corepressor fungieren.

Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass nach längerer Kultivierung in mit Tomatenblatthomogenat angereichertem Medium (Ansatz II) einige Gene aus der *tomA*-Region induziert waren, darunter auch Gene, die für verschiedene  $\beta$ -Glycosidasen (*bgIE*, *bgIF*, *bgIH*, *bgII*) und eine Zuckerpermease codieren. Daher kann angenommen werden, dass  $\beta$ -Glycoside, eventuell auch durch die induzierte Permease, zur Energiegewinnung aufgenommen wurden und intrazellulär durch spezifische  $\beta$ -Glycosidasen gespalten wurden. Nach 12-minütiger Inkubation mit dem Homogenat wurden diese Gene nicht verstärkt exprimiert. Dies könnte bedeuten, dass *Cmm* andere Kohlenstoffquellen bevorzugt, die zu diesem Zeitpunkt durch das Pflanzenhomogenat noch in ausreichend hohen Konzentrationen im Medium vorhanden waren. Der Unterschied in der Nährstoffzusammensetzung und -konzentration nach kurzer (12 min) oder längerer Kultivierung (12 h) mit Homogenat könnte auch der Grund dafür sein, dass einige Gene, die für Transporter codieren, nur unter einer der beiden Bedingungen induziert (z.B. nach 12 min Transporter für Peptide oder polare Aminosäuren) oder reprimiert (verschiedene Zuckertransporter) waren. Solange sich *Cmm* ausschließlich im Xylem befindet, könnten die  $\beta$ -Glycosidasen besonders wichtig sein, um  $\beta$ -glycosidische Verbindungen, die zum Beispiel durch die Cellulase freigesetzt werden können, zu verwerten. Ob und inwiefern die  $\beta$ -Glycosidasen, deren Gene in der *chp/tomA*-Region lokalisiert sind, für *Cmm* bei der Kolonisierung der Pflanzen essentiell sind, ist noch zu prüfen. Denn neben den neun Genen in dieser Region codieren weitere 9 chromosomale Gene ebenfalls für  $\beta$ -Glycosidasen. Diese Vermutung wird durch die Tatsache, dass der *Cmm*-Stamm CMM101 $\beta$ 330-18, in dem die durch *direct repeats* begrenzte *chp/tomA*-Region deletiert ist, *in planta* nur noch einen maximalen Titer von  $2,8 \times 10^4$  Bakterien/g Pflanzenhomogenat (Titer des Wildtypstamms:  $8 \times 10^9$ ) erreichte und keine Krankheitssymptome auslösen konnte (Schott, 2004; Gartemann et al., 2008).

### 6.2.1 Charakterisierung des TetR-Regulators CMM\_1624

Zur Aufklärung der Prozesse, die es *Cmm* ermöglichen, die Tomate zu besiedeln und die charakteristischen Krankheitssymptome auszulösen, ist es auch wichtig, zu verstehen, in welcher Weise diese Prozesse reguliert werden. Transkriptionsregulatoren, die essentielle

Gene für die pathogene Interaktion regulieren, sind für *Cmm* bislang nicht beschrieben. Auch Versuche, mögliche Regulatoren von *celA* und *pat-1* mittels einer kombinierten DNA-Affinitätschromatographie und MALDI-TOF-Massenspektrometrie zu identifizieren, waren nicht erfolgreich (Mayer, 2006). Daher war es sehr interessant, dass in mit Tomatenblatthomogenat versetztem Medium neben den für extrazelluläre Enzyme codierenden Genen auch CMM\_1624, das für einen möglichen Transkriptionsregulator der TetR-Familie codiert, reprimiert war. Nach 12-minütiger Kultivierung mit dem Homogenat zeigte zudem *sigY* (codiert für einen Sigmafaktor der ECF-Subfamilie) eine erhöhte Expression. Ob die differentielle Expression von CMM\_1624 unter diesen Bedingungen auch eine Funktion in der pathogenen Interaktion impliziert, wurde in Pflanzentests mit zwei CMM\_1624<sup>-</sup>-Mutanten (*Cmm1624* und CMM101\_1624), die mittels gerichteter Kassettenmutagenese hergestellt wurden, genauer untersucht.

*Cmm1624* enthält beide endogenen NCPPB382-Plasmide, CMM101\_1624 nur pCM1, auf dem *celA* lokalisiert ist. Die Infiltration beider Mutanten sowie ihrer entsprechenden Wildtypstämme (NCPPB382 und CMM101) führte bei allen drei getesteten Nichtwirtspflanzen (*Mirabilis jalapa* aus der *Nyctaginaceae*-Familie und den Solanaceen *Nicotiana benthamiana* und *Nicotiana tabacum* cv. Samsun) zu einer Hypersensitiven Reaktion (HR) im Bereich der Infiltrationsstelle. Eine essentielle Bedeutung von CMM\_1624 in der Auslösung der HR kann demnach ausgeschlossen werden.

Im Pflanzentest mit *Solanum lycopersicum* (Tomate) war eine leichte aber signifikante Verringerung der Virulenz aber nicht der Kolonisationsfähigkeit festzustellen. Pflanzen, die mit den CMM\_1624<sup>-</sup>-Mutanten infiziert wurden, wurden während des 4-wöchigen Pflanzentests weniger häufig als "tot" eingestuft und zeigten allgemein mit 51 % (*Cmm1624*) bzw. 32 % (CMM101\_1624) seltener Welkesymptome (Kategorien "(+)" bis "tot") als die mit den Kontrollstämmen infizierten Pflanzen (NCPPB382: 63 %, CMM101: 57 %). Auch das Gewicht der welkenden Pflanzen war 28 Tage nach Infektion mit den beiden Mutanten im Vergleich zu den Kontrollpflanzen signifikant erhöht. Die verringerte Virulenz war besonders deutlich bei CMM101\_1624 (pCM1<sup>+</sup>, pCM2<sup>-</sup>) zu erkennen. Im Gegensatz zu *Cmm1624*, bei dem der Welkeindex im Vergleich zu NCPPB382 nur um einen Tag erhöht war (*Cmm1624*: WI = 12; NCPPB382: WI = 11), konnte hier auch ein stark erhöhter Welkeindex von 21 Tagen (CMM101: WI = 12) festgestellt werden. Das Ausmaß der Virulenzabschwächung scheint also relativ stark durch pCM2 beeinflusst zu werden.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der Pflanzentests vermuten, dass der durch CMM\_1624 codierte TetR-Regulator Prozesse reguliert, die wesentlich für die vollständige Virulenz von *Cmm* sind. Zur weiteren Charakterisierung dieses Regulators sollen zukünftig z.B. durch Microarrayexperimente die Gene identifiziert werden, deren Expression durch CMM\_1624 modifiziert wird. Zudem soll überprüft werden, ob die bisherigen Ergebnisse durch Komplementierung der Mutanten bestätigt werden können.

### 6.2.2 Analyse der Genexpression *in planta*

Die Analyse der Genexpression *in vitro* nach Zugabe des Tomatenblatthomogenats führte zu der Frage, wie die Repression essentieller Virulenzfaktoren unter dieser Bedingung erklärt werden kann. Darüberhinaus musste geklärt werden, ob dieses *in vitro*-System geeignet ist, zumindest partiell das Expressionsprofil von *Cmm in planta* widerzuspiegeln, um z.B. zukünftige Untersuchungen zur Veränderung der Genexpression durch Inaktivierung einzelner Gene zu vereinfachen. Bei der Analyse des Expressionsprofils *in planta* ist zu beachten, dass sich die Genexpression von *Cmm*, welches sich über das Xylemgefäß in der ganzen Pflanze ausbreitet und keine nur lokal begrenzte Infektion auslöst, innerhalb einer Pflanze aufgrund lokal veränderter Bedingungen sehr stark unterscheiden kann. So kann z.B. während der Kolonisierung des Xylems die Bakteriendichte in einzelnen Pflanzenabschnitten ausgehend von der Infektionsstelle stark variieren und das Nährstoffangebot durch eine lokale Degradierung pflanzlichen Gewebes sehr stark modifiziert sein. Um ein möglichst ähnliches Expressionsprofil der untersuchten Bakterien zu gewährleisten, wurden die Pflanzen über Verletzungen (durch Punktieren) der Fiederblattstiele infiziert und zur RNA-Isolierung möglichst nur das punktierte Gewebe verwendet. Damit genügend RNA für ein Microarrayexperiment isoliert werden konnte, wurde pro Array das Gewebe von zehn Pflanzen (insgesamt bis zu 50 verschiedene Infektionsbereiche) 10 Tage nach Infektion (dpi) gepoolt und für die RNA-Isolierung verwendet.

Der Vergleich der Genexpression von *Cmm in planta* mit der Genexpression einer Minimalmediumkultur in der logarithmischen Wachstumsphase zeigte, dass sich die Bedingungen *in planta* 10 dpi massiv von denen in einer Minimalmediumkultur unterscheiden. 667 Gene waren *in planta* induziert, 658 Gene reprimiert. Damit wiesen insgesamt **42 %** aller 3131 Gene von *Cmm* ein verändertes Expressionsprofil auf. Da die Zusammensetzung und Konzentration der Verbindungen, die von *Cmm* verwertet werden können, in der Pflanze im Vergleich zum Minimalmedium sehr komplex ist, kann angenommen werden, dass der Metabolismus an diese Umgebung stark angepasst ist und sich deutlich von dem unter *in vitro* Bedingungen unterscheidet. Der hohe Anteil an differentiell exprimierten Genen der Gruppe I (Metabolismus, 30 % der Gene, denen eine Funktion zugeordnet werden konnte) und der Gene, die für Transporter codieren (163 Gene) ist zu großen Teilen sicherlich als Kennzeichen für die Anpassung an die spezielle Nährstoffzusammensetzung *in planta* anzusehen. Auch die Induktion oder Repression von mehr als einem Drittel aller Gene, die für regulatorische Proteine codieren (107 von insgesamt 288 annotierten), könnte in vielen Fällen durch die Adaption an das Nährstoffangebot begründet sein. Durch den Vergleich mit dem Experiment zur wachstumsphasenabhängigen Expression wurden mehr als hundert Gene, darunter auch zahlreiche für ribosomale Proteine codierende Gene, identifiziert, die *in planta* ein ähnliches Expressionsprofil aufwiesen. Dies könnte eventuell dadurch begründet sein, dass die Teilungsrate in der Pflanze generell niedriger ist als in der logarithmischen Wachstumsphase im Minimalmedium oder aber dies nur ein lokaler durch die Bakteriendichte bedingter Effekt in dem zur RNA-Isolierung verwendeten Gewebe ist.

Unter den differentiell exprimierten Genen waren auch 19 Gene, die für extrazelluläre Enzyme codieren. Aber entgegen der Erwartung, dass diese Gene in der Pflanze verstärkt

exprimiert werden, zeigten sie alle ähnlich wie bei dem *in vitro* Experiment mit Tomatenblatthomogenat ein verringertes Transkriptlevel. Auch hier handelte es sich mit *celA*, *chpC* und *ppaC* um Gene, deren Inaktivierung, wie bereits erwähnt, zu einer Verringerung der Virulenz führt. Zudem war für *pat-1*, ein weiterer essentieller Virulenzfaktor, ebenfalls eine Repression um einen Faktor von 1,8 ( $M = -0,88$ ) festzustellen. Entsprechend zum Experiment mit Tomatenblatthomogenat war hier außerdem das für einen TetR-Regulator codierende Gen CMM\_1624 reprimiert.

War die Expression der Virulenzfaktoren in dem *in vitro*-System also vergleichbar mit ihrer Expression 10 Tage nach Infektion und konnte damit die Funktionalität des *in vitro*-Systems zumindest partiell gezeigt werden? Oder ist eher davon auszugehen, dass im Minimalmedium, welches für die Kontrollbedingung verwendet wurde, insbesondere diese Gene stärker exprimiert werden als während der Interaktion mit der Pflanze?

Durch Analysen des Sekretoms von *Cmm* in Minimalmedium, in Vollmedium (TBY) und in TBY mit zusätzlich 4 % Glucose wurde mittlerweile gezeigt, dass *Cmm* in M9-Minimalmedium (4 % Glucose als C-Quelle) große Mengen vieler extrazellulärer Proteine wie CelA, Pat-1, ChpC und weiterer Serinproteasen bildet. Im Kulturüberstand einer *Cmm*-Kultur in TBY hingegen wurden die in Minimalmedium gebildeten extrazellulären Proteine darunter auch CelA und Pat-1 nicht oder in deutlich geringeren Mengen nachgewiesen. Wurde dem TBY-Medium allerdings entsprechend zum verwendeten Minimalmedium 4 % Glucose zugegeben, konnten z.B. sowohl CelA als auch Pat-1 detektiert werden. Die Konzentration der identifizierten extrazellulären Enzyme war allerdings geringer als in Minimalmedium (Tews, persönliche Mitteilung). Die Expression dieser Gene kann also durch Glucose induziert und zudem durch Verwendung von Minimal- statt Vollmedium noch verstärkt werden. Erste Analysen des Sekretoms einer Kultur in Minimalmedium mit 1% Tomatenblatthomogenat bestätigten partiell die in dieser Arbeit beobachtete Repression extrazellulärer Enzyme durch Tomatenblatthomogenat. Die Serinproteasen PpaC, PpaE, PpaF und PpaJ konnten zwar auch hier nachgewiesen werden, aber waren nur in geringeren Mengen vorhanden als in einer Kultur in Minimalmedium (Tews, persönliche Mitteilung).

Eine medienabhängige Induktion von Pathogenitätsgenen ist z.B. für die *hrp*-Gene der Proteobakterien gezeigt, deren Produkte das TypIII-Sekretionssystem bilden bzw. über dieses transportiert werden, ein Transportsystem, das in Actinomyceten allerdings nicht vorkommt. So konnte für *hrp*-Gene von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) gezeigt werden, dass in Vollmedium keine oder nur eine basale Expression der *hrp*-Gene nachweisbar war, sie in Minimalmedium (z.B. mit Fructose und Mannitol als C-Quelle) dagegen wie auch einige *avr*-Gene stark induziert waren (Innes et al., 1993; Mudgett & Staskawicz, 1999; Brown et al., 2001; Hu et al., 2001). Zudem konnte nach Kultivierung von *Pst* in Apoplasten-Extrakt für *hrpA* (codiert das Pilin-Protein des TypIII-Sekretionssystems) ebenfalls ein hohes Transkriptlevel nachgewiesen werden, allerdings lag es sehr deutlich unter dem, welches in Minimalmedium erreicht wurde (Rico & Preston, 2008). Ob Gene, die

für extrazelluläre Enzyme codieren, in Minimalmedium generell stärker exprimiert werden als in der Pflanze, muss jedoch noch genauer untersucht werden.

Ebenso wäre vorstellbar, wie es auch schon für einige andere Organismen gezeigt wurde, dass die Expression der Virulenzgene von der Infektionsphase abhängt und zu bestimmten Zeitpunkten nur sehr geringe Transkriptlevel vorliegen können. In *Xylella fastidiosa* wurde z.B. gezeigt, dass eine verminderte Expression von Virulenzgenen in bestimmten Infektionsphasen zu einem avirulenten Phänotyp führen kann. de Souza et al. verglichen dazu (2003 und 2005) unter zwei verschiedenen Bedingungen die Expression ausgewählter Gene 15 bzw. 90 Tage nach Infektion der Orange (*Citrus sinensis*). Unter der ersten Bedingung wurden zur Infektion *X. fastidiosa* Zellen verwendet, die zuvor aus infizierten, welkenden Cataranthen (*Catharanthus roseus*) reisoliert wurden (FP: *first passage after isolation*) und normalerweise einen virulenten Phänotyp aufweisen. Unter der zweiten Bedingung wurden hingegen Zellen verwendet, die aufgrund wiederholter Anzucht auf Agarplatten (SP: *several passages in axenic cultures*) avirulent waren. 15 aber nicht 90 Tage nach Infektion war unter der FP-Bedingung für Gene, die für ein Fimbrienprotein und zwei Adhäsine codieren, eine höhere Expression zu verzeichnen als unter der SP-Bedingung. Unter der SP-Bedingung ist bereits in der frühen Infektionsphase, in der ein Biofilm im Xylemgefäß aufgebaut wird, eine schlechtere Kolonisierung der Pflanze zu erkennen. Daher wird vermutet, dass die Adhäsionsproteine insbesondere in der frühen Phase zur Ausbildung des Biofilms benötigt werden. Eine zu geringe Expression dieser Gene würde demnach die Bildung des Biofilms und damit die Kolonisierung des Xylems beeinträchtigen. Vier weitere Gene, die für Proteine mit einer potentiellen Funktion für die Virulenz codieren (*acrA*: precursor of drug resistance gene, *xpsE*: TypII-Sekretionssystemprotein, *cvaC*: Colicin V precursor, *msrA*: Peptid Methionin Sulfoxid Reduktase) waren hingegen nur 90 Tage nach der Infektion unter der FP-Bedingung stärker exprimiert als unter der SP-Bedingung. Die Expression dieser Gene scheint folglich insbesondere in den fortgeschrittenen Stadien der Infektion, wenn erste Symptome sichtbar werden (Almeida et al., 2001), für die Kolonisierung oder die Ausbildung der Krankheitssymptome von Bedeutung zu sein (de Souza et al., 2005; de Souza et al., 2003).

Auch für extrazelluläre Enzyme von *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* wurde mittlerweile gezeigt, dass verschiedene Virulenzfaktoren unterschiedlich stark in der Pflanze exprimiert werden und ihre Expression oft mit bestimmten Infektionsphasen korreliert. Gene, die für zwei Cellulasen (*CelA*, *CelB*) und zwei Serinproteasen (*Pat0022*, *Pat2991*) codieren, waren bis zu 96 h nach Vakuuminfiltration von Kartoffelblättern im Vergleich zu fünf weiteren untersuchten Genen am stärksten exprimiert. Betrachtet man die Expression der Gene zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion, werden *pat1262* (codiert eine Serinprotease), *pat2991*, *xyI0087* (codiert eine Xylanase) und *celB* insbesondere nach 24 bzw. 96 h verstärkt exprimiert, während ein für eine Pectatlyase codierendes Gen (*pl2234*) zu allen Zeitpunkten ein ähnliches Expressionsmuster zeigte. Drei für Serinproteasen codierende Gene, darunter auch *pat0022*, wiesen *in planta* zu allen Zeitpunkten eine niedrigere Expression auf als in Vollmedium (Holtsmark et al., 2008).

Auch für *Cmm* ist von Chalupowicz et al. (2010) eine Infektionsphasen-abhängige Expression bekannter Virulenzfaktoren, die für eine extrazelluläre Cellulase (*CelA*) und drei Serinproteasen (*Pat-1*, *ChpC*, *PpaA*) codieren, gezeigt. Die Transkriptlevel der auf den beiden Plasmiden lokalisierten Gene *celA* und *pat-1* waren drei Tage bzw. einen Tag nach Infektion der Tomatenpflanzen am höchsten, sanken bis zum siebten Tag nach Infektion allerdings deutlich ab. Für *chpC* und *ppaA* konnte die höchste Expression 4 Tage nach Infektion festgestellt werden. Im Vergleich zur Transkriptmenge in *Cmm*-Zellen, die auf Minimalmedium-Agarplatten angezogen wurden, waren *celA* und *pat-1 in planta* zu allen Zeitpunkten verstärkt exprimiert.

Aufgrund der zeitabhängigen Expression von Virulenzfaktoren von *Clavibacter in planta* in frühen Infektionsphasen (Holtsmark et al., 2008; Chalupowicz et al., 2010) und einer starken Expression dieser Gene in Minimalmedium mit Glucose ist es durchaus plausibel, dass 10 Tage nach Infektion die Expression dieser Virulenzfaktoren *in planta* geringer war als unter *in vitro*-Bedingungen. Da durch Zugabe von Tomatenblatthomogenat bezüglich der extrazellulären Enzyme ein ähnlicher Effekt erzielt wurde, wie *in planta* 10 Tage nach Infektion, kann zudem vermutet werden, dass z.B. durch eine fortgeschrittene Degradierung des Pflanzenmaterials in dieser Phase der Infektion *Cmm* auch verstärkt Kontakt zu cytoplasmatischen Bestandteilen aus Tomatenzellen hat. Dies würde zum einen bedeuten, dass das *in vitro*-System mit Tomatenblatthomogenat geeignet ist, das Expressionsmuster von *Cmm* in der Pflanze in einer späteren Infektionsphase in Teilen widerzuspiegeln. Durch eine Erhöhung der Homogenat-Konzentration könnte möglicherweise auch eine größere Übereinstimmung der beiden Expressionsmuster erzielt werden. Zum anderen kann angenommen werden, dass cytoplasmatische Bestandteile der Tomate eine reprimierende Wirkung auf die Expression extrazellulärer Enzyme von *Cmm* haben. Interessant wäre es hier z.B. mittels Reportergenfusion oder Analyse der Proteinzusammensetzung von *Cmm in planta* zu überprüfen, wie hoch die Proteinmengen zu unterschiedlichen Zeitpunkten tatsächlich sind.

#### **6.2.2.1 *In planta* induzierte Gene mit möglicher Funktion in der pathogenen Interaktion**

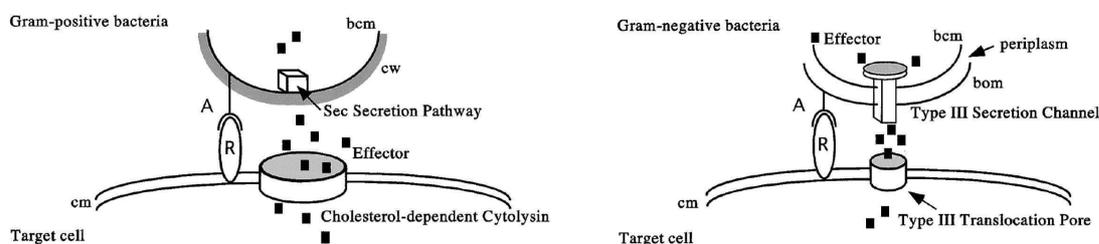
Neben extrazellulären Enzymen, die der Erschließung von Nährstoffen und der Signalübertragung dienen, spielen auch Oberflächenstrukturen und -proteine eine wichtige Rolle in der pathogenen Interaktion. Die Anheftung des Pathogens an bestimmte Oberflächen des Wirts ist häufig wesentlich für die erfolgreiche Infektion und Besiedlung der Pflanze. Sie wird durch spezielle Oberflächenproteine wie Adhäsine vermittelt, die zudem auch der Anlagerung einzelner Bakterienzellen aneinander dienen können. Durch Exopolysaccharide (EPS) wiederum wird eine hydratisierte Matrix gebildet, die sowohl Adhäsionsprozesse als auch die Aufnahme von Nährstoffen erleichtert und einen Schutz vor pflanzlichen Abwehrstoffen bietet (Leigh & Coplin, 1992; Niehaus et al., 1993; Kiraly et al., 1997). Für NCPPB382 wurden vier verschiedene EPS-Biosynthesecuster (EPS-I/*wcn*-Cluster: CMM\_0711-CMM\_0727, EPS-II/*wco*-Cluster: CMM\_0819-CMM\_0834, EPS-III/*wcq*-Cluster: CMM\_1006-CMM\_1031 und EPS-IV/*wcm*-Cluster: CMM\_1596-CMM\_1611) identifiziert. Das

hochmolekulare EPS, welches die mucoide Zellmorphologie auf Festmedien bedingt, wird durch das *wcm*-Cluster (EPS-IV) codiert. Die gezielte Inaktivierung von *gmdA*, *wcmH* oder *wcmI* (*wcm*-Cluster), die für eine GDP-Mannose 4,6-Dehydratase, eine Glycosyltransferase bzw. eine Acetyltransferase codieren, führt zu einer rauhen Kolonimorphologie, die durch die Reduktion der EPS-Menge um mindestens 90 % zu erklären ist (Schauer, 2004). Im Pflanzentest mit der Tomate kann im Vergleich zu NCPPB382 eine leichte Erhöhung der Biomasse und eine minimale Abschwächung der Welkesymptome infizierter Pflanzen beobachtet werden. Ein möglicher Grund hierfür kann eine verbesserte Wasserversorgung der Pflanzenzellen durch eine verminderte Verstopfung des Xylems sein. Eine essentielle Rolle dieses EPS-Clusters für die Pathogenität und Virulenz von *Cmm* kann z.B. im Gegensatz zu dem Stewartan-EPS von *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Dolph et al., 1988; Nimtz et al., 1996), oder dem EPS von *Ralstonia solanacearum* (Denny et al., 1988; Kao et al., 1992; Saile et al., 1997), die wichtige Virulenzfaktoren dieser beiden phytopathogenen Bakterien darstellen, weitestgehend ausgeschlossen werden (Bermpohl et al., 1996). Dennoch scheint EPS-IV in der Pflanze in ebenso hohen Mengen wie *in vitro* gebildet zu werden, da kein Unterschied in der Expression des *wcm*-Clusters zwischen beiden Bedingungen beobachtet werden konnte. Allerdings waren *in planta* Gene des *wco*-Clusters (EPS-II) induziert und Gene des *wcq*-Clusters (EPS-III) reprimiert. Dies lässt eine Anpassung des Exopolysaccharids an die Bedingungen in der Pflanze vermuten. Möglich wäre z.B., dass Proteine, die von dem *wco*-Cluster codiert werden, eine für die Kolonisierung der Pflanze wichtige Veränderung des Exopolysaccharids bezüglich seiner physikochemischen oder strukturellen Eigenschaften bewirken. Neben dem *wcm*-Cluster (EPS-IV) wurde bislang nur ein Gen von EPS-I (*wcnE*: CMM\_0718) durch Inaktivierung näher charakterisiert. Weder bezüglich der Virulenz noch der Menge des gebildeten EPS war ein Unterschied zum Wildtyp festzustellen (Schauer, 2004). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wäre es sinnvoll, insbesondere das *wco*-Cluster in Zukunft genauer zu untersuchen. Zum einen könnte durch Inaktivierung einzelner Gene oder größerer Bereiche von EPS-II die Funktion dieses Clusters bezüglich der Virulenz von *Cmm* untersucht werden. Zum anderen wäre es interessant z.B. mittels *real-time*-RT-PCR oder weiterer Microarray-Experimente die Expression der EPS-Gene zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion von Tomatenpflanzen zu analysieren.

Ein weiterer möglicher Virulenzfaktor von *Cmm* könnte CMM\_2382 sein. *In planta* wurde dieses Gen, das für ein Perforin (MACPF Domäne, *membrane attack complex/perforin*, pfam01823) codiert, fast 5-mal ( $M = 2,25$ ) stärker exprimiert als unter *in vitro*-Bedingungen. Perforine sind vor allem in der Immunabwehr von Säugern beschrieben, wurden aber auch in pathogenen Bakterien wie *Chlamydia* spp. (Ponting, 1999) und *Photobacterium luminescens* (Rosado et al., 2007) identifiziert. In der Immunabwehr der *Mammalia* werden Perforine nach Degranulierung der cytotoxischen T-Zellen freigesetzt und bilden Poren in der Membran infizierter Zellen. Über diese Poren translozierte Granzyme (Serin-Proteasen der intrazellulären Granula von Abwehrzellen des Immunsystems) führen zum Absterben der infizierten Zellen durch Apoptose (Pipkin & Lieberman, 2007). Mittlerweile ist durch die Analyse der Kristallstruktur des MACPF-Proteins von *Photobacterium luminescens* subsp.

*laumondii* TTO1 bekannt, dass die Struktur der MACPF-Proteine sehr stark der Struktur Cholesterin-abhängiger Cytolysine (CDC, *cholesterol-dependent cytolysins*) von Gram-positiven Bakterien ähnelt, obwohl die Aminosäure-Sequenzen sehr verschieden sind (Rosado et al., 2007). Daher wurde postuliert, dass Perforine einen CDC-ähnlichen Mechanismus zur Porenbildung verwenden. Das von CMM\_2283 codierte Perforin ist zu 47 % ähnlich zu dem MACPF-Protein von *P. luminescens* subsp. *laumondii* TTO1.

Poren-bildende Toxine wie Cytolysine und Perforine werden als lösliche Proteine sekretiert und binden an spezifischen Rezeptoren der Wirtszelle. Eine Porenbildung ist meistens erst nach Oligomerisierung mehrerer Cytolysin- oder Perforin-Proteine zu beobachten (Gonzalez et al., 2008; Iacovache et al., 2008). Poren müssen nicht zwingend die Lyse der Wirtszelle hervorrufen, sondern können z.B. bei geringerem Durchmesser den Transport bestimmter Verbindungen aus der Wirtszelle begünstigen und so eine verbesserte Nährstoffversorgung des Pathogens ermöglichen (Bischofberger et al., 2009). Für das Gram-positive Bakterium *Streptococcus pyogenes* zeigten Madden et al. (2001) zudem, dass Streptolysin O, ein Cholesterin-abhängiges Cytolysin, ähnlich wie das TypIII-Sekretionssystem von Gram-negativen Bakterien den Transport von bakteriellen Proteinen in die Wirtszelle vermittelt. Dabei wird angenommen, dass über das TypII-Sekretionssystem ausgeschleuste Proteine durch eine aus Streptolysin O-Proteinen gebildete Pore in der Wirtszellmembran in das Cytosol der Wirtszelle transloziert werden (Abbildung 6.1). Die Poren-bildende Eigenschaft von Streptolysin O wird in der Zellkultur bereits routinemäßig zur Translokation großer heterologer Proteine in intrazelluläre Kompartimente verwendet (Bhakdi et al., 1993).



**Abbildung 6.1:** Modell des Cytolysin vermittelten Transports bakterieller Proteine in eukaryotische Wirtszellen im Vergleich zum TypIII-Sekretionssystem Gram-negativer Bakterien. bcm: *bacterial cell membrane*; bom: *bacterial outer membrane*; cw: *cell wall*; cm: *cellular membrane*; A: *adhesive molecule*; R: *cellular receptor*. Abbildung aus (Madden et al., 2001).

Aufgrund der ähnlichen Struktur von Perforinen und Cholesterin-abhängigen Cytolysinen und der Funktion des von *S. pyogenes* gebildeten Streptolysins O ist eine genaue Charakterisierung von CMM\_2382 von großem Interesse. Denn dieser Mechanismus würde ähnlich dem TypIII-Sekretionssystem in Gram-negativen Bakterien eine direkte Manipulation des Wirts durch Einschleusen von proteinogenen Effektoren ermöglichen. Sollte eine Streptolysin O-ähnliche Funktion nachgewiesen werden, wäre im nächsten Schritt zu untersuchen, welche Proteine von *Cmm* in die Pflanzenzellen über diesen Mechanismus transportiert werden.

Wie bereits in Abbildung 6.1 zu erkennen, erfordert der für *Streptococcus pyogenes* nachgewiesene Cytolysin-vermittelte Transport neben dem Poren-bildenden Cytolysin auch eine z.B. durch spezifische Adhäsine vermittelte Bindung der Bakterienzelle an die Wirtszelle. Fehlt das entsprechende Adhäsine, so erfolgt trotz Expression aller weiteren Gene, die für diesen Mechanismus essentiell sind, kein Transport in die Wirtszelle (Ruiz et al., 1998; Madden et al., 2001). Adhäsine spielen aufgrund ihrer Eigenschaft, Zell-Zellkontakte zwischen den Bakterien oder eine Anheftung der Bakterien an Oberflächen des Wirts zu vermitteln, unabhängig von dem hier beschriebenen Transportmechanismus eine wichtige Rolle für die Virulenz von pathogenen Bakterien. Wie bereits erwähnt (6.2.2, S. 128), ist die Expression von Adhäsine-Genen von *Xylella fastidiosa* zu bestimmten Zeitpunkten wesentlich für eine erfolgreiche Kolonisierung des Xylems der Orange (de Souza et al., 2003; de Souza et al., 2005). Zudem zeigten Gottig et al. (2009) z.B. für *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, dass eine *fhaB*-Mutante (FhaB: Hämaggglutinin-ähnliches Protein) im Pflanzentest mit *Citrus sinensis* (Orange) eine verringerte Virulenz und Kolonisationsfähigkeit als der Wildtypstamm aufweist. Unter *in vitro*-Bedingungen war zudem eine Beeinträchtigung der Biofilmbildung zu erkennen. Ähnliche Effekte waren durch Inaktivierung von *hecA* von *Dickeya (Erwinia) chrysanthemi*, das ebenfalls für ein Hämaggglutinin-ähnliches Adhäsine codiert, zu beobachten. Die Mutante war darin beeinträchtigt, sich an Blätter von *Nicotiana clevelandii* anzulagern und Aggregate zu bilden, und zeigte eine verminderte Virulenz auf *N. clevelandii*-Keimlingen (Rojas et al., 2002). Folglich könnte auch insbesondere das von CMM\_0431 codierte Hämaggglutinin-ähnliche Protein, welches *in planta* verstärkt exprimiert wurde, von Interesse für zukünftige Untersuchungen sein.

### 6.3 Xylemsaft - das natürliche Habitat von *Cmm*

*In planta* befindet sich *Cmm* nach der Infektion zunächst hauptsächlich als biotrophes Pathogen im Xylem. Daher war es von besonderem Interesse zu untersuchen, welchen Einfluss Xylemsaft der Tomate bzw. dessen Zusammensetzung auf das Wachstum und die Genexpression von *Cmm* hat. Da Xylemsaft im Vergleich zum Phloemexsudat relativ nährstoffarm ist (Marschner, 1997; Bialczyk et al., 2004) und Pathogene durch unterschiedlichste Mechanismen eine gute Nährstoffversorgung *in planta* bewirken (Mudgett, 2005; Abramovitch et al., 2006), stellt sich zudem die Frage, ob sich die Zusammensetzung des Xylemsafts ändert, wenn die Tomate mit *Cmm* infiziert ist.

Die *in vitro* Anzucht von *Cmm* in unverdünntem Xylemsaft nicht infizierter Pflanzen zeigt deutlich, dass *Cmm* sehr gut an sein natürliches Habitat adaptiert ist. Trotz der im Vergleich zu M9-Minimalmedium geringen Nährstoffkonzentration im verwendeten Xylemsaft (nur etwa 3 % der Zuckermenge: 260  $\mu$ M Fructose und 375  $\mu$ M Glucose gegenüber 22 mM Glucose im Minimalmedium) erreichen die Bakterien eine Generationszeit von 2,3 Stunden, während eine Teilung in M9-Minimalmedium 5-6 h dauert. Allerdings scheint die geringere Zuckerkonzentration die maximal erreichbare Zellmenge und die Länge der logarithmischen

Wuchsphase zu beeinflussen. Denn während bei Anzucht in Xylemsaft nach 5-stündiger Kultivierung bereits 75 % der Glucose und Fructose verbraucht war und sich bereits der Übergang in die stationäre Wuchsphase abzeichnete, befanden sich die Zellen in Minimalmedium noch mehr als 15 h in der logarithmischen Wuchsphase. In Xylemsaft wurde nur eine maximale  $OD_{580}$  von 0,76 ( $\approx 3,8 \times 10^8$  Bakterien/ml) erreicht, im Gegensatz zur Anzucht in Minimalmedium mit einer maximalen  $OD_{580}$  von 2,0 ( $\approx 1,0 \times 10^9$  Bakterien/ml). Die schnellere Wachstumsgeschwindigkeit im Xylemsaft hängt offenbar vielmehr von der Summe der Komponenten und ihrer Konzentration als von der Zuckerkonzentration ab. Die im Xylemsaft z.T. in sehr hohen Konzentrationen enthaltenen Carbonsäuren (z.B. Malat: 4 mM) werden von *Cmm* auch verstoffwechselt, allerdings erst nachdem die bevorzugten C-Quellen (Glucose, Fructose) und die meisten Aminosäuren verbraucht sind.

Bei der vergleichenden Analyse des Xylemsafts infizierter und *mock*-infizierter Pflanzen (10 dpi) wurde festgestellt, dass die Zusammensetzung des Xylemsafts durch eine Infektion mit *Cmm* modifiziert wird und darüberhinaus auch von der Virulenz und Kolonisationsfähigkeit des verwendeten *Cmm*-Stamms abhängt. So war besonders auffällig, dass nach der Infektion mit NCPPB382, dem virulenten Wildtypstamm, die Konzentrationen aller Metabolite, die unter *in vitro* Bedingungen weitestgehend bereits in der exponentiellen Wuchsphase (nach 5-6 h) von *Cmm* verbraucht worden waren, sowie die Konzentrationen von Citrat und Fumarat, erhöht waren. Besonders hervorzuheben sind hier Glucose, Fructose und Fumarat, deren Konzentrationen in Pflanzen, die mit dem Wildtyp oder seinem avirulenten, normal kolonisierenden Derivat CMM100 infiziert wurden, mehr als doppelt so hoch waren wie in *mock*-infizierten Pflanzen. Maleinsäure hingegen, die von *Cmm* (*in vitro*) erst in der stationären Phase verbraucht worden war, erreichte in dem Xylemsaft aller infizierten Pflanzen signifikant geringere Konzentrationen als in nicht infizierten Pflanzen. Vor allem die Veränderung der Metabolitkonzentration durch eine Infektion mit dem avirulenten CMM100 könnte ein Indiz dafür sein, dass die Pflanze von *Cmm* stimuliert wird, bestimmte Nährstoffe verstärkt ins Xylem zu transportieren, woraufhin sich die Bakterien in der Pflanze so gut vermehren können, dass Titer von bis zu  $1 \times 10^{10}$  Bakterien/g Frischgewicht erreicht werden können (Meletzus et al., 1993). Die Konzentrationen an Glucose, Fructose, Citrat und Fumarat im Xylemsaft von Pflanzen, die mit CMM101*chpC* $\beta$  infiziert wurden, sind sowohl im Vergleich zu mit NCPPB382- als auch mit CMM100-infizierten Pflanzen wesentlich niedriger. Hierbei ist die eingeschränkte Kolonisationsfähigkeit wohl der wichtigere Aspekt und weniger die schwächere Virulenz. Denn Pflanzen, die mit dem avirulenten CMM100 infiziert wurden, enthielten deutlich höhere Mengen dieser Metabolite. Vielleicht ist dies ein Indiz dafür, dass ChpC an der Modulation der Pflanze bezüglich der Nährstoffzufuhr ins Xylem beteiligt ist.

Das Phytohormon Salicylsäure, das an der Auslösung der Pflanzenabwehr als Botenstoff beteiligt ist (Klesig & Malamy, 1994; Durrant & Dong, 2004), wurde ausschließlich im Xylemsaft infizierter Pflanzen nachgewiesen. Die Konzentration an Salicylsäure stieg mit zunehmender Virulenz der zur Infektion verwendeten Stämme signifikant an und erreichte in mit NCPPB382 infizierten Pflanzen eine Konzentration von 29  $\mu$ M (Infektion mit CMM101*chpC* $\beta$ : 11  $\mu$ M; Infektion mit CMM100: 7  $\mu$ M). Salicylsäure ist an der Aktivierung der

systemisch erworbenen Resistenz (SAR) beteiligt. Die Resistenz von Pflanzen kann durch Behandlung mit Salicylsäure erhöht aber z.B. durch Inaktivierung der Salicylsäuresynthese verringert werden (Loake & Grant, 2007). Der Nachweis von Salicylsäure im Xylemsaft gelang erstmals Ratzinger et al. (2009) in *Brassica napus* (Raps). In gesunden Pflanzen konnten mittels HPLC-MS minimale Konzentrationen von 0,06-0,11  $\mu\text{M}$  Salicylsäure im Xylemsaft nachgewiesen werden. Nach Infektion mit dem vaskulären Pilz-Pathogen *Verticillium longisporum*, das fast ausschließlich das Xylemgefäß seines Wirts besiedelt (Zhou et al., 2006; Eynck et al., 2007), stieg die Konzentration auf 0,2-1,5  $\mu\text{M}$  an (Ratzinger et al., 2009). Die Korrelation der Salicylsäure-Konzentration des Xylemsafts mit der Virulenz des zur Infektion verwendeten *Cmm*-Stamms deutet darauf hin, dass die Tomate das Pathogen erkennt und mit zunehmender Virulenz des Pathogens verstärkt Abwehrreaktionen durch Salicylsäure auch in nicht infizierten Bereichen der Pflanze induziert werden. Eventuell ist die erhöhte Salicylsäure-Konzentration nach Infektion mit virulenten Stämmen aber auch z.T. durch die zunehmende Degradierung des Pflanzengewebes zu erklären.

Eine (partielle) Aktivierung der basalen Pflanzenabwehr durch *Cmm* konnten auch Balaji et al. (2008) durch Analysen der Genexpression der Tomate 4 und 8 Tage nach Infektion mit *Cmm* zeigen. So ließen die Transkriptomdaten auf eine verstärkte Synthese von PR-Proteinen, Extensinen und Proteinen, die an der Synthese und Neutralisierung reaktiver Sauerstoffspezies oder der Biosynthese der Pflanzenhormone Ethylen und Jasmonsäure beteiligt sind, schließen. Nach Infektion Ethylen-insensitiver Tomaten-Mutanten mit virulenten *Cmm*-Stämmen war im Vergleich zu Ethylen-sensitiven Tomaten zudem eine Verringerung der Welkesymptome zu beobachten (Balaji et al., 2008; Balaji & Sessa, 2008). Ein ähnlicher Effekt war für verschiedene pathogene *Xanthomonas*- und *Pseudomonas*-Stämme zu beobachten, die ebenfalls bei Ethylen-insensitiven Tomaten- und *Arabidopsis*-Pflanzen weniger starke Krankheitssymptome hervorriefen als bei den entsprechenden Wildtyppflanzen (Bent et al., 1992; Lund et al., 1998). Die Kolonisationsfähigkeit der Pathogene war interessanterweise in keinem dieser Beispiele eingeschränkt. Bei dem *Cmm*/Tomaten-System konnte außerdem für ausgewählte PR-Proteine auch in Ethylen-insensitiven Pflanzen nach Infektion eine verstärkte Expression festgestellt werden (Balaji et al., 2008).

In einigen Pathogen-Wirt-Systemen scheinen also Pflanzenhormone an der Ausbildung der Krankheitssymptome beteiligt zu sein. Ob die anderen nach Infektion mit *Cmm* induzierten basalen Pflanzenabwehrmechanismen der Tomate auch zu einer Verstärkung der Krankheitssymptome beitragen oder auf andere Weise an der pathogenen Interaktion beteiligt sind, ist bislang noch nicht geklärt. Des Weiteren bleibt zu untersuchen, welche Mechanismen es *Cmm* ermöglichen, trotz verstärkter Abwehrreaktionen, die Pflanze erfolgreich zu kolonisieren.

Die gute Anpassung des Stoffwechsels von *Cmm* an die Zusammensetzung des Xylemsafts ist sicher eines der wichtigsten Kriterien für die erfolgreiche Ausbreitung des Pathogens in der Tomate. Denn sobald *Cmm* in das Xylem gelangt, kann es sich dort sehr schnell verbreiten und so vielleicht auch erste Abwehrreaktionen der Pflanze überstehen. Im Gegensatz zu den

*in vitro* Bedingungen, die ein geschlossenes System darstellen, wird der Xylemsaft *in planta* ständig mit neuen Metaboliten angereichert. Folglich kann *Cmm*, solange der Xylemtransport durch die Krankheitssymptome noch nicht zu stark beeinträchtigt wurde (die Pflanze noch nicht zu stark geschädigt ist), sehr hohe Zelldichten *in planta* erreichen. Auf welche Weise die Zusammensetzung des Xylems modifiziert wird und ob und welche Verbindungen von der Pflanze stammen, ist noch zu überprüfen. Vorstellbar wäre in diesem Zusammenhang, dass auch die Dezimierung einiger Metabolite durch *Cmm* zu einem Mangel in den eigentlichen Ziel-Geweben führt und so ein erhöhter Einstrom dieser Metabolite ins Xylem induziert wird. Auf jeden Fall ist festzustellen, dass die Zusammensetzung des Xylemsafts des Wirts einen Hinweis auf die Virulenz und Kolonisationsfähigkeit des Pathogens geben kann.

### 6.3.1 Veränderung der Genexpression durch Xylemsaft und Rolle von DtxR

Die Analyse der Genexpression von NCPPB382 bei Anzucht mit Xylemsaft nicht infizierter Pflanzen (10 % Endkonzentration) im Medium zeigte, dass verglichen mit der Anzucht ohne Xylemsaftzugabe insbesondere Gene der Hydroxamatbiosynthese und des Eisentransports reprimiert wurden. Eine differentielle Genexpression der Biosynthesegene für das zweite Siderophor, ein Catecholat, das *Cmm* produzieren kann, war nicht festzustellen. Also ist anzunehmen, dass Xylemsaft Eisenverbindungen in Konzentrationen enthält, die sogar noch 14 h nach Zugabe des Xylemsafts einen Import in die Zelle ohne Zuhilfenahme des Hydroxamat-Siderophors und spezifischer Eisentransporter ermöglichen. Eisen wird im Xylem hauptsächlich in Form von  $\text{Fe}^{3+}$ -Komplexen transportiert. Übliche Liganden stellen hierbei organische Säuren wie z.B. Citrat dar (Marschner, 1997; Rellán-Alvarez et al., 2010), dessen Konzentration im Xylemsaft *mock*- oder nicht-infizierter Pflanzen mit 49-270  $\mu\text{M}$  (Citrat) bestimmt werden konnte. Die Aufnahme von Eisen kann in dieser Form, wie bereits für *Streptomyces coelicolor* gezeigt (Lensbouer et al., 2008,) über Citrat-Transporter der CitMHS-Familie erfolgen. Vertreter dieser Transporter-Familie können allerdings für unterschiedliche Metall-Citrat-Komplexe spezifisch sein. Für ein CitM-Homolog von *Streptomyces mutans* z.B. konnte nur der Transport von  $\text{Fe}^{3+}$ - und  $\text{Mn}^{2+}$ -Citrat, aber nicht von  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ - oder  $\text{Ni}^{2+}$ -Citrat beobachtet werden (Korithoski et al., 2005). CitM von *Bacillus subtilis* wiederum war spezifisch für  $\text{Mg}^{2+}$ -,  $\text{Ni}^{2+}$ -,  $\text{Mn}^{2+}$ -,  $\text{Co}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -Citrat (Krom et al., 2000). Die Induktion des Gens CMM\_2878, insbesondere 12 min nach Zugabe des Xylems, das für eine Permease der CitMHS-Familie, also möglicherweise einen Metall-Citrat-Transporter codiert, ist somit offenbar als Anpassung an die leicht zugänglichen Eisenverbindungen des Xylemsafts anzusehen.

Zumindest im Xylemsaft uninfizierter Pflanzen scheint Eisen für *Cmm* sehr leicht zugänglich zu sein, was zu einer verringerten Synthese des Alcaligin-ähnlichen Hydroxamats (Alcaligin von *Bordetella pertussis*) (Kang et al., 1996) (CMM\_2095-CMM\_2093) sowie spezifischer Eisentransporter führt. Die Eisenaufnahme wird in den meisten Bakterien von Transkriptionsregulatoren der DtxR- oder der Fur-Familie reguliert, für die z.T. auch alternative regulatorische Funktionen in der Mangan-, der Zinkaufnahme oder des

oxidativen Stresses nachgewiesen wurden (Moore & Helmann, 2005). Fur (*ferric uptake regulator*) wurde zuerst in Mutanten von *E. coli* und *Salmonella typhimurium* identifiziert, die trotz hoher Eisenkonzentrationen Siderophore bildeten (Bagg & Neilands, 1987). Fur-Homologe sind sowohl bei Gram-negativen als auch Gram-positiven Bakterien weit verbreitet. Die DtxR-Familie ist nach dem Eisen-abhängigen *diphtheria toxin regulator* von *Corynebacterium diphtheriae* benannt (Schmitt & Holmes, 1991; Boyd et al., 1990). Insbesondere in Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt, aber auch in anderen Eubakterien wurden Homologe des Dtx-Regulators identifiziert (Makui et al., 2000; Hantke, 2001). Für *Cmm* konnten je zwei Regulatoren der Fur- (FurA, FurB) und der DtxR-Familie (DtxR, SirR) identifiziert werden. Da bei allen in diesem Experiment reprimierten Genen des Eisenmetabolismus im 5'-UTR-Bereich Bindestellen für DtxR (mindestens 79 %-ige Identität zur Konsensussequenz von *Corynebacterium diphtheriae*, Lee & Holmes, 2000) vorhergesagt wurden (Gartemann et al., 2008), war anzunehmen, dass die eisenabhängige Regulierung dieser Gene durch DtxR oder SirR vermittelt wird. Weiterhin konnte Kraz (2004) bereits durch Analyse einer *dtxR*<sup>-</sup>-Mutante zeigen, dass die Biosynthesegene mindestens eines der beiden von *Cmm* gebildeten Siderophore durch DtxR reprimiert werden müssen. In Gegenwart von Eisen (in TBY Medium) bildete die Mutante im Gegensatz zu dem Kontrollstamm aber auch zu einer *sirR*<sup>-</sup>-Mutante deutlich höhere Siderophorkonzentrationen. Bei den beiden anderen *Cmm*-Stämmen konnten nur minimale Siderophormengen nachgewiesen werden (Kraz, 2004).

Durch ein vergleichendes Expressionsprofil der *dtxR*<sup>-</sup>-Mutante CMM101*dtxRA1* mit CMM101 in mit Xylemsaft supplementiertem Medium war es möglich, die regulatorische Wirkung von DtxR unter den gleichen Bedingungen wie bei den beiden Experimenten mit NCPPB382, bei denen der Einfluss von Xylemsaft untersucht wurde, zu überprüfen. Wie aufgrund der identifizierten DtxR-Bindestellen und des Phänotyps der *dtxR*<sup>-</sup>-Mutante zu erwarten war, wurden die Gene des Eisenmetabolismus in der Mutante offensichtlich nicht reprimiert und wiesen im Vergleich zum Kontrollstamm ein erhöhtes Transkriptlevel auf. Neben den Genen mit potentieller DtxR-Bindestelle zeigten auch *acnA*, *sdhA*, *sdhC* und *dpsA* in diesem Experiment einen im Vergleich zu den Xylemsaftexperimenten mit NCPPB382 entgegengesetzten Effekt. Die für eine Aconitathydratase, die Succinatdehydrogenase und ein Stress induziertes DNA-Bindeprotein codierenden Gene waren im Wildtyp nach Zugabe von Xylemsaft induziert, bei der *dtxR*<sup>-</sup>-Mutante im Vergleich zu CMM101 allerdings reprimiert.

Eine Fur-abhängige Induktion der Aconitathydratase- und Succinatdehydrogenase-Gene unter hohen Eisenkonzentrationen scheint auch in *E. coli* vorzuliegen (Gruer & Guest, 1994; Park et al., 1995). Für *E. coli* ist mittlerweile nachgewiesen, dass die Fe<sup>2+</sup>-Fur-abhängige Induktion zumindest einiger Gene wie *acnA* und *sdh* durch RhyB (kleine nicht-codierende RNA) vermittelt wird. Offenbar wirkt RhyB als Fe<sup>2+</sup>-Fur-reprimierter negativer Regulator dieser Gene (Masse & Gottesman, 2002). Ebenso wie bei *Cmm* war auch für eine *dtxR*<sup>-</sup>-Mutante von *Corynebacterium glutamicum* unter erhöhten Eisenkonzentrationen neben der Induktion einiger Gene des Eisenmetabolismus auch eine verringerte Expression von Genen,

die für eine Succinatdehydrogenase und ein Stress induziertes DNA-Bindeprotein (Dps) codieren, festzustellen (Brune et al., 2006).  $H_2O_2$  wird in Gegenwart von Eisen zu reaktiven Hydroxylradikalen umgesetzt (Fenton-Reaktion), die Zelle ist also bei erhöhter Eisenkonzentration oxidativem Stress ausgesetzt. Daher ist es durchaus plausibel, dass neben der eisenabhängigen Repression von Siderophorbiosynthese- und Transporter-Genen durch Regulatoren wie DtxR oder Fur auch Gene wie *dps* induziert werden, die die Zelle vor oxidativen Stress schützen. Dps (*starvation-induced DNA protection protein*) wurde zuerst für *E. coli* beschrieben (Almiron et al., 1992) und scheint DNA vor Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies zu schützen, indem es  $H_2O_2$  bindet und dadurch die Katalyse von  $H_2O_2$  zu Hydroxylradikalen durch  $Fe^{2+}$  verhindert und zum anderen unspezifisch an DNA bindet (Zhao et al., 2002).

DtxR von *Cmm* scheint also, ähnlich wie bereits für andere Gram-positive (*C. glutamicum*) und -negative Bakterien (*E. coli*) gezeigt, der Repressor der Siderophor (Hydroxamat)-Biosynthesegene zu sein und direkt oder indirekt die Expression von *acnA*, *dpsA*, *sdhA* und *sdhC* zu induzieren. Welche Funktion das zweite von *Cmm* gebildete Siderophor (Catechol) hat und wann es gebildet wird, bleibt zu überprüfen, ebenso wie die Rolle der drei anderen Regulatoren der Fur- (FurA, FurB) und der DtxR-Familie (SirR). Erste Untersuchungen der *sirR*-Mutante deuten daraufhin, dass SirR ein Transkriptionsregulator der Mangan-Aufnahme ist (Kraz, 2004).

Für einige Transkriptionsregulatoren der Fur- und der DtxR-Familie wurde beschrieben, dass sie neben ihrer Funktion im Eisenmetabolismus auch die Expression von Virulenzfaktoren beeinflussen. Das Diphtherie-Toxin von *Corynebacterium diphtheriae* z.B. wird nur unter Eisenmangel-Bedingungen gebildet. Ist ausreichend Eisen vorhanden, wird die Expression des entsprechenden Gens durch DtxR reprimiert (Tao et al., 1994). Ebenso konnte für viele weitere überwiegend human- oder tierpathogene Bakterien (wie z.B. *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*) gezeigt werden, dass Virulenzfaktoren unter Eisenmangelbedingungen verstärkt exprimiert werden (Litwin & Calderwood, 1993). Des Weiteren ist z.B. auch für das phytopathogene Bakterium *Dickeya chrysanthemi* (früher *Erwinia chrysanthemi*) bekannt, dass Gene, die für Pectatlyasen (*pelB*, *pelC*, *pelD* und *pelE*) codieren, unter niedrigen Eisenkonzentrationen induziert waren (Franza et al., 1999).

Im Vergleich zu CMM101 waren in CMM*dtxR*101 unter anderem vier für extrazelluläre Enzyme (PpaB1, PpaB2, PpaC, CelA) codierende Gene reprimiert, bei denen es sich um wesentliche Virulenzfaktoren handelt (*celA*, *ppaC*) (Meletzus et al., 1993; Jahr et al., 2000; Abt & Eichenlaub, unveröffentlicht) oder es vermutet werden kann (*ppaB1*, *ppaB2*). Dies könnte ein erstes Indiz dafür sein, dass eventuell auch bei *Cmm* ein Regulator des Eisenmetabolismus (direkt oder indirekt) an der Regulation von Virulenzfaktoren beteiligt sein könnte. Die von Kraz beobachtete verringerte Virulenz von CMM101*dtxRA*1 könnte demnach abgesehen von dem unter *in vitro* Bedingungen verringerten Wachstum (Kraz, 2004) auch in der reduzierten Expression einiger pathogenitätsrelevanter Gene begründet sein. Es kann also angenommen werden, dass  $Fe^{3+}$ -Citrat im Xylemsaft von Tomatenpflanzen als Signal für *Cmm* dient, durch das die Expression einiger Virulenzfaktoren induziert wird.

#### 6.4 Ausblick

Mit der Etablierung der Microarraytechnologie für *Cmm* ist es nun möglich, weitere Untersuchungen zur Interaktion von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* mit seiner Wirtspflanze auf Transkriptomebene vorzunehmen. Das vergleichende Expressionsmuster von *Cmm* in *planta* (10 dpi) und unter *in vitro*-Bedingungen (Flüssigkultur in Minimalmedium) zeigte, dass für die Anpassung von *Cmm* an sein natürliches Habitat offenbar eine differentielle Expression von 42 % aller Gene erforderlich ist. In Zukunft ist es hier besonders von Interesse, die Genexpression von *Cmm* zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion zu untersuchen. Aufgrund der Problematik genügend *Cmm*-RNA aus infizierten Pflanzen zu gewinnen, wäre allerdings zu überlegen, ob diese Untersuchung nur für ausgewählte Gene mittels *real-time*-RT-PCR erfolgt. Neben den bereits bekannten Virulenzfaktoren *CelA*, *Pat-1* usw. sollte zudem auch die Expression von Genen untersucht werden, die zu verschiedenen EPS-Clustern gehören, das Perforin codieren oder wie *CMM\_0431* (codiert für ein Hämagglutinin-ähnliches Protein) 10 Tage nach Infektion der Tomate verstärkt exprimiert wurden.

In *in vitro*-Systemen, deren Bedingungen genauer eingestellt werden können und die eine höhere Reproduzierbarkeit aufweisen, könnten zudem weitere Analysen zur Reaktion von *Cmm* auf Xylemsaft und Tomatenblatthomogenat durchgeführt werden. Möglich wäre hier z.B. erhöhte Konzentrationen dieser Substanzen zu verwenden oder den Xylemsaft bzw. das Homogenat von Pflanzen zu verwenden, die mit unterschiedlichen *Cmm*-Stämmen infiziert wurden. Da die Xylemsaftmenge insbesondere aus infizierten Pflanzen relativ gering ist, ist es fraglich, inwieweit diese Analysen mit Xylemsaft durchführbar sind. Zudem stellt sich die Frage, ob Salicylsäure, die nur in infizierten Pflanzen und mit zunehmender Virulenz des verwendeten *Cmm*-Stamms in höheren Konzentrationen nachgewiesen wurde, einen Einfluss auf *Cmm* hat. Zunächst könnte das Wuchsverhalten von *Cmm* nach Zugabe verschiedener Konzentrationen an Salicylsäure untersucht werden. Je nach dem Effekt, den die Salicylsäure auf das Wachstum von *Cmm* hat, könnte in einem weiteren Schritt das Expressionsmuster von *Cmm* nach Zugabe von Salicylsäure bestimmt werden. Auch Pflanzentests mit *SA<sup>-</sup>*-Mutanten der Tomate wären von Interesse, um zu überprüfen, ob Salicylsäure ähnlich wie Ethylen an der Ausbildung der Krankheitssymptome beteiligt ist.

Zur weiteren Analyse von *DtxR* sollte durch Verwendung anderer Eisenverbindungen wie z.B. Eisen(II)-Sulfat, untersucht werden, ob das Regulon von *DtxR* von der verwendeten Eisenverbindung abhängig ist. Hierbei wäre z.B. von besonderem Interesse, ob auch nach Zugabe von Eisen(II)-Sulfat die Virulenzgene (*celA*, *ppaC*) differentiell exprimiert werden, oder ob hierzu speziell Xylemsaft erforderlich ist.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abramovitch, R., & Martin, G. (2004). Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, *7*, 356-364.
- Abramovitch, R., Anderson, J., & Martin, G. (2006). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, *7*, 601-611.
- Abt, B. (2003). Etablierung eines Systems zur Komplementation von Transposonmutanten von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Abt, B. (2008). Untersuchungen zur Stabilität und Konjugation der Plasmide pCM1 und pCM2 von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Dissertation, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Alfano, J., & Collmer, A. (1996). Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell*, *8*, 1683-1698.
- Alfano, J., & Collmer, A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *42*, 385-414.
- Almeida, R., Tereira, E., Purcell, A., & Lopes, J. (2001). Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. *Plant Dis.*, *85*, 382-386.
- Almiron, M., Link, A., & Furlong, D. (1992). A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev.*, *6*, 2646-2654.
- Altenbuchner, J., & Cullum, J. (1984). DNA amplification and an unstable arginine gene in *Streptomyces lividans* 66. *Mol. Gen. Genet.*, *195*, 134-138.
- Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., W., M., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, *25*, 3389-3402.
- Alvarez, M. (2000). Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol. Biol.*, *44*, 429-442.
- Atkinson, S., & Williams, P. (2009). Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J. R. Soc. Interface*, *6*, 959-978.
- Bagg, A., & Neilands, J. (1987). Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol. Rev.*, *51*, 509-518.
- Bainton, N., Bycroft, B., Chhabra, S., Stead, P., Gledhill, L., Hill, P., et al. (1992). A general role for the lux autoinducer in bacterial cell signalling control of antibiotic biosynthesis in *Erwinia*. *Gene*, *116*, 87-91.
- Balaji, V., & Sessa, G. (2008). Activation and manipulation of host responses by a Gram-positive bacterium. *Plant Signal. Behav.*, *3*, 839-841.

- Balaji, V., Mayrose, M., Sherf, O., Jacob-Hirsch, J., Eichenlaub, R., Iraki, N., et al. (2008). Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiol.*, *146*, 1797-1809.
- Barras, F., van Gijsegem, F., & Chatterjee, A. (1994). Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *32*, 201-234.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., et al. (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*, *32*, D138-D141.
- Beattie, G. (2006). Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In S. Gnanamanickam, *Plant-associated bacteria* (S. 1-56). Dordrecht, Springer.
- Beimen, A., Bempohl, A., Meletzus, D., Eichenlaub, R., & Barz, W. (1992). Accumulation of phenolic compounds in leaves of tomato plants after infection with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains differing in virulence. *Z. Naturforsch.*, *47c*, 898-909.
- Bell, K., S. M., Pritchard, L., Holden, M., Hyman, L., Holeva, M., et al. (2004). Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *101*, 11105-11110.
- Bender, C., Alarcon-Chaidez, F., & Gross, D. (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, *63*, 266-292.
- Bender, C., Palmer, D., Peñaloza-Vázquez, A., Rangaswamy, V., & Ullrich, M. (1998). Biosynthesis and regulation of coronatine, a non-host-specific phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae*. *Subcell. Biochem.*, *29*, 321-41.
- Benhamou, N. (1991). Cell surface interactions between tomato and *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*: localization of some glycoproteins in infected host leaf tissues. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, *38*, 15-38.
- Bent, A., Innes, R., Ecker, J., & Staskawicz, B. (1992). Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.*, *5*, 372-378.
- Bentley, S., Corton, C., Brown, S., Barron, A., Clark, L., Doggett, J., et al. (2008). Genome of the actinomycete plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* suggests recent niche adaptation. *J. Bacteriol.*, *190*, 2150-2160.
- Bergey, D. H. (2004). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2nd Ed.). Baltimore: Williams and Wilkins.

- Bermpohl, A. (1990). Untersuchungen der pathogenen Wechselwirkungen zwischen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und der Tomate (*Lycopersicon esculentum*). Diplomarbeit, angerfertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Bermpohl, A., Dreier, J., Bahro, R., & Eichenlaub, R. (1996). Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. *Microbiol. Res.*, *151*, 391-399.
- Bhakdi, S., Weller, U., Walev, I., Martin, E., Jonas, D., & Palmer, M. (1993). A guide to the use of pore-forming toxins for controlled permeabilization of cell membranes. *Med. Microbiol. Immunol.*, *182*, 167-175.
- Bialczyk, J., Lechowski, Z., & Dziga, D. (2004). Composition of the xylem sap of tomato seedlings cultivated on media with  $\text{HCO}_3^-$  and nitrogen source as  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$ . *Plant Soil*, *263*, 265-272.
- Bischofberger, M., Gonzalez, M., & van der Goot, F. (2009). Membrane injury by pore-forming proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, *21*, 589-595.
- Bittel, P., & Robatzek, S. (2007). Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.*, *10*, 335-341.
- Bogdanove, A., Beer, S., Bonas, U., Boucher, C., Collmer, A., Coplin, D., et al. (1996). Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.*, *20*, 681-683.
- Bolwell, G., Bindschedler, L., Blee, K., Butt, V., Davies, D., Gardner, S., et al. (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.*, *53*, 1367-1376.
- Boyd, J., Oza, M., & Murphy, J. (1990). Molecular cloning and DNA sequence analysis of a diphtheria toxin iron-dependent regulatory element (*dtxR*) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *87*, 5968-5972.
- Bradshaw-Rouse, J., Whatley, M., Coplin, D., Woods, A., Sequeira, L., & Kelman, A. (1981). Agglutination of *Erwinia stewartii* strains with a corn agglutinin: Correlation with extracellular polysaccharide production and pathogenicity. *Appl. Environ. Microbiol.*, *42*, 344-350.
- Brelles-Marino, G., & Bedmar, E. (2001). Detection, purification and characterisation of quorum-sensing signal molecules in plant-associated bacteria. *J. Biotechnol.*, *91*, 197-209.
- Bremer, H., & Denis, P. (1996). Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. In F. C. Neidhart, *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology* (2 Ausg., S. 1553-1569). ASM Press, Washington D.C.
- Brisson, L., Tenhaken, R., & Lamb, C. (1994). The function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell*, *6*, 1703-1712.

- Brown, I., Mansfield, J., Taira, S., Roine, E., & Romantschuk, M. (2001). Immunocytochemical localization of HrpA and HrpZ supports a role for the Hrp pilus in the transfer of effector proteins from *Pseudomonas syringae* pv. tomato across the host plant cell wall. *Mol. Plant Microbe Interact.*, *14*, 394–404.
- Brune, I., Becker, A., Paarmann, D., Albersmeier, A., Kalinowski, J., Pühler, A., et al. (2006). Under the influence of the active deodorant ingredient 4-hydroxy-3-methoxybenzyl alcohol, the skin bacterium *Corynebacterium jeikeium* moderately responds with differential gene expression. *J. Biotechnol.*, *127*, 21–33.
- Brune, I., Werner, H., Hüser, A., Kalinowski, J., Pühler, A., & Tauch, A. (2006). The DtxR protein acting as dual transcriptional regulator directs a global regulatory network involved in iron metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Genomics*, *7*, 21.
- Büttner, D., & Bonas, U. (2002). Port of entry - the type III secretion translocon. *Trends Microbiol.*, *10*, 186–192.
- Burger, A., Gräfen, I., Engemann, J., Niermann, E., Pieper, M., Kirchner, O., et al. (2005). Identification of homologues to the pathogenicity factor, Pat-1, a putative serine protease of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Microbiol. Res.*, *160*, 417–427.
- Cámara, M., Williams, P., & Hardman, A. (2002). Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet Infect. Dis.*, *2*, 667–676.
- Carlton, W., Braun, E., & Gleason, M. (1998). Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology*, *88*, 525–529.
- Chalupowicz, L., Cohen-Kandli, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K.-H., Sessa, G., et al. (2010). Sequential expression of bacterial virulence and plant defense genes during infection of tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, *100*, 252–261.
- Chan, W., Coyle, B., & Williams, P. (2004). Virulence regulation and quorum sensing in staphylococcal infections: competitive AgrC antagonists as quorum sensing inhibitors. *J. Med. Chem.*, *47*, 4633–4641.
- Cheung, A., Bayer, A., Zhang, G., Gresham, H., & Xiong, Y. (2004). Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, *40*, 1–9.
- Chou, F., Chou, H., Lin, Y., Yang, B., Lin, N., Weng, S., et al. (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*, 265–269.
- Cleveland, W. (1979). Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J. Am. Stat. Assoc.*, *74*, 829–836.
- Cohn, J., & Martin, G. (2005). *Pseudomonas syringae* pv. tomato type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato. *Plant J.*, *44*, 139–154.

- Collmer, A., Schoedel, C., Roeder, D., Ried, J., & Rissler, J. (1985). Molecular cloning in *Escherichia coli* of *Erwinia chrysanthemi* genes encoding multiple forms of pectate lyase. *J. Bacteriol.*, *161*, 913-920.
- Conway, T., & Schoolnik, G. (2003). Microarray expression profiling: capturing a genome-wide portrait of the transcriptome. *Mol. Microbiol.*, *47*, 879-889.
- Cornelis, G., & Van Gijsegem, F. (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.*, *54*, 735-774.
- Cosgrove, D. (1998). Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiol.*, *118*, 333-339.
- Daniels, M., Dow, J., & Osbourn, A. (1988). Molecular genetics of pathogenicity in phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *26*, 285-312.
- Davis, M., Gillaspie, A., Vidaver, A., & Harris, R. (1984). *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov. pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. *Int. J. Syst. Bact.*, *34*, 107-117.
- de Kievit, R., & Iglewski, B. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *J. Bacteriol.*, *68*, 4839-4849.
- de Souza, A., Takita, M., Coletta-Filho, H. D., Caldana, C., Goldman, T., Yanai, T., et al. (2003). Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. *Mol. Plant Microbe Interact.*, *16*, 867-875.
- de Souza, A., Takita, M., Pereira, E., Coletta-Filho, H., & Machado, M. (2005). Expression of pathogenicity-related genes of *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. *Curr. Microbiol.*, *50*, 223-228.
- Denny, T., Carney, B., & Schell, M. (1990). Inactivation of multiple virulence genes reduces the ability of *Pseudomonas solanacearum* to cause wilt symptoms. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, *3*, 293-300.
- Denny, T., Makini, F., & Brumbley, S. (1988). Characterization of *Pseudomonas solanacearum* Tn5 mutants deficient in extracellular polysaccharide. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, *1*, 215-223.
- Dolph, P., Majerczak, D., & Coplin, D. (1988). Characterization of a gene cluster for exopolysaccharide biosynthesis and virulence in *Erwinia stewartii*. *J. Bacteriol.*, *170*, 865-871.
- Dondrup, M., Albaum, S., Griebel, T., Henckel, K., Jünemann, S., Kahlke, T., et al. (2009). EMMA 2--a MAGE-compliant system for the collaborative analysis and integration of microarray data. *BMC Bioinformatics*, *10*, 50.
- Dondrup, M., Goesmann, A., Bartels, D., Kalinowski, J., Krause, L., Linke, B., et al. (2003). EMMA: a platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data. *J. Biotechnol.*, *106*, 135-146.

- Dow, M., Newman, M., & von Roepenack, E. (2000). The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharids. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *38*, 241-261.
- Dreier, J., Meletzus, D., & Eichenlaub, R. (1997). Characterization of the plasmid encoded virulence region *pat-1* of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, *10*, 195–206.
- Dudoit, S., Yang, Y., Callow, M., & Speed, T. (2002). Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. *Statistica Sinica*, *12*, 111-139.
- Durrant, W., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *42*, 185-209.
- Duval, I., Brochu, V., Simard, M., Beaulieu, C., & Beaudoin, N. (2005). Thaxtomin A induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells. *Planta*, *222*, 820-831.
- Eberhard, A. (1972). Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J. Bacteriol.*, *109*, 1101-1105.
- Eisen, M., & Brown, P. (1999). DNA arrays for analysis of gene expression. *Meth. Enzymol.*, *303*, 179-205.
- EPPO/CABI. (2005). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *EPPO Bulletin*, *35*, 275-283.
- Eynck, C., Koopmann, B., Grunewaldt-Stoecker, G., Karlovsky, P., & von Tiedemann, A. (2007). Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *Eur. J. Plant Pathol.*, *118*, 259–274.
- Fatmi, M., & Schaad, N. (2002). Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathol.*, *51*, 149-154.
- Felix, G., & Boller, T. (2003). Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J. Biol. Chem.*, *278*, 6201–6208.
- Feys, B., & Parker, J. (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet.*, *16*, 449-455.
- Feys, B., Benedetti, C., Penfold, C., & Turner, J. (1994). *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell*, *6*, 751-759.

- Flavier, A., Ganova-Raeva, L., Schell, M., & Denny, T. (1997). Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum*: control of acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J. Bacteriol.*, *179*, 7089-7097.
- Flor, H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *9*, 275-296.
- Flor, H. (1955). Host-parasite interaction in flax rust – its genetics and other implications. *Phytopathology*, *45*, 680-685.
- Folcher, M., Gaillard, H., Nguyen, L., Nguyen, K., Lacroix, P., Bamas-Jacques, N., et al. (2001a). Pleiotropic functions of a *Streptomyces pristinaespiralis* autoregulator receptor in development, antibiotic biosynthesis and expression of a superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, *276*, 44297-44306.
- Folcher, M., Morris, R., Dale, G., Salah-Bey-Hocini, K., Viollier, P., & Thompson, C. (2001b). A transcriptional regulator of a pristinomycin resistance gene in *Streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.*, *276*, 1479-1485.
- Franza, T., Sauvage, C., & Expert, D. (1999). Iron regulation and pathogenicity in *Erwinia chrysanthemi* 3937: role of the Fur repressor protein. *Mol. Plant Microbe Interact.*, *12*, 119-128.
- Fulkerson, J. (1960). Pathogenicity and stability of strains of *Corynebacterium insidiosum*. *Phytopathology*, *50*, 377-380.
- Fuqua, W., Winans, S., & Greenberg, E. (1994). Quorum-sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.*, *176*, 269-275.
- Gartemann, K.-H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., et al. (2008). The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J. Bacteriol.*, *190*, 2138-2149.
- Gitaitis, R. (1990). Induction of a hypersensitivelike reaction in four o'clock by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Dis.*, *74*, 58-60.
- Godsey, M., Zheleznova Heldwein, E., & Brennan, R. (2002). Structural biology of bacterial multidrug resistance gene regulators. *J. Biol. Chem.*, *277*, 40169-40172.
- Gomez-Gomez, L., & Boller, T. (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.*, *7*, 251-256.
- González, E., & Allen, C. (2003). Characterization of a *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galacturonic acid. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, *16*, 536-544.
- Gonzalez, M., Bischofberger, M., Pernot, L., van der Goot, F., & Freche, B. (2008). Bacterial pore-forming toxins: the (w)hole story? *Cell. Mol. Life Sci.*, *65*, 493-507.

- Gottig, N., Garavaglia, B., Garofalo, C., Orellano, E., & Ottado, J. (2009). A Filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. *PLoS One*, *4*, e4358.
- Gräfen, I. (2005). Identifizierung eines Gens von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* für die Kolonisation von *Solanum lycopersicum*. Dissertation, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Grant, S., Jessee, J., Bloom, F., & Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylaton-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *87*, 4645-4649.
- Greenberg, J., Guo, A., Klessig, D., & Ausubel, F. (1994). Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell*, *77*, 551-563.
- Grkovic, S., Brown, M., Roberts, N., Paulsen, I., & Skurray, R. (1998). QacR is a repressor protein that regulates expression of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pump QacA. *J. Biol. Chem.*, *273*, 18665-18673.
- Gruer, M., & Guest, J. (1994). Two genetically-distinct and differentially-regulated aconitases (AcnA and AcnB) in *Escherichia coli*. *Microbiology*, *140*, 2531-2541.
- Grunberg-Manago, M. (1996). Regulation of the expression of aminoacyl-tRNA synthetases and translation factors. In F. C. Neidhart, *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology* (2. Ausg., S. 1432-1457). ASM Press, Washington D.C.
- Hantke, K. (2001). Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, *4*, 172-177.
- Hauben, L., Moore, E., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., et al. (1998). Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Syst. Appl. Microbiol.*, *21*, 384-397.
- He, S.Y., Nomura, K., & Whittam, T.S. (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta*, *1694*, 181-206.
- Healy, F., Krasnoff, S., Wach, M., Gibson, D., & Loria, R. (2002). Involvement of a cytochrome P450 monooxygenase in thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces acidiscabies*. *J. Bacteriol.*, *184*, 2019-2029.
- Healy, F., Wach, M., Krasnoff, S., Gibson, D., & Loria, R. (2000). The *txtAB* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Mol. Microbiol.*, *38*, 794-804.
- Hengge-Aronis, R. (1996). Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In F. C. Neidhart, *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology* (2. Ausg., S. 1497-1512). ASM Press, Washington D.C.
- Hildebrandt, D. (1971). Pectate and pectin gels for differentiation of *Pseudomonas* sp. and other bacterial plant pathogens. *Phytopathology*, *61*, 1430-1436.

- Hillen, W., & Berens, C. (1994). Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu. Rev. Microbiol.*, *48*, 345-369.
- Holtsmark, I., Takle, G., & Brurberg, M. (2008). Expression of putative virulence factors in the potato pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* during infection. *Arch. Microbiol.*, *189*, 131-139.
- Hopkins, D. (1989). *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *27*, 271-290.
- Hu, W., Yuan, J., Jin, Q.-L., Hart, P., & He, S. (2001). Immunogold labeling of Hrp pili of *Pseudomonas syringae* pv. tomato assembled in minimal medium and in planta. *Mol. Plant Microbe Interact.*, *14*, 234-241.
- Huang, Q., & Allen, C. (2000). Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, *57*, 77-83.
- Hueck, C. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, *62*, 379-433.
- Hüser, A., Becker, A., Brune, I., Dondrup, M., Kalinowski, J., Plassmeier, J., et al. (2003). Development of a *Corynebacterium glutamicum* DNA microarray and validation by genome-wide expression profiling during growth with propionate as carbon source. *J. Biotechnol.*, *106*, 269-286.
- Iacovache, I., van der Goot, F., & Pernot, L. (2008). Pore formation: an ancient yet complex form of attack. *Biochim. Biophys. Acta*, *1778*, 1611-1623.
- Innes, R., Bent, A., Kunkel, B., Bisgrove, S., & Staskawicz, B. (1993). Molecular analysis of avirulence gene *avrRpt2* and identification of a putative regulatory sequence common to all known *Pseudomonas syringae* avirulence genes. *J. Bacteriol.*, *175*, 4859-4869.
- Jahr, H. (2000). Characterization of the endo-beta-1,4-glucanase CelsA, a phytopathogenic determinant secreted by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and its role in symptom development. Dissertation, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R., & Eichenlaub, R. (2000). The endo-beta-1,4-glucanase CelsA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.*, *13*, 703-714.
- Ji, G., Beavis, R., & Novick, R. (1995). Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *92*, 12055-12059.
- Jones, J., & Dangl, J. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*, 323-329.
- Kanehisa, M. (1996). Toward pathway engineering: a new database of genetic and molecular pathways. *Science & Technology Japan*, *59*, 34-38.

- Kanehisa, M., Araki, M., Goto, S., Hattori, M., Hirakawa, M., Itoh, M., et al. (2008). KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res.*, *36*, D480-D484.
- Kang, H., Brickmann, T., Beaumont, F., & Armstrong, S. (1996). Identification and characterization of iron-regulated *Bordetella pertussis* alcaligin siderophore biosynthesis genes. *J. Bacteriol.*, *178*, 4877-4884.
- Kao, C., Barlow, E., & Sequeira, L. (1992). Extracellular polysaccharide is required for wild-type virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.*, *174*, 1068-1071.
- Katzen, F., Ferreira, D., Oddo, C., Ielmini, M., Becker, A., Pühler, A., et al. (1998). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *J. Bacteriol.*, *180*, 1607-1617.
- Kaup, O. (2009). Die Tomatinase von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Dissertation, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Kaup, O., Gräfen, I., Zellermann, E., Eichenlaub, R., & Gartemann, K. (2005). Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Mol. Plant Microbe Interact.*, *18*, 1090-1098.
- Kauss, H. (1987). Callose-Synthese: Regulation durch induzierten  $Ca^{2+}$ -Einstrom in Pflanzenzellen. *Naturwissenschaften*, *74*, 275-281.
- Keener, J., & Nomura, M. (1996). Regulation of ribosome synthesis. In F. C. Neidhart, *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology* (2. Ausg., S. 1417-1431). ASM Press, Washington D.C.
- Kers, J., Wach, M., Krasnoff, S., Widom, J., Cameron, K., Bukhalid, R., et al. (2004). Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. *Nature*, *429*, 79-82.
- Kim, J., Jeon, E., Oh, J., Moon, J., & Hwang, I. (2004). Mutational analysis of *Xanthomonas* harpin HpaG identifies a key functional region that elicits the hypersensitive response in nonhost plants. *J. Bacteriol.*, *186*, 6239-6247.
- Kiraly, Z., El-Zahaby, H., & Klement, Z. (1997). Role of extracellular polysaccharide (EPS) slime of plant pathogenic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. *J. Phytopathol.*, *145*, 59-68.
- Kirchner, O. (2003). Etablierung genetischer Methoden für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Charakterisierung von Mutanten mit veränderter Morphologie, Physiologie und Virulenz. Dissertation, angefertigt am Lehrstuhl für Mikrobiologie und Gentechnologie, Universität Bielefeld.
- Kirchner, O., Gartemann, K.-H., Zellermann, E.-M., Eichenlaub, R., & Burger, A. (2001). A highly efficient transposon mutagenesis system for the tomato pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, *14*, 216-228.

- Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J., Yvin, J., Kopp, M., Kloareg, B., et al. (2000). Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol.*, *124*, 1027-1038.
- Kleitman, F., Barash, I., Burger, A., Iraki, N., Falah, Y., Sessa, G., et al. (2008). Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *Eur. J. Plant Pathol.*, *121*, 463-475.
- Klement, Z., Farkas, G., & Lovrekovich, L. (1964). Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology*, *54*, 474-477.
- Klesig, D., & Malamy, J. (1994). The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol Biol.*, *26*, 1439-1458.
- Kloek, A., Verbsky, M., Sharma, S., Schoelz, J., Vogel, J., Klessig, D., et al. (2001). Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *Plant J.*, *26*, 509-522.
- Korithoski, B., Krastel, K., & Cvitkovich, D. (2005). Transport and metabolism of citrate by *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.*, *187*, 4451-4456.
- Kraz, H. (2004). Identifizierung und Charakterisierung von Regulatoren des Eisenstoffwechsels und des oxidativen Stresses in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Krom, B., Warner, J., Konings, W., & Lolkema, J. (2000). Complementary metal ion specificity of the metal-citrate transporters CitM and CitH of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, *182*, 6374-6381.
- Kunkel, B., & Brooks, D. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.*, *5*, 325-331.
- Laine, M., Haapalainen, M., Wahlroos, T., Kankarea, K., Nissinen, R., Kassuwi, S., et al. (2000). The cellulase encoded by the native plasmid of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* plays a role in virulence and contains an expansin-like domain. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, *57*, 221-233.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., & Lanzdunski, A. (1996). A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhlR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol. Microbiol.*, *13*, 117-1146.
- Lawrence, C., Clark, M., & King, R. (1990). Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. *Phytopathology*, *80*, 606-608.
- Lazazzera, B. (2000). Quorum-sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Curr. Opin. Microbiol.*, *3*, 177-182.
- Leach, J., & White, F. (1996). Bacterial avirulence genes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *34*, 153-179.

- Lee, J., & Holmes, R. (2000). Characterization of specific nucleotide substitutions in DtxR-specific operators of *Corynebacterium diphtheriae* that dramatically affect DtxR binding, operator function, and promoter strength. *J. Bacteriol.*, 432-438.
- Leigh, J., & Coplin, D. (1992). Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Microbiol.*, 46, 307-346.
- Lensbouer, J., Patel, A., Sirianni, J., & Doyle, R. (2008). Functional characterization and metal ion specificity of the metal-citrate complex transporter from *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.*, 190, 5616–5623.
- Lithgow, J., Wilkinson, A., Hardman, A., Rodelas, B., Wisniewski-Dyé, F., Williams, P., et al. (2000). The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Mol. Microbiol.*, 37, 81-97.
- Litwin, C., & Calderwood, S. (1993). Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6, 137-149.
- Liu, H., Zhang, S., Schell, M.A., & Denny, T.P. (2005). Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 18, 1296–1305.
- Loake, G., & Grant, M. (2007). Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10, 466-472.
- Loria, R., Kers, J., & Joshi, M. (2006). Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 469-487.
- Lund, S., Stall, R., & Klee, H. (1998). Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell*, 10, 371-382.
- Madden, J., Ruiz, N., & Caparon, M. (2001). Cytolysin-mediated translocation (CMT): A functional equivalent of type III secretion in Gram-positive bacteria. *Cell*, 104, 143-152.
- Makui, H., Roig, E., Cole, S., Helmann, J., Gros, P., & Cellier, M. (2000). Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol. Microbiol.*, 35, 1065-1078.
- Maniatis, T., Fritsch, W., & Sambrook, J. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J., Chitsaz, F., Gerbyshire, M., DeWeese-Scott, C., Fong, J., et al. (2009). CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res.*, 205-210.
- Marie, C., Broughton, W., & Deakin, W. (2001). *Rhizobium* typeIII secretion systems: legume charmers or alarmers? *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, 336-342.
- Marinus, M., & Morris, N. (1973). Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 114, 1143-1150.
- Marschner, H. (1997). Mineral Nutrition of Higher Plants (2 Ausg.). Academic Press London.

- Masse, E., & Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *99*, 4620-4625.
- Mayer, K. (2006). Versuche zur Identifikation regulatorischer Proteine bei *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Mikrobiologie und Gentechnologie, Universität Bielefeld.
- Meletzus, D., & Eichenlaub, R. (1991). Transformation of the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* by electroporation and development of a cloning vector. *J. Bacteriol.*, *173*, 184-190.
- Meletzus, D., Bempohl, A., Dreier, J., & Eichenlaub, R. (1993). Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *J. Bacteriol.*, *175*, 2131-2136.
- Melkonyan, H. (1993). Klonierung und Charakterisierung des chromosomalen *pat-1*-Locus. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., & He, S. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, *126*, 969-980.
- Meyer, F., Goesmann, A., McHardy, A., Bartels, D., Bekel, T., Clausen, J., et al. (2003). GenDB - an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res.*, *31*, 2187-2195.
- Milagres, A., Machuca, A., & Napoleão, D. (1999). Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrom azurol S (CAS) agar plate assay. *J. Microbiol. Meth.*, *37*, 1-6.
- Mittal, S., & Davis, K. (1995). Role of the phytotoxin coronatine in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.*, *8*, 165-171.
- Moore, C., & Helmann, J. (2005). Metal ion homeostasis in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.*, *8*, 188-195.
- Mudgett, M. (2005). New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, *56*, 509-531.
- Mudgett, M., & Staskawicz, B. (1999). Characterization of the *Pseudomonas syringae* pv. tomato AvrRpt2 protein: demonstration of secretion and processing during bacterial pathogenesis. *Mol. Microbiol.*, *32*, 927-942.
- Nicholas, K., Nicholas, H., & Deerfield, D. (1997). Genedoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBnew News*, *4*, 14.
- Niehaus, K., Kapp, D., & Pühler, A. (1993). Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPSI)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. *Planta*, *190*, 415-425.

- Niermann, E. (1997). Ortsspezifische Mutagenese der *pat-1* Region des Plasmids pCM2 von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Nimtz, M., Mort, A., Wray, V., Domke, T., Zhang, Y., Coplin, D. L., et al. (1996). Structure of stewartan, the capsular exopolysaccharide from the corn pathogen *Erwinia stewartii*. *Carbohydr. Res.*, *288*, 189-201.
- Nissinen, R., Lai, F.-M., Laine, M., Bauer, P., Reilley, A., Li, X., et al. (1997). *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* elicits a hypersensitive response in tobacco and secretes hypersensitive response-inducing protein(s). *Phytopathology*, *87*, 678-684.
- Novick, R., & Geisinger, E. (2008). Quorum sensing in Staphylococci. *Annu. Rev. Genet.*, *42*, 541-564.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B., & Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.*, *198*, 249-266.
- O'Donnell, P., Jones, J., Antoine, F., Ciardi, J., & Klee, H. (2001). Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *Plant J.*, *25*, 315-323.
- O'Donnell, P., Schmelz, E., Block, A., Miersch, O., Wasternach, C., Jones, J., et al. (2003). Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense response. *Plant Physiol.*, *133*, 1181-1189.
- Park, S.-J., Tseng, C.-P., & Gunsalus, R. (1995). Regulation of succinate dehydrogenase (*sdhCDAB*) operon expression in *Escherichia coli* in response to carbon supply and anaerobiosis: Role of ArcA and Fnr. *Mol. Microbiol.*, *15*, 473-482.
- Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, *29*, e45.
- Pieper, M. (2001). Untersuchungen am Plasmid pCM2 von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: Identifizierung der *pat-1*-homologen Gene *phpA* und *phpB* und Nachweis der Konjugation. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Pipkin, M., & Lieberman, J. (2007). Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr. Opin. Immunol.*, *19*, 301-308.
- Pirhonen, M., Saarilahti, H., Karlsson, M.-B., & Palva, E. (1991). Identification of pathogenicity determinants of *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* by transposon mutagenesis. *Mol. Plant Microbe Interact.*, *4*, 276-283.
- Ponting, C. (1999). Chlamydial homologues of the MACPF (MAC/perforin) domain. *Curr. Biol.*, *9*, R911-913.
- Purcell, A., & Hopkins, D. (1996). Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *34*, 131-151.

- Qazi, S., Counil, E., Morrissey, J., Rees, C., Cockayne, A., Winzer, K., et al. (2001). *agr* expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. *Infect. Immun.*, *69*, 7074–7082.
- Ramos, J., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., et al. (2005). The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, *69*, 326-356.
- Ratzinger, A., Riediger, N., von Tiedemann, A., & Karlovsky, P. (2009). Salicylic acid and salicylic acid glucoside in xylem sap of *Brassica napus* infected with *Verticillium longisporum*. *J. Plant Res.*, *122*, 571–579.
- R-Development-Core-Team. (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rellán-Alvarez, R., Giner-Martínez-Sierra, J., Orduna, J., Orera, I., Rodríguez-Castrillón, J., García-Alonso, J., et al. (2010). Identification of a tri-iron(III), tri-citrate complex in the xylem sap of iron-deficient tomato resupplied with iron: new insights into plant iron long-distance transport. *Plant Cell. Physiol.*, *51*, 91-102.
- Rico, A., & Preston, G. (2008). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 uses constitutive and apoplast-induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients that are abundant in the tomato apoplast. *Mol. Plant Microbe Interact.*, *21*, 269-282.
- Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R., & Willmitzer, L. (2000). Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J.*, *23*, 131-142.
- Rojas, C., Ham, J., Deng, W., Doyle, J., & Collmer, A. (2002). HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana glauca* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *99*, 13142–13147.
- Rosado, C., Buckle, A., Law, R., Butcher, R., Kan, W., Bird, C., et al. (2007). A common fold mediates vertebrate defense and bacterial attack. *Science*, *317*, 1548-1551.
- Rouch, D., Cram, D., DiBerardino, D., Littlejohn, T., & Skurray, R. (1990). Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins. *Mol. Microbiol.*, *4*, 2051-2062.
- Rüberg, S., Tian, Z., Krol, E., Linke, B., Meyer, F., Wang, Y., et al. (2003). Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J. Biotechnol.*, *106*, 255-268.
- Ruiz, N., Wang, B., Pentland, A., & Caparon, M. (1998). Streptolysin O and adherence synergistically modulate proinflammatory responses of keratinocytes to group A Streptococci. *Mol. Microbiol.*, *27*, 337-346.
- Saile, E., McGarvey, J., Schell, M., & Denny, T. (1997). Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology*, *87*, 1264-1271.

- Schaefer, A., Greenberg, E., Oliver, C., Oda, Y., Huang, J., Bittan-Banin, G., et al. (2008). A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals. *Nature*, *454*, 595-599.
- Schauer, K. (2004). Genetische und biochemische Analyse der Exopolysaccharid-Biosynthese von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Untersuchung ihrer Rolle in der Pathogenität. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Scheible, W., Fry, B., Kochevenko, A., Schindelasch, D., Zimmerli, L., Somerville, S., et al. (2003). An *Arabidopsis* mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose inhibitor from *Streptomyces* species. *Plant Cell*, *15*, 1781-1794.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R., & Brown, P. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, *270*, 467-470.
- Schlösser, E. (1997). Allgemeine Phytopathologie, 2. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme Verlag.
- Schmitt, M., & Holmes, R. (1991). Iron-dependent regulation of diphtheria toxin and siderophore expression by the cloned *Corynebacterium diphtheriae* repressor gene *dtxR* in *C. diphtheriae* C7 strains. *Infect. Immun.*, *59*, 1899–1904.
- Schott, S. (2004). Charakterisierung von Transposonmutanten von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* mit veränderter Virulenz. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Serrania, J., Vorhölter, F., Niehaus, K., Pühler, A., & Becker, A. (2008). Identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* galactose utilization genes from transcriptome data. *J. Biotechnol.*, *135*, 309-317.
- Shaw, P., Ping, G., Daly, S., Cronan, J., Rinehart, K., & Farrand, S. (1997). Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *94*, 6036-6041.
- Shcherban, T., Shi, J., Durchko, D., Gultinan, M., McQueen-Mason, S., Shieh, M., et al. (1995). Molecular cloning and sequence analysis of expansins – a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *92*, 9245-9249.
- Simpson, A., Reinach, F., Arruda, P., Abreu, F., Acencio, M., Alvarenga, R., et al. (2000). The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the organization for nucleotide sequencing and analysis. *Nature*, *406*, 151-159.
- Smadja, B., Latour, X., Faure, D., Chevalier, S., Dessaux, Y., & Orange, N. (2004). Involvement of N-acylhomoserine lactones throughout plant infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). *Mol. Plant Microbe Interact.*, *17*, 1269-1278.
- Stackebrandt, E., Rainey, F., & Ward-Rainey, N. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, *47*, 479-491.

- Steingröver, M. (2003). Charakterisierung der *chp*-Region von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Stork, I., Gartemann, K.-H., Burger, A., & Eichenlaub, R. (2008). A family of serine proteases of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: *chpC* plays a role in colonization of the host plant tomato. *Mol. Plant Pathol.*, *9*, 599-608.
- Strider, D. (1969). Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. A literature review and bibliography. North Carolina Agricultural Experiment Station. *Tech. Bull.*, *193*.
- Sturn, A., Quackenbush, J., & Trajanoski, Z. (2002). Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics*, *18*, 207-208.
- Tao, X., Schiering, N., Zeng, H., Ringe, D., & Murphy, J. (1994). Iron, DtxR, and the regulation of diphtheria toxin expression. *Mol. Microbiol.*, *14*, 191-197.
- Tatusov, R., Koonin, E., & Lipman, D. (1997). A genomic perspective on protein families. *Science*, *278*, 631-637.
- Tatusov, R., Koonin, E., Feodorova, N., Jackson, J., Jacobs, A., Kiryotin, B., et al. (2003). The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics*, *4*, 41.
- Tauch, A., Zheng, Z., Pühler, A., & Kalinowski, J. (1998). The *Corynebacterium striatum* resistance transposon Tn5564: genetic organization and transposition in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, *40*, 126-139.
- Tegg, R., Melian, L., Wilson, C., & Shabala, S. (2005). Plant cell growth and ion flux responses to the streptomyces phytotoxin thaxtomin A: calcium and hydrogen flux patterns revealed by the non-invasive MIFE technique. *Plant Cell Physiol.*, *46*, 638-648.
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. (1997). CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, *25*, 4876-82.
- Toth, I., & Birch, P. (2005). Rotting softly and stealthily. *Curr. Opin. Plant Biol.*, *8*, 424-429.
- Tsiantos, J. (1987). Transmission of *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. *J. Phytopathol.*, *119*, 142-146.
- Van Alfen, N., McMillan, B., & Wang, Y. (1987). Properties of the extracellular polysaccharides of *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum* that may effect pathogenesis. *Phytopathology*, *77*, 501-505.
- Van Gijsegem, F., Genin, S., & Boucher, C. (1993). Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. *Trends Microbiol.*, *1*, 175-180.
- Vidaver, A. (1982). The plant pathogenic corynebacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, *36*, 495-517.
- Vieira, J., & Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for intertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, *19*, 259-268.

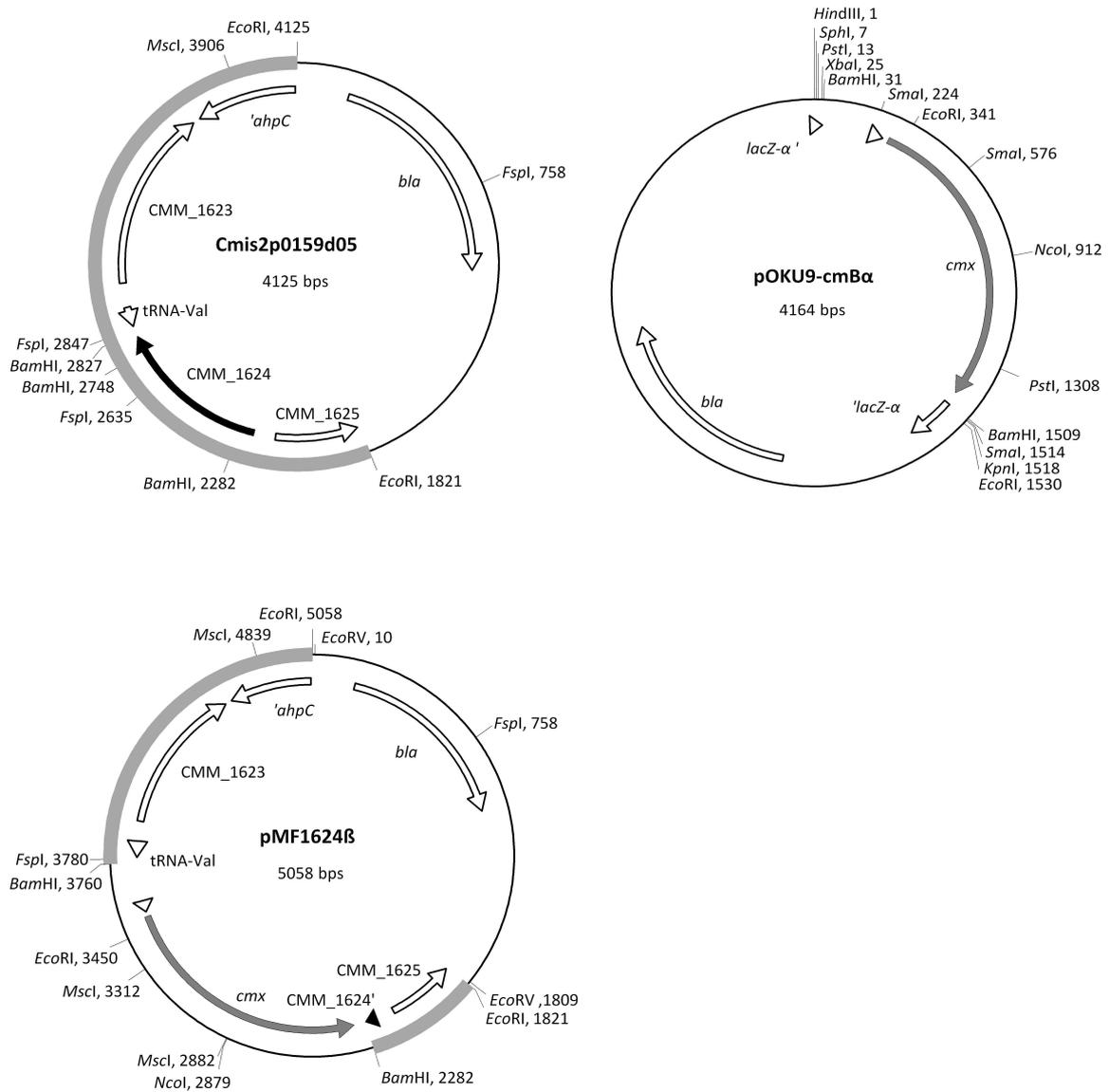
- Viprey, V., Del Greco, A., Golinowski, W., Broughton, W., & Perret, X. (1998). Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol. Microbiol.*, *28*, 1381-1389.
- Wallis, F. (1977). Ultrastructural histopathology of tomato plants infected with *Corynebacterium michiganense*. *Physiol. Plant Pathol.*, *13*, 333-342.
- Williams, P. (2007). Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology*, *153*, 3923-3938.
- Williams, P., Winzer, K., Chan, W., & Cámara, M. (2007). Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Phil. Trans. R. Soc. B*, *362*, 1119-1134.
- Winter, M. (2008). Charakterisierung von Transkriptionsregulatoren von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Winzer, K., Hardie, K., & Williams, P. (2002). Bacterial cell to-cell communication: sorry, can't talk now—gone to lunch! *Curr. Opin. Microbiol.*, *5*, 216–222.
- Wuster, A., & Babu, M. (2008). Conservation and evolutionary dynamics of the *agr* cell-to-cell communication system across firmicutes. *J. Bacteriol.*, *190*, 743-746.
- Yamaguchi, I., Yamada, A., Hong, N., Ogawa, T., Ishii, T., & Shibuya, N. (2000). Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: beta-glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension cultured rice cells. *Plant Cell*, *12*, 817-826.
- Yang, Y., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D., Peng, V., Ngai, J., et al. (2002). Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.*, *30*, e15.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, *33*, 103-119.
- Ye, R., Wang, T., Beszyk, L., & Croker, K. (2001). Applications of DNA microarrays in microbial systems. *J. Microbiol. Methods*, *47*, 257-272.
- Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., et al. (2004). Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *101*, 15811-15816.
- Zhao, G., Ceci, P., Ilari, A., Giangiacomo, L., Laue, T., Chiancone, E., et al. (2002). Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells - A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, *277*, 27689-27696.
- Zhao, Y., Thilmony, R., Bender, C., Schaller, A., He, S., & Howe, G. (2003). Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. tomato promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *Plant J.*, *36*, 485-499.

---

Zhou, L., Hu, Q., Johansson, A., & Dixelius, C. (2006). *Verticillium longisporum* and *Verticillium dahliae*: infection and disease in *Brassica napus*. *Plant Pathol.*, 55, 137–144.

## 8 Anhang

### 8.1 Plasmidkarten



**Abbildung 8.1:** Karten der Plasmide Cmis2p0159d05, pOKU9-cmBα und pMF1624β.

## 8.2 Einteilung der *Cmm*-Gene in funktionelle Gruppen

**Tabelle 8.1:** Funktionelle Gruppeneinteilung aller auf dem Microarray *Cmm3kOLI* repräsentierten *Cmm*-Gene. Die Gruppe „hypothetische Proteine“ enthält auch die 108 in der manuellen Annotation verworfenen ORFs. Informationen zu jedem einzelnen Gen befinden sich auf der dieser Arbeit beiliegenden CD (S. 189).

Gruppe	Anzahl
<b>I Metabolismus</b>	<b>578</b>
<b>Energie-, Kohlenstoffmetabolismus</b>	<b>212</b>
Glycolyse	27
Pentose-Phosphatweg	26
Citrat Zyklus	25
oxidative Phosphorylierung	20
übrige Zucker und andere C-Verbindungen	21
Energie, Rest	2
Pyruvat, Umwandlungsreaktionen verschiedener Energieträger (ATP; PO <sub>4</sub> ; NAD(P))	5
n-Glycan (Glucosidasen)	40
Aminozucker	10
Nukleotidzucker	3
Inositol	7
Epimerasen / Isomerasen	19
Zuckeraktivierung (Phosphatasen)	7
<b>Aminosäuren</b>	<b>134</b>
Aminotransferasen	6
Asparagin, Aspartat, Glutamin, Glutamat, Alanin	10
Prolin, Arginin	15
Glycin, Serin, Threonin	12
Lysin, Valin, Threonin	25
Histidin	10
aromatische AS (Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin)	21
Methionin, Cystein	18
Harnstoff	5
Katabolismus und Proteinmodifikation	12
<b>Nukleotide</b>	<b>60</b>
Purin	39
Pyrimidin	15
Nukleotide, Rest	6
<b>Lipide</b>	<b>47</b>
Fettsäuren	25
Carotinoid-/Chinonvorstufensynthese (Steroidbiosynthese)	4
Lipide, Rest	18
<b>Coenzyme</b>	<b>83</b>
Pantothenat	13
Vitamin B6	6
Riboflavin	6
Nicotinsäure	4
Thiamin	3
Folsäure	8
Hämoglobin	17
Menachinon	10
Molybdän	7
Lipoat	4
S-Adenosyl-Methionin	5

<b>Sekundärmetabolismus</b>		<b>42</b>
Phosphat		11
Eisen		16
Chalcon, Lantibiotikum		8
Carotinoid		7
<b>II Zelluläre Prozesse</b>		<b>177</b>
<b>Zellzyklus</b>		<b>34</b>
Teilung		13
Partitionierung		21
<b>Zellwand</b>		<b>143</b>
Peptidoglycanbiosynthese		25
Undecaprenol	<b>Biosynthese</b>	4
Teichonsäuren		10
Glycosyltransferasen		18
Zelloberfläche		19
Sortasen		2
EPS-Cluster I	<b>EPS</b>	11
EPS-Cluster II		19
EPS-Cluster III		22
EPS-Cluster IV		13
<b>III Informationsspeicherung und -prozessierung</b>		<b>277</b>
<b>Replikation</b>		<b>116</b>
Replikation		26
DNA Polymerasen		9
Reparatur		19
Glycosylasen (z.T. an Reparatur beteiligt)		9
Methylierung		6
Nukleasen		10
Rekombination		15
Transposasen etc.		8
Replikation, Rest		14
<b>Transkription</b>		<b>24</b>
Transkription		11
weitere an der Transkription beteiligte Proteine		13
<b>Translation</b>		<b>137</b>
ribosomale Proteine		54
tRNA-Prozessierung und Modifikation		23
Initiation, Elongation, Termination		12
Translation, Rest		41
GTP Bindeproteine		7
<b>IV Potentiell relevant für die phytopathogene Interaktion</b>		<b>921</b>
<b>Transporter</b>		<b>393</b>
ABC, ohne weitere Zuordnung	<b>ABC</b>	21
ABC, Energiemetabolismus		2
ABC, Zellteilung		2
ABC, Aminosäuren		53
ABC, Zucker		74
ABC, Zellwand		12
ABC, anorganische Ionen		50
ABC, Abwehr		18
Permeasen, ohne weitere Zuordnung	<b>Permeasen</b>	57
Permeasen, Energiemetabolismus		8

Permeasen, Aminosäuren		9
Permeasen, Nukleotide		4
Permeasen, Zucker		11
Permeasen, Coenzyme	<b>Permeasen</b>	1
Permeasen, Zellwand		2
Permeasen, anorganische Ionen		29
Permeasen, Abwehr		8
Transporter, Energie		12
Kanäle		4
Phosphotransferasesysteme		16
<b>Proteintransport</b>		<b>61</b>
Sec-System		7
Tat-System		3
Signalpeptidase	<b>TypII-Sekretionssystem</b>	7
Signalerkennung ( <i>signal recognition</i> )		2
Konjugation		30
Piline		12
<b>Regulatoren</b>		<b>288</b>
Transkriptionsregulatoren		179
Zwei-Komponenten-Regulatoren		59
<i>winged helix</i> DNA Bindeproteine		3
Sigmafaktoren		20
Histon ähnliche Proteine		4
Mox-Regulatoren (ATPasen, Proteinebene)		4
Serin/Threonin Protein-Phosphatasen		15
weitere Regulatoren (Proteinebene)		4
<b>Stress</b>		<b>36</b>
Hitzeschock, Chaperone		13
Clp-Proteasen		5
Kälteschock		3
Peptidyl-Prolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase		6
Alkalischock		4
generelle Schockproteine		5
<b>Resistenz</b>		<b>60</b>
Hydroperoxid		9
Thioredoxin		14
Kupfer		4
Radikale (Fenton)		2
Eisen/Schwefel-Cluster		5
Antibiotika		8
Sonstige: Restriktionsenzym, Cytochrom, Hämoglobin		12
Mycothiol		6
<b>extrazelluläre Enzyme</b>		<b>44</b>
extrazelluläre Serinproteasen		21
Pseudogene, extrazelluläre Serinproteasen		8 (3)
weitere extrazelluläre Proteine (z.B. Cellulasen, Tomatinase, Xylanasen)		15
<b>intrazelluläre Proteasen</b>		<b>39</b>
Metalloproteasen		16
Cysteinproteasen		3
Serinproteasen		17
andere Proteasen		3

---

<b>V Schlecht/kaum charakterisiert</b>	<b>1286</b>
<b>generelle Funktionszuordnung</b>	<b>244</b>
Methyltransferasen	10
SAM abhängige Methyltransferasen	5
Dehydrogenasen	109
Acetyltransferasen	46
ATPasen	9
Hydrolasen	62
DNA-Bindeproteine	3
<b>Funktion unbekannt</b>	<b>1042</b>
konserviert hypothetische Proteine	501
hypothetische Proteine	502
Pseudogene	39 (23)

---

### 8.3 Differentielle Genexpression in der spät-logarithmischen Wachstumsphase

**Tabelle 8.2:** In der spät-logarithmischen Wachstumsphase differentiell exprimierte Gene der Genregionen I-III (Positionsplot). Die Gene sind jeweils nach der Zugehörigkeit zu den funktionellen Gruppen sortiert. Schwellenwerte:  $M \geq |0,93|$ ,  $A \geq 8,39$ ,  $p \leq 0,05$ ,  $n \geq 7$ .

GenDB-ID	Genname	mögliche Funktion	M9
<b>Genregion I</b>			
CMM_0877	<i>araD</i>	L-Ribulose-5-Phosphat-4-Epimerase (EC 5.1.3.4)	-1,10
CMM_0878	<i>araA</i>	L-Arabinose-Isomerase (EC 5.3.1.4)	-1,47
CMM_0860	<i>rplJ</i>	50S ribosomales Protein L10	-2,48
CMM_0861	<i>rplL</i>	50S ribosomales Protein L7/L12	-2,23
CMM_0857	<i>clpC</i>	ATP-abhängig Protease, ATPase Untereinheit (EC 3.4.-.-)	-1,19
CMM_0866	-	$\alpha$ -Glucosid ABC Transporter, Substratbindeprotein	-1,86
CMM_0867	-	$\alpha$ -Glucosid ABC Transporter, Permease	-1,57
CMM_0880	-	Zucker ABC Transporter, ATPase	-2,12
CMM_0881	-	Zucker ABC Transporter, Permease	-1,90
<b>Genregion II</b>			
CMM_1736	<i>pgiA</i>	Glucose-6-Phosphat-Isomerase (EC 5.3.1.9)	-1,33
CMM_1738	<i>opcA</i>	Glucose-6-P-Dehydrogenase Effektor	-1,33
CMM_1735	<i>talA</i>	Transaldolase (EC 2.2.1.2)	-1,09
CMM_1737	<i>zwfA2</i>	Glucose-6-Phosphat-1-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49)	-1,64
CMM_1739	<i>pglA</i>	6-Phosphogluconolactonase (EC 3.1.1.31)	-0,95
CMM_1752	<i>rpsA</i>	30S ribosomales Protein S1	-2,10
CMM_1727	-	konserviert hypothetisches Protein, beteiligt am Fe-S-Cluster <i>Assembly</i>	-1,00
CMM_1729	-	2Fe-2S Ferredoxin	-1,26
CMM_1730	-	konserviert hypothetisches Protein, beteiligt am Fe-S-Cluster <i>Assembly</i> , ABC Transporter	-1,25
CMM_1728	-	ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	-1,18
CMM_1746	<i>whiA</i>	konserviert hypothetisches Protein	-1,38
<b>Genregion III</b>			
CMM_2584	<i>rpoA</i>	DNA-gerichtete RNA-Polymerase, $\alpha$ -Untereinheit (RNAP, $\alpha$ -Untereinheit) (EC 2.7.7.6)	-1,65
CMM_2579	<i>rpsI</i>	30S ribosomales Protein S9	-1,74
CMM_2580	<i>rplM</i>	50S ribosomales Protein L13	-1,30
CMM_2583	<i>rplQ</i>	50S ribosomales Protein L17	-1,53
CMM_2585	<i>rpsK</i>	30S ribosomales Protein S11	-1,60
CMM_2586	<i>rpsM</i>	30S ribosomales Protein S13	-1,17
CMM_2599	<i>rplO</i>	50S ribosomales Protein L15	-1,79
CMM_2600	<i>rpmD</i>	50S ribosomales Protein L30	-1,98
CMM_2601	<i>rpsE</i>	30S ribosomales Protein S5	-1,83
CMM_2602	<i>rplR</i>	50S ribosomales Protein L18	-0,94
CMM_2603	<i>rplF</i>	50S ribosomales Protein L6	-2,50
CMM_2605	<i>rplE</i>	50S ribosomales Protein L5	-1,63
CMM_2606	<i>rplX</i>	50S ribosomales Protein L24	-1,83
CMM_2607	<i>rplN</i>	50S ribosomales Protein L14	-2,21
CMM_2608	<i>rpsQ</i>	30S ribosomales Protein S17	-1,85
CMM_2609	<i>rpmC</i>	50S ribosomales Protein L29	-1,08
CMM_2610	<i>rplP</i>	50S ribosomales Protein L16	-2,19
CMM_2612	<i>rplV</i>	50S ribosomales Protein L22	-2,61

---

CMM_2614	<i>rplB</i>	50S ribosomales Protein L2	-1,20
CMM_2615	<i>rplW</i>	50S ribosomales Protein L23	-2,24
CMM_2616	<i>rplD</i>	50S ribosomales Protein L4	-2,33
CMM_2618	<i>rpsJ</i>	30S ribosomales Protein S10	-2,02
CMM_2622	<i>rpsG</i>	30S ribosomales Protein S7	-1,27
CMM_2620	<i>tuf</i>	Elongationsfaktor Tu (EF-Tu)	-1,67
CMM_2621	<i>fusA</i>	Elongationsfaktor G (EF-G)	-1,75
CMM_2598	<i>secY</i>	Präprotein Translocase, SecY Untereinheit	-0,94

---

## 8.4 Bestimmung der Metabolitmengen in Xylemsaft

**Tabelle 8.3:** Quantitativer Nachweis von Metaboliten des Überstands einer NCPPB382-Kultur in Xylemsaft. Die Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten ist in Klammern angegeben. **Fett:** signifikanter Unterschied (t-test;  $p < 0,05$ ) zu Werten der Probe 5 h; \*: signifikanter Unterschied zu Werten der Probe 6 h.

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Xylemsaft	5 h	6 h	23 h
Lysin	1,566	0	0	0
Citrat	271,57	261,71 ( $\pm 11,22$ )	<b>229,20</b> ( $\pm 8,90$ )	* <b>4,750</b> ( $\pm 0,467$ )
Fumarat	24,07	103,18 ( $\pm 7,78$ )	<b>144,56</b> ( $\pm 10,05$ )	* 52,30 ( $\pm 38,81$ )
Malat	4018,30	4234,95 ( $\pm 332,44$ )	4192,58 ( $\pm 245,34$ )	* <b>77,422</b> ( $\pm 47,87$ )
Succinat	165,48	322,20 ( $\pm 4,22$ )	<b>390,19</b> ( $\pm 23,30$ )	* 155,55 ( $\pm 93,20$ )
Harnstoff	30,41	23,20 ( $\pm 8,53$ )	42,32 ( $\pm 27,94$ )	54,87 ( $\pm 24,44$ )
Fructose	259,60	79,58 ( $\pm 13,91$ )	<b>5,488</b> ( $\pm 8,02$ )	<b>0,129</b> ( $\pm 0,07$ )
Glucose	374,82	77,35 ( $\pm 15,33$ )	28,90 ( $\pm 41,11$ )	<b>0,343</b> ( $\pm 0,30$ )
myo-Inositol	2,167	2,176 ( $\pm 0,004$ )	<b>2,189</b> ( $\pm 0,004$ )	* <b>2,202</b> ( $\pm 0,004$ )

**Tabelle 8.4:** Qualitativer Nachweis von Metaboliten des Überstands einer NCPPB382-Kultur in Xylemsaft. Die Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten ist in Klammern angegeben. **Fett:** signifikanter Unterschied (t-test;  $p < 0,05$ ) zu den Konzentrationen nach 5 h; \*: signifikanter Unterschied zu den Konzentrationen nach 6 h.

relative Konzentrationen	Xylemsaft	5 h	6 h	23 h
$\beta$ -Alanin	0,080	0,070 ( $\pm 0,002$ )	0,066 ( $\pm 0,005$ )	* <b>0,035</b> ( $\pm 0,004$ )
Isoleucin	2,419	1,456 ( $\pm 0,048$ )	<b>1,105</b> ( $\pm 0,087$ )	* <b>0,149</b> ( $\pm 0,039$ )
Leucin	3,411	2,569 ( $\pm 0,195$ )	<b>1,813</b> ( $\pm 0,239$ )	* <b>0,076</b> ( $\pm 0,028$ )
Serin	0,377	0,182 ( $\pm 0,072$ )	0,092 ( $\pm 0,021$ )	0,143 ( $\pm 0,107$ )
Threonin	0,435	0,406 ( $\pm 0,022$ )	<b>0,350</b> ( $\pm 0,016$ )	* <b>0,082</b> ( $\pm 0,025$ )
Valin	2,959	2,865 ( $\pm 0,108$ )	2,659 ( $\pm 0,071$ )	* <b>1,582</b> ( $\pm 0,089$ )
$\gamma$ -Aminobutyrat (GABA)	8,646	7,341 ( $\pm 0,233$ )	6,433 ( $\pm 0,489$ )	* <b>0,507</b> ( $\pm 0,140$ )
Glycerat	0,169	0,211 ( $\pm 0,010$ )	0,287 ( $\pm 0,096$ )	<b>0,481</b> ( $\pm 0,019$ )
Maleinsäure	0,230	0,281 ( $\pm 0,011$ )	<b>0,339</b> ( $\pm 0,022$ )	* 0,161 ( $\pm 0,052$ )

<b>Uracil</b>	0,046	0,055 (±0,023)	0,056 (±0,008)	* 0,074 (±0,005)
<b>Ribose</b>	0,363	0,535 (±0,013)	0,498 (±0,024)	0,444 (±0,070)

**Tabelle 8.5:** Identifizierung und Bestimmung der relativen Konzentration von Metaboliten aus dem Xylemsaft uninfizierter und mit verschiedenen *Cmm*-Stämmen infizierter Tomatenpflanzen. Der Standardfehler von fünfzehn (5 bei *mock*-infizierten) biologischen Replikaten ist in Klammern angegeben. **Grau unterlegt:** signifikanter Unterschied (t-test;  $p < 0,05$ ) zu Werten von Xylemsaft *mock*-infizierter Pflanzen ( $XS_{mock}$ ); **fett und unterstrichen:** signifikanter Unterschied zu Werten von  $XS_{382}$ ; \*: signifikanter Unterschied zu Werten von  $XS_{100}$ .

relative Konzentrationen	$XS_{382}$	$XS_{chpC}$	$XS_{100}$	$XS_{mock}$
<b>β-Alanin</b>	0,148 (±0,020)	<b><u>0,039</u></b> (±0,007)	<b><u>0,032</u></b> (±0,003)	0
<b>Cystein</b>	0,025 (±0,003)	0,028 (±0,006)	0,032 (±0,003)	0,022 (±0,005)
<b>Isoleucin</b>	4,315 (±0,381)	* <b><u>0,888</u></b> (±0,091)	<b><u>0,480</u></b> (±0,051)	0,315 (±0,033)
<b>Leucin</b>	5,288 (±0,564)	* <b><u>1,075</u></b> (±0,112)	<b><u>0,529</u></b> (±0,068)	0,278 (±0,060)
<b>Methionin</b>	0,197 (±0,045)	0,338 (±0,061)	0,336 (±0,052)	0,134 (±0,017)
<b>Prolin</b>	1,225 (±0,330)	* <b><u>0,181</u></b> (±0,034)	<b><u>0,036</u></b> (±0,006)	0,033 (±0,009)
<b>Serin</b>	1,230 (±0,231)	<b><u>0,458</u></b> (±0,108)	<b><u>0,247</u></b> (±0,034)	0,150 (±0,036)
<b>Threonin</b>	1,216 (±0,164)	* <b><u>0,234</u></b> (±0,027)	<b><u>0,115</u></b> (±0,010)	0,062 (±0,007)
<b>Valin</b>	6,238 (±0,633)	* <b><u>1,056</u></b> (±0,101)	<b><u>0,661</u></b> (±0,060)	0,431 (±0,041)
<b>γ-Aminobutyrat (GABA)</b>	7,144 (±0,857)	5,627 (±1,346)	<b><u>4,804</u></b> (±0,680)	1,772 (±0,210)
<b>Glycerat</b>	0,255 (±0,031)	0,205 (±0,021)	0,237 (±0,011)	0,175 (±0,020)
<b>Maleinsäure</b>	0,195 (±0,020)	<b><u>0,290</u></b> (±0,034)	<b><u>0,331</u></b> (±0,020)	0,424 (±0,009)
<b>Uracil</b>	0,338 (±0,019)	* <b><u>0,132</u></b> (±0,006)	<b><u>0,057</u></b> (±0,003)	0,052 (±0,004)
<b>Ribose</b>	0,437 (±0,054)	0,416 (±0,073)	0,354 (±0,031)	0,200 (±0,015)

## 8.5 Differentielle Genexpression von *Cmm* in Gegenwart von Tomatenhomogenat oder Xylemsaft

**Tabelle 8.6:** Differentielle Genexpression durch Zugabe von Tomatenblatthomogenat. **Ansatz I:** Transkriptionsprofil von Zellen 12 min nach Zugabe von 5 % Tomatenblatthomogenat. **Ansatz II:** Transkriptionsprofil logarithmischer Zellen in M9-Minimalmedium<sub>5%-T-Hom.</sub>. Daten von 3 biologischen Replikaten. Schwellenwerte:  $M \geq |0,93|$ ;  $p \leq 0,05$ ;  $n \geq 7$ ;  $A_{\text{Ansatz I}} \geq 7,82$ ,  $A_{\text{Ansatz II}} \geq 8,21$ . Die Anzahl aller differentiell exprimierten Gene ist in Klammern angegeben.

Gruppe	Anzahl induzierter Gene ( $M \geq 0,93$ )		Anzahl reprimierter Gene ( $M \leq -0,93$ )	
	I (31)	II (23)	I (38)	II (62)
<b>I Metabolismus</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>5</b>
<b>Energiemetabolismus; Kohlenstoff</b>				
Pentose-Phosphatweg	-	-	1	-
Citrat-Zyklus	1	1	1	1
übrige Zucker und andere C-Verbindungen	-	-	1	-
n-Glycan	-	4	-	-
<b>Aminosäuren</b>				
Methionin, Cystein	2	-	-	-
Harnstoff	-	-	1	-
Aminotransferasen	-	-	-	1
<b>Lipide</b>				
Fettsäuren	-	-	2	1
Carotinoid-/Chinonvorstufensynthese	1	-	-	-
weitere Lipide	-	-	1	-
<b>Sekundärmetabolismus</b>				
Eisen	-	-	3	2
<b>II Zelluläre Prozesse</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Zellwand</b>				
Glycosyltransferasen	-	-	-	1
EPS-Cluster I	-	3	-	-
<b>III Informationsspeicherung und -prozessierung</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Translation</b>				
ribosomale Proteine	1	-	-	-
Translation, Rest	-	-	1	1
<b>IV Potentiell relevant für phytopathogene Interaktion</b>	<b>16</b>	<b>13</b>	<b>18</b>	<b>35</b>
<b>Transporter</b>				
ABC, ohne weitere Zuordnung	-	1	1	-
ABC, Aminosäuren	5	-	-	-
ABC, Zucker	-	-	4	1
ABC, anorganische Ionen	4	-	-	2
ABC, Abwehr	-	-	2	-
Permeasen, ohne weitere Zuordnung	1	-	-	-
Permeasen, Energiemetabolismus	-	1	-	-
Permeasen, Zucker	1	2	-	-
Permeasen, anorganische Ionen	-	1	-	-
Phosphotransferasesysteme	-	1	-	-
<b>Proteintransport</b>				
Konjugation	-	-	-	7
<b>Regulatoren</b>				
Transkriptionsregulatoren	-	-	1	1

Sigmafaktoren	1	-	-	-
Serin/Threonin Protein-Phosphatasen	-	1	-	-
<b>Stress</b>				
Hitzeschock, Chaperone	2	4	-	-
Kälteschock	-	-	-	1
<b>Resistenz</b>				
Radikale (Fenton)	1	1	-	-
Antibiotika	1	-	-	-
Sonstige: Restriktionsenzym, Cytochrom, Hämoglobin	-	1	-	-
<b>extrazelluläre Enzyme</b>				
extrazelluläre Serinproteasen	-	-	8	15
Pseudogene, extrazelluläre Serinproteasen	-	-	-	3
weitere extrazelluläre Proteine (z.B. Cellulasen, Tomatinase, Xylanasen)	-	-	2	3
<b>intrazelluläre Proteasen</b>				
Metalloproteasen	-	-	-	1
Serinproteasen	-	-	-	1
<b>V Schlecht/kaum charakterisiert</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>20</b>
<b>generelle Funktionszuordnung</b>				
Methyltransferasen	1	-	-	-
Dehydrogenasen	3	-	-	2
Hydrolasen	-	2	1	1
<b>Funktion unbekannt</b>				
konserviert hypothetische Proteine	4	-	3	7
hypothetische Proteine	2	-	4	10

**Tabelle 8.7:** In Gegenwart von Tomatenblatthomogenat reprimierte Gene aus der *chp*-Region, die nicht für Serinproteasen codieren. Weitere differentiell exprimierte Gene aus dieser Region sind in Tabelle 5.7 aufgeführt. Angegeben sind die M-Werte der Ansätze I und II. **Fett:** M-Wert  $\leq -0,93$ .

GenDB-ID	Genname	Funktion	I	II
CMM_0045	-	hypothetisches Protein	<b>-1,39</b>	<b>-2,28</b>
CMM_0037	-	hypothetisches Protein	<b>-1,34</b>	<b>-1,49</b>
CMM_0072	-	Zn-abhängig Hydrolase	<b>-1,17</b>	<b>-2,69</b>
CMM_0073	-	Acyl-CoA-Synthetase (AMP-bildend)	-0,90	<b>-1,84</b>

**Tabelle 8.8:** In Gegenwart von Tomatenblatthomogenat differentiell exprimierte Gene aus der *tomA*-Region (Genregion II in Abbildung 5.9). Angegeben sind die M-Werte der Ansätze I und II. **Fett:** M-Wert  $\geq 0,93$ ; \*: M-Wert ist nicht signifikant, da  $p > 0,05$ .

GenDB-ID	Genname	Funktion	I	II
CMM_0099	<i>bgIE</i>	$\beta$ -Galactosidase/ $\beta$ -Glucuronidase	0,24	<b>1,07</b>
CMM_0100	<i>bgIF</i>	$\beta$ -Glucosidase, Glycosyl-Hydrolase-Familie 3 (EC 3.2.1.-)	* 0,11	<b>3,25</b>
CMM_0102	<i>bgIH</i>	$\beta$ -Galactosidase (EC 3.2.1.23)	0,39	<b>2,00</b>
CMM_0103	<i>bgII</i>	$\beta$ -Xylosidase, Glycosyl-Hydrolase-Familie 43 (EC 3.2.1.37)	0,75	<b>2,28</b>
CMM_0095	<i>cytB</i>	3Fe-4S Ferredoxin	* 0,27	<b>1,34</b>
CMM_0104	-	Zucker Permease (MFS Superfamilie)	* 0,19	<b>1,34</b>

**Tabelle 8.9:** In Gegenwart von Tomatenblatthomogenat differentiell exprimierte Gene, die für Hitzeschockproteine/Chaperone, ein Stress induziertes DNA-Bindeprotein oder Transporter codieren. Angegeben sind die M-Werte der Ansätze I und II. **Fett:** M-Wert  $\geq 0,93$ ; \*: M-Wert ist nicht signifikant, da  $p > 0,05$  oder  $A_{\text{Ansatz I}} \leq 7,83$  bzw.  $A_{\text{Ansatz II}} \leq 8,21$ .

GenDB-ID	Genname	Funktion	I	II
CMM_0153	<i>dnaJ1</i>	Chaperon, <i>curved DNA-binding</i> Protein	0,34	<b>1,01</b>
CMM_0316	-	ATPase mit Chaperon Aktivität, ATP-bindende	<b>1,14</b>	* -0,02
	<i>clpY</i>	Untereinheit		
CMM_2092	<i>hsp20</i>	Hitzeschockprotein, HSP20-Familie	<b>1,10</b>	<b>1,02</b>
CMM_2478	<i>groL</i>	60 kDa Chaperonin (Protein Cpn60) (GroEL Protein)	0,56	<b>1,28</b>
CMM_2568	<i>groS</i>	10 kDa Chaperonin (Protein Cpn10) (groES Protein)	0,18	<b>1,16</b>
CMM_1461	<i>dpsA</i>	Stress induziertes DNA-Bindeprotein	<b>1,67</b>	<b>1,23</b>
CMM_0104	-	Zucker Permease (MFS Superfamilie)	* 0,19	<b>1,34</b>
CMM_0325	-	ABC Transporter (fusionierte Permease/ATPase)	<b>-0,93</b>	* 0,07
CMM_0396	-	Na <sup>+</sup> Efflux ABC transporter, Permease	<b>-1,05</b>	<b>1,63</b>
CMM_0866	-	$\alpha$ -Glucosid ABC Transporter, Substratbindeprotein	<b>-1,49</b>	<b>-1,59</b>
CMM_0867	-	$\alpha$ -Glucosid ABC Transporter, Permease	<b>-1,23</b>	-0,84
CMM_0880	-	Zucker ABC Transporter, ATPase	<b>-2,26</b>	-0,90
CMM_0881	-	Zucker ABC Transporter, Permease	<b>-1,57</b>	-0,82
CMM_1087	<i>mnhAB</i>	<i>multisubunit</i> Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter, NADH-Chinon Dehydrogenase (EC 1.6.5.3)	0,41	<b>1,33</b>
CMM_1274	-	<i>multidrug</i> ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	<b>-0,96</b>	-0,46
CMM_1505	<i>fruB</i>	Phosphotransferase System, Phosphocarrier Protein HPr (EC 2.7.1.69)	* 0,12	<b>1,30</b>
CMM_1627	-	Metall ABC Transporter, Permease	-0,80	<b>-1,10</b>
CMM_1669	<i>amtB</i>	Ammonium Transporter, Amt-Familie	-0,32	<b>1,10</b>
CMM_1790	-	Anion ABC Transporter, Substratbindeprotein	<b>1,36</b>	<b>-1,00</b>
CMM_1949	-	MFS Permease	<b>1,85</b>	-0,49
CMM_1959	-	Peptid ABC Transporter, Permease	<b>0,97</b>	* -0,12
CMM_1960	-	Peptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	<b>1,74</b>	-0,27
CMM_2051	-	2-Oxoglutarat/Malat Translocator, DASS-Familie	<b>1,67</b>	<b>1,24</b>
CMM_2281	-	Metall ABC Transporter, Permease	<b>0,97</b>	* -0,13
CMM_2282	-	Metall ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	<b>1,31</b>	* -0,11
CMM_2283	-	Metall ABC Transporter, Substratbindeprotein	<b>1,96</b>	-0,31
CMM_2423	-	Peptid ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	<b>1,13</b>	* -0,27
CMM_2626	-	polare Aminosäuren ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	<b>1,23</b>	-0,18
CMM_2627	-	polare Aminosäuren ABC Transporter, Permease	<b>1,38</b>	* -0,17
CMM_2878	-	Citrat Transporter, CitMHS-Familie	<b>1,00</b>	<b>1,55</b>

**Tabelle 8.10:** Differentielle Genexpression durch Zugabe von Xylemsaft. **Ansatz I:** Transkriptionsprofil von Zellen 12 min nach Zugabe von 10 % Xylemsaft. **Ansatz II:** Transkriptionsprofil logarithmischer Zellen in M9-Minimalmedium<sub>10%-xy</sub>. Daten von 3 biologischen Replikaten. Schwellenwerte:  $M \geq |0,7|$ ;  $p \leq 0,05$ ;  $n \geq 7$ ;  $A_{\text{Ansatz I}} \geq 8,31$ ,  $A_{\text{Ansatz II}} \geq 8,23$ . **Fett und unterstrichen:** Schnittmenge der differentiell exprimierten Gene stimmt unter beiden Bedingungen exakt überein. Die Anzahl aller differentiell exprimierten Gene ist in Klammern angegeben.

Gruppe	Anzahl induzierter Gene ( $M \geq 0,7$ )		Anzahl reprimierter Gene ( $M \leq -0,7$ )	
	I (12)	II (10)	I (11)	II (12)
<b>I Metabolismus</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Energie-, Kohlenstoffmetabolismus</b>				
<b><u>Citrat Zyklus</u></b>	<b><u>2</u></b>	<b><u>1</u></b>	-	-
<b>Nukleotide</b>				
Pyrimidin	1	-	-	-
<b>Coenzyme</b>				
<b><u>Hämoglobin</u></b>	-	-	<b><u>1</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b>Sekundärmetabolismus</b>				
Phosphat	1	-	-	-
<b><u>Eisen</u></b>	-	-	<b><u>2</u></b>	<b><u>3</u></b>
<b>II Zelluläre Prozesse</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Zellwand</b>				
Teichonsäuren	-	-	-	1
Zelloberfläche	-	1	-	-
<b>III Informationsspeicherung und -prozessierung</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Translation</b>				
ribosomale Proteine	1	-	-	-
<b>IV Potentiell relevant für phytopathogene Interaktion</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>5</b>
<b>Transporter</b>				
ABC, ohne weitere Zuordnung	-	-	1	-
<b><u>ABC, anorganische Ionen</u></b>	-	-	<b><u>2</u></b>	<b><u>4</u></b>
Permeasen, Zucker	2	-	-	-
Permeasen, anorganische Ionen	-	-	1	1
Phosphotransferasesysteme	1	-	-	-
<b>Proteintransport</b>				
Konjugation	-	-	1	-
<b>Stress</b>				
Hitzeschock, Chaperone	-	2	-	-
<b>Resistenz</b>				
<b><u>Radikale (Fenton)</u></b>	<b><u>1</u></b>	<b><u>1</u></b>	-	-
<b>extrazelluläre Enzyme</b>				
extrazelluläre Serinproteasen	-	-	1	-
<b>intrazelluläre Proteasen</b>				
Serinproteasen	1	-	-	-
<b>V Schlecht/kaum charakterisiert</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>generelle Funktionszuordnung</b>				
Dehydrogenasen	-	-	1	-
Hydrolasen	-	1	-	-
<b>Funktion unbekannt</b>				
konserviert hypothetische Proteine	1	1	-	-
hypothetische Proteine	1	2	1	1
Pseudogene	-	1	-	1

**Tabelle 8.11:** *Real-time*-RT-PCR Ergebnisse zum Experiment "Xylemsaft" (Ansatz I und II). Die mittels Microarray erhaltenen Werte sind als  $2^M$  angegeben. Ist die Transkriptmenge unter der Versuchsbedingung verringert, ist der negative, reziproke Wert des Verhältnisses zur Kontrolle angegeben (Verhältnis 0,5  $\rightarrow$  -2).

	GenDB-ID	Genname	mögliche Funktion	$2^M$	RT-PCR
	CMM_0166	<i>fhuD</i>	Fe <sup>3+</sup> -Siderophor ABC Transporter, Substratbindeprotein	-1,99	-5,99
Ansatz I	CMM_1129	-	Siderophor-interagierendes Protein	-2,63	-2,78
	CMM_1461	<i>dpsA</i>	Stress-induziertes DNA-Bindeprotein	4,67	22,54
	CMM_2094	<i>alcA</i>	Siderophorbiosynthese-Enzym / Monooxygenase	-2,75	-1,51
	CMM_2878	-	Citrat Transporter, CitMHS-Familie	2,23	1,36
Ansatz II	CMM_0166	<i>fhuD</i>	Fe <sup>3+</sup> -Siderophor ABC Transporter, Substratbindeprotein	-2,12	-4,15
	CMM_0601	<i>hemO</i>	Hämoxygenase (EC 1.14.99.3)	-2,20	-6,02

## 8.6 Differentielle Genexpression der *dtxR*<sup>-</sup>-Mutante nach Zugabe von 10 % Xylemsaft

**Tabelle 8.12:** In CMM101*dtxRA1* im Vergleich zu CMM101 differentiell exprimierte Gene 20 min nach Zugabe von Xylemsaft. Daten von 3 biologischen Replikaten. Schwellenwerte:  $M \geq |0,7|$ ;  $p \leq 0,05$ ;  $n \geq 7$ ;  $A \geq 7,50$ .

Gruppe	Anzahl induzierter Gene: $M \geq 0,7$ (31)	Anzahl reprimierter Gene: $M \leq -0,7$ (25)
<b>I Metabolismus</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
<b>Energie-, Kohlenstoffmetabolismus</b>		
Citrat Zyklus	-	3
übrige Zucker und andere C-Verbindungen	-	2
<b>Aminosäure</b>		
Katabolismus und Proteinmodifikation	-	1
<b>Nukleotide</b>		
Purin	1	-
<b>Coenzyme</b>		
Hämoglobin	1	-
<b>Sekundärmetabolismus</b>		
Eisen	4	-
<b>II Zelluläre Prozesse</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Zellwand</b>		
Teichonsäuren	1	-
EPS-Cluster II	-	1
EPS-Cluster III	-	1
<b>IV Potentiell relevant für phytopathogene Interaktion</b>	<b>16</b>	<b>8</b>
<b>Transporter</b>		
ABC, ohne weitere Zuordnung	1	-
ABC, Aminosäuren	-	1
ABC, Zucker	2	-
ABC, anorganische Ionen	7	-
Permeasen, ohne weitere Zuordnung	1	-
Permeasen, Energiemetabolismus	1	-
Permeasen, anorganische Ionen	4	-
<b>Regulatoren</b>		
Transkriptionsregulatoren	-	1
<b>Resistenz</b>		
Radikale (Fenton)	-	1
Antibiotika	-	1
<b>extrazelluläre Enzyme</b>		
extrazelluläre Serinproteasen	-	3
weitere extrazelluläre Proteine (z.B. Cellulasen, Tomatinase, Xylanasen)	-	1
<b>V Schlecht/kaum charakterisiert</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>generelle Funktionszuordnung</b>		
Dehydrogenasen	1	1
Hydrolasen	1	-
<b>Funktion unbekannt</b>		
konserviert hypothetische Proteine	2	4
hypothetische Proteine	3	3
Pseudogene	1	1

**Tabelle 8.13:** Real-time-RT-PCR Ergebnisse zum Experiment "DtxR/CMM101". Die mittels Microarray erhaltenen Werte sind als  $2^M$  angegeben. Ist die Transkriptmenge unter der Versuchsbedingung verringert, ist der negative, reziproke Wert des Verhältnisses zur Kontrolle angegeben (Verhältnis 0,5  $\rightarrow$  -2).

GenDB-ID	Genname	mögliche Funktion	$2^M$	RT-PCR
CMM_0601	<i>hemO</i>	Hämoxygenase (EC 1.14.99.3)	4,68	<b>6,30</b>
CMM_1129	-	Siderophor-interagierendes Protein	5,87	<b>2,12</b>
CMM_2094	<i>alcA</i>	Siderophorbiosynthese-Enzym/ Monooxygenase	11,31	<b>5,22</b>
CMM_2095	-	Siderophorbiosynthese-Enzym/ L-Aminosäure Decarboxylase (EC 4.1.1.-)	6,49	<b>2,48</b>

**Tabelle 8.14:** Cluster I-VI des hierarchischen Clusterings der Transkriptomdaten der Experimente mit Xylemsaft und dem Stamm CMM101*dtxRA1* (*dtxR*). Xylemsaft: **Ansatz I:** Transkriptionsprofil von Zellen 12 min nach Zugabe von 10 % Xylemsaft. **Ansatz II:** Transkriptionsprofil logarithmischer Zellen in M9-Minimalmedium<sub>10%-Xy</sub>. \*: mindestens ein Kriterium für p, n oder A nicht erfüllt. **Fett:** M-Wert  $\geq |0,7|$ .

GenDB-ID	Genname	mögliche Funktion	Xylemsaft		
			Ansatz I	Ansatz II	<i>dtxR</i>
<b>Cluster I</b>					
CMM_0165	<i>fhuC</i>	Fe <sup>3+</sup> -Siderophor ABC Transporter, ATPase	-0,36	-0,54	<b>1,87</b>
CMM_0166	<i>fhuD</i>	Fe <sup>3+</sup> -Siderophor ABC Transporter, Substratbindeprotein	<b>-0,99</b>	<b>-1,09</b>	<b>2,50</b>
CMM_0167	<i>fhuB</i>	Fe <sup>3+</sup> -Siderophor ABC Transporter, Permease	-0,56	-0,44	<b>1,07</b>
CMM_0363	-	Fe <sup>3+</sup> -Hydroxamat ABC Transporter, Substratbindeprotein	-0,62	<b>-0,77</b>	<b>1,30</b>
CMM_0601	<i>hemO</i>	Hämoxygenase (EC 1.14.99.3)	<b>-0,90</b>	<b>-1,14</b>	<b>2,23</b>
CMM_1129	-	Siderophor-interagierendes Protein	<b>-1,39</b>	<b>-1,47</b>	<b>2,55</b>
CMM_2093	<i>alcBC</i>	Siderophorbiosynthese-Protein	-0,36	-0,56	<b>2,47</b>
CMM_2094	<i>alcA</i>	Siderophorbiosynthese-Enzym/Monooxygenase	<b>-1,46</b>	<b>-2,05</b>	<b>3,50</b>
CMM_2095	-	Siderophorbiosynthese-Enzym/ L-Aminosäure Decarboxylase (EC 4.1.1.-)	-0,66	<b>-1,02</b>	<b>2,70</b>
CMM_2176	-	konserviertes, sekretiertes Lipoprotein	-0,53	<b>-0,74</b>	<b>1,45</b>
CMM_2349	<i>fecB1</i>	Fe <sup>3+</sup> -Siderophor ABC Transporter, Substratbindeprotein	-0,65	<b>-0,78</b>	<b>1,37</b>
CMM_2931	<i>fecB2</i>	Fe-Siderophor ABC Transporter, Substratbindeprotein	<b>-0,84</b>	<b>-0,83</b>	<b>1,78</b>
CMM_PSEU DO_0030	-	Pseudogen, Siderophor-interagierendes Protein	<b>-0,73</b>	<b>-0,77</b>	<b>1,13</b>
CMM_1281	-	Glycosyltransferase	-0,61	<b>-1,00</b>	<b>2,37</b>
CMM_1323	<i>guaB</i>	Inosinmonophosphat-DH (EC 1.1.1.205)	-0,58	-0,41	<b>1,17</b>
CMM_2837	-	Membranprotein	* -0,13	-0,26	<b>1,36</b>
<b>Cluster II</b>					
CMM_0373	<i>phnM</i>	Metall-abhängige Hydrolase, am Phosphonatmetabolismus beteiligt	<b>0,77</b>	* -0,04	* -0,26
CMM_1782	<i>carB</i>	Carbamoyl-Phosphat-Synthase, große Untereinheit (EC 6.3.5.5)	<b>0,71</b>	* -0,15	* 0,25
CMM_2787	<i>rplK</i>	50S ribosomales Protein L11	<b>0,76</b>	* 0,19	-0,16
CMM_1353	-	membrangebundene Protease	<b>1,00</b>	0,18	* -0,46
CMM_1885	<i>dctA</i>	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Dicarboxylat Symporter, DAACS-Familie	<b>1,49</b>	* -0,06	0,47
CMM_2878	-	Citrat Transporter, CitMHS-Familie	<b>1,16</b>	* 0,69	* 0,47

CMM_1505	<i>fruB</i>	Phosphotransferasesystem, Phosphocarrier Protein HPr (EC 2.7.1.69)	<b>0,91</b>	* -0,20	* -0,11
CMM_1376	-	konserviert hypothetisches Protein	<b>0,77</b>	* 0,12	* 0,25
CMM_0510	-	hypothetisches Protein	<b>0,94</b>	0,30	-0,22
<b>Cluster III</b>					
CMM_2285	-	ABC Transporter, dupliziertes ATP-bindendes Protein	-0,33	* 0,06	<b>0,78</b>
CMM_0866	-	$\alpha$ -Glucosid ABC Transporter, Substratbindeprotein	-0,42	* -0,17	<b>1,02</b>
CMM_0880	-	Zucker ABC Transporter, ATPase	-0,42	* -0,18	<b>0,87</b>
CMM_2928	<i>fecE</i>	Fe <sup>3+</sup> -Siderophor ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	* -0,07	* 0,03	<b>0,73</b>
CMM_2892	-	Transporter, RND-Familie	* -0,06	* -0,21	<b>0,73</b>
CMM_1089	<i>mnhD</i>	multisubunit Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter, NADH-Chinon Dehydrogenase (EC 1.6.5.3)	-0,36	0,44	<b>0,74</b>
CMM_1669	<i>amtB</i>	Ammonium Transporter, Amt-Familie	* -0,08	* 0,33	<b>0,76</b>
CMM_0387	-	NAD(FAD)-abhängige Dehydrogenase	* -0,22	* -0,15	<b>1,03</b>
CMM_0064	-	Hydrolase	0,21	* 0,50	<b>0,70</b>
CMM_2415	-	konserviert hypothetisches Protein, Thioredoxin	* -0,41	* -0,07	<b>0,72</b>
CMM_2017	-	konserviertes, sekretiertes Protein	* 0,01	* 0,29	<b>0,71</b>
CMM_1250	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	* -0,14	* -0,12	<b>0,78</b>
pCM2_0034	-	hypothetisches Protein	* -0,44	* -0,15	<b>0,78</b>
CMM_PSEU	-	Pseudogen, Transkriptionsregulator, LacI-Familie	* 0,37	<b>0,82</b>	0,41
DO_0002					
<b>Cluster IV</b>					
CMM_2536	<i>sbtC</i>	Subtilisin-ähnliche Serin-Protease, (EC 3.4.21.-)	<b>-0,72</b>	* -0,04	-0,26
CMM_0396	-	Na <sup>+</sup> Efflux ABC Transporter, Permease	<b>-0,87</b>	0,01	0,69
CMM_2175	-	Fe <sup>2+</sup> -Permease, OFeT-Familie	<b>-1,15</b>	-0,52	<b>0,86</b>
CMM_2177	-	mögliche Fe-abhängige Peroxidase	<b>-0,68</b>	-0,40	<b>0,73</b>
pCM1_0015	-	sekretiertes Protein	<b>-0,95</b>	* -0,06	* -0,15
CMM_1973	-	Acyl-CoA-Dehydrogenase	<b>-0,81</b>	* 0,04	-0,42
CMM_0631	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	<b>-0,77</b>	-0,52	0,37
<b>Cluster V</b>					
CMM_0530	-	Oxidoreduktase	* -1,03	* -0,30	<b>-1,08</b>
CMM_1557	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	-0,51	<b>-1,01</b>	<b>-0,99</b>
<b>Cluster VI</b>					
CMM_0322	-	Dipeptidase	* -0,39	* 0,32	<b>-0,72</b>
CMM_1014	<i>wcqD</i>	NDP-Zucker-Epimerase	* 0,43	<b>0,70</b>	<b>-0,78</b>
pCM2_0035	<i>rhsA</i>	Rhs ähnliches Protein	* 0,16	<b>0,85</b>	<b>-0,75</b>
CMM_0151	<i>dnaK</i>	Chaperon (Hitzeschockprotein 70)	0,21	<b>0,80</b>	* -0,20
CMM_2092	<i>hsp20</i>	Hitzeschockprotein, HSP20-Familie	0,37	<b>0,88</b>	* -0,26
CMM_1588	-	Oligopeptid ABC Transporter, Permease	* -0,05	* 0,45	<b>-0,83</b>
CMM_0663	-	Carboxylesterase, Typ B (EC 3.1.1.-)	* 0,18	<b>0,89</b>	* -0,12
CMM_1971	-	konserviert hypothetisches Protein, Hydrolase oder DNA-Bindeprotein	0,24	<b>0,71</b>	* 0,01
CMM_1285	-	hypothetisches Protein	* -0,17	* 0,55	<b>-0,90</b>
CMM_2901	-	hypothetisches Protein	0,18	<b>1,11</b>	-0,43
pCM2_0041	-	hypothetisches Membranprotein	* 0,07	<b>0,75</b>	* -0,15

## 8.7 Daten zum Pflanzentest mit den CMM1624<sup>-</sup>-Mutanten

**Tabelle 8.15:** Häufigkeit mit der während des Pflanzentests infizierte Pflanzen in die einzelnen Kategorien "tot", "++", "+", "(+)", "Welke" bzw. "keine Welke" eingestuft wurden. Die Kategorie "Welke" umfasst die Kategorien (+) bis tot. Werte der Mutanten die sich signifikant (mittels t-Test) von den Werten der entsprechenden Kontrollstämme unterscheiden sind fett gedruckt und die Felder grau hinterlegt.

Stamm	Test / Schale	tot [%]	++ [%]	+ [%]	(+) [%]	Welke [%]	keine Welke [%]
NCPB382	1-1	19,9	29,0	11,3	2,4	62,7	37,3
	2-1	24,8	20,6	12,2	2,3	59,9	40,1
	3-1	25,6	23,9	13,8	2,2	65,5	34,5
	3-2	26,8	26,0	10,7	1,6	65,1	34,9
Mittelwert		24,3	24,9	12,0	2,1	63,3	36,7
Standardabweichung		3,0	3,5	1,4	0,4	2,6	2,6
CMM101	1-1	11,1	18,8	25,6	1,9	57,4	42,6
	2-1	26,5	15,4	11,1	2,5	55,5	44,5
	3-1	16,1	22,6	19,1	1,6	59,4	40,6
	3-2	18,4	21,2	17,5	1,4	58,4	41,6
Mittelwert		18,0	19,5	18,3	1,9	57,7	42,3
Standardabweichung		6,4	3,2	6,0	0,5	1,7	1,7
<i>Cmm1624</i>	1-1	18,4	21,9	14,6	1,6	56,5	43,5
	1-2	13,2	21,0	11,4	1,5	47,1	52,9
	1-3	15,1	16,2	12,2	0,5	44,0	56,0
	2-1	23,4	18,4	9,2	1,7	52,8	47,2
	3-1	15,9	25,1	11,6	0,9	53,5	46,5
Mittelwert		<b>17,2</b>	20,5	11,8	<b>1,2</b>	<b>50,8</b>	<b>49,2</b>
Standardabweichung		3,9	3,4	1,9	0,5	5,1	5,1
CMM101_1624	1-1	0,0	10,8	35,1	0,6	46,5	53,5
	1-2	0,0	3,7	26,4	1,2	31,3	68,7
	1-3	0,0	1,4	15,3	1,1	17,7	82,3
	2-1	1,3	8,1	29,2	7,3	45,8	54,2
	3-1	0,0	10,8	26,6	4,5	41,9	58,1
	3-2	0,3	9,3	27,4	0,0	37,0	63,0
Mittelwert		<b>0,3</b>	<b>7,4</b>	26,7	2,4	<b>36,7</b>	<b>63,3</b>
Standardabweichung		0,5	3,9	6,5	2,8	10,9	10,9

**Tabelle 8.16:** Median, Mittelwert und statistische Tests zum Gewicht der mit NCPB382, *Cmm1624*, CMM101 bzw. mit CMM101\_1624 infizierten Pflanzen 28 Tage nach Infektion. Mit dem Shapiro-Test wurde überprüft, ob eine Normalverteilung vorlag, der F-Test wurde verwendet, um zu testen, ob die Varianzen der beiden Proben homogen waren. Für alle hier verwendeten statistischen Tests gilt: ist der berechnete Wert kleiner als 0,05, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Nullhypothese anzunehmen ist, kleiner als 5 %.

Stamm	Median	Mittelwert	Shapiro-Test	F-Test	Wilcoxon-Test	(t-Test)
NCPB382	0,09	0,50	$2,8 \times 10^{-8}$	$4,9 \times 10^{-8}$	0,040	0,003
<i>Cmm1624</i>	0,22	1,44	$9,7 \times 10^{-13}$			
CMM101	0,51	1,17	$1,6 \times 10^{-5}$	0,52	0,008	0,034
CMM101_1624	1,15	1,99	$2,3 \times 10^{-5}$			

**Tabelle 8.17:** Titer der *Cmm*-Stämme in Tomatenpflanzen 28 Tage nach Wurzelinfektion. Titer in cfu/g Pflanzenhomogenat.

Stamm	Nr.	Welkekategorie	Titer	Mittelwert	Standardabweichung
NCPB382	1	tot	$5,45 \times 10^9$	$1,79 \times 10^{10}$	$1,04 \times 10^{10}$
	2	++	$1,55 \times 10^{10}$		
	3	tot	$3,44 \times 10^{10}$		
	4	tot	$1,62 \times 10^{10}$		
	5	++	$1,81 \times 10^{10}$		
CMM101	1	++	$1,69 \times 10^9$	$1,70 \times 10^{10}$	$1,40 \times 10^{10}$
	2	tot	$2,56 \times 10^{10}$		
	3	+	$4,55 \times 10^9$		
	4	tot	$3,48 \times 10^{10}$		
	5	++	$1,83 \times 10^{10}$		
<i>Cmm</i> 1624 Schale 1	1	tot	$3,16 \times 10^{10}$	$1,58 \times 10^{10}$	$1,12 \times 10^{10}$
	2	tot	$2,42 \times 10^{10}$		
	3	tot	$1,35 \times 10^{10}$		
	4	++	$2,27 \times 10^{10}$		
	5	++	$1,09 \times 10^{10}$		
<i>Cmm</i> 1624 Schale 2	6	tot	$1,21 \times 10^{10}$	$1,58 \times 10^{10}$	$1,12 \times 10^{10}$
	7	tot	$1,63 \times 10^{10}$		
	8	tot	$4,40 \times 10^8$		
	9	++	$1,41 \times 10^{10}$		
<i>Cmm</i> 1624 Schale 3	10	++	$4,20 \times 10^8$	$1,58 \times 10^{10}$	$1,12 \times 10^{10}$
	11	tot	$3,41 \times 10^{10}$		
	12	tot	$1,55 \times 10^{10}$		
	13	+	$1,18 \times 10^9$		
	14	++	$3,23 \times 10^{10}$		
CMM101_1624 Schale 1	15	++	$8,16 \times 10^9$	$5,33 \times 10^9$	$1,69 \times 10^9$
	1	+	$6,44 \times 10^9$		
	2	++	$4,73 \times 10^9$		
	3	++	$2,73 \times 10^9$		
	4	++	$4,32 \times 10^9$		
CMM101_1624 Schale 2	5	+	$6,76 \times 10^9$	$5,33 \times 10^9$	$1,69 \times 10^9$
	6	+	$7,30 \times 10^9$		
	7	+	$3,17 \times 10^9$		
	8	+	$3,84 \times 10^9$		
	9	++	$5,73 \times 10^9$		
CMM101_1624 Schale 3	10	+	$8,47 \times 10^9$	$5,33 \times 10^9$	$1,69 \times 10^9$
	11	+	$4,31 \times 10^9$		
	12	+	$6,59 \times 10^9$		
	13	+	$6,56 \times 10^9$		
	14	+	$3,39 \times 10^9$		
	15	++	$5,64 \times 10^9$		

## 8.8 Differentielle Genexpression nach $\alpha$ -Tomatinzugabe

**Tabelle 8.18:** Bei Tomatin<sub>10min</sub> bzw. Tomatin<sub>4h</sub> differentiell exprimierte Gene. **10 min:** Tomatin<sub>10min</sub>, **4 h:** Tomatin<sub>4h</sub>. Daten von 3 biologischen Replikaten. Schwellenwerte:  $M \geq |0,7|$ ;  $p \leq 0,05$ ;  $n \geq 7$ ; Tomatin<sub>10min</sub>  $A \geq 8,23$ ; Tomatin<sub>4h</sub>:  $A \geq 8,29$ .

Gruppe	Anzahl induzierter Gene: $M \geq 0,7$		Anzahl reprimierter Gene: $M \leq -0,7$	
	10 min (4)	4 h (28)	10 min (8)	4 h (59)
<b>I Metabolismus</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>7</b>
<b>Energie-, Kohlenstoffmetabolismus</b>				
Glycolyse	-	-	-	2
Pentose-Phosphatweg	-	-	2	3
übrige Zucker und andere C-Verbindungen	-	-	-	-
n-Glycan (Glucosidasen)	-	5	-	1
<b>Aminosäure</b>				
Aminotransferasen	-	1	-	-
Lysin, Valin, Threonin	-	-	-	1
Methionin, Cystein	-	1	-	-
<b>III Informationsspeicherung und -prozessierung</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>40</b>
<b>Replikation</b>				
Rekombination	-	-	-	1
<b>Transkription</b>				
Transkription	-	-	-	2
<b>Translation</b>				
ribosomale Proteine	-	-	-	33
Initiation, Elongation, Termination	-	-	-	3
Translation, Rest	-	1	-	1
<b>IV Potentiell relevant für phytopathogene</b>	<b>2</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>11</b>
<b>Interaktion</b>				
<b>Transporter</b>				
ABC, ohne weitere Zuordnung	-	1	-	-
ABC, Aminosäuren	2	1	-	-
ABC, Zucker	-	1	5	4
ABC, anorganische Ionen	-	2	-	-
Permeasen, ohne weitere Zuordnung	-	1	-	-
Permeasen, Zucker	-	1	-	-
Transporter, Energie	-	-	-	3
<b>Regulatoren</b>				
Transkriptionsregulatoren	-	-	-	1
Sigmafaktoren	-	1	-	-
Histon ähnliche Proteine	-	-	-	1
<b>Stress</b>				
Kälteschock	-	-	-	1
Peptidyl-Prolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase	-	-	-	1
<b>Resistenz</b>				
Hydroperoxid	-	1	-	-
Sonstige: Restriktionsenzym, Cytochrom, Hämoglobin	-	1	-	-
<b>intrazelluläre Proteasen</b>				
Serinproteasen	-	-	1	-

<b>V Schlecht/kaum charakterisiert</b>	<b>2</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>generelle Funktionszuordnung</b>				
Dehydrogenasen	1	4	-	-
<b>Funktion unbekannt</b>				
konserviert hypothetische Proteine	-	3	-	-
hypothetische Proteine	1	3	-	1

**Tabelle 8.19:** *Real-time*-RT-PCR Ergebnisse zu den  $\alpha$ -Tomatin-Experimenten Tomatin<sub>10min</sub> und Tomatin<sub>4h</sub>. Die mittels Microarray erhaltenen Werte sind als  $2^M$  angegeben. Ist die Transkriptmenge unter der Versuchsbedingung verringert, ist der negative, reziproke Wert des Verhältnisses zur Kontrolle angegeben (Verhältnis 0,5  $\rightarrow$  -2). Tomatin<sub>10min</sub>: CMM\_0866; Tomatin<sub>4h</sub>: CMM\_0095-CMM\_0877.

<b>GenDB-ID</b>	<b>Genname</b>	<b>mögliche Funktion</b>	<b><math>2^M</math></b>	<b>RT-PCR</b>
CMM_0866	-	$\alpha$ -Glucosid ABC Transporter, Substratbindeprotein	-2,29	-4,95
CMM_0095	<i>cytB</i>	3Fe-4S Ferredoxin	2,70	3,17
CMM_0100	<i>bgIF</i>	$\beta$ -Glucosidase, Glycosyl-Hydrolase-Familie 3 (EC 3.2.1.-)	5,21	3,76
CMM_0103	<i>bgII</i>	$\beta$ -Xylosidase, Glycosyl-Hydrolase-Familie 43 (EC 3.2.1.37)	3,91	3,21
CMM_0877	<i>araD</i>	L-Ribulose-5-Phosphat-4-Epimerase (EC 5.1.3.4)	-2,25	-3,26

## 8.9 Daten zu den CatR-Experimenten

**Tabelle 8.20:** Differentielle Genexpression aufgrund der Inaktivierung von CatR. **M9:** CatR<sub>M9</sub>, **10 min:** CatR<sub>Tomat10min</sub>, **4 h:** CatR<sub>Tomat4h</sub>. Daten von 3 biologischen Replikaten. Schwellenwerte:  $M \geq |0,7|$ ;  $p \leq 0,05$ ;  $n \geq 7$ ;  $A(\text{CatR}_{M9}) \geq 8,86$ ,  $A(\text{CatR}_{\text{Tomat10min}}) \geq 8,85$ ,  $A(\text{CatR}_{\text{Tomat4h}}) \geq 9,30$ .

Gruppe	Anzahl induzierter Gene: M $\geq 0,7$			Anzahl reprimierter Gene: M $\leq -0,7$		
	M9	Tomatin		M9	Tomatin	
	10 min (17)	4 h (27)	4 h (23)	10 min (5)	4 h (6)	4 h (6)
<b>I Metabolismus</b>						
<b>Aminosäure</b>						
Methionin, Cystein	-	1	-	-	-	-
<b>II Zelluläre Prozesse</b>						
<b>Zellwand</b>						
Zelloberfläche	1	1	1	-	-	-
<b>IV Potentiell relevant für phytopathogene Interaktion</b>						
<b>Transporter</b>						
ABC, Aminosäuren	-	1	-	-	-	-
ABC, anorganische Ionen	-	1	-	-	-	-
Permeasen, ohne weitere Zuordnung	-	1	-	-	-	-
<b>Proteintransport</b>						
Konjugation	-	-	-	5	6	6
<b>Regulatoren</b>						
Sigmafaktoren	-	1	-	-	-	-
Histon ähnliche Proteine	-	1	1	-	-	-
<b>extrazelluläre Enzyme</b>						
extrazelluläre Serinproteasen	2	2	2	-	-	-
Pseudogene, extrazelluläre Serinproteasen	2	2	2	-	-	-
<b>V Schlecht/kaum charakterisiert</b>						
<b>generelle Funktionszuordnung</b>						
Dehydrogenasen	-	1	-	-	-	-
<b>Funktion unbekannt</b>						
konserviert hypothetische Proteine	2	2	3	-	-	-
hypothetische Proteine	9	12	13	-	-	-
Pseudogene	1	1	1	-	-	-

**Tabelle 8.21:** In den Clustern I und II enthaltene Gene. Das hierarchische Clustering wurde mit den Daten der CatR-Experimente CatR<sub>M9</sub> (**M9**), CatR<sub>Tomat10min</sub> (**10 min**) und CatR<sub>Tomat4h</sub> (**4 h**) durchgeführt. Alle Gene (43), die mindestens unter einer der drei Versuchsbedingungen die Bedingungen für p, n, A und M (siehe Tabelle 8.20) erfüllten, wurden für diese Analyse verwendet. Cluster II a und b sind Untergruppen des Clusters II. **Fett:** M-Wert  $\geq |0,7|$ . Unterstrichene M-Werte: Mittels *real-time*-RT-PCR validierte Werte (Tabelle 8.22).

GenDB-ID	Genname	mögliche Funktion	Tomatin		
			M9	10 min	4 h
<b>Cluster I</b>					
pCM2_0022	<i>traE</i>	konserviert hypothetisches Protein, ATP-bindendes Protein	<b>-0,71</b>	<b>-0,73</b>	<b>-0,84</b>
pCM2_0023	-	konserviertes Membranprotein	-0,63	<b>-0,76</b>	<b>-0,89</b>
pCM2_0024	<i>trbL</i>	Konjugations-Transfer Protein	<b><u>-1,13</u></b>	<b><u>-1,02</u></b>	<b>-1,46</b>
pCM2_0025	-	sekretiertes Protein	<b>-0,87</b>	<b>-0,82</b>	<b>-1,01</b>

pCM2_0026	-	hypothetisches Membranprotein	<b>-0,90</b>	<b>-1,04</b>	<b>-1,22</b>
pCM2_0027	-	hypothetisches Protein	<b>-0,92</b>	<b>-0,90</b>	<b>-1,12</b>
<b>Cluster II</b>					
pCM2_0053	<i>phpA</i>	extrazelluläre Serin-Protease	<b><u>2,09</u></b>	<b><u>2,06</u></b>	<b><u>2,25</u></b>
pCM2_0052	<i>phpB</i>	extrazelluläre Serin-Protease	<b><u>1,39</u></b>	<b><u>1,79</u></b>	<b><u>1,75</u></b>
CMM_PSEU DO_0010	<i>chpA'</i>	Pseudogen, extrazelluläre Serin-Protease	<b>1,01</b>	<b>0,90</b>	<b>0,86</b>
CMM_PSEU DO_0008	<i>chpA'</i>	Pseudogen, extrazelluläre Serin-Protease	<b>1,93</b>	<b>1,86</b>	<b><u>2,03</u></b>
pCM2_0036	-	Transkriptionsregulator, Histon-ähnliches Protein	0,69	<b>1,18</b>	<b>0,91</b>
pCM2_0035	<i>rhsA</i>	Rhs ähnliches Protein	<b><u>1,59</u></b>	<b><u>1,83</u></b>	<b><u>1,59</u></b>
pCM2_0004	-	hypothetisches Protein	0,59	<b>0,92</b>	<b>0,74</b>
pCM2_0012	-	hypothetisches Protein, TraA Konjugationsprotein	<b>0,87</b>	<b>0,87</b>	<b>0,87</b>
pCM2_0028	-	konserviertes sekretiertes Protein	<b>1,04</b>	<b>1,28</b>	<b>1,24</b>
pCM2_0029	-	hypothetisches Membranprotein	<b>1,11</b>	<b>1,24</b>	<b>1,09</b>
pCM2_0030	-	hypothetisches Protein, DNA-Bindeprotein	<b><u>1,11</u></b>	<b>1,25</b>	<b>1,22</b>
pCM2_0037	-	konserviert hypothetisches Protein	<b>0,75</b>	<b>1,13</b>	<b>1,15</b>
pCM2_0041	-	hypothetisches Membranprotein	<b>1,55</b>	<b>1,51</b>	<b>1,38</b>
pCM2_0042	-	hypothetisches Protein	<b>1,61</b>	<b>1,17</b>	<b>1,10</b>
pCM2_0047	-	hypothetisches Protein	<b>1,51</b>	<b>1,21</b>	<b>1,39</b>
pCM2_0049	-	hypothetisches Protein	<b>0,76</b>	<b>0,91</b>	<b>0,90</b>
pCM2_0051	-	hypothetisches Protein	<b>0,90</b>	<b>1,14</b>	<b>0,98</b>
pCM2_0055	-	hypothetisches Protein	<b>0,94</b>	<b>1,00</b>	<b>0,75</b>
pCM2_0065	-	hypothetisches Protein	<b>0,72</b>	<b>0,93</b>	<b>0,79</b>
pCM2_0066	-	konserviert hypothetisches Protein	0,68	<b>1,05</b>	<b>0,73</b>
pCM2_PSE UDO_0004	-	Pseudogen, MFS Permease	<b>0,88</b>	<b>1,26</b>	<b>1,16</b>
<b>Cluster II a</b>					
CMM_1336	<i>metY</i>	O-Acetylhomoserin(Thiol)-Lyase (EC 2.5.1.49)	* 0,10	<b>0,75</b>	* 0,28
CMM_1960	-	Peptid ABC Transporter, Substratbindeprot.	0,40	<b>1,10</b>	* 0,35
CMM_2283	-	Metall ABC Transporter, Substratbindeprot.	0,26	<b>1,05</b>	0,34
CMM_1949	-	MFS Permease	0,24	<b>0,76</b>	* 0,14
CMM_0243	<i>sigY</i>	RNA-Polymerase Sigmafaktor, ECF-Subfamilie	* 0,17	<b>0,80</b>	* 0,23
CMM_1973	-	Acyl-CoA-Dehydrogenase	* 0,07	<b><u>1,17</u></b>	* 0,17
<b>Cluster II b</b>					
CMM_1107	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	0,54	0,54	<b>0,70</b>
pCM2_0061	-	hypothetisches Protein	0,41	0,35	<b>0,71</b>

**Tabelle 8.22:** *Real-time*-RT-PCR Ergebnisse zu den CatR-Experimenten. Die mittels Microarray erhaltenen Werte sind als  $2^M$  angegeben. Ist die Transkriptmenge unter der Versuchsbedingung verringert, ist der negative, reziproke Wert des Verhältnisses zur Kontrolle angegeben (Bsp.: Verhältnis = 0,5  $\rightarrow$  -2).

	GenDB-ID	Genname	mögliche Funktion	$2^M$	RT-PCR
CatR <sub>M9</sub>	pCM2_0024	<i>trbL</i>	Konjugations-Transfer Protein	-2,19	-4,23
	pCM2_0030	-	hypothetisches Protein, DNA-Bindeprotein	2,15	2,96
	pCM2_0035	<i>rhsA</i>	Rhs ähnliches Protein	3,02	14,45
	pCM2_0052	<i>phpB</i>	extrazelluläre Serin-Protease	2,62	4,89
	pCM2_0053	<i>phpA</i>	extrazelluläre Serin-Protease	4,26	5,36
CatR <sub>Tomat.10min</sub>	CMM_1973	-	Acyl-CoA-Dehydrogenase	2,25	3,90
	pCM2_0024	<i>trbL</i>	Konjugations-Transfer Protein	-2,03	-2,13
	pCM2_0035	<i>rhsA</i>	Rhs ähnliches Protein	3,56	17,61
	pCM2_0052	<i>phpB</i>	extrazelluläre Serin-Protease	3,45	6,96
	pCM2_0053	<i>phpA</i>	extrazelluläre Serin-Protease	4,15	10,61
CatR <sub>Tomat.4h</sub>	CMM_PSEU	<i>chpA'</i>	Pseudogen, extrazelluläre Serin-Protease	4,08	4,29
	DO_0008				
	pCM2_0035	<i>rhsA</i>	Rhs ähnliches Protein	3,01	63,39
	pCM2_0052	<i>phpB</i>	extrazelluläre Serin-Protease	3,36	6,40
	pCM2_0053	<i>phpA</i>	extrazelluläre Serin-Protease	4,76	9,62

## 8.10 Daten zu den *Quorum-Sensing* Experimenten QS-10min und QS-6h

**Tabelle 8.23:** Gruppenzuordnung der differentiell exprimierten Gene der Experimente QS-10min (10 min) und QS-6h (6 h). Schwellenwerte:  $p \leq 0,05$ ; **QS-10min:**  $M \geq |0,7|$ ,  $n \geq 9$ ,  $A \geq 7,65$ ; **QS-6h:**  $n \geq 7$ ,  $M \geq |0,93|$ ,  $A \geq 7,99$ .

Gruppe	Anzahl induzierter Gene		Anzahl reprimierter Gene	
	10 min (32)	6 h (11)	10 min (31)	6 h (97)
<b>I Metabolismus</b>				
<b>Energie-, Kohlenstoffmetabolismus</b>				
Glycolyse	1	-	-	2
Pentose-Phosphatweg	-	-	2	2
Citrat-Zyklus	-	-	-	3
<b>Aminosäure</b>				
Aminotransferasen	1	-	-	-
Lysin, Valin, Threonin	-	-	1	-
aromatische Aminosäuren	-	-	-	1
Methionin, Cystein	3	1	-	-
<b>Lipide</b>				
Fettsäuren	-	-	-	2
Lipide, Rest	1	-	-	1
<b>Coenzyme</b>				
Hämoglobin	-	-	-	1
<b>Sekundärmetabolismus</b>				
Eisen	-	-	-	2
<b>III Informationsspeicherung und -prozessierung</b>				
<b>Replikation</b>				
Replikation	-	-	-	1
<b>Transkription</b>				
Transkription	-	-	2	3
weitere an der Transkription beteiligte Proteine	-	-	-	1
<b>Translation</b>				
ribosomale Proteine	-	-	19	38
Initiation, Elongation, Termination	1	-	1	3
Translation, Rest	-	-	-	2
<b>IV Potentiell relevant für phytopathogene</b>				
<b>Interaktion</b>				
<b>Transporter</b>				
ABC, ohne weitere Zuordnung	-	-	-	1
ABC, Zellteilung	-	-	-	1
ABC, Aminosäuren	5	1	-	-
ABC, Zucker	-	-	5	3
ABC, anorganische Ionen	3	-	-	1
Permeasen, ohne weitere Zuordnung	1	1	-	-
Permeasen, Abwehr	-	-	-	1
Transporter, Energie	-	-	1	3
<b>Proteintransport</b>				
Sec-System	-	-	-	3
Tat-System	-	-	-	1
Signalpeptidase	-	-	-	1
Konjugation	-	1	-	-

<b>Regulatoren</b>				
Transkriptionsregulatoren	1	-	-	-
Zwei-Komponenten-Regulatoren	-	-	-	1
Sigmafaktoren	1	-	-	-
Histon ähnliche Proteine	-	-	-	1
<b>Stress</b>				
Hitzeschock, Chaperone	1	-	-	3
Clp-Proteasen	-	-	-	1
Kälteschock	-	-	-	1
Peptidyl-Prolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase	-	-	-	2
<b>Resistenz</b>				
Hydroperoxid	1	-	-	-
Radikale (Fenton)	-	-	-	1
Eisen/Schwefel-Cluster	-	-	-	2
<b>extrazelluläre Enzyme</b>				
extrazelluläre Serinproteasen	-	1	-	-
<b>intrazelluläre Proteasen</b>				
Serinproteasen	-	-	-	1
<b>V Schlecht/kaum charakterisiert</b>				
<b>generelle Funktionszuordnung</b>				
Dehydrogenasen	5	1	-	2
<b>Funktion unbekannt</b>				
konserviert hypothetische Proteine	2	1	-	3
hypothetische Proteine	6	4	-	-

**Tabelle 8.24:** *Real-time*-RT-PCR Ergebnisse zu den *Quorum-Sensing* Experimenten QS-10min und QS-6h. Die mittels Microarray erhaltenen Werte sind als  $2^M$  angegeben. Ist die Transkriptmenge unter der Versuchsbedingung verringert, ist der negative, reziproke Wert des Verhältnisses angegeben (Verhältnis 0,5  $\rightarrow$  -2). **QS-10min:** CMM\_0879-CMM\_2804; **QS-6h:** CMM\_0044.

GenDB-ID	Genname	mögliche Funktion	$2^M$	RT-PCR
CMM_0879	-	Zucker ABC Transporter, Substratbindeprotein	-2,19	-2,33
CMM_0880	-	Zucker ABC Transporter, ATPase	-3,93	-1,90
CMM_2804	-	Transkriptionsregulator, MarR-Familie	2,25	3,13
CMM_0044	<i>ppaC</i>	extrazelluläre Serin-Protease	2,06	2,39

**Tabelle 8.25:** Cluster II des hierarchischen Clusterings der QS-Experimente (**QS-10 min, -6 h**) und des wuchsphasenabhängigen Experiments (**spät log**). Die Gene sind nach ihrer Zugehörigkeit zu den funktionellen Gruppen I bis V und nach ihrer GenDB-ID sortiert. **Fett** gedruckte Gene aus Cluster II sind Bestandteil der Untergruppe II'. Unterstrichener M-Wert: Mittels *real-time*-RT-PCR validierter Wert (Tabelle 8.24). **Fett:** M-Wert  $\geq |0,7|$ .

GenDB-ID	Genname	Funktion	spät log	QS 10 min	6 h
<b>Cluster II</b>					
<b>CMM_0183</b>	-	<b>Aminotransferase</b>	<b>1,42</b>	<b>1,64</b>	<b>0,92</b>
<b>CMM_1336</b>	<i>metY</i>	<b>O-Acetylhomoserin(Thiol)-Lyase (EC 2.5.1.49)</b>	<b>0,70</b>	<b>1,57</b>	<b>0,95</b>
CMM_0573	<i>menC</i>	O-Succinylbenzoat-CoA-Synthase (EC 4.2.1.-)	0,46	* 0,24	<b>0,72</b>
CMM_2791	<i>murB</i>	UDP-N-Acetylmuramat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.158)	* 0,18	* 0,04	<b>0,73</b>

CMM_0911	-	hypothetisches Protein (Sortase Motiv)	0,37	0,28	<b>0,84</b>
<b>CMM_1960</b>	-	<b>Peptid ABC Transporter, Substratbindeprotein</b>	<b>1,21</b>	<b>2,17</b>	<b>1,10</b>
CMM_1949	-	MFS Permease	<b>1,42</b>	<b>1,24</b>	<b>1,15</b>
CMM_0222	-	multidrug Resistenz Membranprotein	* 0,38	* 0,06	<b>0,73</b>
pCM1_0006	-	hypothetisches Protein	<b>0,88</b>	0,49	<b>1,68</b>
CMM_1101	-	Transkriptionsregulator, TetR-Familie	* 0,11	0,31	<b>0,82</b>
CMM_0316	<i>clpY</i>	ATPase mit Chaperon Aktivität, ATP-bindende UE	0,59	<b>0,75</b>	<b>0,83</b>
CMM_1205	-	Peroxiredoxin	<b>0,98</b>	<b>0,93</b>	<b>0,74</b>
CMM_0044	<i>ppaC</i>	extrazelluläre Serin-Protease	<b>0,80</b>	* 0,09	<b>1,04</b>
<b>CMM_1406</b>	-	<b>konserviertes, sekretiertes Protein</b>	<b>1,35</b>	<b>1,59</b>	<b>1,08</b>
CMM_1583	-	konserviert hypothetisches Protein	<b>0,98</b>	0,49	<b>0,76</b>
CMM_0246	-	hypothetisches Protein	* 0,55	0,51	<b>0,92</b>
CMM_1184	-	hypothetisches Protein	<b>1,22</b>	<b>0,99</b>	<b>1,64</b>
CMM_1233	-	hypothetisches Protein	* -0,20	* 0,29	<b>0,72</b>
CMM_1675	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	<b>0,77</b>	0,65	<b>1,51</b>
<b>CMM_2358</b>	-	<b>hypothetisches Membranprotein</b>	0,49	<b>1,19</b>	<b>1,01</b>
CMM_2857	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	0,52	0,53	<b>0,77</b>
CMM_2923	-	hypothetisches Membranprotein	0,94	<b>0,71</b>	<b>1,80</b>

**Tabelle 8.26:** Cluster A, B und V des hierarchischen Clusterings der QS-Experimente (**QS-10 min, -6 h**) und des wuchsphasenabhängigen Experiments (**spät log**). Die Gene sind nach ihrer Zugehörigkeit zu den Gruppen I bis V und nach ihrer GenDB-ID sortiert. **Fett:** M-Wert  $\geq |0,7|$ .

GenDB-ID	Genname	Funktion	spät log	QS	
				10 min	6 h
<b>Cluster A</b>					
CMM_1736	<i>pgiA</i>	Glucose-6-phosphat-Isomerase (EC 5.3.1.9)	<b>-1,33</b>	-0,36	<b>-1,39</b>
CMM_1738	<i>opcA</i>	Glucose-6-P-Dehydrogenase Effektor	<b>-1,34</b>	-0,32	<b>-1,25</b>
CMM_1734	<i>tktA</i>	Transketolase (EC 2.2.1.1)	<b>-0,90</b>	-0,35	<b>-0,73</b>
CMM_1735	<i>talA</i>	Transaldolase (EC 2.2.1.2)	<b>-1,09</b>	-0,14	<b>-1,36</b>
CMM_0972	<i>sdhC</i>	Succinat-Dehydrogenase, Cytochrom b Untereinheit (EC 1.3.99.1)	<b>-1,25</b>	-0,38	<b>-0,94</b>
CMM_1641	<i>aceF</i>	Pyruvat/2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex, Dihyrolipoamid-Acyltransferase (E2) Untereinheit (EC 2.3.1.-)	<b>-0,92</b>	-0,30	<b>-1,17</b>
CMM_2233	<i>fumC</i>	Fumarat-Hydratase (EC 4.2.1.2)	<b>-0,82</b>	-0,27	<b>-0,80</b>
CMM_2548	<i>sucC</i>	Succinyl-CoA-Ligase [ADP-bildend], $\beta$ -Untereinheit (EC 6.2.1.5)	<b>-1,37</b>	-0,48	<b>-1,36</b>
CMM_0902	<i>lysC</i>	Aspartokinase (EC 2.7.2.4)	<b>-0,87</b>	* -0,20	<b>-0,89</b>
CMM_1096	<i>ilvC</i>	Ketosäure-Reductoisomerase (EC 1.1.1.86)	<b>-1,12</b>	<b>-0,80</b>	<b>-0,82</b>
CMM_1770	<i>hisG</i>	ATP-Phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.17)	<b>-0,96</b>	* -0,07	<b>-0,71</b>
CMM_1763	<i>trpB</i>	Tryptophan-Synthase, $\beta$ -Untereinheit (EC 4.2.1.20)	-0,67	-0,28	<b>-1,00</b>
CMM_2543	<i>ddaH</i>	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (EC 3.5.3.18)	<b>-0,81</b>	* -0,12	<b>-0,92</b>
CMM_0999	<i>accD</i>	Acetyl/Propionyl-CoA Carboxylase, $\beta$ -Untereinheit (EC 6.4.1.-)	<b>-0,84</b>	-0,31	<b>-0,96</b>
CMM_0640	-	konserviert hypothetisches Protein	<b>-0,99</b>	-0,28	<b>-1,31</b>
CMM_1013	<i>rmlA</i>	Glucose-1-Phosphat-Thymidyltransferase (EC 2.7.7.24)	<b>-0,78</b>	-0,13	<b>-0,81</b>
CMM_1017	<i>wcqG</i>	Membranprotein	<b>-0,70</b>	-0,25	<b>-0,79</b>
pCM2_0035	<i>rhsA</i>	Rhs ähnliches Protein	<b>-1,06</b>	-0,11	<b>-0,92</b>
CMM_0006	<i>gyrB</i>	DNA-Gyrase, Untereinheit B (EC 5.99.1.3)	<b>-1,37</b>	-0,60	<b>-0,92</b>
CMM_1651	-	Topoisomerase II, Untereinheit A (EC 5.99.1.3)	<b>-0,83</b>	-0,26	<b>-0,95</b>
CMM_2788	<i>nusG</i>	Transkriptions Antiterminations Protein	<b>-1,27</b>	-0,60	<b>-0,99</b>
CMM_2977	<i>rnpA</i>	Ribonuclease P, Protein-Untereinheit (EC 3.1.26.5)	<b>-1,07</b>	-0,40	<b>-0,93</b>
CMM_1357	<i>rpmF</i>	50S ribosomales Protein L32	<b>-0,94</b>	-0,32	<b>-1,34</b>
CMM_1367	<i>rpsP</i>	30S ribosomales Protein S16	<b>-1,25</b>	-0,52	<b>-1,21</b>
CMM_1490	<i>rpmA</i>	50S ribosomales Protein L27	<b>-0,92</b>	-0,28	<b>-0,77</b>

CMM_1551	<i>rpsT</i>	30S ribosomales Protein S20	<b>-1,30</b>	<b>-0,74</b>	<b>-0,85</b>
CMM_1716	<i>rpmE2</i>	50S ribosomales Protein L31 type B	<b>-1,16</b>	* -0,14	<b>-0,76</b>
CMM_1804	<i>rpsD</i>	30S ribosomales Protein S4	<b>-1,14</b>	-0,50	<b>-1,01</b>
CMM_2010	<i>rpmI</i>	50S ribosomales Protein L35	-0,63	-0,48	<b>-1,09</b>
CMM_2270	<i>rplY</i>	50S ribosomales Protein L25	<b>-1,17</b>	-0,37	<b>-1,39</b>
CMM_2580	<i>rplM</i>	50S ribosomales Protein L13	<b>-1,30</b>	-0,52	<b>-1,24</b>
CMM_2586	<i>rpsM</i>	30S ribosomales Protein S13	<b>-1,17</b>	-0,48	<b>-1,39</b>
CMM_2587	<i>rpmJ1</i>	50S ribosomales Protein L36 1	-0,69	-0,15	<b>-1,09</b>
CMM_2602	<i>rplR</i>	50S ribosomales Protein L18	<b>-0,94</b>	-0,62	<b>-1,00</b>
CMM_2609	<i>rpmC</i>	50S ribosomales Protein L29	<b>-1,08</b>	<b>-0,84</b>	<b>-1,31</b>
CMM_2614	<i>rplB</i>	50S ribosomales Protein L2	<b>-1,20</b>	<b>-0,74</b>	<b>-0,92</b>
CMM_2935	<i>rpsN</i>	30S ribosomales Protein S14	<b>-1,01</b>	-0,40	<b>-1,01</b>
CMM_2961	<i>rpsR</i>	30S ribosomales Protein S18	<b>-1,47</b>	-0,60	<b>-1,33</b>
CMM_1802	<i>alaS</i>	Alanyl-tRNA-synthetase (EC 6.1.1.7)	<b>-0,75</b>	-0,25	<b>-0,73</b>
CMM_1793	<i>efp</i>	Elongationsfaktor P (EF-P)	<b>-0,82</b>	-0,15	<b>-0,85</b>
CMM_2461	-	konserviert hypothetisches Protein, Translationsfaktor	-0,63	-0,33	<b>-1,41</b>
CMM_1974	<i>engA</i>	GTP-bindendes Protein	<b>-0,70</b>	-0,49	<b>-0,90</b>
CMM_1728	-	ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	<b>-1,18</b>	-0,36	<b>-1,37</b>
CMM_0085	-	Zucker ABC Transporter, Permease	<b>-0,95</b>	-0,57	<b>-1,00</b>
CMM_0166	<i>fhuD</i>	Fe <sup>3+</sup> -Siderophor ABC Transporter, Substratbindeprotein	<b>-0,81</b>	-0,19	<b>-1,20</b>
CMM_1164	<i>atpE</i>	ATP Synthase, C Untereinheit (EC 3.6.3.-)	<b>-1,14</b>	-0,56	<b>-0,96</b>
CMM_1169	<i>atpD</i>	ATP Synthase, $\beta$ -Untereinheit (EC 3.6.3.14)	<b>-1,02</b>	-0,51	<b>-0,86</b>
CMM_1741	<i>secG</i>	Protein-Export Membranprotein	-0,69	-0,23	<b>-0,98</b>
CMM_1811	<i>secF</i>	Protein-Export Membranprotein	<b>-1,09</b>	-0,46	<b>-1,10</b>
CMM_1812	<i>secD</i>	Präprotein Translocase, Untereinheit	<b>-0,78</b>	-0,28	<b>-0,91</b>
CMM_1813	-	Präprotein Translocase, Untereinheit	<b>-0,72</b>	-0,30	<b>-0,85</b>
CMM_2598	<i>secY</i>	Präprotein Translocase, secY Untereinheit	<b>-0,94</b>	-0,32	<b>-1,22</b>
CMM_1686	<i>tatC</i>	Sec-unabhängige <i>twin-arginine</i> Protein Translocase	<b>-1,03</b>	-0,20	<b>-1,17</b>
CMM_1363	<i>ffhA</i>	<i>Signal recognition particle</i> Protein	-0,63	-0,19	<b>-0,85</b>
CMM_1746	<i>whiA</i>	konserviert hypothetisches Protein	<b>-1,38</b>	-0,55	<b>-0,78</b>
CMM_2475	-	Zwei-Komponenten-System, <i>response regulator</i>	<b>-0,80</b>	* -0,15	<b>-1,46</b>
CMM_2934	<i>hupB</i>	DNA-Bindeprotein	<b>-1,35</b>	-0,40	<b>-1,39</b>
CMM_0151	<i>dnaK</i>	Chaperon (Hitzeschockprotein 70)	-0,61	-0,34	<b>-1,06</b>
CMM_0153	<i>dnaJ1</i>	Chaperon, <i>curved DNA-binding</i> Protein	-0,68	* -0,18	<b>-0,89</b>
CMM_2092	<i>hsp20</i>	Hitzeschockprotein, HSP20-Familie	<b>-0,86</b>	* -0,14	<b>-0,90</b>
CMM_2484	-	konserviert hypothetisches Protein, Protein-Disulfid-Isomerase	<b>-1,39</b>	-0,26	<b>-1,14</b>
CMM_0857	<i>clpC</i>	ATP-abhängig Protease, ATPase Untereinheit (EC 3.4.-.-)	<b>-1,19</b>	-0,49	<b>-0,97</b>
CMM_1464	<i>clpP1</i>	ATP-abhängige Clp Protease, proteolytische Untereinheit	<b>-0,90</b>	-0,34	<b>-0,91</b>
CMM_2479	<i>cspA2</i>	Kälteschockprotein	<b>-0,92</b>	-0,37	<b>-1,02</b>
CMM_0010	<i>ppiA</i>	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase (EC 5.2.1.8)	<b>-0,79</b>	-0,42	<b>-0,94</b>
CMM_1463	<i>tig</i>	<i>trigger factor</i> (TF) (Prolyl Isomerase, Chaperon)	<b>-1,19</b>	-0,36	<b>-1,16</b>
CMM_1727	-	konserviert hypothetisches Protein, beteiligt am Fe-S-Cluster <i>Assembly</i>	<b>-1,00</b>	-0,40	<b>-1,25</b>
CMM_1729	-	2Fe-2S Ferredoxin	<b>-1,26</b>	-0,29	<b>-1,20</b>
CMM_1731	-	konserviert hypothetisches Protein, beteiligt am Fe-S-Cluster <i>Assembly</i> , ABC Transporter	-0,68	-0,27	<b>-0,73</b>
CMM_2434	-	Serin-Protease, S1C-Familie (EC 3.4.21.-)	-0,67	-0,30	<b>-1,42</b>
CMM_1670	-	Oxidoreduktase (EC 1.1.1.-)	<b>-1,44</b>	-0,59	<b>-1,23</b>
CMM_2098	-	<i>short chain</i> Dehydrogenase/Oxidoreduktase	<b>-0,94</b>	* -0,16	<b>-0,86</b>
CMM_0008	-	konserviertes Membranprotein	<b>-0,97</b>	* -0,09	<b>-0,73</b>
CMM_1356	-	konserviert hypothetisches Protein	<b>-0,96</b>	-0,47	<b>-0,70</b>
CMM_2553	-	konserviertes Membranprotein	<b>-0,93</b>	* -0,15	<b>-1,02</b>
CMM_2976	-	konserviert hypothetisches Protein	<b>-0,91</b>	-0,33	<b>-0,90</b>
CMM_0009	-	hypothetisches Protein	<b>-0,73</b>	-0,19	<b>-0,91</b>
CMM_0340	-	Membranprotein	<b>-1,03</b>	* -0,28	<b>-0,84</b>

<b>Cluster B</b>					
CMM_1737	<i>zwfA2</i>	Glucose-6-Phosphat-1-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49)	<b>-1,64</b>	-0,48	<b>-2,01</b>
CMM_2094	<i>alcA</i>	Siderophorbiosynthese-Enzym / Monooxygenase	<b>-1,32</b>	-0,33	<b>-1,96</b>
CMM_2584	<i>rpoA</i>	DNA-gerichtete RNA-Polymerase, $\alpha$ -Untereinheit (RNAP, $\alpha$ -Untereinheit) (EC 2.7.7.6)	<b>-1,65</b>	<b>-0,79</b>	<b>-1,70</b>
CMM_0860	<i>rplJ</i>	50S ribosomales Protein L10	<b>-2,48</b>	-0,66	<b>-2,23</b>
CMM_0861	<i>rplL</i>	50S ribosomales Protein L7/L12	<b>-2,23</b>	-0,47	<b>-1,95</b>
CMM_1383	<i>rpsB</i>	30S ribosomales Protein S2	<b>-1,60</b>	-0,28	<b>-1,71</b>
CMM_1489	<i>rplU</i>	50S ribosomales Protein L21	<b>-1,46</b>	-0,52	<b>-1,93</b>
CMM_1752	<i>rpsA</i>	30S ribosomales Protein S1	<b>-2,10</b>	<b>-0,81</b>	<b>-1,96</b>
CMM_2009	<i>rplT</i>	50S ribosomales Protein L20	<b>-1,19</b>	-0,53	<b>-1,79</b>
CMM_2579	<i>rpsI</i>	30S ribosomales Protein S9	<b>-1,74</b>	-0,67	<b>-1,63</b>
CMM_2583	<i>rplQ</i>	50S ribosomales Protein L17	<b>-1,53</b>	<b>-0,86</b>	<b>-1,82</b>
CMM_2585	<i>rpsK</i>	30S ribosomales Protein S11	<b>-1,60</b>	-0,69	<b>-2,02</b>
CMM_2599	<i>rplO</i>	50S ribosomales Protein L15	<b>-1,79</b>	<b>-0,74</b>	<b>-2,14</b>
CMM_2600	<i>rpmD</i>	50S ribosomales Protein L30	<b>-1,98</b>	<b>-0,81</b>	<b>-1,97</b>
CMM_2601	<i>rpsE</i>	30S ribosomales Protein S5	<b>-1,83</b>	-0,65	<b>-1,25</b>
CMM_2603	<i>rplF</i>	50S ribosomales Protein L6	<b>-2,50</b>	<b>-1,01</b>	<b>-2,49</b>
CMM_2605	<i>rplE</i>	50S ribosomales Protein L5	<b>-1,63</b>	<b>-0,91</b>	<b>-2,09</b>
CMM_2606	<i>rplX</i>	50S ribosomales Protein L24	<b>-1,83</b>	<b>-0,88</b>	<b>-2,06</b>
CMM_2607	<i>rplN</i>	50S ribosomales Protein L14	<b>-2,21</b>	<b>-1,21</b>	<b>-2,56</b>
CMM_2608	<i>rpsQ</i>	30S ribosomales Protein S17	<b>-1,85</b>	<b>-1,01</b>	<b>-2,06</b>
CMM_2610	<i>rplP</i>	50S ribosomales Protein L16	<b>-2,19</b>	<b>-1,13</b>	<b>-1,98</b>
CMM_2612	<i>rplV</i>	50S ribosomales Protein L22	<b>-2,62</b>	<b>-1,25</b>	<b>-2,53</b>
CMM_2615	<i>rplW</i>	50S ribosomales Protein L23	<b>-2,24</b>	<b>-1,07</b>	<b>-2,49</b>
CMM_2616	<i>rplD</i>	50S ribosomales Protein L4	<b>-2,33</b>	<b>-1,09</b>	<b>-2,18</b>
CMM_2618	<i>rpsJ</i>	30S ribosomales Protein S10	<b>-2,02</b>	<b>-0,93</b>	<b>-2,26</b>
CMM_2622	<i>rpsG</i>	30S ribosomales Protein S7	<b>-1,27</b>	-0,51	<b>-1,53</b>
CMM_2787	<i>rplK</i>	50S ribosomales Protein L11	<b>-1,70</b>	<b>-0,77</b>	<b>-1,77</b>
CMM_2937	<i>rpmB</i>	50S ribosomales Protein L28	<b>-1,40</b>	-0,49	<b>-1,62</b>
CMM_2960	<i>rplI</i>	50S ribosomales Protein L9	<b>-1,76</b>	<b>-0,81</b>	<b>-1,83</b>
CMM_1384	<i>tsf</i>	Elongationsfaktor Ts (EF-Ts)	<b>-1,60</b>	-0,55	<b>-1,46</b>
CMM_2620	<i>tuf</i>	Elongationsfaktor Tu (EF-Tu)	<b>-1,67</b>	-0,53	<b>-1,86</b>
CMM_2621	<i>fusA</i>	Elongationsfaktor G (EF-G)	<b>-1,76</b>	<b>-0,89</b>	<b>-1,76</b>
CMM_2047	<i>pnp</i>	Polyribonucleotid-Nucleotidyltransferase (EC 2.7.7.8)	<b>-1,78</b>	-0,66	<b>-2,11</b>
CMM_1166	<i>atpH</i>	ATP Synthase $\delta$ Untereinheit (EC 3.6.3.14)	<b>-1,85</b>	<b>-0,84</b>	<b>-2,16</b>
CMM_1167	<i>atpA</i>	ATP Synthase, $\alpha$ -Untereinheit (EC 3.6.3.14)	<b>-1,28</b>	-0,63	<b>-1,67</b>
CMM_2478	<i>groEL</i>	60 kDa Chaperonin (Protein Cpn60) (GroEL Protein)	<b>-1,43</b>	* -0,24	<b>-1,46</b>
CMM_0144	-	konserviertes, sekretiertes Protein	<b>-1,11</b>	-0,28	<b>-2,36</b>
<b>Cluster V</b>					
CMM_2944	-	2-Ketosäure-Dehydrogenase, E1 $\beta$ -UE (EC 1.2.4.-)	-0,37	* -0,04	<b>-0,87</b>
CMM_0278	-	Chorismat-Mutase	-0,42	* -0,15	<b>-0,83</b>
CMM_0728	<i>purL</i>	Phosphoribosylformylglycinamidin-Synthase II (EC 6.3.5.3)	<b>-0,70</b>	* -0,04	<b>-0,81</b>
CMM_2597	<i>adkA</i>	Adenylat-Kinase (EC 2.7.4.3)	-0,66	-0,14	<b>-0,76</b>
CMM_1656	<i>dutA</i>	Deoxyuridin-5'-Triphosphat-Pyrophosphatase (EC 3.6.1.23)	-0,46	* -0,18	<b>-0,73</b>
CMM_1255	-	Fettsäure-Desaturase (EC 1.14.-.-)	* 0,04	* 0,09	<b>-0,85</b>
CMM_1616	<i>fabF</i>	3-Oxoacyl-[acyl-carrier-Protein]-Synthase (EC 2.3.1.41)	-0,47	* -0,19	<b>-1,04</b>
CMM_1617	<i>acpP</i>	<i>acyl carrier</i> Protein	-0,42	-0,26	<b>-0,75</b>
CMM_1648	-	Glutamin-Amidotransferase	-0,33	* -0,18	<b>-0,75</b>
CMM_0601	<i>hemO</i>	Hämoxxygenase (dezyklisierend) (EC 1.14.99.3)	* -0,16	0,27	<b>-0,95</b>
CMM_1777	<i>metK</i>	S-Adenosylmethionin-Synthetase (EC 2.5.1.6) (Methionin-Adenosyltransferase)	-0,37	* -0,01	<b>-0,72</b>
CMM_1129	-	Siderophor-interagierendes Protein	<b>-0,85</b>	0,25	<b>-1,24</b>
CMM_1865	<i>ftsI</i>	Peptidoglycan-Glycosyltransferase/Penicillin-Bindeprotein (EC 2.4.1.129)	* -0,12	-0,25	<b>-0,74</b>

CMM_1862	<i>mraY</i>	Phospho-N-Acetylmuramoyl-Pentapeptid-Transferase (EC 2.7.8.13)	-0,35	-0,39	<b>-0,87</b>
CMM_2648	-	ATP-abhängige Helicase (EC 3.6.1.-)	-0,40	* 0,06	<b>-0,91</b>
CMM_1310	<i>ftsX</i>	ABC Transporter, Permease, an Zellteilung beteiligt	-0,18	-0,28	<b>-1,00</b>
CMM_1532	<i>proX</i>	Prolin/Glycin/Betain/Cholin ABC Transporter, Substratbindeprotein	-0,53	-0,30	<b>-0,75</b>
CMM_2931	<i>fecB2</i>	Eisen-Siderophor ABC Transporter, Substratbindeprotein	-0,49	* 0,10	<b>-0,80</b>
CMM_0382	-	<i>multidrug</i> Efflux MFS Permease	-0,59	* -0,03	<b>-0,93</b>
CMM_1374	<i>lepB</i>	Signalpeptidase I (EC 3.4.21.89)	-0,27	-0,21	<b>-0,80</b>
CMM_1761	-	Prolipoprotein Diacylglyceryltransferase (EC 2.4.99.-)	-0,46	0,63	<b>-0,99</b>
CMM_1063	-	Transkriptionsregulator, CarD-Familie	-0,54	-0,14	<b>-0,77</b>
CMM_2476	-	Sensor Protein (EC 2.7.13.3)	-0,41	* 0,00	<b>-0,79</b>
CMM_2568	<i>groES</i>	10 kDa Chaperonin (Protein Cpn10)	-0,73	* 0,23	<b>-0,88</b>
CMM_2062	<i>dpsB</i>	DNA-Bindeprotein, Ferritin-ähnliches	-0,33	* 0,06	<b>-1,05</b>
pCM1_0020	<i>celA</i>	Cellulase (EC 3.2.1.4)	-0,53	-0,19	<b>-0,90</b>
CMM_2063	-	<i>short chain</i> Dehydrogenase/Oxidoreduktase	-0,51	* -0,10	<b>-0,90</b>
CMM_2088	-	Oxidoreduktase	-0,51	0,49	<b>-1,54</b>
CMM_2756	-	Esterase/Lipase	* -0,19	* -0,12	<b>-0,82</b>
CMM_2861	-	Acetyltransferase	-0,30	* 0,11	<b>-0,75</b>
CMM_1195	-	konserviert hypothetisches Protein	-0,63	* -0,08	<b>-0,71</b>
CMM_1204	-	konserviertes Membranprotein	-0,52	-0,15	<b>-0,84</b>
CMM_1413	-	konserviert hypothetisches Protein	* -0,25	* -0,50	<b>-0,88</b>
CMM_1683	-	konserviert hypothetisches Protein	* -0,07	* -0,02	<b>-1,33</b>
CMM_1817	-	konserviert hypothetisches Protein	-0,62	* -0,06	<b>-0,71</b>
CMM_2231	-	konserviert hypothetisches Protein	* -0,34	* -0,13	<b>-0,80</b>
CMM_2524	-	hypothetisches Protein	* -0,27	* 0,08	<b>-0,76</b>
pCM2_0047	-	hypothetisches Protein	* 0,03	-0,44	<b>-0,75</b>

### 8.11 *Cmm*-Expressionsmuster *in planta*

**Tabelle 8.27:** Ausgewählte *Cmm*-Gene, die 10 Tage nach Infektion 4 Wochen alter Tomatenpflanzen im Vergleich zu einer Flüssigkultur in der logarithmischen Wuchsphase in M9-Minimalmedium induziert oder reprimiert waren. Schwellenwerte:  $M \geq |0,93|$ ;  $p \leq 0,05$ ;  $n \geq 7$ ;  $A \geq 7,50$ . Daten von 3 biologischen Replikaten.

GenDB-ID	Genname	mögliche Funktion	M-Wert
CMM_2506	<i>pstC</i>	Phosphat ABC Transporter, Permease	-1,03
CMM_2507	<i>pstA</i>	Phosphat ABC Transporter, Permease	-1,53
CMM_2508	<i>pstB</i>	Phosphat ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	-1,22
CMM_0453	<i>pitA</i>	<i>Low affinity</i> Phosphatpermease	2,56
CMM_2084	<i>pitB</i>	<i>Low-affinity</i> Permease für anorganische Phosphate	2,31
<hr/>			
CMM_0150	-	zellwandgebundenes Oberflächenprotein	1,85
CMM_0430	-	hypothetisches, sekretiertes Protein, Zelloberflächenprotein	0,95
CMM_0431	-	Hämagglutinin/Hämolysin-verwandtes Protein	2,86
CMM_0501	-	konserviert hypothetisches Protein (Sortase-Motiv)	1,81
CMM_0912	-	hypothetisches Protein (Sortase Motiv)	1,42
<hr/>			
CMM_2382	-	konserviert hypothetisches Protein, Perforin	2,25
<hr/>			
<b>EPS-II</b>			
CMM_0821	<i>wcoC</i>	Undecaprenyl-Phosphat-Zucker-Phosphotransferase	-1,28
CMM_0822	<i>wcoD</i>	Glycosyltransferase	1,59
CMM_0823	<i>wcoE</i>	Phosphatidylglycerophosphat-Synthase (EC 2.7.8.-)	1,51
CMM_0824	<i>wcoF</i>	Glycosyltransferase	3,37
CMM_0827	<i>wcoI</i>	Biosyntheseenzym eines extrazellulären Polysaccharids	1,72
CMM_0828	-	hypothetisches Protein	-1,20
CMM_0829	<i>wcoK</i>	hypothetisches Protein	2,10
CMM_0830	-	Glycosyltransferase	2,47
CMM_0833	<i>wcoN</i>	Nucleotidzucker-Epimerase	2,21
CMM_0835	<i>wcoP</i>	Transkriptionsregulator, MarR-Familie	2,61
<hr/>			
<b>EPS-III</b>			
CMM_1006	<i>wcqB</i>	Glycosyltransferase, Mannosyltransferase (EC 2.4.-.-)	1,56
CMM_1010	<i>rmlB</i>	dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase (EC 4.2.1.46)	-1,28
CMM_1011	<i>wcqC</i>	konserviert hypothetisches Protein, Zuckertranslocase	-2,03
CMM_1013	<i>rmlA</i>	Glucose-1-Phosphat-Thymidyltransferase (EC 2.7.7.24)	-2,69
CMM_1017	<i>wcqG</i>	Membranprotein	-1,75
CMM_1020	<i>glfA</i>	UDP-Galactopyranose Mutase (EC 5.4.99.9)	-2,26
CMM_1021	<i>wcqJ</i>	Glycosyltransferase	-1,86
CMM_1022	<i>wcqK</i>	sekretiertes Protein	-1,71
CMM_1025	<i>wzy4</i>	konserviertes Membranprotein, Polysaccharidpolymerase	-1,09
CMM_1030	<i>wcqR</i>	Glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	-1,31
CMM_1029	<i>whiB1</i>	Transkriptionsregulator, WhiB Homolog	-1,00
CMM_1007	<i>wzt</i>	Polysaccharid ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	-2,06
CMM_1008	<i>wzm</i>	Polysaccharid ABC Transporter, Permease	-1,75

## 8.12 Funktionelle Gruppen der *Cmm*-Gene

Auf dem Microarray Cmm3kOLI repräsentierte Gene von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und deren Zuordnung zu funktionellen Gruppen sowie eine Übersicht aller Gruppen befinden sich auf der beiliegenden CD.

### 8.13 Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
A	log <sub>2</sub> der Signalintensitäten (Microarrayanalyse)
aa	Aminoallyl
add.	additiv
Agr	<i>accessory gene regulator</i>
AHL	N-Acylhomoserinlacton
AIP	<i>autoinducing peptide</i>
Ap, Ap <sup>R</sup>	Ampicillin, ampicillinresistent
ATP	Adenosintriphosphat
autom.	automatisch
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bv.	biovar
CAS	Chrom-Azurol-S
cfu	<i>colony forming units</i>
Cm, Cm <sup>R</sup>	Chloramphenicol, chloramphenicolresistent
C-Med	C-Medium
<i>Cmm</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
cv.	cultivar
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dpi	<i>days post inoculation</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-Aminoethylether)-tetraacetat
EPS	extrazelluläre Polysaccharide
et al.	et alii (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
ETI	<i>effector-triggered immunity</i>
EtOH	Ethanol
ETS	<i>effector-triggered sensibility</i>
g	Gramm
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>MP</sub>	entionisiertes Wasser aus der Millipore <sup>TM</sup> -Anlage, autoklaviert
hierarch.	hierarchisch
HPLC-MS	<i>high performance liquid chromatographie- mass spectrometry</i>
HR	hypersensitive Reaktion
IPTG	Isopropylthiogalactosid
k	Kilo

kb	Kilobasen
Km	Kanamycin
L	Liter
log-Phase	logarithmische / exponentielle Phase
M	log <sub>2</sub> der Differenz der Signalintensitäten (Microarrayanalyse)
M	Molar
M9-Med	M9-Medium, Minimalmedium
mA	Milliampere
MAMP	<i>microbe associated molecular pattern</i>
min	Minute
n	Replikatzahl
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumblau
NCPPB	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
Nm, Nm <sup>R</sup>	Neomycin, neomycinresistent
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
p	Wert der Fehlerwahrscheinlichkeit, t-Test Statistik
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PR	<i>pathogen related</i>
Prot.	Protein
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
pv.	pathovar
QS	<i>Quorum-Sensing</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAR	systemisch erworbenene Resistenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sm, Sm <sup>R</sup>	Streptomycin, streptomycinresistent
sp.	Spezies
stat-Phase	stationäre Phase
subsp.	Subspezies
TBY	Trypton-Broth-Yeast
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)Aminoethan
TTSS	TypIII-Sekretionssystem
u	Unit
UE	Untereinheit
ün	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
Vol.	Volumen
WI	Welkeindex
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
Xop	<i>Xanthomonas o</i> <u>u</u> <i>t</i> <u>e</u> <i>r</i> <i>p</i> <u>ro</u> <i>t</i> <u>e</u> <i>i</i> <u>n</u>

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Eichenlaub für sein Vertrauen, die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit und für die Möglichkeit dieses interessante Thema zu bearbeiten.

Herzlich bedanken möchte ich mich zudem bei:

Dr. Karl-Heinz Gartemann, der mit zahlreichen Diskussionen, konstruktiven Vorschlägen und Anmerkungen zum Gelingen und Niederschreiben dieser Arbeit und zum Anwachsen der „Literaturberge“ beigetragen hat.

Dr. Birgit Baumgarth für die unkomplizierte Unterstützung bei der Datenanalyse der Microarrayexperimente.

Manuela Meyer und Eva Schulte-Bernd für die technische Unterstützung im Bereich der Transkriptomik und die angenehme Zusammenarbeit.

Burkhard Linke für die schnelle Hilfe bei der Primergenerierung und der Lösung weiterer Fragen im Bereich der Bioinformatik.

Dr. Aiko Barsch für die GC-MS-Messungen und die hilfreichen Diskussionen zur Auswertung dieser Daten.

Dr. Boris Blechschmidt für die Hilfe mit „Herrn Wilcoxon“ und R.

Des Weiteren möchte ich mich bei der „*Clavibacter*“-Gruppe und allen anderen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Lehrstuhls für die tolle Zeit im Labor, die großartige Arbeitsatmosphäre und der permanent abgesicherten Energiezufuhr in Form von Süßigkeiten danken! 😊 Insbesondere geht mein Dank an „Die Band“ (Birte, Olaf und Ines): Ihr seid großartig, habt mich immer wieder aufgebaut und wart immer für konstruktive fachliche und nicht fachliche Diskussionen jeder Art zu haben! Birte und Olaf: vielen lieben Dank auch für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meiner Familie und meinen Freunden, die immer für mich da waren und mich in vielfältigster Weise während der Promotion unterstützt haben. Ohne euch hätte ich das nie geschafft! Insbesondere Lars danke ich für die Geduld, die Motivation, das Verständnis und den Rückhalt während dieser Zeit.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit wurde auf alterungbeständigem Papier (DIN EN ISO 9706) gedruckt.

Bielefeld, im März 2010

---

Monika Flügel