

Untersuchungen zur Stabilität und Konjugation
der Plasmide pCM1 und pCM2 von *Clavibacter*
michiganensis subsp. *michiganensis*

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

vorgelegt von
Birte Abt
aus Dortmund

Mai 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	3
2.1.1	Die Plasmide pCM1 und pCM2	5
2.2	Konjugativer DNA-Transfer	7
2.2.1	Konjugation bei Gram-negativen Bakterien	8
2.2.2	Konjugation bei Gram-positiven Bakterien	9
2.3	Typ-IV-Sekretionssystem	12
2.4	Konjugation der Plasmide von <i>Cmm</i>	15
2.4.1	Potentielle Transferregion von pCM2	15
2.4.2	Potentielle Transferregion von pCM1	19
2.5	Zielsetzung	22
3	Material und Methoden	23
	Material	23
3.1	Bakterienstämme	23
3.2	Plasmide und Vektoren	25
3.3	Pflanzenmaterial	26
3.4	Enzyme und Chemikalien	27
3.4.1	Restriktionsendonukleasen und -puffer	27
3.4.2	Enzyme	29
3.4.3	Chemikalien und Kits	29
3.5	Oligonukleotidprimer für PCR	30
3.6	Nährmedien	31
3.6.1	Zusätze zu Nährmedien	32

3.6.2	Antibiotika	33
3.7	Puffer und Lösungen	33
3.7.1	Lösungen zur Resuspendierung von Zellen	33
3.7.2	Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung	34
3.7.3	Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese	35
3.7.4	Lösungen zur Behandlung von Agarosegelen für Southern-Hybridisierungen	35
3.7.5	Puffer und Lösungen für DNA-DNA-Hybridisierungen	36
3.8	Geräte	37
	Methoden	38
3.9	Anzucht von Bakterienkulturen	38
3.9.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	38
3.9.2	Anzucht von <i>Cmm</i>	38
3.9.3	Titerbestimmung von Bakterien in Flüssigkultur	38
3.9.4	Konservierung von Bakterienkulturen (Glycerinkultur)	38
3.10	DNA-Isolierung	39
3.10.1	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Cmm</i>	39
3.10.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	39
3.10.3	CsCl-Ethidiumbromid-Dichtegradient	41
3.10.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Cmm</i>	42
3.11	DNA-Reinigung und -Konzentration	43
3.11.1	Alkohol-Fällung	43
3.11.2	Phenolisierung	44
3.11.3	Sephadex-Behandlung	44
3.11.4	Aufreinigung von PCR-Produkten (QIAquick PCR Purification Kit)	45
3.12	DNA-Techniken	45
3.12.1	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	45
3.12.2	Agarosegelelektrophorese	46
3.12.3	Bestimmung des Molekulargewichts von DNA	47
3.13	Klonierung von DNA-Fragmenten	48
3.13.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit	48
3.13.2	Dephosphorylierung von DNA mit der Antarctic Phosphatase (New England Biolabs)	49

3.13.3	Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten	49
3.13.4	α - ω -Komplementation (Blau-Weiß-Selektion)	49
3.14	DNA-Transfer	50
3.14.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i> (CaCl ₂ -Methode)	50
3.14.2	Elektroporation von <i>E. coli</i>	51
3.14.3	Elektroporation von <i>Cmm</i>	52
3.15	DNA-DNA-Hybridisierung	54
3.15.1	Markierung der Hybridisierungssonde	54
3.15.2	Überprüfung der Markierungsreaktion (Dot-Blot)	55
3.15.3	Southern-Hybridisierung	55
3.16	Polymerasekettenreaktion (PCR)	57
3.16.1	PCR mit Gesamt-DNA als Template	57
3.16.2	Präparation der Zellen für den Einsatz als Template	58
3.17	Infektion von <i>Solanum lycopersicum</i> durch <i>Cmm</i>	59
3.17.1	Wurzelinfektion	59
3.17.2	Reisolierung von <i>Cmm</i> aus dem Xylemsaft	59
3.17.3	Reisolierung von <i>Cmm</i> aus Pflanzenhomogenat	59
3.17.4	Berechnung des Bakterientiters in der Pflanze	60
3.18	Methoden zur Analyse der Plasmidstabilität	60
3.18.1	Untersuchung der Plasmidstabilität in Flüssigkultur	60
3.18.2	Untersuchung der Plasmidstabilität <i>in planta</i>	61
3.19	Methoden zur Analyse des Plasmidtransfers	61
3.19.1	Konjugation <i>in planta</i>	61
3.19.2	Filterkreuzungsmethode	61
3.20	Datenbanken und Software-Pakete	62
4	Ergebnisse	63
4.1	Untersuchung der Stabilität der <i>Cmm</i> -Plasmide	63
4.1.1	Beschreibung der markierten pCM1- und pCM2-Derivate	64
4.1.2	Analyse des Wachstums von <i>Cmm</i>	66
4.1.3	Analyse der Stabilität und Segregation von pCM2	67
4.2	Untersuchung des Transfers von pCM1 und pCM2	70
4.2.1	Beschreibung einer pigmentfreien Mutante von <i>Cmm</i>	70
4.2.2	Konjugation <i>in planta</i>	72
4.2.3	Entwicklung einer Filterkreuzungs-Methode für <i>Cmm</i>	74

4.2.4	Analyse des Transfers von pCM1 und pCM2	85
4.2.5	Einfluss von Glucose auf die Konjugation	87
4.2.6	Versuche zum Nachweis eines Signalmoleküls	90
4.3	Identifizierung und Inaktivierung von potentiellen Transfergenen auf pCM2	96
4.3.1	Sequenzanalyse des TraA-Proteins von <i>Cmm</i>	96
4.3.2	Konstruktion von pCM2-Mutanten durch Insertionsmutagenese . .	99
4.3.3	Phänotypische Analyse der pCM2-Mutanten	105
4.4	Identifizierung und Inaktivierung von potentiellen Transfergenen auf pCM1	112
4.4.1	Inaktivierung des <i>orfI</i> von pCM1 durch Insertionsmutagenese . . .	113
4.4.2	Phänotypische Analyse der pCM1-Mutanten	114
4.5	Analyse der Stabilität der nicht konjugativen pCM2-Derivate	117
4.5.1	Stabilität von pCM2 bei Anzucht von <i>Cmm</i> in Flüssigkultur	117
4.5.2	Stabilität von pCM2 bei Kultivierung von <i>Cmm in planta</i>	120
5	Diskussion	126
5.1	Nachweis des Transfers der Plasmide pCM1 und pCM2	126
5.1.1	Etablierung der Filterkreuzungsmethode	126
5.1.2	Analyse der Transferbedingungen	131
5.2	Identifizierung der potentiellen Transferregionen der <i>Cmm</i> -Plasmide	136
5.2.1	Charakterisierung der Transferregion von pCM2	137
5.2.2	Charakterisierung der Transferregion von pCM1	140
5.3	Stabilität und Segregation von pCM2	141
5.4	Fazit und Ausblick	145
	Literaturverzeichnis	146
6	Anhang	157
6.1	Plasmidkarten und Protein-Alignments	157
6.2	Tabellen	167
6.2.1	Messwerte der Wachstumskurven von <i>Cmm382</i>	167
6.2.2	Segregation von pCM2 in Flüssigkultur	167
6.3	Abkürzungsverzeichnis	168

1 Zusammenfassung

Die Plasmide von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 (*Cmm*), pCM1 und pCM2, tragen die für die Virulenz essentiellen Pathogenitätsdeterminanten *celA* und *pat-1*. Nach der vollständigen Sequenzierung und Annotation des *Cmm*-Genoms konnten auf beiden Plasmiden potentielle Transferregionen bestimmt werden, die im Rahmen dieser Arbeit partiell charakterisiert worden sind. Die Analyse der Aminosäuresequenz des von pCM2 codierten TraA zeigte, dass TraA sowohl eine Helicase- als auch eine Relaxase-Domäne aufweist. Die Inaktivierung des *traA*-Gens führte zum Verlust der Transferfähigkeit von pCM2. Auch die jeweilige Inaktivierung der pCM2-Gene *trbL* und *traE*, letzteres codiert für ein hypothetisches VirB4-Homolog, hatte den Verlust der Konjugationsfähigkeit zur Folge. Ebenso führten die Mutationen in den Genen *orfI* und *orfM* der hypothetischen Transferregion von pCM1 zu transfernegativen pCM1-Derivaten. Die auf pCM1 und pCM2 identifizierten Regionen sind also für den konjugativen Plasmidtransfer essentiell.

Durch die zum Teil detaillierte Analyse der Transferbedingungen von pCM2 konnte die Filterkreuzungsmethode für *Cmm* etabliert und standardisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Kohlenhydraten, wie z. B. Glucose, Fructose oder Saccharose, für den Nachweis des Plasmidtransfers in einem *filter mating* notwendig ist. Konjugation der *Cmm*-Plasmide bei Anzucht in Flüssigkultur war unter den gewählten Testbedingungen nicht nachweisbar.

In Filterkreuzungsexperimenten verringerte ein zehnfacher Donor-Überschuss die Transferhäufigkeit von pCM2 um den Faktor 30, während die zehnfache Rezipienten Anzahl keine Auswirkungen auf die Transferhäufigkeit hatte. Durch die Aufnahme der Kinetik des Plasmidtransfers während der ersten 12 Stunden eines *filter matings* konnte für pCM2 eine Transferrate zwischen 4×10^{-9} und 4×10^{-8} Transkonjuganten pro Donor pro Minute über einen Zeitraum von einer Stunde ermittelt werden.

Die Transferhäufigkeit der *Cmm*-Plasmide wurde mit der standardisierten Filterkreuzungsmethode bestimmt. pCM1 hat eine relativ geringe Transferhäufigkeit von durchschnittlich $1,4 \times 10^{-8}$ Transkonjuganten pro reisolierendem Rezipienten. Damit ist sie um bis zu 4 Zeh-

nerpotenzen geringer als die Transferhäufigkeit von pCM2, die zwischen $7,1 \times 10^{-6}$ und $1,2 \times 10^{-4}$ Transkonjuganten pro reisolierterem Rezipienten variieren kann.

Es gibt erste Indizien für die Existenz eines vom Rezipienten ausgesendeten Signalmoleküls, das in den Donorzellen den Plasmidtransfer anregt. Allerdings muss diese Vermutung z. B. durch Microarray-Experimente überprüft werden.

Segregationsexperimente in Flüssigkultur haben gezeigt, dass die Stabilität von pCM2 unter einer erhöhten Anzuchttemperatur von 32°C abnimmt. Durch den Vergleich der Stabilität des konjugativen pCM2_{Nm} und des nicht konjugativen pCM2_{traE} wurde deutlich, dass *in planta* die Konjugationsfähigkeit zur stabilen Erhaltung von pCM2_{Nm} auch unter der erhöhten Kultivierungstemperatur beiträgt. Der Verlust von pCM2 kann in einem System, das Konjugation ermöglicht, durch die konjugative Wiederaufnahme des Plasmids kompensiert werden.

2 Einleitung

2.1 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*) ist der Erreger der bakteriellen Welke (Tracheobakteriose) bei der Tomate (*Solanum lycopersicum*). *Cmm* ist ein Gram-positives, coryneformes, nicht sporenbildendes Bakterium, das zu der Gruppe der Actinomyceten gehört (Davis et al., 1984). Auf Grund von 16S-rDNA-Analysen wird *Clavibacter* der Familie der *Microbacteriaceae* zugeordnet, einer Schwestergruppe der *Micrococcaceae*, zu der die Gattung *Arthrobacter* gehört (Stackebrandt et al., 1997).

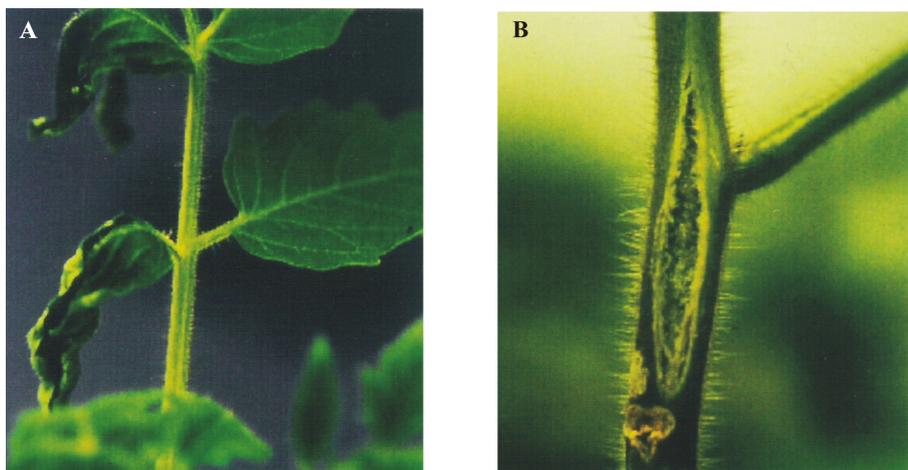


Abbildung 2.1: Aufnahme einer mit *Cmm* infizierten Tomatenpflanze. A: unifaciale Fiederblattwelke, B: Sprossläsionen.

Tomatenpflanzen können über Wunden im Wurzel- und Sprossbereich oder über die Stomata infiziert werden, dabei dringt *Cmm* in die Xylemgefäße ein und breitet sich dort systemisch aus. Der Xylemsaft ist nährstoffarm und mit pH 4,5-5,5 relativ sauer (Richardson et al., 1982). Die Infektion durch *Cmm* führt zunächst zur Wachstumsretardierung, dann zur Ausbildung der unifacialen Fiederblattwelke (Abb. 2.1 A) und im Spätstadium

zum Tod der Pflanze. Die unifaciale Fiederblattwelke ist dadurch charakterisiert, dass die Fiederblätter auf einer Seite der Pflanze sich von den Blatträndern her einrollen, ihre Turgeszenz verlieren und welken, während die Blätter der anderen Seite noch voll turgeszent sind (Strider, 1969). Im weiteren Verlauf der Krankheit können durch einseitiges Aufreißen des Stängels Sprossläsionen auftreten (Abb. 2.1 B), die die Standfestigkeit der Pflanze stark beeinträchtigen können (Wallis, 1977).

Bei Anzucht auf Festmedium bildet *Cmm* gelb gefärbte Kolonien, die aufgrund der starken Produktion von Exopolysacchariden (EPS) eine mukoide Morphologie aufweisen. Im Xylem kann *Cmm* sehr hohe Titer von 1×10^9 - 1×10^{10} Bakterien pro Gramm Frischgewicht der Pflanze erreichen (Berpohl, 1990). Wie in Abbildung 2.2 zu sehen, sind die befallenen Leitbündel sehr dicht von *Cmm* besiedelt. Hierbei könnten die von *Cmm* gebildeten EPS eine wichtige Rolle spielen. EPS ermöglichen den Bakterien die Anheftung an biologische Oberflächen wie z. B. Pflanzenbestandteilen, so dass durch die Bakterien eine mechanische Verstopfung des Xylems entstehen könnte (Coplin and Cook, 1990). Eine Verstopfung des Xylems, die das Welken der Blätter verursacht, scheint von *Cmm* allerdings nicht ausgelöst zu werden. Mutanten mit einer geringeren EPS-Produktion sind nicht in ihrer Virulenz eingeschränkt. Außerdem ist ein plasmidfreies Derivat von *Cmm* (CMM100) nicht virulent, obwohl seine EPS-Produktion unverändert stark ist und die Tomatenpflanze durch dieses Derivat effektiv kolonisiert wird (Berpohl et al., 1996).

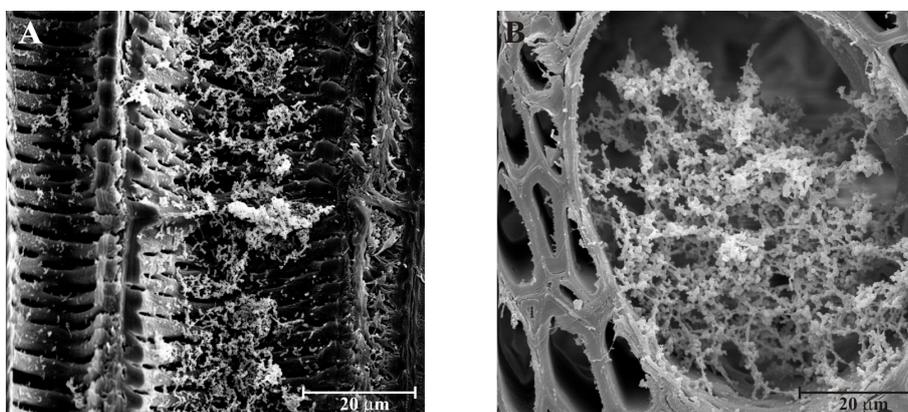


Abbildung 2.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen: Xylemgefäße einer mit *Cmm* infizierten Tomatenpflanze. A: Längsschnitt, B: Querschnitt (Fotos: T. Trapphoff).

Die Nukleotid-Sequenz des 1956 in England isolierten *Cmm*-Stamms NCPPB382, der das Forschungsobjekt der Arbeitsgruppe am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie an der Universität Bielefeld ist, wurde bestimmt. Das Chromosom ist zirkulär, be-

steht aus 3.298 Mb und hat einen relativ hohen durchschnittlichen GC-Gehalt von 72,6 %. Nach Annotation der Sequenz des gesamten *Cmm*-Genoms konnten 3080 putative Protein-codierende Sequenzen identifiziert werden, von denen 2029 (68 %) durch manuelle Annotation eine hypothetische biologische Funktion zugeordnet werden konnte. Die Codon-Abdeckung des Chromosoms von *Cmm* beträgt 90,5 % (Gartemann et al., 2008).

2.1.1 Die Plasmide pCM1 und pCM2

Das Genom des *Cmm*-Stamms NCPPB382 enthält zwei zirkuläre Plasmide (Abb. 2.3). Die Plasmide haben Größen von 27,4 kb (pCM1) und 70 kb (pCM2) und weisen mit 67,6 % (pCM1) und 66,5 % (pCM2) einen geringeren GC-Gehalt auf als das Chromosom. Für pCM1 konnten 28 und für pCM2 68 codierende Sequenzen vorhergesagt werden. Davon konnten für 7 (pCM1) bzw. für 14 (pCM2) durch manuelle Annotation mögliche Funktionen bestimmt werden. Die Codon-Abdeckung beträgt für pCM1 80,8 %, die für pCM2 nur 73,6 %. Durch die Genomabdeckung konnte für pCM1 eine Kopiezahl von 5 und für pCM2 von maximal 1 abgeschätzt werden (Gartemann et al., 2008). Sowohl auf pCM1 als auch auf pCM2 wurden für die Virulenz von *Cmm* essentielle Pathogenitätsdeterminanten identifiziert (Meletzus et al., 1993).

Auf pCM1 befindet sich das *celA*-Gen, das für eine β -1,4-Endoglucanase codiert, die sich aus drei Domänen zusammensetzt. Während die katalytische Domäne und die Cellulosebindedomäne zu anderen bakteriellen Endoglucanasen homolog sind, zeigt die dritte Domäne Homologie zu pflanzlichen α -Expansinen. Für die aufgereinigte β -1,4-Endoglucanase von *Cmm* konnte eine Beteiligung an der Zersetzung von Cellulose, einem Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwand, gezeigt werden. Somit kann für die β -1,4-Endoglucanase eine große Bedeutung in der Ausbildung von Krankheitssymptomen angenommen werden (Jahr et al., 2000).

Auf pCM2 ist als weitere Pathogenitätsdeterminante das *pat-1*-Gen lokalisiert. Es codiert für ein aus 280 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 29,7 kDa, dessen Funktion noch ungeklärt ist, das aber Homologie zu Serinproteasen des Trypsintyps zeigt. Da sich am N-Terminus ein Leaderpeptid befindet, könnte das Protein über einen Signalpeptid-vermittelten Transport sekretiert werden. Für Pat-1 konnte bisher weder ein Substrat bestimmt, noch eine Proteaseaktivität nachgewiesen werden. Auf pCM2 sind benachbart zu *pat-1* zwei Gene lokalisiert, deren Genprodukte Ähnlichkeiten zu Pat-1 aufweisen. Diese Gene wurden als *phpA* und *phpB* (**p**lasmidal **h**omology of **pat-1**)

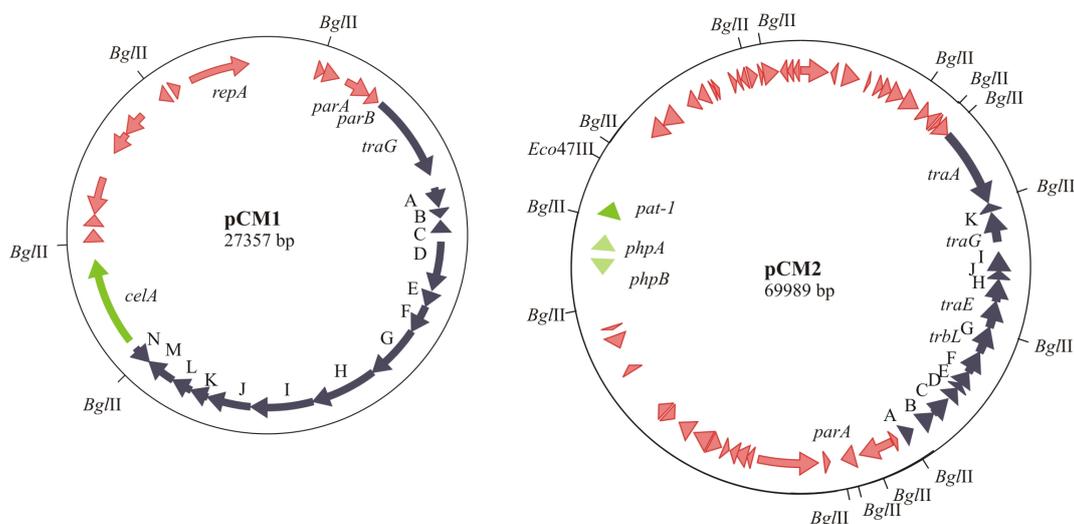


Abbildung 2.3: Plasmidkarten von pCM1 und pCM2. blau: hypothetische Transferregionen, grün: Pathogenitätsdeterminanten β -1,4-Endoglucanase (*celA*), Serinproteasen des Trypsintyps (*pat-1*); *phpA/B* = plasmidal homology of *pat-1*; *parA*: hyp. ATPase (*partitioning*-Protein); *parB*: hyp. *partitioning*-Protein; *repA*: hyp. Replikationsprotein. *orfA* bis *orfN* sind mit A-N abgekürzt. Keine maßstabsgetreue Darstellung.

bezeichnet (Dreier et al., 1997; Burger et al., 2005).

Auf beiden Plasmiden konnten Genregionen identifiziert werden, in denen vermutlich Proteine für den konjugativen Transfer der Plasmide codiert werden. Diese potentiellen Transferregionen werden in Abschnitt 2.4 ausführlich vorgestellt.

Durch Plasmid-Curing (Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 26 °C auf 32 °C) konnten Derivate des Wildtypstamms *Cmm* NCPPB382 hergestellt werden, die nur pCM1 (CMM101), nur pCM2 (CMM102) oder aber gar keines der Plasmide (CMM100) besitzen. Die Virulenz der Curing-Derivate CMM101 und CMM102 ist im Vergleich zum Wildtyp verringert. Bei Pflanzen, die mit diesen Stämmen infiziert worden sind, treten Welkesymptome verspätet und nicht in einem so starken Ausmaß auf wie bei mit dem Wildtyp infizierten Pflanzen. Der plasmidfreie Stamm CMM100 zeigt keine Virulenz, kann die Tomatenpflanze aber annähernd so effektiv kolonisieren wie der Wildtyp (Meletzus and Eichenlaub, 1991; Meletzus et al., 1993). Die Tatsache, dass CMM100 die Tomatenpflanze besiedeln aber keine Welkesymptome auslösen kann, zeigt, dass alle Funktionen, die für die Infektion, Kolonisation und die Unterdrückung der Pflanzenabwehr benötigt werden, chromosomal codiert sein müssen (Berpohl et al., 1996).

Auch bei längerer Kultivierung von *Cmm* und besonders nach Elektroporation ist häu-

fig ein spontaner Verlust von pCM2 zu beobachten. Eine Ursache dafür könnte sein, dass die Regulation der Plasmidreplikation fehlerhaft verläuft und es zu einer Unterreplikation von pCM2 im Vergleich zum Chromosom kommt. Die Weitergabe von pCM2 auf jede Tochterzelle wäre dann nicht möglich. Eine weitere Erklärung wäre, dass das von pCM2 codierte *partitioning*-System nicht effektiv funktioniert und so eine fehlerhafte Verteilung von pCM2 auf die Tochterzellen auftritt.

Im Rahmen des trilateralen Projektes „The Molecular Basis for Pathogenicity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila* and *Erwinia herbicola* pv. *betae*“ mit Israel und Palästina wurde der Plasmidstatus verschiedener Freilandisolate von *Cmm* untersucht. Die getesteten Stämme zeigten unterschiedliche Plasmidprofile mit häufig nur einem Plasmid und selten zwei Plasmiden. Ein Plasmid mit der Größe von pCM1 (27,4 kb) des Referenzstamms NCPPB382 wurde nicht gefunden. Viele Stämme haben ein Plasmid, das größer als pCM2 (70 kb) ist. Die Pathogenitätsdeterminanten *celA* und *pat-1* konnten in allen untersuchten Freilandisolaten aus Israel mittels PCR oder Southern-Hybridisierung nachgewiesen werden. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass die *celA*- und *pat-1*-Gene der Isolate nicht wie im Referenzstamm NCPPB382 auf pCM1- bzw. pCM2-ähnlichen Plasmiden lokalisiert sind. Nur in wenigen Isolaten konnten die zum Plasmidrückgrat gehörenden Gene *repA* (pCM1) und *parA* (pCM2) nachgewiesen werden. Wahrscheinlich existieren in den Freilandisolaten aus Israel andere Replikons als im Referenzstamm NCPPB382 (Kleitman et al., 2007).

Das Vorkommen vieler verschiedener Plasmidmuster in den untersuchten Stämmen deutet auf eine große Variabilität des *Cmm*-Genoms bezüglich des Plasmidstatus hin. Eine solche Variabilität des Plasmidprofils ist nicht im Genom des Kartoffelpathogens *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* zu beobachten. Das *Cms*-Plasmid pCS1 konnte in allen untersuchten Isolaten mit der entsprechenden Größe von ca. 50 kb nachgewiesen werden (Mogen and Oleson, 1987).

2.2 Konjugativer DNA-Transfer

Unter Konjugation versteht man den unidirektionalen DNA-Transfer von einer Donorzelle auf eine Rezipientenzelle über direkten Zellkontakt. Da es konjugativen DNA-Transfer nicht nur zwischen verschiedenen Bakterienarten (auch zwischen Gram-negativen und Gram-positiven), sondern auch zwischen Prokaryoten und Eukaryoten gibt, begünstigt der konjugative DNA-Transfer den Austausch von genetischem Material in der Natur.

Der Transferapparat wird meistens durch ein Plasmid oder ein Transposon codiert. Man unterscheidet selbst-transferierende und mobilisierbare Plasmide. Der Transfer von mobilisierbaren Plasmiden erfordert die Anwesenheit eines selbst-transferierenden Plasmids, das die fehlenden Transferfunktionen zur Verfügung stellt (z. B. ColE1, RSF1010).

Eine essentielle Voraussetzung für einen erfolgreichen Plasmid-Transfer ist der Zellkontakt zwischen Donor- und Rezipientenzelle. Bei Gram-negativen Bakterien wird der Kontakt durch komplexe, extrazelluläre Filamente (Sex-Pili) vermittelt. In Konjugationssystemen von Gram-positiven Bakterien werden keine Pili ausgebildet, sondern Oberflächenproteine, die als unspezifisches Adhäsion fungieren. Ein Beispiel dafür ist das Pheromon-induzierbare Plasmidtransfer System von *Enterococcus faecalis* (Waters et al., 2004).

Konjugativer DNA-Transfer wurde bereits in einigen Actinomyceten (*Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*) beobachtet, jedoch ist über den von diesen Bakterien genutzten Transfermechanismus noch relativ wenig bekannt (Grohmann et al., 2003). Deswegen enthält der folgende Abschnitt zunächst eine kurze Beschreibung des Transfermechanismus von Gram-negativen Bakterien. Anschließend werden zwei Beispiele für Konjugationssysteme von Gram-positiven Bakterien vorgestellt. Das ist zum einen das Pheromon-induzierte Konjugationssystem von *Enterococcus faecalis* und zum anderen der Aggregations-vermittelte Plasmidtransfer in Milchsäurebakterien.

2.2.1 Konjugation bei Gram-negativen Bakterien

Die zwei am besten untersuchten Konjugationssysteme von Gram-negativen Bakterien sind die Transfersysteme des F-Plasmids und des *broad-host-range* Plasmids RP4 (IncP Transfersystem). Beim F-Plasmid werden die Transferfunktionen von einem 35 Gene umfassenden Operon codiert, während sich die Transferfunktionen von RP4 in zwei Regionen befinden (Tra1 und Tra2). Eine aktuelle Modellvorstellung, basierend auf diesen beiden Systemen, beschreibt die Existenz von zwei Proteinkomplexen: das Relaxosom (*Dtr*, „DNA transfer and replication functions“) und den „mating pair formation“ Komplex (*mpf*). Das Relaxosom ist ein Multiprotein-DNA-Komplex, der am Transferursprung (*oriT*) des Plasmids durch Bindung der Relaxase und anderer plasmid- oder chromosomal codierter Proteine entsteht (Lanka and Wilkins, 1995). Der *mpf*-Komplex ist ein plasmidcodierter Multiprotein-Komplex, der die gesamte Zellhülle (Cytoplasmamembran, Periplasma und äußere Membran) durchspannt und so den Transfer der DNA vom Donor in den Rezipienten ermöglicht (Lessl et al., 1993).

Bei Gram-negativen Bakterien wird der für die Konjugation essentielle Zellkontakt durch

extrazelluläre Filamente (Sex-Pili) hergestellt. Die Sex-Pili der verschiedenen Organismen können in ihrer Anzahl und Morphologie stark variieren (RP4: kurz, rigide; F: lang, flexibel). Der initiale Zellkontakt wird zwischen der Pilusspitze und einem Rezeptor auf der Zelloberfläche des Rezipienten ausgebildet. Durch weitere Konjugationsproteine wird dieser noch instabile Komplex stabilisiert und es kommt zur Ausbildung des *mating pairs*. Danach wird in der Donorzelle durch eine plasmidcodierte Relaxase ein Einzelstrangbruch der DNA an der *nic site* am *oriT* durchgeführt. Der Strangbruch erfolgt durch einen nucleophilen Angriff eines konservierten Tyrosin-Rests. In den meisten bekannten Systemen bleibt die Relaxase kovalent am 5´Ende des DNA-Strangs gebunden. An diesen Komplex bindet ein TraG-ähnliches *coupling*-Protein, das den DNA-Strang zum Membran durchspannenden *mpf*-Komplex führt, so dass der Strang in 5´-3´-Richtung schleifenförmig in den Rezipienten transportiert wird. Im Donor erfolgt die Synthese des komplementären Strangs nach dem *rolling-circle*-Mechanismus, wobei es Hinweise darauf gibt, dass zusätzliche Primer benötigt werden. Im Rezipienten müssen für die diskontinuierliche Neusynthese des komplementären Strangs RNA-Primer gebildet werden. Gestoppt wird der DNA-Transfer durch eine von der Relaxase vermittelten Umesterungs-Reaktion, bei der der Phosphodiester wieder hergestellt und der transferierte DNA-Strang rezirkularisiert wird. Es wird angenommen, dass die Relaxase in der Nähe oder an der Pore gebunden bleibt und den transferierten Strang nach der einzelsträngigen *oriT*-Region absucht, um dann den Transfer zu beenden (Lanka and Pansegrau, 1999).

mpf-Komplex-Proteine verschiedener Konjugationssysteme weisen Ähnlichkeiten zu den VirB-Proteinen des Ti-Plasmids von *Agrobacterium tumefaciens* auf (Cao and Saier, 2001). Da die VirB-Proteine im Bezug auf ihre mögliche Funktion im *mpf*-Komplex sehr gut untersucht sind, wird in Abschnitt 2.3 detailliert auf das Typ-IV-Sekretionssystem und den möglichen Aufbau des Membranporenkomplexes eingegangen.

2.2.2 Konjugation bei Gram-positiven Bakterien

Auch in vielen Gram-positiven Bakterien konnten konjugative Transfersysteme identifiziert werden. Sequenzanalysen der potentiellen Transferregionen verschiedener Plasmide von Gram-positiven Bakterien zeigten Ähnlichkeit zu *coupling*-Proteinen (TraG von RP4, TrwB von R388, TraD vom F-Plasmid und VirD4 vom T-DNA Transfersystem). Auch Homologe zu der in den konjugativen Transfer involvierten ATPase (TrbE vom F-Plasmid, VirB4 vom T-DNA Transfersystem) konnten identifiziert werden. Ebenso scheinen die Re-

laxasen von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien sehr stark konserviert zu sein, so dass vermutet werden kann, dass auch in Gram-positiven Bakterien ein Relaxosom existiert und die Prozessierung der DNA ähnlich wie bei Gram-negativen Bakterien abläuft. Die Tatsache, dass in Gram-positiven Bakterien bis jetzt keine Komponenten mit eindeutiger Homologie zu den *mating pair*-Proteinen gefunden wurden, lässt vermuten, dass in Gram-positiven Bakterien die Ausbildung des *mating pairs* anders verläuft als in Gram-negativen Bakterien. Allerdings ist dieser Mechanismus noch nicht bekannt (Grohmann et al., 2003). Wahrscheinlich sind die Unterschiede in der *mating pair*-Bildung auf die verschiedenen Zellwandstrukturen und die fehlende äußere Membran in Gram-positiven Bakterien zurückzuführen.

Pheromon-induziertes Konjugationssystem von *Enterococcus faecalis*

Für *Enterococcus faecalis* wird ein sehr spezielles Pheromon-induziertes Konjugationssystem beschrieben, das auf der Kommunikation zwischen Donor- und Rezipientenzelle basiert. Am besten untersucht wurde der Pheromon-induzierte Transfer der Plasmide pAD1, pCF10 und pPD1. Am Beispiel des nahezu 70 kb großen pCF10, das u. a. eine Tetracyclin-Resistenz vermittelt, soll das Pheromon-induzierte Konjugationssystem von *Enterococcus faecalis* vorgestellt werden. Das chromosomal codierte Pheromon cCF10 (LVTLVFFV) wird von einem plasmidcodierten, extrazellulären Rezeptor (PrgZ) gebunden und von einer chromosomal codierten Oligopeptidpermease (Opp) in die Donorzelle importiert (Leonard et al., 1996). Dort bindet es an den Repressor PrgX und die Expression der Konjugationsgene auf pCF10 startet. Um eine Selbstinduktion in den Donorzellen zu verhindern, gibt es eine plasmidcodierte Antwort auf die Induktion durch das Pheromon cCF10. Diese Pheromon-Antwort setzt sich aus zwei Komponenten zusammen. Das Plasmid codiert zum einen ein Membranprotein (PrgY), das die Menge an freigesetztem Pheromon (cCF10) durch Behinderung des Exports und durch Degradation verringert. Zum anderen wird durch das plasmidcodierte Inhibitor-Peptid iCF10 die restliche Pheromon-Aktivität neutralisiert (Buttaro et al., 2000). Abbildung 2.4 zeigt eine Modellvorstellung des Pheromon-induzierten Transfersystems von *Enterococcus faecalis*.

Da sowohl von Donor- als auch von Rezipientenzellen Pheromone gebildet werden, bestimmt das molare Verhältnis von chromosomal codiertem Pheromon (cCF10) zu plasmidcodiertem Inhibitor (iCF10), ob die Donorzelle induziert wird oder nicht. In einer Monokultur von Donorzellen herrscht ein Gleichgewicht zwischen Pheromon und Inhibitor, so dass

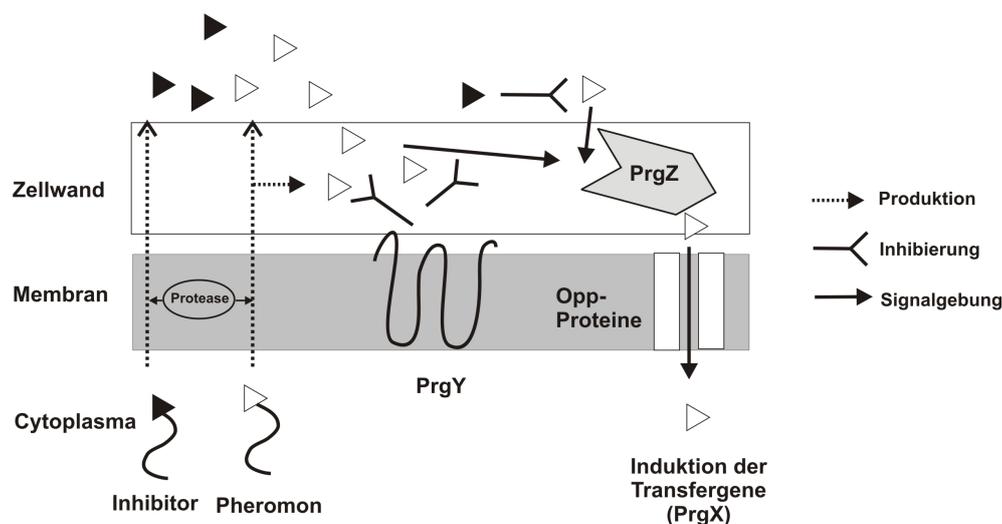


Abbildung 2.4: Pheromon-induziertes Transfersystem von *Enterococcus faecalis*. Modell für die Pheromon-Induktion einer Donorzelle und die Kontrolle der Pheromonaktivität durch PrgY und den Inhibitor (iCF10) (Buttaro et al., 2000; Chandler and Dunny, 2004). PrgZ: plasmidcodierter, extrazellulärer Rezeptor; Opp: chromosomal codierte Oligopermease; PrgY: Membranprotein, verringert die Menge an freigesetztem Pheromon; PrgX: Regulator der Transferegene.

das Transfersystem ausgeschaltet ist. In der Regel ist ein 1:1 Verhältnis von Donor und Rezipient ausreichend, um dieses Gleichgewicht zu Gunsten des Pheromons zu verschieben und somit den Plasmidtransfer zu induzieren. Plasmidfreie Rezipienten produzieren verschiedene Pheromone, die jeweils hoch spezifisch für ein Plasmid oder eine Familie verwandter Plasmide sind (Dunny et al., 1979). Es konnte gezeigt werden, dass die aus sieben bis acht Aminosäuren bestehenden Pheromone wahrscheinlich durch eine intramembrane Prozessierung des abgespaltenen Signalpeptids von einem sekretierten Lipoprotein mit bisher unbekannter Funktion entstehen (Kozłowicz et al., 2006; Dunny, 2007).

Aggregations-vermittelter Plasmidtransfer in Milchsäurebakterien

Die Lactoseplasmide der verwandten *Lactococcus lactis*-Stämme (712, C2, ML3) sind konjugativ, wenn sie mit dem Sex-Faktor ein Kointegrat bilden (Anderson and McKay, 1984). Die für den Plasmidtransfer benötigte Zellaggregation entsteht durch die Interaktion von zwei Zelloberflächen-Komponenten. Eine der Komponenten wird durch die *clu*-Gene codiert, die auf dem Sex-Faktor lokalisiert sind. Die zweite Komponente wird konstitutiv exprimiert und von den chromosomalen *agg*-Genen codiert. Plasmidtransfer mit hoher

Frequenz und Zellaggregation treten nur bei der Kreuzung von Stämmen auf, die die *agg*- und *clu*-Gene besitzen. Dabei können die *agg*- und *clu*-Gene beide im Donor vorhanden sein, was zur Folge hat, dass der Donorstamm aggregiert. Sind die *agg*-Gene im Rezipienten vorhanden und die *clu*-Gene im Donor, dann aggregieren die Konjugationspartner. Bei Anzucht der einzelnen Stämme tritt aber keine Aggregation auf (van der Lelie et al., 1991).

Auch in diesem Transfersystem ist die Aggregation der Zellen die Voraussetzung für effektiven konjugativen Transfer. Allerdings gibt es im Gegensatz zum Konjugationssystem von *Enterococcus faecalis* keine Hinweise auf eine Pheromon-ähnliche Induktion des Transfersystems von *Lactococcus lactis*. Das CluA-Protein weist jedoch Ähnlichkeit zu den in die Konjugation involvierten Oberflächenproteinen von *Enterococcus* auf (z. B. Asc10 von pCF10). Während für Asc10 gezeigt worden ist, dass effektiver Plasmidtransfer unabhängig davon stattfindet, ob Asc10 vom Donor oder vom Rezipienten produziert wird, ist bei *Lactococcus lactis* die Anwesenheit von CluA im Donor für den Plasmidtransfer essentiell. Dies hat zu der Vermutung geführt, das CluA nicht nur für die Ausbildung des Zellkontakts wichtig ist, sondern auch direkt am DNA-Transfer beteiligt ist (Stentz et al., 2004, 2006).

2.3 Typ-IV-Sekretionssystem

Makromolekulare Transfersysteme, die evolutionär mit den bakteriellen konjugativen Transfersystemen verwandt sind, werden als Typ-IV-Sekretionssysteme bezeichnet (Salmond, 1994). Konjugationssysteme sind eine Untergruppe der Typ-IV-Sekretionssysteme, die zusätzlich zum Transport von Proteinen die Fähigkeit entwickelt haben, DNA-Protein-Komplexe zu transportieren. Typ-IV-Sekretionssysteme umfassen den Konjugationstransfer-Apparat, filamentöse Bakteriophagensekretion, Proteinsekretionssysteme von verschiedenen Pathogenen und Systeme der natürlichen Transformation. Einige Pathogene transportieren so Effektor-Moleküle in eukaryotische Zellen. Zum Beispiel benutzt das phytopathogene Bakterium *Agrobacterium tumefaciens*, das Tumorwachstum bei infizierten Pflanzen verursacht, solch ein Transportsystem, um onkogene T-DNA und einige Effektormoleküle in den Nucleus der Pflanzenzelle zu schleusen. *Helicobacter pylori*, der viele Magen- und Darmerkrankungen verursacht, verwendet ein Typ-IV-Sekretionssystem, um das 145 kDa CagA-Protein in die Säugerzellen zu transportieren (Covacci et al., 1999). Das Toxin (PT) von *Bordetella pertussis*, das Keuchhusten verursacht, wird durch ein Typ-IV-Sekretionssystem in das extrazelluläre Milieu abgegeben, wo es dann mit der Target-Zelle

in Kontakt tritt (Burns, 1999).

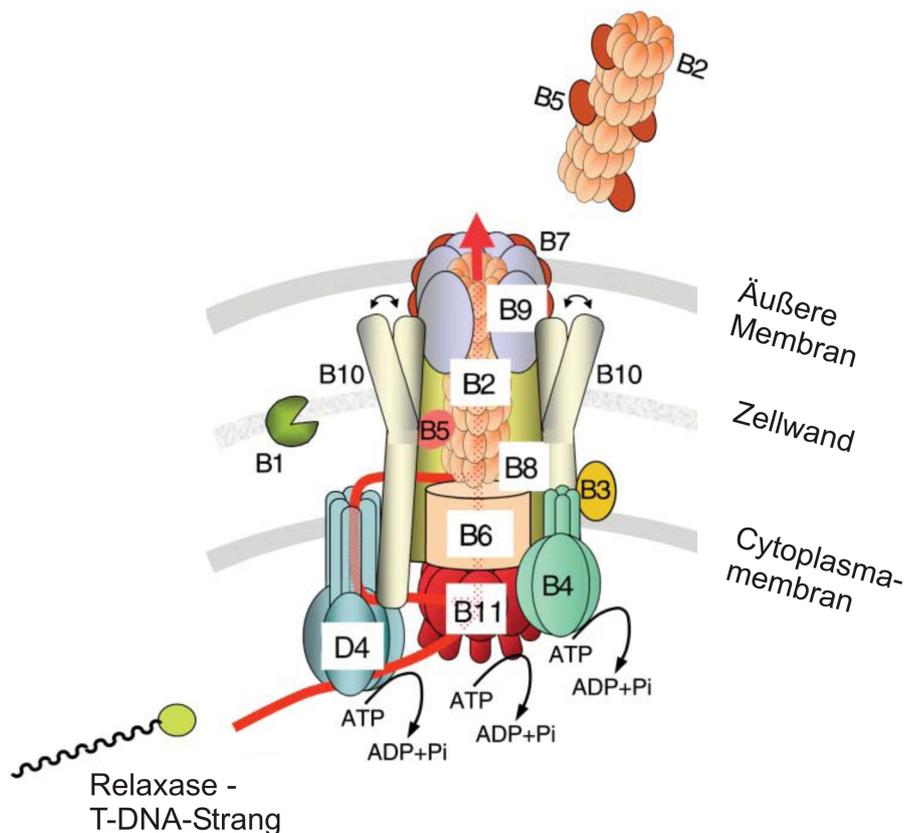


Abbildung 2.5: Konjugativer DNA-Transfer durch das VirB4/D4-System von *Agrobacterium tumefaciens* (Chen et al., 2005). DNA bindet an VirD4-Rezeptor und passiert nacheinander die Kanal-Komponenten VirB11-ATPase, VirB6 und VirB8 und zuletzt VirB2 und VirB9. Drei ATPasen (VirD4, VirB4, VirB11) liefern die Energie für den DNA-Transfer durch die Membran-Translokase (gebildet durch VirD4 und / oder VirB6). Der Transfer durch die Zelloberfläche erfolgt durch einen von VirB2-Pilin und VirB9-Proteinen gebildeten Kanal. ATP-Energie induziert auch Strukturveränderungen (\leftrightarrow) in VirB10, die den DNA-Transfer in den äußeren Bereich des Kanals vermitteln.

Historisch bedingt wird das T-DNA-Transfer-System von *Agrobacterium tumefaciens* als Modellsystem für Typ-IV-Sekretionssysteme verwendet (Salmond, 1994). Dieses System setzt sich aus den Produkten eines ca. 9,5 kb großen *virB*-Operons und der *virD₄*-Gene zusammen. Abbildung 2.5 zeigt ein Modell des konjugativen DNA-Transfers durch das VirB4/D4-System von *Agrobacterium tumefaciens*. Einige Mitglieder der Typ-IV-Familie haben vermutlich die gleiche Abstammung wie konjugative DNA-Transfersysteme. Zum Teil setzen sich die Konjugationssysteme komplett aus Proteinen zusammen, die homolog

zu den VirB-Proteinen sind. Oder aber sie bestehen sowohl aus VirB-Proteinen als auch aus anderen, nicht verwandten Proteinen (Grohmann et al., 2003; Christie, 2001; Christie et al., 2005). In Tabelle 2.1 sind die jeweiligen Homologe der Konjugationssysteme des F-Plasmids, der IncP-Plasmide und des Ti-Plasmids dargestellt.

VirB	RP4	F-Plasmid	Ti-Plasmid	Lokalisation / Funktion
VirB2	TrbC	TraA	TrbC	Pilus
VirB3	TrbD	TraL	TrbD	Porenkomplex
VirB4	TrbE	TraC	TrbE	ATPase
VirB5	TrbJ	TraE	TrbJ	Porenkomplex / Pilus-assoziiert
VirB6	TrbL	TraG	TrbL	Porenkomplex, <i>mating pairs</i> -Stabilisierung
VirB7	TrbK	TraV	TrbK	Porenkomplex / Pilus-assoziiert
VirB8	TrbF		TrbF	Porenkomplex
VirB9	TrbG	TraK	TrbG	Porenkomplex
VirB10	TrbI	TraB	TrbI	Porenkomplex
VirB11	TrbB		TrbB	ATPase
VirD2	TraI	TraI	TraA	Relaxase / Helicase / Nickase
VirD4	TraG	TraD	TraG	<i>coupling</i> -Protein

Tabelle 2.1: Das VirB4/D4-System von *Agrobacterium tumefaciens*; Homologe der VirB- und VirD-Proteine des F-Plasmids, der IncP-Plasmide und des Ti-Plasmids, sowie ihre vermutete Funktion. (Christie, 1997; Cao and Saier, 2001; Lawley et al., 2003b).

Auch in Gram-positiven Bakterien wurden Homologe zu einigen Vir-Proteinen gefunden. Zum Beispiel wurden Homologe zu VirB4-Proteinen von *Agrobacterium tumefaciens* identifiziert. VirB4-Proteine kommen in allen Typ-IV-Sekretionssystemen vor und liegen als Hexamer vor. Es wird angenommen, dass sie als Andockstelle am Eingang des Kanals vom Typ-IV-Sekretionssystem fungieren (Middleton et al., 2005). Es wird vermutet, dass VirB4-ATPasen Informationen, in Form von ATP induzierten Konformationsänderungen, über die Cytoplasmamembran übertragen (Dang et al., 1999).

Des Weiteren wurden in Gram-positiven Organismen Homologe zur VirB11-ATPase identifiziert, für die eine Funktion als Chaperon (GroEL-like) bei der Translokation von ungefalteten Proteinen über die Cytoplasmamembran angenommen wird. VirB11-ATPasen bilden Homo-Oligomere und sind mit der Cytoplasmamembran assoziiert (Christie, 2001). Auch *coupling*-Proteine (VirD4 in *A. tumefaciens*, TraG von RP4, TrwB von R388, TraD vom F-Plasmid) sind in vielen Gram-positiven Organismen identifiziert worden. Sie be-

stehen aus einer N-terminalen Transmembran-Domäne und einer großen C-terminalen Cytoplasma-Domäne. Es wird angenommen, dass *coupling*-Proteine die Verbindung zwischen dem DNA-Transfer-Intermediat und dem die Membran durchspannenden *mpf*-Komplex herstellen. Viele, aber nicht alle *coupling*-Proteine, haben Walker A und B Nukleotidbindemotive. Es wird vermutet, dass die Hydrolyse von ATP die Energie zur Verfügung stellt, die den *coupling*-Proteinen eine Funktion als Motor für den DNA-Transport (*motive force*) ermöglicht (Llosa et al., 2002).

Homologe zu den Pilus-Proteinen (VirB2, VirB5) und zu VirB9 wurden in fast allen Konjugationssystemen von Gram-negativen Bakterien gefunden, nicht aber in den DNA-Transfersystemen von Gram-positiven Bakterien. Wahrscheinlich existieren unterschiedliche Mechanismen für die Translokation der DNA an die Zelloberfläche von Gram-negativen bzw. Gram-positiven Organismen (Grohmann et al., 2003).

2.4 Konjugation der Plasmide von *Cmm*

Nach der vollständigen Sequenzierung und Annotation des Genoms von *Cmm* konnten auf den Plasmiden pCM1 und pCM2 Regionen identifiziert werden, in denen Homologe zu Proteinen von zum Teil bereits charakterisierten Konjugationssystemen codiert werden. Dabei weisen die potentiellen Transfergene von pCM1 und pCM2 und die durch sie codierten Proteine untereinander keine Homologie auf. Dass die Plasmide pCM1 und pCM2 konjugativ sind, konnte bereits in zwei am Lehrstuhl angefertigten Diplomarbeiten gezeigt werden (Pieper, 2001; Kosthorst, 2004). In den folgenden beiden Abschnitten werden diese hypothetischen Transferregionen von pCM2 und pCM1 vorgestellt.

2.4.1 Potentielle Transferregion von pCM2

Auf pCM2 wurde eine Region identifiziert, die eine Reihe von Genen enthält, die wahrscheinlich für den Transfer von pCM2 benötigt werden (Abb. 2.6). Diese potentielle Transferregion von pCM2 besteht aus 15 Genen (*orfA*-*orfL*), von denen 14 wahrscheinlich als Operon organisiert sind. Die meisten benachbarten Gene dieser Region haben überlappende Stopp- und Startcodons für die Translation (9 Überlappungen). Bei den übrigen Genen (z. B. *traE* und *orfH*, *orfH* und *orfI*) ist der Abstand zwischen Stopp- und Startcodon sehr kurz. Wahrscheinlich wird die Transkription dieses hypothetischen Tra-Operons von pCM2 durch einen starken Terminator (-60,7 kcal freie Energie) beendet, der sich zwischen dem *traA*-Gen und dem *orfK* befindet. Die sich an die Terminatorsequenz anschließenden

Adenin-Reste deuten darauf hin, dass es sich hier um eine ρ -unabhängige Termination handelt. Durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen mittels PSI-Blast konnten den Genen dieser Region hypothetische Funktionen zugeordnet werden (Tab. 2.2).

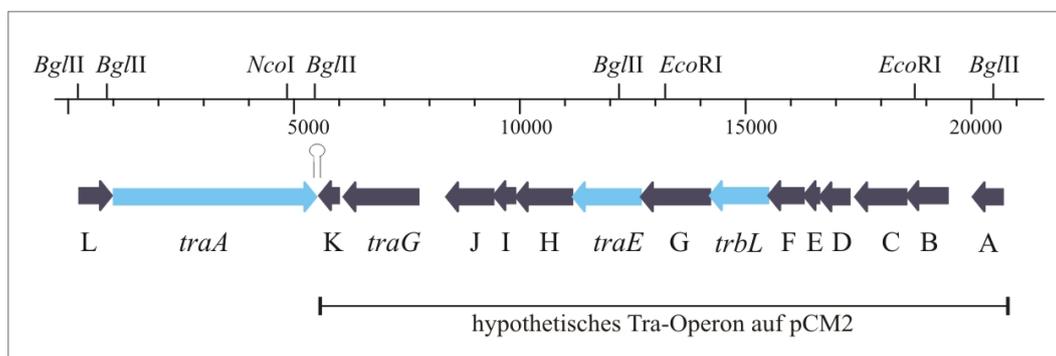


Abbildung 2.6: Physikalische Karte der hypothetischen Transferregion von pCM2: *orfA* bis *orfL* mit den Buchstaben A-L abgekürzt. Hypothetischer Terminator und vermutetes Tra-Operon sind dargestellt. Die Pseudogene pCM2_PS_0002 und pCM2_PS_0001 zwischen *orfJ* und *traG* sind nicht eingezeichnet. Blau: Gene der hypothetischen Transferregion, türkis: in dieser Arbeit durch Kassettenmutagenese inaktivierte Gene.

Das *traA*-Gen ist entgegengesetzt zum Operon orientiert und codiert für ein aus 1492 Aminosäuren bestehendes Protein, das sowohl eine Relaxase- als auch eine Helicase-Domäne aufweist (Alignments, S. 97 und S. 99). Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist in einem Bereich von 1084 Aminosäuren zu 45 % identisch zum TraA-Protein von *Arthrobacter aureescens* (Acc.-Nr.: ASS20144). Auch TraA von *Rhodococcus erythropolis* ist in einem Bereich von 1116 Aminosäuren zu 36 % identisch zu TraA von *Cmm* (Acc.-Nr.: ABF48485) (Alignment: Abb. 6.5, S. 161).

Für viele Gram-negative aber auch Gram-positive Bakterien ist bekannt, dass Relaxasen / Helicasen für die Initiierung des DNA-Transfers bei der Konjugation benötigt werden. Durch das Einfügen eines Einzelstrangbruchs am *oriT* wird der konjugative DNA-Transfer eingeleitet. Der *orfL* (pCM2_0012) codiert für ein Protein, das zu 35 % identisch ist zum N-Terminus (Relaxase-Domäne) von TraA (AS 164-343) von *Cmm*.

Des Weiteren befindet sich in dieser potentiellen Transferregion das *traG*-Gen, das für ein aus 552 Aminosäuren bestehendes hypothetisches *coupling*-Protein codiert. Für TraG-Proteine wird eine Interaktion zwischen dem Relaxosom und dem *mating pair*-Komplex in der Konjugation vorhergesagt. TraG von *Cmm* ist über einen Bereich von 504 Aminosäuren zu 37 % identisch mit dem hypothetischen TraG-Protein von *Arthrobacter aureescens* TC1 (pTC1; Acc.-Nr.: ABM10535) und weist die Walker-Motive A und B auf.

GenDB-Nr.	Gen	hypothetische Funktion	GC	TMH	AS	MW
pCM2_0030	<i>orfA</i>	Regulator des Tra-Operons (DNA-Bindedomäne)	63,7	0	222	24,4
pCM2_0029	<i>orfB</i>	Membranprotein	60,9	6	305	33,9
pCM2_0028	<i>orfC</i>	sekretiertes Protein (Esterase-Lipase-Domäne)	66,5	1*	378	40,4
pCM2_0027	<i>orfD</i>	hypothetisches Protein	70,6	0	222	25,8
pCM2_0026	<i>orfE</i>	Membranprotein	59,5	2	116	11,8
pCM2_0025	<i>orfF</i>	sekretiertes Protein	62,3	1*	261	26,7
pCM2_0024	<i>trbL</i>	Konjugationsprotein (VirB6)	61,9	6	430	41,6
pCM2_0023	<i>orfG</i>	Membranprotein	62,2	2	509	51,1
pCM2_0022	<i>traE</i>	ATP-bindendes Protein (VirB4)	64,3	0	501	54,3
pCM2_0021	<i>orfH</i>	ATPase	72,1	0	416	43,9
pCM2_0017	<i>orfI</i>	hypothetisches Protein	71,8	1*	161	16,5
pCM2_0016	<i>orfJ</i>	Zellwand assoziierte Hydrolase	70,0	1*	349	39,5
pCM2_0015	<i>traG</i>	<i>coupling</i> -Proteine (VirD4)	69,4	2	552	60,2
pCM2_0014	<i>orfK</i>	hypothetisches Protein	68,9	0	147	16,8
pCM2_0013	<i>traA</i>	Relaxase / Helicase	72,9	0	1492	160,7
pCM2_0012	<i>orfL</i>	Relaxase (homolog zu N-Terminus von TraA)	65,7	0	240	26,0

Tabelle 2.2: Gene und Genprodukte der hypothetischen Transferregion von pCM2. GC: GC-Gehalt [%]; TMH: Anzahl an Transmembranhelices; *Leaderpeptid; AS: Anzahl der Aminosäuren; MW: Molekulargewicht [kDa].

Das *Cmm*-Gen *traE* codiert für ein aus 501 Aminosäuren bestehendes putatives ATP-bindendes Protein, das über einen Bereich von 443 Aminosäuren Homologie (26 %) zum VirB4-Protein aus *Frankia sp. CcI3* zeigt (Acc.-Nr.: ABD09428). VirB4-Proteine sind Komponenten des Typ-IV-Sekretionssystems, die auch in vielen Konjugationssystemen identifiziert worden sind. Sie sind wahrscheinlich durch eine ATP vermittelte Konformationsänderung direkt am Translokationsprozess des DNA-Strangs beteiligt.

Das Protein, das von *orfH* codiert wird, könnte auch eine ATPase sein. Die von *orfH* abgeleitete Aminosäuresequenz ist zu 47 % identisch (Bereich AS 33-416) zu einer am Chromosom-*partitioning* beteiligten ATPase von *Renibacterium salmoninarum* (Acc.-Nr.: ABY2291).

Das *Cmm*-Gen *trbL* codiert für ein Protein bestehend aus 430 Aminosäuren, das im Bereich der Aminosäuren 83 bis 280 Homologie (32 % Identität) zu einem putativen Transferkomplexprotein aus *Arthrobacter nicotinovorans* (Acc.-Nr.: CAD47985) zeigt (Alignment: Abb. 6.7, S. 164). Über einen sehr kurzen Bereich (AS 186-280) zeigt die von *trbL* abgeleitete Aminosäuresequenz Homologie (34 % Identität) zum TrbL-Protein von *Rhodococcus equi* (Acc.-Nr.: BAB16649). Für das TrbL-Protein von *Cmm* werden sechs Transmembranhelices vorhergesagt.

orfJ codiert eine aus 349 Aminosäuren bestehende putative Hydrolase, die wahrscheinlich mit der Zellwand assoziiert ist und eine Rolle in der Degradation der bakteriellen Zellwand bei der Ausbildung des Porenkomplexes spielen könnte. Der C-Terminus (AS 248-345) des Genproduktes von *orfJ* ist zu 50 % identisch zum C-terminalen Bereich eines wahrscheinlich Peptidoglycan lysierenden Proteins P45 von *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* str. CTCB07 (Acc.-Nr.: AAT89847). Eine ähnliche Funktion könnte auch die von *orfC* codierte sekretierte hypothetische Hydrolase (378 AS) haben. Über einen Bereich von 358 Aminosäuren ist die von *orfC* abgeleitete Aminosäuresequenz zu 31 % identisch zu einer Hydrolase von *Renibacterium salmoninarum* (Acc.-Nr.: ABY24101).

Neben diesen wahrscheinlich Zellwand-abbauenden Enzymen befinden sich in der Region auch Gene (*orfB*, *orfE*, *orfG*) durch die Proteine mit einer vorhergesagten Transmembran-Topologie codiert werden, so dass für diese Proteine eine Lokalisation in der Membran vorhergesagt werden kann. Somit könnten sie an der Bildung des *mating pair formation*-Komplexes beteiligt sein. Insgesamt werden für neun der durch das hypothetische Operon codierten Proteine Transmembranhelices vorhergesagt (Tab. 2.2).

orfA codiert für ein aus 222 Aminosäuren bestehendes wahrscheinlich DNA-bindendes Protein. Da es Homologie zu einem putativen Transkriptionsregulatorprotein von *Ralstonia solanacearum* (GMI1000) zeigt, könnte es sich hierbei um einen Regulator des potentiellen Tra-Operons von pCM2 handeln.

Grohmann et al. (2003) vergleichen die Transferregion von Plasmiden aus *Enterococcus* (pRE25), *Staphylococcus* (pGO1 und pSK41) und *Lactococcus* (pMRC01) und beschreiben einen modularen Aufbau mit ausgeprägter Ähnlichkeit der Transferregionen untereinander. Sie konnten zeigen, dass drei Transferproteine der Plasmide zu Schlüsselenzymen des Typ-IV-Sekretionssystems homolog sind. Dies sind die VirB4-ATPase, das *coupling*-Protein VirD4 und die lytische Transglykosylase VirB1. Abgesehen von der Tatsache, dass *traA* in *Cmm* nicht Teil des Operons ist, ist die Organisation des Tra-Operons von pCM2 mit der von Grohmann et al. (2003) beschriebenen Struktur zumindest teilweise vergleichbar. Die

beschriebene Reihenfolge der Gene für die VirB4-ATPase, die lytische Transglykosylase VirB1 und das *coupling*-Protein VirD4 ist identisch mit der Reihenfolge von *traE* (VirB4), *orfJ* (hypothetisches Peptidoglycan abbauendes Enzym) und *traG* (VirD4) im hypothetischen Tra-Operon von pCM2 in *Cmm*. Allerdings weicht die Anzahl der Gene, die sich auf pCM2 zwischen *traE*, *orfJ* und *traG* befinden, leicht von der Zahl, die für die anderen Transferregionen beschrieben worden sind, ab. Dennoch unterstützen die Ähnlichkeiten die Vermutung, dass es sich bei der in diesem Abschnitt vorgestellten Region tatsächlich um die Transferregion von pCM2 handelt.

2.4.2 Potentielle Transferregion von pCM1

Nach der Sequenzierung des *Cmm*-Genoms und nach Annotation der erhaltenen DNA-Sequenz konnte auf pCM1, dem mit 27,4 kb kleineren der beiden *Cmm*-Plasmide, ebenfalls eine potentielle Transferregion (Größe: 14315 bp) identifiziert werden. Durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenz mittels PSI-Blast wurde festgestellt, dass in dieser Region vermutlich einige Transfer-Proteine codiert werden.

Die Region (Abb. 2.7) besteht aus 14 Genen und ist stromaufwärts vom *celA*-Gen gelegen. Die Gene *orfD* bis *orfM* könnten als Operon organisiert sein, da ihre Stopp- und Startcodons überlappen (5 Überlappungen) oder nur durch wenige Basen getrennt werden. Wahrscheinlich wird die Transkription dieses hypothetischen Tra-Operons von pCM1 durch einen Terminator (-31,0 kcal freie Energie), der sich zwischen *orfM* und *orfN* befindet, beendet. Da der Terminatorsequenz keine Adenin-Reste folgen, ist von einer ρ -abhängigen Termination auszugehen. In der Tabelle 2.3 sind die Gene der potentiellen Transferregion von pCM1 und ihre hypothetische Funktion aufgelistet.

Auch in dieser Region befinden sich Gene, die für Proteine codieren, die zu den Schlüsselproteinen des Typ-IV-Sekretionssystems homolog sind. Das *traG*-Gen, das vermutlich für ein *coupling*-Protein codiert, ist stromaufwärts des hypothetischen Tra-Operons von pCM1 lokalisiert. Das von pCM1 codierte TraG-Protein ist im mittleren Bereich (AS 227 - 594) zu 21 % identisch zum VirD4-Protein (*coupling*-Protein) von *Thermoanaerobacter* sp. X514 (Acc.-Nr.: ABY92045).

orfI codiert für ein aus 523 Aminosäuren bestehendes hypothetisches ATP-bindendes Protein, das über einen Bereich von 456 Aminosäuren zu 33 % identisch ist zu einem ATP-bindenden Protein von *Arthrobacter aurescens* TC1 (Acc.-Nr.: AAS20154). Außerdem zeigt die von *orfI* abgeleitete Aminosäuresequenz Homologie (24 %, im Bereich von AS 116 - 488)

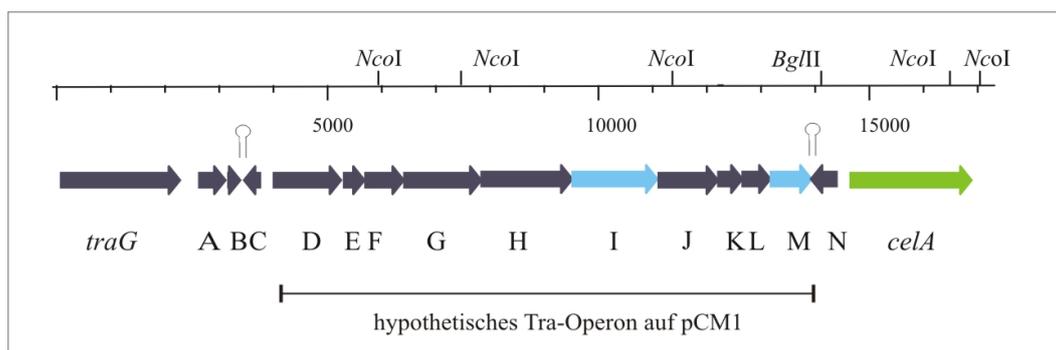


Abbildung 2.7: Physikalische Karte der hypothetischen Transferregion von pCM1: *orfA* bis *orfN* mit den Buchstaben A - N abgekürzt. Hypothetische Terminatoren und vermutetes Tra-Operon sind dargestellt. Blau: Gene der hypothetischen Transferregion, türkis: in dieser Arbeit durch Kassettenmutagenese inaktivierte Gene. *celA*: β -1,4-Endoglucanase (Pathogenitätsdeterminante).

zum VirB4-Protein, einer Komponente des Typ-IV-Sekretionssystems von *Brevibacterium linens* BL2 (Acc.-Nr. ZP_00381005). Das Genprodukt von *orfI* weist das Walker A-Motiv auf (Alignment: Abb. 6.8, S. 165). VirB4-Proteine sind wahrscheinlich am Transport der DNA durch die Membran beteiligt.

Das von *orfD* codierte aus 415 Aminosäuren bestehende Protein könnte ebenfalls eine ATPase sein und am DNA-Transport beteiligt sein. Die von *orfD* abgeleitete Aminosäuresequenz ist im Bereich der Aminosäuren 76 bis 390 zu 28 % identisch zu einer wahrscheinlich am Chromosom-*partitioning* beteiligten ATPase von *Arthrobacter* sp. Chr15 (Acc.-Nr.: ABR67096). Außerdem ist das Genprodukt von *orfD* zu zwei chromosomal codierten Proteinen von *Cmm* homolog (CMM_2854; 49 % Identität; CMM_2711; 32 % Identität).

Neben den beiden potentiellen Transfergenen (*traG*, *orfI*) befinden sich in der Region auch Gene (*orfE*, *orfG*, *orfH*, *orfL*) durch die Proteine mit einer vorhergesagten Transmembran-Topologie codiert werden, so dass für diese Proteine eine Lokalisation in der Membran vorhergesagt werden kann. Somit könnten sie an der Bildung des *mating pair formation*-Komplexes beteiligt sein. Insgesamt werden für neun der durch das hypothetische Tra-Operon von pCM1 codierten Proteine Transmembranhelices vorhergesagt (Tab. 2.3).

orfM codiert für ein aus 252 Aminosäuren bestehendes wahrscheinlich sekretiertes Protein, das homolog ist zu zwei chromosomal codierten Proteinen von *Cmm* (CMM_0063; 74 % Identität und CMM_1065; 61 % Identität) und zu einem von pCM2 codierten Protein (pCM_0007; 76 % Identität), das sich aber außerhalb der potentiellen Transferregion befindet. Des Weiteren ist die von *orfM* abgeleitete Aminosäuresequenz über einen Bereich von

GenDB-Nr.	Gen	hypothetische Funktion	GC	TMH	AS	MW
pCM1_0005	<i>traG</i>	<i>coupling</i> -Protein (VirD4)	71,3	4	733	73
pCM1_0006	<i>orfA</i>	hypothetisches Protein	61,4	0	163	17,3
pCM1_0007	<i>orfB</i>	hypothetisches Protein	58,3	2	75	7,7
pCM1_0008	<i>orfC</i>	Transkriptionsregulator (ArsR-Fam.)	66,3	0	100	12
pCM1_0009	<i>orfD</i>	ATPase	72,3	0	415	45,9
pCM1_0010	<i>orfE</i>	Membranprotein	66,4	2	128	13,2
pCM1_0011	<i>orfF</i>	sekretiertes Protein	64,0	1*	238	24,1
pCM1_0012	<i>orfG</i>	Membranprotein	63,7	6	475	48,9
pCM1_0013	<i>orfH</i>	Membranprotein	71,3	2	560	61,2
pCM1_0014	<i>orfI</i>	ATP bindendes Protein (VirB4)	69,0	0	523	57,2
pCM1_0015	<i>orfJ</i>	sekretiertes Protein	70,9	1*	367	36,4
pCM1_0016	<i>orfK</i>	hypothetisches Protein	69,5	0	151	16,1
pCM1_0017	<i>orfL</i>	Membranprotein	71,2	5	174	18,1
pCM1_0018	<i>orfM</i>	sekretiertes Protein, Endonuclease	73,4	1	252	26,4
pCM1_0019	<i>orfN</i>	hypothetisches Protein	71,0	0	160	17,9
pCM1_0020	<i>celA</i>	β -1,4-Endoglucanase	66,7	1*	746	73,5

Tabelle 2.3: Gene und Genprodukte der hypothetischen Transferregion von pCM1. GC: GC-Gehalt [%]; TMH: Anzahl an Transmembranhelices; * Leaderpeptid; AS: Anzahl der Aminosäuren; MW: Molekulargewicht [kDa].

169 Aminosäuren zu 45 % identisch zu einer nicht näher charakterisierten hypothetischen extrazellulären Deoxyribonuclease aus *Mycobacterium smegmatis* str. MC2 155 (Acc.-Nr.: ABK69953) (Alignment: Abb. 6.9, S. 166).

Die Suche nach konservierten Domänen in der von *orfC* abgeleiteten Aminosäuresequenz zeigte, dass das Genprodukt von *orfC* ein Transkriptionsregulator der HTH-ArsR-Superfamilie (*helix-turn-helix*, *arsenical resistance operon repressor*) sein könnte. Das Genprodukt von *orfC* ist in der N-terminalen Hälfte (AS 7-63) zu 33 % identisch zu einem hypothetischen Transkriptionsregulator der ArsR-Familie von *Rhodococcus* sp. RHA1 (Acc.-Nr.: ABG98691).

Auch wenn auf pCM1 ein Gen, das für eine Relaxase (TraA) und somit für das Initiatorprotein des konjugativen DNA-Transfers codiert, nicht identifiziert werden konnte, kann aber auf Grund der Anwesenheit einiger potentieller Transfergene dennoch vermutet werden, dass die oben beschriebene Region die Transferregion von pCM1 ist.

2.5 Zielsetzung

Die Ziele, die in dieser Arbeit verfolgt wurden, lassen sich zwei Bereichen zuordnen, zum einen den Untersuchungen zur Stabilität von Plasmiden und zum anderen der Charakterisierung der Konjugation von *Cmm*.

Die Stabilität der *Cmm*-Plasmide pCM1 und pCM2 sollte unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen untersucht werden. Von Interesse war, ob die Stabilität der Plasmide von der Kultivierungstemperatur und von der Konjugationsfähigkeit der Plasmide abhängt. Diese Analysen sollten in der Tomatenpflanze als dem natürlichen Lebensraum von *Cmm* aber auch *in vitro*, in Flüssigkulturen, durchgeführt werden.

Um umfangreiche Untersuchungen zur Konjugation der beiden Plasmide durchführen zu können, sollte die Methode des *filter matings* für *Cmm* etabliert werden, da diese Methode im Gegensatz zu Kreuzungsexperimenten *in planta* standardisiert angewendet werden kann. Dazu war es nötig, die optimalen Transferbedingungen zu bestimmen, zu denen ein geeignetes Nährmedium, das passende Mischungsverhältnis von Donor und Rezipient und die Inkubationsdauer gehören.

Des Weiteren sollten die potentiellen Transferregionen von pCM1 und pCM2 charakterisiert werden. Von Interesse war die Inaktivierung einzelner Gene dieser zum Teil als Operon organisierten Transferregionen. Über die Methode des *gene replacement* sollte z. B. das *traA*-Gen auf pCM2, das für ein Protein mit einer Relaxase- und Helicase-Domäne codiert und wahrscheinlich das Initiator-Protein des konjugativen Transfers ist, inaktiviert werden. Ob die Inaktivierung einzelner potentieller Transfergene einen Einfluss auf die Konjugation der Plasmide hat, sollte sowohl *in planta* als auch durch Filterkreuzungsexperimente untersucht werden.

3 Material und Methoden

Material

3.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp, wichtige Eigenschaften	Referenz
DH5 α MCR	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , λ^- <i>recA1</i> , <i>gyrA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>relA1</i> , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr\ hsdMS\ mcrBC)$, $\Delta(lacXYA-argF)$ -U169 Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15	Grant et al., 1990
GM119	F ⁻ , <i>dcm-6</i> , <i>dam-3</i> , <i>metβ1</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>lacY1</i> , <i>tsx-78</i> , <i>supE44</i>	Marinus and Morris, 1973

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

Stamm	Genotyp, wichtige Eigenschaften	Referenz
<i>Cmm</i> NCPPB382	Wildtyp, virulent, <i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate), pCM1 und pCM2	NCPPB
CMM100	Curing-Derivat von <i>Cmm</i> NCPPB382, avirulent, plasmidfrei	Meletzus and Eichenlaub, 1991
CMM101	Curing-Derivat von <i>Cmm</i> NCPPB382, virulent, pCM1	Meletzus and Eichenlaub, 1991

Stamm	Genotyp, wichtige Eigenschaften	Referenz
CMM101 _{Gm}	Gm ^R , pCM1 <i>celA::Gm</i>	Jahr et al., 2000
CMM102 _{Nm}	Nm ^R , pCM2 _{Nm} Kointegrat pCM2 / pHJ21	Jahr et al., 2000
CMM382 _{Nm/Gm}	Nm ^R , Gm ^R , pCM1 <i>celA::Gm</i> , pCM2 _{Nm} Kointegrat pCM2 / pHJ21	Pieper, 2001
CMM382pCM2 _{Nm}	Nm ^R , pCM2 _{Nm} Kointegrat pCM2 / pHJ21, pCM1	diese Arbeit
CMM382pCM2 _{traA}	Spc ^R , pCM2 <i>traA::add9</i> , pCM1	diese Arbeit
CMM382pCM2 _{trbL}	Spc ^R , pCM2 <i>trbL::add9</i> , pCM1	diese Arbeit
CMM382pCM2 _{traE}	Cm ^R , pCM2 <i>traE::cmx</i> , pCM1	diese Arbeit
CMM101pCM1 _{orfI}	Spc ^R , pCM1 <i>orfI::add9</i>	diese Arbeit
CMM101pCM1 _{orfM}	Spc ^R , pCM1 <i>orfM::add9</i>	Kosthorst, 2004
CMM382 _{Spc}	Spc ^R , pCM2 Kointegrat pCM2 / pBATrbL α	diese Arbeit
CMM100white _{Cm}	Cm ^R , <i>crtBI::cmx</i> , weißer Phänotyp, plasmidfrei	diese Arbeit
CMM100Strep	Strep ^R , Spontanresistenz, plasmidfrei	diese Arbeit
CMMGmdA	Cm ^R , <i>gmdA::cmx</i> (EPS IV), pCM1	Schauer, 2004
CMMWcmH	Cm ^R , <i>wcmH::cmx</i> (EPS IV), pCM1	Schauer, 2004
CMMWcnE	Cm ^R , <i>wcnE::cmx</i> (EPS I), pCM1	Schauer, 2004
CMMBldKD	Cm ^R , <i>bldKD::cmx</i> , pCM1, pCM2	Flügel, unveröffentlicht

Tabelle 3.3: In dieser Arbeit verwendete *Clavibacter*-Stämme, Wirtspflanze: Tomate (*Solanum lycopersicum*).

3.2 Plasmide und Vektoren

Vektor/Plasmid	Genotyp, wichtige Eigenschaften	Referenz
pUC::4,6B2	4595 bp <i>Bgl</i> II-Fragment von pCM2 in pUC13 (<i>Bam</i> HI) kloniert, <i>traA</i> , Ap ^R	Zellermann, unveröffentlicht
pUC::7,7B2	7667 bp <i>Bgl</i> II-Fragment von pCM2 in pUC13 (<i>Bam</i> HI) kloniert, <i>trbL</i> , Ap ^R	Zellermann, unveröffentlicht
cmis01p198F11	geschertes 1,2 kb Fragment aus <i>Cmm</i> NCPPB382, kloniert in pSMART, flankiert von <i>Eco</i> RI-Schnittstellen, <i>traE</i> , Ap ^R	Genomprojekt <i>Cmm</i> NCPPB382, IIT Bielefeld
pAKS1	pS19MECA2 mit 8kb <i>Pst</i> I-Fragment aus pDM302 (<i>E. coli</i> - <i>Cmm</i> Shuttle Vektor), Spc ^R , pCM1-Replicon	Kosthorst, 2004
pEC70	pK18mob mit 3,1 kb <i>Hpa</i> I/ <i>Hind</i> III-Fragment von pTP10 aus <i>Corynebacterium striatum</i> , Cm ^R , Km ^R	Tauch et al., 1998
pBATraA β	pUC::4,6B2 mit in <i>Bsa</i> BI-Deletion kloniertem <i>add9</i> -Gen (1,6 kb- <i>Eco</i> RV-Fragment) aus pAKS1, <i>add9</i> in entgegengesetzter Orientierung zu <i>traA</i> ; Ap ^R , Spc ^R	diese Arbeit
pBATrbL α	pUC::7,7B2 mit über <i>Eco</i> RV inseriertem <i>add9</i> -Gen (1,6 kb- <i>Eco</i> RV-Fragment) aus pAKS1, <i>add9</i> in gleicher Orientierung wie <i>trbL</i> ; Ap ^R , Spc ^R	diese Arbeit
pBATrbL β	pUC::7,7B2 mit über <i>Eco</i> RV inseriertem <i>add9</i> -Gen (1,6 kb- <i>Eco</i> RV-Fragment) aus pAKS1, <i>add9</i> in entgegengesetzter Orientierung wie <i>trbL</i> ; Ap ^R , Spc ^R	diese Arbeit

Vektor/Plasmid	Genotyp, wichtige Eigenschaften	Referenz
pBATraE α	cmis01p198F11 mit über <i>NruI</i> inseriertem <i>cmx</i> -Gen (1,9 kb- <i>BsaAI</i> -Fragment) aus pEC70, <i>cmx</i> in gleicher Orientierung wie <i>traE</i> ; Ap ^R , Cm ^R	diese Arbeit
pBATraE β	cmis01p198F11 mit über <i>NruI</i> inseriertem <i>cmx</i> -Gen (1,9 kb- <i>BsaAI</i> -Fragment) aus pEC70, <i>cmx</i> in entgegengesetzter Orientierung wie <i>traE</i> ; Ap ^R , Cm ^R	diese Arbeit
pT19ME2::113-35 α	pT19MECA2 mit 5,9 kb- <i>BglII</i> -Fragment aus Cosmid cos2/27, enthält Carotinoidbiosynthese-Cluster von <i>Cmm</i>	Abt, 2003
pUC13::113-35 α	pUC13 mit 6,1 kb- <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment aus pT19ME2::113-35 α , enthält Carotinoidbiosynthese-Cluster von <i>Cmm</i>	Abt, 2003
pUC13::113-35 α <i>cmx</i> β	pUC13::113-35 α mit in <i>Eco47III</i> -Deletion kloniertem <i>cmx</i> -Gen (1,9 kb- <i>BsaAI</i> -Fragment) aus pEC70, <i>cmx</i> in entgegengesetzter Orientierung zu <i>crtBI</i> ; Ap ^R , Cm ^R	diese Arbeit

Tabelle 3.4: In dieser Arbeit verwendete Plasmide und Vektoren.

3.3 Pflanzenmaterial

Pflanzensamen	Herkunft
<i>Solanum lycopersicum</i> (Mill.) (Tomate) cv. „MoneyMaker“	Erfurter Saatgut, N.L. Chrestensen, Erfurter Samen- und Pflanzenzucht GmbH

Tabelle 3.5: In dieser Arbeit verwendete Pflanzensamen.

3.4 Enzyme und Chemikalien

3.4.1 Restriktionsendonukleasen und -puffer

Enzym	Erkennungsequenz 5'→ 3'	Reaktionspuffer	Temperatur
<i>Bam</i> HI	G/GATCC	NEBuffer 2	37 °C
<i>Bgl</i> II	A/GATCT	NEBuffer 3	37 °C
<i>Bsa</i> AI	PyAC/GTPu	NEBuffer 2	37 °C
<i>Bsa</i> BI	GATNN/NNATC	NEBuffer 2	60 °C
<i>Eco</i> RI	G/AATTC	NEBuffer 1 - 4	37 °C
<i>Eco</i> RV	GAT/ATC	NEBuffer 3	37 °C
<i>Eco</i> 47III	AGC/GCT	NEBuffer 3	37 °C
<i>Hind</i> III	A/AGCTT	NEBuffer 2	37 °C
<i>Kpn</i> I	GGTAC/C	NEBuffer 1	37 °C
<i>Nco</i> I	C/CATGG	NEBuffer 4	37 °C
<i>Not</i> I	GC/GGCCGC	NEBuffer 3	37 °C
<i>Nru</i> I	TCG/CGA	NEBuffer 3	37 °C
<i>Msc</i> I	TGG/CCA	NEBuffer 4	37 °C
<i>Psh</i> AI	GACNN/NGTC	NEBuffer 4	37 °C
<i>Pst</i> I	CTGCA/G	NEBuffer 3	37 °C
<i>Sma</i> I	CCC/GGG	NEBuffer 4	25 °C
<i>Xho</i> I	C/TCGAG	NEBuffer 2	37 °C

Tabelle 3.6: In dieser Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen; / gibt die Position der Schnittstelle an, Pu: Purin, Py: Pyrimidin.

3.4.2 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs
Lysozym	Sigma
Proof Start Polymerase	Qiagen
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
RNase A	Serva
Taq-Polymerase	Qiagen oder isoliert aus rekombinantem <i>E. coli</i> -Stamm
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs

Tabelle 3.7: In dieser Arbeit verwendete Enzyme.

Ligase-Puffer (Firma New England Biolabs)

1 × T4-DNA-Ligase-Buffer	50 mM	Tris-HCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	Dithiothreitol
	1 mM	ATP
	25 mg/ml	BSA
		pH 7,5

3.4.3 Chemikalien und Kits

Bezugsquelle	Chemikalien/Material
Amersham	Hybond N-Filter, Sephadex
AppliChem	Gentamicin
Biozym	Agarose Seakem LE
Eurogentec	Elektroporationsküvetten (2 mm Elektrodenabstand)

Bezugsquelle	Chemikalien/Material
GibcoBRL	Select Agar, Select Peptone 140, Select Yeast Extract
Macherey & Nagel	Porablot NY
Qiagen	QIAprep Spin Miniprep, QIAquick Gel Extraction Kit, Taq PCR Core Kit, QIAquick PCR-Purification Kit
Roche	NBT/BCIP Stock Solution, Blocking Reagenz, DIG DNA Labeling and Detection Kit
Roth	Ampicillin, Glasperlen, Glucose, Glycerin, Glycin, Natriumchlorid, Tween80, X-Gal
Sartorius	Nitrocellulose Nitrate Filter (Porengröße 0,45 μm)
Serva	Asparagin, Bromphenolblau, N-Laurylsarkosyl, Silicone solution
Sigma	Chloramphenicol, Dimethylformamid, EDTA, EGTA, Mineralöl, Natriumhydroxid, Neomycin, Sorbitol, Tris-HCl, Triton-X-100
Whatman	3 MM Papier

Tabelle 3.8: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Kits.

3.5 Oligonukleotidprimer für PCR

Primer	Sequenz 5'→ 3'	Herkunft/Referenz
P6 (<i>pat-1</i>)	CGT CAG GAG GTC GCT AAT A	Zellermann, unveröffentlicht
P5 (<i>pat-1</i>) oder pat-1fwd (<i>pat-1</i>)	GCG AAT AAG CCC ATA TCA A GCT ACT ATG CAG TTC ATG TC	Zellermann, unveröffentlicht Flügel, unveröffentlicht
PRC3 (<i>celA</i>)	TCG TCT CGA ACT TCG TAC CG	Zellermann, unveröffentlicht
PFC1 (<i>celA</i>)	GTC TGA GCT CTG GTA CAC AT	Zellermann, unveröffentlicht

Tabelle 3.9: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotidprimer. Annealingtemperatur 55 °C.

3.6 Nährmedien

Die Mengen der einzuwiegenden Substanzen beziehen sich auf 1000 ml deionisiertes H₂O.

TBY-Medium	10 g	Trypton
	5 g	Hefe-Extrakt
	5 g	NaCl
		pH 7,5
C-Medium	10 g	Trypton
	5 g	Hefe-Extrakt
	5 g	NaCl
	5 g	Glucose
		pH 7,2
SB Medium	10 g	Trypton
	5 g	Hefe-Extrakt
	2 g	NaCl
	16 g	Agar (für Festmedium) in 600 ml H ₂ O deionisiert
	91 g	Sorbitol
	20 ml	1 M MgCl ₂
	5 ml	5 M CaCl ₂
		in 400 ml H ₂ O deionisiert; getrennt autoklavieren
SOC-Medium	20,0 g	Trypton
	5,0 g	Hefe-Extrakt
	3,9 g	Glucose
	2,5 g	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
	2,1 g	MgCl ₂ · 6 H ₂ O
	0,6 g	NaCl
	0,2 g	KCl
		pH 7,0

Kartoffelmedium (MBAL)	2 g	K ₂ HPO ₄
	2 g	NaCl
	1 g	Na-Citrat
	6 g	Glucose
	300 g	weichgekochte Kartoffeln, in dem Sud mit Pürierstab zerkleinern
	12 g	Agar auf 1000 ml auffüllen, pH 7,0
	0,6 g	Asparagin nach dem Autoklavieren zugeben
Tomatenmedium	2 g	K ₂ HPO ₄
	2 g	NaCl
	1 g	Na-Citrat
	6 g	Glucose
	300 g	Tomaten (Frucht oder Pflanze), mit Pürierstab zerkleinern
	12 g	Agar auf 1000 ml auffüllen, pH 7,0
	0,6 g	Asparagin nach dem Autoklavieren zugeben

3.6.1 Zusätze zu Nährmedien

Festmedium	16 g	Agar pro 1000 ml Medium
Weichmedium	7 g	Agar pro 1000 ml Medium
lacZ- α - ω -Komplementation:	1500 μ l/l	3% X-Gal (v/v) in DMF gelöst
	200 μ l/l	0,2 M IPTG

3.6.2 Antibiotika

Antibiotikum	Abkürzungen	Lösungsmittel	Konzentration in <i>E. coli</i> ($\mu\text{g/ml}$)	Konzentration in <i>Cmm</i> ($\mu\text{g/ml}$)
Ampicillin	Ap	H ₂ O	150	-
Chloramphenicol	Cm	70% (v/v) EtOH	10	10
Gentamicin	Gm	H ₂ O	10	40
Neomycin	Nm	H ₂ O	50	75
Spectinomycin	Spc	H ₂ O	100	100
Streptomycin	Strep	H ₂ O	300	300

Tabelle 3.10: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika.

3.7 Puffer und Lösungen

3.7.1 Lösungen zur Resuspendierung von Zellen

PS-Puffer	7 g	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O
	5 g	NaCl
	3 g	KH ₂ PO ₄
		pH 7,0
1 x TE	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA
		pH 8,0

3.7.2 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung

Gesamt-DNA-Isolierung aus *Cmm*

AK I	6,7 %	Sucrose (w/v)
	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA

Plasmidisolierung

P1	50 mM	Tris
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
		pH 8,0

P2	200 mM	NaOH
	1 %	SDS

P3	3 M	K-Acetat
		pH 5,5

Plasmidisolierung nach Birnboim-Doly

(Sambrook et al., 1989)

BD I	50 mM	Glucose
	10 mM	EDTA
	25 mM	Tris-HCl, pH 7,5

BD II	200 mM	NaOH
	10 mM	EDTA
	1 %	SDS (w/v)

CsCl-gesättigtes Isopropanol	37 g	CsCl in 41 ml Millipore 100 ml Isopropanol zugeben
------------------------------	------	---

Chloroform-Isoamylalkohol		Chloroform und Isoamylalkohol Verhältnis 24:1 (v/v)
---------------------------	--	--

3.7.3 Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese

Agarose-Lösung	0,8-2 %	Agarose (w/v) in TBE (1 ×) aufkochen
----------------	---------	--------------------------------------

Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml	in H ₂ O
-----------------------	----------	---------------------

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

TBE (10 ×)	108,0 g	Tris-Base
	9,3 g	EDTA
	55,0 g	Borsäure
		mit H ₂ O bidest. auf 1000 ml auffüllen

3.7.4 Lösungen zur 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 ₄ -Acetat
	0,02 M	NaOH

3.7.5 Puffer und Lösungen für DNA-DNA-Hybridisierungen

DIG-Färbelösung	80 μ l	NBT/BCIP Stock-Solution in 20 ml DIG-Puffer 3
DIG-Hybridisierungslösung	7 ml	DIG-Prähybridisierungslösung mit DIG-markierter DNA-Probe
DIG-Blocking-Stammlösung	10 %	Blocking-Reagenz in DIG-Puffer 1 (w/v)
DIG-Prähybridisierungslösung	5 \times 0,5 % 0,1 % 0,02 %	SSC Dig-Blocking-Stammlösung (v/v) N-Laurylsarkosyl (v/v) SDS (w/v)
DIG-Puffer 1	0,1 M 0,15 M	Maleinsäure NaCl pH 7,5
DIG-Puffer 2	2 %	DIG-Blocking-Stammlösung (w/v) in DIG-Puffer 1

DIG-Puffer 3	100 mM	Tris-HCl, pH 9,5
	100 mM	NaCl
	50 mM	MgCl ₂
DIG-Waschpuffer	0,3 %	Tween80 (v/v) in DIG-Puffer 1
20 × SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Na-Citrat
		pH 7,0
Waschpuffer I	2 ×	SSC
	0,1 %	SDS
Waschpuffer II	0,1 ×	SSC
	0,1 %	SDS

3.8 Geräte

Elektroporationsgerät, Gene Pulser, Firma BioRAD

Hybridisierungssofen, OV2, Firma Biometra

Klimaschrank für Pflanzenanzucht, MCR-35OH, Firma Sanyo

Kühlzentrifuge, Centrikon H-401, Firma Kontron

Megafuge 10, Firma Heraeus Sepatech

RoboCycler Gradient 96, Firma Stratagene

Transilluminator VL, Firma Vilber Lourmat

Tischzentrifuge, Centrifuge 5417C, Firma Eppendorf

Ultrazentrifuge, Optima LE-80K, Firma Beckmann & Coulter

UV-VIS-Spektrometer, UV-1202, Firma Shimadzu

Methoden

3.9 Anzucht von Bakterienkulturen

3.9.1 Anzucht von *E. coli*

E. coli-Stämme werden auf festem oder in flüssigem TBY-Medium, ggf. unter Zusatz von Antibiotika, bei 37°C über Nacht angezogen. Größere Volumina werden im Erlenmeyer-Kolben bei 37°C auf dem Luftschüttler (180 U/min) inkubiert. Nach der Elektroporation erfolgt die Regeneration der *E. coli*-Zellen in SOC-Medium.

3.9.2 Anzucht von *Cmm*

Kulturausstriche von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stämmen werden auf C- oder TBY-Medium, ggf. unter Zusatz von Antibiotika, über 3-4 Tage bei 26°C angezogen. Die Kultivierung größerer Volumina erfolgt im Erlenmeyer-Kolben auf dem Luftschüttler (180 U/min). Nach Elektroporation werden *Clavibacter*-Zellen zur Regeneration auf SB-Selektionsmedium inkubiert.

3.9.3 Titerbestimmung von Bakterien in Flüssigkultur

Das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur kann durch die photometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 580 nm verfolgt werden. Als Referenz dient das jeweilige sterile Nährmedium, in dem die Bakterien kultiviert wurden. Bis zu einer $OD_{580} \leq 1$ entspricht hierbei eine OD_{580} von 0,1 einem Lebendtiter von $\sim 2 \times 10^7$ Zellen/ml bei *E. coli* und $\sim 5 \times 10^7$ Zellen/ml bei *Cmm*.

3.9.4 Konservierung von Bakterienkulturen (Glycerinkultur)

- Bakterien von der Agar-Platte in ein Eppendorfgesäß überführen
- add. 400 µl PS-Puffer, vortexen
- add. 600 µl 87% Glycerin, vortexen
- Lagerung bei -20°C

3.10 DNA-Isolierung

3.10.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus *Cmm*

(Altenbuchner and Cullum, 1984)

- Bakterien von der Agar-Platte in ein Eppendorfgefäß überführen
- Zellen in 500 μ l AKI-Lösung mit 10 mg/ml Lysozym gut resuspendieren
- 45-60 min bei 37 °C inkubieren (gelegentlich invertieren)
- add. 200 μ l 5 % SDS, mischen
- 10 min bei 70 °C inkubieren
- langsam auf RT abkühlen lassen
- add. 200 μ l Phenol/Chloroform 1:1 (neutral), durch Invertieren homogenisieren
- 30 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Oberphase in neues Eppendorfgefäß überführen
- Phenolisierungsschritt wiederholen
- add. 1 Vol. Isopropanol und $\frac{1}{10}$ Vol. 3 M Na-Acetat (pH 8,0)
- invertieren, bis die DNA ausfällt
- präzipitierte DNA in neues Eppendorfgefäß überführen
- DNA 2 \times in 500 μ l 70 % (v/v) Ethanol waschen
- DNA in neues Eppendorfgefäß überführen
- DNA in 50-200 μ l H₂O lösen (Volumen ist abhängig von isolierter DNA-Menge)
- 30 min bei 37 °C oder ü/N bei RT inkubieren
- Lagerung bei 4 °C

3.10.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Isolierung von Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit

(nach Qiagen Handbuch 2001)

- Bakterien von der Agar-Platte in ein Eppendorfgefäß überführen

- Zellen in 250 μ l P1-Puffer resuspendieren
- add. 250 μ l P2-Puffer, 4-6 \times invertieren, 5 min bei RT inkubieren
- add. 350 μ l N3-Puffer, 4-6 \times invertieren
- 20 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- QIAprep-Säule in ein 2 ml-Sammelgefäß einsetzen
- Überstand auf QIAprep-Säule geben
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- 500 μ l PB-Puffer auf die QIAprep-Säule geben
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- 750 μ l PE-Puffer auf die QIAprep-Säule geben
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- Zentrifugation wiederholen, um Waschpuffer vollständig zu entfernen
- QIAprep-Säule in ein neues Eppendorfgefäß setzen
- 50 μ l H₂O bidest. oder EB-Puffer in die Mitte der QIAprep-Säule geben
- 60 s bei RT inkubieren
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren
- Lagerung bei -20 °C

Plasmidisolierung nach Birnboim-Doly

(Sambrook et al., 1989)

- 100 ml TBX-Selektionsmedium mit *Escherichia coli* animpfen, ü/N auf dem Luftschüttler bei 37 °C inkubieren
- 38 ml in 40 ml Zentrifugationsröhrchen überführen
- 5 min bei 5000 rpm zentrifugieren (Kühlzentrifuge, Firma Kontron, Rotor A8.24)
- Überstand abgießen und mit weiteren 38 ml den Vorgang wiederholen
- Pellet in 8 ml BDI resuspendieren (vortexen)
- add. 16 ml BDII (frisch ansetzen)
- 10 min bei RT inkubieren

- add. 12 ml 3 M Na-Acetat (pH 4,8), invertieren
- 10 min bei 0°C inkubieren
- 10 min bei 20000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand auf zwei 40 ml-Zentrifugationsröhrchen verteilen
- add. 1 Vol. Isopropanol, invertieren
- 30 min bei 10000 rpm zentrifugieren
- Pellet trocknen und in insgesamt 5 ml 1 × TE (pH 8,0) lösen
- 4,3 ml für CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation verwenden

3.10.3 CsCl-Ethidiumbromid-Dichtegradient

- 4,65 g CsCl in Corex-Röhrchen abwiegen
- add. 4,3 ml Birnboim-Doly-DNA-Lösung, invertieren
- add. 300 µl EtBr (2-3 mg/ml), mit Pasteurpipette mischen
- Lösung luftblasenfrei in Quickseal-Röhrchen überführen
- Gradient: 15°C, 50000 rpm, mind. 8 h oder ü/N (Ultrazentrifuge, Beckman Coulter)
- unter UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) Plasmidbande (= untere Bande) mit einer Spritze abziehen und in ein Eppendorfgefäß überführen
- add. 300 µl CsCl-Isopropanol (37 g in 41 ml H₂O lösen, add. 100 ml Isopropanol), mischen
- obere Phase abziehen, Vorgang wiederholen, bis untere Phase farblos ist
- Dialyse zweimal 4 h gegen 1 × TE (pH 8,0)

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

- Bakterien-Kultur in ein Eppendorfgefäß überführen
- Zellen mit 200 µl P1 mit 100 mg/ml RNase A resuspendieren
- add. 200 µl P2, 4-6 × invertieren
- 5 min bei RT inkubieren
- add. 200 µl 4°C kalten P3, sofort 4-6 × invertieren

- 5 min auf Eis inkubieren
- 20 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- 600 μl des Überstandes in neues Eppendorfgefäß überführen
- add. 600 μl Isopropanol, mischen
- 30 min bei 13200 rpm zentrifugieren, Überstand entfernen
- mit 500 μl 70 % (v/v) Ethanol waschen
- 5 min bei 13200 rpm zentrifugieren, Überstand vollständig entfernen
- DNA-Pellet trocknen
- DNA in 20 μl H₂O bidest. oder 1 \times TE-Puffer (pH 8,0) resuspendieren
- Lagerung kurzfristig bei 4 °C, langfristig bei -20 °C

3.10.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Cmm*

- Zellen von einer frischbebrüteten Agar-Platte in ein Eppendorfgefäß überführen
- Zellen in 300-500 μl 10 % (v/v) Glycerin waschen
- 20 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- ü/N bei -20 °C einfrieren
- Pellet in 300 μl P1 mit 7 mg/ml Lysozym resuspendieren
- 25 min bei 37 °C inkubieren
- add. 300 μl P2, 6 \times invertieren
- 8 min bei RT inkubieren
- add. 30 μl P3, 6 \times invertieren
- 10 min bei 0 °C inkubieren
- 20 min bei 13200 rpm zentrifugieren
- Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen
- add. 700 μl neutrales Phenol/Chloroform, durch Invertieren homogenisieren
- 5 min bei 0 °C inkubieren
- 20 min bei 13200 rpm zentrifugieren

- Überstand in neues Eppendorfggefäß überführen
- add. 700 μl Chloroform/Isoamylalkohol (1:24), invertieren
- 20 min bei 13200 rpm zentrifugieren
- Überstand in neues Eppendorfggefäß überführen
- $\frac{1}{10}$ Vol. Na-Acetat (pH 7,5) zugeben, 6 \times invertieren
- 1 Vol. Isopropanol zugeben, 6 \times invertieren
- 20 min bei -20°C inkubieren
- 20 min bei 13200 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet mit 500 μl 70 % (v/v) Ethanol waschen
- 10 min bei 13200 rpm zentrifugieren
- Überstand vollständig entfernen
- Pellet bei 37°C trocknen
- DNA in 50 μl TE-Puffer lösen

3.11 DNA-Reinigung und -Konzentration

3.11.1 Alkohol-Fällung

Ethanol-Fällung

- 1 Vol. DNA-Lösung
- add. $\frac{1}{10}$ Vol. 3 M Na-Acetat, pH 8,0
- add. 2 Vol. Ethanol, invertieren
- 30 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand entfernen
- Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol waschen
- 5 min bei 13200 rpm zentrifugieren
- Überstand vollständig entfernen
- Pellet trocknen und in H_2O bidest. oder TE-Puffer (pH 8,0) resuspendieren

Isopropanol-Fällung

- 1 Vol. DNA-Lösung
- add. $\frac{1}{10}$ Vol. 3 M Na-Acetat, pH 8,0
- add. 1 Vol. Isopropanol, invertieren
- 30 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand entfernen
- Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol waschen
- 5 min bei 13200 rpm zentrifugieren
- Überstand vollständig entfernen
- Pellet trocknen und in H₂O bidest. oder TE-Puffer (pH 8,0) resuspendieren

3.11.2 Phenolisierung

- 1 Vol. DNA-Lösung
- add. $\frac{1}{2}$ Vol. Phenol/Chloroform 1:1 (neutral), mischen
- 30 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- obere Phase in neues Eppendorfgefäß überführen
- add. 1 Vol. Phenol/Chloroform (neutral), mischen (Vorgang ggf. wiederholen)
- anschließend Isopropanol-Fällung des Überstandes

3.11.3 Sephadex-Behandlung

- Sephadex G50 Pulver (Amersham) in H₂O bidest. quellen lassen, autoklavieren
- silikonisiertes Glaskügelchen (\varnothing ca. 2,5 mm) in blaue Pipettenspitze geben, Silikonisierung: Glaskügelchen in Silikonisierungslösung für 1 h bei 100 °C backen
- Pipettenspitze in Weichagar-Röhrchen stellen
- 800 μ l Sephadex G50 Lösung in die Pipettenspitze füllen
- 15 min bei 3000 \times g zentrifugieren (Megafuge, Heraeus Sepatech)
- Pipettenspitze in neues Weichagar-Röhrchen stellen
- DNA auf die Sephadex-Säule auftragen

- Rörchen 15 min bei $3000 \times g$ zentrifugieren
- entsalztes DNA-Eluat weiter verwenden oder bei -20°C lagern

3.11.4 Aufreinigung von PCR-Produkten (QIAquick PCR Purification Kit)

(nach Qiagen Handbuch 2001)

- add. 5 Vol. PB-Puffer zu 1 Vol. PCR-Reaktionsansatz
- Säule in ein Sammelgefäß stellen und Ansatz darauf pipettieren
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Durchlauf verwerfen
- 750 μl PE-Puffer auf die Säule geben
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- Zentrifugation wiederholen, um den restlichen Puffer vollständig zu entfernen
- Säule in ein neues Eppendorfggefäß setzen
- 30 bis 50 μl EB-Puffer oder H_2O bidest. auf die Mitte der Säule geben
- 60 s bei RT inkubieren
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren, um DNA zu eluieren
- Lagerung bei -20°C

3.12 DNA-Techniken

3.12.1 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Hydrolyse von Plasmid-DNA

20 μl Ansatz

1 - 5 μl	DNA (0,2 - 0,5 μg)
2 μl	10 \times Restriktionspuffer
1 μl	Restriktionsendonuklease (2 - 4 u)
x μl	H_2O bidest. (auf 20 μl Reaktionsvolumen auffüllen)

- ü/N bei Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms inkubieren
- Inaktivierung des Enzyms durch Inkubation bei 70 °C für 20 min oder Phenolisierung

Hydrolyse von Gesamt-DNA

100 μ l Ansatz

10 μ l	DNA (0,2 - 0,5 μ g)
10 μ l	10 \times Restriktionspuffer
1 - 2 μ l	Restriktionsendonuklease (2 - 4 u)
x μ l	H ₂ O bidest. (auf 100 μ l Reaktionsvolumen auffüllen)

- ü/N bei Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms inkubieren
- Inaktivierung des Enzyms durch Inkubation bei 70 °C für 20 min oder Phenolisierung

3.12.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird zur Charakterisierung von DNA-Molekülen nach Amplifikation, Isolierung oder Restriktion verwendet. Aufgrund der negativen Ladung, die die Phosphatreste der DNA verleihen, kann die DNA im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Bei der Auftrennung in Agarosegelen ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA zum einen von der Größe und zum anderen von der Konformation (ss, ds, linear, oc, ccc) der Moleküle abhängig. Maßgeblich für die DNA-Wanderungsgeschwindigkeit ist die aus unterschiedlichen Agarosekonzentrationen resultierende Dichte des Netzwerkes. Je höher die Agarosekonzentration ist, desto geringer ist die Wanderungstrecke der DNA-Moleküle unter gleich bleibenden Bedingungen. Die Agarosekonzentration des Gels wird entsprechend der erwarteten Größe der DNA-Moleküle gewählt. In dieser Arbeit wurden Agarosekonzentrationen von 0,8 bis 1,5 % verwendet.

- Agarose in TBE-Puffer aufkochen
- auf ca. 60 °C abkühlen lassen, in einen Gelträger gießen und Kamm einsetzen
- nach dem Auspolymerisieren des Gels (ca. 20 min) in eine mit 1 \times TBE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer einsetzen und den Kamm entfernen

- DNA-Proben mit Gel-Lade-Puffer ($\frac{1}{5}$ Vol.) versetzen
- Geltaschen mit Proben beladen und geeigneten Marker auftragen
- Auftrennung bei einer Spannung von 90 - 120 Volt
- Gel nach Ende der Elektrophorese 5 - 15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung färben
- Gel wässern und unter UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) fotografieren
- Gel ggf. in $1 \times$ TBE-Puffer entfärben

3.12.3 Bestimmung des Molekulargewichts von DNA

Die Mobilität von DNA-Molekülen bei der Gelelektrophorese ist, unter geeigneten Bedingungen, umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes. Durch den Vergleich der Mobilitäten der im gleichen Gel aufgetrennten Größenstandards, können die Größen der unbekanntenen DNA-Fragmente ermittelt werden. Als Größenstandards wurden in dieser Arbeit *EcoRI/HindIII*-hydrolysierte λ -Phagen-DNA und die 1 kb-Leiter der Firma New England Biolabs verwendet (Abb. 3.1).

In Hybridisierungsgelen wurden als Marker Digoxigenin-11-dUTP markierte *EcoRI/HindIII*-Restriktionsfragmente de λ -Phagen-DNA von Roche Diagnostics eingesetzt.

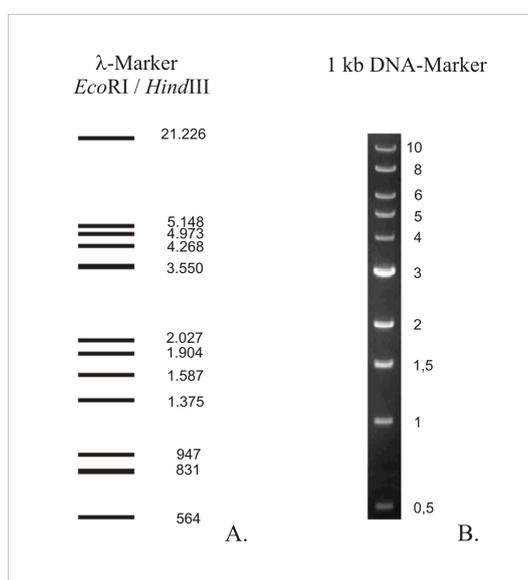


Abbildung 3.1: A: Restriktionsfragmente der *EcoRI/HindIII* hydrolysierten λ -Phagen-DNA als DNA-Längenmarker (bp); B: TryDye 1 kb DNA-Marker (New England Biolabs).

3.13 Klonierung von DNA-Fragmenten

3.13.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit

(nach Qiagen Handbuch 2001)

- DNA-Restriktionsfragmente aus dem Agarosegel ausschneiden
- add. 300 μl QG-Puffer pro 100 μg Gel, mischen
- 15 min bei 50 °C inkubieren, gelegentlich vortexen
- add. 100 μl Isopropanol pro 100 μg Gel, mischen
- Säule in 2 ml-Sammelgefäß stecken
- Lösung auf die Säule geben
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Durchlauf verwerfen
- add. 500 μl QG-Puffer
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- add. 500 μl PB-Puffer
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- add. 750 μl PE-Puffer
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- nochmal 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren
- Säule in neues Eppendorfgefäß setzen
- 30 bis 50 μl EB-Puffer oder H₂O in die Mitte der QIAprep-Säule geben
- 1 min inkubieren
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren, um DNA zu eluieren
- Lagerung bei 4 °C

3.13.2 Dephosphorylierung von DNA mit der Antarctic Phosphatase (New England Biolabs)

1-5	μl	gespaltene DNA (1 μg)
1	μl	10 \times Antarctic Phosphatase Reaction Buffer
1	μl	Antarctic Phosphatase (5 u)
x	μl	H ₂ O bidest. (auf 10 μl Reaktionsvolumen auffüllen)

- Inkubation für 15 min bei 37°C, bei 5'-Überhang oder *blunt ends*
- Inkubation für 60 min bei 37°C, bei 3'-Überhang
- Inaktivierung durch Inkubation bei 65°C für 5 min

3.13.3 Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten

Die Klonierung eines Restriktionsfragments kann entweder direkt nach der Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen (*shotgun*-Klonierung) oder nach der Isolierung des DNA-Fragments aus dem Agarosegel erfolgen. Vektor- und Insert-DNA werden in einem geeigneten Verhältnis (1:3 bis 1:5) gemischt und in einer Ligasereaktion miteinander verbunden.

Ligationsansatz (40 μl)

15-25	μl	Vektor-Insert-Gemisch
4	μl	10 \times T4-Ligasepuffer
1	μl	T4-Ligase
x	μl	H ₂ O bidest. (auf 40 μl Reaktionsvolumen auffüllen)

- Ligationsansatz 3 h bei RT oder ü/N bei 16°C ligieren
- 10 min bei 70°C inaktivieren

3.13.4 α - ω -Komplementation (Blau-Weiß-Selektion)

Durch die α - ω -Komplementation ist es möglich, den Erfolg einer Klonierung in *E. coli* ohne großen Aufwand zu überprüfen. Bei den hierfür verwendeten Klonierungsvektoren

liegt die *multiple cloning site* (*mcs*) innerhalb des α -Fragments des *lacZ*-Gens, das für die β -Galactosidase codiert. Die β -Galactosidase setzt bei der Spaltung des, dem Medium zugesetzten, farblosen Substrats X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid) das blaue 5-Brom-4-chlor-indigo frei. Durch die Klonierung des Inserts in die *mcs* des Vektors, wird das *lacZ*-Fragment unterbrochen, das im Medium vorhandene X-Gal kann nicht gespalten werden und die entstehenden Kolonien bleiben weiß. Die Zellen der blauen Kolonien enthalten den Vektor ohne Insert.

3.14 DNA-Transfer

3.14.1 Transformation von *Escherichia coli* (CaCl₂-Methode)

Herstellung kompetenter Zellen

- *E. coli* ü/N-Flüssigkultur 1:50 in TBY überimpfen
- Inkubation bei 37 °C auf dem Luftschüttler bis zu einer OD₅₈₀ = 0,5-0,8
- alle weiteren Schritte werden auf Eis durchgeführt
- 5 min bei 6000 × g und (4 °C) zentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor 8.24, Kontron)
- Überstand verwerfen
- Pellet in 5 ml 100 mM CaCl₂ (eiskalt) resuspendieren
- 30 min auf Eis inkubieren
- 5 min bei 6000 × g zentrifugieren
- Pellet in 2 ml 100 mM CaCl₂ mit 20 % Glycerin (eiskalt) resuspendieren
- Zellen zu 200 μ l Aliquots in vorgekühlte Eppendorfgefäße portionieren
- Lagerung bei -80 °C

Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

- 200 μ l kompetente Zellen auf Eis auftauen
- add. 10 μ l des Ligationsansatzes bzw. 5 μ l 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 37 °C inkubieren
- Zellen 1 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Zellen im Rücklauf resuspendieren und auf Selektionsmedium ausplattieren
- Inkubation ü/N bei 37 °C

3.14.2 Elektroporation von *E. coli*

Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

- *E. coli* ü/N-Flüssigkultur 1:100 in TBY verdünnen
- Inkubation bei 37 °C auf dem Luftschüttler bis zu einer OD₅₈₀ von 0,5-0,75
- Zellen 15 min in Eiswasser abkühlen
- alle weiteren Schritte werden auf Eis durchgeführt, Lösungen vorkühlen
- 250 ml Kultur 15 min bei 6000 × g zentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor 6.9, Kontron)
- Überstand vollständig entfernen
- Pellet zweimal mit ca. 20 ml H₂O (Millipore) waschen, ohne das Pellet zu lösen
- Pellet in 5 ml H₂O (Millipore) resuspendieren
- add. 250 ml H₂O (Millipore), mischen
- 15 min bei 6000 × g zentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor 6.9, Kontron)
- Überstand sofort abgießen, Pellet im Rücklauf resuspendieren
- Zellsuspension auf zwei 40 ml-Zentrifugenröhrchen aufteilen
- add. 25 ml eiskaltes 15 % Glycerin, mischen
- 15 min bei 6000 × g zentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor 8.24, Kontron)
- Überstand abziehen
- Pellet in 0,5-1 ml 15 % Glycerin resuspendieren
- kompetente Zellen à 100 µl in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotieren
- Lagerung bei -80 °C

Elektroporation kompetenter *E.coli*-Zellen

Einstellungen des Gene Pulser (Firma BioRAD)

Kapazität	25	μF
Parallelwiderstand	400	Ω
Spannung	12,5	kV/cm (2,5 kV bei 2 mm Küvetten)

- kompetente Zellen auf Eis auftauen, DNA und Küvetten auf Eis stellen
- 100 μl kompetente Zellen mit bis zu $\frac{1}{20}$ Vol. salzfreier DNA vermischen
- Zell-DNA-Suspension in die Küvette geben
- Küvette sorgfältig abtrocknen, in die Apparatur stellen und Puls auslösen
- sofort nach dem Puls 1 ml SOC-Medium in die Küvette geben, mischen
- Zellen in ein Eppendorfgefäß überführen
- Zellen 1 h bei 37 °C inkubieren, regenerieren lassen
- Zellen auf TBY-Selektionsmedium ausplattieren
- Inkubation ü/N bei 37 °C

3.14.3 Elektroporation von *Cmm*

Herstellung kompetenter *Cmm*-Elektroporationszellen

(Kirchner, 2003)

- 250 ml TBY-Kultur mit *Cmm* animpfen
- Inkubation auf dem Luftschüttler bei 26 °C ü/N bis zu einer $\text{OD}_{580} = 1,0 - 1,2$
- mit TBY auf eine $\text{OD}_{580} = 0,3$ verdünnen
- von dieser Verdünnung 218,5 ml in einem neuen Kolben auf dem Luftschüttler bei 28 °C bis zu einer $\text{OD}_{580} = 0,6$ anziehen (2-2,5 h)
- add. 31,5 ml 20 % Glycin (entspricht Endkonzentration von 2,5 % Glycin)
- Inkubation für 2 h auf dem Luftschüttler bei 26 °C
- alle weiteren Schritte auf Eis durchführen, alle Lösungen vorkühlen

- Zellsuspension in 500 ml-Zentrifugenbecher überführen
- 10 min bei $7000 \times g$ zentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor 6.9, Firma Kontron)
- Überstand komplett entfernen
- Pellet in 5 ml eiskaltem H_2O (Millipore) resuspendieren
- Suspension in 40 ml-Zentrifugenröhrchen überführen
- add. 25 ml eiskaltes H_2O (Millipore), mischen
- 10 min bei $4^\circ C$ mit $8000 \times g$ zentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor 8.24, Firma Kontron)
- Überstand komplett entfernen
- Pellet in 1 ml eiskaltem H_2O (Millipore) resuspendieren, vortexen
- add. 25 ml eiskaltes H_2O (Millipore), vortexen
- 10 min bei $4^\circ C$ mit $8000 \times g$ zentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor 8.24, Firma Kontron)
- Waschvorgang zweimal mit 10 % Glycerin wiederholen
- add. 1 ml 15 % eiskaltes Glycerin, resuspendieren
- Zellen à $100 \mu l$ in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotieren
- kompetente Zellen sofort verwenden oder Lagerung bei $-80^\circ C$

(Bei eingefrorenen Zellen wird die Effektivität auf bis zu 50 % reduziert)

Elektroporation kompetenter *Cmm*-Zellen

(Kirchner, 2003)

Einstellungen des Gene Pulser (Firma BioRAD)

Kapazität	25	μF
Parallelwiderstand	600	Ω
Spannung	12,5	kV/cm (2,5 kV bei 2 mm Küvetten)

- kompetente Zellen auf Eis auftauen, DNA und Küvetten auf Eis stellen

- 400 μl SB-Medium in ein Eppendorfgesäß pipettieren
- 100 μl kompetente Zellen mit 1-5 μl salzfreier DNA vermischen
- Zell-DNA-Suspension in die Küvette geben
- Küvette sorgfältig abtrocknen, in die Apparatur stellen und Puls auslösen
- sofort nach dem Puls 150 μl SB-Medium in die Küvette geben, mischen
- Zellsuspension zu den restlichen 250 μl in das Eppendorfgesäß pipettieren
- Zellen 3 h bei 28 °C regenerieren lassen
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand sofort abgießen, Pellet im Rücklauf resuspendieren
- Zellen auf SB-Selektionsmedium ausplattieren
- Inkubation 3-6 Tage bei 28 °C

3.15 DNA-DNA-Hybridisierung

3.15.1 Markierung der Hybridisierungssonde

(DIG-DNA Labeling-Kit der Firma Roche)

- 5 μl DNA mit H_2O bidest. auf 16 μl auffüllen
- 10 min bei 100 °C inkubieren
- sofort im Eis/Ethanolbad abkühlen lassen

auf Eis dazugeben:

2 μl	Hexanucleotid Mix (10 ×)
2 μl	dNTP Labeling Mixture
1 μl	Klenow-Polymerase

- mindestens 1 h, besser ü/N bei 37 °C inkubieren
- Reaktion durch 20 min Inkubation bei 70 °C stoppen

3.15.2 Überprüfung der Markierungsreaktion (Dot-Blot)

- 1 μl markierte Proben-DNA und 2 μl nicht-markierte Kontroll-DNA (Dig-DNA Labeling Kit) auf eine Nylonmembran auftragen
- bei RT trocknen lassen
- 3 min unter UV-Licht quervernetzen ($\lambda = 302 \text{ nm}$)
- 1 min in DIG-Puffer 1 waschen
- 30 min in DIG-Puffer 2 inkubieren (Schüttler)
- 30 min in DIG-Puffer 2 mit Antikörperkonjugat (1:10000) inkubieren (Schüttler)
- 2 \times 15 min mit DIG-Waschpuffer waschen (Schüttler)
- 2 min mit DIG-Puffer 3 äquilibrieren
- Nylonmembran in 5 ml DIG-Puffer III mit 50 μl NBT/BCIP im Dunkeln färben
- Färbereaktion mit H_2O stoppen

3.15.3 Southern-Hybridisierung

DNA-Transfer auf Nylonmembran (Kapillarblot)

(Smith and Summers, 1980)

- restringierte DNA-Proben durch Agarosegelelektrophorese auftrennen
- DNA mit EtBr-Lösung färben, unter UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) fotografieren
- Gel entfärben
- Agarosegel 5 min in Depurinierungslösung (Blot I) inkubieren, Lösung abgießen
- 2 \times 15 min in Denaturierungslösung (Blot II) inkubieren, Lösung abgießen
- 2 \times 15 min in Neutralisierungslösung (Blot III) inkubieren, Lösung abgießen

Blot-Aufbau:

- restringierte DNA-Proben durch Agarosegelelektrophorese auftrennen, Frapan faltenfrei auf der Unterlage befestigen
- Gel mit der Oberseite nach unten blasenfrei auf das Frapan legen
- Nylonmembran (Porablot NY, Macherey & Nagel) blasenfrei auf das Gel legen

- 5 Lagen mit Blotpuffer III getränktes Whatman-Papier blasenfrei auf die Membran auflegen
- ca. 10 cm dicken Stapel Papierhandtücher auf das Whatman-Papier legen
- Brett/Glasplatte auf den Stapel legen und mit einem Gewicht beschweren
- DNA-Transfer über Nacht bei RT
- DNA auf der Nylonmembran 3 min unter UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) quervernetzen
- Membran zur Hybridisierung einsetzen

Prähybridisierung und Hybridisierung unter stringenten Bedingungen

- Hybridisierungszylinder mit H_2O bidest. füllen
- Membran mit der DNA-Seite nach innen in den Hybridisierungszylinder überführen, H_2O bidest. abgießen
- Zylinder mit vorgewärmter Prähybridisierungslösung (68°C) befüllen
- mindestens 2 h bei 68°C im Hybridisierungsofen inkubieren (Rollervorrichtung)
- Digoxigenin-markierte DNA-Probe (Sonde) zu 7 ml DIG-Prähybridisierungslösung geben und 20 min bei 100°C denaturieren
- Prähybridisierungslösung aus dem Zylinder abgießen und Hybridisierungssonde zugeben
- ü/N bei 68°C im Hybridisierungsofen inkubieren (Rollervorrichtung)

Immunologische Nachweisreaktion unter stringenten Bedingungen

- Hybridisierungssonde abgießen und für eine Wiederverwendung bei -20°C lagern
- Membran 2×5 min mit jeweils 100 ml Waschpuffer I bei RT waschen (Rollervorrichtung), Lösung abgießen
- Membran 2×15 min mit je 100 ml Waschpuffer II bei 68°C waschen (Rollervorrichtung), Lösung abgießen
- Membran in eine Hybridisierungsschale überführen (die folgenden Inkubationsschritte werden auf einem Schüttler durchgeführt)
- 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 20 ml DIG-Puffer 2 und 2 μ l Antikörperkonjugat (1:10000) bei RT inkubieren, Lösung abgießen
- 2 \times 15 min in jeweils 100 ml DIG-Waschpuffer bei RT inkubieren, Lösung abgießen
- Membran für 2 min in 50 ml DIG-Puffer 3 äquilibrieren
- Membran in 20 ml DIG-Puffer III mit 100 μ l NBT/BCIP im Dunkeln färben
- Färbereaktion durch H₂O stoppen
- Membran trocknen und im Dunkeln aufbewahren

3.16 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.16.1 PCR mit Gesamt-DNA als Template

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (8 \times 25 μ l)

20 μ l	10 \times PCR-Reaktionspuffer
20 μ l	10 mM MgCl ₂
20 μ l	dNTPs
10 μ l	Primer 1
10 μ l	Primer 2
15 μ l	DMSO (optional)
1 μ l	Gesamt-DNA*
100 μ l	H ₂ O bidest.
1 μ l	Taq-Polymerase

- jeden Ansatz mit 25 μ l PCR-Öl beschichten, um ein Verdampfen zu vermeiden
- Reaktionsansätze in den RoboCycler Gradient 96 (Firma Stratagene) stellen
- * anstelle von G-DNA können auch ganze Zellen von *Cmm* als Template eingesetzt werden (Abschnitt 3.16.2)

Zyklen	Dauer [min]	Temperatur
1	4	94 °C
35	1 - 1,5	94 °C
	1 - 1,5	Annealingtemperatur
	1 - 2	72 °C
1	10	72 °C

- Lagerung der PCR-Produkte bei -20 °C
- Überprüfung der PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese

3.16.2 Präparation der Zellen für den Einsatz als Template

- etwas Zellmaterial von der Agar-Platte abnehmen und in ein Eppendorfgefäß überführen
- add. 500 μl H₂O bidest., resuspendieren
- 5 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand verwerfen
- Zellen im Rücklauf resuspendieren
- 1 μl für einen 25 μl PCR-Ansatz verwenden

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

3.17 Infektion von *Solanum lycopersicum* durch *Cmm*

3.17.1 Wurzelinfektion

- Aussaat und Anzucht der Tomatenpflanzen in steriler Erde
- Pflanzen im 2-Blatt-Stadium (ca. zwei Wochen nach der Aussaat) entnehmen und anhaftende Erde entfernen
- *Cmm*-Zellen von einer frischen dichtbewachsenen Agar-Platte abnehmen, in sterilem Leitungswasser resuspendieren und eine OD₅₈₀ von 8-9 einstellen
- 1 ml dieser Suspension in ein Eppendorfgefäß füllen
- Pflanzen 15 min in Bakteriensuspension inkubieren (4 Pflanzen pro Eppendorfgefäß)
- Pflanzen in vorbereitete Pflanztöpfe mit steriler Erde einsetzen
- Anzucht der Pflanzen im Pflanzenraum bei 50-60% relativer Luftfeuchtigkeit im Tag-Nacht-Rhythmus bei 25 °C (Tag: 16 h bei 12000 Lux, Nacht: 8 h im Dunkeln)

3.17.2 Reisolierung von *Cmm* aus dem Xylemsaft

- Tomatenpflanzen gut wässern
- Pflanze mit steriler Schere 1 cm oberhalb der Erde abschneiden
- den austretenden Xylemsaft mit einer Pipette abnehmen
- eine Verdünnungsreihe anlegen
- jeweils 100 µl der ausgewählten Verdünnungsstufen ausplattieren
- 3-5 Tage bei 26 °C inkubieren
- Anzahl der *colony forming units* (cfu) und Bakterientiter bestimmen

3.17.3 Reisolierung von *Cmm* aus Pflanzenhomogenat

- Mörser und Pistill mit 70% Ethanol sterilisieren
- Pflanze mit steriler Schere direkt oberhalb der Erde abschneiden, wiegen, in kleinere Stücke zerschneiden und in den Mörser geben
- den Mörser mit flüssigem Stickstoff befüllen, so 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
- eine Verdünnungsreihe anlegen
- jeweils 100 μ l der ausgewählten Verdünnungsstufen ausplattieren
- 3-5 Tage bei 26 °C inkubieren
- Anzahl der *colony forming units* (cfu) und den Bakterientiter bestimmen (gewichtetes Mittel)

3.17.4 Berechnung des Bakterientiters in der Pflanze

Um den Bakterientiter einer Bakteriensuspension zu ermitteln, wird eine Verdünnungsreihe der Suspension angelegt. Von geeigneten Verdünnungsstufen werden je 100 μ l auf den jeweiligen Agar-Platten ausplattiert. Nach Inkubation der Bakterien wird die Koloniezahl bestimmt. Die Ergebnisse der verschiedenen Verdünnungsstufen werden nicht zum arithmetischen Mittel, sondern zu einem gewichteten Mittel zusammengefasst. Verdünnungsreihen sind immer mit Fehlern, die zum größten Teil aus Pipettierungenauigkeiten resultieren und sich von Verdünnungsstufe zu Verdünnungsstufe vervielfachen, behaftet. Am geringsten ist der Fehler also bei der kleinsten Verdünnungsstufe, die sich noch problemlos auszählen lässt. Deshalb wird diese zu 100 %, die folgenden Verdünnungsstufen nur noch zu 10 %, 1 % und 0,1 % gewertet.

3.18 Methoden zur Analyse der Plasmidstabilität

3.18.1 Untersuchung der Plasmidstabilität in Flüssigkultur

- aus einer ü/N-Kultur (C-Medium) in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben 10 ml C-Medium (ohne Antibiotikum) mit einer Start-OD₅₈₀ von 0,15 beimpfen
- Inkubation der Zellen auf dem Luftschüttler (ca. 90 U/min) bei 26 °C bzw. 32 °C
- im Abstand von 2 Tagen Bakterien mit einer Start-OD₅₈₀ von 0,15 in frisches C-Medium überimpfen und weiter inkubieren.
- von den zu überimpfenden Kulturen eine Verdünnungsreihe anlegen
- jeweils 100 μ l der ausgewählten Verdünnungsstufen ausplattieren

- 3-5 Tage bei 26 °C inkubieren
- 100 Kolonien parallel auf C-Medium mit und ohne Antibiotika-Zusatz stochern, um den Anteil plasmidtragender Zellen zu ermitteln

3.18.2 Untersuchung der Plasmidstabilität *in planta*

- Pflanzen, wie in Abschnitt 3.17.1 beschrieben, mit dem zu testenden *Cmm*-Stamm, der ein Antibiotika-markiertes Plasmid trägt, infizieren
- Pflanzen bei 26 °C bzw. 32 °C kultivieren
- im Abstand von 7 Tagen *Cmm* aus einer oder mehreren Pflanzen reisolieren (3.17.3)
- eine Verdünnungsreihe anlegen
- jeweils 100 µl der ausgewählten Verdünnungsstufen ausplattieren
- 3-5 Tage bei 26 °C inkubieren
- 100 Kolonien parallel auf C-Medium mit und ohne Antibiotika-Zusatz stochern, um den Anteil plasmidtragender Zellen zu ermitteln

3.19 Methoden zur Analyse des Plasmidtransfers

3.19.1 Konjugation *in planta*

- Pflanzen, wie in 3.17.1 beschrieben, mit einem Gemisch aus Donor- und Rezipientenzellen infizieren und kultivieren
- nach 10 bis 14 Tagen Xylemsaft der Pflanzen entnehmen (3.17.2)
- 2 µl Xylemsaft jeder Pflanze auf die verschiedenen Selektionsmedien auftropfen, um die Anzahl an Pflanzen mit Donor- Rezipienten- und Transkonjugantenzellen zu bestimmen

3.19.2 Filterkreuzungsmethode

- separate Anzucht einer ü/N-Flüssigkultur von Donor und Rezipient in TBY
- mit TBY auf eine OD₅₈₀ von 0,2 bis 0,5 verdünnen
- Inkubation auf dem Luftschüttler (90 U/min) bei 26 °C bis zu einer OD₅₈₀ von 1-2

- Zellsuspension so mit TBY verdünnen oder ankonzentrieren, dass sie eine theoretische OD_{580} von 1,5 hat
- Donor und Rezipient im gewünschten Verhältnis (meistens 1:1) mischen
- Nitrocellulosefilter (Porengröße: $0,45\ \mu\text{m}$, Durchmesser: 25 mm, Firma Sartorius) auf C-Medium-Agar-Platten legen
- $200\ \mu\text{l}$ des Donor-Rezipient-Gemischs auf den Filter auftragen, trocknen lassen
- Inkubation bei $26\ ^\circ\text{C}$ für 12 Stunden
- Zellen abschwemmen, dazu den Filter mit den Zellen nach innen in ein Eppendorfgefäß geben, 1 - 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
- 3-5 Tage bei $26\ ^\circ\text{C}$ inkubieren
- Anzahl der *colony forming units* (cfu) von Donor, Rezipient und Transkonjugant bestimmen
- Transferhäufigkeit (Transkonjuganten pro reisoliertem Rezipienten) berechnen

3.20 Datenbanken und Software-Pakete

Aminosäuresequenzen wurden mit den Programmen BlastP und PSI-Blast mit bereits gespeicherten Sequenzen der NCBI Datenbank verglichen (Altschul et al., 1997).

Die Suche nach konservierten Proteindomänen erfolgte in der Conserved Domain Database von NCBI (Marchler-Bauer et al., 2005).

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Protein-Alignments wurden mit dem Programm ClustalX erstellt (Thompson et al., 1997).

Die Darstellung erfolgte mittels GeneDoc (Nicholas et al., 1997).

Plasmidkarten und Genregionen des *Cmm*-Chromosoms wurden mit dem Programm Clone-Manager 5.0 erstellt (Scientific and Educational Software).

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Stabilität der *Cmm*-Plasmide

Plasmide können für ihren Wirt eine metabolische Belastung darstellen, da sie zelluläre Ressourcen für ihre Replikation, Transkription und Translation benötigen. Häufig vermitteln Plasmide aber auch Fähigkeiten (z. B. Antibiotikaresistenzen), die dem Wirt unter bestimmten Umweltbedingungen einen selektiven Vorteil verschaffen können. Die Belastung, die ein Plasmid für den Wirt darstellt, kann also mit der Veränderung von Umweltbedingungen (z. B. Wachstumsphase, Nährmedium und Kultivierungstemperatur) variieren. Um ihre Stabilität in einer Population sicherzustellen, können Plasmide verschiedene Mechanismen besitzen. Durch das *multimer resolution system* werden multimerische Plasmide, wie sie nach Replikation oder Rekombination entstanden sein können, in ihre monomere Form überführt, so dass eine Verteilung auf die Tochterzellen durch aktives *partitioning* ermöglicht wird. Dabei werden die Plasmide nach der Replikation und vor der Zellteilung in der Zellmitte gepaart und dann getrennt zu den Zellpolen bewegt. In allen bekannten Systemen codiert das stromaufwärts gelegene Gen (*parA*) eine für die korrekte Verteilung der Plasmide essentielle ATPase. Das stromabwärts liegende *parB*-Gen codiert für ein Protein, das an die Centromer-ähnliche Struktur bindet (Gerdes et al., 2000). Das *post segregational killing*-System verhindert durch das Abtöten plasmidfreier Zellen ihre Vermehrung innerhalb einer Population. Dieses System basiert auf zwei plasmidcodierten Faktoren: Ein stabiles spezifisches Toxin und ein weniger stabiler Faktor (Antidot), der die letale Wirkung des Toxins aufhebt (Gerdes et al., 1997). Trotz der Anwesenheit dieser Mechanismen ist der Verlust von Plasmiden, wenn auch relativ selten, immer wieder zu beobachten (Summers, 1991; De Gelder et al., 2007).

In dieser Arbeit wurde die Stabilität der beiden *Cmm*-Plasmide pCM1 (27,4 kb) und pCM2 (70 kb) untersucht. Es ist davon auszugehen, dass beide Plasmide ein *partitioning*-System besitzen. Durch Homologievergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz konnte auf pCM1 ein hypothetisches Operon bestehend aus den Genen *parA* (pCM1_0003) und

parB (pCM1_0004) identifiziert werden. ParA von pCM1 ist zu 43 % identisch zum hypothetischen ParA-Protein von *Arthrobacter* sp. Chr15 (Acc.-Nr.: ABR67050). Für das hypothetische ParB-Protein von pCM1 konnten keine eindeutigen Homolgien festgestellt werden. Auch auf pCM2 konnte ein hypothetisches *parA*-Gen (pCM2_0033) identifiziert werden. Auf Grund seiner Lage könnte der folgende *orf*, trotz fehlender Homologie zu bereits charakterisierten ParB-Proteinen, die Funktion von ParB haben. Das hypothetische ParA-Protein von pCM2 ist zu 30 % identisch zu hypothetischen ParA von *Rhodococcus erythropolis* (Acc.-Nr.: AAC45808). Ein plasmidcodiertes *post segregational killing*-System wurde auf den *Cmm*-Plasmiden bisher noch nicht entdeckt. Allerdings sind Toxin und Antidot auf Grund ihrer häufig sehr geringen Größe schwer zu identifizieren.

Es wird gelegentlich beobachtet, dass das Plasmid pCM2, das eine Kopiezahl von etwa 1 hat, bei längerer Kultivierung von *Cmm* auf Agarplatten und besonders bei der Elektroporation von *Cmm*-Zellen verloren gehen kann. Das Plasmid pCM1 scheint wesentlich stabiler als pCM2 in der Zelle vorzuliegen, da ein spontaner Verlust von pCM1 bisher nicht beobachtet wurde. Vielleicht liegt dies an der relativ hohen Kopiezahl mit der pCM1 in den *Cmm*-Zellen vorliegt. Nach der Genomabdeckung aus dem Sequenzierungsprojekt konnte für pCM1 eine Kopiezahl von etwa 5 abgeschätzt werden. Lediglich bei der Konstruktion des plasmidfreien Stamms CMM100 konnte pCM1 durch die Erhöhung der Anzuchttemperatur erfolgreich aus den *Cmm*-Zellen entfernt werden.

Die Analyse von Plasmidsegregation und Plasmidtransfer setzt voraus, dass *Cmm*-Stämme zur Verfügung stehen, deren Plasmide markiert sind, so dass der Verlust bzw. der Transfer der Plasmide auf selektiven Medien leicht zu detektieren ist. Diese, wie im folgenden Abschnitt beschriebenen, markierten Plasmide lagen bereits zu Beginn meiner Arbeit vor und konnten in Experimenten zur Untersuchung der Segregation eingesetzt werden.

4.1.1 Beschreibung der markierten pCM1- und pCM2-Derivate

Für die Analysen zum Transfer von pCM1 wurde ein Stamm, dessen pCM1 über *gene-replacement* mit einer Gentamicinresistenzgen-Kassette (*aacC1* aus Tn1696) (Wohlleben et al., 1989) markiert ist verwendet. Durch die Insertion der Resistenzgen-Kassette in den 5'-Bereich des *celA*-Gens (Beginn der katalytischen Domäne) gehen die welkeinduzierenden Eigenschaften des Plasmids pCM1 verloren (Jahr et al., 2000). Die potentielle Transferregion und die hypothetischen *partitioning*-Gene von pCM1_{Gm} werden durch die Insertion der Resistenzgen-Kassette aber nicht beeinflusst. In dieser Arbeit wurde der beschriebene Stamm als CMM101_{Gm} bezeichnet, da er nur das markierte pCM1 besitzt.

Für die Markierung von pCM2 wurde über Insertionsmutagenese eine Neomycinresistenzgen-Kassette (*aphII* aus Tn5) (Beck et al., 1982) in das subklonierte (pUC-Derivat) *pat-1* tragende *Bgl*II-Fragment (3762 bp) von pCM2 eingebracht. In dem so konstruierten Mutageneseplasmid pHJ21 erfolgte die Insertion der Neomycinresistenzgen-Kassette über eine *Eco*47III-Schnittstelle, die sich ca. 1,8 kb stromabwärts des *pat-1*-Gens in einer vermutlich nicht codierenden Genregion befindet (Jahr et al., 2000). Über Hybridisierung konnte eine erfolgreiche Insertion nachgewiesen werden, jedoch liegt ein Kointegrat (Abb. 4.1) von pCM2 und dem Mutageneseplasmid pHJ21 vor (Burger, unveröffentlicht). Dieses erwies sich allerdings als stabil, so dass der resultierende Stamm in Segregations- und Kreuzungsexperimenten verwendet werden konnte. Er zeigte die gleichen phytopathogenen Eigenschaften wie der unmarkierte Stamm und wurde, da er das markierte pCM2 und kein pCM1 besitzt, als CMM102_{Nm} bezeichnet.

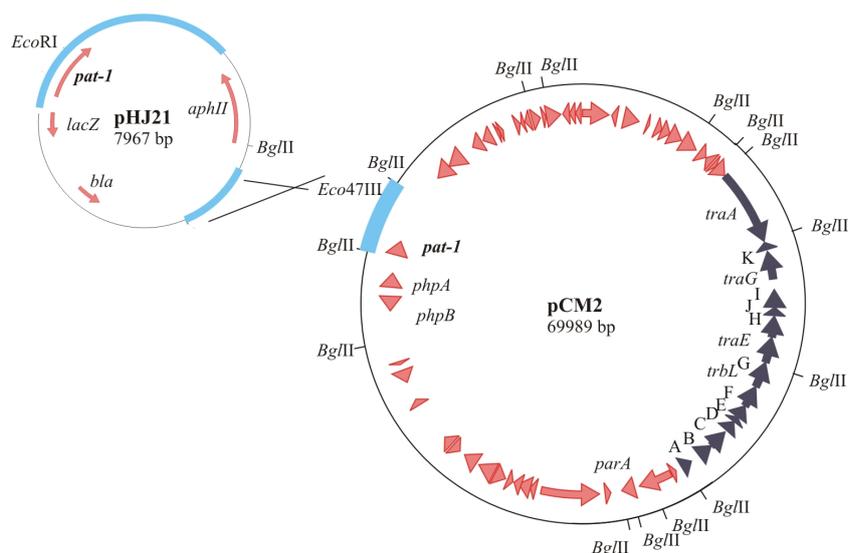


Abbildung 4.1: Kointegrat aus pCM2 und pHJ21; entstanden durch Rekombination in der Region 55192-58954 nt (Jahr et al., 2000). Hellblau: 3,75 kb *Bgl*II-Fragment von pCM2 (homologer Bereich), dunkelblau: hypothetische Transferregion von pCM2. *pat-1*: hyp. Serinprotease (Pathogenitätsdeterminante); *phpA/B*: hyp. Serinproteasen (plasmidal homology of *pat-1*); *parA*: hyp. ATPase (*partitioning*-Protein); *aphII*: Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gen (Neomycinresistenzgen) *bla*: β -Lactamase-Gen; *lacZ*: α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation.

4.1.2 Analyse des Wachstums von *Cmm*

Für die Planung und Ausführung der Experimente zum Plasmidtransfer und zur Plasmidstabilität, war es zunächst wichtig, das Wachstumsverhalten von *Cmm* zu untersuchen. Dazu wurde das Wachstum von *Cmm*-Kulturen über einen Zeitraum von 26 Stunden durch die Bestimmung der OD₅₈₀ protokolliert. Von einer stationären ü/N-Kultur wurde in frisches C-Medium (Vollmedium + Glucose (5 g/l)) überimpft, so dass die Start-OD₅₈₀ bei 0,15 (etwa $7,5 \times 10^7$ Bakterien/ml) lag. Um zu untersuchen, ob die Erhöhung der für *Cmm* standardisierten Anzuchttemperatur von 26 °C auf 32 °C das Wachstumsverhalten beeinflusst, erfolgte die Inkubation der Kulturen bei 26 °C bzw. 32 °C. Abbildung 4.2 zeigt die semi-logarithmische Darstellung der aufgenommenen Wachstumskurven. Eine lag-Phase ist nicht zu erkennen. Nach ca. 11 Stunden ist die exponentielle Wachstumsphase beendet und die Bakterien befinden sich in der stationären Phase.

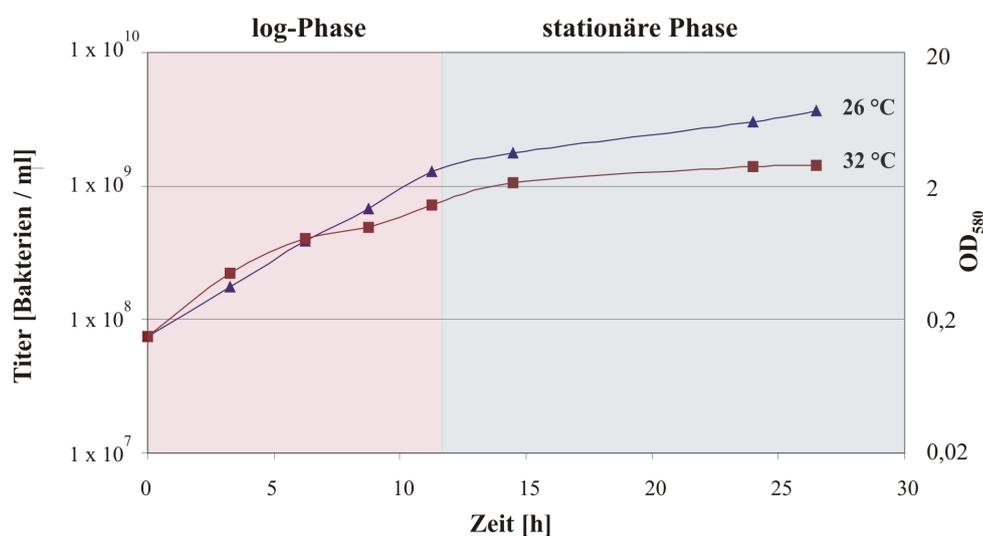


Abbildung 4.2: Wachstumskurve von *Cmm*: Semilogarithmische Darstellung der Wachstumskurven von *Cmm* bei 26 °C und 32 °C Anzuchttemperatur. Tabelle der Rohdaten befindet sich im Anhang (Tab. 6.1, S. 167).

Die bei 26 °C inkubierten Kulturen erreichen einen Endtiter von $3,6 \times 10^9$, der von den bei 32 °C inkubierten Kulturen erreichte Endtiter liegt dagegen nur bei $1,4 \times 10^9$ Bakterien/ml. Das bedeutet, dass sich die bei 26 °C inkubierten Zellen bis zum Erreichen der stationären Phase ungefähr sechsmal teilen, während die bei 32 °C inkubierten Zellen bereits nach 4-5 Teilungen stationär werden. Ein Anzuchtzyklus entspricht also bei 26 °C ca. 6 Generationen und bei 32 °C nur ca. 4-5 Generationen. Aus dem in der semilogarithmi-

schen Darstellung linearen Anstieg des Titers lässt sich die Generationszeit der Kulturen errechnen. Bei 26 °C Kultivierungstemperatur beträgt die Generationszeit von *Cmm* ca. 2,8 Stunden. Durch die Erhöhung der Anzuchttemperatur auf 32 °C verlängert sich die Generationszeit und liegt dann bei ca. 3,6 Stunden.

4.1.3 Analyse der Stabilität und Segregation von pCM2

Da bisher im experimentellen Umgang mit *Cmm* lediglich der Verlust von pCM2 zu beobachten war und pCM1 sich auch in Curing-Experimenten als sehr stabil herausgestellt hatte, wurde im Rahmen dieser Arbeit nur die Stabilität von pCM2 untersucht. Von Interesse war, ob die Erhöhung der für *Cmm* im Labor standardisierten Kultivierungstemperatur von 26 °C auf 32 °C Auswirkungen auf die Stabilität von pCM2 hat. Dazu wurde der Stamm CMM102_{Nm}, dessen pCM2 durch eine Neomycinresistenzgen-Kassette (*aphII*) markiert ist, unter Selektionsdruck auf Festmedium angezogen, so dass gewährleistet war, dass jede Zelle das Plasmid enthielt. Um das Segregationsexperiment mit einer definierten Zellmenge starten zu können, wurde zunächst über Nacht eine Vorkultur in C-Medium (Vollmedium + Glucose (5 g/l)) unter unselektiven Bedingungen angezogen. Von dieser stationären ü/N-Kultur wurde in frisches C-Medium ohne Antibiotikum überimpft, so dass die Start-OD₅₈₀ bei 0,15 (etwa 7,5 x 10⁷ Bakterien / ml) lag. Die Kulturen wurden auf dem Luftschüttler (ca. 90 Umdrehungen / min) bei 26 °C bzw. 32 °C inkubiert. Nach 2 oder 3 Tagen wurden die Bakterien mit einer Start-OD₅₈₀ von 0,15 in frisches C-Medium überimpft und weiter inkubiert. Dies wurde 14-mal (14 Anzuchtzyklen) wiederholt. Von den zu überimpfenden Kulturen wurden Verdünnungen ausplattiert, so dass nach Inkubation bei 26 °C jeweils 100 einzelne Kolonien parallel auf Agarplatten mit und ohne Antibiotikum gestochert werden konnten. Da das Plasmid die Antibiotikumresistenz verleiht, konnte so der Anteil plasmidtragender Zellen an der Gesamtpopulation ermittelt werden.

Abbildung 4.3 zeigt die Kinetik der Segregation des Neomycin-markierten pCM2_{Nm} im Stamm CMM102_{Nm} in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur (26 °C und 32 °C). Es ist deutlich zu erkennen, dass bis zum 10. Tag, also nach 5 Anzuchtzyklen, pCM2 stabil in den Zellen vorliegt. Dies ist sowohl unter der für die Anzucht von *Cmm* standardisierten Temperatur von 26 °C als auch bei Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf 32 °C der Fall. Erst nach 10 Tagen nimmt der Anteil pCM2_{Nm}-tragender Zellen in der Kultur, die bei 32 °C inkubiert wurde, kontinuierlich ab. Nach 32 Tagen liegt der Anteil pCM2-tragender Zellen nur noch bei 13 %. Währenddessen nimmt der Anteil plasmidhaltiger Zellen in der bei 26 °C inkubierten Kultur nur sehr langsam ab und ist mit 87 bis 98 % nach 32 Tagen

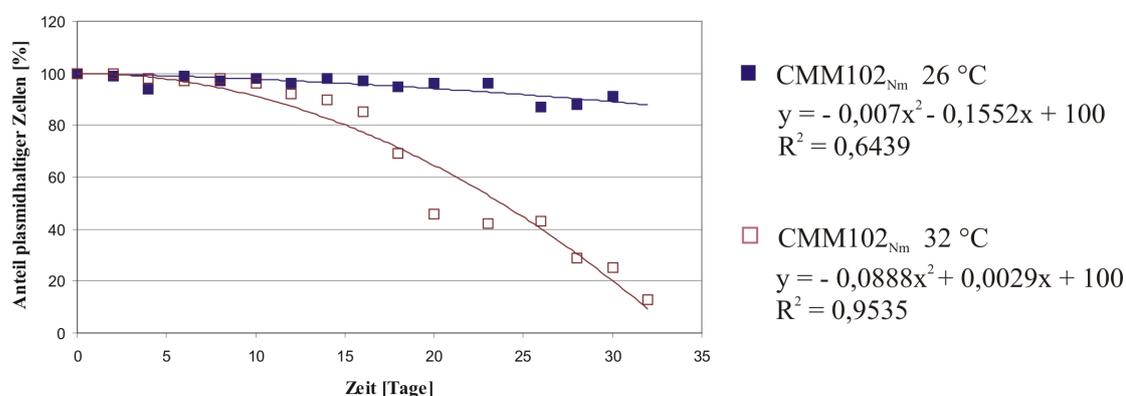


Abbildung 4.3: Kinetik der Segregation von pCM2_{Nm} bei unselektiver Anzucht in Flüssigkultur: Anteil plasmidhaltiger Zellen im Verlauf von 14 Anzuchtzyklen unter den Kultivierungstemperaturen von 26 °C (ca. 84 Generationen) bzw. 32 °C (ca. 63 Generationen). Funktionsgleichung der Regression und Bestimmtheitsmaß R^2 .

noch relativ hoch.

Wie im vorherigen Abschnitt 4.1.2 beschrieben, beeinflusst die Kultivierungstemperatur das Wachstum der Zellen. Das bedeutet, dass sich die bei 26 °C inkubierten Zellen innerhalb eines Anzuchtzyklus ungefähr sechsmal teilen und die bei 32 °C inkubierten Zellen nur vier- bis fünfmal, bis sie in die stationäre Phase eintreten. Dabei macht es keinen Unterschied, ob der Anzuchtzyklus 2 oder 3 Tage dauert, da die Zellen bei einer für *Cmm* unter diesen Bedingungen charakteristischen Generationszeit von ca. 3 Stunden bereits nach 18 Stunden die stationäre Wachstumsphase erreichen. Die 14 im Experiment durchgeführten Anzuchtzyklen umfassen bei 26 °C Anzuchttemperatur also ca. 84 Generationen und bei 32 °C Anzuchttemperatur ca. 63 Generationen.

Da die Datenpunkte (Abb. 4.3) einen nicht linearen Funktionsverlauf vermuten lassen, wird eine Regression 2. Ordnung angenommen. Die Gleichungen für die Regression und die zugehörigen Bestimmtheitsmaße sind in Abbildung 4.3 dargestellt. Unter der Annahme, dass sich der Verlust von pCM2 auch unter einer Anzuchttemperatur von 26 °C kontinuierlich fortsetzt und sein Verlauf der unterstellten Regressionsgleichung folgt, kann als Zeitpunkt des totalen Plasmidverlustes in der Kultur der 109. Tag berechnet werden. In der bei 32 °C inkubierten Kultur wird bereits nach 34 Tagen der totale Plasmidverlust erwartet. Auch hier wird vorausgesetzt, dass der Verlust der angenommenen Regressionsgleichung folgt.

Für den Funktionsverlauf der Daten, die bei der Anzuchttemperatur von 26 °C ermittelt worden sind, könnte auch eine andere Vorhersage getroffen werden. Denn neben dem oben angenommenen Regressionsverlauf 2. Ordnung könnte hier auch ein linearer Funktionsverlauf ($y = -0,317x + 100$, $R^2 = 0,6036$) vermutet werden. Ein linearer Verlauf würde als Zeitpunkt des totalen Plasmidverlustes den 315. Tag vorhersagen. Eine eindeutige Prognose für den Zeitpunkt des Plasmidverlustes zu machen, ist also in diesem Fall nicht möglich, da abhängig vom angewandten Modell (lineare Regression oder nicht lineare Regression 2. Ordnung) sehr unterschiedliche Zeitpunkte (109. und 315. Tag) vorhergesagt werden. Abschließend kann aber festgehalten werden, dass der Verlust von pCM2 bei erhöhter Kultivierungstemperatur wesentlich schneller erfolgt als bei 26 °C. Die Erhöhung der Kultivierungstemperatur scheint sich somit über einen längeren Zeitraum destabilisierend auf pCM2 auszuwirken.

4.2 Untersuchung des Transfers von pCM1 und pCM2

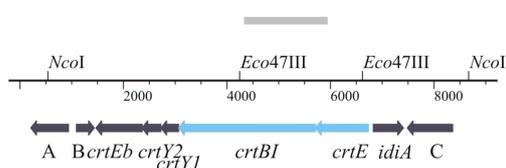
Da die Plasmide pCM1 und pCM2 von *Cmm* die beiden essentiellen Pathogenitätsdeterminanten *celA* und *pat-1* tragen, würde die Segregation der Plasmide zum Verlust oder zur Verringerung der Virulenz des Phytopathogens führen. Zumindest für pCM2 konnte, wie in Abschnitt 4.1.3 beschrieben, bei unselektiver Anzucht in Flüssigkultur bei einer Kultivierungstemperatur von 32 °C eine erhebliche Instabilität festgestellt werden. Temperaturen von 32 °C und auch deutlich höher werden in den Tomatenanbaugebieten häufig erreicht, so dass es durch den Verlust von pCM2 zu einer verringerten Virulenz von *Cmm* kommen könnte. Auch die charakterisierten Freilandisolate aus Israel haben sehr unterschiedliche Plasmidprofile. Die meisten analysierten Stämme haben nur ein Plasmid und nur wenige haben zwei. Da bereits gezeigt werden konnte, dass pCM1 und pCM2 konjugativ sind (Pieper, 2001; Kosthorst, 2004) wäre es jedoch möglich, dass plasmidfreie Derivate die Plasmide durch Konjugation wieder aufnehmen und somit die Pathogenität von *Cmm* sicherstellen. Ein Ziel dieser Arbeit war, den Transfer von pCM1 und pCM2 *in planta* aber auch in Filterkreuzungsexperimenten quantitativ zu untersuchen und die Transferbedingungen der Plasmide zu analysieren. Für die Untersuchungen zum Plasmidtransfer konnten die bereits in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Stämme mit den markierten Plasmiden pCM1_{Gm} und pCM2_{Nm} als Donorstämme verwendet werden. Um eine einfache Identifizierung der Transkonjuganten in den Kreuzungsexperimenten zu ermöglichen, wurde eine weiße Farbmutante von *Cmm* hergestellt, die in den Konjugationsexperimenten als Rezipient eingesetzt werden konnte.

4.2.1 Beschreibung einer pigmentfreien Mutante von *Cmm*

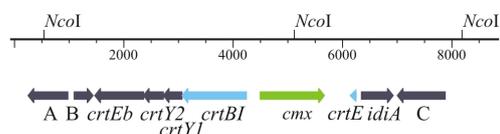
Im Rahmen von Transposonmutagenese-Experimenten wurde eine *Cmm*-Mutante identifiziert, die den für *Cmm* typischen gelben Farbstoff, ein Carotin, nicht mehr synthetisieren kann und dadurch weiß ist (Kirchner, 2003). Klonierung und Sequenzierung des Insertionslocus des Transposons führten zur Identifizierung des Carotinoidbiosynthese-Genclusters. Um einen genau definierten Rezipientenstamm in Kreuzungsexperimenten einsetzen zu können, wurde im plasmidfreien Stamm CMM100 gezielt das Gen *crtBI* (CMM_2887) durch Insertion des Chloramphenicolexportergens (*cmx*) aus *Corynebacterium striatum* (Tauch et al., 1998) inaktiviert. *CrtBI* codiert für eine Phytoen-Synthase / Dehydrogenase, die das Absorptionsverhalten des farblosen Phytoens durch Einfügen konjugierter Doppelbindungen so verändert, dass es gelb gefärbt ist.

Für die Konstruktion dieser carotinoidfreien Mutante wurde basierend auf dem Plasmid pUC13::113-35 α ein Mutageneseplasmid hergestellt. Das Plasmid pUC13::113-35 α enthält einen großen Teil des Carotinoidbiosynthese-Genclusters (Abb. 6.2, S. 158). Zur Herstellung eines Mutageneseplasmids für die Inaktivierung der Carotinoidbiosynthese wurde das interne 2369 bp große *Eco47III*-Fragment des Plasmids pUC13::113-35 α deletiert und durch ein 1,9 kb großes Fragment, welches das Chloramphenicolexportergen (*cmx*) enthält, ersetzt. Das so konstruierte Mutageneseplasmid pUC13::113-35 $\text{cmx}\beta$ (Abb. 6.2, S. 158) wurde durch Elektroporation in den plasmidfreien Stamm CMM100 transferiert. Es entstanden chloramphenicolresistente, weiße Klone, die durch Hybridisierung gegen eine pUC-Sonde, eine genspezifische Sonde (1599 bp großes *SmaI*-Fragment von pUC13::113-35 α) und gegen das *cmx*-Gen als Sonde weiter analysiert wurden. Dazu wurde zunächst mittels Hybridisierung gegen die pUC-DNA sichergestellt, dass die Farblosigkeit und die Chloramphenicol-Resistenz auf einen korrekten Genaustausch durch ein doppeltes Rekombinationsereignis und nicht auf eine Kointegratbildung durch Integration des Mutageneseplasmids in das Chromosom zurückzuführen ist. Die Gesamt-DNA der Klone, die keinen integrierten Vektor zeigten, wurden mit der Restriktionsendonuklease *NcoI* hydrolysiert und gegen die Zielgen-Sonde und die *cmx*-Sonde hybridisiert. Da sich in der *cmx*-Kassette eine *NcoI*-Schnittstelle befindet, ist bei der Hybridisierung gegen die Zielgen-Sonde im Wildtyp ein 8,1 kb großes *NcoI*-Fragment und in der Mutante ein mit 4,6 kb kleineres hybridisierendes *NcoI*-Fragment zu erwarten. Wie in Abbildung 4.4 zu sehen ist, stimmen die errechneten Größen der hybridisierenden Fragmente mit den tatsächlich entstandenen überein. Auch die Hybridisierung gegen das *cmx*-Gen als Sonde zeigte das erwartete Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

Damit liegt ein definierter, plasmidfreier, weißer, chloramphenicolresistenter Rezipientenstamm (CMM100white $_{Cm}$) vor, der durch seine Pigmentveränderung / Farbe unselektiv und durch die Antibiotikumresistenz selektiv markiert ist. In den folgenden Kapiteln wird dieser Stamm als „weiß“ bezeichnet.

Wildtyp *Cmm**crtBI*-Sondehybridisierendes
NcoI-Fragment

8125 bp

weiße Mutante*crtBI*-Sondehybridisierendes
NcoI-Fragment

4580 bp

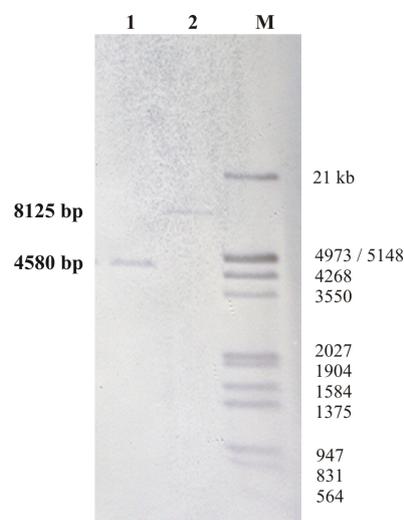


Abbildung 4.4: Konstruktion einer pigmentfreien Mutante von *Cmm*. Physikalische Karte und Southern-Hybridisierung *NcoI*-gespaltener G-DNA der Carotinoid-Mutante und des Wildtyps gegen die *crtBI*-Sonde. 1: weiße Mutante, 2: Wildtyp, M: λ -Marker *EcoRI/HindIII* gespalten. Die anderen Gene des Carotinoidbiosynthese-Clusters und ihre hypothetische Funktion: *crtEb*: Lycopanelongase, *crtY1* und *crtY2*: C50-Carotinoid- ϵ -Cyclase, *crtE*: Geranylpyrophosphat-Synthase, *idiA*: Isopentenyl-Diphosphat- δ -Isomerase, *orfA* - C: hypothetische Proteine.

4.2.2 Konjugation *in planta*

In Rahmen zweier am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie angefertigter Diplomarbeiten, konnte bereits gezeigt werden, dass die Plasmide pCM1 und pCM2 von *Cmm in planta* auf einen plasmidfreien Rezipienten transferiert werden können (Pieper, 2001; Kosthorst, 2004). Da im Xylem von infizierten Tomatenpflanzen ein Titer von bis zu 10^9 Bakterien pro g Frischgewicht erreicht werden kann, ist der für den Plasmidtransfer notwendige Zellkontakt zwischen Donor und Rezipient *in planta* wahrscheinlich gewährleistet. Auch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Abb. 2.2, S. 4) zeigen, wie dicht *Cmm* das Xylem besiedelt, so dass Kontakt zwischen Donor- und Rezipientenzellen möglich ist.

In den ersten Kreuzungsexperimenten *in planta* wurde der Stamm CMM102_{Nm}, dessen pCM2 durch eine Neomycinresistenzgen-Kassette markiert ist, als Donor und die plasmidfreie, weiße Farbmutante als Rezipient eingesetzt. Zwei Wochen alte Tomatenpflanzen

Test	Anzahl an Pflanzen					
	Pflanzen gesamt	Pflanzen infiziert	Donor	Rezipient	Donor + Rezipient	Transkonjugant
1	32	25	25	22	22	21 (95,5 %)
2	20	11	10	9	9	9 (100 %)
3	15	11	11	11	11	9 (81,8 %)
gesamt	67	47	46	42	42	39 (92,9 %)

Tabelle 4.1: Transfer von pCM2 *in planta*. Anzahl an Pflanzen, aus denen Donor-Rezipienten- bzw. Transkonjugantenzellen isoliert werden konnten. Der prozentuale Anteil Transkonjuganten tragender Pflanzen bezieht sich auf die Pflanzen, aus denen sowohl Donor als auch Rezipient isoliert werden konnten. Nachweisgrenze: 500 Transkonjuganten / 1 ml Xylemsaft.

wurden mit einem Gemisch (1:1) aus Donor- und Rezipientenzellen (10^9 Bakterien/ml) infiziert. Nach ca. zwei Wochen konnte durch Auftropfen des Xylemsafts dieser Pflanzen auf entsprechende Selektionsmedien der Anteil an Pflanzen bestimmt werden, in denen Transkonjuganten entstanden waren. Da die Neomycin-Resistenz durch das Plasmid codiert wird, sind nur die Transkonjuganten und spontanresistente Zellen befähigt auf den Agarplatten mit Neomycin und Chloramphenicol zu wachsen. Es wurden $2\ \mu\text{l}$ Xylemsaft aufgetropft, also lag die Nachweisgrenze bei 500 Transkonjuganten pro 1 ml Xylemsaft. Tabelle 4.1 zeigt die Anzahl an Pflanzen, aus denen Donor-, Rezipienten- und Transkonjugantenzellen isoliert werden konnten. Es sind drei unabhängige Kreuzungsexperimente mit dem Stamm CMM102_{Nm} als Donor und dem weißen Stamm als Rezipient dargestellt. Die Daten zeigen, dass aus 80 % bis 100 % der tatsächlich mit Donor und Rezipient infizierten Pflanzen Transkonjuganten isoliert werden konnten. Der Transfer von pCM2 scheint *in planta* also ein relativ häufiges Ereignis zu sein.

Im Vergleich dazu scheint der Transfer von pCM1, dem mit 27,4kb kleineren der beiden Plasmide von *Cmm*, weniger häufig aufzutreten. Bei Doppelinfektionen von Tomatenpflanzen mit dem Stamm CMM101_{Gm}, dessen pCM1 durch eine Gentamicinresistenzgen-Kassette markiert ist, als Donor und dem weißen Rezipient, konnten nur aus 33,3% der Pflanzen Transkonjuganten isoliert werden.

Aus diesem Grund wurden alle Experimente zur Etablierung der Filterkreuzungsmethode für *Cmm* mit dem Neomycin-markierten pCM2_{Nm} aus dem Stamm CMM102_{Nm} durchgeführt. Als Rezipient wurde der weiße, plasmidfreie Stamm CMM100white_{Cm} eingesetzt.

4.2.3 Entwicklung einer Filterkreuzungs-Methode für *Cmm*

Ein Ziel dieser Arbeit war, zu testen, ob und unter welchen Bedingungen bei *Cmm* Plasmidtransfer auf festen Kulturmedien stattfindet. Die Entwicklung einer Kreuzungsmethode auf Festmedium (*filter mating*) wäre sehr vorteilhaft, da diese Methode im Gegensatz zu Konjugationsexperimenten in der Pflanze standardisiert und in größerem Umfang durchgeführt werden könnte.

Etablierung eines geeigneten Festmediums für *filter matings*

Für die ersten *filter mating*-Experimente wurden Donor (CMM102_{Nm}) und der weiße Rezipient (CMM100white_{Cm}) in TBY-Flüssigmedium ohne Selektionsdruck bis zu einer OD₅₈₀ von 1-2 (ca. $0,5-1 \cdot 10^9$ Bakterien / ml) bei einer Kultivierungstemperatur von 26 °C angezogen. Auf die Zugabe von Antibiotika wurde verzichtet, da sich pCM2 über kurze Anzuchtperioden als stabil erwiesen hat. Die Stämme wurden in verschiedenen Verhältnissen (1:1, 1:3 und 3:1) gemischt und für eine Stunde bei 26 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Nitrocellulose-Filter gebracht (Porengröße: 0,45 µm, Durchmesser: 25 mm, Firma Sartorius), die auf Vollmediumplatten (TBY-Platten) auflagen. Da eine *Cmm*-Zelle eine Fläche von ca. 0,5 µm² bedeckt, ist bei einer eingesetzten Zellsuspension (200 µl) mit einer absoluten Zellmenge von ca. $1,5 \cdot 10^8$ Zellen davon auszugehen, dass Donor und Rezipient auf dem Filter (benetzte Fläche ca. 3 cm²) spätestens nach ein bis zwei Teilungen den für den Plasmidtransfer nötigen Zellkontakt haben. Nach verschiedenen Inkubationszeiten (1-4 Tage) wurden die Filter abgeschwemmt und die gewonnene Zellsuspension nach geeigneter Verdünnung auf Medium mit Neomycin und Chloramphenicol ausplattiert. Nur wenn eine weiße chloramphenicolresistente Rezipientenzelle das pCM2_{Nm} erhalten hat, ist sie in der Lage auf dem Selektionsmedium mit den beiden Antibiotika zu wachsen. Jedoch konnten keine Transkonjuganten aus diesen Kreuzungsexperimenten isoliert werden.

Da Konjugation zwischen Bakterien, die sich im Xylem von Tomatenpflanzen befinden, sehr häufig auftritt (Tab. 4.1), wurde den Vollmedium-Platten, auf die die Filter gelegt werden sollten, bis zu 20 % sterilfiltrierter Xylemsaft zugegeben. Aber auch bei Kreuzungsexperimenten (Mischungsverhältnis: 1:1) auf diesem Medium konnte kein Plasmidtransfer beobachtet werden. Erst der Austausch der Vollmediumplatten gegen Agarplatten, die zu 30 % aus homogenisierten Tomatenpflanzen bestanden, zeigte Erfolg. Auch auf Agarplatten, die zu 30 % aus homogenisierten Kartoffeln oder Tomaten (Frucht) bestanden, konnte Plasmidtransfer nachgewiesen werden. Tabelle 4.2 zeigt die Anzahl (Bakterien / Filter) von Donor, Rezipient und Transkonjugant aus Kreuzungsexperimenten auf Medien mit den je-

Homogenat-Zusatz	Bakterien pro Filter		
	Donor	Rezipient	Transkonjugant
Tomate (Pflanze)	$5,69 \times 10^9$	$4,59 \times 10^9$	$9,91 \times 10^5$
Tomate (Frucht)	$3,14 \times 10^9$	$2,36 \times 10^9$	$1,96 \times 10^6$
Kartoffel (Knolle)	$6,91 \times 10^9$	$2,68 \times 10^9$	$1,58 \times 10^6$

Tabelle 4.2: Transfer von pCM2 bei zugesetzten Homogenaten im Medium. Titer von Donor, Rezipient und Transkonjugant aus Kreuzungsexperimenten (Donor und Rezipient im Verhältnis 1:1) auf Medien, die zu 30 % aus Tomatenpflanzen, Tomaten oder Kartoffeln bestanden.

weiligen Zusätzen. Die Bakterien wurden 5 Tage bei 26 °C auf dem Filter inkubiert. Der Transfer von pCM2 in den weißen Rezipienten scheint auf den drei getesteten Medien mit ähnlicher Frequenz stattzufinden. Daraus konnte zunächst gefolgert werden, dass eine pflanzliche Komponente, die durch den Filter diffundieren kann, den Transfer von pCM2 stimuliert. Auffällig bei diesem Experiment war, dass *Cmm* bei Anzucht auf den Agarplatten, die zu 30 % aus Pflanzen- bzw. Fruchthomogenat bestanden, eine sehr mukoiden Morphologie zeigte. Ein ähnlich mukoides Wachstum ist charakteristisch bei Anzucht von *Cmm* auf Vollmediumagarplatten mit zugesetzter Glucose. Deshalb wurden auch Kreuzungsexperimente auf Vollmediumplatten mit Glucose (5 g/l; entspricht 0,0277 mol/l) durchgeführt. Da auch auf diesem Medium Plasmidtransfer nachgewiesen werden konnte, musste die Hypothese, dass eine pflanzliche Substanz stimulierend auf die Konjugation wirkt, verworfen werden.

Anschließend wurden weitere Zucker und Carbonsäuren daraufhin untersucht, ob auch sie den Transfer von pCM2 stimulieren können. Es wurden Vollmediumagarplatten mit 0,025 mol/l Fructose, Saccharose, Aspartat bzw. Malat verwendet. Da sich eine Inkubationszeit von 12 Stunden für den Nachweis von Transkonjuganten als ausreichend herausgestellt hatte wurde die Inkubationszeit verkürzt. Nach 12-stündiger Inkubation bei 26 °C auf den Agarplatten mit den verschiedenen Zusätzen wurden die Filter abgeschwemmt. In Tabelle 4.3 sind die durch selektives Ausplattieren ermittelten Titer für Donor, Rezipient, Transkonjugant und die Transferhäufigkeit (Transkonjugant / reisoliertem Rezipienten) dargestellt. Die angegebenen Titer sind Mittelwerte, die sich aus der Titerbestimmung von jeweils drei Filtern ergeben haben. Hier ist zu erkennen, dass auch die Zugabe von Fructose oder Saccharose zu den Vollmediumplatten einen positiven Einfluss auf die Konjugation von pCM2 hat. Es konnte Plasmidtransfer nachgewiesen werden. Allerdings ist die Anzahl der Transkonjuganten, die auf den Platten mit zugesetzter Saccharose entstanden sind,

TBY + Zusatz	Bakterien pro Filter			Transferhäufigkeit
	Donor	Rezipient	Transkonjugant	
Glucose	$1,92 \times 10^9$	$2,95 \times 10^9$	$8,59 \times 10^4$	$2,91 \times 10^{-5}$
Fructose	$1,79 \times 10^9$	$2,58 \times 10^9$	$7,34 \times 10^4$	$2,85 \times 10^{-5}$
Saccharose	$2,04 \times 10^9$	$2,59 \times 10^9$	$1,05 \times 10^3$	$4,07 \times 10^{-7}$
Malat	$1,27 \times 10^9$	$1,30 \times 10^9$	$< 1,5$	$< 1,15 \times 10^{-9}$
Aspartat	$1,57 \times 10^9$	$1,55 \times 10^9$	$< 1,5$	$< 9,68 \times 10^{-10}$
ohne Zusatz	$1,33 \times 10^9$	$1,48 \times 10^9$	$< 1,5$	$< 1,01 \times 10^{-9}$

Tabelle 4.3: Transfer von pCM2 bei verschiedenen Zusätzen im Medium. Titer von Donor, Rezipient und Transkonjugant [Bakterien / Filter] und Transferhäufigkeit [Transkonjugant / reisoliertem Rezipienten]. Angegebene Titer sind Mittelwerte von jeweils drei Filtern. Schwankungen innerhalb der Dreifachbestimmung: Transkonjuganten: Faktor 1,9-2,6; Donor und Rezipient: Faktor 1-1,5; Nachweisgrenze: 1,5 Transkonjuganten / Filter.

ungefähr 80-fach geringer als auf den Platten mit den zugesetzten Monosacchariden. Dies könnte damit zusammenhängen, dass Saccharose ein Disaccharid ist und wahrscheinlich vor oder nach der Aufnahme in die Zelle in die Einfachzucker Glucose und Fructose gespalten wird. Auch auf den TBY-Agarplatten mit zugesetztem Malat oder Aspartat ist *Cmm* in der Lage sich zu vermehren. Die erreichten Titer von Donor und Rezipient sind in der gleichen Größenordnung wie bei Anzucht auf dem Medium mit Glucose. Allerdings führt die Zugabe von Malat oder Aspartat zu dem Vollmedium nicht zum Transfer von pCM2_{Nm} auf den weißen Rezipienten. Diese Ergebnisse zeigen, dass Glucose und Fructose aber auch Saccharose den Plasmidtransfer bei Filterkreuzungsexperimenten anscheinend stimulieren.

Zur Standardisierung wurden alle folgenden Filterkreuzungsexperimente auf Medium mit Glucose-Zusatz (5 g / l; entspricht 0,0277 mol / l; C-Medium) durchgeführt. Des Weiteren hat sich in diesen ersten *filter matings* gezeigt, dass die auf den Filter aufgebrachte Zellmenge von ca. $1,5 \times 10^8$ Bakterien / Filter (200 μ l) und eine Inkubationszeit von 12 Stunden für den Nachweis des Transfer von pCM2 ausreichend sind. Auch die logarithmische bis spätlogarithmische Wachstumsphase (OD₅₈₀ von 1-2, bei Anzucht in Vollmedium), in der sich die auf den Filter gebrachten Zellen befanden, hat sich als geeignet herausgestellt, so dass die Präparation der Zellen für die folgenden Filterkreuzungsexperimente, wie in diesem Abschnitt und im Fließschema (Abb. 4.5) dargestellt, durchgeführt wurde.

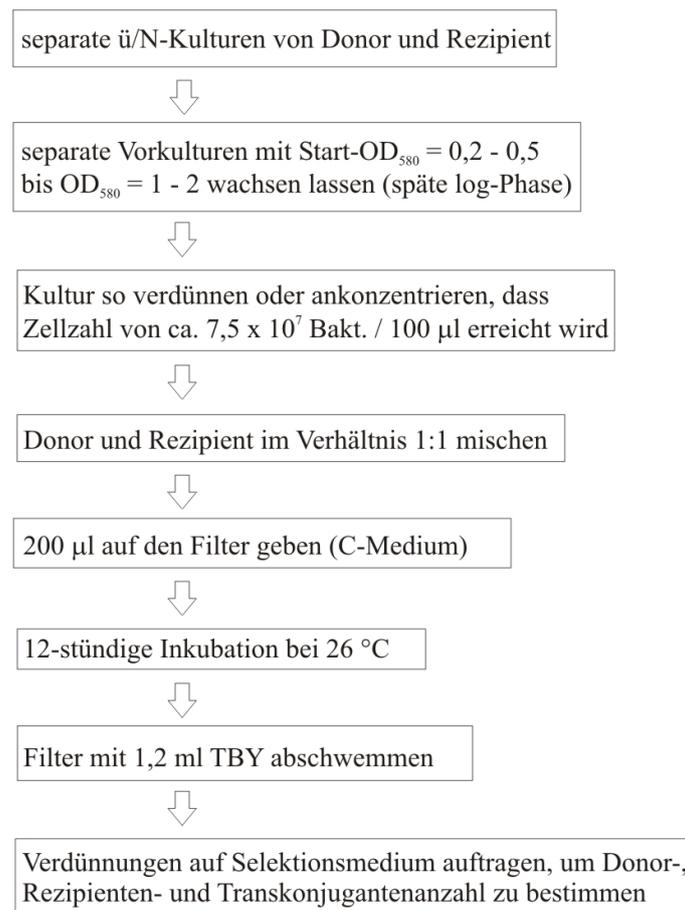


Abbildung 4.5: Fließschema des standardisierten *filter matings*: Präparation der Zellen und Durchführung der *filter matings*.

EPS-Mutanten als Rezipient

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, zeigt *Cmm* bei Anzucht auf zuckerhaltigen Agarmedien eine mukoide Koloniemorphologie, die auf einer starken EPS-Bildung beruht. Auch der Transfer von pCM2 scheint von den Zuckern im Medium abhängig zu sein. Diese beiden Beobachtungen führten zu der Vermutung, dass die EPS-Bildung vielleicht für den Zellkontakt zwischen Donor- und Rezipientenzelle, also für die Bildung eines stabilen *mating pairs*, nötig ist. Um dies zu untersuchen, wurden *Cmm*-Stämme, die durch Mutationen in den Exopolysaccharid-Biosynthese-Clustern (EPS-Cluster) einen weniger mukoiden Phänotyp zeigen, als Rezipient in *filter matings* eingesetzt. Diese EPS-Mutanten waren im Rahmen einer am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie angefertigten Diplomarbeit hergestellt worden (Schauer, 2004). Durch die Insertion eines Chloramphenicolexportergens

Rezipient	Bakterien pro Filter			Transferhäufigkeit
	Donor	Rezipient	Transkonjugant	
<i>gmdA</i> -Mutante (EPS IV)	$2,11 \times 10^9$	$3,54 \times 10^9$	$1,79 \times 10^5$	$5,06 \times 10^{-5}$
<i>wcmH</i> -Mutante (EPS IV)	$2,14 \times 10^9$	$2,85 \times 10^9$	$2,20 \times 10^5$	$7,72 \times 10^{-5}$
<i>wcnE</i> -Mutante (EPS I)	$2,41 \times 10^9$	$3,45 \times 10^9$	$1,81 \times 10^5$	$5,25 \times 10^{-5}$
weiß (Wt-Kontrolle)	$1,94 \times 10^9$	$2,43 \times 10^9$	$4,10 \times 10^4$	$1,69 \times 10^{-5}$

Tabelle 4.4: Transfer von pCM2 in EPS-Mutanten. Titer von Donor, Rezipient und Transkonjugant [Bakterien / Filter] und Transferhäufigkeit [Transkonjugant / reisoliertem Rezipient] aus Kreuzungsexperimenten mit den EPS-Mutanten als Rezipient (EPS-Cluster I bzw. IV). Nachweisgrenze: 1,5 Transkonjuganten / Filter. Angegebene Titer sind Mittelwerte von jeweils drei Filtern. Schwankungen innerhalb der Dreifachbestimmung: Transkonjuganten: Faktor 1,2 - 3,3; Donor und Rezipient: Faktor 1 - 1,3;

(*cmx*) wurden die Gene *gmdA* (CMM_1600) und *wcmH* (CMM_1601) des EPS-Clusters IV von *Cmm* und das Gen *WcnE* (CMM_0718) des EPS-Clusters I inaktiviert. Das Gen *gmdA* codiert für eine hypothetische GDP-D-Mannose-Dehydratase, die an der Synthese des EPS-Zuckers GDP-L-Fucose beteiligt ist. Das Gen *wcaI* codiert für eine Glykosyltransferase, die ein aktiviertes Zuckermolekül auf einen in der Cytoplasmamembran verankerten Lipidcarrier überträgt. Die Manosyltransferase B (*WcnE*) des EPS-Clusters I überträgt bei der EPS-Biosynthese Mannose auf das wachsende Polymer. Die biochemische Analyse der Mutanten zeigte, dass lediglich die Mutationen im EPS-Cluster IV durch eine geringe EPS-Produktion zu einer Veränderung des Oberflächenphänotyps führten (Schauer, 2004). Dennoch wurden alle drei Mutanten, die lediglich das 27,4 kb große pCM1 besitzen, als Rezipient in Kreuzungsexperimenten eingesetzt.

Die jeweilige Anzucht von Donor (CMM102_{Nm}) und den EPS-Mutanten erfolgte nach dem standardisierten Protokoll (Abb. 4.5, S. 77). Nach 12-stündiger Inkubation bei 26 °C wurden die Zellen von den Filtern abgeschwemmt, Verdünnungsreihen angelegt und die geeigneten Verdünnungen auf Selektionsmedium ausplattiert, um den Donor-, Rezipienten- und Transkonjugantentiter (Bakterien / Filter) zu ermitteln.

Die in Tabelle 4.4 dargestellten Daten zeigen, dass der Transfer von pCM2 in die Mutanten, deren Zelloberfläche weniger EPS enthält, ähnlich häufig auftritt wie in den weißen Rezipienten. Daraus kann gefolgert werden, dass zumindest die Zellmorphologie des Rezipienten die Effektivität des Transfers von pCM2 nicht beeinflusst. Ob allerdings die mukoide Zelloberfläche des Donors essentiell für einen effektiven Transfer von pCM2 ist, bleibt ungeklärt. Um diese Frage zu klären, könnten die Transkonjuganten aus den oben dargestellten Ex-

perimenten als Donor eingesetzt werden, jedoch fehlte für ein solches *mating* ein Rezipient mit eingeschränkter EPS-Produktion und einer geeigneten Antibiotikumresistenz.

Mengenverhältnis von Donor und Rezipient

Um herauszufinden, ob das Mengenverhältnis von Donor und Rezipient im Konjugationsansatz einen Einfluss auf die Effizienz des Plasmidtransfers hat, wurden verschiedene Mengenverhältnisse (1:1, 1:10 und 10:1) von Donor- und Rezipientenzellen in Filterkreuzungsexperimenten eingesetzt. Die *filter matings* wurden nach dem standardisierten Protokoll (Abb. 4.5, S. 77) durchgeführt. Pro Mischungsverhältnis und Test (I und II) wurden drei *filter matings* durchgeführt, die daraus bestimmten Titer wurden gemittelt. In Tabelle 4.5 sind die Ergebnisse aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Tests dargestellt.

Verhältnis	Test	Bakterien pro Filter			Transferhäufigkeit
		Donor	Rezipient	Transkonjugant	
1 : 1	I	$2,36 \times 10^9$	$2,83 \times 10^9$	$9,35 \times 10^3$	$3,30 \times 10^{-6}$
	II	$2,40 \times 10^9$	$2,40 \times 10^9$	$4,55 \times 10^3$	$1,89 \times 10^{-6}$
	Mittel	$2,38 \times 10^9$	$2,62 \times 10^9$	$6,93 \times 10^3$	$2,43 \times 10^{-6}$
1 : 10	I	$3,05 \times 10^8$	$5,56 \times 10^9$	$2,41 \times 10^4$	$4,33 \times 10^{-6}$
	II	$4,55 \times 10^8$	$5,22 \times 10^9$	$4,22 \times 10^3$	$8,08 \times 10^{-7}$
	Mittel	$3,80 \times 10^8$	$5,39 \times 10^9$	$1,4 \times 10^4$	$2,60 \times 10^{-6}$
10 : 1	I	$4,20 \times 10^9$	$4,47 \times 10^8$	$2,91 \times 10^1$	$6,51 \times 10^{-8}$
	II	$5,06 \times 10^9$	$4,98 \times 10^8$	$5,87 \times 10^1$	$1,18 \times 10^{-7}$
	Mittel	$4,63 \times 10^9$	$4,73 \times 10^8$	$4,39 \times 10^1$	$9,28 \times 10^{-8}$

Tabelle 4.5: Transfer von pCM2 bei verschiedenen Donor-Rezipient-Verhältnissen. Titer von Donor, Rezipient und Transkonjuganten [Bakterien / Filter] und Transferhäufigkeit [Transkonjugant / reisoliertem Rezipienten] aus *filter matings* mit unterschiedlichen Mengenverhältnissen von Donor und Rezipient. Ergebnisse aus zwei Tests (I, II); angegebene Titer der einzelnen Tests sind Mittelwerte von jeweils drei Filtern. Schwankungen innerhalb der Dreifachbestimmung: Transkonjuganten: Faktor 1,2 - 2,5; Donor und Rezipient: Faktor 1,2 - 2,1.

Wird die zehnfache Menge Donor im Vergleich zum Rezipienten eingesetzt, ist die Ausbeute mit durchschnittlich 43,9 Transkonjuganten / Filter relativ gering. Werden Donor und Rezipient in gleicher Menge im Konjugationsansatz eingesetzt, kann ein durchschnittlicher Transkonjugantentiter von $6,93 \times 10^3$ Transkonjuganten pro Filter erreicht werden. Wird

ein zehnfacher Überschuss an Rezipient eingesetzt, bleibt die Anzahl an Transkonjuganten ($1,4 \times 10^4$ Transkonjuganten / Filter) in der selben Größenordnung wie bei den *filter matings* in denen Donor und Rezipient im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Da in diesem Experiment die Menge an eingesetztem Rezipient variierte, wird der Transkonjugantentiter zusätzlich relativ zu der jeweils reisolierten Rezipienten-Anzahl (Transferhäufigkeit) angegeben. Im Vergleich zeigen diese Daten, dass eine zehnfache Menge an eingesetztem Rezipient keine Auswirkungen auf die Effizienz des Plasmidtransfers hat. Wohingegen ein zehnfacher Donor-Überschuss die Transferhäufigkeit um das ca. 26-fache reduziert. Die dreifache Menge an eingesetztem Donor bzw. Rezipient zeigte keinen Einfluss auf die Anzahl entstehender Transkonjuganten. Der Transkonjugantentiter und auch die Transferhäufigkeit (Transkonjugant pro reisolierter Rezipienten) unterschieden sich nicht von den Ergebnissen der Konjugationsansätze, bei denen Donor und Rezipient in gleicher Konzentration eingesetzt wurden (Daten nicht gezeigt).

In allen weiteren Filterkreuzungsexperimenten wurden Donor- und Rezipientenzellen im Verhältnis 1:1 eingesetzt.

Kinetik des Transfers von pCM2 im Filterkreuzungsexperiment

Da sich die neu entstandenen Transkonjuganten auf dem Filter ebenso durch Teilung vermehren wie Donor- und Rezipientenzellen, ist es schwierig eine Transferrate (z. B. Plasmidtransfer / Generation oder Transkonjuganten / Minute) zu berechnen. Im Laufe eines Experiments ist nicht mehr zu unterscheiden, ob die Transkonjugantenzelle durch die Aufnahme des Plasmids oder durch Teilung entstanden ist. Deswegen war es wichtig, den Zeitpunkt zu bestimmen an dem in einem *filter mating* die ersten Plasmide transferiert werden, also die ersten Transkonjuganten entstehen. Dazu wurden über einen Zeitraum von 12 Stunden stündlich zwei Filter mit einem Donor-Rezipient-Gemisch (Verhältnis 1:1; Anzuchttemperatur 26 °C) abgeschwemmt. Über selektives Ausplattieren geeigneter Verdünnungen wurden die Titer von Donor, Rezipient und Transkonjugant bestimmt (Tabelle 4.6). Zuvor erfolgte die Präparation der Zellen für das *filter mating* so wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben (Abb. 4.5, S. 77). Um schon während des Experiments das Wachstum aller Bakterien auf dem Filter protokollieren zu können, wurde die OD₅₈₀ der vom Filter abgeschwemmt Zellsuspensionen bestimmt.

In Abbildung 4.6 ist zu sehen, dass die Gesamtzellzahl der Bakterien auf den Filtern während der zwölf Stunden nach einer kurzen *lag*-Phase exponentiell steigt. Die Anzahl der Transkonjuganten pro Filter zu den jeweiligen Zeitpunkten ist als Säule dargestellt.

Zeit [h]	OD ₅₈₀	Donor [Bakterien pro Filter]	Rezipient	Transkonj.	gesamt	Transkonj./ Rezipient	Transferrate
0	0,234	$4,94 \times 10^7$	$5,44 \times 10^7$	< 1	$1,04 \times 10^8$	-	-
2	0,240	$5,96 \times 10^7$	$7,78 \times 10^7$	< 1	$1,37 \times 10^8$	-	-
3	0,334	$1,04 \times 10^8$	$1,31 \times 10^8$	1	$2,35 \times 10^8$	$7,63 \times 10^{-9}$	-
4	0,418	$1,60 \times 10^8$	$1,67 \times 10^8$	6	$3,27 \times 10^8$	$3,60 \times 10^{-8}$	$8,01 \times 10^{-10}$
5	0,438	$2,20 \times 10^8$	$2,45 \times 10^8$	50	$4,65 \times 10^8$	$2,04 \times 10^{-7}$	$4,58 \times 10^{-9}$
6	0,688	$2,61 \times 10^8$	$3,70 \times 10^8$	98	$6,31 \times 10^8$	$2,65 \times 10^{-7}$	$3,64 \times 10^{-9}$
7	0,874	$3,62 \times 10^8$	$3,57 \times 10^8$	625	$7,19 \times 10^8$	$1,75 \times 10^{-6}$	$3,37 \times 10^{-8}$
8	1,05	$4,47 \times 10^8$	$6,10 \times 10^8$	1403	$1,06 \times 10^9$	$2,30 \times 10^{-6}$	$3,98 \times 10^{-8}$
9	1,30	$5,17 \times 10^8$	$5,90 \times 10^8$	6687	$1,11 \times 10^9$	$1,13 \times 10^{-5}$	$1,97 \times 10^{-7}$
10	1,65	$8,72 \times 10^8$	$6,38 \times 10^8$	13680	$1,51 \times 10^9$	$2,14 \times 10^{-5}$	$2,25 \times 10^{-7}$
11	2,38	$1,11 \times 10^9$	$6,05 \times 10^8$	15524	$1,72 \times 10^9$	$2,57 \times 10^{-5}$	$3,52 \times 10^{-8}$
12	3,26	$1,34 \times 10^9$	$7,84 \times 10^8$	79145	$2,12 \times 10^9$	$1,01 \times 10^{-4}$	$9,55 \times 10^{-7}$

Tabelle 4.6: Kinetik des Transfers von pCM2 im Filterkreuzungsexperiment: OD₅₈₀, Titer von Donor, Rezipient, Transkonjugant, Gesamtzellzahl [Bakterien / Filter] und Transferhäufigkeit [Transkonjugant / reisoliertem Rezipient] im Verlauf der ersten 12 Stunden eines *filter matings* bei einer Kultivierungstemperatur von 26 °C. Die Transferrate wurde berechnet als Transkonjuganten pro Donor pro Minute über einen Zeitraum von einer Stunde. Nachweisgrenze: 1 Transkonjugant pro Filter

Nach drei Stunden konnte bereits das erste Transferereignis nachgewiesen werden. Während sich die Gesamtzellzahl innerhalb von 2 Stunden (Zeitraum zwischen 3.-5. Stunde) verdoppelt, hat sich die Anzahl der Transkonjuganten pro Filter von 1 auf 50 erhöht. Dieser Anstieg kann also nicht nur auf Zellteilung zurückgeführt werden, sondern ist zum größten Teil durch einzelne Transferereignisse von pCM2 auf den Rezipienten entstanden. Auch der starke Anstieg der Transferhäufigkeit (Transkonjuganten pro reisoliertem Rezipienten) im Verlauf der 12 Stunden zeigt, dass die Anzahl der Transkonjuganten in einem größeren Maße zunimmt als die Anzahl der Rezipienten. Die Transferrate wurde gemessen als Transkonjuganten pro Donor pro Minute über einen Zeitraum von einer Stunde. Wobei jeweils der Donortiter zu Beginn der Periode von einer Stunde für die Berechnung der Transferrate benutzt wurde.

Gegen Ende des Experiments (nach 9-12 Stunden) nimmt der Anteil der Transkonjuganten, der neu durch Plasmidaufnahme und nicht durch Zellteilung entsteht, scheinbar ab. Während in den ersten Stunden des Experiments der Transkonjugantentiter innerhalb ei-

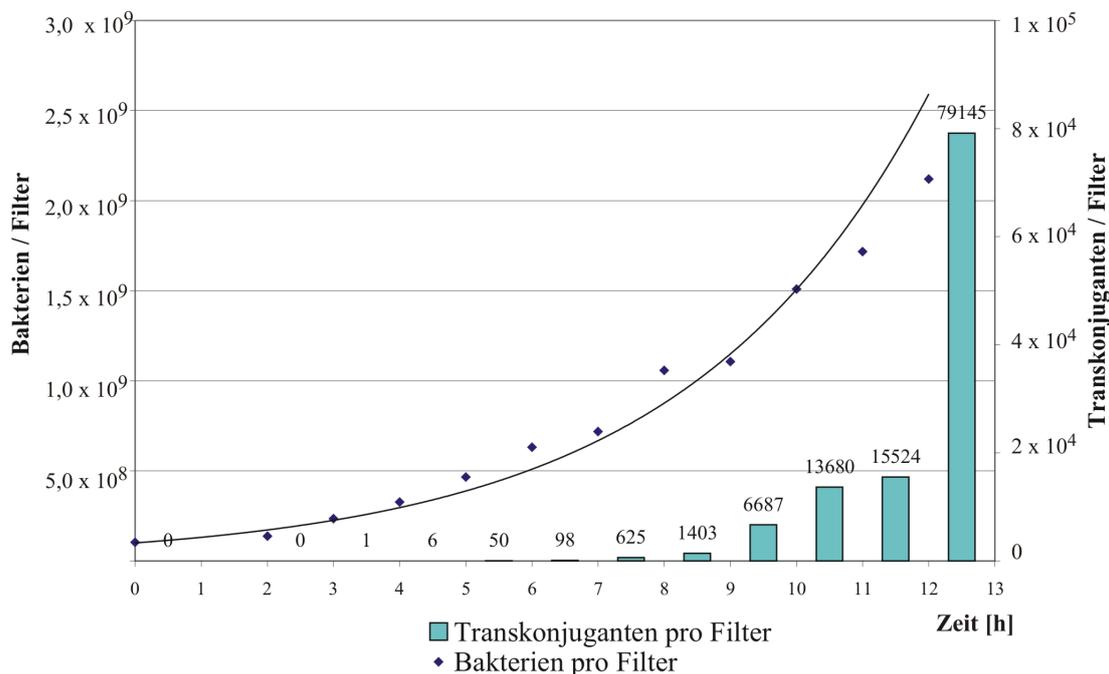


Abbildung 4.6: Kinetik des Transfers von pCM2 im Filterkreuzungsexperiment: Gesamtzellzahl (Graph) und Anzahl an Transkonjuganten (Säulen) auf den stündlich abgeschwemmten Filtern.

ner Generation ver Hundertfacht wird, ist der Anstieg des Transkonjugantentiters gegen Ende des Experiments wesentlich geringer. Im Zeitraum zwischen der 9. und 12. Stunde verdoppelt sich die Gesamtzellzahl, während der Transkonjugantentiter nur noch um den Faktor 12 steigt.

Die semilogarithmische Darstellung (Abb. 4.7) der Gesamtzellzahl und der Anzahl an Transkonjuganten in Abhängigkeit von der Zeit kann durch eine lineare Regression beschrieben werden. Dies zeigt, dass nach einer kurzen *lag*-Phase sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Anzahl an Transkonjuganten exponentiell ansteigt. Es ist zu erkennen, dass die Wachstumskonstante μ (Steigung der Regressionsgeraden) der Transkonjuganten-Zunahme ($\mu = 1,2003$) wesentlich höher ist als die mit der die Gesamtzellzahl ($\mu = 0,239$) zunimmt. Durch die Wachstumskonstante μ kann die Generationszeit t_d berechnet werden ($t_d = \ln(2) / \mu$). Daraus ergibt sich für die Gesamtzellzahl eine Generationszeit von 2,9 Stunden und für die Transkonjuganten eine Generationszeit von 0,6 Stunden. Diese äußerst kurze Verdoppelungszeit der Transkonjuganten, wird nicht nur durch Zellteilung erreicht, sondern vor allem durch Transkonjuganten, die durch Aufnahme von pCM2 neu

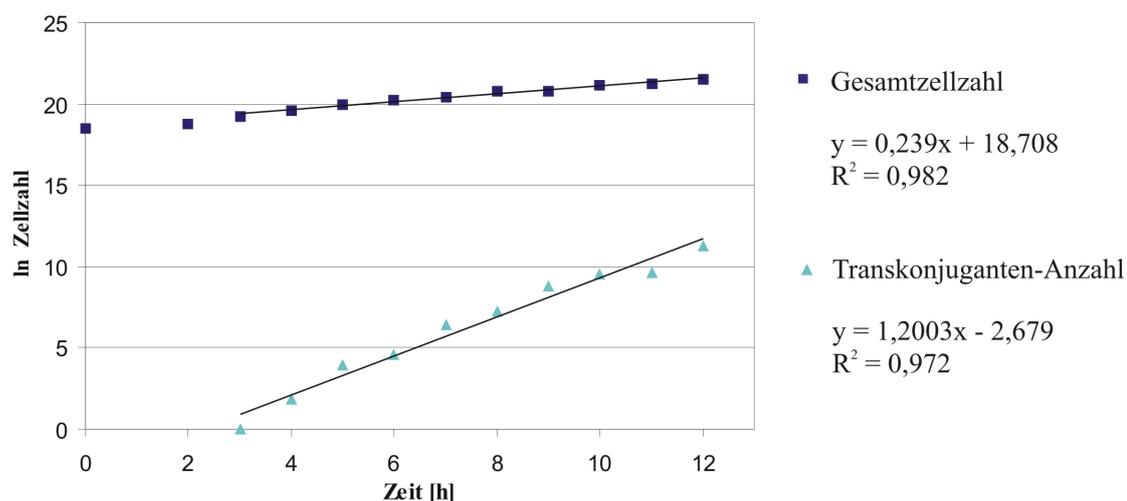


Abbildung 4.7: Semilogarithmische Darstellung der Gesamtzellzahl und der Transkonjuganten-Anzahl: Gleichung der linearen Regression und Bestimmtheitsmaß R^2 sind angegeben.

entstanden sind.

Die für das Wachstum der Zellen auf den Nitrocellulose-Filtern in diesem Experiment ermittelte Generationszeit von ca. 3 Stunden, entspricht in etwa der Generationszeit, die von *Cmm* bei Anzucht in Flüssigkultur erreicht wird. Die Versorgung mit Nährstoffen scheint zumindest in den ersten 12 Stunden eines *filter matings* nicht schlechter als bei Anzucht in Flüssigkultur auf dem Luftschüttler zu sein. Der ermittelte Zeitpunkt des ersten Transferereignisses (nach drei Stunden) scheint nicht unbedingt von der Dichte der Zellen auf dem Filter abzuhängen. Zumindest führte die Verdoppelung der Anfangs-Zelldichte von Donor und Rezipient auf dem Filter nicht dazu, dass der Plasmidtransfer früher nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Die Zellen befinden sich anscheinend in einer Art *lag*-Phase bevor der Plasmidtransfer beginnt.

Die Dauer eines Konjugationsereignisses kann nur abgeschätzt werden. Vermutlich ist aber die Ausbildung des *mating pair*-Komplexes und nicht die Dauer der Transferreplikation der die Geschwindigkeit bestimmende Schritt. Denn der Transfer des *E. coli*-Chromosoms in *Hfr*-Stämmen (ca. 4200 kb) ist nach 100 Minuten abgeschlossen, daraus ergibt sich eine Transfergeschwindigkeit von 42 kb/min. Demnach würde der eigentliche Transfer von pCM1 bzw. pCM2 nur ca. 1-2 Minuten dauern.

Standardisierung des *filter matings*

Die Experimente, die in diesem Abschnitt aufgelistet sind, dienen der Etablierung einer Filterkreuzungsmethode für *Cmm*. An dieser Stelle soll zusammengefasst werden, wie die *filter matings* auf Grund dieser Untersuchungen standardisiert durchgeführt werden. Die Anzucht von Donor und Rezipient erfolgt wie in Abbildung 4.5 (S. 77) beschrieben. In der Regel werden Donor- und Rezipientenzellen im Verhältnis 1:1 gemischt und die Inkubation der Filter erfolgt auf Agarplatten mit Glucose-Zusatz (C-Medium).

Auch wenn gezeigt werden konnte, dass bereits nach 3 Stunden ein Transfer-Ereignis stattgefunden hat, soll als Standard eine Inkubationszeit von 12 Stunden eingehalten werden. Damit soll sichergestellt werden, dass auch der Transfer von Plasmiden, die seltener als pCM2 (z. B. pCM1) konjugieren, beobachtet werden kann.

Nach 12-stündiger Inkubation auf dem Filter werden die Zellen mit 1,2 ml TBV abgeschwemmt. Es wird eine Verdünnungsreihe hergestellt und die geeigneten Verdünnungsstufen werden auf Selektionsmedium ausplattiert, so dass der Titer von Donor, Rezipient und Transkonjugant ermittelt werden kann. Da die Plasmide durch Antibiotikaresistenzen markiert sind, können nur Transkonjuganten und spontanresistente Zellen auf den Medien, denen beide entsprechenden Antibiotika zugesetzt wurden, wachsen. In der Regel werden pro zu untersuchendem Kreuzungspaar parallel drei Filter verwendet. Von den daraus resultierenden Titern für Donor, Rezipient und Transkonjugant wird das arithmetische Mittel berechnet. Zusätzlich wird der Faktor, um den die Daten der Dreifachbestimmung schwanken, angegeben.

Um die Anwesenheit der Plasmide in den Transkonjuganten zu überprüfen und sie nicht nur auf Grund der Antibiotikaresistenzen indirekt nachzuweisen, wurden exemplarisch einige Kontrollen durchgeführt. Mittels PCR wurden die plasmidcodierten Pathogenitätsdeterminanten *celA* (pCM1) und *pat-1* (pCM2) in den Transkonjugantenzellen nachgewiesen. Des Weiteren wurden die Plasmide aus den Transkonjuganten isoliert, mit geeigneten Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und dann gegen das *celA*-Gen und das *pat-1*-Gen als Sonden hybridisiert. Da in allen getesteten antibiotikaresistenten Transkonjuganten, die entsprechenden Plasmide durch PCR oder Hybridisierung nachgewiesen werden konnten, reichte anschließend bei den häufig umfangreichen Experimenten die erworbene Antibiotikumresistenz als Indiz für die Anwesenheit des die entsprechende Resistenz tragenden Plasmids aus.

4.2.4 Analyse des Transfers von pCM1 und pCM2

Durch Filterkreuzungsexperimente, die, wie in der Abb. 4.5 (S. 77) dargestellt, für Cmm etabliert worden sind, konnte in den folgenden Experimenten der Transfer der markierten Plasmide (pCM1 und pCM2) in den weißen, plasmidfreien Rezipienten untersucht werden. In Tabelle 4.7 sind die Transkonjugantentiter aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Kreuzungsexperimenten (Test I-III) dargestellt. Pro Konjugationsansatz wurde in jedem Test der Transkonjugantentiter von drei Filtern bestimmt. Die Mittelwerte der Titerbestimmung von diesen drei Filtern und der Mittelwert, der sich aus den drei Tests ergibt, sind in der Tabelle protokolliert.

Donor	Transfer	Transkonjuganten pro Filter			Mittel (I, II, III)
		I	II	III	
CMM382 $_{Nm/Gm}$	pCM1	-	$1,40 \times 10^1$	$1,20 \times 10^1$	$1,30 \times 10^1$
	pCM2	$4,52 \times 10^5$	$1,69 \times 10^4$	$1,33 \times 10^5$	$2,01 \times 10^5$
CMM101 $_{Gm}$	pCM1	-	$1,95 \times 10^1$	$2,50 \times 10^1$	$2,23 \times 10^1$
CMM102 $_{Nm}$	pCM2	$2,03 \times 10^4$	$7,09 \times 10^3$	$2,95 \times 10^3$	$1,01 \times 10^4$
CMM382pCM2 $_{Nm}$	pCM2	$3,99 \times 10^4$	-	$2,73 \times 10^3$	$2,13 \times 10^4$

Tabelle 4.7: Transfer von pCM1 und pCM2 verschiedener Donorstämme. Transkonjugantentiter [Bakterien / Filter] aus *filter matings* mit verschiedenen Donorstämmen und dem weißen Rezipienten. Angegebene Titer sind Mittelwerte von jeweils drei Filtern. Der angegebene Mittelwert fasst die Ergebnisse der Tests I-III zusammen. Schwankungen innerhalb der Dreifachbestimmung: Test I: Faktor 1,2-1,3; Test II: Faktor 1,3-3,1; Test III: Faktor 1,8-4,5. (-) nicht getestet.

Die Tatsache, dass aus allen Kreuzungsexperimenten Transkonjuganten isoliert werden konnten, zeigt, dass der Transfer der markierten Plasmide, pCM1 $_{Gm}$ und pCM2 $_{Nm}$, in den weißen, plasmidfreien Rezipienten erfolgreich war. Auffallend ist, dass die Anzahl an Transkonjuganten, die durch Aufnahme von pCM1 entstanden sind, um das 1.000- bis 10.000-fache geringer ist als die Zahl der Zellen, die pCM2 aufgenommen haben. Der Transfer von pCM1 ist also im Vergleich zum Transfer von pCM2 ein selteneres Ereignis. Da der Transfer von pCM1 $_{Gm}$ aus dem Stamm CMM382 $_{Nm/Gm}$, der beide Plasmide besitzt, und dem nur pCM1 tragenden Stamm CMM101 $_{Gm}$ ungefähr gleich selten auftritt, kann ausgeschlossen werden, dass die Anwesenheit von pCM2 den Transfer von pCM1 beeinflusst.

Die Ergebnisse der drei unabhängig von einander durchgeführten Tests (I-III) zeigen, dass die Anzahl der entstehenden Transkonjuganten trotz gleicher Bedingungen bis zu einem

Faktor von 25 schwanken kann. Derartige Schwankungen treten allerdings nicht innerhalb eines Tests auf. Die durch die drei Filter ermittelten Transkonjugantentiter variieren meistens nur um einen Faktor zwischen 1 - 1,5, selten um einen Faktor größer als 2. Das lässt vermuten, dass die in unabhängig voneinander durchgeführten Tests ermittelten, variierenden Transkonjugantentiter aus kleinen, experimentell bedingten Unterschieden in der Anzucht der Zellen resultieren.

Unterschiedlich viele Transkonjuganten sind durch die Aufnahme von pCM2_{Nm} entstanden: $2,01 \times 10^5$, $1,01 \times 10^4$ und $2,13 \times 10^4$ Transkonjuganten pro Filter. Besonders viele Transkonjuganten ($2,01 \times 10^5$) sind aus der Kreuzung des Stamms CMM382_{Nm/Gm}, in dem beide Plasmide durch Antibiotikaresistenzen markiert vorliegen, mit dem weißen Rezipienten hervorgegangen. Eine um das zehnfache geringere Menge an Transkonjuganten konnte nach der Kreuzung des Stamms CMM382pCM2_{Nm}, der neben dem pCM2_{Nm} das unmarkierte pCM1 trägt, und dem weißen Rezipienten, beobachtet werden. Dies war so nicht zu erwarten. Dennoch kann wahrscheinlich ein Einfluss von pCM1 auf den Transfer von pCM2 ausgeschlossen werden, da der Transfer von pCM2_{Nm} aus dem Stamm CMM102_{Nm} (ohne pCM1) und dem Stamm CMM382pCM2_{Nm} (mit pCM1) in den weißen Rezipienten ungefähr gleich häufig auftritt. Außerdem liegen Schwankungen um den Faktor 10 in dem experimentell bedingten Bereich. Der Transfer von pCM1 bzw. pCM2 scheint also unabhängig von der Anwesenheit des jeweils anderen Plasmids zu sein.

Von vielen Konjugationssystemen ist bekannt, dass durch die Anwesenheit eines bestimmten Plasmids in potentiellen Rezipientenzellen, die Aufnahme oder Etablierung eines identischen oder nahe verwandten Plasmids erschwert oder sogar verhindert wird. Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob Zellen, die bereits das 70 kb große pCM2 besitzen, ein weiteres durch eine Antibiotikumresistenz markiertes pCM2_{Nm} durch Konjugation aufnehmen. Als Rezipient wurden zwei *Cmm*-Stämme verwendet, die sowohl pCM1 als auch pCM2 tragen und durch die Insertion einer Antibiotikumresistenzgen-Kassette gegen Chloramphenicol resistent sind. Zum einen die *traE*-Mutante, bei der das *traE*-Gen auf pCM2 durch die Insertion eines Chloramphenicolexportergens (*cmx*) inaktiviert worden ist (siehe Abschnitt 4.3.2, S. 103) und zum anderen die *bldKD*-Mutante. In dieser Mutante wurde das chromosomale *bldKD*-Gen (CMM_0802), das für ein hypothetisches ATP-bindendes Protein eines ABC-Transporters codiert, durch die Insertion des *cmx*-Gens inaktiviert (Flügel, unveröffentlicht). Durch die standardisierte Filterkreuzungsmethode wurde überprüft, ob diese pCM2 tragenden Stämme das Neomycin-markierte pCM2_{Nm}

des Stamms CMM102_{Nm} durch Konjugation aufnehmen können. Als Kontrolle wurde der Transfer von pCM2_{Nm} in den weißen, plasmidfreien Rezipienten untersucht. In Tabelle 4.8 sind die Titer von Donor, Rezipient und Transkonjugant aus diesen Kreuzungsexperimenten zusammengefasst.

Donor	Rezipient	Plasmidstatus	Bakterien pro Filter		
			Donor	Rezipient	Transkonjugant
CMM102 _{Nm}	weiß (Wt)	-	$1,24 \times 10^9$	$1,80 \times 10^9$	$1,56 \times 10^5$
CMM102 _{Nm}	<i>traE</i> -Mut.	pCM1 / pCM2	$1,53 \times 10^9$	$1,79 \times 10^9$	< 1,5
CMM102 _{Nm}	<i>bldKD</i> -Mut.	pCM1 / pCM2	$1,45 \times 10^9$	$1,56 \times 10^9$	< 1,5

Tabelle 4.8: Transfer von pCM2 in pCM2 tragende Stämme. Titer von Donor, Rezipient und Transkonjugant aus *filter matings* mit CMM102_{Nm} als Donor und den pCM2 tragenden Stämmen (*traE*-Mutante und *bldKD*-Mutante) als Rezipient. Angegebenen Titer sind Mittelwerte von jeweils drei Filtern. Nachweisgrenze: 1,5 Transkonjuganten / Filter.

Da keine gegen Neomycin und Chloramphenicol resistenten Transkonjuganten in den Kreuzungsexperimenten mit den pCM2 tragenden Rezipienten entstanden sind, ist davon auszugehen, dass diese Stämme das Neomycin-markierte pCM2 nicht aufgenommen haben oder auf Grund der Inkompatibilität nicht stabil etablieren konnten. Die Anwesenheit von pCM2 in einem Stamm scheint also die Aufnahme oder die Etablierung weiterer pCM2-Plasmide zu verhindern.

4.2.5 Einfluss von Glucose auf die Konjugation

Wie schon in Abschnitt 4.2.3 (S. 74) beschrieben, scheint die Anwesenheit von Glucose in den Agarplatten, die für *filter matings* verwendet werden, essentiell zu sein. Durch das im Folgenden beschriebene Experiment sollte untersucht werden, ob auch bei Kreuzungsexperimenten, die in Flüssigkultur durchgeführt werden, die Anwesenheit von Glucose einen positiven Einfluss auf die Konjugation hat oder ob für einen erfolgreichen Plasmidtransfer eine feste Oberfläche benötigt wird. Um den Einfluss von Glucose auf den Transfer zu untersuchen, wurde ein Gemisch (1:1) von Donor (CMM102_{Nm}) und dem weißen Rezipienten (jeweils OD₅₈₀ = 0,1) zum einen in Vollmedium (TBY) und zum anderen in Vollmedium mit 5 g Glucose / l (C-Medium) im Erlenmeyerkolben (Luftschüttler 90 rpm, 26 °C) angezogen. Alle zwei Stunden wurde untersucht, ob Transkonjuganten aus den Konjugationsansätzen hervorgegangen sind. Dazu wurden die Zellen (1 ml, durch Zentrifugation sedimentiert und im Rücklauf resuspendiert) auf neomycin- und chloramphenicolhaltiges

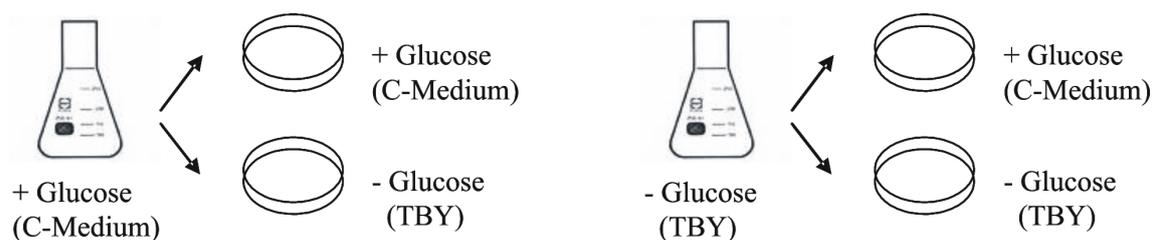


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Untersuchung des Einflusses von Glucose in Fest- und Flüssigmedien.

Medium, auf dem nur die Transkonjuganten wachsen können, gebracht. Durch die Verwendung von Selektionsagarplatten mit und ohne Glucose (C-Medium und TBY) sollte getestet werden, ob Glucose auch hier einen Einfluss auf die Effektivität des Transfers von $pCM2_{Nm}$ hat. Abbildung 4.8 zeigt schematisch den Versuchsablauf. Sowohl die Anzucht als auch das Ausplattieren der Zellen erfolgte jeweils mit Glucose (C-Medium) und ohne Glucosezusatz (TBY).

Über einen Zeitraum von acht Stunden wurde das Wachstum der Zellen in den Konjugationsansätzen mittels Messung der optischen Dichte ($\lambda=580$) protokolliert. Die Graphik 4.9 zeigt das Wachstum der Bakterien in den Konjugationsansätzen, die in Nährmedium mit (C-Medium) bzw. ohne Glucosezusatz (TBY) angezogen wurden. Die Anzahl an Transkonjuganten, die auf den Agarplatten mit (C-Medium) und ohne Glucose (TBY) entstanden sind, ist in dieser Graphik als Säule und zur besseren Übersicht auch in der Tabelle 4.9 dargestellt.

		Transkonjuganten [Bakterien / ml]			
		C-Medium		TBY	
Flüssigmedium (Kolben)		C-Medium		TBY	
Festmedium (Platte)		C-Medium	TBY	C-Medium	TBY
Zeit [h]	0	0	0	0	0
	2	50	4	0	0
	4	406	22	0	0
	6	1020	50	4	0
	8	1280	3	0	0

Tabelle 4.9: Einfluss von Glucose in Fest- und Flüssigmedien auf den Transfer von $pCM2$. Transkonjugantentiter [Bakterien / ml] nach 2-, 4-, 6- und 8-stündiger Anzucht (Kolben) des Donor-Rezipienten-Gemischs in glucosehaltigem (C-Medium) und glucosefreiem (TBY) und Ausplattieren auf glucosehaltigen (C-Medium) und glucosefreien (TBY) Agarplatten.

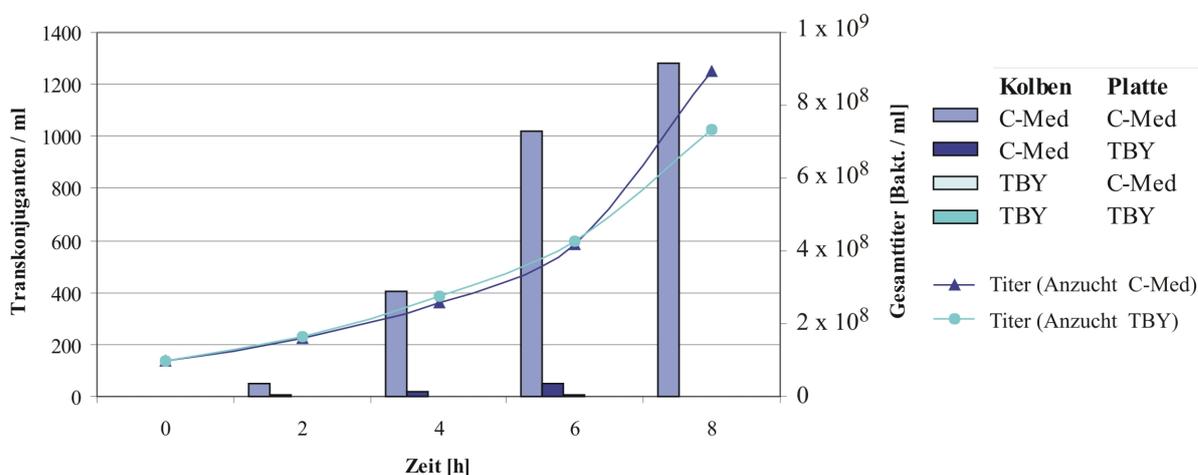


Abbildung 4.9: Einfluss von Glucose in Fest- und Flüssigmedien auf den Transfer von pCM2: Transkonjugantentiter [Bakterien / ml], als Säulen dargestellt, nach 2-, 4-, 6- und 8-stündiger Anzucht (Kolben) des Donor-Rezipienten-Gemischs in C-Medium (+ Glucose) bzw. TBY (- Glucose) und Ausplattieren auf C-Medium- und TBY-Agarplatten. Der Gesamttiter wurde entsprechend der ermittelten OD_{580} berechnet.

Es wird deutlich, wie wichtig Glucose für den Transfer von pCM2 ist. Die meisten Transkonjuganten entstehen, bei Anzucht und Ausplattieren in bzw. auf glucosehaltigem Medium (C-Medium). Wohingegen bei der Verwendung von glucosefreiem Medium, sowohl für die Anzucht als auch das Ausplattieren (TBY), gar kein Plasmidtransfer nachgewiesen werden konnte. Nur wenn die Kultivierung des Konjugationsgemischs in glucosehaltigem Flüssigmedium erfolgt, kann nach Selektion auf glucosefreiem Medium (TBY) auch Plasmidtransfer nachgewiesen werden. Zum Beispiel ist nach sechsstündiger Kultivierung der Konjugationsansätze auf dem Luftschüttler die Anzahl mit ca. 50 Transkonjuganten / ml deutlich geringer als nach Ausplattieren auf C-Medium (1020 Transkonjuganten / ml). Da beide Proben aus derselben in glucosehaltigem Medium angezogenen Kultur stammen, wäre zu erwarten gewesen, dass auf den Agarplatten mit und ohne Glucose etwa die gleiche Anzahl Transkonjuganten wächst. Der Transkonjugantentiter auf den glucosehaltigen Agarplatten ist aber um den Faktor 20 größer als auf den glucosefreien Platten. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Plasmidtransfer scheinbar nicht oder nicht ausschließlich wäh-

rend der Inkubation im Kolben passiert, sondern hauptsächlich nach dem Ausplattieren der Zellen auf den Selektionsagarplatten. Dies ist erstaunlich, da weder Donor- noch Rezipientenzellen in der Lage sind, auf den Agarplatten mit Neomycin- und Chloramphenicol-zusatz zu wachsen. Erst die Aufnahme des pCM2 mit dem Neomycinresistenzgen befähigt den entstandenen Transkonjuganten zum Wachstum auf dem Selektionsmedium. Da der Angriffsort der beiden hier verwendeten Antibiotika (Neomycin und Chloramphenicol) die Proteinbiosynthese ist, würde ein erfolgreicher Plasmidtransfer auf dem Selektionsmedium voraussetzen, dass alle für die Konjugation benötigten Proteine bereits während der unselektiven Anzucht im Kolben gebildet worden sind. Hierbei scheint auch die Anwesenheit der Glucose wichtig zu sein, da nach Kultivierung der Konjugationsansätze in dem glucosefreien TBY-Flüssigmedium nahe zu keine Transkonjuganten auf dem glucosehaltigen Selektionsplatten zu beobachten waren.

Die Wachstumskurven (Abb. 4.9) der beiden Kulturen mit und ohne Glucose-Zusatz verlaufen sehr ähnlich, so dass davon auszugehen ist, dass jeweils nach 2, 4, 6 und 8 Stunden ungefähr die gleiche Zellmenge ausplattiert wurde. Das Ausbleiben der Transkonjuganten in der Kultur ohne Glucose-Zusatz ist also nicht auf schlechteres Wachstum der Zellen in diesem Medium zurückzuführen.

4.2.6 Versuche zum Nachweis eines Signalmoleküls

Von verschiedenen Konjugationssystemen bei Gram-positiven Bakterien ist bekannt, dass es zwischen Donor und Rezipient Kommunikation in Form von Signalmolekülen gibt. Plasmidfreie Rezipientenzellen von *Enterococcus faecalis* senden ein chromosomal codiertes Pheromon aus, das den Plasmidtransfer in den Donorzellen anregt. Donorzellen produzieren neben dem Pheromon ein plasmidcodiertes Inhibitorprotein, das die Selbstinduktion in den Donorzellen verhindert. Überwiegt die Menge an Pheromon so wird den Donorzellen signalisiert, dass sich in ihrer Umgebung viele Rezipientenzellen befinden und der Konjugationsprozess wird gestartet (Dunny, 2007).

Um der Frage nachzugehen, ob auch bei *Cmm* Donor- oder Rezipientenzellen ein Signalmolekül aussenden und somit den Plasmidtransfer initiieren, wurden Donorzellen im Zellüberstand von Donor- bzw. Rezipientenzellen angezogen. Wenn ein Signalmolekül von den Zellen produziert wird, befindet es sich in ihrem Kulturüberstand und könnte die Konjugationsbereitschaft der Donorzellen während ihrer Anzucht in den Kulturüberständen positiv beeinflussen. Aus einer ü/N-Kultur wurden Donor und Rezipient jeweils in frisches C-Medium (Start- $OD_{580} = 0,2$) überimpft und für 4 Stunden auf dem Luftschüttler bei

26 °C inkubiert. In die sterilfiltrierten Überstände dieser Kulturen (Donor bzw. Rezipient) wurde der Donor, der separat in C-Medium angezogen worden war, überimpft und für 3 Stunden auf dem Luftschtüttler bei 26 °C inkubiert. Anschließend wurden die Donorzellen im Verhältnis 1:1 mit Rezipientenzellen, die auch separat in C-Medium angezogen worden waren, gemischt. Die Zellen (1 ml, durch Zentrifugation sedimentiert und im Rücklauf resuspendiert) wurden direkt (t_0) auf C-Medium Agarplatten mit Neomycin und Chloramphenicol ausplattiert, um auf Transkonjuganten zu selektionieren. Auch nach 45- und 90-minütiger Inkubation des Konjugationsansatzes auf dem Luftschtüttler bei 26 °C wurden Proben entnommen und auf Transkonjuganten untersucht. Als Negativ-Kontrolle diente ein Ansatz mit Donorzellen, die in frischem C-Medium angezogen wurden. In Abbildung 4.10 ist der Versuchsablauf schematisch dargestellt.

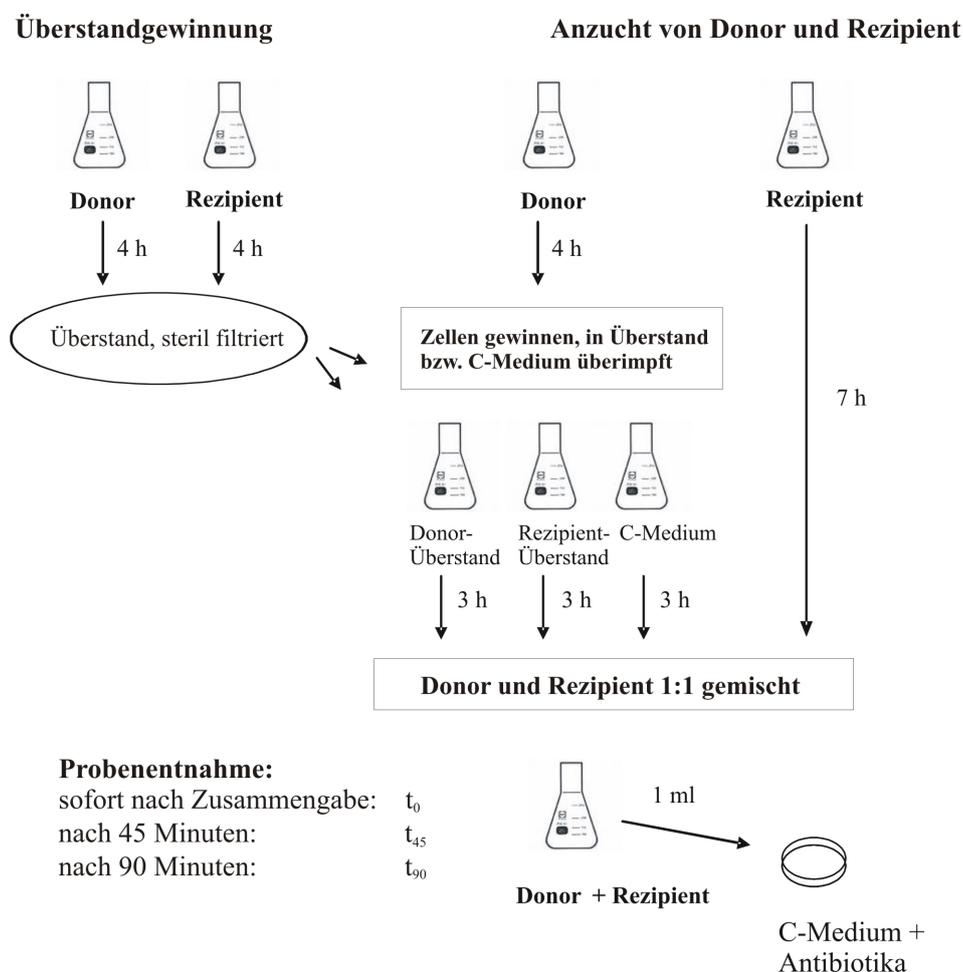


Abbildung 4.10: Nachweis eines Signalmoleküls. Schematische Darstellung des Versuchs.

Medium (Donor-Anzucht vor Rezipient-Zugabe)	Transkonjugantentiter [Bakterien / ml]		
	t_0	t_{45}	t_{90}
C-Medium	0	26	178
Donor-Überstand	0	2	71
Rezipienten-Überstand	19	104	96

Tabelle 4.10: Transfer von pCM2 nach Anzucht des Donors im Donor- bzw. Rezipienten-Überstand. Transkonjugantentiter [Bakterien / ml] nach Anzucht des Donors (vor Zugabe des Rezipienten) in C-Medium, sterilfiltriertem Donor-Überstand und sterilfiltriertem Rezipienten-Überstand.

Tabelle 4.10 zeigt, wie viele Transkonjuganten entstanden sind, nachdem die Donorzellen in C-Medium und in Donor- bzw. Rezipienten-Überstand angezogen worden sind. Zum Zeitpunkt t_0 , also direkt nach Zusammengabe von Donor- und Rezipientenzellen, konnten nur nach Anzucht des Donors im Rezipienten-Überstand Transkonjuganten beobachtet werden. Erst nach 45 bzw. 90 Minuten gemeinsamer Inkubation von Donor- und Rezipientenzellen konnten auch aus den anderen Konjugationsansätzen, bei denen der Donor zuvor in C-Medium oder in Donor-Überstand angezogen wurde, Transkonjuganten isoliert werden. Vielleicht sendet der Rezipient tatsächlich ein Signalmolekül aus, das die Donorzellen zum Plasmidtransfer anregt. Dieses Molekül scheint auch in Abwesenheit der Donorzellen bei Anzucht des Rezipienten in C-Medium produziert zu werden und bereits im Rezipienten-Überstand in ausreichender Konzentration vorzuliegen, so dass sofort nach Zusammen-gabe (t_0) von Donor- und Rezipientenzellen der Plasmidtransfer stimuliert wird. Nach 45-minütiger Inkubation haben die zugegebenen Rezipientenzellen in den beiden anderen Versuchsansätzen (Anzucht des Donors in Donor-Überstand bzw. C-Medium) anscheinend eine ausreichende Menge des postulierten Signalmoleküls produziert, so dass zu diesem Zeitpunkt Transkonjuganten beobachtet werden können.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob der Rezipienten-Titer der Kultur, von der der Überstand für die Anzucht des Donors benutzt wird, einen Einfluss auf den Plasmidtransfer hat. Bei einer höheren Zelldichte könnte auch das postulierte Signalmolekül in einer größeren Menge vorhanden sein.

Der Rezipient wurde aus einer \bar{u}/N -Kultur jeweils mit einer Start- OD_{580} von 0,05; 0,2 und 0,8 angeimpft und dann 4 Stunden auf dem Luftschüttler bei 26 °C inkubiert.

Des Weiteren wurde durch Aufkochen (20 min, 100 °C) bzw. Autoklavieren (20 min, 120 °C)

des Rezipienten-Überstands (Start-OD₅₈₀ = 0,2) getestet, ob das postulierte Signalmolekül hitzestabil ist. Die Anzucht des Donors in den verschiedenen Medien bzw. Zellüberständen wurde doppelt (Kolben a und b) durchgeführt. Außerdem wurde der Konjugationsansatz (1 ml) zum Zeitpunkt t₀ parallel auf zwei Selektionsagarplatten ausplattiert, um die Anzahl an Transkonjuganten zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.11 zusammengefasst.

Medium (Donor-Anzucht vor Rezipient-Zugabe)	Start- OD ₅₈₀	Kolben	Transkonjuganten [Bakterien / ml]		
			Platte 1	Platte 2	Mittel
C-Medium	0,2	a	0	0	0
		b	0	0	0
Rezipienten-Überstand	0,05	a	4	1	2,5
		b	6	4	5
	0,2	a	22	77	49,5
		b	101	209	155
	0,8	a	427	262	345
		b	70	54	62
Rezipienten-Überstand, 100 °C	0,2	a	19	31	25
		b	6	9	7,5
Rezipienten-Überstand, 120 °C (Autoklav)	0,2	a	3	8	5,5
		b	0	1	0,5

Tabelle 4.11: Transfer von pCM2 nach Anzucht des Donors in verschiedenen Rezipienten-Überständen. Transkonjugantentiter [Bakterien / ml] nach Anzucht des Donors in unterschiedlich behandelten, sterilfiltrierten Rezipienten-Überständen und in C-Medium.

Es ist zu erkennen, dass die Anzahl der entstehenden Transkonjuganten anscheinend von der Zelldichte des Rezipienten in der Kultur, aus welcher der Überstand für die Donor-Anzucht gewonnen wurde, abhängt. Wird der Überstand einer Rezipienten-Kultur mit einer geringen Start-OD₅₈₀ von 0,05 zur Anzucht des Donors verwendet, können nur durchschnittlich 2-5 Transkonjuganten pro Platte beobachtet werden. Bei einer höheren Start-OD₅₈₀ des Rezipienten von 0,2 bzw. 0,8 können durchschnittlich 50 bis 345 Transkonjuganten pro Platte protokolliert werden. Vielleicht ist dies auf eine höhere Konzentration des postulierten Signalmoleküls zurückzuführen. Auch die Tatsache, dass eine im Vergleich

zum Donor 10-fach geringere Rezipienten-Konzentration (Tab. 4.5) einen negativen Effekt auf die Transfereffizienz von pCM2 hat, unterstützt die Theorie, dass eine bestimmte Konzentration des postulierten Signalmoleküls für einen effektiven Transfer erforderlich ist. Auffallend ist, dass die Transkonjugantentiter, die aus den doppelt durchgeführten Experimenten (Kolben a und b) resultieren, sehr stark schwanken. Nach Anzucht des Donors im Rezipienten-Überstand mit einer Start- OD_{580} von 0,8 ist die Anzahl der Transkonjuganten, die aus Kolben a stammen, mehr als fünfmal so hoch wie die Anzahl in Kolben b. Auch die Anzahl der Transkonjuganten, die auf den parallel ausplattierten Agarplatten (Platten 1 und 2) entstanden sind, können bis zu einem Faktor von 4 variieren. Dies ist vielleicht damit zu erklären, dass das Zusammentreffen von Donor- und Rezipientenzelle sowohl in Flüssigkultur, als auch auf Festmedium ein zufälliges Ereignis ist, das trotz gleicher Zellzahl von Donor und Rezipient in den Kulturen nicht gleich häufig passiert.

Die Anzucht der Donorzellen im Rezipienten-Überstand, der für 20 Minuten aufgeköcht worden ist, führt zu einer Reduzierung der Transkonjuganten-Anzahl um den Faktor 2-20. Wird der Rezipienten-Überstand für 20 Minuten auf 120°C erhitzt, dann ist die Anzahl der entstehenden Transkonjuganten durchschnittlich sogar um den Faktor 35 reduziert. Das angenommene Signalmolekül scheint also nicht vollkommen hitzestabil zu sein.

Um das hypothetische Signalmolekül genauer zu charakterisieren, wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung des Rezipienten-Überstands ($\text{Start-}OD_{580} = 0,2$) durchgeführt. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend für die Anzucht des Donors verwendet. Um zu testen, in welcher Fraktion sich das gesuchte Molekül befindet, wurden mit diesen Donorzellen Kreuzungsexperimente durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.12 aufgelistet. Das Signalmolekül scheint bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 40 bis 50 % auszufallen, da nur nach Anzucht des Donors in dieser Fraktion des Rezipienten-Überstands Transkonjuganten beobachtet werden konnten. Allerdings ist ihre Anzahl mit durchschnittlich 4 Transkonjuganten pro Platte wesentlich geringer als bei Anzucht des Donors im ungefällten Rezipienten-Überstand (durchschnittlich 68 Transkonjuganten / Platte). Vielleicht ist die Konzentration des Signalmoleküls durch den Fällungsprozess stark verringert worden, so dass es zu weniger Transferereignissen gekommen ist. Da der gefällte Überstand nicht dialysiert worden ist, kann das im Überstand verbliebene Ammoniumsulfat auch osmotische Effekte haben und so die Zellen beeinflussen.

Medium (Donor-Anzucht vor Rezipient-Zugabe)	Fraktion % Ammonium- sulfat	Kolben	Transkonjuganten [Bakterien / ml]		
			Platte 1	Platte 2	Mittel
Rezipienten-Überstand ungefällt		a	58	53	55,5
		b	93	69	81
Rezipienten-Überstand	0 - 40 %	a	0	0	0
		b	0	1	0,5
	40 - 50 %	a	6	3	4,5
		b	4	4	4
	50 - 60 %	a	0	0	0
		b	0	0	0
	60 - 100 %	a	0	0	0
		b	0	0	0

Tabelle 4.12: Transfer von pCM2 nach Anzucht des Donors in Fraktionen des Rezipienten-Überstands. Transkonjugantentiter [Bakterien / ml] nach Anzucht des Donors in verschiedenen Ammoniumsulfat-Fällung-Fractionen des sterilfiltrierten Rezipienten-Überstands. Start-OD₅₈₀ = 0,2.

Abschließend ist festzuhalten, dass die hier durchgeführten Experimente erste Versuche waren, die Anwesenheit eines Signalmoleküls zu untersuchen. Problematisch ist die stark schwankende Anzahl entstehender Transkonjuganten in parallel durchgeführten Experimenten. Die ermittelten Ergebnisse liefern also nur erste Indizien dafür, dass es ein Signalmolekül geben könnte, weitere Untersuchungen müssen dies bestätigen.

4.3 Identifizierung und Inaktivierung von potentiellen Transfergenen auf pCM2

Im Rahmen des Genomprojekts von *Cmm* konnte auf pCM2 eine Region mit 15 Genen identifiziert werden, denen durch Homologievergleich der Aminosäuresequenz mittels PSI-Blast teilweise eine hypothetische Funktion in der Konjugation von pCM2 vorhergesagt werden konnte (Tabelle 2.2, S. 17). Die Region, die aus einem 14 Gene umfassenden hypothetischen Operon und dem gegensätzlich orientierten *traA*-Gen besteht, könnte die Transferregion von pCM2 sein (Abb. 4.11). Ein Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung dieser potentiellen Transferregion. Über die Inaktivierung einzelner Gene dieser Region sollte ihre Relevanz für den Plasmidtransfer untersucht werden.

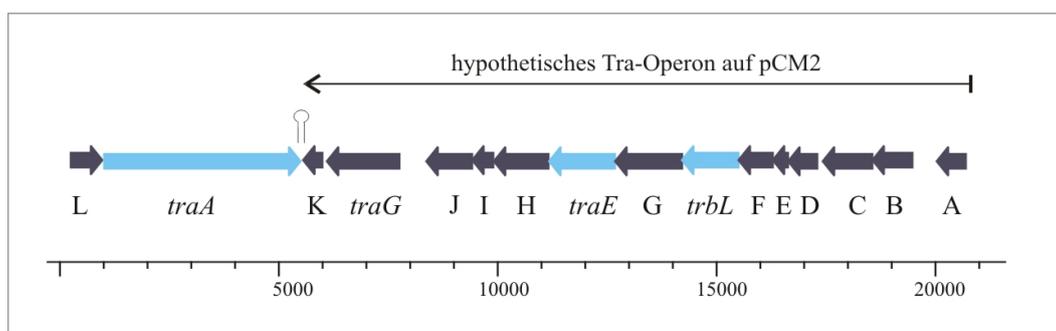


Abbildung 4.11: Physikalische Karte der hypothetischen Transferregion von pCM2: *orfA* bis *orfL* mit den Buchstaben A-L abgekürzt. Hypothetischer Terminator und vermutetes Tra-Operon sind dargestellt. Blau: Gene der hypothetischen Transferregion, türkis: in dieser Arbeit durch Kassettenmutagenese inaktivierte Gene.

4.3.1 Sequenzanalyse des TraA-Proteins von *Cmm*

Von besonderem Interesse war die Inaktivierung des *traA*-Gens, da Sequenzanalysen (PSI-Blast) Homologie zu zum Teil bereits charakterisierten TraA-Proteinen aus anderen Gram-positiven Bakterien zeigten. Die Nomenklatur wurde dabei vom Ti-Plasmid übernommen. TraA vom konjugativen Transfersystem des Ti-Plasmids weist sowohl eine Nickase als auch eine Helicase-Aktivität auf (Alt-Mörbe et al., 1996). Das putative aus 1492 Aminosäuren bestehende TraA-Protein von *Cmm* ist in einem Bereich von 1116 Aminosäuren zu 36% identisch mit dem TraA-Protein von *Rhodococcus erythropolis* AN12.

Das *traA*-Gen ist auf dem ca. 400 kb großen Megaplasmid pREA400 lokalisiert (Acc.-Nr.: ABF48485). Für TraA von pREA400 konnte bereits gezeigt werden, dass es für die Konjugation essentiell ist. Die Inaktivierung des *traA*-Gens von pREA400 durch Insertion einer Antibiotikumresistenzgen-Kassette hatte den Verlust der Konjugationsfähigkeit von pREA in den Stamm SQ1 zur Folge (Yang et al., 2007). Auch die TraA-ähnlichen Proteine von *Arthrobacter aurescens* (GenID: AAur_pTC10121 (Acc.-Nr.: AAS20144) und AAur_pTC10080 (Acc.-Nr.: ABM10507)) sind in einem Bereich von 1084 Aminosäuren bzw. 1015 Aminosäuren zu 45 % bzw. 40 % identisch mit dem TraA-Protein von *Cmm*. Die TraA-Proteine von *Gordonia westfalica* (Acc.-Nr.: CAE09129) auf dem 101 kb Megaplasmid pKB1 (Broeker et al., 2004) und von *Corynebacterium glutamicum* (Acc.-Nr.: CAD12223) auf dem Plasmid pCG4 (Tauch et al., 2003) sind in einem Bereich von 1176 AS bzw. 975 AS zu 34 % bzw. 32 % identisch mit TraA von *Cmm*.

Die Suche nach konservierten Domänen zeigt, dass TraA sowohl eine Relaxase als auch eine Helicase-Domäne besitzt (Marchler-Bauer et al., 2005). TraA zeigt im Bereich der Aminosäuren 522-929 Ähnlichkeit zu ATP-abhängigen Helicasen des RecD-Typs. Vergleiche mit den bekannten Helicase-Consensus-Sequenzen (Hall and Matson, 1999) weisen darauf hin, dass die Helicase-Domäne von TraA von *Cmm* zum Superfamilie-I-Typ (SFI) der Helicasen gehört. Wie in Abbildung 4.12 zu sehen, sind die meisten Aminosäurereste der einzelnen Motive mit einigen Ausnahmen sehr konserviert.

Cmm	577	VGIGFAGAGKT	587	604	MIGLAPSA	611	652	LVVDEAG	658	679	VRLIGDDRQ	687
A. aures.	595	VGIGAAGTGKS	605	622	VIGLAPSA	629	677	VIVDEAG	683	704	VRLIGDDRQ	712
G. westf.	627	LVLAFAAGTGKT	637	654	LIGLAPTA	661	745	VVVDEAG	751	772	VRLVGDQQQ	780
R. eryth.	610	VGVGFAAGTGKT	620	637	VIALAPSA	644	691	LLVDEAS	697	718	VRLIGDPNQ	726
C. glut.	468	VVLAFAAGAGKT	478	495	VIGLAPTG	502	547	IIVVDEAG	553	574	VVLVGDPPYQ	582
Consensus	(I)	++xGxAGoGKS		(IA)	xx+xxxoo		(II)	+++DExo		(III)	++++GDxoQ	
		A P T										
Cmm	776	APTGATVT	783	881	ARTISRSQGLTADTS	895	910	TGLTRGKQ	917			
A. aures.	802	APTNESSQ	809	908	ALTTTIRAQGMTRDAG	922	937	VAATRGRD	944			
G. westf.	867	AATRDTVN	874	972	ASTTIFAQGMATDTC	986	1001	VAMTRGRH	1008			
R. eryth.	814	LSTRDDVR	821	922	AATVRSQGLTVDTS	936	951	VATRGRRT	958			
C. glut.	675	ASTHDYVD	682	780	ASTGFAAQGATVDVA	794	810	VPLTRGRE	817			
Consensus	(IV)	xx+xooxR		(V)	xxT+xxxQG+o+ooV		(VI)	VA+TRxoo				
				S	K	I						

Abbildung 4.12: TraA-Alignment - Helicase - Domäne: Alignment von TraA-Proteinen aus Actinomyceten und den Consensus-Sequenz-Motiven (I, IA, II, III, IV, V und VI) der Helicase Superfamilie Typ I (Hall and Matson, 1999). In der Consensus-Sequenz sind hydrophobe, hydrophile und nicht-spezifische AS-Reste mit +, o und x dargestellt. Acc.-Nr.: *Cmm* TraA (CAM98494), *A. aurescens* TraA (AAS20144), *G. westfalica* TraA (CAE09129), *R. erythropolis* TraA (ABF48485), *C. glutamicum* TraA (NP_862296).

In Motiv III scheint die zweite hydrophobe Aminosäure in vielen Actinomyceten durch ein hydrophiles Arginin ersetzt zu sein. Ebenso wird die dritte hydrophobe Aminosäure des Motivs IV gegen ein hydrophiles Threonin ausgetauscht (Yang et al., 2007). Außerdem unterscheidet sich TraA von *Cmm* am Anfang des letzten Motivs (VI) von der Consensus-Sequenz und auch von der konservierten Sequenz der anderen Actinomyceten. Das Motiv beginnt im TraA-Protein von *Cmm* mit Threonin und Glycin, während die Consensus-Sequenz mit Valin und Alanin startet.

Der N-terminale Bereich von TraA weist die Relaxase-Domäne auf. Das Alignment der ersten 360 Aminosäuren des TraA-Proteins zeigt, dass bezogen auf den N-Terminus TraA von pCM2 zu 53 % bzw. 40 % mit TraA von *Arthrobacter aureescens* (Acc.-Nr.: AAS20144) bzw. *Rhodococcus erythropolis* (Acc.-Nr.: ABF48485) identisch ist. Des Weiteren zeigt TraA von *Cmm* Homologie (41 %) zur katalytischen Core-Domäne einer DNA-Primase von *Norcardiodes* sp. JS614 (Acc.-Nr.: ABL79516). Neben der Relaxase Funktion in der Donorzelle könnte TraA vielleicht auch eine Primase-Funktion in der Rezipienten- bzw. Transkonjuganten-Zelle übernehmen.

Die Analyse der ersten 60 Aminosäuren von TraA ließ erkennen, dass TraA von *Cmm* auch die von Yang et al. (2007) kürzlich beschriebenen neuen Consensus-Motiv I (+T+Hx+x+GxGYxY+oxxx+xxD) und IA (LxoYYxxxGxxPGxWxGxG+xx+) für Relaxasen von Actinomyceten aufweist. In der Consensus-Sequenz sind hydrophobe, hydrophile und nicht-spezifische AS-Reste mit folgenden Symbolen +, o bzw. x dargestellt. In Abbildung 4.13A ist das Alignment der ersten 60 Aminosäuren von TraA-Proteinen aus verschiedenen Actinomyceten verglichen mit den Sequenzen von TraI des F-Faktors (Frost et al., 1994) und von TrwC von R388 (Llosa et al., 1994) und die von Yang et al. (2007) beschriebene Consensus-Sequenz der Motive I und IA zu sehen. In der Sequenz von TraI von RP4 ist das Motiv IA nicht zu finden, während die anderen Motive vorhanden sind. Besonders bei der Betrachtung der Motive II und III wird deutlich, dass TraA von *Cmm* der TraI-Relaxase vom F-Faktor und der TrwC-Relaxase von R388 ähnelt (Abb. 4.13B). Auch die von Larkin et al. (2005) durch Kristallstruktur-Analysen bestimmten Schlüssel-Aminosäuren (Y16, D81, H146, H157 und H159) des aktiven Zentrums von TraI des F-Faktors sind in der Aminosäuresequenz von TraA von *Cmm* zu finden. Es ist für viele Relaxasen von Konjugationssystemen beschrieben, dass der Tyrosin-Rest (Y16) für die Transesterungs-Reaktion und den nucleophilen Angriff auf das Phosphatrückgrat der DNA am *oriT* verantwortlich ist, so dass eine kovalente Bindung zwischen dem 5'-Ende des DNA-Moleküls und der Relaxase entsteht und der Transfer des Einzelstrangs beginnen kann.

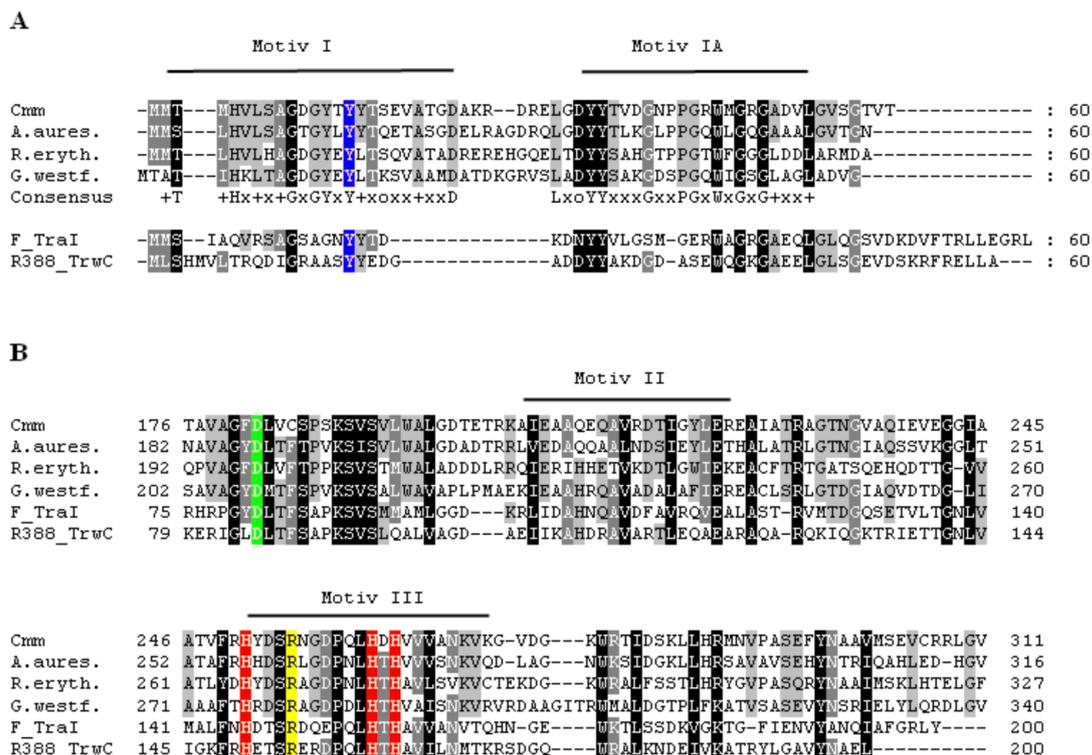


Abbildung 4.13: TraA-Alignment - Relaxase-Domäne: Alignment des N-Terminus von TraA-Proteinen verschiedener Actinomyceten verglichen mit TraI vom F-Faktor und TrwC von R388. In der Consensus-Sequenz sind hydrophobe, hydrophile und nicht-spezifische AS-Reste mit +, o und x dargestellt. Acc.-Nr.: *Cmm* TraA (CAM98494), *A. aurescens* TraA (ASS20144), *R. erythropolis* TraA (ABF48485), *G. westfalica* TraA (CAE09129), *E. coli* F TraI (AAC44186), *E. coli* TrwC (CAA44853). A: Alignment der ersten 60 Aminosäuren; B: Alignment der Motive II und III.

4.3.2 Konstruktion von pCM2-Mutanten durch Insertionsmutagenese

Um ein bekanntes Gen gezielt zu inaktivieren, wird die gerichtete Kassettenmutagenese verwendet. Dazu wird das komplette Gen oder nur ein Teil davon in einen *E. coli*-Kloniervektor kloniert. Über Restriktionsschnittstellen, die sich im zu inaktivierenden Gen befinden, wird eine Antibiotikumresistenz-Kassette in das Gen inseriert. Dabei kann es auch zu kleineren Deletionen im Gen kommen. Für die Konstruktion der pCM2-Mutanten wurden zum einen die Spectinomycinresistenzgen-Kassette (*add9*) aus *Enterococcus faecalis* (LeBlanc et al., 1991) und zum anderen die Chloramphenicolresistenzgen-Kassette (*cmx*, Chloram-

phenicalexporter) aus *Corynebacterium striatum* (Tauch et al., 1998) verwendet. Mit Hilfe der Elektroporation wurden die Mutageneseplasmide in Zellen des *Cmm*-Wildtypstamms NCPPB382 transferiert. Da die Mutageneseplasmide auf der Basis von pUC-Vektoren konstruiert wurden, sind sie in *Cmm*-Zellen nicht replikativ (Suicide-Vektor). Die Antibiotikaresistenz kann also nur durch Integration ins Chromosom oder in eines der Plasmide in *Cmm* etabliert werden. Über ein *single crossover*, bei dem nur ein das Gen flankierender homologer Bereich durch homologe Rekombination zwischen dem klonierten Fragment und dem Chromosom bzw. Plasmid ausgetauscht wird, kann es zu einer Kointegratbildung zwischen Mutageneseplasmid und Chromosom bzw. Plasmid kommen. Für einen exakten Austausch des intakten Gens durch das inaktivierte Gen auf dem Mutageneseplasmid, ist ein weiteres Rekombinationsereignis (*double crossover*) im anderen das Gen flankierenden Bereich notwendig.

Durch Southern-Hybridisierung gegen die pUC-DNA als Sonde wurden die antibiotikumresistenten Klone zunächst daraufhin untersucht, ob sie durch ein singuläres oder ein doppeltes Rekombinationsereignis entstanden sind. Zur weiteren Analyse wurde die Gesamt-DNA der Klone, die keinen Vektoranteil zeigten, gegen die genspezifische Sonde hybridisiert. Da die pCM2-Mutanten basierend auf Zellen des Wildtypstamms *Cmm382* konstruiert worden sind, sollte auch das mit 27,4 kb kleinere der *Cmm*-Plasmide pCM1 vorhanden sein. Durch Amplifikation des auf pCM1 lokalisierten *celA*-Gens mittels PCR wurde pCM1 in den Zellen aller pCM2-Mutanten indirekt nachgewiesen. Ein weiterer Nachweis wurde durch Southern-Hybridisierung der isolierten Plasmid-DNA gegen das *celA*-Gen als Sonde erbracht. Die Konstruktion der Mutageneseplasmide und die Resultate der Southern-Hybridisierungen sind in den nächsten Abschnitten detailliert beschrieben.

Inaktivierung des *traA*-Gens

TraA von *Cmm* besteht aus 1492 Aminosäuren, weist sowohl ein Helicase- als auch ein Relaxase-Domäne auf und könnte somit das Initiatorprotein für den konjugativen Transfer von pCM2 sein. Durch die gezielte Inaktivierung des *traA*-Gens und spätere phänotypische Analysen, sollte untersucht werden, ob TraA für einen erfolgreichen Transfer von pCM2 essentiell ist.

Für die Konstruktion eines Mutageneseplasmids zur Inaktivierung des *traA*-Gens wurde der pCM2 Subklon pUC::4,6B2, der das 4595 bp große *Bgl*II-Fragment von pCM2 trägt, verwendet. Auf diesem in den pUC13 klonierten *Bgl*II-Fragment befindet sich der größte Teil des *traA*-Gens (nt 9307 - 13752) (Zellermann, unveröffentlicht).

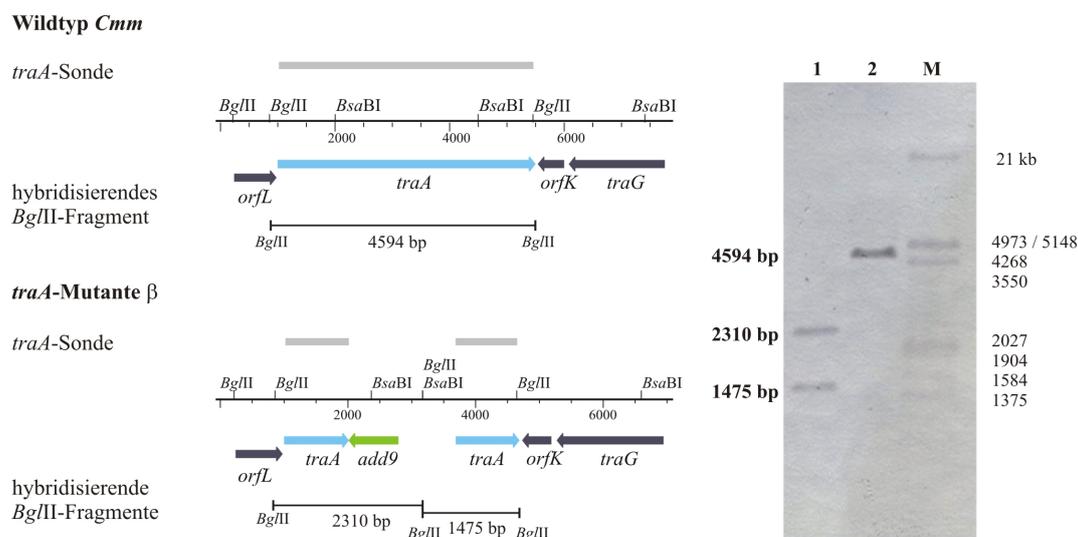


Abbildung 4.14: Konstruktion der *traA*-Mutante: Physikalische Karte und Southern-Hybridisierung *Bgl*II-gespaltener G-DNA der *traA*-Mutante und vom Wildtyp gegen die *traA*-Sonde. 1: *traA*-Mutante, 2: Wildtyp, M: λ -Marker *Eco*RI/*Hind*III gespalten.

Zur Inaktivierung von *traA* wurde das interne 2,5 kb große *Bsa*BI-Fragment deletiert und durch ein 1,68 kb großes *Eco*RV-Fragment des Vektors pAKS1 mit der Spectinomycinresistenz-Kassette (*add9*) ersetzt. In dem so konstruierten Mutageneseplasmid pBATraA β ist die Spectinomycinresistenzgen-Kassette entgegengesetzt zum *traA*-Gen orientiert (Abb. 6.4, S. 159).

Die durch ein doppeltes Rekombinationsereignis entstandenen potentiellen Mutanten wurden durch Southern-Hybridisierung gegen das *traA*-Gen (4,6 kb *Eco*RI/*Hind*III Fragment des pCM2 Subklons pUC::4,6B2) und die Spectinomycinresistenzgen-Kassette als Sonden näher charakterisiert. Bei erfolgreicher Insertion der Antibiotikumresistenz-Kassette unterscheiden sich die Hybridisierungsmuster der mit *Bgl*II hydrolysierten Gesamt-DNA von Mutante und Wildtyp. Die Abbildung 4.14 zeigt, dass bei der Hybridisierung gegen die genspezifische Sonde im Wildtyp nur ein hybridisierendes Fragment der Größe 4,6 kb zu erwarten ist, während im Fall der Mutante zwei Fragmente (2,3 kb und 1,5 kb) hybridisieren. Die tatsächlich entstandenen Hybridisierungsmuster sind ebenfalls in Abbildung 4.14 zu sehen und stimmen mit den errechneten überein. Auch die Hybridisierung gegen die Spectinomycinresistenz-Kassette als Sonde (Daten nicht gezeigt) bestätigte, dass es sich um eine korrekte Mutante handelt, die nun in Konjugationsexperimenten auf die Transferierbarkeit von pCM2 untersucht werden konnte.

Inaktivierung des *trbL*-Gens

Neben der Inaktivierung des außerhalb des hypothetischen Tra-Operons liegenden *traA*-Gens, sollten auch Gene des hypothetischen Operons inaktiviert werden (Abb. 4.11, S. 96). Das *trbL*-Gen ist das siebte Gen des Operons. Aminosäuresequenz-Analysen von TrbL zeigten, dass TrbL im Bereich der Aminosäuren 83 bis 280 zu 32 % identisch ist zu einem hypothetischen Protein des Transferkomplexes von *Arthrobacter nicotinovorans* (Acc.-Nr.: CAD47985). In einem kurzen Bereich (AS 186-280) zeigt die von *trbL* abgeleitete Aminosäuresequenz Homologie (34 %) zum TrbL-Protein des Transferkomplexes von *Rhodococcus equi* (Acc.-Nr.: BAB16649) (Alignment: Abb. 6.7, S. 164). Da für das TrbL-Protein von *Cmm* sechs Transmembranhelices vorhergesagt werden, ist eine Beteiligung an der Bildung des *mpf*-Komplexes wahrscheinlich. Von daher waren auch die Inaktivierung des hypothetischen *trbL*-Gens von *Cmm* und die Untersuchung des Einflusses von TrbL auf die Konjugation sehr interessant.

Für die Herstellung einer Insertionsmutation im *trbL*-Gen von pCM2 wurde ein Mutageneseplasmid basierend auf dem pCM2 Subklon pUC::7,7B2 konstruiert. Dieses Plasmid pUC::7,7B2 enthält das 7,7 kb große *Bgl*II-Fragment (nt 21075-28741) von pCM2, auf dem sich ein großer Teil der hypothetischen Tra-Operons (*orfA* - *orfG*) von pCM2 befindet (Zellermann, unveröffentlicht). Die *Bgl*II-Schnittstellen liegen innerhalb des *orfA* bzw. *orfG*, so dass sich nur das Ende bzw. der Anfang dieser Gene auf dem Subklon pUC::7,7B2 befindet. Über eine singuläre *Eco*RV-Schnittstelle im *trbL*-Gen wurde die 1,7 kb große Spectinomycinresistenzgen-Kassette aus dem Vektor pAKS1 (*Eco*RV-Fragment) in das Gen inseriert. In den so entstandenen Mutageneseplasmiden pBATrbl α und pBATrbl β befindet sich die Antibiotikumresistenzgen-Kassette in gleicher bzw. in gegensätzlicher Orientierung zum *trbL*-Gen (Abb. 6.4, S. 159).

Die potentiellen Mutanten, die nach der Southern-Hybridisierung mit der pUC-DNA als Sonde, keinen Vektoranteil zeigten, also durch ein doppeltes Rekombinationsereignis entstanden sind, wurden weiter charakterisiert. Dazu wurde die Gesamt-DNA mit den Restriktionsenzymen *Sma*I bzw. *Xho*I hydrolysiert und gegen die genspezifische *trbL*-Sonde (2,2 kb *Not*I / *Hind*III Fragment aus pCM2 Subklon pUC::7,7B2) und die Spectinomycinresistenzgen-Kassette als Sonde hybridisiert. Bei exakter Insertion der Resistenzgen-Kassette unterscheiden sich die Hybridisierungsmuster von Mutante und Wildtyp.

Abbildung 4.15 zeigt die errechneten Größen der mit den jeweiligen Sonden hybridisierenden Fragmente. Die *trbL*-Sonde hybridisiert im Wildtyp mit einem 6,4 kb *Sma*I Fragment, während in der Mutante ein 8 kb großes *Sma*I-Fragment hybridisiert. Bei der *Xho*I ge-

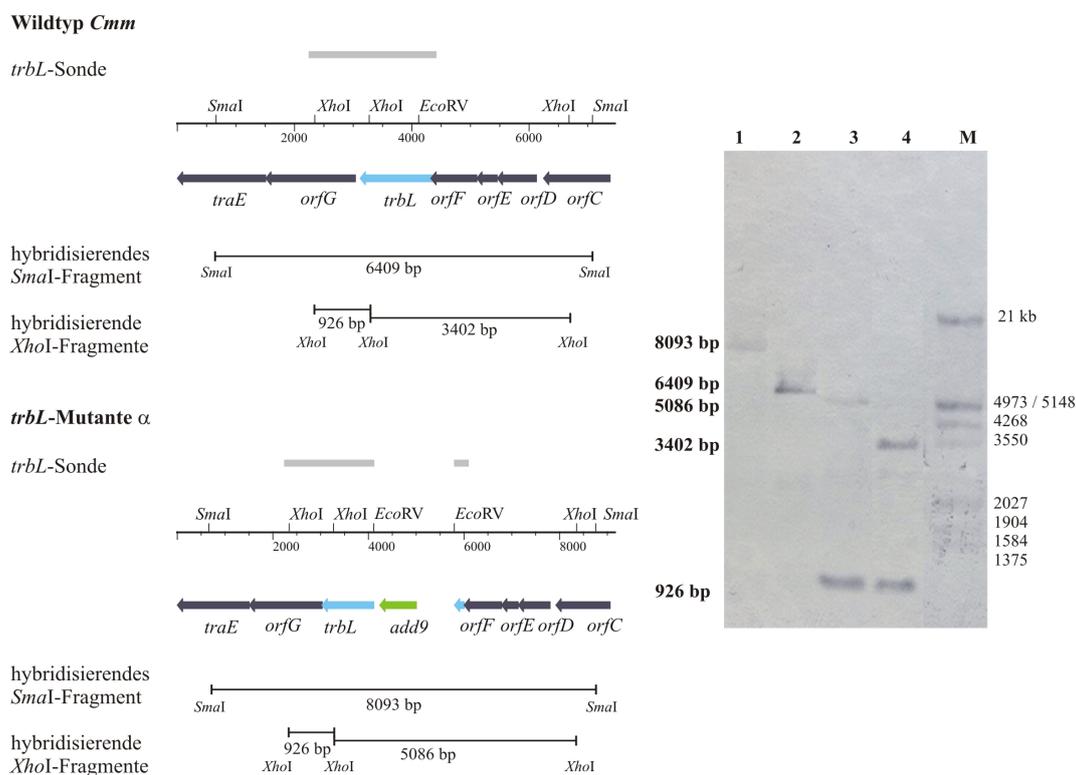


Abbildung 4.15: Konstruktion der *trbL*-Mutante: Physikalische Karte und Southern-Hybridisierung *SmaI* bzw. *XhoI*-gespaltener G-DNA der *trbL*-Mutante und des Wildtyps gegen die *trbL*-Sonde. 1: *trbL*-Mutante (*SmaI*), 2: Wildtyp (*SmaI*), 3: *trbL*-Mutante (*XhoI*), 4: Wildtyp (*XhoI*) M: λ -Marker *EcoRI*/*HindIII* gespalten.

spaltenen Gesamt-DNA hybridisiert im Wildtyp ein 0,9 kb und ein 3,4 kb *XhoI*-Fragment, wohingegen in der Mutante neben dem 0,9 kb Fragment ein 5 kb Fragment hybridisiert. Wie in Abbildung 4.15 zu sehen ist, stimmen die errechneten Größen der hybridisierenden Fragmente mit den tatsächlich entstandenen überein. Auch die Hybridisierung (Daten nicht gezeigt) gegen die Spectinomycinresistenzgen-Kassette als Sonde bestätigte, dass es sich um eine korrekte Mutante handelt, die nun in Konjugationsexperimenten, wie z. B. Filterkreuzungsexperimenten analysiert werden kann.

Inaktivierung des *traE*-Gens

Das *traE*-Gen ist das neunte Gen des hypothetischen Operons (Abb. 4.11, S. 96) und wurde ebenfalls durch Insertion einer Antibiotikumresistenzgen-Kassette inaktiviert. Homologievergleiche der Aminosäuresequenz mittels PSI-Blast haben gezeigt, dass das aus 501 Aminosäuren bestehende TraE von *Cmm* Ähnlichkeit zu ATP-bindenden Proteinen

anderer Actinomyceten aufweist. ATP-bindende Proteine von *Arthrobacter nicotinovorans* (Acc.-Nr.: CAD47983), *Micrococcus* sp. 28 (Acc.-Nr.: AAK62515) und *Rhodococcus equi* (Acc.-Nr.: AAG21741) sind zu 33 %, 30 % und 28 % identisch zu TraE von *Cmm*. Des Weiteren ist TraE von *Cmm* in einem Bereich von 443 Aminosäuren bzw. 359 Aminosäuren zu 26 % bzw. 23 % identisch zur VirB4-ATPase des Type-IV-Sekretions-Systems von *Frankia* sp. CcI3 (Acc.-Nr.: ABD09428) und von *Brevibacterium linens* BL2 (Acc.-Nr.: ZP_00381005). Das Alignment der Proteinsequenz (Abb. 6.6, S. 163) zeigt, dass TraE über das Nucleotidbinde-Motiv A (Walker A: GXXXXGKT(S)) verfügt.

Zur Konstruktion einer Mutation im *traE*-Gen auf pCM2 stand aus dem Sequenzierungsprojekt von *Cmm* NCPB382 das Plasmid cmis1p0198F11 mit einem 1,2 kb großen pCM2-Fragment, auf dem sich die hintere Hälfte (nt 19451-20268) des *traE*-Gens befindet, zur Verfügung. Auf der Basis dieses Sequenzierplasmids wurde ein Mutageneseplasmid konstruiert. Dazu wurde eine Chloramphenicolresistenzgen-Kassette (1,9 kb-großes *Bsa*AI-Fragment von pEC70) in die singuläre *Nru*I Schnittstelle des *traE*-Gens inseriert. In dem Mutageneseplasmid pBATraE α liegt das *cmx*-Gen in der gleichen Orientierung wie das *traE*-Gen (Abb. 6.4, S. 159).

Die Gesamt-DNA der potentiellen Mutanten, die keinen Vektoranteil zeigten, wurde mit dem Restriktionsenzym *Pst*I hydrolysiert und gegen die genspezifische *traE*-Sonde (856 bp *Eco*RI / *Xho*I-Fragment aus cmis01p198F11) und das *cmx*-Gen als Sonde hybridisiert. Im Wildtyp hybridisiert ein 5,9 kb großes *Pst*I-Fragment, während in der Mutante bei exakter Insertion der *cmx*-Kassette zwei *Pst*I-Fragmente (2,7 kb und 5 kb) mit der Zielgen-Sonde hybridisieren. Die Southern-Hybridisierung zeigt, dass die errechneten Größen der hybridisierenden Fragmente mit den tatsächlich entstandenen übereinstimmen (Abb. 4.16).

Auch die Hybridisierung gegen das *cmx*-Gen als Sonde (Daten nicht gezeigt) bestätigte, dass es sich um eine korrekte Mutante handelt, die in Konjugationsexperimenten auf die Transferierbarkeit von pCM2_{*traE*} untersucht werden konnte.

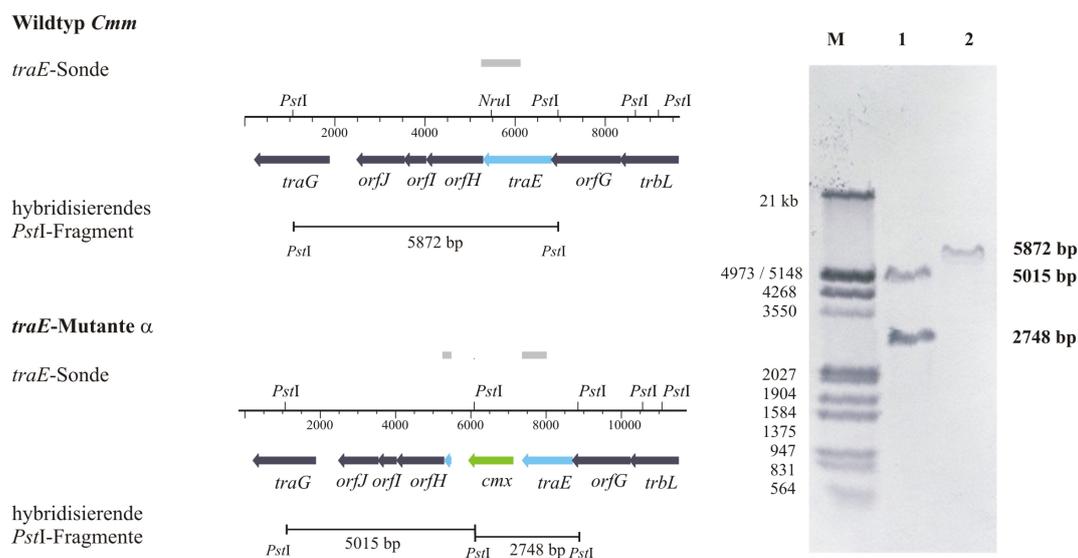


Abbildung 4.16: Konstruktion der *traE*-Mutante: Physikalische Karte und Southern-Hybridisierung *Pst*I-gespaltener G-DNA der *traE*-Mutante und vom Wildtyp gegen die *traE*-Sonde. M: λ -Marker *Eco*RI/*Hind*III gespalten, 1: *traE*-Mutante, 2: Wildtyp.

4.3.3 Phänotypische Analyse der pCM2-Mutanten

Wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, wurden *Cmm*-Stämme konstruiert in denen verschiedene, potentiell für den Plasmidtransfer wichtige pCM2-Gene durch Insertion von Antibiotikaresistenzgen-Kassetten inaktiviert worden sind. Um zu überprüfen, ob die Inaktivierung dieser Gene eine Auswirkung auf den Transfer von pCM2 hat, wurden diese Mutanten in Kreuzungsexperimenten sowohl *in planta* als auch durch *filter matings* analysiert.

traA-Mutante - Test auf Plasmidtransfer

In der *traA*-Mutante wurde das *traA*-Gen von pCM2, das für ein Protein mit Relaxase- und Helicase-Domäne und somit wahrscheinlich für das Initiator-Enzym des konjugativen DNA-Transfers codiert, durch die Insertion einer Spectinomycinresistenzgen-Kassette inaktiviert. Um zu testen, ob die Inaktivierung dieses Gens einen Einfluss auf die Transferierbarkeit von pCM2 hat, wurde zunächst ein Konjugationsexperiment in der Wirtspflanze Tomate durchgeführt. Dazu wurde die *traA*-Mutante als Donor und der weiße, plasmidfreie Stamm CMM100white_{Cm} als Rezipient eingesetzt. Da der weiße Rezipient chloramphenicolresistent ist und das pCM2 des Donors eine Spectinomycinresistenz trägt, können sich auf Agarplatten, die diese beiden Antibiotika enthalten, nur die Rezipientenzellen vermehren, die das pCM2 vom Donor erhalten haben. Als Kontrolle diente bei diesem Experiment eine

Konjugationsansatz			Anzahl an Pflanzen				
Donor	Rezipient		infiziert	Donor isoliert	Rezipient isoliert	Donor+Rezipient isoliert	Transkonj. isoliert
<i>traA</i> -Mut.	weiß	1:1	24	4	23	4	0*
		2:1	16	7	16	6	0*
CMM102 _{Nm}	weiß	1:1	26	25	22	22	21 (95,5 %)
		2:1	17	17	15	15	15 (100 %)

Tabelle 4.13: Phänotypische Untersuchung der *traA*-Mutante *in planta*. Anzahl an Pflanzen, aus denen Donor-, Rezipienten- bzw. Transkonjugantenzellen isoliert werden konnten. * Nachweisgrenze: 500 Transkonjuganten / 1 ml Xylemsaft. Es wurden jeweils 32 Pflanzen untersucht. Getestete Mengenverhältnisse von Donor und Rezipient: 1:1 und 2:1.

Doppelinfektion von Pflanzen mit dem Stamm CMM102_{Nm} als Donor, dessen pCM2 mit einer Neomycinresistenzgen-Kassette markiert ist, und dem weißen Stamm als Rezipienten. Auf Agarplatten, die Neomycin und Chloramphenicol enthalten, können also nur Transkonjuganten und spontanresistente Zellen wachsen. Jeweils 32 zwei Wochen alte Pflanzen wurden mit dem Gemisch (1:1) aus Donor und Rezipient (10^9 Bakterien/ml) infiziert. Nach ca. zwei Wochen wurde durch Auftropfen des Xylemsafts dieser Pflanzen auf entsprechende Selektionsmedien der Anteil an Pflanzen bestimmt, in denen Transkonjuganten entstanden sind. Nach der Reisolierung der Bakterien aus den 32 Pflanzen stellte sich heraus, dass nur 50 % bis 81 % der Pflanzen tatsächlich infiziert waren. Dies könnte damit zu erklären sein, dass die Methode der Wurzelinfektion keine kontrollierte und immer gleich dosierte Infektion der Pflanzen ermöglicht. Tabelle 4.13 zeigt die Anzahl an Pflanzen, aus deren Xylemsaft spectinomycinresistente, chloramphenicolresistente und doppeltresistente Zellen reisoliert werden konnten. Zur Berechnung des prozentualen Anteils der Pflanzen aus denen Transkonjuganten isoliert werden konnten, wurden nur die Pflanzen herangezogen, aus denen sowohl Donor- als auch Rezipientenzellen reisoliert werden konnten.

Aus den Pflanzen, die mit dem Gemisch aus der *traA*-Mutante und dem weißen Stamm infiziert wurden, konnten keine Transkonjuganten isoliert werden. Da $2 \mu\text{l}$ Xylemsaft aufgetropft wurden, lag die Nachweisgrenze bei 500 Transkonjuganten pro 1 ml Xylemsaft. Allerdings zeigte sich auch, dass am Ende dieses Experiments (9-12 Tage nach Infektion der Pflanzen) in vielen Pflanzen die *traA*-Mutante von dem weißen Rezipienten scheinbar verdrängt worden ist. Bei der Infektion der Pflanzen mit doppelt so vielen Donorzellen, wie Rezipientenzellen (2:1) konnten am Ende des Experiments aus 7 von 16 tatsächlich

infizierten Pflanzen Donorzellen isoliert werden, Transkonjuganten waren aber auch hier nicht zu beobachten. Dagegen waren aus 95,5 % bzw. 100 % der Pflanzen, die mit dem Kontroll-Konjugationsansatz infiziert wurden, Transkonjuganten zu isolieren. Dieses Konjugationsexperiment gibt einen ersten Hinweis darauf, dass die Inaktivierung des *traA*-Gens zum Verlust der Transferierbarkeit von pCM2 geführt hat.

Ein generell schlechteres Wachstum der *traA*-Mutanten kann ausgeschlossen werden, da sie bei Anzucht in Flüssigkultur ein ähnliches Wuchsverhalten wie der Wildtyp zeigt. Ebenso ist die Kolonisationsfähigkeit der *traA*-Mutante bei Einzelinfektion von Tomatenpflanzen mit der des Wildtyps vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Warum bei einer Doppelinfektion mit dem weißen Stamm eine Verdrängung zu beobachten ist, bleibt unklar.

Voraussetzung für einen erfolgreichen Plasmidtransfer ist, dass Donor und Rezipient in ausreichender Konzentration im Xylem der Pflanze vorhanden sind. Es muss also ausgeschlossen werden, dass die ausbleibenden Transkonjuganten auf eine zu geringe Konzentration der *traA*-Mutante in der Pflanze zurückzuführen sind. Deshalb wurde die Transferierbarkeit von pCM2_{*traA*} auch in Filterkreuzungsexperimenten untersucht.

Das *filter mating* mit der *traA*-Mutante als Donor und dem weißen Rezipienten wurde nach dem standardisierten Protokoll (Abb. 4.5, S. 77) durchgeführt. Die in Tabelle 4.14 aufgeführten Titer sind Mittelwerte von jeweils drei Filtern.

Donor	Rezipient	Bakterien pro Filter		
		Donor	Rezipient	Transkonjugant
<i>traA</i> -Mutante	weiß	$1,45 \times 10^9$	$1,56 \times 10^9$	< 1,5
CMM102 _{<i>Nm</i>}	weiß	$1,08 \times 10^9$	$1,49 \times 10^9$	$2,03 \times 10^4$

Tabelle 4.14: Phänotypische Untersuchung der *traA*-Mutante im *filter mating*.

Titer von Donor, Rezipient und Transkonjugant [Bakterien / Filter]. Angegebene Titer sind Mittelwerte von jeweils drei Filtern. Schwankungen innerhalb der Dreifachbestimmung: Transkonjuganten: Faktor 1,3; Donor und Rezipient: Faktor 0,4-1,5; Nachweisgrenze: 1,5 Transkonjuganten / Filter.

Die im Pflanzentest ermittelten Ergebnisse konnten durch die Filterkreuzungsexperimente bestätigt werden. Das pCM2_{*traA*} konnte nicht erfolgreich transferiert werden. Es sind keine Transkonjuganten entstanden. Die Nachweisgrenze für Transkonjuganten lag in diesem Experiment bei 1,5 Transkonjuganten pro Filter, da 800 μ l der vom Filter abgeschwemmten Zellsuspension (Gesamtvolumen: 1,2 ml) auf Transkonjuganten untersucht worden sind.

Die Titer von Donor und Rezipient sind nach 12 Stunden Inkubation auf dem Filter ungefähr gleich, folglich kann ausgeschlossen werden, dass der ausbleibende Transfer von pCM2

auf eine zu geringe Donor-Konzentration zurückzuführen ist. Auch die Verlängerung der Inkubationszeit des *filter matings* auf bis zu 90 Stunden, führte nicht zum Nachweis von Transkonjuganten (Daten nicht gezeigt). Die Anwesenheit eines intakten TraA-Proteins scheint also für den Transfer von pCM2 essentiell zu sein.

***trbL*-Mutante - Test auf Plasmidtransfer**

In der *trbL*-Mutante ist das *trbL*-Gen, dessen Genprodukt Homologie zu Proteinen des Transferkomplexes anderer Gram-positiven Bakterien zeigt, durch Insertion einer Spectinomycinresistenzgen-Kassette inaktiviert worden. Ob durch diese Inaktivierung die Transfer-eigenschaft von pCM2 beeinflusst wird, sollte durch ein Konjugationsexperiment in der Pflanze überprüft werden. Dazu wurden jeweils 15 Pflanzen mit einem Gemisch aus Donor- und Rezipientenzellen infiziert. Nach 12 Tagen erfolgte die Reisolierung der Bakterien aus dem Xylemsaft. Durch Auftropfen des Xylemsafts auf die geeigneten Selektionsmedien, konnte bestimmt werden, in wie vielen Pflanzen Transkonjuganten entstanden sind.

Als Donor wurden zwei im Bezug auf die Inaktivierung des *trbL*-Gens identische Klone der *trbL*-Mutante (K37 und K15) und ein Stamm, in dessen pCM2 das Mutageneseplasmid pBATrbl α oder ein Teil davon integriert ist, benutzt (CMM382 $_{Spc}$). In diesem Stamm gab es keinen exakten Austausch zwischen dem inaktivierten *trbL*-Gen und dem intakten Gen, sondern eine Kointegratbildung, so dass wahrscheinlich auch das intakte *trbL*-Gen vorliegt. Als Rezipient diente die weiße, plasmidfreie Mutante. Als Positiv-Kontrolle wurde eine Doppelinfektion mit dem Stamm CMM102 $_{Nm}$, dessen pCM2 konjugativ ist, und dem weißen Rezipienten durchgeführt. Die in Tabelle 4.15 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass nicht alle 15 Pflanzen, sondern nur 11-14 Pflanzen erfolgreich von *Cmm* kolonisiert wurden. Zur Berechnung des prozentualen Anteils der Pflanzen, aus denen Transkonjuganten isoliert werden konnten, wurden nur die tatsächlich mit Donor und Rezipient infizierten Pflanzen herangezogen.

Aus den Pflanzen, die mit einem der beiden Klone der *trbL*-Mutante als Donor und der weißen Mutante als Rezipient infiziert worden sind, konnten keine Transkonjuganten isoliert werden. Auch in diesem Pflanzenexperiment lag die Nachweisgrenze bei 500 Transkonjuganten pro 1 ml Xylemsaft. Dagegen konnten aus 100 % der Pflanzen, die mit dem Gemisch aus CMM382 $_{Spc}$ (Kointegrat aus pCM2 und Mutageneseplasmid) als Donor und dem weißen Rezipienten infiziert wurden, Transkonjuganten isoliert werden (Tab.4.15). Das Kointegrat aus pCM2 und dem Mutageneseplasmid pBATrbl α ist also konjugativ. Der Transfer dieses Kointegrats tritt in der gleichen Größenordnung auf, wie der Transfer von pCM2 $_{Nm}$ des

Konjugationsansatz		Anzahl an Pflanzen				
Donor	Rezipient	infiziert	Donor isoliert	Rezipient isoliert	Donor+Rezipient isoliert	Transkonjugant isoliert
<i>trbL</i> -Mut. K37	weiß	14	4	14	3	0*
<i>trbL</i> -Mut. K15	weiß	13	4	12	3	0*
CMM102 _{Nm}	weiß	11	11	11	11	9 (81,8%)
CMM382 _{SpC} (Kointegrat)	weiß	11	9	11	9	9 (100%)

Tabelle 4.15: Phänotypische Untersuchung der *trbL*-Mutante *in planta*. Anzahl an Pflanzen, aus denen Donor- Rezipienten- bzw. Transkonjugantenzellen isoliert werden konnten.

* Nachweisgrenze: 500 Transkonjuganten / 1 ml Xylemsaft. Es wurden jeweils 15 Pflanzen untersucht.

Stamms CMM102_{Nm}. Hier konnten aus 81,8% der infizierten Pflanzen Transkonjuganten isoliert werden (Tab. 4.15). Das Mutageneseplasmid pBATrbL α enthält das 7,7 kb große *Bgl*III-Fragment von pCM2, auf dem ein großer Teil des hypothetischen Tra-Operons von pCM2 (*orfA* - *orfG*) liegt. Da die *Bgl*III-Schnittstellen innerhalb des *orfA* bzw. *orfG* liegen, befinden sich auf dem Subklon pUC::7,7B2 die Gene *orfB* bis *trbL* aber nur das Ende bzw. der Anfang von *orfA* und *orfG*. Das Kointegrat aus pCM2 und diesem Mutageneseplasmid in dem Stamm CMM382_{SpC} scheint allerdings alle für den Plasmidtransfer wichtigen Gene zu besitzen.

Die Tatsache, dass aus den Kreuzungsexperimenten mit den korrekten *trbL*-Mutanten (K37 und K15) keine Transkonjuganten hervorgegangen sind, zeigt, dass ein intaktes *trbL*-Gen für den Transfer von pCM2 nötig ist. Da allerdings auch die *trbL*-Mutante *in planta* von dem weißen Rezipienten verdrängt worden ist, ist es wichtig zu zeigen, dass der ausbleibende Transfer von pCM2 nicht auf eine zu geringe Donor-Konzentration in der Pflanze zurückzuführen ist.

Um die Ergebnisse des Pflanzentests zu verifizieren, wurde zusätzlich ein *filter mating* nach dem in Abschnitt 4.2.3 standardisierten Protokoll (Abb. 4.5, S. 77) durchgeführt. Die in Tabelle 4.16 aufgeführten Titer sind Mittelwerte, die sich aus der Titerbestimmung von jeweils drei Filtern ergeben haben. Da beide genetisch identischen Klone der *trbL*-Mutante (K15 und K37) im Kreuzungsexperiment *in planta* keinen Transfer von pCM2 zeigten, wurde das *filter mating* nur mit dem Klon K37 durchgeführt.

Durch die Methode des *filter matings* konnten die *in planta* ermittelten Ergebnisse be-

Donor	Rezipient	Bakterien pro Filter		
		Donor	Rezipient	Transkonjugant
<i>trbL</i> -Mutante K37	weiß	$1,22 \times 10^9$	$1,86 \times 10^9$	< 1,5
CMM102 _{Nm}	weiß	$1,08 \times 10^9$	$1,49 \times 10^9$	$2,03 \times 10^4$

Tabelle 4.16: Phänotypische Untersuchung der *trbL*-Mutante im *filter mating*.

Titer von Donor, Rezipient und Transkonjugant [Bakterien / Filter]. Angegebene Titer sind Mittelwerte von jeweils drei Filtern. Schwankungen innerhalb der Dreifachbestimmung: Transkonjugant: Faktor 1,3; Donor und Rezipient: Faktor 1,1-1,3; Nachweisgrenze: 1,5 Transkonjuganten / Filter.

stätigt werden. Das pCM2 mit inaktiviertem *trbL*-Gen wurde nicht in den Rezipienten transferiert. Es sind keine Transkonjuganten entstanden. Auch nach der Verlängerung der Inkubationszeit des *filter matings* auf bis zu 90 Stunden, konnten keine Transkonjuganten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Inaktivierung des *trbL*-Gens hat zum Verlust der Konjugationsfähigkeit von pCM2 geführt. Da das *trbL*-Gen innerhalb des hypothetischen Tra-Operons von pCM2 liegt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Insertion der Antibiotikumresistenzgen-Kassette auch die Inaktivierung der stromabwärts liegenden Gene des Operons zur Folge hat. Es ist nicht experimentell untersucht worden, ob die verwendete Spectinomycinresistenzgen-Kassette Terminatorstrukturen enthält, die zum Abbruch der mRNA-Synthese führen. Da die Analyse der DNA-Sequenz von der Spectinomycinresistenzgen-Kassette keine eindeutigen Aussagen darüber zulässt, kann ein polarer Effekt auf die stromabwärts liegenden Gene nicht ausgeschlossen werden.

***traE*-Mutante - Test auf Plasmidtransfer**

In der *traE*-Mutante wurde das *traE*-Gen, das für ein hypothetisches ATP-bindendes Protein codiert, durch die Insertion einer Chloramphenicolresistenzgen-Kassette inaktiviert. Ob diese Inaktivierung die Konjugationsfähigkeit von pCM2 beeinflusst, sollte durch ein *filter mating* untersucht werden. Da die unterschiedliche Fähigkeit der Donorstämme (*traA*-Mutante und *trbL*-Mutante, S. 106 und 109) und des weißen Rezipientenstamms die Pflanze effektiv zu kolonisieren, ein großes Problem bei Kreuzungsexperimenten *in planta* darstellte, wurde bei der Analyse der *traE*-Mutante auf ein Kreuzungsexperiment in der Pflanze verzichtet.

Als Rezipient konnte in diesem *filter mating* wegen der Chloramphenicolresistenz der *traE*-Mutante nicht die weiße Mutante eingesetzt werden. Stattdessen wurde ein plasmidfreier, gelber *Cmm*-Stamm (CMM100) mit einer spontanen Streptomycinresistenz verwendet. Auf

Donor	Rezipient	Bakterien pro Filter		
		Donor	Rezipient	Transkonjugant
<i>traE</i> -Mutante	CMM100 _{Strep}	$1,59 \times 10^9$	$1,31 \times 10^9$	$< 1,5$
CMM102 _{Nm}	CMM100 _{Strep}	$1,11 \times 10^9$	$1,38 \times 10^9$	$2,25 \times 10^3$
CMM102 _{Nm}	weiß	$1,55 \times 10^9$	$3,28 \times 10^8$	$3,24 \times 10^3$

Tabelle 4.17: Phänotypische Untersuchung der *traE*-Mutante im *filter mating*.

Titer von Donor, Rezipient und Transkonjugant [Bakterien / Filter]. Angegebene Titer sind Mittelwerte von jeweils drei Filtern. Schwankungen innerhalb der Dreifachbestimmung: Transkonjugant: Faktor 1,2-1,5; Donor und Rezipient: Faktor 1,2-1,7; Nachweisgrenze: 1,5 Transkonjuganten / Filter.

Agarplatten, die Chloramphenicol und Streptomycin enthalten, können also nur Transkonjuganten wachsen. Zur Kontrolle wurde auch der Transfer des konjugativen pCM2_{Nm} aus dem Stamm CMM102_{Nm} in den spontanresistenten Stamm CMM100_{Strep} aber auch in den weißen Rezipienten untersucht. Die in der Tabelle 4.17 aufgeführten Titer sind Mittelwerte von jeweils drei Filtern.

Es wurden keine chloramphenicol- und streptomycinresistenten Transkonjuganten beobachtet. Auch nach der Verlängerung der Inkubationszeit des Donor-Rezipienten-Gemischs auf dem Filter auf bis zu 90 Stunden, konnten keine Transkonjuganten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ein Transfer von pCM2 mit dem inaktivierten *traE*-Gen in den streptomycinresistenten Rezipienten, war also nicht möglich. Auch hier lag die Nachweisgrenze bei 1,5 Transkonjuganten pro Filter. Der Transfer von pCM2 in diesen streptomycinresistenten Rezipienten ist aber prinzipiell möglich, da nach der Kreuzung mit dem Stamm CMM102_{Nm} neomycin- und streptomycinresistente Transkonjuganten ($2,25 \times 10^3$) entstanden sind. Der Verlust der Transferierbarkeit des pCM2 kann nun entweder direkt auf die Inaktivierung des *traE*-Gen oder aber, da sich das *traE*-Gen in im hypothetischen Tra-Operon von pCM2 befindet, auf die Inaktivierung der stromabwärts liegenden Gene des Operons zurückgeführt werden. Auch die Chloramphenicolresistenzgen-Kassette wurde experimentell bisher nicht daraufhin untersucht, ob sie Transkriptions-Terminatoren enthält. Allerdings ergab die Analyse der DNA-Sequenz der Chloramphenicolresistenzgen-Kassette keine Hinweise, die auf die Anwesenheit eines Terminators schließen lassen. Dennoch kann ein faktischer Ausfall der stromabwärts liegenden Gene nicht ausgeschlossen werden.

4.4 Identifizierung und Inaktivierung von potentiellen Transfergenen auf pCM1

Im Rahmen des Genomprojekts von *Cmm* wurde auf pCM1, dem mit einer Größe von 27,4 kb kleineren nativen Plasmid von *Cmm* ein Cluster von 10 Genen identifiziert, für die eine Funktion im Plasmidtransfer vermutet werden kann. Durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenz (PSI-Blast) konnte den Genen dieses Clusters eine hypothetische Funktion zugeordnet werden. Die tatsächliche Aufgabe dieser Gene ist allerdings noch nicht geklärt. Abbildung 4.17 zeigt die hypothetische Transferregion von pCM1. Wahrscheinlich sind die *open reading frames orfD* bis *orfM* als Operon organisiert.

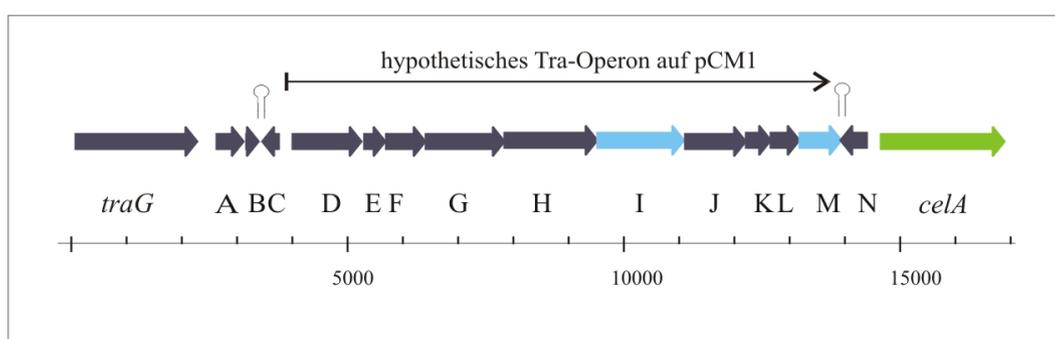


Abbildung 4.17: Physikalische Karte der hypothetischen Transferregion von pCM1: *orfA* bis *orfN* mit den Buchstaben A-N abgekürzt. Hypothetische Terminatoren und vermutetes Tra-Operon sind dargestellt. Blau: Gene der hypothetischen Transferregion, türkis: in dieser Arbeit durch Kassettenmutagenese inaktivierte Gene. *celA*: β -1,4-Endoglucanase (Pathogenitätsdeterminante).

In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass pCM1 konjugativ ist (Pieper, 2001; Kosthorst, 2004). Ob die Gene dieser hypothetischen Transferregion von pCM1 tatsächlich für den Transfer von pCM1 verantwortlich sind, sollte durch die Inaktivierung einiger dieser hypothetischen Transfergene überprüft werden. Die Inaktivierung der Gene sollte durch die Insertion einer Antibiotikumresistenzgen-Kassette erfolgen. Im Rahmen einer am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie angefertigten Diplomarbeit (Kosthorst, 2004) wurden Plasmide für die Insertionsmutagenese der *open reading frames orfD* und *orfM* und für eine Deletionsmutagenese in der Region von *orfG* bis *orfI* hergestellt. Als Basis für die Konstruktion der Mutageneseplasmide dienten drei Sequenzierklone aus dem Genomprojekt von *Cmm* (cmis2p0168h05, cmis3p0015h06 und cmis3p0003c01).

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Diplomarbeit eine Mutante konstruiert werden, in der *orfM* durch Insertion einer Spectinomycinresistenzgen-Kassette inaktiviert worden ist (*orfM*-Mutante). Der Phänotyp dieser Mutante ist jedoch noch nicht untersucht worden. *orfM* codiert für ein aus 252 Aminosäuren bestehendes wahrscheinlich sekretiertes Protein, das homolog ist zu zwei chromosomal codierten Proteinen (CMM_0063; 74 % Identität und CMM_1065; 61 % Identität) und zu einem von pCM2 codierten Protein (pCM_0007; 76 % Identität), das sich aber außerhalb der potentiellen Transferregion befindet. Zudem ist die von *orfM* abgeleitete Aminosäuresequenz über einen Bereich von 169 Aminosäuren zu 45 % identisch zu einer nicht näher charakterisierten hypothetischen extrazellulären Deoxyribonuclease aus *Mycobacterium smegmatis* str. MC2 155 (ABK69953) (Abb. 6.9, S. 166).

4.4.1 Inaktivierung des *orfI* von pCM1 durch Insertionsmutagenese

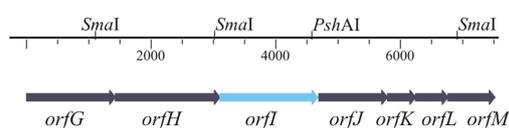
In dieser Arbeit wurde zur Inaktivierung des *orfI* auf pCM1, dessen Genprodukt Homologie zu ATP/GTP bindenden Proteinen aus *Arthrobacter aurescens* und *Streptomyces coelicolor* A3(2) aufweist, das Mutageneseplasmid pAK-Mem3S α (Kosthorst, 2004) verwendet. Da das Genprodukt von *orfI* im Bereich der Aminosäuren 116-488 auch Homologie (24 %) zur VirB4-ATPase des Typ-IV-Sekretionssystems von *Brevibacterium linens* BL2 (ZP_00381005) hat, war eine Inaktivierung und damit die Untersuchung des Einflusses von dem hypothetischen VirB4-Homolog auf den Transfer von pCM1 besonders interessant. Das Protein-Alignment (Abb. 6.8, S. 165) zeigt, dass das Genprodukt von *orfI* das Nucleotidbinde-Motiv A (Walker A: GXXXXGKT(S)) hat.

Das Mutageneseplasmid pAK-Mem3S α (Abb. 6.3, S. 158) wurde basierend auf dem Sequenzierklon cmis3p0015h06 konstruiert, indem über eine singuläre *PshAI*-Schnittstelle im *orfI* eine Spectinomycinresistenzgen-Kassette *add9* (LeBlanc et al., 1991) inseriert wurde (Kosthorst, 2004). Nachdem das Mutageneseplasmid durch Elektroporation in Zellen des Stamm CMM101 transferiert worden ist, wurden die spectinomycinresistenten Klone mittels Hybridisierung gegen Vektor-DNA als Sonde daraufhin untersucht, ob die Antibiotikumresistenz auf ein doppeltes Rekombinationsereignis, also einen exakten Genaustausch, zurückzuführen ist oder ob sie durch Kointegratbildung zwischen Mutageneseplasmid und pCM1 entstanden ist. Zur weiteren Analyse wurde die Gesamt-DNA der Klone, die keinen Vektoranteil zeigten, mit dem Restriktionsenzym *SmaI* hydrolysiert und gegen die genspezifische *orfI*-Sonde (4987 bp *EcoRI*-Fragment von cmis3p0015h06) und die Spectinomycinresistenzgen-Kassette als Sonde hybridisiert. Bei exakter Insertion

der Resistenzgen-Kassette unterscheiden sich die Hybridisierungsmuster von Mutante und Wildtyp. Abbildung 4.18 zeigt die errechneten Größen der mit den jeweiligen Sonden hybridisierenden Fragmente. Die *orfI*-Sonde hybridisiert im Wildtyp mit einem 1,9 kb und einem 3,9 kb großen Fragment, während in der Mutante neben dem 1,9 kb-Fragment ein 5,6 kb großes *Sma*I-Fragment hybridisiert. Wie in Abbildung 4.18 zu sehen ist, stimmen die errechneten Größen der hybridisierenden Banden mit den tatsächlich entstandenen überein. Auch die Hybridisierung gegen die Spectinomycinresistenzgen-Kassette als Sonde bestätigte (Daten nicht gezeigt), dass es sich um eine korrekte Mutante handelt, die anschließend in Konjugationsexperimenten auf die Transferierbarkeit von pCM1 untersucht werden konnte.

Wildtyp *Cmm*

orfI-Sonde

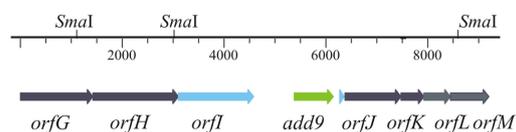


hybridisierende *Sma*I-Fragmente



orfI-Mutante α

orfI-Sonde



hybridisierende *Sma*I-Fragmente

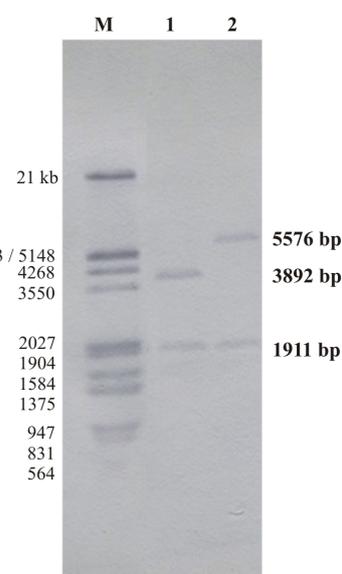
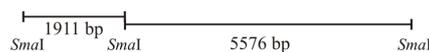


Abbildung 4.18: Konstruktion der *orfI*-Mutante: Physikalische Karte und Southern-Hybridisierung *Sma*I-gespaltener G-DNA der *orfI*-Mutante und vom Wildtyp gegen die *orfI*-Sonde. M: λ -Marker *Eco*RI/*Hind*III gespalten, 1: Wildtyp, 2: *orfI*-Mutante.

4.4.2 Phänotypische Analyse der pCM1-Mutanten

Um zu überprüfen, ob die Inaktivierung von *orfI* bzw. *orfM* einen Einfluss auf die Transfereigenschaft von pCM1 hat, wurde zunächst ein Konjugationsexperiment in der Wirtspflanze Tomate durchgeführt. Dazu wurden jeweils 32 Pflanzen mit einem Gemisch aus *orfI*- oder der *orfM*-Mutante als Donor und dem weißen Rezipienten infiziert. Nach 10

Tagen wurde durch Auftropfen des Xylemsafts dieser Pflanzen auf entsprechende Selektionsmedien der Anteil an Pflanzen bestimmt, in denen Transkonjuganten entstanden sind. Als Positiv-Kontrolle diente in diesem Experiment eine Doppelinfektion von Pflanzen mit einem Donor, dessen pCM1 mit einem Gentamicinresistenzgen-Kassette (CMM101_{Gm}) markiert ist, und dem weißen Stamm als Rezipienten. Tabelle 4.18 zeigt die Anzahl an Pflanzen, aus deren Xylemsaft Spectinomycin-, chloramphenicolresistente und doppeltresistente Zellen reisoliert werden konnten. Zur Berechnung des prozentualen Anteils der Pflanzen, aus denen Transkonjuganten isoliert werden konnten, wurden nur die tatsächlich mit Donor und Rezipient infizierten Pflanzen herangezogen.

Konjugationsansatz		Anzahl an Pflanzen				
Donor	Rezipient	infiziert	Donor isoliert	Rezipient isoliert	Donor+Rezipient isoliert	Transkonjugant isoliert
<i>orfI</i> -Mut.	weiß	10	4	9	3	0*
<i>orfM</i> -Mut.	weiß	12	4	12	4	0*
CMM101 _{Gm}	weiß	21	12	21	12	4 (33,3%)

Tabelle 4.18: Phänotypische Untersuchungen der *orfI*- und *orfM*-Mutante *in planta*. Anzahl an Pflanzen, aus denen Donor-, Rezipienten- bzw. Transkonjugantenzellen isoliert werden konnten, * Nachweisgrenze: 500 Transkonjuganten / 1 ml Xylemsaft. Es wurden jeweils 32 Pflanzen untersucht.

Aus den Pflanzen, die mit den beiden pCM1-Mutanten als Donor und dem weißen Stamm als Rezipient infiziert worden sind, konnten keine Transkonjuganten isoliert werden. Da 2 µl Xylemsaft aufgetropft wurden, lag die Nachweisgrenze bei 500 Transkonjuganten pro 1 ml Xylemsaft. Dagegen konnte der Transfer des Gentamicin-markierten pCM1 aus dem Stamm CMM101_{Gm} in den weißen Rezipienten nachgewiesen werden. Allerdings konnten nur aus 4 von 12 Pflanzen, die tatsächlich mit Donor und Rezipient infiziert worden waren, Transkonjuganten isoliert werden. Verglichen mit dem Transfer von pCM2_{Nm} in den weißen Rezipienten ist das eine sehr geringe Anzahl an nachgewiesenen Transferereignissen. Der Anteil an Pflanzen, in denen Transfer von pCM2 auf den weißen Rezipienten stattgefunden hat, lag bei durchschnittlich 93 % (siehe Abb. 4.1, S. 73). Ein Problem stellte auch in diesem Kreuzungsexperiment die offensichtlich unterschiedliche Fähigkeit der Stämme, sich in der Pflanze etablieren zu können, dar. Nach 10 Tagen konnten nur aus jeweils 4 Pflanzen die pCM1-Mutanten (*orfI*-Mutante und *orfM*-Mutante) reisoliert werden. Um dieses Problem zu umgehen, wurde der Transfer der Plasmide mit dem inaktivierten *orfI*

bzw. *orfM* auch in Filterkreuzungsexperimenten untersucht. Die Anzucht der Donor- und Rezipientenstämme und die Durchführung des *filter matings* erfolgte wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben (Abb. 4.5, S. 77). Die in Tabelle 4.19 aufgeführten Titer sind Mittelwerte, die sich aus der Titerbestimmung von jeweils drei Filtern ergeben haben.

Donor	Rezipient	Bakterien pro Filter		
		Donor	Rezipient	Transkonjugant
<i>orfI</i> -Mutante	weiß	$1,28 \times 10^9$	$1,33 \times 10^9$	$< 1,5$
<i>orfM</i> -Mutante	weiß	$1,13 \times 10^9$	$1,48 \times 10^9$	$< 1,5$
CMM101 _{Gm}	weiß	$1,52 \times 10^9$	$1,52 \times 10^9$	$1,95 \times 10^1$

Tabelle 4.19: Phänotypische Untersuchungen der *orfI*- und *orfM*-Mutante im *filter mating*. Titer von Donor, Rezipient und Transkonjugant [Bakterien / Filter]. Angegebene Titer sind Mittelwerte von jeweils drei Filtern. Schwankungen innerhalb der Dreifachbestimmung: Transkonjugant: Faktor 1,8; Donor und Rezipient: Faktor 1,2-1,5; Nachweisgrenze: 1,5 Transkonjuganten / Filter.

Auch in den Filterkreuzungsexperimenten wurde das pCM1 mit inaktiviertem *orfI*- bzw. *orfM* nicht in den weißen Rezipienten transferiert. Durch Insertion der Spectinomycin-resistenzgen-Kassette hat pCM1 seine Konjugationsfähigkeit verloren. Da die beiden untersuchten Gene vermutlich Teil des hypothetischen Tra-Operons von pCM1 sind, kann nicht genau bestimmt werden, ob der Verlust der Transferierbarkeit in der *orfI*-Mutante nur auf den inaktivierten *orfI* zurückzuführen ist oder ob die Mutation polare Effekte auf die stromabwärts gelegenen Gene *orfJ* bis *orfM* hat.

Abschließend ist allerdings festzuhalten, dass pCM1 mit 19 Transkonjuganten / Filter im Vergleich zu pCM2 (mehr als 10.000 Transkonjuganten / Filter) relativ selten konjugiert. Deshalb wäre für die phänotypische Analyse der pCM1-Mutanten vielleicht eine noch sensitivere Methode des TransfERNachweises notwendig. Aufgrund der vergleichsweise geringen Transfereffizienz von pCM1, ist nicht sicher, ob der Transfer des pCM1_{*orfI*} und pCM1_{*orfM*} wirklich ausblieb, oder ob er vielleicht experimentell bedingt nicht nachweisbar war.

4.5 Analyse der Stabilität der nicht konjugativen pCM2-Derivate

Wie bereits in Kapitel 4.1.3 beschrieben, nimmt die Stabilität von pCM2 bei Erhöhung der Kultivierungstemperatur von den optimalen 26 °C auf 32 °C bei Anzucht der Bakterien in Flüssigkultur stark ab. Nach 14 Anzuchtzyklen (ca. 63 Generationen) bei einer Kultivierungstemperatur von 32 °C ist pCM2_{Nm} nur noch in 13 % der Zellen des Stamms CMM102_{Nm} vorhanden. Bei einer Kultivierungstemperatur von 26 °C ist pCM2_{Nm} nach 14 Anzuchtzyklen dagegen noch in 87 - 98 % der Zellen zu finden.

Im Vergleich zu diesen Ergebnissen wurde die Stabilität von pCM2 in den transfernegativen Mutanten untersucht. Von Interesse war dabei, ob die fehlende Transferfähigkeit dieser Mutanten einen Einfluss auf die Stabilität von pCM2 hat. Dies wäre zu erwarten, da die transfernegativen pCM2-Derivate im Falle des Plasmidverlustes durch Konjugation nicht wieder zurückgewonnen werden können. Allerdings scheint der Transfer der *Cmm*-Plasmide bei Anzucht der Zellen in Flüssigkultur gar nicht oder nur sehr selten aufzutreten. Bisher konnte kein Plasmidtransfer bei Kreuzungsexperimenten in Flüssigkultur nachgewiesen werden. Es wäre also möglich, dass der Verlust der Transferfähigkeit bei Anzucht in Flüssigkultur keinen Einfluss auf die Stabilität haben kann.

4.5.1 Stabilität von pCM2 bei Anzucht von *Cmm* in Flüssigkultur

Um die Stabilität des konjugativen pCM2_{Nm} aus dem Stamm CMM102_{Nm} mit der des nicht konjugativen pCM2_{traE} der *traE*-Mutante vergleichen zu können, wurden diese *Cmm*-Stämme über 14 Anzuchtzyklen in Flüssigkultur ohne Selektionsdruck bei 26 °C bzw. 32 °C inkubiert. Dazu wurden diese Stämme zunächst unter Selektionsdruck auf Festmedium angezogen, so dass gewährleistet war, dass jede Zelle das Plasmid enthielt. Um das Segregationsexperiment mit einer definierten Zellmenge starten zu können, wurde über Nacht eine Vorkultur in C-Medium unter unselektiven Bedingungen herangezogen. Von dieser stationären ü/N-Kultur wurde in frisches Vollmedium ohne Antibiotikum überimpft, so dass die Start-OD₅₈₀ bei 0,15 (etwa 7,5 x 10⁷ Bakterien / ml) lag. Die Kulturen wurden auf dem Luftschüttler (90 Umdrehungen/min) bei 26 °C bzw. 32 °C inkubiert. Nach 2 bis 3 Tagen wurden die Bakterien wieder mit einer Start-OD₅₈₀ von 0,15 in frisches C-Medium überimpft und weiter inkubiert. Dies wurde 14-mal (14 Anzuchtzyklen) wiederholt und von der zu überimpfenden Kultur wurden Verdünnungen der Bakterienkulturen ausplattiert, so dass nach Inkubation bei 26 °C jeweils 100 einzelne Kolonien parallel auf Agarplatten

mit und ohne Antibiotikum gestochert werden konnten. Da das Plasmid die Antibiotikum-resistenz verleiht, konnte so der Anteil plasmidtragender Zellen an der Gesamtpopulation ermittelt werden.

Um zu untersuchen, ob die Anwesenheit von pCM1 einen Einfluss auf die Stabilität von pCM2_{Nm} hat, wurde auch der Stamm CMM382pCM2_{Nm}, der im Gegensatz zum Stamm CMM102_{Nm} neben dem Neomycin-markierten pCM2_{Nm} das unmarkierte pCM1 besitzt, in diesem Segregationsexperiment untersucht. In Abbildung 4.19 ist der prozentuale Anteil plasmidtragender Zellen über einen Zeitraum von 32 Tagen in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur (26 °C, 32 °C) dargestellt.

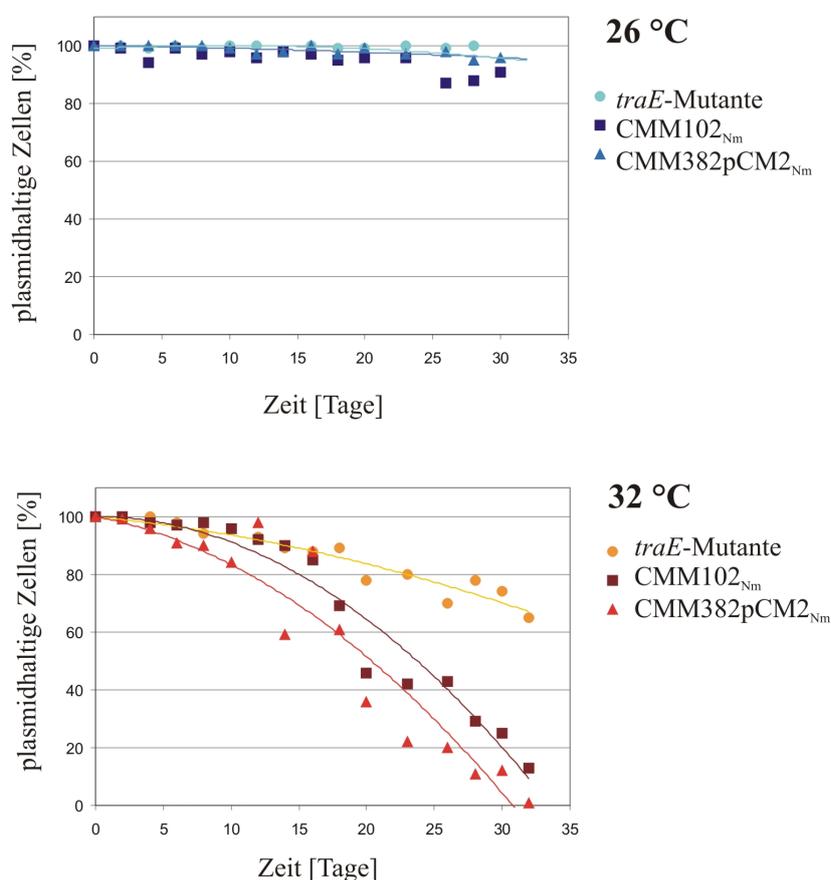


Abbildung 4.19: Stabilität von pCM2: Kinetik der Segregation des konjugativen pCM2_{Nm} in den Stämmen CMM102_{Nm} und CMM382pCM2_{Nm} und des nicht konjugativen pCM2_{traE} bei unselektiver Anzucht in Flüssigkultur: Anteil plasmidhaltiger Zellen nach 14 Anzuchtzyklen bei 26 °C bzw. 32 °C Anzuchttemperatur. Rohdaten sind in Abb. 6.2, S. 167 dargestellt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass nur sehr wenige der bei 26 °C inkubierten Zellen pCM2 verloren haben. Über den gesamten Zeitraum von 32 Tagen kommt es bei maximal 13 % der Zellen (Tag 26, Stamm CMM102_{Nm}) zum Verlust von pCM2. Am 32. Tag (nach 84 Generationen) liegt das Plasmid noch in 91 - 96 % der Zellen vor. Dahingegen zeigt die Kultivierung bei 32 °C, dass das Neomycin-markierte pCM2_{Nm} in den Stämmen CMM102_{Nm} und CMM382pCM2_{Nm} relativ häufig segregiert. Ab dem 16. Tag nimmt der prozentuale Anteil der Zellen, die das pCM2_{Nm} noch tragen, sehr stark ab. Am 32. Tag besitzen nur noch 13 % der CMM102_{Nm}-Zellen und 1 % der CMM382pCM2_{Nm}-Zellen das Plasmid pCM2_{Nm}.

Das nicht konjugative pCM2_{traE} segregiert allerdings seltener als das pCM2_{Nm} der anderen Stämme. Am Ende des Experiments tragen noch 65 % der bei 32 °C inkubierten Zellen das pCM2_{traE}, während der Anteil plasmidtragender Zellen, die bei 26 °C inkubiert wurden, bei 91 bis 100 % liegt. Auch das nicht konjugative pCM2_{traE} hat durch die Erhöhung der Kultivierungstemperatur um 6 °C an Stabilität verloren.

Die vergleichsweise geringere Stabilität des konjugativen pCM2_{Nm} könnte vielleicht darauf zurückzuführen sein, dass es ein Kointegrat aus pCM2 und pHJ21 ist (Abb. 4.1, S. 65). Allerdings wird diese Instabilität wahrscheinlich nicht darin begründet sein, dass das pCM2_{Nm} (78 kb) ca. 6 kb größer ist als das nicht konjugative pCM2_{traE} (72 kb). Da der Verlust des konjugativen pCM2_{Nm} in den Stämmen CMM102_{Nm} (- pCM1) und CMM382pCM2_{Nm} (+ pCM1) bei der Kultivierungstemperatur von 32 °C ungefähr gleich häufig auftritt, kann ein Einfluss von pCM1 auf die Stabilität von pCM2 wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Die Anwesenheit von pCM1 im Stamm CMM382pCM2_{Nm} scheint sich weder stabilisierend noch destabilisierend auf pCM2_{Nm} auszuwirken.

Die Erhöhung der Kultivierungstemperatur hat, wie bereits in Abschnitt 4.1.2 beschrieben auch Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen. Die Erhöhung der Temperatur führt zu einer verlängerten Generationszeit von 3,6 Stunden. Außerdem sind die von diesen Kulturen erreichten Endtiter geringer. Das hat zur Folge, dass die bei 26 °C inkubierten Kulturen während eines Anzuchtzyklus 6 Generationen durchlaufen. Bei den bei 32 °C inkubierten Kulturen entspricht ein Anzuchtzyklus dagegen nur 4-5 Generationen. Daraus ergibt sich, dass die Kulturen in diesem Experiment ca. 84 Generationen (26 °C) bzw. ca. 63 Generationen (32 °C) inkubiert wurden.

Abschließend kann festgehalten werden, dass bei allen getesteten pCM2-Derivaten bei Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf 32 °C über einen Zeitraum von 14 Anzuchtzyklen Segregation beobachtet werden kann. Vorausgesetzt der Transfer von pCM2 findet auch

bei Anzucht der Zellen in Flüssigmedium statt, wäre zu erwarten gewesen, dass das nicht konjugative pCM2_{traE} instabiler ist als das konjugative pCM2_{Nm}, da es nach Verlust nicht wieder durch Konjugation zurückgewonnen werden kann. Weil das pCM2_{traE} allerdings weniger stark segregiert als das konjugative pCM2_{Nm}, kann ein negativer Einfluss der fehlenden Konjugationsfähigkeit auf die Stabilität zumindest bei Anzucht in Flüssigkultur ausgeschlossen werden. Ein Grund dafür könnte aber auch sein, dass die Zellen bei Anzucht in Flüssigkultur auf dem Luftschüttler (90 Umdrehungen pro Minute) ohnehin nicht in der Lage sind stabile *mating pairs* auszubilden, die für den Plasmidtransfer essentiell sind. Damit wäre zu erklären, warum auch das eigentlich konjugative pCM2_{Nm} relativ instabil ist. Die Tatsache, dass auch in anderen Experimenten bisher kein Transfer von pCM2 bei Anzucht in Flüssigkultur gezeigt werden konnte, unterstützt diese Theorie.

4.5.2 Stabilität von pCM2 bei Kultivierung von *Cmm* in planta

Die Erhöhung der Kultivierungstemperatur wirkt sich sowohl auf das konjugative pCM2_{Nm} als auch auf das nicht konjugative pCM2_{traE} bei Anzucht in Flüssigmedium destabilisierend aus. Um die Auswirkung eines möglichen Rücktransfers von pCM2 in die Segreganten zu untersuchen, müssen die Stabilitätsexperimente also in einem System durchgeführt werden, das Konjugation der Plasmide ermöglicht. Wie bereits gezeigt werden konnte, tritt Transfer von pCM2 in *Cmm*-Zellen, die sich in der Wirtspflanze Tomate befinden, relativ häufig auf. Deshalb wurde die Stabilität der beiden pCM2-Derivate *in planta* untersucht. Das pCM2_{Nm} in dem Stamm CMM102_{Nm} ist konjugativ. Nachdem eine Zelle das pCM2_{Nm} verloren hat, kann sie es also durch Konjugation wieder aufnehmen. Das pCM2_{traE} hat seine Konjugationsfähigkeit durch die Insertion der Chloramphenicolresistenzgen-Kassette in das *traE*-Gen verloren, so dass ein Rücktransfer in plasmidfreie Zellen nicht möglich ist. Für dieses Experiment wurden zwei Wochen alte Tomatenpflanzen über Wurzelinfektion mit dem Stamm CMM102_{Nm} bzw. der *traE*-Mutante infiziert und bei 26 °C bzw. 32 °C kultiviert. Im Abstand von jeweils 6 oder 7 Tagen (Tag 2, 9, 16, 23, 30, 36) wurde aus mindestens einer Pflanze *Cmm* isoliert. Dazu wurde ein Pflanzenhomogenat hergestellt. Dies wurde verdünnt und auf nichtselektive Agarplatten ausplattiert. Nach viertägiger Inkubation bei 26 °C konnten jeweils 100 Kolonien parallel auf antibiotikafreie und antibiotikahaltige Platten gestochert werden. Da die Antibiotikumresistenz plasmidcodiert ist, konnte so die Anzahl der Zellen mit Plasmid ermittelt werden.

Tabelle 4.20 zeigt den prozentualen Anteil der plasmidtragenden Zellen, die zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubation bei 26 °C bzw. 32 °C aus den Tomatenpflanzen

isoliert werden konnten. Ist kein Wert angegeben bedeutet dies, dass aus dieser Pflanze keine Reinkultur von *Cmm* isoliert werden konnte und somit keine Einzelkolonien für die Analyse zur Verfügung standen.

Anteil [%] plasmidhaltiger Zellen					
Tag	Pflanze-Nr.	CMM102 _{Nm}		<i>traE</i> -Mutante	
		26 °C	32 °C	26 °C	32 °C
2	1	100	100	100	100
9	1	100	-	98	98
16	1	100	99	100	100
23	1	100	99	100	97
30	1	100	100	99	97
	2	100	100	100	98
	3	100	100	99	94
30	Mittelwert	100	100	99,3	96,3
	Standardabw.	(±0)	(±0)	(±0,58)	(±2,08)
36	1	100	100	99	87
	2	99	99	98	97
	3	100	100	100	92
	4	100	100	-	95
	5	100	97	100	96
	6	100	100	100	96
	7	99	100	100	98
36	Mittelwert	99,7	99,4	99,5	94,4
	Standardabw.	(±0,49)	(±1,13)	(±0,84)	(±3,78)

Tabelle 4.20: Stabilität von pCM2 in planta. Prozentualer Anteil plasmidtragender Zellen, die zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubation bei 26 °C bzw. 32 °C aus den Pflanzen isoliert wurden. - : Es konnte keine Reinkultur von *Cmm* aus der entsprechenden Pflanze isoliert werden.

Nach 30 Tagen wurde von jeweils 3 Pflanzen der Anteil plasmidtragender Zellen ermittelt. Jeweils 7 Pflanzen (CMM102_{Nm} 26 °C bzw. 32 °C, *traE*-Mutante 26 °C bzw. 32 °C) wurden nach 36 Tagen untersucht. In der Abbildung 4.20 ist der Anteil plasmidtragender Zellen über den Zeitraum von 36 Tagen graphisch dargestellt.

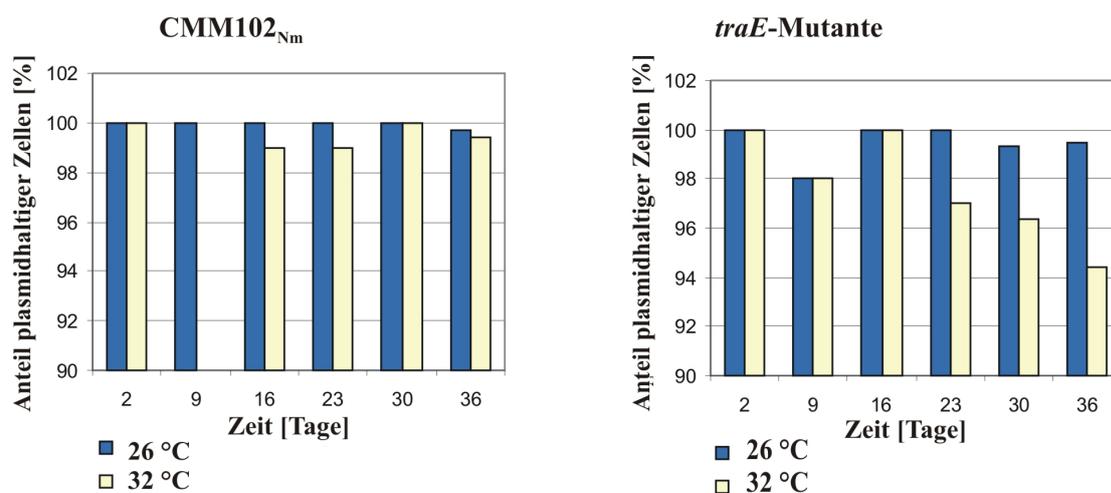


Abbildung 4.20: Stabilität von pCM2 *in planta*: Kinetik der Segregation von pCM2_{Nm} und pCM2_{traE} *in planta* in Abhängigkeit von der Anzuchttemperatur (26 °C bzw. 32 °C). Dargestellt ist der Anteil plasmidtragender Zellen, die im Verlauf von 36 Tagen aus den Pflanzen isoliert wurden. Tag 9, Stamm CMM102_{Nm}, 32 °C: es konnte keine Reinkultur von *Cmm* aus der entsprechenden Pflanze isoliert werden.

In den Zellen beider getesteter Stämme, die in den ersten 2 Wochen (Tag 2 bis Tag 16) aus den Pflanzen isoliert wurden, scheint pCM2 noch relativ stabil vorzuliegen. 98 % bis 100 % der Zellen aus den Pflanzen, die bei 26 °C oder 32 °C inkubiert wurden, tragen das pCM2_{Nm} bzw. pCM2_{traE} noch. Erst danach wird deutlich, dass die Kultivierung der *traE*-Mutante bei 32 °C eine stärkere Segregation von pCM2_{traE} zur Folge hat. Nach fünf-wöchiger Kultivierung der Pflanzen bei 32 °C schwankt der Anteil plasmidtragender Zellen in den sieben untersuchten Pflanzen zwischen 87 % und 98 %. Während nach Inkubation bei 26 °C in 98 % bis 100 % der Zellen pCM2_{traE} vorhanden ist. Im Stamm CMM102_{Nm} scheint die Stabilität von pCM2_{Nm} nicht durch die Erhöhung der Kultivierungstemperatur beeinträchtigt zu werden. Der Anteil der Zellen, die kein pCM2_{Nm} tragen, liegt bei beiden Temperaturen nie unter 97 %.

Diese Beobachtungen wurden durch den Wilcoxon-Rangsummentest überprüft. Normalerweise wird zum Testen von Hypothesen über Erwartungswerte zweier Stichproben der t-Test verwendet. Der t-Test setzt allerdings normalverteilte Grundgesamtheiten voraus. Da es sich bei den prozentualen Anteilen plasmidtragender Zellen, die aus den Pflanzen isoliert wurden, um zensierte Daten handelt, die also keine normalverteilte Grundgesamtheit darstellen, muss ein robusterer, nicht-parametrischer Test (z. B. Wilcoxon-Rangsummentest)

Test	Datensatz 1	Datensatz 2	p-value	Nullhypothese (H_0)
Temperatur	CMM102 _{Nm} 26 °C	CMM102 _{Nm} 32 °C	0,9358	H_0 annehmen (Unterschied nicht signifikant)
	<i>traE</i> -Mut. 26 °C	<i>traE</i> -Mut. 32 °C	0,0037	H_0 ablehnen (Unterschied signifikant)
Konjugationsfähigkeit	CMM102 _{Nm} 26 °C	<i>traE</i> -Mut. 26 °C	0,7919	H_0 annehmen (Unterschied nicht signifikant)
	CMM102 _{Nm} 32 °C	<i>traE</i> -Mut. 32 °C	0,0032	H_0 ablehnen (Unterschied signifikant)

Tabelle 4.21: Ergebnisse des Wilcoxon-Rangsummentests. Verwendung der am 36. Tag generierten Daten; Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$; p-value = Überschreitungswahrscheinlichkeit; Nullhypothese (H_0): Alle Beobachtungen stammen aus der gleichen Grundgesamtheit. Die Daten unterscheiden sich nicht. Der Unterschied ist nicht signifikant.

angewandt werden. Es soll getestet werden, ob die Temperaturerhöhung und der Verlust der Konjugationsfähigkeit (*traE*-Mutante) sich signifikant auf die Stabilität von pCM2 ausgewirkt haben. Dazu wurde mit den am 36. Tag ermittelten Daten der jeweils sieben Pflanzen der Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt. Als Nullhypothese (H_0) wird angenommen, dass die plasmidtragenden Zellen in den verschiedenen Pflanzengruppen der gleichen Verteilung folgen, ihre Anzahl also gleich ist. Es wird demnach angenommen, dass sich der Anteil plasmidtragender Zellen in den verschiedenen Pflanzengruppen nicht unterscheidet. In Tabelle 4.21 sind die Überschreitungswahrscheinlichkeiten (p-value) der Tests zur Untersuchung des Einfluss der Temperaturerhöhung und der Konjugationsfähigkeit aufgeführt. Zu einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ wird die Nullhypothese abgelehnt.

Die Ergebnisse des Wilcoxon-Rangsummentests bestätigen, dass die Erhöhung der Anzuchttemperatur die Stabilität des konjugativen pCM2_{Nm} (CMM102_{Nm}) nicht beeinträchtigt hat (p-value = 0,9358; H_0 wird angenommen). Dagegen ist die Stabilität des nicht konjugativen pCM2_{traE} bei erhöhter Anzuchttemperatur geringer als bei der optimalen Anzuchttemperatur von 26 °C (p-value = 0,0037, H_0 wird abgelehnt). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass das pCM2_{Nm} konjugativ ist und die Bedingungen für den Plasmidtransfer *in planta* optimal sind. Wahrscheinlich segregiert pCM2_{Nm} bei erhöhter Anzuchttemperatur genauso häufig wie das nicht konjugative pCM2_{traE}. Allerdings wird der Verlust von pCM2_{Nm} durch die Wiederaufnahme des Plasmids durch Konjugation wieder aufgehoben. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass der Verlust der Konjugationsfähigkeit (*traE*-

Mutante) lediglich bei einer erhöhten Anzuchttemperatur zum verstärkten Verlust von pCM2 führt (26 °C: p-value = 0,7919; H_0 wird angenommen. 32 °C: p-value = 0,0032; H_0 wird abgelehnt). Auf Grund des relativ geringen Stichprobenumfangs zeigen diese Ergebnisse nur eine Tendenz. Trotzdem ist wegen der sehr kleinen p-values ein Einfluss der Konjugationsfähigkeit und der Temperatur auf die Stabilität von pCM2 wahrscheinlich. Der Vergleich der Stabilität des nicht konjugativen pCM2_{traE} *in planta* (32 °C) und bei Anzucht in Flüssigkultur (32 °C) lässt zunächst vermuten, dass die Stabilität von pCM2_{traE} in der Pflanze generell größer ist. Nach 36 Tagen ist pCM2_{traE} in durchschnittlich 94,4 % der Zellen vorhanden, die aus den Pflanzen isoliert wurden. Dagegen besitzen nur noch 65 % der Zellen, die über 32 Tage in Flüssigmedium kultiviert wurden, das pCM2_{traE}. Da aber für *Cmm* bei Wachstum *in planta* eine Generationszeit von ca. 2 Tagen bestimmt worden ist (Gräfen, 2005), umfasst das 36-tägige *in planta*-Experiment nur ca. 18 Generationen, während die Segregation in Flüssigkultur über ca. 63 - 84 Generationen beobachtet worden ist. Vielleicht würde eine Verlängerung des *in planta*-Experiments ebenfalls einen stärkeren Verlust von pCM2_{traE} zeigen.

Anteil [%] plasmidhaltiger Zellen					
Tag	Pflanze-Nr.	<i>traA</i> -Mutante		<i>trbL</i> -Mutante	
		26 °C	32 °C	26 °C	32 °C
39	1	98	97	99	65
	2	99	95	-	88
	3	100	10	93	-
	4	100	95	98	71
	5	-	95	95	65
39	Mittelwert	99,3	78,4	96,3	72,3
	Standardabw.	(±0,96)	(±38,25)	(±2,75)	(±10,87)

Tabelle 4.22: Stabilität von pCM2_{traA} und pCM2_{trbL} *in planta*. Prozentualer Anteil plasmidtragender Zellen, die nach 39 Tagen Inkubation bei 26 °C bzw. 32 °C aus den Pflanzen isoliert wurden. - : Es konnte keine Reinkultur von *Cmm* aus der entsprechenden Pflanze isoliert werden.

Auch die Untersuchung der beiden anderen nicht konjugativen pCM2-Derivate (pCM2_{traA} und pCM2_{trbL}) zeigte einen Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der Plasmide bei Kultivierung von *Cmm in planta*. Nach 39 Tagen sind die Bakterien dieser beiden Mutan-

ten aus den Pflanzen isoliert worden und ihr Plasmidstatus wurde überprüft (Tab. 4.22). Werden nur die Durchschnittswerte betrachtet, so scheint sich die Erhöhung der Kultivierungstemperatur stärker auf die Stabilität von pCM2_{traA} und pCM2_{trbL} ausgewirkt zu haben als auf die Stabilität von pCM2_{traE}. Die Daten der einzelnen Pflanzen zeigen aber, dass es gerade bei der *traA*-Mutante starke Schwankungen gibt. Der Anteil plasmidtragender Zellen variiert von 10 % bis 97 %. In den Pflanzen, die mit der *trbL*-Mutante infiziert wurden, schwankt der Anteil plasmidtragender Zellen zwischen 65 % und 88 %. Diese Schwankungen sind wahrscheinlich damit zu erklären, dass der Verlust von pCM2 zufällig in den Zellen auftritt. Verlieren die *Cmm*-Zellen in einer Pflanze relativ früh das Plasmid, so teilen sich diese Zellen über viele Generationen, so dass der Anteil dieser pCM2-freien Zellen nach 5 Wochen sehr groß sein kann. Der Anteil plasmidtragender Zellen am Ende des Experiments könnte also vom Zeitpunkt des Plasmidverlustes abhängen.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse ganz deutlich, dass die Häufigkeit des Plasmid-Verlustes durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur zunimmt. Außerdem scheint die Konjugationsfähigkeit zur Stabilität des Plasmids innerhalb einer Population beizutragen.

5 Diskussion

5.1 Nachweis des Transfers der Plasmide pCM1 und pCM2

Ein Ziel dieser Arbeit war, den Transfer der beiden *Cmm*-Plasmide pCM1 und pCM2 sowohl *in planta* als auch in Filterkreuzungsexperimenten zu untersuchen. Um Kreuzungsexperimente in einem großen Umfang und standardisiert durchführen zu können, wurde die Methode des *filter matings* für *Cmm* etabliert. Diese Methode stellt eine sinnvolle Ergänzung zu den Kreuzungsexperimenten in der Tomatenpflanze, dem natürlichen Habitat von *Cmm*, dar. *In planta*-Experimente sind nur in einem begrenzten Umfang möglich und häufig schlecht reproduzierbar, da es sich bei einer Pflanze, um einen komplexen Organismus handelt, der auf kleinste Umweltveränderungen zum Teil empfindlich reagiert.

5.1.1 Etablierung der Filterkreuzungsmethode

Um die Filterkreuzungsmethode für *Cmm* zu etablieren, wurden verschiedene Parameter untersucht, die den Transfer beeinflussen könnten. Zu diesen Parametern gehörten die Zusammensetzung des Festmediums, das Mengenverhältnis zwischen Donor und Rezipient und die Inkubationsdauer der Zellen auf dem Filter. Da Kreuzungsexperimente auf Vollmediumagarplatten (TBY) erfolglos blieben und bereits gezeigt werden konnte, dass der Transfer der *Cmm*-Plasmide in der Wirtspflanze Tomate sehr häufig auftritt, wurde den Agarplatten bis zu 20 % Xylemsaft zugegeben. Die Zugabe des Xylemsafts führte allerdings nicht zum erfolgreichen Transfer von pCM2. Der Transfer der *Cmm*-Plasmide wird daher nicht durch pflanzliche Bestandteile des Xylemsaftes induziert. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Zugabe von Glucose, Fructose oder Saccharose (0,025 mol / l) zum Vollmedium (TBY) den Transfer von pCM2 in einem Filterkreuzungsexperiment induziert. Dies könnte zwei Gründe haben. Zum einen könnte die Energieversorgung und somit das Wachstum der Zellen auf dem Filter durch die zugesetzte Glucose verbessert sein. Dieser

Effekt ist aber zumindest bei der relativ kurzen Inkubationszeit (12 Stunden) der Zellen auf dem Filter fraglich, da bei Anzucht auf Medium mit Glucose bzw. ohne Glucose nach 12 Stunden die erreichten Zellzahlen in der gleichen Größenordnung liegen (mit Glucose: $4,9 \times 10^9$ Zellen pro Filter; ohne Glucose: $2,8 \times 10^9$ Zellen pro Filter). Dass diese Zelldichte für Transferereignisse mehr als ausreichend ist, konnte durch Experimente zur Kinetik des Transfers von pCM2 gezeigt werden. Auch bei einer zehnfach geringeren Anzahl von Donor- und Rezipientenzellen auf dem Filter konnte Transfer von pCM2 nachgewiesen werden. Verbesserte Energieversorgung als Ursache für den Plasmidtransfer in Filterkreuzungen ist daher wenig wahrscheinlich. Auch in natürlichen Systemen scheint sich eine limitierte Nährstoffversorgung nicht negativ auf den Plasmidtransfer auszuwirken. Sogar unterversorgte Zellen einer Gemeinschaft mariner Bakterien sind zum Plasmidtransfer befähigt (Dahlberg et al., 1998).

Wahrscheinlicher ist daher, dass durch die Zucker im Medium eine Veränderung der Struktur der Zelloberfläche erfolgt. Bei Anzucht von *Cmm* auf zuckerhaltigen Medien ist eine verstärkt mukoide Koloniemorphologie zu beobachten, die auf eine erhöhte EPS-Produktion zurückzuführen ist. Es ist bekannt, dass die Beschaffenheit und Menge der gebildeten EPS von der Art und Konzentration des während des Wachstums zur Verfügung stehenden Zuckers abhängt. Die EPS-Produktion durch *Streptococcus salivarius* ist bei Anwesenheit von Glucose oder Fructose im Nährmedium größer als bei zugegebener Lactose oder Saccharose (Osman et al., 1986; Gancel and Novel, 1994). Es ist also denkbar, dass eine verstärkte EPS-Produktion, eine stabile Aneinanderlagerung der Zellen auf dem Filter begünstigt, was wiederum für einen erfolgreichen Plasmidtransfer essentiell ist. Die Produktion von EPS trägt auch zur Bildung von Biofilmen bei. Biofilme stellen auf Grund der räumlichen Nähe der Zellen zueinander eine ideale Umgebung für horizontalen Genaustausch dar (Jefferson, 2004).

Der Transfer von pCM2 auf Rezipienten, die auf Grund von Mutationen in den EPS-Clustern I bzw. IV von *Cmm* eine weniger mukoide Koloniemorphologie aufweisen, scheint allerdings mit der gleichen Effizienz wie der Transfer in normal mukoide Rezipienten statt zu finden. Wenn eine EPS-reiche Zelloberfläche oder -umgebung für den Plasmidtransfer tatsächlich essentiell ist, dann würde dies bedeuten, dass die Menge der vom Donor produzierten EPS für die Ausbildung des engen Zellkontakts zwischen Donor und Rezipient ausreichend ist. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass eine mukoide Zelloberfläche des Rezipienten für die Konjugation nicht nötig ist, während der EPS-reiche Phänotyp der Donorzellen essentiell ist. Diese Theorie müsste durch Kreuzungsexperimente mit einem

in der EPS-Produktion eingeschränkten Donorstamm untersucht werden. Ob die im Medium zur Verfügung stehenden Zucker durch die verstärkte EPS-Produktion nur indirekt den Plasmidtransfer beeinflussen oder ob die zugesetzten Zucker eine direkte Auswirkung haben, könnten Kreuzungsexperimente mit Donor- und Rezipientenstämmen zeigen, die beide in ihrer EPS-Produktion eingeschränkt sind. Für solche Experimente könnten die in dieser Arbeit entstandenen Transkonjuganten (EPS-Mutante + pCM2_{Nm}) als Donor verwendet werden. Allerdings wäre zunächst die Konstruktion eines Rezipientenstamms mit geeigneter Antibiotikumresistenz notwendig. Des Weiteren wäre auch von Interesse, ob die EPS, die durch die beiden anderen EPS-Biosynthesecluster II und III codiert werden, bei der Konjugation von pCM2 eine Rolle spielen.

Die Analyse unterschiedlicher Mengenverhältnisse (1:1, 1:10, 10:1) von Donor und Rezipient ergab, dass die zehnfache Menge an eingesetztem Rezipienten keinen Einfluss auf die Transfereffizienz hat. Die Anzahl an Transkonjuganten und die Transferhäufigkeit (Transkonjuganten pro reisolierendem Rezipient) befanden sich in der gleichen Größenordnung wie in Experimenten bei denen Donor und Rezipient im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Ein zehnfacher Donor-Überschuss wirkt sich dagegen negativ auf die Transferhäufigkeit aus. Die Anzahl entstehender Transkonjuganten wird um den Faktor 160 und die Transferhäufigkeit um den Faktor 26 verringert. Ähnliche Beobachtungen wurden von Piper and Farrand (1999) bei Untersuchungen zum Transfer vom Ti-Plasmid pTiC58 aus *Agrobacterium tumefaciens* gemacht. Die jeweils zehnfache Zunahme des Donor-Rezipient-Verhältnisses (10:1, 100:1, 1000:1) führte jeweils zu einer zehnfachen Verringerung der Transferhäufigkeit, die als Transkonjuganten pro eingesetztem Donor gemessen wurde. Die jeweils zehnfache Erhöhung der Rezipienten-Menge (Donor-Rezipient-Verhältnis, 1:10 bis 1:1.000.000) zeigte, dass die Transferhäufigkeit (Transkonjuganten pro eingesetztem Donor) bei einem Mischungsverhältnis von 1:10 am größten ist und bei größer werdendem Rezipienten-Überschuss gleich bleibt. Bezogen auf die eingesetzte Donor-Menge ist die Transferhäufigkeit von pCM2 in *Cmm* auch bei einem Mischungsverhältnis von 1:10 am größten. Da aber die absolute Transkonjuganten Anzahl auf dem Filter bei den Donor-Rezipienten Verhältnissen von 1:1 und 1:10 ungefähr gleich ist, ein Rezipienten-Überschuss also nicht zu einer besseren Detektierbarkeit von Transkonjuganten führen würde, wurden Donor und Rezipient standardmäßig im Verhältnis 1:1 gemischt. Falls in *Cmm* ähnlich wie in *Enterococcus faecalis* ein vom Rezipienten produziertes Signalmolekül existiert, könnte die vergleichsweise niedrige Transfereffizienz bei einem zehnfachen Donor-Überschuss im Konjugationsansatz das

Resultat einer geringeren Konzentration des postulierten Signalmoleküls sein.

Die Untersuchungen zur Kinetik der Konjugation von pCM2 in Filterkreuzungsexperimenten haben gezeigt, dass die Anzahl der Transkonjuganten nach einer kurzen *lag*-Phase exponentiell ansteigt. Dabei wird eine Verdoppelungszeit von 0,6 Stunden erreicht. Da für das Wachstum von *Cmm* auf Nitrocellulose-Filtern eine Generationszeit von 2,9 Stunden ermittelt werden konnte, wird deutlich, dass diese äußerst kurze Verdoppelungszeit von 0,6 Stunden nicht nur durch Teilung von Transkonjuganten, sondern vor allem durch Konjugationsereignisse erreicht wird. Die Betrachtung einzelner Zeitabschnitte innerhalb dieser aufgenommenen Kinetik hat gezeigt, dass vermutlich der Anteil neu entstehender Transkonjuganten innerhalb der ersten sieben Stunden größer ist als zwischen der 7. und der 12. Stunde. Anfangs ver Hundertfacht sich die Transkonjuganten-Anzahl im Zeitraum von drei Stunden, während sie später innerhalb von drei Stunden nur noch um den Faktor 12 ansteigt. Dies ist wahrscheinlich damit zu erklären, dass gegen Ende des Experiments der Anteil durch Teilung entstehender Transkonjuganten bezogen auf die Gesamtzahl der Transkonjuganten größer ist als am Anfang des Experiments. Allerdings kann die Herkunft der Transkonjuganten nicht genau bestimmt werden. Denn Transkonjuganten können entstehen: 1. durch ein primäres Transferereignis, bei dem das Plasmid von dem Donor auf den Rezipienten übertragen wird, 2. durch Teilung und 3. durch sekundäre Transferereignisse, bei denen der Transfer von einem neu entstandenen Transkonjuganten auf einen Rezipienten erfolgt. Ein Transkonjugant ist allerdings nicht sofort nach der Plasmidaufnahme zur Weitergabe befähigt. Es wird z. B. von Cullum et al. (1978) für den Transfer des F-Plasmids in *E. coli* beschrieben, dass neu entstandene Transkonjuganten eine bestimmte „Reifungszeit“ benötigen, bevor sie wie ein Donor funktionieren können. Diese beschriebene „Reifungszeit“ entspricht in etwa der Generationszeit. Dies hängt damit zusammen, dass die in vielen Konjugationssystemen identifizierte, für die Ausbildung des *mpf*-Komplexes essentielle Aggregations-Substanz, nur in die Zellwand neu synthetisierter Zellen eingebaut wird (Luckevich and Beveridge, 1989).

Andrup et al. (1998) haben die Kinetik des Transfers von pXO16 im Aggregations-vermittelten Konjugationssystem von *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in Flüssigkultur untersucht. Die Kinetik wird in drei Phasen unterteilt. In der ersten Phase ist ein nahezu linearer Anstieg der Transkonjuganten zu verzeichnen, der zum größten Teil durch primären Transfer zu erklären ist. In der zweiten Phase ist der Anstieg nicht mehr linear. Diese stärkere Zunahme an Transkonjuganten kann nicht nur auf das Wachstum der Zel-

len zurückgeführt werden, sondern ist auch durch sekundären Transfer entstanden. In der dritten Phase ist noch mal eine drastische Zunahme der Transkonjuganten zu verzeichnen, die von Andrup et al. (1998) durch die Transferaktivität späterer Generationen von kompetenten Transkonjuganten und den ursprünglichen Donoren erklärt wird. Die Kinetik des Transfers von pCM2 in *Cmm* könnte auch in diese drei Phasen unterteilt werden. Abbildung 5.1 A zeigt die Transkonjuganten-Zunahme über den gesamten Zeitraum von 12 Stunden. In Abbildung 5.1 B ist der Zeitraum bis zur siebten Stunde dargestellt.

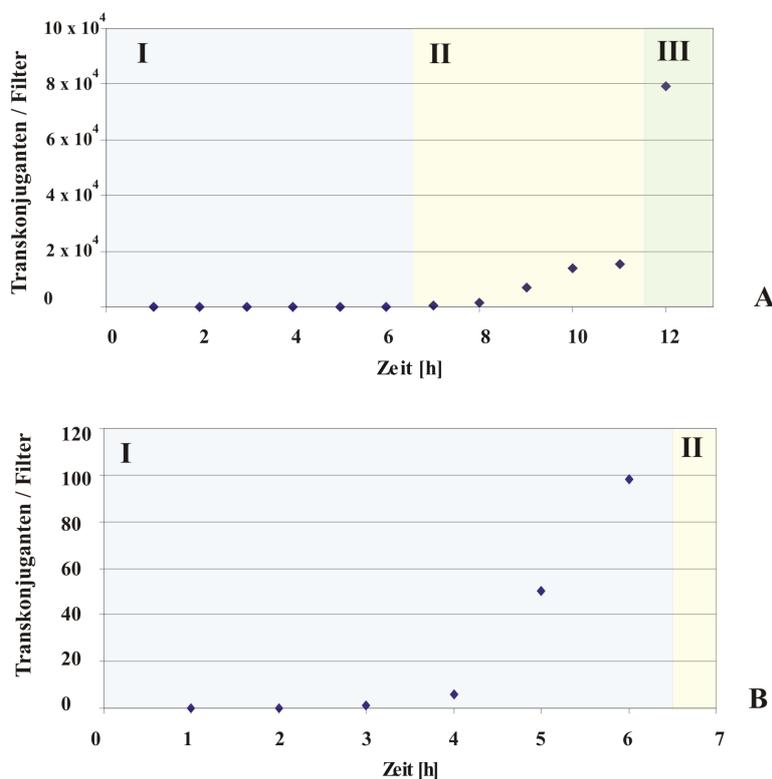


Abbildung 5.1: Phasen der Kinetik des Transfers von pCM2. Anzahl der Transkonjuganten auf den stündlich abgeschwemmten Filtern. A: Stunde 0-12; B: Stunde 0-7; die möglichen Phasen I, II und III sind dargestellt.

Bis zur siebten Stunde könnte die erste Phase dauern, in der die Transkonjugantenanzahl nahezu linear ansteigt und ihre Entstehung durch primären Transfer zu erklären ist (Abb. 5.1 B). Die zweite Phase könnte zwischen der siebten und elften Stunde liegen. Die starke Zunahme an Transkonjuganten wäre in dieser Phase auf sekundären Transfer zurückzuführen. Dadurch lässt sich für die Transkonjuganten eine „Reifungszeit“ von vier Stunden abschätzen. Vom Auftreten der ersten Transkonjuganten bis zur nicht mehr linearen Zu-

nahme vergehen ungefähr vier Stunden. Damit ist die abgeschätzte „Reifungszeit“ etwas länger als die Generationszeit von *Cmm*. Dies wurde auch von Andrup et al. (1998) für den Transfer von pXO16 im Aggregations-vermittelten Konjugationssystem von *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* beobachtet. Der drastische Anstieg nach elf Stunden könnte der Beginn der dritten Phase sein, der durch die vereinigte Transferaktivität späterer Generationen von kompetenten Transkonjuganten und ursprünglichen Donoren zu erklären ist. Die eigentliche Transferrate, ohne den Einfluss des sekundären Transfers und des Zellwachstums, kann folglich nur in der ersten Phase unter Ausschluss der *lag*-Phase berechnet werden. Für den Transfer von pCM2 kann eine Transferrate zwischen 4×10^{-9} und 4×10^{-8} Transkonjuganten pro Donor und Minute abgeschätzt werden (Tab. 4.6, S. 81). Es bleibt unklar, ob die von Andrup et al. (1998) beschriebene Theorie zur Kinetik auf den Transfer von pCM2 in Filterkreuzungsexperimenten übertragen werden kann. Dennoch bietet sie einen Erklärungsansatz für die Phasen, die in der Kinetik des Transfers von pCM2 zu beobachten sind.

Auch wenn die Transferrate für pCM2 am besten zwischen der dritten und siebten Stunde eines *filter matings* bestimmt werden kann, wurde als Standard in den *filter matings* eine Inkubationszeit von 12 Stunden eingehalten. Ein Grund dafür war, dass mit der standardisierten Methode auch potentiell weniger konjugative oder transfernegative Plasmide in den konstruierten Mutanten getestet werden sollten. Eine kürzere Inkubationszeit hätte eine schlechtere Detektierbarkeit von selteneren Transferereignissen zur Folge gehabt.

5.1.2 Analyse der Transferbedingungen

Mit der für *Cmm* optimierten und standardisierten Filterkreuzungsmethode konnte der Transfer von pCM1 und pCM2 aus verschiedenen Donorstämmen auf unterschiedliche Rezipienten analysiert werden. Für das mit 27,4 kb kleinere der beiden *Cmm*-Plasmide pCM1 wurde eine relativ geringe Transferhäufigkeit von durchschnittlich $1,4 \times 10^{-8}$ Transkonjuganten pro reisoliertem Rezipienten bestimmt. Der Transfer von pCM2 in den weißen Rezipienten tritt wesentlich öfter auf. Die Transferhäufigkeit variiert zwischen $7,1 \times 10^{-6}$ und $1,2 \times 10^{-4}$ Transkonjuganten pro reisoliertem Rezipienten.

Kreuzungsexperimente mit Donorstämmen, die sich in ihrem Plasmidstatus unterscheiden, haben gezeigt, dass die Transferhäufigkeit von pCM1 bzw. pCM2 nicht von der Anwesenheit des jeweils anderen Plasmids in den Donorzellen abhängt. pCM1 ist also unabhängig von pCM2 zum Transfer befähigt. Da die potentielle Transferregion von pCM1 nur einige Homologe zu Komponenten bereits bekannter Konjugationssysteme aufweist und keine TraA-

ähnliche Relaxase/Helicase von pCM1 codiert wird, wäre vorstellbar gewesen, dass pCM1 nicht konjugativ, sondern lediglich durch pCM2 mobilisierbar ist. Mobilisierbare Plasmide haben einen *oriT* und codieren in der Regel für Proteine, die für die DNA-Prozessierung benötigt werden (Relaxase und Helferproteine). Sie nutzen die durch ein Helferplasmid bereitgestellten Komponenten des *mpf*-Komplexes. Neben dem experimentellen Nachweis spricht also auch die Anwesenheit von Homologen zur VirB4-ATPase und zum *coupling*-Protein (TraG, VirD4) auf pCM1 für den autonomen konjugativen Transfer. Die meisten mobilisierbaren Plasmide besitzen kein eigenes *coupling*-Protein, sondern sind auf das des Helferplasmids angewiesen (RSF1010, Cole1). Eine Ausnahme ist CloDF13, dessen Mobilisierung auch ohne das *coupling*-Protein des Helferplasmids funktioniert (Llosa et al., 2002; Nunez and de la Cruz, 2001). Unklar bleibt, wie die Initiation des pCM1-Transfers ohne eine TraA-ähnliche Relaxase erfolgen kann. Denkbar wäre, dass das hypothetische RepA-Protein von pCM1 durch Einfügen eines Einzelstrangbruchs in die DNA die Funktion der Relaxase ersetzt. Das *repA*-Gen von pCM1 (pCM1_0028) ist zehn Gene stromabwärts des hypothetischen Tra-Operons von pCM1 lokalisiert. Die Inaktivierung des *repA*-Gens und die anschließende phänotypische Untersuchung der Mutante könnte klären, ob das RepA-Protein für den konjugativen Transfer von pCM1 verantwortlich ist. Allerdings könnte die Inaktivierung des wahrscheinlich auch für die Plasmid-Replikation essentiellen RepA-Proteins zum Verlust von pCM1 in den *Cmm*-Zellen führen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der Transfer von pCM1 durch ein chromosomal codiertes Protein initiiert wird. Da pCM1 in An- und Abwesenheit von pCM2 die gleiche Transferhäufigkeit aufweist, ist auszuschließen, dass die durch pCM2 codierte TraA-Relaxase an den *oriT* von pCM1 bindet und den Transfer einleitet. Vielleicht ist die auf pCM1 vermutlich fehlende Relaxase / Helicase eine Erklärung für die relativ geringe Transferhäufigkeit von pCM1.

Die Transfereffizienz verschiedener Plasmide und Konjugationssysteme miteinander zu vergleichen, ist nur bedingt möglich. Die angewandten Methoden zur Bestimmung der Transferhäufigkeit unterscheiden sich z. B. durch Parameter wie Start-Zellzahl, Mengenverhältnis zwischen Donor und Rezipient, Inkubationsdauer. Von diesen Faktoren wird die Anzahl entstehender Transkonjuganten beeinflusst. Außerdem wird die Transferhäufigkeit unterschiedlich definiert. Sie kann bezogen auf die Zellzahl von eingesetztem oder reisoliertem Donor oder Rezipienten angegeben werden. Die Transferhäufigkeit des Megaplasmids pREA400 von *Rhodococcus erythropolis* AN12 wird bezogen auf die reisolierten Rezipientenzellen angegeben und die Inkubation der Zellen auf dem Filter erfolgt über Nacht (Lessard et al., 2004). Von daher ist die für pREA400 ermittelte Transferhäufigkeit von 7×10^{-4}

Transkonjuganten pro reisolierterem Rezipienten (Yang et al., 2007) wahrscheinlich mit der von pCM2 ($7,1 \times 10^{-6}$ und $1,2 \times 10^{-4}$ Transkonjuganten pro reisolierterem Rezipienten) vergleichbar.

Ein Transfer des durch eine Neomycinresistenz markierten pCM2_{Nm} in Rezipientenstämme, in denen bereits pCM2 vorlag, konnte nicht nachgewiesen werden. Dies könnte verschiedene Gründe haben: Die Aufnahme gleicher Plasmide könnte nicht unterstützt vielleicht sogar verhindert werden (*surface* oder *entry exclusion*-System). Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die beiden pCM2-Derivate auf Grund ihrer gleichen Replikations- und Stabilitätsregion in einer Zelle nicht coexistieren können. Wegen der Inkompatibilität der Plasmide könnte also ein möglicher Transfer nicht nachgewiesen werden. Vorstellbar wäre aber auch, dass es in *Cmm* ein *surface* (oder *entry*) *exclusion*-System gibt. Für das F-Plasmid werden zwei unabhängige, aber kombinierbare, plasmidcodierte Komponenten des *surface exclusion*-Systems beschrieben. Das Produkt von *traS* ist ein Protein der inneren Membran, das vermutlich die konjugative DNA-Replikation inhibiert. *traT* codiert für ein Lipoprotein, das an der äußeren Membran lokalisiert die Bildung eines stabilen *mating*-Aggregats verhindert (Achtman et al., 1977). Die *entry exclusion*-Funktion von RP4 besteht aus einem durch *trbK* codierten Lipoprotein der inneren Membran, das ebenfalls die Bildung des *mating pairs* behindert (Haase et al., 1996). Falls es im Konjugationssystem von *Cmm* ein vom Rezipienten ausgesendetes Signalmolekül gibt, könnten die in diesem Experiment ausbleibenden Transkonjuganten auch damit erklärt werden, dass es keinen plasmidfreien Rezipienten gibt und deshalb die Konzentration des postulierten Signalmoleküls für die Induktion des Transfers nicht ausreichend ist.

Die in den unabhängig von einander durchgeführten Experimenten ermittelten Transferhäufigkeiten für die Plasmide können bis zu einem Faktor von 25 variieren. Für die Bestimmung der Transferhäufigkeit wurde jedes *mating* dreifach (3 Filter) ausgeführt. Die so dreifach bestimmte Anzahl an Transkonjuganten variierte in den meisten Fällen nur um den Faktor 1,2 - 1,4 selten um einen Faktor größer als 2. Dies zeigt, dass die Schwankungen wahrscheinlich durch experimentell bedingte Unterschiede z. B. in der Anzucht der Zellen begründet sind. Dass diese Schwankungen durch unterschiedlich häufiges, zufälliges Aufeinandertreffen von Donor und Rezipient auf dem Filter verursacht werden, ist unwahrscheinlich. Die Zelldichte, der auf den Filter aufgetragenen Suspension, sollte ausreichen, um spätestens nach zwei Generationen den Kontakt zwischen Donor und Rezipient zu garantieren. Auch von Piper and Farrand (1999) wurden ähnliche Schwankungen in unabhängig von einander durchgeführten Filterkreuzungsexperimenten mit dem pTiC58 von

Agrobacterium tumefaciens beschrieben. Innerhalb der Dreifachbestimmung (3 Filter) wurden allerdings nur Differenzen von ca. 10 % beobachtet.

Die parallele Anzucht und das Ausplattieren von Konjugationsansätzen in glucosehaltigem und glucosefreiem Medium zeigt nochmals die Relevanz der Glucose in Kreuzungsexperimenten. Die gemeinsame Anzucht von Donor und Rezipient in glucosefreiem Medium führte zu einer sehr geringen Anzahl an Transkonjuganten auf den selektiven Agarplatten mit und ohne Glucose-Zusatz. Dagegen konnten nach gemeinsamer Anzucht von Donor und Rezipient in glucosehaltigem Medium Transkonjuganten nachgewiesen werden. Allerdings führte das Ausplattieren der Zellen desselben Konjugationsansatzes auf glucosehaltigem und glucosefreiem Selektionsmedium zu einer sehr unterschiedlichen Anzahl an Transkonjuganten. Durchschnittlich konnte auf den glucosehaltigen Platten die 17-fache Anzahl an Transkonjuganten beobachtet werden (Probenentnahme nach 2, 4 und 6 Stunden gemeinsamer Inkubation). Nach 8 Stunden Inkubation ist sogar eine um den Faktor 426 größere Anzahl an Transkonjuganten auf den glucosehaltigen Selektionsagarplatten zu verzeichnen. Da die Proben aus demselben Konjugationsansatz stammen, wäre zu erwarten gewesen, dass auf den Selektionsagarplatten mit und ohne Glucose ungefähr die gleiche Anzahl an Transkonjuganten zu beobachten ist. Die Unterschiede in der Transkonjuganten-Anzahl zeigen, dass der Plasmidtransfer scheinbar nicht oder nicht ausschließlich während der Inkubation im Kolben, sondern auch nach dem Ausplattieren der Zellen auf den selektiven Agarplatten stattfindet. Da auf die Platten ca. 2×10^8 bis 8×10^8 Zellen aufgebracht worden sind, ist ein zufälliger Kontakt zwischen Donor- und Rezipientenzellen wahrscheinlich möglich, so dass es zum Plasmidtransfer auch nach dem Ausplattieren kommen konnte. Da der Angriffsort der beiden verwendeten Antibiotika Neomycin und Chloramphenicol die Proteinbiosynthese ist, würde ein erfolgreicher Plasmidtransfer auf dem Selektionsmedium voraussetzen, dass alle für die Konjugation benötigten Proteine bereits während der unselektiven Anzucht im Kolben gebildet worden sind.

Piper and Farrand (1999) konnten durch *lacZ*-Reporterfusions-Experimente zeigen, dass die durch Opine induzierte *tra*-Gen-Expression des Plasmids pTiC58 von *Agrobacterium tumefaciens* auf festem und in flüssigem Medium gleich stark ist, während die Transferfrequenz auf festen Medien zwischen 3 und 4 Zehnerpotenzen höher ist als in Flüssigkultur. Daraus wurde gefolgert, dass die Bildung von stabilen *mating pairs* auf festen Medien begünstigt ist, während das regulatorische System die Expression der *tra*-Gene sowohl auf festen als auch in flüssigen Medien aktivieren kann.

Es wäre also auch für *Cmm* vorstellbar, dass die Expression der für den Transfer benötigten

Gene schon während der Anzucht in Flüssigkultur stattfindet. In der zum Zeitpunkt t_0 , also direkt nach Zusammengabe von Donor und Rezipient, entnommenen Probe konnten keine Transkonjuganten nachgewiesen werden. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass die Expression der Transferegene in *Cmm* nur bei gemeinsamer Inkubation von Donor und Rezipient induziert wird. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Anzucht des Donors im Überstand einer Rezipientenkultur anscheinend bereits für die Induktion der Transferegene ausreicht. Dagegen führte die Anzucht der Donorzellen in unbehandeltem C-Medium bzw. im Überstand einer Donorkultur nicht zum Auftreten von Transkonjuganten. Die Expression der Transferegene wurde also vermutlich nicht induziert. Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass von *Cmm*-Rezipientenzellen ein Signalmolekül ausgesendet wird, dass in den Donorzellen die Expression der *tra*-Gene veranlasst. Dieses postulierte Signalmolekül scheint nicht vollkommen hitzestabil zu sein. Das Aufkochen und besonders das Autoklavieren des für die Anzucht des Donors verwendeten Rezipienten-Überstands hat zu einer verringerten Transkonjuganten-Ausbeute in anschließenden Kreuzungsexperimenten geführt. Bei dem postulierten Signalmolekül könnte es sich also um ein Protein handeln. Eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung des Rezipienten-Überstands ergab, dass das angenommene Signalmolekül bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 40 bis 50 % ausfällt. Allerdings war die Transkonjuganten-Ausbeute nachdem der Donor in dieser Fraktion des Rezipienten-Überstands angezogen worden war um den Faktor 16 geringer als bei Anzucht in unbehandeltem Rezipienten-Überstand. Der Effekt dieser Fraktion auf den Plasmidtransfer ist also deutlich geringer als der des ursprünglichen Rezipienten-Überstands. Dies könnte zum einen daran liegen, dass durch die Fällung die Konzentration des Signalmoleküls im Überstand verringert worden ist. Zum anderen wäre auch vorstellbar, dass das in der 40 - 50 %-Fraktion ausgefallene Signalmolekül zusammen mit einer zweiten Komponente, die sich nach der Fällung in einer anderen Fraktion befindet, besonders aktiv ist.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zum Nachweis eines Signalmoleküls sind nicht statistisch abgesichert und sind lediglich erste Indizien für die Anwesenheit eines vom Rezipienten unabhängig von der Anwesenheit eines potentiellen Donors ausgesendeten Signalmoleküls im Konjugationssystem von *Cmm*. Durch Anreicherung und Aufreinigung müsste das postulierte Signalmolekül nachgewiesen und charakterisiert werden. Auf Grund ihrer häufig sehr geringen Größe gestaltet sich die Identifizierung und Charakterisierung solcher Signalmoleküle aber oft sehr schwierig. Des Weiteren könnte durch Microarray-Analysen untersucht werden, ob die Transkription der Transferegene von *Cmm* tatsächlich durch die

Anwesenheit von potentiellen Rezipientenzellen induziert wird. Durch den Vergleich der Transkriptionsprofile von Zellen, die im Rezipienten-Überstand bzw. in normalem Nährmedium angezogen worden sind, könnte der Einfluss des Rezipienten auf die Induktion der Transferegene untersucht werden.

Für *Enterococcus faecalis* wird ein sehr spezielles Pheromon-induziertes Konjugationssystem beschrieben. Durch ein chromosomal codiertes, plasmidspezifisches Pheromon wird in Donorzellen die Expression der Konjugationsgene induziert. Auch die Produktion der Aggregations-Substanz, die den für die Konjugation essentiellen Zellkontakt vermittelt, wird durch das Pheromon induziert (Dunny, 2007; Waters et al., 2004). Das Pheromon-induzierte Konjugationssystem von *Enterococcus faecalis* wurde bereits in der Einleitung dieser Arbeit (S. 11) ausführlich vorgestellt, da es das am besten erforschte Konjugationssystem von Gram-positiven Bakterien ist.

Bei den Experimenten zur Analyse des Signalmoleküls war die stark schwankende Anzahl an Transkonjuganten in parallel durchgeführten Experimenten besonders auffällig. Diese Schwankungen sind vielleicht damit zu erklären, dass das Zusammentreffen von Donor- und Rezipientenzellen sowohl bei der Anzucht in Flüssigkultur als auch auf Festmedium ein zufälliges Ereignis ist, das trotz der gleichen Zelldichte der Kulturen nicht gleich häufig auftritt. Denn anders als bei den durchgeführten *filter matings* ist in diesem Experiment die Zelldichte, der auf die komplette Agarplatte ausplattierten Zellsuspension, nicht unbedingt ausreichend, um sofort (oder nach ein bis zwei Teilungen) Zellkontakt zwischen Donor und Rezipient zu garantieren. Da sich Donor und Rezipient nicht auf den doppeltselektiven Agarplatten vermehren können, setzt die Entstehung von Transkonjuganten voraus, dass Donor- und Rezipientenzelle entweder in Flüssigkultur oder auf dem Festmedium zufällig zusammengetroffen sind.

5.2 Identifizierung der potentiellen Transferregionen der *Cmm*-Plasmide

Nach der vollständigen Sequenzierung und Annotation des Genoms von *Cmm* wurden auf den beiden Plasmiden pCM1 und pCM2 Genregionen identifiziert, die wahrscheinlich für den Plasmidtransfer essentiell sind. Sowohl auf pCM1 als auch auf pCM2 wurden Homologe zu *coupling*-Proteinen (TraG, VirD4) und der VirB4-ATPase des Typ-IV-Sekretionssystems gefunden (Abb. 5.2). Konjugationssysteme stellen eine Untergruppe der

Typ-IV-Sekretionssysteme dar, die auch zum Transport von DNA-Protein-Komplexen befähigt sind. VirB4- und VirD4-Homologe wurden auf vielen konjugativen Plasmiden von Gram-positiven Bakterien identifiziert (Grohmann et al., 2003).

Der Abbildung 5.2 kann man entnehmen, dass die Transferregionen von pCM1 und pCM2 einen relativ ähnlichen Aufbau haben. Stromaufwärts der hypothetischen VirB4-Homologe werden sowohl auf pCM1 als auch auf pCM2 zunächst zwei hypothetische Membranproteine, dann ein wahrscheinlich sekretiertes Protein und ein weiteres hypothetisches Membranprotein codiert. Lediglich die Lage des VirD4-Homologs unterscheidet sich stark. Während *traG* von pCM1 vor dem hypothetischen Tra-Operon lokalisiert ist, befindet sich *traG* von pCM2 stromabwärts von *traE*, innerhalb des hypothetischen Tra-Operons von pCM2. Die Transferregionen von pCM1 und pCM2 haben also eine ähnliche Struktur. Dabei zeigen die von pCM1 und pCM2 codierten hypothetischen Transfer-Proteine untereinander aber keine ausgeprägte Homologie. Auch die Plasmidrückgrate von pCM1 und pCM2 unterscheiden sich, so dass sie kompatibel sind und coexistieren können.

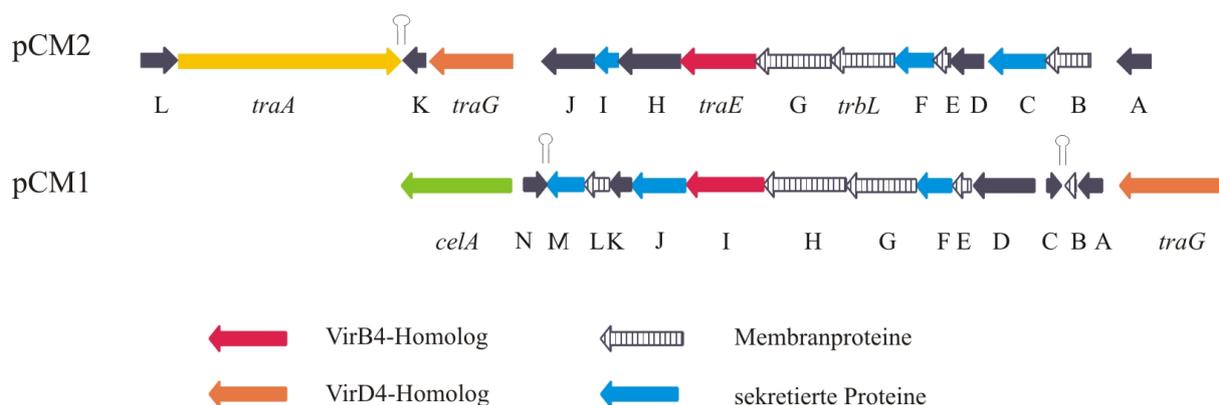


Abbildung 5.2: Transferregionen von pCM2 und pCM1: rot: hypothetische VirB4-Homologe (ATPase), orange: hypothetische VirD4-Homologe (*coupling*-Protein), schraffiert: Transmembranhelices im codierten Protein, hellblau: wahrscheinlich sekretierte Proteine, gelb: TraA-Relaxase / Helicase, grün: β -1,4-Endoglucanase (Pathogenitätsdeterminante).

5.2.1 Charakterisierung der Transferregion von pCM2

Die potentielle Transferregion von pCM2 besteht aus 15 Genen, von denen 14 (*orfA* - *orfK*) wahrscheinlich als Operon organisiert sind (Abb. 5.2). Das *traA*-Gen ist stromabwärts des hypothetischen Tra-Operons und in gegensätzlicher Orientierung lokalisiert.

TraA von *Cmm* weist sowohl eine Relaxase- als auch eine Helicase-Domäne auf. Die Analyse der ersten 320 Aminosäuren von TraA zeigte, dass TraA von *Cmm* die von Yang et al. (2007) kürzlich beschriebenen Consensusmotive für Relaxasen von Actinomyceten enthält. Die Anwesenheit der Helicase-motive I bis VI weisen daraufhin, dass die Helicase-Domäne von TraA zum Superfamilie-I-Typ (SFI) der Helicasen gehört. Während die Kombination von Relaxase- und Helicaseaktivität in Transferproteinen von Gram-negativen Bakterien selten zu sein scheint (Byrd et al., 2002), tritt sie in Actinomyceten häufig auf. Die TraA-Proteine von *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* und *Gordonia* haben eine kombinierte Relaxase- und Helicaseaktivität. TraA von *Streptomyces* scheint eine Ausnahme darzustellen, da es nur eine Relaxaseaktivität hat. Auf Grund der Homologie (Motive IA, II, III) der pREA400-Relaxase zu TraI vom F-Plasmid wird für pREA400 von *Rhodococcus erythropolis* angenommen, dass die DNA als Einzelstrang übertragen wird (Yang et al., 2007).

Die Inaktivierung des *traA*-Gens auf pCM2 wurde durch das Einfügen einer ca. 2,5 kb großen Deletion (326 - 1157 AS) und die Insertion einer Spectinomycinresistenzgen-Kassette realisiert. Durch Kreuzungsexperimente *in planta* und durch *filter matings* konnte anschließend gezeigt werden, dass die Inaktivierung des *traA*-Gens den Verlust der Transferfähigkeit von pCM2 zur Folge hatte. In Kreuzungsexperimenten mit der *traA*-Mutante als Donor und dem weißen Rezipienten konnten, bei einer Nachweisgrenze von 1,5 Transkonjuganten pro Filter, keine Transkonjuganten nachgewiesen werden. Während in Kreuzungsexperimenten mit einem vollständig intaktem pCM2 ca. 20.000 Transkonjuganten pro Filter entstanden sind. Da es sich bei der Relaxase / Helicase, die durch *traA* codiert wird, wahrscheinlich um das Initiatorprotein des konjugativen DNA-Transfers handelt, war zu erwarten, dass die Inaktivierung gravierende Auswirkungen auf den Transfer von pCM2 haben würde. Offensichtlich kann die Funktion von TraA auf pCM2 nicht durch ein anderes z. B. von pCM1 oder chromosomal codiertes Protein ersetzt werden. Auch eine *gene disruption*-Mutation im *traA*-Gen des Megaplasmids pREA400 (ca. 400 kb) des Actinomyceten *Rhodococcus erythropolis* hatte einen Effekt auf den Transfer von pREA400 in den Rezipientenstamm SQ1. Die Anzahl an Transkonjuganten, die bei Kreuzungsexperimenten auf Festmedium entstanden, sank von 200.000 auf weniger als 30 Transkonjuganten pro Kreuzungsexperiment. Durch die Inaktivierung des *traA*-Gens von pREA400 wurde die Transkonjugantenanzahl ungefähr um den Faktor 10.000 reduziert (Yang et al., 2007). Die TraA-Proteine von *Rhodococcus erythropolis* AN12 und von *Cmm* sind in einem Bereich von 1116 Aminosäuren zu 36 % identisch und haben die charakteristischen Helicase- und Relaxasemotive.

Ebenso blieb der Transfer des konjugativen, Pheromon-unabhängigen *Enterococcus* Plasmids pHT β nach Einfügen einer zehn Aminosäuren großen Deletion in dem *orf34*, der für eine hypothetische Relaxase / Nickase codiert, aus (Tomita and Ike, 2005).

Auch die jeweilige Inaktivierung des *trbL*-Gens und des *traE*-Gens, dem siebten bzw. neunten Gen des hypothetischen Operons, führte zum Verlust der Transferfähigkeit von pCM2. Allerdings ist nicht sicher, ob dieser Verlust in den beiden Mutanten nur auf das inaktivierte *trbL* bzw. *traE*-Gen zurückzuführen ist. Polare Effekte auf die jeweils stromabwärts liegenden Gene können nicht ausgeschlossen werden, da bisher nicht untersucht worden ist, ob die verwendeten Antibiotikumresistenzgen-Kassetten Terminator-Strukturen enthalten, die zum Abbruch der mRNA-Synthese führen.

TraE von *Cmm* zeigt Ähnlichkeit zu VirB4-Proteinen von *Brevibacterium linens* BL2 und *Frankia* sp. CcI3. VirB4-Proteine sind ein wichtiger Bestandteil von Typ-IV-Sekretionssystemen. Als Hexamer bilden sie eine Art Andockstelle am Eingang des Kanals und sind gemeinsam mit dem *coupling*-Protein und der VirB11-ATPase wahrscheinlich direkt am Transport des Substrats beteiligt (Middleton et al., 2005). Konjugationssysteme stellen eine Untergruppe der Typ-IV-Sekretionssysteme dar. Da die Inaktivierung des *traE*-Gens (VirB4-Homolog) den Verlust der Transferfähigkeit von pCM2 zur Folge hatte, kann die Funktion von TraE (VirB4-ATPase) scheinbar nicht durch das von pCM1 (*orfI*) codierte VirB4-Homolog ersetzt werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass die beiden von pCM1 bzw. pCM2 codierten VirB4-Homologe untereinander keine Ähnlichkeit zeigen. Vermutlich können sie sich deshalb nicht gegenseitig komplementieren.

Für die VirB4-ATPase von *Agrobacterium tumefaciens* konnte gezeigt werden, dass sie sowohl für den T-DNA-Transfer in die Pflanzenzelle als auch für den konjugativen Transfer von mobilisierbaren IncQ-Plasmiden (RSF1010) essentiell ist (Beijersbergen et al., 1992; Fullner et al., 1994). Ebenso wurde von Lawley et al. (2003a) beschrieben, dass eine Mutation im *trhC*-Gen (TrhC-Homologe: TraC von F, TrbE/VirB4 von RP4) von IncHI1 Plasmid R27 den Verlust der Transferfähigkeit zur Folge hatte.

Die von *trbL* abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt über einen kurzen Bereich (AS 186-280) Homologie (34 % Identität) zum TrbL-Protein von *Rhodococcus equi* (Acc.-Nr.: BAB16649). Für das TrbL-Protein von *Cmm* werden sechs Transmembranhelices vorhergesagt. Deshalb ist für TrbL eine Beteiligung an der Ausbildung des *mpf*-Komplexes wahrscheinlich. Die Inaktivierung des *trbL*-Gens könnte also zu einem fehlerhaften Aufbau des *mpf*-Komplexes geführt haben, so dass der Transfer von pCM2 in den Rezipienten nicht möglich war. TrbL von RP4 befindet sich in der Cytoplasmamembran (Grahn et al., 2000) und auch für VirB6

wird vermutet, dass es in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist (Hapfelmeier et al., 2000). Deletionen im *virB6*-Gen führten zur Avirulenz von *Agrobacterium*-Stämmen (Hapfelmeier et al., 2000; Judd et al., 2005) .

Die phänotypischen Analysen der Mutanten haben gezeigt, dass die auf pCM2 identifizierte potentielle Transferregion tatsächlich für den Transfer von pCM2 essentiell ist. Sowohl die Inaktivierung des Relaxase-Gens *traA* als auch die Mutationen in Genen (*trbL* und *traE*) des hypothetischen Tra-Operons haben zum Verlust der Konjugationsfähigkeit von pCM2 geführt. Durch die partielle Charakterisierung der Region konnte ihre Relevanz für den Transfer von pCM2 gezeigt werden.

5.2.2 Charakterisierung der Transferregion von pCM1

Die hypothetische Transferregion von pCM1 besteht aus 14 Genen und ist stromaufwärts vom *celA*-Gen gelegen (Abb. 5.2). Die Gene *orfD* bis *orfM* könnten als Operon organisiert sein. Durch das *traG*-Gen, das sich vor dem hypothetischen Tra-Operon von pCM1 befindet, wird vermutlich das *coupling*-Protein (TraG, VirD4) von pCM1 codiert. Das von *orfI* codierte hypothetische ATP-bindende Protein weist Ähnlichkeit zum VirB4-Protein von *Brevibacterium linens* BL2 auf. Somit werden auch in der hypothetischen Transferregion von pCM1 Homologe zu Schlüsselproteinen von Typ-IV-Sekretionssystemen codiert. Neben der Konstruktion einer Mutation im *orfI* von pCM1 wurde auch der *orfM*, der für ein wahrscheinlich sekretiertes Protein codiert, das über einen kurzen Bereich von 169 Aminosäuren Homologie (45 %) zu einer nicht näher charakterisierten hypothetischen extrazellulären Deoxyribonuclease aus *Mycobacterium smegmatis* str. MC2 155 aufweist, durch die Insertion einer Antibiotikumresistenzgen-Kassette inaktiviert. Die Inaktivierung von *orfI* bzw. *orfM*, dem sechsten bzw. zehnten Gen des hypothetischen Operons, hatte in den beiden Mutanten den Verlust der Transferfähigkeit von pCM1_{*orfI*} bzw. pCM1_{*orfM*} zur Folge. In Kreuzungsexperimenten, die *in planta* und als *filter mating* durchgeführt wurden, blieb der Transfer von pCM1 in den weißen Rezipienten aus. Während der Transfer des intakten pCM1 in Filterkreuzungsexperimenten zur Entstehung von durchschnittlich 19 Transkonjuganten pro Filter führte. Damit ist die Transfereffizienz von pCM1 wesentlich geringer als die von pCM2. Durch den Transfer von pCM2 können in *filter matings* mehr als 10.000 Transkonjuganten pro Filter entstehen. Vielleicht wäre für die phänotypische Analyse der pCM1-Mutanten die Entwicklung und Anwendung einer noch sensitiveren Nachweismethode für den Plasmidtransfer erforderlich gewesen. Bei der ohnehin schon vergleichsweise geringen Transfereffizienz von pCM1 muss in Betracht gezogen werden, dass vielleicht ein

Transfer von pCM1_{orfI} bzw. pCM1_{orfM} experimentell bedingt nicht nachweisbar war. Allerdings sollten bei einer Inkubationszeit des Konjugationsansatzes auf dem Filter von 12 Stunden und einer Nachweisgrenze von 1,5 Transkonjuganten pro Filter, auch seltene Transferereignisse detektiert werden können, so dass vermutlich doch die Mutationen in *orfI* und *orfM* des hypothetischen *tra*-Operons von pCM1 zum Verlust der Transferfähigkeit von pCM1 geführt haben. Dass die Inaktivierung des *orfI*, der für das VirB4-Homolog codiert, einen Effekt auf den Plasmidtransfer hat, war zu erwarten, da VirB4-Homologe wichtige Bestandteile von Konjugationssystemen sind. Auch die Inaktivierung des *traE*-Gens von pCM2, das vermutlich ebenfalls für ein VirB4-Homolog codiert, hatte den Verlust der Transferfähigkeit von pCM2 zur Folge. Allerdings können auch in der *orfI*-Mutante polare Effekte auf die stromabwärts liegenden Gene (*orfJ* bis *orfM*) nicht ausgeschlossen werden. Ob der Effekt also nur auf den Ausfall des jeweiligen Gens zurückzuführen ist, könnte die Komplementation der Mutanten mit den entsprechenden Genen zeigen.

Der vergleichsweise selten auftretende Transfer von pCM1 erschwert eine gesicherte Analyse der Relevanz einzelner Gene der potentiellen Transfer-Region von pCM1. Somit sind die Ergebnisse nur ein Indiz dafür, dass die Region eine Rolle im Transfer von pCM1 spielt. Durch die Entwicklung und Anwendung einer sensitiveren Methode müssen diese Hinweise bestätigt werden.

5.3 Stabilität und Segregation von pCM2

Bereits der experimentelle Umgang mit *Cmm* hat gezeigt, dass das mit 70 kb größere der *Cmm*-Plasmide pCM2 weniger stabil ist als das 27,4 kb große pCM1. Während nach längerer Kultivierung und besonders nach der Elektroporation von *Cmm*-Zellen des öfteren der Verlust von pCM2 zu beobachten ist, liegt pCM1 stabil in den *Cmm*-Zellen vor. Ein Begründung dafür könnte sein, dass pCM1 mit einer Kopiezahl von ca. 5 und pCM2 nur mit einer Kopiezahl von maximal 1 in den Zellen vorliegt. Daher ist der Verlust von pCM1, der zu dem plasmidfreien Curing-Derivat CMM100 führte, ein sehr seltenes Ereignis. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen zur Stabilität nur mit pCM2 durchgeführt.

Bei Anzucht von *Cmm* in Flüssigkultur führte die Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 26 °C auf 32 °C zu einem verstärkten Verlust von pCM2. Nach 32-tägiger Kultivierung mit 14 Verdünnungsschritten (14 Anzuchtzyklen), was bei einer Kultivierungstemperatur von 32 °C ca. 63 Generationen entspricht, besaßen nur noch 13 % der CMM102_{Nm}-Zellen das Neomycin-markierte pCM2_{Nm}. Währenddessen nahm der Anteil plasmidhaltiger Zellen

in der bei 26 °C inkubierten Kultur nur sehr langsam ab und war nach ca. 84 Generationen mit 87 bis 98 % immer noch sehr hoch. Die Erhöhung der Kultivierungstemperatur um 6 °C führt also über einen Zeitraum von mehr als 28 Generationen (32 °C) zu einer größeren Instabilität von pCM2.

Vielleicht rührt der Plasmidverlust daher, dass die plasmiderhaltenden Mechanismen, wie zum Beispiel die Plasmidreplikation und das *partitioning* durch die Erhöhung der Kultivierungstemperatur in ihrer Funktion oder Effektivität beeinträchtigt worden sind. Das vermehrte Auftreten von plasmidfreien Zellen deutet auch daraufhin, dass *Cmm* keine effektive *post segregational killing*-Funktion besitzt. Bisher sind auf den Plasmiden von *Cmm* keine Gene, die für das Toxin und das Antidot codieren, identifiziert worden.

Von Avşaroğlu et al. (2007) wurde die Stabilität von Plasmiden in drei *Lactococcus lactis*-Subspecies untersucht. Auch hier wird ein gemeinsamer Effekt der Temperaturerhöhung auf mehr als 30 °C und der Inkubationsdauer auf die Stabilität der Plasmide beschrieben. Die Analyse der transfernegativen pCM2-Derivate sollte zeigen, inwiefern der Verlust der Transferfähigkeit die Stabilität von pCM2 beeinflusst. Die nicht konjugativen pCM2-Derivate könnten nach möglichem Verlust von den Segreganten nicht wieder durch Konjugation zurückgewonnen werden. Der Verlust der Transferfähigkeit könnte die Stabilität des Plasmids in einer Population also sehr stark beeinträchtigen. Bei Anzucht der Zellen in Flüssigkultur auf dem Luftschtler bei 32 °C schien das nicht konjugative pCM2_{traE} etwas stabiler als das konjugative pCM2_{Nm} zu sein. Der Vergleich der Stabilität von pCM2_{traE} nach Kultivierung bei 26 °C und 32 °C zeigte aber, dass auch das nicht konjugative pCM2_{traE} durch die Erhöhung der Anzuchttemperatur um 6 °C an Stabilität verloren hat. Nach ca. 63 Generationen war es noch in 65 % der bei 32 °C inkubierten Zellen nachzuweisen. Die Erhöhung der Temperatur um 6 °C hat über einen Zeitraum von mindestens 56 Generationen (32 °C) bei Anzucht der Zellen in Flüssigkultur zu einem verstärkten Verlust sowohl des nicht konjugativen pCM2_{traE} als auch des konjugativen pCM2_{Nm} geführt. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Anwesenheit von pCM1 in den Zellen keinen Einfluss auf die Stabilität von pCM2 hat. Unklar bleibt, ob das Neomycin-markierte pCM2_{Nm} durch die Erhöhung der Temperatur tatsächlich in einem größeren Maße instabil wird als pCM2_{traE}. Vielleicht kann eine größere Instabilität darauf zurückgeführt werden, dass das pCM2_{Nm} ein Kointegrat aus dem ursprünglichen pCM2 und dem Mutageneseplasmid pHJ21 ist. Allerdings wird diese Instabilität nicht darin begründet sein, dass das Kointegrat (78 kb) ca. 6 kb größer als pCM2 ist. Wahrscheinlicher ist, dass sich die Stabilität der pCM2-Derivate nicht wesentlich unterscheidet und dass diese Ergebnisse nur einen zufällig aufgetretenen

Segregationsverlauf dokumentieren. Denn die Kinetik der Segregation hängt auch davon ab, wann die ersten Plasmidverluste aufgetreten sind und in welchem Umfang sich die entstandenen Segreganten vermehrt haben. Durch einen größeren Probenumfang und parallele Versuchsansätze müsste gezeigt werden, ob pCM2_{traE} tatsächlich stabiler ist oder ob dieser Effekt bei zukünftigen Segregationsexperimenten nicht mehr zu beobachten ist.

Sowohl die Stabilität des konjugativen als auch des nicht konjugativen pCM2-Derivats wurde durch die Temperaturerhöhung beeinträchtigt. Bei Anzucht in Flüssigkultur wurde durch die Transferfähigkeit die Stabilität von pCM2_{Nm} in den *Cmm*-Zellen nicht verbessert. Ein Grund dafür könnte sein, dass durch die Anzucht der Zellen in Flüssigkultur auf dem Luftschüttler (ca. 90 Umdrehungen pro Minute) Konjugation, also auch der Rücktransfer von pCM2 in die Segreganten, nicht begünstigt wird. Bisher ist der Transfer von pCM2 in Flüssigkultur nicht nachweisbar. Ob der Verlust der Transferfähigkeit eines Plasmids sich negativ auf die Stabilität auswirkt, musste also in einem System, das Konjugation begünstigt, untersucht werden. Die Ergebnisse der Segregationsexperimente, die in der Tomatenpflanze durchgeführt wurden, bestätigten diese Vermutung. Nach 36-tägiger Inkubation der *Cmm*-Zellen in der Tomatenpflanze bei 32 °C Anzuchttemperatur erwies sich das nicht konjugative pCM2_{traE} als instabiler als das konjugative pCM2_{Nm}. Der Anteil plasmidtragender Zellen der *traE*-Mutante lag nach 36 Tagen bei durchschnittlich 94,4 % während noch in durchschnittlich 99,4 % der CMM102_{Nm}-Zellen das konjugative pCM2_{Nm} nachgewiesen werden konnte. Durch den Wilcoxon-Rangsummentest konnte bestätigt werden, dass die Erhöhung der Anzuchttemperatur im Stamm CMM102_{Nm} keinen Einfluss auf die Stabilität des konjugativen pCM2_{Nm} hat, während sie die Stabilität des nicht konjugativen pCM2_{traE} beeinträchtigt.

Das durchgeführte 36-tägige *in planta*-Experiment umfasst, da für *Cmm* in der Pflanze eine Generationszeit von ca. 2 Tagen ermittelt worden ist (Gräfen, 2005), nur ca. 18 Generationen, während die Segregation von pCM2 in Flüssigkultur über einen Zeitraum von 63-84 Generationen beobachtet worden ist. Die Ergebnisse der *in planta* und in Flüssigkultur durchgeführten Experimente zur Segregation von pCM2 sind also nicht direkt miteinander vergleichbar.

Von Sia et al. (1995) wurde der Einfluss der Transferfähigkeit auf die Stabilität des IncP α -Plasmids RK2 in verschiedenen Wirtszellen untersucht. Der vermutete positive Effekt der Konjugationsfähigkeit auf die Stabilität war zunächst in Flüssigkultur nicht detektierbar, erst auf Festmedium, das Konjugation von RK2 nachweislich begünstigt, zeigte sich ein verstärkter Plasmidverlust in den transfernegativen Mutanten. Daraus wurde gefolgert, dass

das konjugative Transfersystem von RK2 ein wichtiger Faktor ist, der zur Verringerung der Segreganten-Anzahl beiträgt, wenn die Anzucht in einem System erfolgt, das Konjugation ermöglicht.

So ist vorstellbar, dass der Verlust des konjugativen pCM2_{Nm} bei der erhöhten Anzuchttemperatur auch auf Festmedium genauso häufig auftritt wie der Verlust des nicht konjugativen pCM2-Derivats. Dieser Verlust ist allerdings nicht nachweisbar, da er durch die konjugative Wiederaufnahme des pCM2_{Nm} kompensiert wird. Die Konjugationseffizienz von pCM2 wird durch die Temperaturerhöhung auf 32 °C kaum beeinträchtigt. Die Transferhäufigkeit von pCM2 in Filterkreuzungsexperimenten bei einer Inkubationstemperatur von 32 °C lag zwischen $7,5 \times 10^{-7}$ und $1,3 \times 10^{-5}$ Transkonjuganten pro reisolierendem Rezipienten, während bei einer Kultivierungstemperatur von 26 °C von pCM2 eine Transferhäufigkeit von $7,1 \times 10^{-6}$ bis $1,2 \times 10^{-4}$ Transkonjuganten pro reisolierendem Rezipienten erreicht wird.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass gerade in dem natürlichen Habitat von *Cmm* die Konjugationsfähigkeit der Plasmide ein wichtiger Faktor ist, der die Virulenz einer Population sicherstellt. In den Tomatenanbaugebieten liegt die Temperatur sehr häufig über den für *Cmm* optimalen 26 °C. Dies hätte den verstärkten Verlust von pCM2 und damit eine Verringerung der Virulenz zur Folge. Da der Verlust von pCM2 aber durch die konjugative Wiederaufnahme aufgehoben werden kann, ist die Pathogenität von *Cmm* auch unter höheren Temperaturen sichergestellt. Möglich wäre auch, dass durch Plasmid-Verlust und konjugative Wiederaufnahme eine gezielte Modulation der Virulenz erfolgt. Durch den Plasmidstatus kann die Stärke der Virulenz variiert werden, was zur Erhaltung des Wirt-Pathogen-Gleichgewichts beitragen könnte.

Es ist bekannt, dass der Besitz von „mobilen Elementen“ zu denen neben den Plasmiden auch IS-Elemente und Transposons gehören, zu einem flexiblen, dynamischen Genom führt, das in der Wirt-Pathogen-Interaktion und unter veränderten Umweltbedingungen vorteilhaft sein kann. Diese genetische Variabilität ermöglicht eine schnelle Anpassung an Umweltbedingungen und beeinflusst die bakterielle Evolution (Vivian et al., 2001; Sundin, 2007). So wird zum Beispiel angenommen, dass aus dem Pflanzen-Epiphyt *Pantoea agglomerans* durch den Erwerb einer plasmidcodierten Pathogenitäts-Determinante (pPATH) „erst kürzlich“ der pathogene Stamm *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophila* entstanden ist (Manulis and Barash, 2003).

Auch im Hinblick auf die Entwicklung der verschiedenen Subspecies von *Clavibacter michiganensis* könnte die Transferfähigkeit der Plasmide eine wichtige Rolle gespielt haben. Sequenzvergleiche der *Cmm*-Plasmide mit dem Plasmid pSC1 des Kartoffelpathogens *Cla-*

vibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* (*Cms*) lassen eine gemeinsame Herkunft vermuten. Dass Konjugation zwischen den Subspecies auftreten kann, konnte zumindest für *Clavibacter michiganensis* subsp. *tesselarius* (*Cmt*), dem Erreger der Mosaik-Fleckenkrankheit des Weizens, gezeigt werden. Der Transfer des Neomycin-markierten pCM2_{Nm} in *Cmt*-Zellen war erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

5.4 Fazit und Ausblick

Durch die zum Teil detaillierte Analyse der Transferbedingungen von pCM2 konnte für *Cmm* die Filterkreuzungsmethode etabliert und standardisiert werden. Dies ermöglichte umfangreiche Untersuchungen mit verschiedenen Donor- und Rezipientenstämmen. Es konnte gezeigt werden, dass die Transferhäufigkeit von pCM2 bis zu 4 Zehnerpotenzen größer ist als die von pCM1. Da die Methode auf Grund der Transferanalysen von pCM2 entwickelt worden ist, wäre für die Untersuchungen zum Transfer von pCM1 die Entwicklung einer noch sensitiveren Nachweismethode wünschenswert.

Die Transferregionen von pCM1 und pCM2 wurden identifiziert und partiell charakterisiert. Durch die Inaktivierung einzelner Gene dieser Regionen, die den Verlust der Konjugationsfähigkeit zur Folge hatte, konnte die Relevanz der beiden Transferregionen für den konjugativen Plasmidtransfer nachgewiesen werden. Um sicherzustellen, dass der transfernegative Phänotyp in den Mutanten durch das inaktivierte Gen und nicht auf polare Effekte im hypothetischen Tra-Operon zurückzuführen ist, muss in zukünftigen Arbeiten die Komplementation der Mutanten erfolgen. Auch das Einbringen von gezielten Punktmutationen in die Relaxase- oder Helicasemotive von TraA könnte Aufschluss über das aktive Zentrum und die Funktion von TraA geben.

Es gibt erste Hinweise auf die Anwesenheit eines von Rezipienten ausgesendeten Signalmoleküls. Durch Anreicherung und Aufreinigung müsste das postulierte Signalmolekül nachgewiesen und charakterisiert werden. Microarray-Experimente könnten klären, ob die Anwesenheit eines potentiellen Rezipienten tatsächlich die Transkription der Transfergene in den Donorzellen induziert.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Stabilität von pCM2 bei längerer Kultivierung in Flüssigkultur unter einer erhöhten Anzuchttemperatur von 32 °C abnimmt. Bei der Kultivierung von *Cmm in planta* wird dieser Verlust durch die konjugative Wiederaufnahme des Plasmids wahrscheinlich kompensiert. Die Transferfähigkeit eines Plasmids trägt also zu seiner Stabilität innerhalb einer Population bei.

Literaturverzeichnis

- 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*.
- Achtman, M., Kennedy, N., and Skurray, R. (1977). Cell-cell interactions in conjugating *Escherichia coli*: role of *traT* protein in surface exclusion. *Proc Natl Acad Sci US A*, 74(11):5104–8.
- Alt-Mörbe, J., Stryker, J., Fuqua, C., Li, P., Farrand, S., and Winans, S. (1996). The conjugal transfer system of *Agrobacterium tumefaciens* octopine-type Ti plasmids is closely related to the transfer system of an IncP plasmid and distantly related to Ti plasmid *vir* genes. *Journal of Bacteriology*, 178(14):4248.
- Altenbuchner, J. and Cullum, J. (1984). DNA amplification and an unstable arginine gene in *Streptomyces lividans* 66. *Mol. Gen. Genet.*, 195:134–138.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25:3389–3402.
- Anderson, D. and McKay, L. (1984). Genetic and physical characterization of recombinant plasmids associated with cell aggregation and high-frequency conjugal transfer in *Streptococcus lactis* ML3. *Journal of Bacteriology*, 158(3):954.
- Andrup, L., Smidt, L., Andersen, K., and Boe, L. (1998). Kinetics of conjugative transfer: A study of the plasmid pXO16 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Plasmid*, 40(1):30–43.

- Avşaroğlu, M., Buzrul, S., Şanlıbaba, P., Alpas, H., and Akçelik, M. (2007). A kinetic study on the plasmid stability of three *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(11):729–737.
- Beck, E., Ludwig, G., Auerwald, E., Reiss, B., and Schaller, H. (1982). Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene*, 19(3):327–36.
- Beijersbergen, A., Dulk-Ras, A., Schilperoort, R., and Hooykaas, P. (1992). Conjugative transfer by the virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Science*, 256(5061):1324–1327.
- Berpohl, A. (1990). Untersuchungen der pathogenen Wechselwirkungen zwischen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und der Tomate (*Lycopersicon esculentum*). *Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld*.
- Berpohl, A., Dreier, J., Bahro, R., and Eichenlaub, R. (1996). Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. *Microbiol. Res.*, 151:1–9.
- Broeker, D., Arenskoetter, M., Legatzki, A., Nies, D., and Steinbuechel, A. (2004). Characterization of the 101-Kilobase-pair megaplasmid pKB 1, isolated from the rubber-degrading bacterium *Gordonia westfalica* Kb 1. *Journal of Bacteriology*, 186(1):212–225.
- Burger, A., Gräfen, I., Engemann, J., Niermann, E., Pieper, M., Kirchner, O., Gartemann, K.-H., and Eichenlaub, R. (2005). Identification of homologues to the pathogenicity factor Pat-1, a putative serine protease of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Microbiol. Res.*, 160:417–427.
- Burns, D. (1999). Biochemistry of type IV secretion. *Current Opinion in Microbiology*, 2(1):25–29.
- Buttaro, B., Antiporta, M., and Dunny, G. (2000). Cell-associated pheromone peptide (cCF 10) production and pheromone inhibition in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 182(17):4926–4933.

- Byrd, D., Sampson, J., Ragonese, H., and Matson, S. (2002). Structure-function analysis of *Escherichia coli* DNA helicase I reveals non-overlapping transesterase and helicase domains. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45):42645–42653.
- Cao, T. and Saier, M. (2001). Conjugal type IV macromolecular transfer systems of Gram-negative bacteria: organismal distribution, structural constraints and evolutionary conclusions. *Microbiology*, 147(12):3201–3214.
- Chandler, J. and Dunny, G. (2004). *Enterococcal* peptide sex pheromones: synthesis and control of biological activity. *Peptides*, 25(9):1377–1388.
- Chen, I., Christie, P., and Dubnau, D. (2005). The Ins and Outs of DNA Transfer in Bacteria.
- Christie, P. (1997). *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *Journal of Bacteriology*, 179(10):3085.
- Christie, P. (2001). Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Molecular Microbiology*, 40(2):294–305.
- Christie, P., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., and Cascales, E. (2005). Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annual Review of Microbiology*, 59:451–485.
- Coplin, D. and Cook, D. (1990). Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Microbe Interact*, 3(5):271–9.
- Covacci, A., Telford, J., Del Giudice, G., Parsonnet, J., and Rappuoli, R. (1999). *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*, 284(5418):1328–33.
- Cullum, J., Collins, J., and Broda, P. (1978). Factors affecting the kinetics of progeny formation with F⁺lac in *Escherichia coli* K12. *Plasmid*, 1(4):536–44.
- Dahlberg, C., Bergstrom, M., and Hermansson, M. (1998). In situ detection of high levels of horizontal plasmid transfer in marine bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7):2670–2675.
- Dang, T., Zhou, X., Graf, B., and Christie, P. (1999). Dimerization of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB4 ATPase and the effect of ATP-binding cassette mutations on the

- assembly and function of the T-DNA transporter. *Molecular Microbiology*, 32(6):1239–1253.
- Davis, M. J., Gillaspie, A. G., Vidaver, A. K., and Harris, R. W. (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. Bacteriol.*, 34:107–117.
- De Gelder, L., Ponciano, J., Joyce, P., and Top, E. (2007). Stability of a promiscuous plasmid in different hosts: no guarantee for a long-term relationship. *Microbiology*, 153(2):452.
- Dreier, J., Meletzus, D., and Eichenlaub, R. (1997). Characterization of the plasmid encoded virulence region *pat-1* of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *MPMI*, 10:195–206.
- Dunny, G. (2007). The peptide pheromone-inducible conjugation system of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10: cell-cell signalling, gene transfer, complexity and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1483):1185–1193.
- Dunny, G., Craig, R., Carron, R., and Clewell, D. (1979). Plasmid transfer in *Streptococcus faecalis*: production of multiple sex pheromones by recipients. *Plasmid*, 2(3):454–65.
- Frost, L., Ippen-Ihler, K., and Skurray, R. (1994). Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiological reviews*, 58(2):162–210.
- Fullner, K., Stephens, K., and Nester, E. (1994). An essential virulence protein of *Agrobacterium tumefaciens*, VirB4, requires an intact mononucleotide binding domain to function in transfer of T-DNA. *Molecular Genetics and Genomics*, 245(6):704–715.
- Gancel, F. and Novel, G. (1994). Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. 1. conditions of production. *Journal of Dairy Science*, 77(3):685–688.
- Gartemann, K., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., Gaigalat, L., Goesmann, A., Gräfen, I., Kalinowski, J., et al. (2008). The genome sequence of

- the tomato-pathogenic Actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *Journal of Bacteriology*, 190(6):2138–2149.
- Gerdes, K., Gulyaev, A., Franch, T., Pedersen, K., and Mikkelsen, N. (1997). Antisense RNA-regulated programmed cell death. *Annu Rev Genet*, 31:1–31.
- Gerdes, K., Moller-Jensen, J., and Jensen, R. (2000). Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Molecular Microbiology*, 37(3):455–466.
- Grahn, A., Haase, J., Bamford, D., and Lanka, E. (2000). Components of the RP4 conjugative transfer apparatus form an envelope structure bridging inner and outer membranes of donor cells: implications for related macromolecule transport systems. *J Bacteriol*, 182(6):1564–74.
- Grant, S. G. N., Jessee, J., Bloom, F. R., and Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *PNAS*, 87:4645–4649.
- 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*.
- Grohmann, E., Muth, G., and Espinosa, M. (2003). Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(2):277.
- Haase, J., Kalkum, M., and Lanka, E. (1996). TrbK, a small cytoplasmic membrane lipoprotein, functions in entry exclusion of the IncP alpha plasmid RP4. *Journal of Bacteriology*, 178(23):6720.
- Hall, M. and Matson, S. (1999). Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding. *Mol Microbiol*, 34(5):867–77.
- Hapfelmeier, S., Domke, N., Zambryski, P., and Baron, C. (2000). VirB6 is required for stabilization of VirB5 and VirB3 and formation of VirB7 homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 182(16):4505–11.
- Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R., and Eichenlaub, R. (2000). The endo-beta-1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *MPMI*, 13:703–714.

- Jefferson, K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236(2):163–173.
- Judd, P., Mahli, D., and Das, A. (2005). Molecular characterization of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer protein VirB6.
- 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 Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld*.
- Kleitman, F., Barash, I., Burger, A., Iraki, N., Falah, Y., Sessa, G., Weinthal, D., Chalupowicz, L., Gartemann, K.-H., Eichenlaub, R., and Manulis-Sasson, S. (2007). Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *Eur J Plant Pathol*.
- Kosthorst, A. (2004). Stabilität und Transfer von Plasmiden in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld*.
- Kozłowicz, B., Shi, K., Gu, Z., Ohlendorf, D., Earhart, C., and Dunny, G. (2006). Molecular basis for control of conjugation by bacterial pheromone and inhibitor peptides. *Molecular Microbiology*, 62(4):958–969.
- Lanka, E. and Pansegrau, W. (1999). Conjugative DNA Transfer requires intimate cell-cell contact. In *Lengeler J.W., Drews G. and Schlegel H.G. (Hrsg.), Biology of the prokaryotes*, pages 389–406.
- Lanka, E. and Wilkins, B. (1995). DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annual Reviews in Biochemistry*, 64(1):141–169.
- Larkin, C., Datta, S., Harley, M., Anderson, B., Ebie, A., Hargreaves, V., and Schildbach, J. (2005). Inter- and intramolecular determinants of the specificity of single-stranded DNA binding and cleavage by the F Factor relaxase. *Structure*, 13(10):1533–1544.
- Lawley, T., Gilmour, M., Gunton, J., Tracz, D., and Taylor, D. (2003a). Functional and mutational analysis of conjugative transfer region 2 (Tra2) from the IncHI1 plasmid R27. *Journal of Bacteriology*, 185(2):581.

- Lawley, T., Klimke, W., Gubbins, M., and Frost, L. (2003b). F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiology Letters*, 224(1):1–15.
- LeBlanc, D., Lee, L., and Inamine, J. (1991). Cloning and nucleotide base sequence analysis of a spectinomycin adenylyltransferase AAD (9) determinant from *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 35(9):1804–1810.
- Leonard, B., Podbielski, A., Hedberg, P., and Dunny, G. (1996). *Enterococcus faecalis* pheromone binding protein, PrgZ, recruits a chromosomal oligopeptide permease system to import sex pheromone cCF10 for induction of conjugation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(1):260.
- Lessard, P., O'Brien, X., Currie, D., and Sinskey, A. (2004). pB264, a small, mobilizable, temperature sensitive plasmid from *Rhodococcus*. *BMC Microbiol*, 4(1):15.
- Lessl, M., Balzer, D., Weyrauch, K., and Lanka, E. (1993). The mating pair formation system of plasmid RP 4 defined by RSF 1010 mobilization and donor-specific phage propagation. *Journal of Bacteriology*, 175(20):6415–6425.
- Llosa, M., Bolland, S., and de la Cruz, F. (1994). Genetic organization of the conjugal DNA processing region of the IncW plasmid R388. *J Mol Biol*, 235(2):448–64.
- Llosa, M., Gomis-Ruth, F., Coll, M., and Cruz, F. (2002). Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Molecular Microbiology*, 45(1):1–8.
- Luckevich, M. and Beveridge, T. (1989). Characterization of a dynamic S layer on *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 171(12):6656–6667.
- Manulis, S. and Barash, I. (2003). Pathogen profile: *Pantoea agglomerans* pvs. *gypsophilae* and *betae*, recently evolved pathogens? *Molecular Plant Pathology*, 4(5):307–314.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J., Cherukuri, P., DeWeese-Scott, C., Geer, L., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D., Jackson, J., Ke, Z., et al. (2005). CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Research*, 33(Database Issue):D192.
- Marinus, M. G. and Morris, N. R. (1973). Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 114:1143–1150.

- Meletzus, D., BERPPOHL, A., Dreier, J., and Eichenlaub, R. (1993). Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB 382. *Journal of Bacteriology*, 175(7):2131–2136.
- Meletzus, D. and Eichenlaub, R. (1991). Transformation of the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by electroporation and development of a cloning vector. *J. Bacteriol.*, 173:184–190.
- Middleton, R., Sjoelander, K., Krishnamurthy, N., Foley, J., and Zambryski, P. (2005). Predicted hexameric structure of the *Agrobacterium* VirB4 C terminus suggests VirB4 acts as a docking site during type IV secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(5):1685–1690.
- Mogen, B. and Oleson, A. (1987). Homology of pCS1 plasmid sequences with chromosomal DNA in *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum*: Evidence for the presence of a repeated sequence and plasmid integration. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(10):2476.
- Nicholas, K. B., Nicholas, H. B. J., and Deerfield, D. W. I. (1997). Genedoc: analysis and visualization of genetic variation. *Emblnew. News*, 4:14.
- Nunez, B. and de la Cruz, F. (2001). Two atypical mobilization proteins are involved in plasmid CloDF 13 relaxation. *Molecular Microbiology*, 39(4):1088–1099.
- Osman, S., Fett, W., and Fishman, M. (1986). Exopolysaccharides of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Bacteriol*, 166(1):66–71.
- 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*.
- Piper, K. and Farrand, S. (1999). Conjugal transfer but not quorum-dependent *tra* gene induction of pTiC 58 requires a solid surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6):2798–2801.
- Richardson, P., Baker, D., and Ho, L. (1982). The chemical composition of cucurbit vascular exudates. *Journal of Experimental Botany*, 33(6):1239–1247.

- Salmond, G. (1994). Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annual review of phytopathology*, 32:181–200.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold-Spring Harbor Laboratory, New York*.
- 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*.
- Sia, E., Roberts, R., Easter, C., Helinski, D., and Figurski, D. (1995). Different relative importances of the par operons and the effect of conjugal transfer on the maintenance of intact promiscuous plasmid RK 2. *Journal of Bacteriology*, 177(10):2789–2797.
- Smith, G. E. and Summers, M. D. (1980). A bidirectional transfer of DNA and RNA to nitrocellulose or diazobenzyloxymethyl-paper. *Anal. Biochem.*, 109:123–129.
- Stackebrandt, E., Rainey, F., and Ward-Rainey, N. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2):479–491.
- Stentz, R., Gasson, M., and Shearman, C. (2006). The tra domain of the Lactococcal CluA surface protein is a unique domain that contributes to sex factor DNA transfer. *Journal of Bacteriology*, 188(6):2106–2114.
- Stentz, R., Jury, K., Eaton, T., Parker, M., Narbad, A., Gasson, M., and Shearman, C. (2004). Controlled expression of CluA in *Lactococcus lactis* and its role in conjugation.
- Strider, D. L. (1969). Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. A literature review and bibliography. *North Carolina Agricultural Experiment Station Tech. Bull.*, 193.
- Summers, D. (1991). The kinetics of plasmid loss. *Trends in Biotechnology*, 9(8):273–278.
- Sundin, G. (2007). Genomic insights into the contribution of phytopathogenic bacterial plasmids to the evolutionary history of their hosts. *Annu Rev Phytopathol*.

- Tauch, A., Pühler, A., Kalinowski, J., and Thierbach, G. (2003). Plasmids in *Corynebacterium glutamicum* and their molecular classification by comparative genomics. *Journal of Biotechnology*, 104(1-3):27–40.
- Tauch, A., Zheng, Z., Pühler, A., and Kalinowski, J. (1998). The *Corynebacterium striatum* resistance transposon Tn5564: genetic organization and transposition in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, 40:126–139.
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 25(24):4876–82.
- Tomita, H. and Ike, Y. (2005). Genetic analysis of transfer-related regions of the vancomycin resistance *Enterococcus* conjugative plasmid pHT β : Identification of oriT and a putative relaxase Gene. *Journal of Bacteriology*, 187(22):7727–7737.
- van der Lelie, D., Chavarri, F., Venema, G., and Gasson, M. (1991). Identification of a new genetic determinant for cell aggregation associated with lactose plasmid transfer in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(1):201.
- Vivian, A., Murillo, J., and Jackson, R. (2001). The roles of plasmids in phytopathogenic bacteria: mobile arsenals? *Microbiology*, 147(4):763–780.
- Wallis, F. M. (1977). Ultrastructural histopathology of tomato plants infected with *Corynebacterium michiganense*. *Physiol. Plant Path.*, 11:333–338.
- Waters, C., Hirt, H., McCormick, J., Schlievert, P., Wells, C., and Dunny, G. (2004). An amino-terminal domain of *Enterococcus faecalis* aggregation substance is required for aggregation, bacterial internalization by epithelial cells and binding to lipoteichoic acid. *Molecular Microbiology*, 52(4):1159–1171.
- Wohlleben, W., Arnold, W., Bissonnette, L., Pelletier, A., Tanguay, A., Roy, P., Gamboa, G., Barry, G., Aubert, E., Davies, J., et al. (1989). On the evolution of Tn21-like multiresistance transposons: Sequence analysis of the gene (*aacC1*) for gentamicin acetyltransferase-3-I (AAC (3)-I), another member of the Tn21-based expression cassette. *Molecular and General Genetics MGG*, 217(2):202–208.

-
- Yang, J., Lessard, P., Sengupta, N., Windsor, S., OBrien, X., Bramucci, M., Tomb, J., Nagarajan, V., and Sinskey, A. (2007). TraA is required for megaplasmid conjugation in *Rhodococcus erythropolis* AN12. *Plasmid*, 57(1):55–70.

6 Anhang

6.1 Plasmidkarten und Protein-Alignments

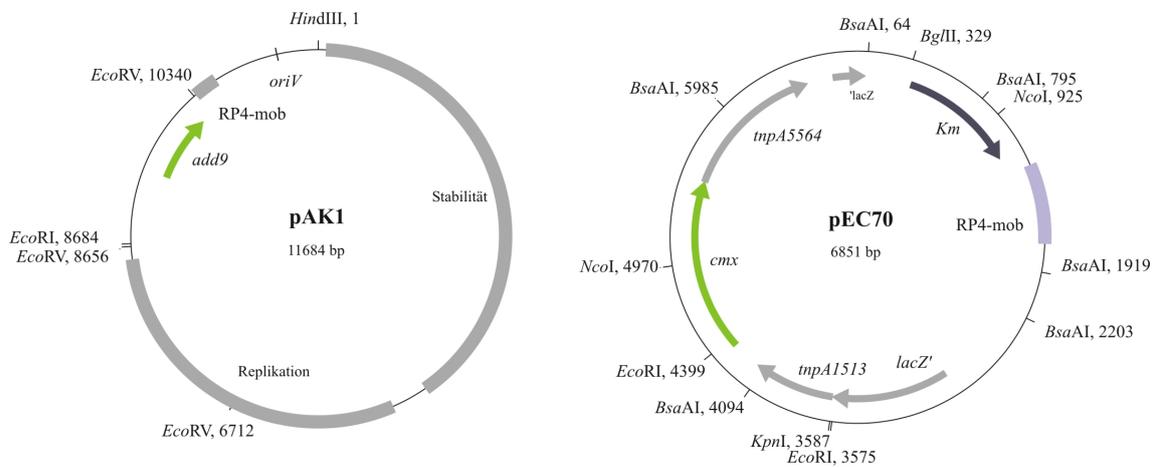


Abbildung 6.1: Plasmidkarten von den Antibiotikaresistenzgen-Kassetten tragenden Plasmiden pAK1 (Kosthorst, 2004) und pEC70 (Tauch et al., 1998); *oriV* Replikationsursprung; RP4mob: mob-Region des Plasmids RP4.; *add9*: Spectinomycinresistenzgen; grau: Stabilitäts- und Replikationsregion von pCM1; *lacZ*: α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation; *Km*: Kanamycinresistenzgen; *cmx*: Chloramphenicolexportergen; *tnpA1513* / *tnpA5564*: Transposasen

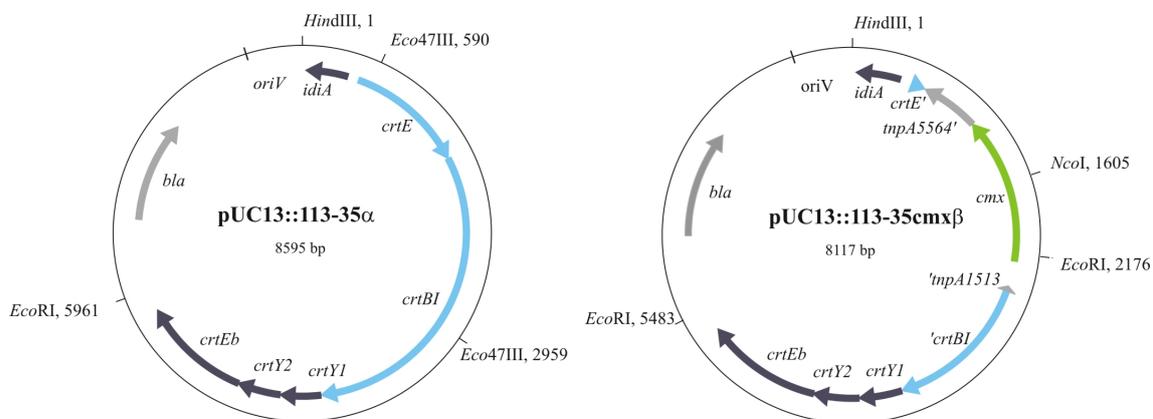


Abbildung 6.2: Plasmidkarte von pUC13::113-35 α und dem Mutageneseplasmid pUC13::113-35cmx β für die Konstruktion einer pigmentfreien Mutante. *bla*: β -Lactamase-Gen; *oriV*: Replikationsursprung; *crtEb*: Lycopenelongase, *crtY1* und *crtY2*: C50-Carotinoid- ϵ -Cyclase, *crtE*: Geranylpyrophosphat-Synthase, *idiA*: Isopentenyl-Diphosphat- δ -Isomerase, *cmx*: Chloramphenicolexportergen; *tnpA1513* / *tnpA5564*: Transposasen (Fragmente).

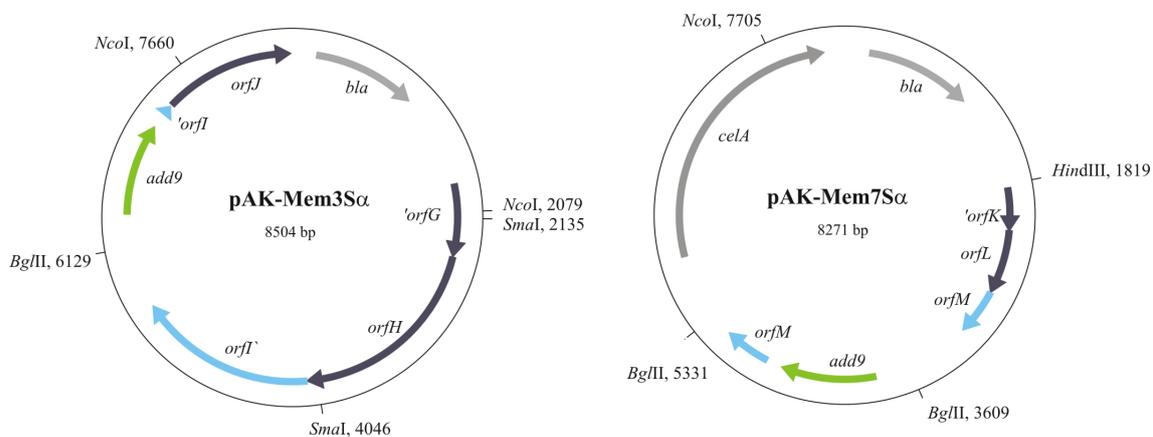


Abbildung 6.3: Plasmidkarten der Mutageneseplasmide pAK-Mem3S α und pAK-Mem7S α (Kosthorst, 2004) für die Konstruktion der *orfI*-Mutante und der *orfM*-Mutante. *bla*: β -Lactamase-Gen; *lacZ*: α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation; *orfI*: hypothetisches ATP-bindendes Protein (VirB4); *orfM*: hypothetisches sekretiertes Protein; *add9*: Spectinomycinresistenzgen; blaue Pfeile: andere Gene der hypothetischen Transferregion von pCM1.

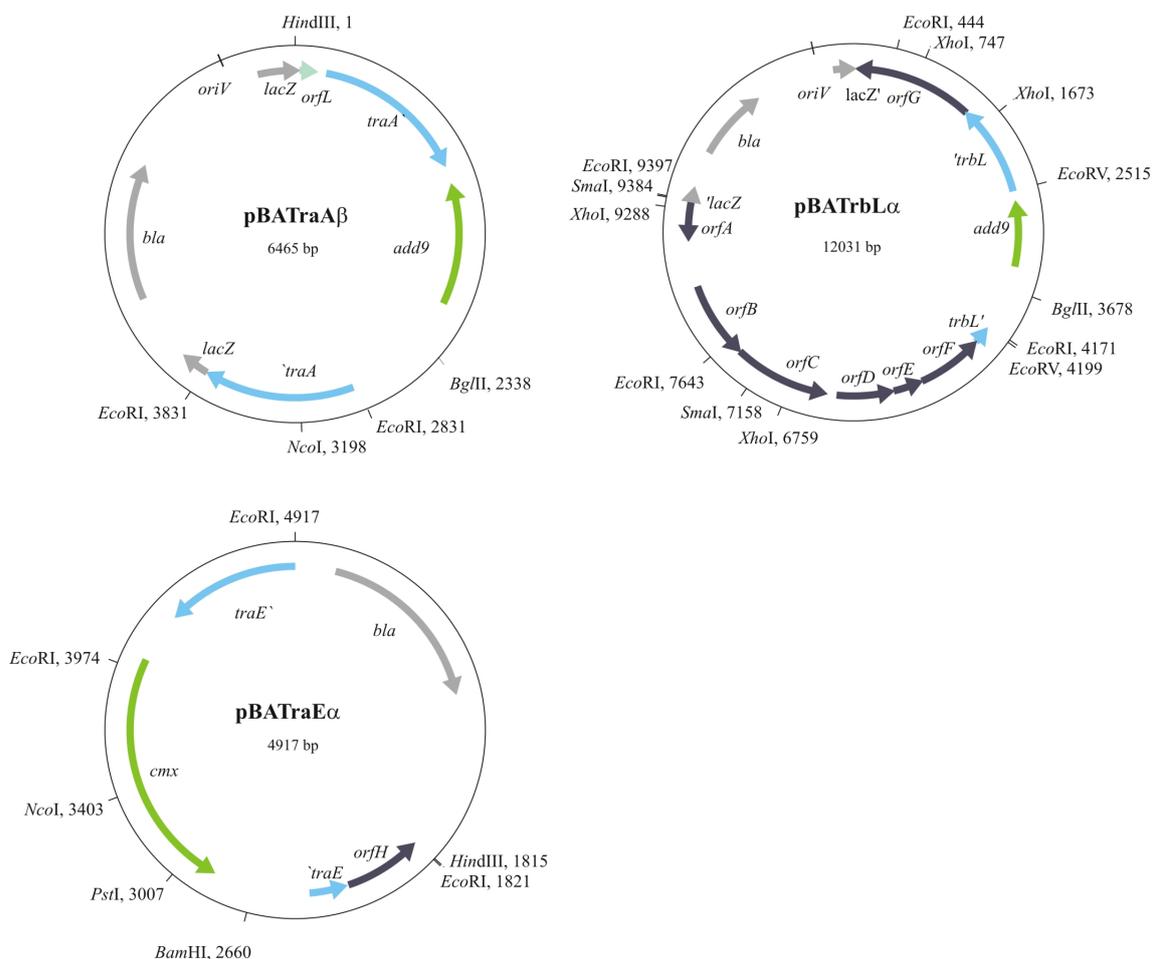


Abbildung 6.4: Plasmidkarten der Mutageneseplasmide für die Konstruktion der *traA*-Mutante, der *trbL*-Mutante und der *traE*-Mutante. *bla*: β -Lactamase-Gen; *lacZ*: α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation; *oriV*: Replikationsursprung; *traA*: hypothetische Helicase / Relaxase; *trbL*: hypothetisches Konjugationsprotein; *traE*: hypothetisches ATP-bindendes Protein (VirB4); *add9*: Spectinomycinresistenzgen; *cmx*: Chloramphenicolexportergen; blaue Pfeile: andere Gene der hypothetischen Transferregion von pCM2.

	Motiv I	Motiv IA	
	* 20 * 40 * 60 *		
Cmm	: MMTMHVLSAGDGYIYVTSEVATGDAK--DRELGDYYTVDGMPGFRMMGFGADVLG----- : 54		
À. aures.	: MMSLHVL SAGTGYLYTCEIASGDEL RAGDRQLGDYYTLKGLPPGCMGCGAALG----- : 56		
R. eryth.	: MMTLHVLHAGDGYEYLTQVATADRRREHGQELTDYYSAHGTPPGTDFGGGLDLDLRMDADTEIADEHRI : 70		
	MM3 6HVLsAGdGY YyTs2vA3gD R dr2LgDY3 G PPG W G Gad Lg		
	80 * 100 * 120 * 140		
Cmm	: -VSGVTTEQMKALYGEGLHPDADRIIADALAEGVSAEAC---QRAKLGRSYVAVRAGPATLQGRITQ : 119		
À. aures.	: -VTGNVTEAQMANLFGKGRHPEYEAILGKTKASGLSPRAARAAEKEAKLGRRYVYVYPKDMLAQILV : 125		
R. eryth.	: ADGAVVSDPKMKALFGEGMHPNADRMVVASIKGGMDPRTV---KEARLGRKFPDFN-DIPLLRHRA : 135		
	v gtV3E QMkaL5GeG HP adr66 a G6spK Aq kaA4LGR 5y 5a d tL aira		
	* 160 * 180 * 200 *		
Cmm	: GYDTFORVNGHPDABEERLIRAEEGQAFEDAKGEPADKEELGKFTTAAIRPDCTAVAGFDLVCSFSK : 189		
À. aures.	: RESDFERLRGRKPNAAEERHRIKATAGVMPFRBGHGFPASKEELGRYITACLRPQNAVAGYDLTTFVW : 195		
R. eryth.	: ALECFAVDARRFSKAESEGALMEIVCTALFEETICFSAQDPOELUSWISACENRVRQPVAGFDLVITPFR : 205		
	F r ngr P aaEr 6ra Ga Fre hgR padk2ELg 5T3Aq rp q aVAG5DLvE3P K		
	220 * 240 * 260 * 280	Motiv III	
Cmm	: SVSVLWALGDTEIRKATEAQEQAVRDTIGYLEREAIATRACINGVACIEVEGCIATVFRHVDSENGDE : 259		
À. aures.	: SISVLWALGDADTRRIVEDAQCALNDSIEYLETHALATRLCTINGIAGSSVKGCLTATFRHDSLHGD : 265		
R. eryth.	: SVSTMALADDLRRQIERIHHEIVKDLGWEIEKECFTRTIGATSOEHQDITG-VVATLYDHVDSRAGDP : 274		
	S6Sv6WALgD dtR4 6E aq a6 D36g56E eA aTR Gtnq aq v Gg6 AT 5rHyDSR GDP		
	* 300 * 320 * 340		
Cmm	: QLHDHVVAANKVKG-VDGRURTIIDSKLLHRMMVPSBFFYMAAVHSEVCRRLGVTTRVFPSPGRRVMEI : 328		
À. aures.	: NLHTHVVSNKVQD-LACNKSIIIGKLLHRSAAVAVSSEYNTRIQAHLED-HGVRFERAVWNGSKQVMEI : 333		
R. eryth.	: NLHTHVVLVVKVCTERDGRWRLLFSSTLHRYGVPASCFYMAAIESKLTHELGFGLIERSVGRGRQVVEI : 344		
	nlHtHv6snKV dGkM4 6dsklLHR VpaS2 YNaa6ms 6 1Gv taR g4qpV6EI		
	360 * 380 * 400 * 420		
Cmm	: AGVDPDLLDITFSRSASIRATTELVEEYQRDHGRAPDARTLIRIAQQATLDTFRCKDDVRSPOAHEEA : 398		
À. aures.	: ASVPRRLTSLFSEKSEGIRTSLTLLRQYEECHESPIRAMLRLACQATLDTFRCKDAPKT--LAEQAT : 401		
R. eryth.	: AVVPOQLCEMFSRRTOIEIRRDQLVAYRQKHDFMBSAKANYLLYQAMLDTRACKCEPQILRECMNW : 414		
	A Vp Li FSsRs Irt Lv eY Hgr Pdaka6ia6aQqAtLdTRp K p 3 a		
	* 440 * 460 * 480 *		
Cmm	: VGR-----VGRGRDAGLVDAARALPPTN---KEAESVEVDEITAHVIRTVEEHHVVGCHVVIDAE : 455		
À. aures.	: MVR-----HEACTLYTEDDLARI TGTRINTIRPLAAGIDVDAAARRIIDAVSDKRSSTITIQVMAE : 462		
R. eryth.	: IIRSAQILGDDTAVGALAEQWRGQREHAGVREHQTIRKAGTPAEAKRVVHELENGRATTAITHVHSA : 484		
	6 R ag a d a R a aa vde a r66 6e ratW a 6 ae		
	500 * 520 * 540 * 560		
Cmm	: RRRHLAAIPDQ-SVAEPLVQCVTRAAAG-CSVTLTPSPHGAF TPLTRSDGSSIYDHKGLLFTSTRIL : 523		
À. aures.	: ANEWAKEYAAEHGPPPHGTVASVSRSLGTSVFIITEDOVHCRFEALTRNACTADFNHRTDHRYTSKIL : 532		
R. eryth.	: VVANFVAV SFPDEAARAAAANKAVHEVLG-ASVHLPADLPFAPALRRRDCEPILTNHCTAHTSASII : 553		
	a r aa v V Vt LG aSV 6tp hgafeaLr dG i h g t l TSt I6		
	* 580 * 600 * 620 *		
Cmm	: DLEDQLDAAIRTRVSPISRDTEPRTAQH---TC---PLDAGQDLAREFA TSDRELWVGIGHAGA : 584		
À. aures.	: EDENLLLRAHGKDVIPALSMDFTAAVAYNQAVA TEKSHPLDTGQDLAREFA TSSKLLSVGIGAGI : 602		
R. eryth.	: TLEQFMLDATRIPYIYIAQAGLDRVWEKIAR---TSDHPLNAGQELAEHFVGSGLLAWGVGFAGI : 618		
	aE 6LdA rt t as fd va tg hPLiaQrDLareFatS lL VG6GpAGt		
	640 * 660 * 680 * 700		
Cmm	: GKTALRLAATAL EDGGRMI GLAPSAPASVIAEAVCHEATTHGFIITAHQAQLP-----AKVEVR : 647		
À. aures.	: GRSSSNGLVRAALTHAGGRVIGLAPSAAANLGCOLGVAAATTDKFLHTNYYPDHDPPDGLAAGPFRVT : 672		
R. eryth.	: GKTTSMRAATDTRATCHEVIALAPSAAVAE TLGEEHDVTAHTL A TL TYPWGLGHEPR--LPEHIEP : 687		
	GK3s6 lv a G r6IgLAPSAA 6ge 6g6 A T fl r e r e6		
	* 720 * 740 * 760 *		
Cmm	: AGDVLVDEAGMAGTQRLAALHTIAREYGHVRLIGDDROLSAVEAGGALRLIDREVCVRLVSHVHRF-Q : 716		
À. aures.	: PCTVIVDEAGMAGTGLADVVRVVEAGGIVRLIGDDROLSAVEAGGALRLILNIEIGATELEHTIHRF-T : 741		
R. eryth.	: AGAMLVDEASLSTKDLAANTEIAAKGAVVRLIGDPNQLDAVE TGGALRLLAETNAPETLWVVRFGK : 757		
	aG 666VDEAg6agT LLa6 6a a Ga VRL6GdrQLsAV2aGGALRL6 E ga eLe 6hRF		

```

780      *      800      *      820      *      840
Cmm      : DADAEASLHLRDF-LRPGPFPAFYCANRVIIGDVTMTDAVFAGWQTTIVVGLRSLMLAFTGATVTEL : 785
A. aures. : SPDEASLLELFTTAHEADPPFAYKANGRIQACNIITVEGLAELGLWQIRLNCQDAAVMMAPFNESSQRL : 811
R. eryth. : DTEQANSLALRHG---EESSELEFYARGVWHEETAAEMKDAATAYLADIGACKTIVVLSLRDVRV : 824
          d d2AeaSL LR p e dpfaw5 Angr6 G d 6 daaf 5qtd G s666apT v e6

      *      860      *      880      *      900      *
Cmm      : NARAQAHRITAGVITCT-RSVLEDDLSAHVGDVITAFERNEELRIONGRDE---VKNGDLICVIRIGAD : 851
A. aures. : SERAQAIRIQTCEVACAGVAVCLDGSFAMAGDEIVTFSNDSELKVRGRDV---VKNGDMITVEQAHED : 878
R. eryth. : NLAIQAHYRREGTAKAG-NIVTLESDDEAGVGDIVLTERMKRRLRTRGGKRSMFWRNGDLITVIAWMEN : 893
          n raQAhrisaaGtv g V LrD l A vGD 6 TR N s L4 k G4dr V4NGD6WtVt e1

      920      *      940      *      960      *      980
Cmm      : GSLDVVHRDHAAPVITLPAQVVEHVELGYRTISRSOGLTADTSEVLCGESLIRREIAYTGLTRGKOSMNI : 921
A. aures. : GLSLVSHLDHGCKIRLPAAEVVSGHVHLGYMLTTHRIGQMTREAGIPILDAATSRENAVYVATRGRDENVL : 948
R. eryth. : GSLNLRSETHECTITLPAQVYVRNTELGAAATVHRSQGLVDTSTTTVGHSTNRPGLYVATTRGRDENVL : 963
          GSL 6 h dH g 6tLPA YV hvelGYA T hRsQG6T Dtsh d st Re aYva TRG4 eN L

      *      1000      *      1020      *      1040      *
Cmm      : VLEVAIDGAAVGDALVETATRSAMLSAHEITRAFQDRVDDLVTLLDCHADVAFERAGEIRYGRITAEVALGT : 991
A. aures. : FVAVEEGQDRDVTVAALAGNHSQDSSAHEITLATEYDRINSPLTADQVRYNDEBANNIRMAAARDVLAGP : 1018
R. eryth. : YVPVEPCVTQDEGMHLGSIIN--PASREVELEKILANDNGHKAATTEDEALEHARSPELREAYHAAHS : 1031
          56 Ve G dt l 6a sahEt6 e dr l tliid2 r v e A ir r A alg

      1060      *      1080      *      1100      *      1120
Cmm      : RLATTLQSCESWGAVAAALRHAEIDYGFSPVETLRVYEQRELGTADDVPAVLSWRTERAEERIDAPRPSG : 1061
A. aures. : -DAEMFITASSWGAVVTHLAGABHGCDPAGLLQTACQDRDFDSADDQSVLAQRLEIRMAAPELDEQT : 1087
R. eryth. : RLRDRDLDDVLDRALPAILLATIAAENPGSLAEELRTTLGQAHDRGDSARRIFNDALASGELHTARDVRL : 1101
          rla eswgA6aaal ae g p l a qr d aDd a6l wr6e k av

      *      1140      *      1160      *      1180      *
Cmm      : NLLF---DVGVAAMLADRLRLENDLVPDWRHEIQRHHYIGIRLKERGAALLAEFPAMWEDALGAVPE : 1127
A. aures. : GERPLQQLTDDQLAKLRIDDEAARITAREEATGDPKFAEHWTNRHHGKLTDAELERRIFTNRFSAREQI : 1157
R. eryth. : LNSR-----IIEATQAAEAATEADTALPPIPEPRTTSDRELDYARIYADRYATARPEHRTDG : 1162
          p d a tda a a t r a l pr h t r l a arr r

      1200      *      1220      *      1240      *      1260
Cmm      : HPKRFDLHQLAAEVVLEAKYRIDPDEAMAIPATLRGNEIDRRCQQRVTAMHKAALLLTAEPIDLDIRC : 1197
A. aures. : SINDPAAARHAHQQLRALQDEHRIR---TQQLKETRRAAFAAEGRSR-----TQYGTSDPVIASNC : 1216
R. eryth. : IGATRRYDETRVQLTTRTHRPVREDFEPFIAERILSEAGVORGR-----HLRKAALAGIDPEAVL : 1225
          a 26d lr r6r a 6 et r e a Rl r t p6a q

      *      1280      *      1300      *      1320      *
Cmm      : RYAAH-FTAVGAARITLGRPVMPAVAAALAAQAFAVVEATAVATELASANTPQASIVETAPALMTST : 1266
A. aures. : RARGHDVIAARARAEERLRALTPPVSSDAPDRLEMLPPSRMAASBYLFGSWRELELARRQVLAARFE : 1286
R. eryth. : RIRHQQLAAEGEDVTAANLIKDNAPAITGTTEKINTRIAEHEDELRRHFELAVAAERTEDPRMVAVG : 1295
          r ah Ar va l Pa a aa p w A a a E p a a t e a k

      1340      *      1360      *      1380      *      1400
Cmm      : ATTFMATSFTTEHEGTTMSDPIDAEAEVGRHVGRIGCTVTSEVTRQICRADDRRRRCQALQORRAERE : 1336
A. aures. : ERGHLIAREP-----GVAQKLGPPARFDIARQWRDTATLEMFRRYR--IPETEATPVERF : 1344
R. eryth. : RIRELTHAGFDIDDLCRTIETAHSTAHVGTIDALDTIAPAESEPVDPAAPHWVPSDDLHHLDPDPTL : 1365
          6 ta p a l hv da q a t r a p eA ver

      *      1420      *      1440      *      1460      *
Cmm      : REHAAREAQKLDREREAEQAAAREQERADRLAARYGRADAEQAEAGVAGGVVLGAAASSTETETD : 1406
A. aures. : RNDDIGRLYDQVTVSRRSRLLTDHITGCDRTLDAINAVEFAKNTHPQAP---AQQSDTDRKTHGQE : 1411
R. eryth. : ADQLDNTYTDIAAEHTANTRRIGTDAFGNDPEIRFTEHLBSRPDPGMALQWDRTAAEIQVYDRENIT : 1435
          re aa k ra td a g Dr l E a a a a r h

      1480      *      1500      *      1520      *      1540
Cmm      : SAATSDGADARRESLEITAAAGQSDIDCYTGRELQEREMLOAGIDPDERSTDICADSSWSEQRPAPEI : 1476
A. aures. : PDAITPPQTEKPS---LWTRREEMVLECCQARKTAEQPAECKPETAQORQARLAAERAVRECCQ-RAGR : 1476
R. eryth. : DITTSVIGDPENADIPFPTVHEDIDALHDEMDEHREORRERAAQAKIEHHHTACHVECEQRAGPR : 1505
          ait r 4 a a q r e qaa r t A EQr r r

Cmm      : SRGDDGLER : 1485
A. aures. : SRGDD-LGY : 1484
R. eryth. : L----- : 1506
          srgdd l

```

Abbildung 6.5: Alignment der TraA-Proteine von *Cmm*, *Arthrobacter aurescens* (ASS20144) und *Rhodococcus erythropolis* (ABF48485). Relaxase-Motive I, IA, II und III. Die Deletion in der *traA*-Mutante ist durch rote Pfeile markiert.

```

      *           20           *           40           *           60
Cnno : -----MGGTMTRETR----- : 11
A.nico. : -----MARIRLLTA-----KTSKTVNPATTSDTMAPR : 27
M.sp28 : MMTSVDELITINEAPEQRRTEELREQRAERGRGEVVGALTLKRDVRRMARTKRRARQDAAKAER : 64
R.equi : -----MSAHKAAKAKPQTPADKIARTLLSDADLAALSAASAAAEQNAVKNAWKQALIKROY : 55
              r                               k

      *           80           *           100          *           120
Cnno : -----TPMGFLGEGGEMWSPVQAPMIFSTSVQSCGIIYPPFGVCTG : 51
A.nico. : QAR-----EAGPGARGWPCRGGMARLVPSVKEVRCITIVQVCGLWPFSSGAS : 74
M.sp28 : AARFSTGGILQRMADARRENTFRPGPRGNRAGGAPAGMLEDLFVQVCSAVQLCCGFPPFTAGAG : 128
R.equi : SRRATLRLTKSSTDGFTRDVAITLDERGFDEEGGEMSTVMPVVEVRCITVQVAGAYPIWVIGAK : 119
              r           a   rG5 g G6g   6   e   g3 VQ cG 5P5 Ga

                                     Walker Motif A
      *           140          *           160          *           180          *
Cnno : RFTDGAFLGRDVIDHTAVCTDHEALYR--ENVISPTGILFGLINGVGKSTTAQTILLGQMGRLT : 114
A.nico. : SPMIGVPLGRHEEIQATVCCDPTISWFORRLISNPSAFILGKPGKSTVVRMFIQLSAQGVH : 138
M.sp28 : LPVVGVPLGYHTRRRSIVCADPVSWFT--AGIISNPSAFVLQPGKSLVHRIITVLSNWGTI : 191
R.equi : APLLGTPLGRHLRIGAAVGFDPYAKK--MKAITAPSCLICALNGFGKSILLRRIICLDIARGTR : 182
              P G PLGrh t   Vc Dp 5 a I3 P3 6 g G GKS3   r6 g G

      200           *           220           *           240           *
Cnno : EAVFDPFKGEHVPMIRAVGGQVFSIGPCAGRDKIMIVSPGPIGAAAAIRIGGHVG----EELAQL : 174
A.nico. : PLLLGDFKGEHVKAVALGGQVIRLGRGVGY--LMILDPGQAVEAAQLLEDHGYFEDAARVRAD : 200
M.sp28 : PLVLDASRPDYHTIRALGGQVIAFAPGKGH--VMPDLLGPVVAQLHQIADP---VARKEALDE : 250
R.equi : VLVPGDLKPDLLRRLTEAVEGQVSEVGYCTGS--NMPHARGPIGEAIAQLPEGS--LERERAIFA : 242
              pl6 d 4 v   rA6gQV   g G G   N 6 Gp a 6

      260           *           280           *           300           *           320
Cnno : ARDKAVALVQLNARVSRGHPLDIIEDTALAEAVDLSLRERTSRP-----VTRDLVTVFDAVS : 230
A.nico. : AHGRRLAMVVSLLTISRNNPFSQEQCTILDRRLRILDDRFE--GVF-----VLKDLLLQVIVSAP : 257
M.sp28 : MASRRLAQCKSMIGMILGRPLAPHEASVLAQVHMLDPELR--TAP-----VITDLTELIRSRP : 307
R.equi : LHAQLNITCALLEIVRGPRLRFEEETMLASIRLLYAEDS--EFSNDKPAALMODLLDVIAGAP : 304
              4 6a           6 r   Pl d e 3 L   a6 L           6 DL 6i p

      *           340           *           360           *           380
Cnno : DRMLHVTGQRD--ADSFRRFARIGELLRSMISG--EMGOMLSGVDSVEFDPGNPGGFCDTSSID : 292
A.nico. : EELREVALDRGLAVYQOETRAEATLLGLTGCGKLGELFSRHTSEPMYRDR--AVVEDVSSID : 319
M.sp28 : EGRNVALTYDDPAAFDRVQGLLDALVSLGPSGPYCTLFSSEPTSEHMQPGR--PAVEDISGAM : 369
R.equi : DELMEDAVADS--AEEYRAQIKPLLRSMRALVKG--RFGETFNRESTVRIIDISRF--MVCLDVSQWP : 365
              6 va           5 a   L   6 6 g   G fs 3           fd Ss

      *           400           *           420           *           440
Cnno : PSMTRLLSAAMLSWISLGMDAIDAHWEIAQHEQRLVEEAALAGEMYVPKVTWSGYTSLMDECMY : 356
A.nico. : ETEEDLQAAVLLACWSYCFGTVNVANALADEGL-----EPRRNYFVLDLQMR : 367
M.sp28 : KMDGVLMAAIQSLCWNLGSATVSMESHLSRAG-----RRRRTYIIVMDLQMR : 417
R.equi : PGDELMAAVLLSGWNEAFAAVBEAHLLEDEGL-----GPNLAFHVLMDLQMR : 413
              6 aA l W g   6 a   6a a           5 66DE W

      *           460           *           480           *           500           *
Cnno : PLRACE--GIVDRYDALIRTRRSKGVALLKVTHTSPKDLISLFPNADREKARGFVERSCLVYLMAL : 419
A.nico. : ALRAGK--GMVDRVDALIRLRVGVGQIMISHTMSDLLALAEEDRMKARGFVERSVMVICGGL : 430
M.sp28 : VLRASG--EMVHFVDTIIRLRNGIGQVMVTHMKD--LKLPEQHLTDVAVGFVERSAMVFLGGL : 479
R.equi : VLSVADGALVPRVDVAVQLQRSIGVAMVTHSLAELEKTTGG-----LGLVERSARARIGPV : 470
              Lra   6V rvDa6 RlnRs G6   m63H3 d1 lp           a GFVERS v g 6

```

```

                                cmx
                                v
Cmm      : TRDDLESLSGIRRLTSKEINRWASFNAAAPSWKQSPRQKGEKG----- : 461
A.nico.  : PASDMPCLTSAIPDSRQEQQKLIQWQ-DPPAWDSRGADVPEP----- : 471
M.sp28   : AEGEMGNLEEFALTDAEVAQLSDMIGEAPVDPWTGKAGLRP----- : 521
R.equi   : PEAEVDRLSKFMKFSAEERNMSTWATDGTSAVDEKALRQARRKAAVNYVAADDTVDTSAPE : 534
          e6 L    13 E    6 5

          580 *          600 *          620 *          640
Cmm      : --APPGACRVMLKIPER--AGTIVQMFQHDVQQLHVTDERYRQ----- : 501
A.nico.  : -----GRGKELIKVGG--RPGIEVQVSLTSLDTGPEGVNDTNTKWITSQEMLLQPAPAVIDE : 528
M.sp28   : -----GAGNELLKTKG--EAGIEFHQQLTRAEKP---HTEETTRDWDMTNHDVV----- : 564
R.equi   : KRTAAGVQQLLKLGEAAPGTFKVMVPPAEHAG-IHDTRARLRSAADDRGKEFAA----- : 591
          G G f66K g      Gip      t 2      t

Cmm      : -- : -
A.nico.  : TA : 530
M.sp28   : -- : -
R.equi   : -- : -

```

Abbildung 6.6: Alignment des TraE-Proteins von *Cmm* mit den ATP-bindenden Proteinen von *Arthrobacter nicotinovorans* (CAD47983), *Micrococcus* sp. 28 (AAK62515) *Rhodococcus equi* (AAG21741). Das Walker A Motiv und der Insertionsort der Chloramphenicolresistenzgen-Kassette (*cmx*) sind eingezeichnet.

```

      *           20           *           40           *           60
Cmm   : MIMHPDAASDAANNAACGLIAPCELAKSAHSAANGAFQDTADCMFDGFDSTITKGLTSTWTGHS : 65
A.nico. : -----MAEKECEVWDVAVCWTTQOGAGNIVAGIVDDAISNLAKAVMEGMSQMVITLSTFWVSTPTVW : 60
R.equi. : -----MARATLVAGTETSIVVLDG : 18
      a c g a 3 gf ts

      add9
      *
      *           80           *           100           *           120           *
Cmm   : FIVDIEGGASQWFRDIN--LELNVSIFTLGLIVAGIRIMLSVVRGEPDKDANSGVIRWLAITTAGA : 128
A.nico. : LASQDCTASPVVSLVSELMFWTLAVLAVLAVIGGVRLIMEQRGAPLRDLIRSLILITLVSQSGSL : 125
R.equi. : TRLSDCIAN-----WFMEGTVGSDPRGLVHEAMVSIAYVYAGPG : 55
      dg a p l l i g r 6 rGepl4dl6 66 6 g G

      *           140           *           160           *           180           *
Cmm   : AATKVFAWGSDAYSQYILQVSG-----VNAGGSALIMSFSSMFPDIALIFGLVGIILAVGCGWIIIM : 188
A.nico. : GVISILVVAADAPSTLVISRATDGKDFAESLKLIVNTQIGVGVFVLIVLGLIGLISLVQIVLIM : 190
R.equi. : -----GTALLFVIGLLGILGGLVMAFLM : 78
      i da s g a6l 6 GL6G66a lvq 6M

      *           200           *           220           *           240           *           260
Cmm   : IVRDATHPLLNRFWPSAAAGSLFERGQCAFQKVTSMIIAFLIYSPIAAATNAYAWRDKGGD--- : 250
A.nico. : VVRSGLVILAGILPITRAFINTEMGRCMELKAVGWTIAFIAFKPAAIVSVAFILMGDGN--- : 252
R.equi. : LMRITGLVLMALPTINGAAGGTKIGSCAFDKMIAMIIAWLLVKKPVGAFVIGCSAMFLFKATPTI : 143
      66R g Lv66aa lP aaA te G QaF K WtIA56 ykP aa 6y a L g d

      *           280           *           300           *           320
Cmm   : -----CPGGVLTGLTILGLAVLTLPALMRLLVPAVSAVGRASGGMALGATABAVSAGVAVGAA : 309
A.nico. : ---NSSELVQSITGFILMLVALFALPALMRVIVPMVAAVASG-SGAGAGAVTALATGAVSFGRG : 313
R.equi. : SNPNDGDMALMTGVILLCAALVLPALMRDIPVNVGALGGGSGAAAGALGALAMKAGCMAG : 208
      g 6TG tL6 A l LPaLMR 6vP V A6g g sGa AgaA6 Ala gv gag

      *           340           *           360           *           380           *
Cmm   : VATGGGS----AAAGSGAASSTGTAGTAAAGGVGTAAAPTGADTSSGTGGAVGGENTTGDAAGG : 370
A.nico. : GSGRCDASPIPASTTERTTQNTSTNGGPGSNGPACPRGGGQOPTPGPTGPGGAAGTAEAAKAGR : 378
R.equi. : GG-----APTGAAVASSSSTTASTSAGGDSGMTTGAQPAASFGGGGDDGGQPPGGTSGG : 264
      g g A tgs ass3sT g sgs g g ggaqp pg G gG ggt a aGg

      *           400           *           420           *           440           *
Cmm   : GG-----SSTAGADGGMSDSEGPVAGSSGSPSSGSRGWAACSLVDSGASRGCTAEGMLG : 429
A.nico. : ACSAGTTGAAATGARGGGAAAGPAGVAVATGAQLASGTSQLEKTAQDSAGEGPGSGSN----- : 436
R.equi. : N-----PNVNGAAGGNPGGSEAGTPTSSGAAPASGDSGGRQPVSTGAAAPQFNSGGFER--- : 318
      g GA GGna s aG s ga paSg S a aq a g s gg

Cmm : E : 430
A.nico. : - : -
R.equi. : - : -

```

Abbildung 6.7: Alignment von **TrbL** von *Cmm* mit hypothetischen Transferkomplex-Proteinen von *Arthrobacter nicotinovorans* (CAD47985) und *Rhodococcus equi* (TrbL: BAB16649). Der Insertionsort der Spectinomycinresistenzgen-Kassette (*add9*) ist eingezeichnet.

```

      *           20           *           40           *           60           *
Cmm   : MSGRQAKAQRVAAATVDTEQVIAPORRRSELTRVFTVNRFLPPEAFVSDVEVSEHAAAGELAPIDVPG : 70
B.linens : MSRDDDERLHTSVLVAPASRRRRS-RKARRAAATAIQKON--ROHMAAAKARAEERRRERRARALPAS : 67
      MS           V           E           R4A R           I 4           6           E           A           5

      80           *           100           *           120           *           140
Cmm   : SCLRPDQWCSASRARRGWYAPAHQGAATTTROAEIVTAHFCAPTGFDGIVNGRDLTRTAFADHETITAY : 140
B.linens : GPPGPAALRTPGRFR--LPRHQDTTASLAAAYPFLAEGGLGS----EGVFICDLYSGASVYDEWVLY : 130
      2 P           3 R R           A3           6A G           G6 G D 3 F DP Y

      Walker Motiv A
      *           160           *           180           *           200           *
Cmm   : RRTPRGLTSENVIVLQOTGSGKSSWTTCNLIMKHLMLKRRAVVFSKRDRCGECEHAETTRQLGNEPFRF : 210
B.linens : ARG--VITAPNWWWACIVGSGKSSALAKS-LYTRSLPFGRF--VYVPGDPKC--EHTRVAQAVGG---RA : 189
      R           6T PNV6V G GSGKS           L 4 L           4R V5 D G EH           6G R

      220           *           240           *           260           *           280
Cmm   : LAMCAQGEGRVINMDPAITRVVDGIQGGKLMDDIAIQQRHRSCTVAVSVEEAGWDDCADRLALRSLDAD : 280
B.linens : IALCHGLPSRLNPLDEGYRPSGMTDAEWSSTVARRRRDLIGALDETVLIRPLTPLEHTAIDTALAATVRE : 259
      6A G           R6 L           6 3           3 TV 3           E A6 AL 6

      *           300           *           320           *           340           *
Cmm   : HEDTRTPTLADLSARLGAVDPHRGDYSILRSRERLHCGLSISHMLN-DILETYGWFDCGETSSEVDLTHK : 349
B.linens : NDTPIIPVWVEHILNP-----SDDADGRITEDGRIAGHMLRRLVWGDLAGLFDGFSTEMPDPTLP : 319
      P 6           S           RL 2 G           H L           66           G6FDG 33 D T

      360           *           380           *           400           *           420
Cmm   : LITFDISQLPSDGAVISIVIAAANMMMLGRTKDEMGWATNVLYDFGEMHTIGGFSVG-LTCSNKKLSRSLG : 418
B.linens : MSISLDSRWTEENTLNSVLLTCSSAMMEAMLLDPRGGORUCWYDEAURMISHPPLLRRLMDSHWLRRHYC : 389
      6 3 D6S 6 1 66S66M           WM 6 D G           6Y E W M6 P 6 6 S 4L R G

      *           440           *           460           *           480           *
Cmm   : MSNIFIMHRGTDIPPE-----SAGVTVICEACTAYIFROEHECDAAWAQRTFNLDDOTTIKVLMGLGT : 480
B.linens : IANMLFHRISDLEAVGDQGSAMRPSIAASLLANRETRVLYROEADCLGSTAK-ALGLTGTESLPTLSV : 458
      6 N6 6 H4 3D6           S 366 A2T ISRQE Q A L           6L L

      add9
      *           500           *           520           *
Cmm   : GHCIARTIDMPETEVEHLSREWEKELTDSQAMMGDSADALGH : 523
B.linens : GGGLMRLSR-SFVTOHOLHPAEMDLDUTSARAACKV----- : 494
      G 6 KIA           2H           E L D3           G

```

Abbildung 6.8: Alignment des durch *orfI* von pCM1 codierten Proteins von *Cmm* mit einem putativen VirB4-Protein von *Brevibacterium linens* BL2 (ZP_00381005). Das Walker A Motiv und der Insertionsort der Spectinomycinresistenzgen-Kassette (*add9*) sind eingezeichnet.

```

Cmm      : MTPRS--RRLFVVAANLLSACGVVCG-----WYGTGLGFTQEPADVAASGAVGDVRLARAGLVH : 57
S.coeli. : MTRHSRI RTGWANGAAALADALVTGCEG----LEADGDAPASGGGAQAPAAAGHAVSFPLDNPDTGTEP : 62
M.smegm. : MTRR---RTWMLA--LLVAVAVFYAYQT----ISAS-----SQRSMVADADVPT-VAP : 43
A.sp.FB24 : MKDMTIPRRSSKALTI VTAV--LLDGG-----LAGCGAVESAGTAVAEAVRSVAVPSVG-AGKPAP : 57
C.jeiike. : MEKRVSGRVSARAAALLVGVSLLLCGCAEAGAEFLBEGSSASQSSTAPLEPTTETVDPQPEQAEPPE : 66
          M      R      a      g      a      V

          *      20      *      40      *      60

Cmm      : G--GVYDA---AAVR-----SLVDKLEADTHARTPAYDRAAYGSPSADTDH-----NGC : 101
S.coeli. : GLAPVTGDSPOAA-----ARKLIDGLETKGRGPKTGYDRDDEFGYAMMDTADGVPLARNGC : 117
M.smegm. : GADVLAG-----VAVVEARMNG--HDYRRAAFGDAMDDDD-APGGHNGC : 85
A.sp.FB24 : QPAGNPDE---VSAA-----LARTAAIEVKGFRAPKTGYSRQFGPAMADVDH-----NGC : 104
C.jeiike. : QPEQEPEQ---PAAPERSLHQONMLDLEHETLAVKGRAPKTYSRABFGQRMRDIDR-----NGC : 122
          6      6p      r      Y      R      5g      W      D      NGC

          add9
          /
          \

Cmm      : DQRNDVLRDLTAVTITKTD-PGCTWATCHELDVYVYGRSIFDFTSKTISAARVQIDHLVPELGGAWWH : 166
S.coeli. : DTRNDLLKRDGQEVREKSGSDCVVIAMT--LDDPYTGTSTIEWRK--QKASEVQIDHVYPLSYSWQM : 179
M.smegm. : DTRNDILDRDLVDKTYTSISRCPTAVATCVLHDPYTNLTIFPFRGNKKGAAVQIEHIVPELAYAWDQ : 151
A.sp.FB24 : DTRNDILARDLTGETEKPGT-HDCVVDCTLDKDYTKTIRFVRCAGETSAAVQIDHIVPLSLAWGT : 169
C.jeiike. : DQRNDILARDLITVYMAPKG---CKVLSGLDQPYTDQHLHFVRCQKTSQAVQIDHVYALADAMWK : 184
          D      RND6L      RD1      v      g      L      D      YT      I      5      g      t      aVQIDH6VpL      aWq

          140      *      160      *      180      *      200

Cmm      : GAAGWTGEPREQIADIVMNLQAVDGETNEAKSDQGPATMLPFAAGYDCLVVTFLAYLRLTYELTID : 232
S.coeli. : GSSRWFPENKREQIANDPLNLLPVEGRANSARKRSGPASMPPDKAVRCAVAVRFACAAKVELAVT : 245
M.smegm. : GARYWQCMRVRLANDFANLVAVCGCANQDKGKEPALMMPNAAFHCOYAMQFIEVMRGMALPVD : 217
A.sp.FB24 : GAQQITEEQRKQIANDPLNLLMAADGPNASAKGKDAATMLPNNKGFRCHEYTARMTAKKAKKLWVT : 235
C.jeiike. : GAQQLSPERRECFANDFNNLLAVDGPANMCKGAGDAAATMLPANKGFRCITYVS IQVRRKAEYQLWVT : 250
          Ga      R      qlAnDp      NL      av      G      aN      K      d      A      W6Pp      C      Y      V      Y      L      6

          *      280

Cmm      : DADRAAIDHTLDGSSPAAG : 252
S.coeli. : EADRAMMAKQCQG----- : 258
M.smegm. : APSVPYLROAADTCPRG--- : 234
A.sp.FB24 : QPEHDAIQGILAAACA----- : 250
C.jeiike. : QAEKEAIQRELGR----- : 264
          6      c

```

Abbildung 6.9: Alignment des durch *orfM* von pCM1 codierten Proteins von *Cmm* mit einem putativen Lipoprotein von *Streptomyces coelicolor* A3(2) (CAC09548), einer extrazellulären Desoxyribonuclease aus *Mycobacterium smegmatis* str. MC2 155 (ABK69953), mit einem hypothetischen Protein von *Arthrobacter* sp. FB24 (YP_831640) und einem putativ sekretierten Protein aus *Corynebacterium jeikeium* K411 (CAI36202). Insertionsort Spectinomycinresistenzgen-Kassette (*add9*) ist eingezeichnet.

6.2 Tabellen

6.2.1 Messwerte der Wachstumskurven von *Cmm382*

Temperatur	Ansatz	OD ₅₈₀ zu Zeitpunkt t [h]							
		0	3,25	6,25	8,75	11,25	14,5	24	26,5
26 °C	1	0,15	0,35	0,783	1,35	2,62	3,14	5,97	6,71
	2	0,15	0,355	0,777	1,35	2,48	3,92	6,00	7,8
	Mittel	0,15	0,353	0,780	1,35	2,55	3,53	5,98	7,25
32 °C	1	0,15	0,448	0,813	0,981	1,38	2,13	2,72	2,55
	2	0,15	0,437	0,806	0,980	1,53	2,11	2,85	3,12
	Mittel	0,15	0,443	0,810	0,981	1,46	2,12	2,79	2,84

Tabelle 6.1: Wachstum von *Cmm382* in C-Medium in Abhängigkeit von der Temperatur. Wachstumskurven (Mittelwert) sind im Kapitel Ergebnisse (Abb. 4.2, S. 66) dargestellt.

6.2.2 Segregation von pCM2 in Flüssigkultur

Zeit [Tag]	26 °C			32 °C		
	CMM102 _{Nm}	CMM382 _{Nm}	<i>traE</i> -Mut.	CMM102 _{Nm}	CMM382 _{Nm}	<i>traE</i> -Mut.
0	100	100	100	100	100	100
2	99	100	100	100	99	99
4	94	100	99	98	96	100
6	99	100	100	97	91	98
8	97	100	99	98	90	94
10	98	99	100	97	84	96
12	96	97	100	98	98	93
14	98	98	98	90	59	89
16	97	100	100	85	88	88
18	95	97	99	69	61	89
20	96	99	99	46	36	78
23	96	97	100	42	22	80
26	87	98	99	43	20	70
28	88	95	100	29	11	78
30	91	96	91	25	12	74
32				13	1	65

Tabelle 6.2: Anteil [%] plasmidhaltiger Zellen. Graphische Darstellung Abb. 4.19, S. 118

6.3 Abkürzungsverzeichnis

% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent
Abb.	Abbildung
Acc.-Nr.	Accession Nummer
Ap, Ap ^R	Ampicillin, ampicillinresistent
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylpyrophosphat
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
ccc	<i>supercoiled</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
Cm, Cm ^R	Chloramphenicol, chloramphenicolresistent
<i>Cmm</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
<i>Cms</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>
<i>Cmt</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>tesselarius</i>
C-Med	C-Medium
cv.	cultivar
DIG	Digoxygenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -Aminoethylether)-tetraacetat
et al.	et alii (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Gm, Gm ^R	Gentamicin, gentamicinresistent
g	Gramm
hyp.	hypothetisch
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
k	Kilo
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Km, Km ^R	Kanamycin, kanamycinresistent
l	Liter

M	Mol, molar
<i>mcs</i>	<i>multiple cloning site</i>
min	Minuten
MW	Molekulargewicht
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalm
NCPPB	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria
Nm, Nm ^R	Neomycin, neomycinresistent
oc	<i>open circle</i>
OD	optische Dichte
<i>orf</i>	<i>open reading frame</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pv.	pathovar
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
Sp _c , Sp _c ^R	Spectinomycin, spectinomycinresistent
ss	einzelsträngig
SSC	Sodium-Saline Citrat
Standardabw.	Standardabweichung
Strep, Strep ^R	Streptomycin, streptomycinresistent
subsp.	Subspecies
Tab.	Tabelle
TBY	Trypton-Broth-Yeast
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)Aminoethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
ü/N	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
Vol.	Volumen
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid

<i>A. aures.</i>	<i>Arthrobacter aurescens</i>
<i>A. nico.</i>	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>
<i>A. sp. FB24</i>	<i>Arthrobacter sp. FB24</i>
<i>C. jeike.</i>	<i>Corynebacterium jeikeium</i> K411
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>M. sp. 28</i>	<i>Micrococcus sp. 28</i>
<i>M. smegm.</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>R. equi</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
<i>R. eryth.</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rudolf Eichenlaub für die Bereitstellung dieses interessanten und vielseitigen Themas und für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit.

Für die Begutachtung meiner Arbeit möchte ich mich außerdem bei Prof. Dr. Karsten Niehaus bedanken.

Herzlich danken möchte ich auch Dr. A. Burger und Dr. B. Dreiseikelmann für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und für die konstruktiven Korrekturvorschläge. Dr. Karl-Heinz Gartemann danke ich für die Bereitschaft, wissenschaftliche Fragen und Probleme jederzeit engagiert zu erörtern.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei der „Clavibacter“- Arbeitsgruppe und den anderen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Lehrstuhls für die vielen schönen Stunden im Labor, die großartige Arbeitsatmosphäre, die riesige Hilfsbereitschaft und die vielen Aufmunterungen in Form von Worten oder Süßigkeiten.

Besonders danken möchte ich Moni nicht nur für das Korrekturlesen dieser Arbeit, sondern auch für die super gute Laborgemeinschaft während der letzten Jahre. Außerdem danke ich Ines und Olaf für die vielen fachlichen, humorvollen und auch persönlichen Gespräche im Labor und während der Tee-Pausen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie für den Rückhalt und die Unterstützung während meines Studiums und der Promotionszeit. Boris danke ich für die Nachhilfe in Statistik, den Crashkurs in Latex und für alles andere.

Erklärung

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

Bielefeld, im Mai 2008

.....
Birte Abt