

Die Tomatinase
von
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*

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

vorgelegt von
Olaf Kaup

Mai 2009

Inhaltsverzeichnis:

A. Zusammenfassung.....	1
B. Einleitung.....	3
I. Bakterien-Pflanzen-Interaktionen.....	3
Phytopathogene Wechselwirkung	3
II. Abwehr von Pflanzen	4
Die Nichtwirtsresistenz.....	5
Kultivar-spezifische Resistenz	6
Abwehrstoffe der Pflanze	6
a) Phytoalexine.....	7
b) Phytoanticipine	9
III. α -Tomatin, das Hauptsaponin der Tomate.....	11
Tomatinasen von Phytopathogenen.....	15
IV. <i>Clavibacter michiganensis</i> – ein phytopathogenes Bakterium.....	17
Genetische Aspekte und Pathogenitätsfaktoren.....	19
Das Gen <i>tomA</i> von <i>Cmm</i>	20
Das Gen <i>tomA</i> ist umgeben von regulatorischen Elementen.....	23
Mutanten von <i>tomA</i>	24
C. Zielsetzung	26
D. Material und Methoden	27
I. Material	27
1. Bakterienstämme	27
2. Plasmide und Vektoren	28
3. Nährmedien	29
3.1 Zusätze zu Nährmedien	29
3.2 Antibiotika	30
4. Puffer und Lösungen	30
4.1 Lösungen für Gelelektrophorese	30
4.2 Lösungen zur DNA-Isolierung.....	30
4.3 Lösungen zur Vorbereitung des Agarosegels für Southern Blot.....	31
4.4 Lösungen für die Southern Hybridisierung	32
4.5 Lösung für proteinbiochemische Methoden.....	33
4.6 Lösungen für SDS-PAGE.....	35
4.7 Lösungen für Nachweis beim Westernblot.....	36
4.8 Lösung zur Konservierung von Bakterien	37
4.9 Lösung zur Bestimmung der Menge an reduzierenden Zuckern:.....	37
4.10 Lösungen zur Isolierung der nativen Tomatinase aus <i>Cmm</i>	37
5. Enzyme und Chemikalien.....	38
5.1 Enzyme	38
5.2 Restriktionsendonukleasen und dazugehörige Puffer.....	38
5.3 Oligonucleotidprimer für PCR	39
5.4 Materialien und Chemikalien.....	39
6. Geräte.....	40
7. Pflanzensamen	41

II.	Methoden	41
1.	Kultivierung von Bakterienstämmen.....	41
1.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	41
1.2	Kultivierung von <i>Cmm</i>	41
1.3	Konservierung von Bakterienkulturen	41
1.4	Titerbestimmung von Bakterien in Flüssigkultur.....	42
1.5	Agardiffusionstest mit <i>Cmm</i>	42
2.	DNA-Isolierung	42
2.1	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Cmm</i>	42
2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	43
3.	DNA-Reinigung / Konzentrierung und -Denaturierung.....	45
3.1	Alkoholfällung	45
3.2	Denaturierung (alkalisch) von Plasmid-DNA.....	45
3.3	Aufreinigung von PCR-Produkten mit NucleoSpin Extract II	46
4.	Techniken zur Charakterisierung von DNA-Molekülen	46
4.1	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	46
4.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	47
4.3	Bestimmung des Molekulargewichts von DNA-Fragmenten	48
4.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	49
4.5	Sequenzierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	49
5.	Klonierung von DNA-Fragmenten	49
5.1	Isolierung von Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen	49
5.2	Klenow-Auffüllung von 5'-Überhängen.....	50
5.3	Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten.....	50
5.4	Shotgun-Klonierung.....	51
6.	Transformation von Bakterien	51
6.1	Transformation von <i>E. coli</i> nach der CaCl ₂ -Methode	52
6.2	Transformation von <i>Cmm</i> durch Elektroporation	53
7.	Southern Hybridisierung.....	54
7.1	Nichtradioaktive Markierung der Hybridisierungssonde durch Random-Priming mit Digoxigenin-dUTP	55
7.2	Transfer der DNA auf eine Nylonmembran durch Kapillarblotting	55
7.3	Prähybridisierung und Hybridisierung unter stringenten Bedingungen.....	56
7.4	Immunologische Nachweisreaktion unter stringenten Bedingungen.....	57
8.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	57
8.1	DNA-Amplifikation von <i>tomA</i>	57
9.	Proteinbiochemische Methoden.....	58
9.1	Induktion von <i>Cmm</i> durch α -Tomatin.....	58
9.2	Isolation von <i>Cmm</i> -Gesamtprotein mit der French Press	59
9.3	Konzentrierung von <i>Cmm</i> Kulturüberstand.....	59
9.4	Anzucht und Induktion von <i>E. coli</i> zur Überexpression von TomA	59
9.5	Kompartimenttest	60
9.6	Isolation von <i>E. coli</i> -Gesamtprotein zum direkten Einsatz im Enzymtest....	60
9.7	Konzentrierung von <i>E. coli</i> Kulturüberstand zum direkten Einsatz im Enzymtest	60
9.8	Isolierung von Inclusion Bodies mit der French press	61
9.9	Aufreinigung über Nickel-Affinitätschromatografie unter denaturierenden Bedingungen	61
9.10	Renaturierung durch Dialyse	62

9.11	Bestimmung der Proteinkonzentration	62
9.12	Konservierung von isolierten Proteinen	63
9.13	SDS-PAGE	63
9.14	Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen	66
9.15	Westernblot	67
9.16	Ponceaufärbung und Immunologischer Nachweis	67
9.17	ECL (Enhanced Chemilumineszenz) Nachweis	68
9.18	Enzymtests	69
9.19	Dünnschichtchromatografie der Reaktionsprodukte	69
9.20	3,5-DNS-Methode zur Bestimmung der Menge an reduzierenden Zuckern in einer Lösung	70
9.21	Präparation löslichen Xylans	70
9.22	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	71
10.	Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen TomA	71
10.1	Antigengewinnung und Erzeugung des polyklonalen Antikörpers	71
11.	Isolierung der nativen Tomatinase aus <i>Cmm</i>	72
11.1	Kopplung des polyklonalen Antikörpers an Protein A Sepharose	72
11.2	Reinigung der nativen Tomatinase	73
12.	Analyse des Pathogenitätsverhaltens von <i>Cmm</i>	74
12.1	Wurzelinfektion	74
12.2	Kolonisationsschnelltest	74
12.3	Hypersensitive Reaktion (HR) an <i>Mirabilis jalapa</i>	74
13.	Datenbanken und Softwarepakete	75
E.	Ergebnisse	76
I.	Enzymatische Aktivität von TomA	76
	Komplementation der <i>tomA</i> -Mutante	79
	Einfluss von α -Tomatin auf das Wachstum von <i>Cmm</i>	82
	Wuchskurve in Flüssigkultur in Gegenwart von α -Tomatin	83
II.	Regulation und Induktion der Tomatinase	87
III.	Phänotypische Untersuchungen der <i>tomA</i> -Mutante im Pflanzentest	88
	Pflanzentest an <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Moneymaker	89
	Pflanzentest an <i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>	92
	Hypersensitive Reaktion (HR) an <i>Mirabilis jalapa</i>	93
IV.	Überexpression und Reinigung der Tomatinase aus <i>E. coli</i>	94
	Klonierung	95
	Expression	97
	Aktivitätsnachweis	98
	Reinigung	100
	Aktivitätsnachweis der aufgereinigten Expressionsprodukte	104
	Massenspektrometrische Analyse der Hydrolyseprodukte von α -Tomatin	105
V.	Biochemische Charakterisierung der Tomatinase	107
	Bestimmung des Temperatur-Optimums	109
	Bestimmung des pH-Optimums	109
	Einfluss von zweiwertigen Kationen auf die Tomatinase	110
	Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit	111
	Substratspektrum der Tomatinase	112
VI.	Antikörper gegen Tomatinase	117
	Herstellung/Gewinnung des Antikörpers gegen Tom16 _E	117
	Funktionalität des Antikörpers (Western Blot)	118

Aufreinigung der Tomatinase aus <i>Cmm</i>	120
F. Diskussion	123
I. Enzymatische Aktivität	123
II. Regulation der Tomatinase.....	126
III. Phänotypische Untersuchungen im Pflanzentest.....	128
III. Überexpression und Reinigung der Tomatinase von <i>Cmm</i>	131
IV. Charakterisierung der Tomatinase.....	132
V. Antikörper gegen TomA	135
VI. Fazit und Ausblick.....	137
G. Literatur.....	139
H. Anhang	154
I. Abkürzungsverzeichnis.....	154
II. Plasmidkarten und Protein-Alignment	156
III. Daten zu Pflanzentests	159
1. Pflanzentest an <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Moneymaker.....	159
2. Pflanzentest an <i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>	160
I. Publikationen.....	161

A. Zusammenfassung

Das Saponin α -Tomatin, ein glykosyliertes Steroidalkaloid, ist ein Abwehrstoff der Tomatenpflanze, für den nachgewiesen wurde, dass er potentiell pathogene Mikroorganismen in ihrem Wachstum hemmt. Von einigen phytopathogenen Mikroorganismen ist bekannt, dass sie Tomatinasen - also Glykosylhydrolasen, die α -Tomatin deglykosylieren - besitzen und damit entgiften, welche somit als Pathogenitätsfaktoren wirken. Das offene Leseraster CMM_0090 im Genom von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) besitzt gute Übereinstimmungen zu bereits charakterisierten Tomatinasen phytopathogener Pilze und wurde deshalb mit *tomA* bezeichnet.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass das Genprodukt von *tomA* (1,6 kb) tatsächlich α -Tomatin deglykosyliert und dabei das Tetrasaccharid vollständig vom α -Tomatin-Molekül abspaltet. Das Enzym TomA besitzt zwei Domänen, wobei die katalytische Aktivität auf den vorderen, N-terminalen Bereich beschränkt ist. Die Expression von *tomA* wird durch das eigene Substrat α -Tomatin induziert und das Genprodukt wird aus der Zelle ausgeschleust. Anhand eines durchgeführten Agardiffusionstests konnte nachgewiesen werden, dass die Inaktivierung von *tomA* zu einer gesteigerten Sensitivität von *Cmm* gegenüber α -Tomatin führt. Das Gen *catR*, ein Regulator, der sich in direkter Nachbarschaft zu *tomA* befindet, scheint ein positiver Regulator für *tomA* zu sein, während der Zweikomponentenregulator *regA/regB*, der sich stromaufwärts von *tomA* befindet, keinen Einfluss auf die Expression der Tomatinase hat. Die *tomA* knock-out-Mutanten *CmmTom2* und *CmmC7* zeigen in Pflanzentests nach Infektion von *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker im Vergleich mit dem Wildtyp CMM101 keine Veränderung in der Virulenz. Dagegen führte die Infektion der Wildtomate *Lycopersicon pimpinellifolium* mit der Mutante *CmmTom2* zu einem signifikant reduzierten Titer *in planta* gegenüber der Infektion mit dem Wildtyp CMM101. TomA scheint also in Kulturtomaten im Gegensatz zu Wildtomaten kein Pathogenitätsfaktor zu sein. Sowohl die *tomA*-Mutanten als auch der Wildtyp lösen an der Nicht-Wirtspflanze *Mirabilis jalapa* eine hypersensitive Reaktion aus.

Zur näheren Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften von TomA wurden verschiedene *tomA*-Amplifikate in *E. coli* überexprimiert und gereinigt. Für die in *E. coli* rekombinant hergestellte Tomatinase wurde damit ein Temperaturoptimum von 32 °C,

ein pH-Optimum von pH 5,5 und nach dem Modell von Michaelis und Menten ein V_{Max} -Wert von 1,70 nmol/(min* μg Enzym) und ein K_{M} -Wert von 0,37 mM ermittelt. Ferner zeigte sich, dass das rekombinante Enzym keine zweiwertigen Kationen zur Katalyse benötigt. Neben der α -Tomatin deglykosylierenden Aktivität besitzt TomA eine geringfügige hydrolytische Aktivität gegen Xylane. Das Saponinanalogon der Kartoffel, α -Solamin, ist kein Substrat von TomA.

Es wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen TomA hergestellt. Dieser ist hochspezifisch für TomA. Durch Kopplung dieses Antikörpers an Protein A konnten geringe Mengen an aktiver Tomatinase aus *Cmm* isoliert werden. Mit dieser Methode kann TomA somit nativ aus *Cmm* isoliert werden und für eine weitergehende biochemische Analytik eingesetzt werden.

B. Einleitung

I. Bakterien-Pflanzen-Interaktionen

Pflanzen sind in ihrem natürlichen Habitat einer Vielzahl von Mikroorganismen ausgesetzt. Neben zahlreichen Eukaryoten (Fadenpilze, Hefepilze, Algen, Protozoen, Nematoden etc.) bilden dabei die Prokaryoten einen großen Anteil. Die meisten Prokaryoten, die man in Assoziation mit Pflanzen findet, sind Kommensalen, welche auf der Pflanzenoberfläche zu finden sind und keinen messbaren Effekt auf Wachstum und Physiologie der Pflanze haben (Gnanamanickam, 2006).

Die Prokaryoten, die einen Effekt auf Pflanzen haben, sind zum einen Phyto symbionten, die zu einem beiderseitigen Vorteil für Pflanze und Prokaryot führen und zum anderen Phytopathogene, die der Pflanze schaden. Sie lassen sich vier Klassen zuordnen: Cyanobacteria, Proteobacteria, Firmicutes und Actinobacteria, wobei Pathogene nur in den letzten drei genannten Klassen zu finden sind (Bergey's Manual, 2004).

Phytopathogene Wechselwirkung

Phytopathogene Bakterien führen immer zu einer Schädigung der Pflanze. Sie können nicht nur unterschiedliche Krankheitssymptome an spezifischen Pflanzen hervorrufen; sie unterscheiden sich voneinander in ihrer Invasionsstrategie und in ihrem Mechanismus der Pathogenese. Die Krankheitssymptome, die sie bei den Pflanzen hervorrufen können, sind dabei sehr mannigfaltig. Dabei kann einerseits ein bestimmtes Symptom von Pathogenen verschiedener Gattungen hervorgerufen werden; es können aber auch Vertreter einer bestimmten Gattung unterschiedliche Symptome auslösen.

Nekrosen, bei denen es zu lokal begrenztem Absterben von Pflanzenzellen kommt, werden u. a. von Vertretern von *Xanthomonas* (Leyns et al., 1984), *Erwinia* (Schroth et al., 1974) und *Streptomyces* (Loria et al., 2006) verursacht. Bakterien können auch vaskuläre Erkrankungen auslösen, bei denen die Gefäßsysteme der Pflanze betroffen sind. Ist das Xylem betroffen, resultieren häufig Welkesymptome durch gestörten Wassertransport wie bei den Vertretern der Gattungen *Ralstonia* (Hayward et al., 1991),

Xylella (Wells et al., 1987; Hartung et al., 1994) und *Clavibacter* (Davis et al., 1984; Maramorosh et al., 1973). Ist das Phloem betroffen, wie am Beispiel der Infektion mit *Spiroplasma citri* (Saglio et al., 1973), kann es durch einen vermutlich blockierten Transport von Assimilaten zu einer Gelbverfärbung des Pflanzengewebes kommen. Bakterien können auch Tumore hervorrufen, indem sie eine vermehrte Zellteilung und Zellvergrößerung induzieren. Als bestes untersuchtes Beispiel sei *Agrobacterium tumefaciens* genannt, der bei einer Vielzahl von Pflanzen zu „crown gall“, Wurzelhalsgalle, führt (Binns et al., 1988).

Wie bereits erwähnt findet man in nur drei verschiedenen Klassen phytopathogene Bakterienarten (Bergeys Manual, 2004): *Proteobacteria* (diese beinhaltet Gram-negative Bakterien, wie z. B. die Gattung *Xanthomonas*), *Firmicutes* (diese beinhaltet Gram-positive Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt, wie z. B. die Gattung *Spiroplasma*) und *Actinobacteria* (diese beinhaltet Gram-positive mit hohem GC-Gehalt, wie z. B. die Gattung *Clavibacter*). In keiner der Archeae wurden bisher Phytopathogene beschrieben.

In der Interaktion zwischen Pflanzen und potentiell pathogenen Prokaryoten muss es aber nicht zwangsläufig zu einer Erkrankung der Pflanze kommen. Es gibt auch die Möglichkeit, dass die Pflanze das Pathogen effektiv abwehren kann. In diesem Zusammenhang werden folgende Fachbegriffe aus der Phytopathologie definiert: Bricht eine Krankheit aus, so bezeichnet man die befallene Pflanze als **suszeptibel** (anfällig) und das Pathogen als **virulent**, in diesem Fall sind Wirt und Pathogen **kompatibel**. Kommt es dagegen nicht zur Erkrankung, so wird die Wirtspflanze als **resistent** und das Pathogen als **avirulent** bezeichnet, Wirt und Pathogen sind in diesem Fall **inkompatibel** (Definition aus: Strasburger et al., 2008).

II. Abwehr von Pflanzen

Pflanzen sind in ihrer natürlichen Umgebung einer ständigen Auseinandersetzung mit potentiell pathogenen Mikroorganismen ausgesetzt. Um Phytopathogene effektiv abzuwehren, haben auch Pflanzen dabei im Laufe der Evolution entsprechende Abwehrstoffe und -reaktionen entwickelt, die eine sogenannte „innate immunity“

darstellen. Die Ausbildung von Resistenzen bei Pflanzen gegenüber pathogenen Mikroorganismen beruht dabei prinzipiell auf zwei grundlegend verschiedenen Arten: der Nichtwirtsresistenz und der Kultivar-spezifischen Resistenz.

Die Nichtwirtsresistenz

Die Nichtwirtsresistenz, auch als allgemeine oder basale Abwehr bezeichnet, wird durch nicht-wirtsspezifische Elicitoren ausgelöst. Diese Elicitoren sind ganz allgemein Moleküle, die dem Wirt die Anwesenheit eines potentiellen Pathogens signalisieren. Diese können sowohl wirtseigene Substanzen, die bei der Hydrolyse/Degradation der pflanzlichen Zellwand durch pathogene Mikroorganismen freigesetzt werden (endogene Elicitoren) (Hahn et al., 1981; Vorwerk et al., 2004) als auch charakteristische mikrobielle Strukturen sein, anhand derer die Pflanze die Anwesenheit eines Pathogens erkennt. Diese charakteristischen, mikrobiellen Strukturen, die sogenannten „pathogen/microbe-associated molecular patterns“ (PAMPs/MAMPs) sind Moleküle, die normalerweise in der pflanzlichen Zelle nicht vorkommen und daher als „fremd“ erkannt werden (Nürnberg et al., 2002). Dazu zählen zum Beispiel Bestandteile der bakteriellen Zelle, wie Lipopolysaccharide (Zeidler et al., 2004), Flagelline (Felix et al., 1999), Harpins (He et al., 1993, Wie et al., 1992) oder Komponenten der pilzlichen Zelle, wie Chitine oder Ergosterol (Nürnberg et al., 2002). Durch entsprechende membrangebundene Rezeptoren werden diese Elicitoren erkannt und lösen die Induktion von Signalkaskaden aus. In Folge dieser Signalweiterleitung innerhalb der Pflanzenzelle kommt es u. a. zu Calciueinstrom und Bildung radikaler Sauerstoffspezies (ROS), welches eine Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) zur Folge hat. Letztendlich führt dieses zur Änderung der Transkription zahlreicher Gene und somit zur Induktion von Abwehrgenen der Pflanzenzelle (Garcia-Brugger et al., 2006; Nürnberg et al., 2001). Häufig ist eine Unterdrückung dieser basalen Abwehr für eine effektive Etablierung des Pathogens im Wirt notwendig. Einige pathogene Bakterien sind in der Lage diese Basalabwehr zu unterdrücken, indem sie durch Typ-III-Sekretionssysteme Effektoren direkt in die pflanzliche Zelle schleusen (Mudget, 2005; de Torres et al., 2006). Im Rahmen der Kultivar-spezifischen Resistenz haben Pflanzen wiederum Methoden entwickelt, um auf diese Effektoren zu reagieren.

Kultivar-spezifische Resistenz

Die Kultivar-spezifische Resistenz beruht auf der spezifischen Erkennung spezieller Genprodukte des Pathogens durch die Pflanze. Nach der Gen-für-Gen-Hypothese (Flor, 1955; Flor, 1971) führt das Erkennen eines *avr*-Gens (Avirulenz) des Pathogens durch ein korrespondierendes *R*-Gen (Resistenz) der Pflanze zur Auslösung bestimmter Pflanzenabwehrreaktionen. Die Erkennung dieser spezifischen *avr*-Genprodukte findet im Gegensatz zur Nichtwirtsresistenz im Inneren der Pflanzenzelle statt (Jones et al., 2006). Bei Gram-negativen, pathogenen Bakterien konnte nachgewiesen werden, dass *avr*-Genprodukte häufig durch Typ-III-Sekretionssysteme in die pflanzliche Zelle injiziert werden und als Effektoren an der Beeinträchtigung der Reaktionen der Nichtwirtsresistenz beteiligt sind (Mudget, 2005). Nur wenn Avr-Protein und korrespondierendes *R*-Genprodukt in der Pflanzenzelle aufeinander treffen, wird eine entsprechende Abwehrreaktion ausgelöst. Die *R*-Genprodukte haben dabei eine inaktivierende Funktion oder dienen als Rezeptor des Avr-Genproduktes, der nach Bindung zur Ausprägung der Pflanzenabwehr führt (Leach et al., 1996).

Die Erkennung des Avr-Proteins kann direkt durch das *R*-Genprodukt erfolgen oder indirekt, indem das *R*-Genprodukt mit einem Zielprotein in der Pflanzenzelle interagiert, welches zuvor durch das Avr-Protein verändert wurde. Diese indirekte Erkennung wird durch das „guard“-Modell beschrieben (Marathe et al., 2003). Sofern durch verschiedene *avr*-Genprodukte das gleiche Zielgen in der Pflanzenzelle verändert wird, können mit einem *R*-Genprodukt auf diese Weise mehrere Avr-Proteine detektiert werden.

Diese beschriebenen Erkenntnisse beruhen weitestgehend auf Untersuchungen bei Gram-negativen Bakterien. Die Übertragbarkeit dieser Modellvorstellungen für die Bakterien-Pflanzen-Interaktion bei Gram-positiven Bakterien ist im Detail noch nicht geklärt.

Abwehrstoffe der Pflanze

Die Pflanze hat eine Vielzahl an Abwehrstoffen im Laufe der Evolution entwickelt, um mikrobielle Eindringlinge abwehren zu können. Viele dieser Substanzen, die als Schutz vor Pathogenen dienen, stammen aus dem Sekundärstoffwechsel von Pflanzen (Taiz et al., 2000). Diese Substanzen können dabei im Rahmen der Nichtwirtsresistenz oder der

Kultivar-spezifischen Resistenz induziert gebildet werden oder bereits präformiert vorliegen. Aus diesem Grund unterteilt man dabei die Abwehrstoffe der Pflanze allgemein in **a) Phytoalexine** und **b) Phytoanticipine** (VanEtten et al., 1994). Die Bildung von Phytoalexinen wird durch das eindringende Pathogen induziert. Der Begriff Phytoanticipine umfasst solche Substanzen, die präformiert in der Pflanze vorliegen oder als inaktive Vorstufen in Vesikeln gelagert werden, welche dann bei Infektion der Pflanze in die aktive Form überführt und freigesetzt werden.

a) Phytoalexine

Phytoalexine werden bei einer gerichteten Abwehr der Pflanze gegen Pathogene gebildet. Gerichtete Abwehrmaßnahmen sind solche, die von der Pflanze erst nach Infektion als direkte Antwort auf ein Pathogen initiiert werden.

Schlösser (1997) definiert Phytoalexine als niedermolekulare, antimikrobiell wirkende Substanzen in Pflanzen, die in der Nähe des Infektionsortes gebildet werden. Es handelt sich demnach um eine lokal aktivierte Resistenz. Ihre *de novo* Synthese und Akkumulation am Infektionsort wird durch Elicitoren ausgelöst.

Zu den Phytoalexinen zählen zum Beispiel die Isoflavonoide, die bei den Leguminosen weit verbreitet sind. Interessanterweise sind Phytoalexine, die sich von den Isoflavonoiden ableiten, nur gegenüber Gram-positiven Bakterien toxisch, Gram-negative zeigen keine Reaktion (Hock, 1995). Phytoalexine der Solanaceen sind Terpenoide, Polyacetylene oder Derivate aus dem Phenylpropanweg. Bekannte Vertreter sind zum Beispiel Kaffeesäure und Rhishitin. Letzteres hemmt das Myzelwachstum von verschiedenen phytopathogenen Pilzen (Hock, 1995; Hammerschmidt, 1999).

Neben diesen allgemein unspezifisch wirkenden Substanzen können von der Pflanze auch sehr spezifische Abwehrstoffe gebildet werden. Die Bildung von sogenannten *Pathogenesis related Proteins* (PR Proteine), bestimmte gegen Mikroorganismen gerichtete Proteine mit geringer Empfindlichkeit gegenüber Proteinasen und unterschiedlichem Substratspektrum, kann ebenfalls nach Pathogenbefall induziert werden. Unter ihnen findet man auch Glucanasen und Chitinasen, die auf die pilzliche Zellwand wirken (Benhamou et al., 1991). Einige dieser Chitinasen besitzen auch Lysozymaktivität und bauen die Bakterienzellwand, das Peptidoglykan, ab (Hock, 1995).

Hypersensitive Reaktion

Ein klassisches Beispiel einer gerichteten Abwehrreaktion, die von der Pflanze als direkte Antwort auf ein Pathogen initiiert wird, ist die *Hypersensitive Reaktion* (HR). Bei dieser Abwehrreaktion der Pflanze kommt es kurz nach dem Eindringen des Erregers in einem nichtkompatiblen Wirt in der Nähe des Eintrittsortes zum Absterben der Wirtszellen. Initial geht dieser programmierte Zelltod mit der Bildung radikaler Sauerstoffspezies (ROS), wie Superoxidanionen, Hydroxylradikalen und Wasserstoffperoxid einher. Man spricht in diesem Zusammenhang von einem *oxidative burst* (Wojtaszek et al., 1997). Die Freisetzung von ROS stellt dabei ein wichtiges Signal für die Expression pflanzlicher Abwehrgene dar (Doke et al., 1996; Tenhaken et al., 1995). Da sie andererseits aber auch den Erreger wirkungsvoll abtöten können (Lamb and Dixon, 1997), stellt vermutlich die Kombination beider Wirkungen letztendlich die Ursache für die schnelle und wirkungsvolle Abgrenzung eingedrungener Erreger innerhalb des Pflanzengewebes dar (Schlösser, 1997). Radikale Sauerstoffspezies werden dabei durch einen membranständigen NADPH-Oxidase-Komplex freigesetzt, der Ähnlichkeiten zu ROS-produzierenden Oxidasen aus Makrophagen der tierischen Zelle aufweist (Simon-Plas et al., 2002). Die Nekrotisierung des Gewebes kann sich sehr rasch vollziehen und bereits Minuten bis Stunden nach der Infektion abgeschlossen sein. Durch diesen programmierten Zelltod wird das Pathogen eingekapselt und somit an einer weiteren Ausbreitung im Gewebe gehindert. Letztendlich stirbt das abgekapselte Pathogen in Folge von Austrocknung und Entzug von Nährstoffen innerhalb des nekrotischen Gewebes ab.

Neben der Nekrotisierung des Gewebes und Auslösung des *oxidative burst* reagiert die Pflanze zusätzlich noch mit der Neusynthese von Kohlenhydraten, vor allem Zellulose und Kallose, einem 1,3- β -Glucan, an den angrenzenden Zellen der Eintrittsstelle. Diese Polymere werden zwischen Zellwand und Zytoplasmamembran eingelagert (Hock, 1995). Auch phenolische Komponenten werden in der Zellwand bei der Lignifizierung quervernetzt (Greenberg, 1997). Bei der Lignifizierung handelt es sich um eine radikalische Polymerisierungsreaktion, bei der die einzelnen Ligninbausteine, die als Vorstufen des Phenylpropanweges, zum Beispiel aus der Zimtsäure, gebildet wurden, zum Lignin polymerisieren. Diese Polymerisierungen und Ablagerungen in und an den angrenzenden Zellwänden dienen dazu, durch Schaffung einer physikalischen Barriere die Ausbreitung des Erregers weiter zu unterbinden.

b) Phytoanticipine

Neben den erläuterten gerichteten Abwehrmaßnahmen verfügt die Pflanze über eine Vielzahl ungerichteter Abwehrmaßnahmen. Dies sind in erster Linie strukturell-physikalische und chemische Barrieren, die in der Pflanze präformiert vorliegen und die ein Pathogen, welches von außen in die Pflanze eindringen will, überwinden muss.

Zu den strukturellen Elementen zählt zum Beispiel die Oberflächenbeschaffenheit der Wirtspflanze, welche Auswirkungen auf die Benetzbarkeit der Blätter und dadurch auf die Haftung und Auskeimung pathogener Sporen hat. Auch die Dicke der Epidermisauflagerung, vor allem Cutin und Wachse, die es einem Pathogen erschweren mechanisch einzudringen, fallen darunter. Da einige Erreger, wie zum Beispiel *Pseudomonas citri*, die Stomata einer Pflanze als Eintrittsstelle nutzen, können auch Größe, Anzahl und Art der Stomata als strukturelle Elemente eine wichtige Rolle spielen (Mc Lean, 1921).

Zu den chemischen Barrieren zählen zahlreiche präformierte Substanzen. Diese Stoffe findet man im Sekundärstoffwechsel der Pflanze wieder. Darunter befinden sich ungesättigte Lactone, die erst nach Enzymhydrolyse in ihre aktive Form überführt werden. Diese kommen u. a. bei Tulpen vor und haben antimikrobielle Wirkungen z.B. gegen *Botrytis cinerea* (Hock, 1995). Außerdem findet man zahlreiche Phenole und Phenolderivate, die zum Beispiel das Auskeimen von Pilzsporen in Infektionstropfen hemmen.

Saponine

Eine große Gruppe der konstitutiv exprimierten Abwehrstoffe der Pflanze, die somit auch zu den Phytoanticipinen gehört, stellen die Saponine dar. Viele Saponine haben fungizide und insektizide Eigenschaften und sind auch in gesunden Pflanzen in hoher Konzentration vorhanden, daher wirken diese Moleküle als präformierte chemische Barrieren (Papadopoulou et al., 1999). Es handelt sich dabei um steroidähnliche polyzyklische Kohlenstoffverbindungen, die mit einer Gruppe aus ein bis fünf Zuckermolekülen glycosyliert sind. Diese Oligosaccharidkette besteht dabei im Allgemeinen aus Glucose, Arabinose, Glucuronsäure, Xylose oder Rhamnose (Hostettmann et al., 1995). Den zuckerfreien Rest des Saponins bezeichnet man als Aglycon, der gewöhnlich zu einer der drei folgenden Gruppen gehört: Triterpenoide, Steroide oder Steroidalkaloide (Morissey et al., 1999).

Der Zuckerrest ist über eine glykosidische Bindung mit einer Hydroxylgruppe am C₃ des Aglycon verbunden. Saponine sind weit verbreitet und liegen in gesunden Pflanzen oft in relativ hohen Konzentrationen vor. Für viele Saponine konnte eine Wirkung gegen phytopathogene Pilze nachgewiesen werden (Osbourn et al., 1998). Deshalb zählt man sie auch zu den Phytoanticipinen. Da Saponine vorwiegend in den Vakuolen gelagert werden, ist eine Verletzung der Pflanzenzelle durch das Pathogen notwendig, um die Saponine freizusetzen. Erst dann können sie ihre Wirkung entfalten (Schlösser, 1997). Die toxische Wirkung auf Eukaryoten liegt offensichtlich in der amphoteren Eigenschaft des Saponinmoleküls. Die Oligosaccharidkette wirkt hydrophil, hingegen ist der Aglyconteil eher hydrophob; dadurch können Saponine membranaktiv wirken (Morrissey und Osbourn, 1999; Friedman, 2002). Der hydrophobe Teil des Moleküls kann in die äußere Phospholipidschicht der Membran eindringen. Da der Zuckerrest hydrophil ist und deshalb nicht mit eindringen kann, begrenzt er das Eindringen des Saponins auf die äußere Phospholipidschicht der Membran. Eine Interaktion mit vorhandenen Steroiden führt dann dazu, dass die Membranintegrität gestört wird und sich die äußere Schicht des Phospholipidbilayers konvex nach außen, oder konkav nach innen wölbt. Am Ende resultieren daraus entweder Poren in der Membran oder es entstehen Vesikel, die sich aus der Membran herauslösen (siehe Abb. 1).

Einige phytopathogene Pilze, deren Wirtspflanze Saponine produzieren, führen eine aktive Detoxifikation durch, indem sie durch spezielle Glykosylhydrolasen den Zuckerrest vom Aglycon abspalten. Obwohl Saponine im Pflanzenreich weit verbreitet sind, wurde bisher im Wesentlichen nur der Einfluss bei der Tomate und bei Hafer als bestimmender Faktor für die Ausprägung einer Krankheitsresistenz untersucht (Osbourn et al., 1998).

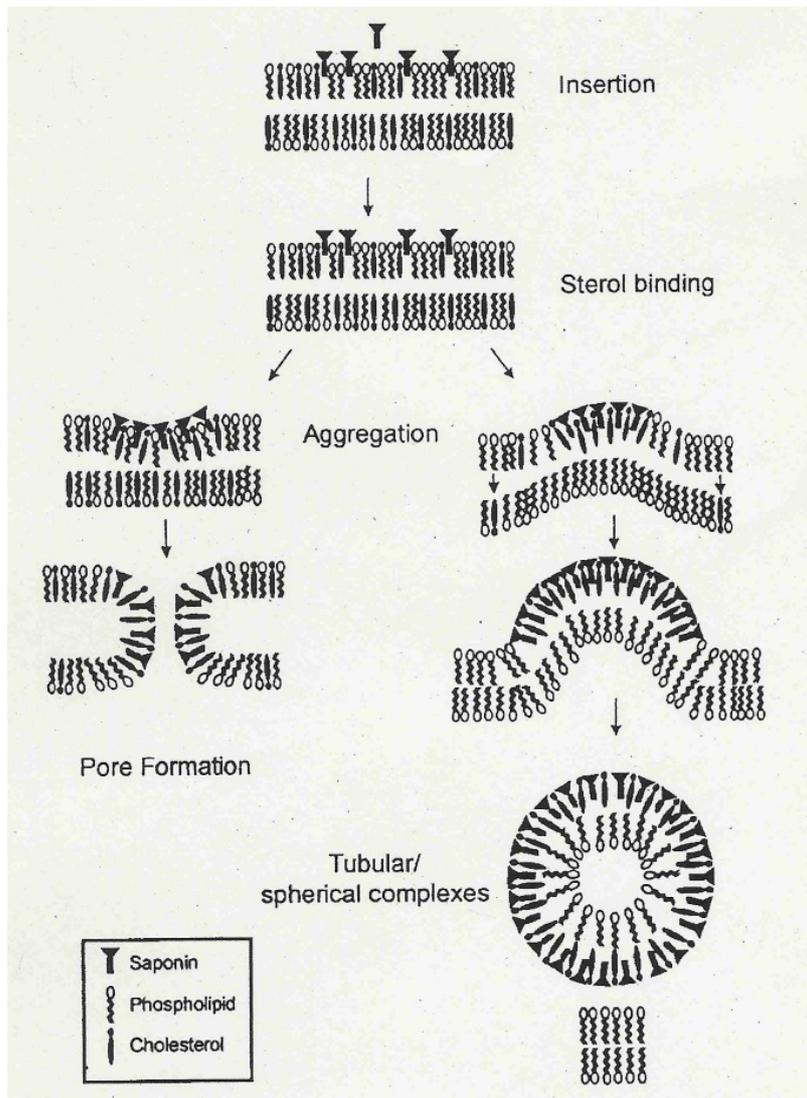


Abb. 1: Wirkungsweise von Saponinen auf die eukaryotische Membran

Vorgeschlagene Modelle für die Membranzerstörung durch Saponine bei der eukaryotischen Membran. Saponine interagieren mit Steroiden in Membranen und bilden Aggregate. Aggregation führt daraufhin zur Bildung von Membranporen (links dargestellt), oder zum Verlust von Steroiden aus der Membran mit der Bildung von Vesikeln außerhalb der Membran (aus: Osbourn et al., 1998).

III. α -Tomatin, das Hauptsaponin der Tomate

Das Hauptsaponin der Tomatenpflanze ist α -Tomatin, das zu den Steroidalkaloiden zählt, welche man in erster Linie bei Mitgliedern der Familie der Solanaceae findet, zu denen u. a. die Tomate und die Kartoffel gehören (Morrisey et al., 1999). Irving et al. isolierten 1945 als Erste α -Tomatin aus *Lycopersicon pimpinellifolium*, einer Wildtomate. Das α -

Tomatin-Molekül (siehe Abb. 2) besteht aus dem Aglycon Tomatidin, welches zu der Gruppe der Steroidalkaloide gehört, an dessen C₃ die Tetrasaccharidseitenkette (Lycotetraose) gebunden ist. Das Tetrasaccharid besteht aus vier Zuckern: ein Molekül Galaktose, 2 Moleküle Glucose und ein Molekül Xylose. Aufgrund dieser Struktur besitzt es einen hydrophilen Teil (der Tetrasaccharidseitenkette), einen hydrophoben Teil (den steroidal Rest) und eine polare NH-Gruppe, welche pH-Wert-abhängig unterschiedlich protoniert vorliegen kann. Diese drei Bereiche verleihen dem Molekül seine einzigartige biologische Aktivität.

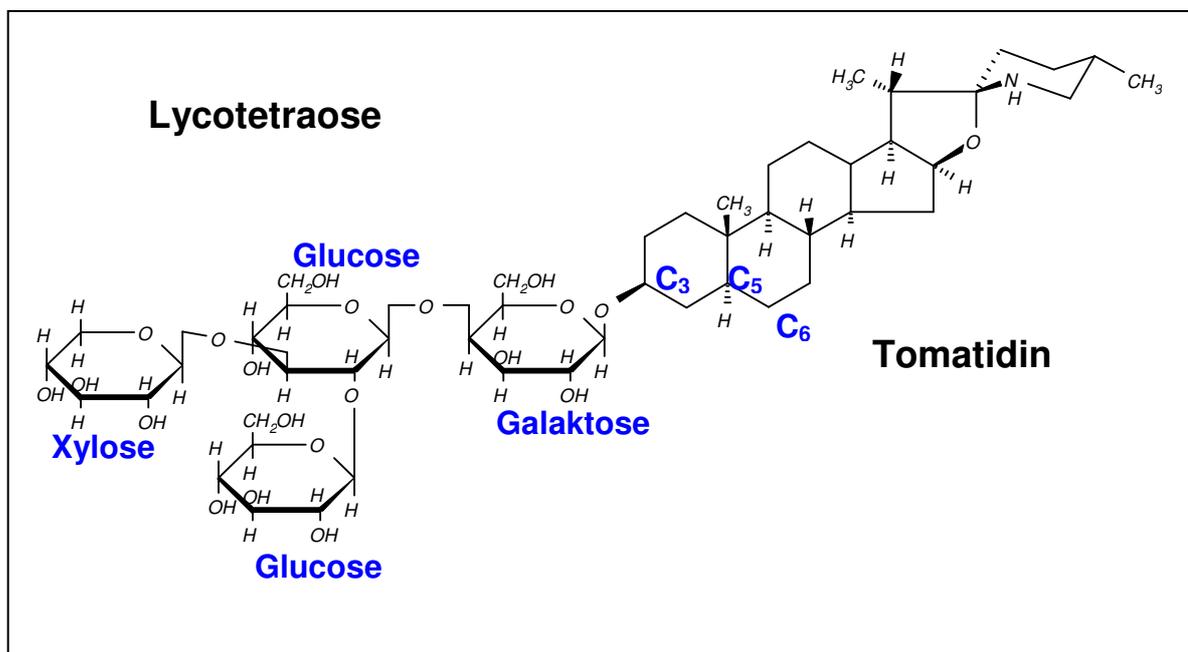


Abb. 2: Struktur von α -Tomatin

Als typischer Vertreter der Saponine kann α -Tomatin mit seinem bipolaren Aufbau, durch das hydrophile Tetrasaccharid auf der einen und dem eher hydrophoben Aglycon Tomatidin auf der anderen Seite, membranaktiv wirken (vergleiche Abb. 1). Durch die pH-abhängige Protonierung der NH-Gruppe des unpolaren Tomatidinrestes kann dieser an sich hydrophobe Teil des α -Tomatin-Moleküls protoniert und damit zunehmend hydrophiler werden. Bei niedrigen pH-Werten von pH 4,0 und kleiner verliert α -Tomatin dadurch seine membranaktiven Eigenschaften und somit seine toxische Wirkung. Dieses konnte sehr eindrucksvoll an der Wechselwirkung des tomatenpathogenen Pilzes *Corticium rolfsii* mit der Tomatenfrucht demonstriert werden (Schlösser, 1997; Schlösser, 1975): Grüne Früchte werden nach Wundinokulation durch den Pilz *Corticium rolfsii* trotz

des hohen Tomatingehaltes erfolgreich besiedelt, da aufgrund einer beträchtlichen Ausschüttung an Oxalsäure durch den Pilz der ursprüngliche pH-Wert an der Inokulationsstelle von pH 4,5 auf 3,5 abgesenkt wird. Wird die Inokulationsstelle auf pH 8,0 abgepuffert, wird *C. rolfsii* innerhalb von 24-48 Stunden durch die wiederhergestellte toxische Wirkung des α -Tomatins abgetötet. Wenn bei der Pufferung auf pH 8,0 zusätzlich Cholesterin appliziert wird, so wird das hochreaktive α -Tomatin durch Komplexierung inaktiviert und der Pilz kann ungehindert die grüne Frucht besiedeln. Dieses belegt nicht nur die pH-abhängige Wirkungsweise von α -Tomatin, sondern es bestätigt zudem das Modell, dass α -Tomatin mit den Cholesterinen der eukaryotischen Membran interagiert (siehe Abb. 1).

Bereits kurz nach der Erstisolierung von α -Tomatin (Irving et al., 1945) konnte gezeigt werden, dass α -Tomatin fungizide Eigenschaften hat (Irving et al., 1946; Fontaine et al., 1948). In einfachen Agardiffusionstesten konnten Irving et al. (1946) zeigen, dass zahlreiche Pilze, darunter sowohl phytopathogene, wie *Phytophthora solanacearum* und *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, als auch humanpathogene, wie *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* und *Microsporium audouini* durch α -Tomatin in ihrem Wachstum *in vitro* gehemmt werden. Irving et al. (1946) konnten ebenfalls zeigen, dass α -Tomatin auch antibiotische Eigenschaften gegenüber Bakterien hat und das Wachstum von *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis* hemmt, allerdings wurde bei *Escherichia coli* und *Penicillium notatum* keine Wirkung beobachtet. Auch auf Schadinsekten wirkt α -Tomatin. So konnte an mehreren Beispielen gezeigt werden, dass α -Tomatin in Früchten die Entwicklung von Larven verschiedener Insekten, wie z. B. *Phthorimaea operculella* (Mulatu et al., 2006) oder *Ceratitis capitata*, der mediterranen Fruchtfliege, hemmt (Chan et al., 1985). Ferner konnte gezeigt werden, dass α -Tomatin die Vermehrung des Tabakmosaikvirus in infizierten Pflanzenzellen *in vitro* inhibiert (Balashova et al., 1984). α -Tomatin hämolysiert Erythrozyten *in vitro* und *in vivo*. Direkte Injektion von α -Tomatin in Mäuse hatte einen rapiden Blutdruckabfall zur Folge, welches die Autoren mit der Hämolyse der Erythrozyten in Verbindung brachten (Nishie et al., 1975). In diesem Zusammenhang zeigte sich auch, dass zusätzliche Gabe von Cholesterin die Erythrozyten gegen Hämolyse schützt (Elferink et al., 1977). Um die Wirkung von α -Tomatin auf den menschlichen Körper abschätzen zu können, verglichen Sackmann et al. (1959) die LD₅₀-Werte (Dosis, die bei 50 % der getesteten Individuen

letal wirkt) bei Applikation von α -Tomatin auf Mäuse: intraperitoneal 25 mg/kg Körpergewicht, oral 500 mg/kg Körpergewicht und subkutan >1000 mg/kg Körpergewicht. Trotzdem scheint die orale Aufnahme auch von relativ hohen, natürlich vorkommenden, α -Tomatin-Dosen beim Menschen keinen nachteiligen Effekt zu haben. Die Früchte von einigen Wildformen der Tomate, wie z. B. *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*, die in den Hochlanden Perus vorkommen, haben mit 500-5000 $\mu\text{g/g}$ Trockengewicht einen sehr hohen α -Tomatin-Gehalt. Der Konsum dieser recht bitter schmeckenden Tomatenfrüchte scheint aber auf die Gesundheit der einheimischen Bevölkerung keine nachteiligen Effekte zu haben (Rick et al., 1994). α -Tomatin hat aber auch nachgewiesene positive Effekte auf den menschlichen Körper. So konnte gezeigt werden, dass α -Tomatin das Wachstum von humanen Krebszellen inhibiert (Lee et al., 2004) und Tomatidin die Chemotherapie bei Krebszellen positiv beeinflusst (Lavie et al., 2001). In Fütterungsexperimenten beim Hamster konnte außerdem gezeigt werden, dass oral aufgenommenes α -Tomatin den LDL-(Low-Density-Lipoprotein)-Cholesteringehalt im Blut senkt (Friedmann et al., 2000).

Neben α -Tomatin findet man in der Tomatenpflanze auch geringe Mengen an Dehydrotomatin, welches eine Form des α -Tomatins ist, bei der sich unter Abspaltung von Wasserstoff des steroidalen Restes zwischen C₅ und C₆ eine Doppelbindung ausgebildet hat.

α -Tomatin ist in allen Pflanzenteilen der Tomate präsent (Friedman, 2002); allerdings ist die Konzentration sehr unterschiedlich und abhängig vom jeweiligen Pflanzengewebe (siehe Tab. 1).

Tomatin-Gehalt von Pflanzenteilen der Tomate	
Pflanzenteil	mg/kg Frischgewicht
Blüten	1100
Blätter	975
kleiner Stängel	896
Blütenkelch	795
großer Stängel	465
kleine, unreife, grüne Früchte	465
große, unreife, grüne Früchte	144
Wurzeln	118

Tab. 1: Tomatingehalt in Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum*) (aus: Friedmann, 2002; Friedmann und Levin, 1998)

Anhand Tab. 1 erkennt man, dass der Gehalt an α -Tomatin in Blüten, Blättern und dem Stängel besonders hoch ist und Werte bis knapp unter ein Gramm pro Kilogramm Frischgewicht erreicht. In den roten, reifen Früchten ist der Tomatingehalt gegenüber den noch unreifen Früchten deutlich reduziert. Kozukue et al. (2004) zeigten in ihren Experimenten exemplarisch für die Sorte „Momotaro-T93“, dass der Gehalt an α -Tomatin von anfangs 795 mg/kg Frischgewicht in grünen Früchten durch die Reifung auf 1,5 mg/kg Frischgewicht absinkt.

Die Pflanzensorte hat außerdem einen Einfluss auf den Tomatingehalt. So konnten Asano et al. (1996) bei ihren Analysen zeigen, dass Wildtomaten gewöhnlich einen höheren Tomatingehalt haben als Zuchttomaten. Da durch Züchtungen auch versucht wurde, auf den Geschmack von Tomatenfrüchten Einfluss zu nehmen, ist dadurch vermutlich auch der Tomatingehalt in reifen Früchten reduziert worden, denn ein hoher Tomatingehalt korreliert mit einem bitteren Geschmack bei Tomatenfrüchten (Rick et al., 1994; Friedmann, 2002).

Tomatinasen von Phytopathogenen

Das Phytoanticipin α -Tomatin, welches präformiert in unterschiedlichen Konzentrationen in Pflanzenteilen der Tomate vorliegt, nimmt eine wichtige Rolle als Abwehrstoff gegen phytopathogene Organismen ein. Zudem kann eine zusätzliche, verstärkte Bildung von α -Tomatin auch durch Pathogenbefall induziert werden. So konnten Beimen et al. (1992) zeigen, dass der Tomatingehalt in den Blättern von *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker von 775 nmol auf 1600 nmol pro Gramm Frischgewicht ansteigt, wenn die Pflanze mit dem untersuchten Pathogen, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, infiziert wurde.

Weiterhin wurde nachgewiesen, dass bei gleichen Tomatensorten einige pathogene Mikroorganismen weniger sensitiv auf α -Tomatin reagieren als andere nichtpathogene (Sulemann et al., 1996). Folglich müssen diese Mikroorganismen Mechanismen entwickelt haben, dem toxischen Effekt von α -Tomatin auszuweichen (Morrissey und Osbourn, 1999). Bei einigen phytopathogenen Organismen konnten Tomatinasen nachgewiesen werden, mit denen diese in der Lage sind, das α -Tomatin-Molekül zu deglykosylieren und damit zu entgiften. Dabei spalten die beschriebenen Tomatinasen

jeweils einen oder mehrere Zucker des α -Tomatin-Moleküls ab (siehe Abb. 3). Durch Abspaltung der Zucker werden die hydrophilen Teil-Eigenschaften des amphoteren α -Tomatin-Moleküls reduziert und es verliert dadurch seine schädigende Membranaktivität. Es ist vorstellbar, dass nach der Deglykosylierung das hydrophobe Aglycon die Membran ungehindert passieren kann und im Zytoplasma möglicherweise von unspezifisch wirkenden Enzymen weiter verstoffwechselt wird.

Septoria lycopersici, ein phytopathogener Pilz, der bei Tomaten „leaf spot“ verursacht, produziert eine extrazelluläre Tomatinase, die die terminale Glucose vom α -Tomatin-Molekül abspaltet (Sandrock et al., 1995). Auch der nekrotrophe Pilz *Botrytis cinerea*, der bei Tomaten die „grey-mold-disease“ hervorruft, produziert Hydrolasen, die die terminale Xylose vom α -Tomatin-Molekül abspalten (Quidde et al., 1998). Im Gegensatz zu *B. cinerea* und *S. lycopersici* besiedelt der phytopathogene Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* das vaskuläre System der Tomatenpflanze. Er produziert eine induzierbare, extrazelluläre Tomatinase, die α -Tomatin in das Tetrasaccharid Lycotetraose und das Aglycon Tomatidin spaltet und dadurch entgiftet (Lairini et al., 1996).

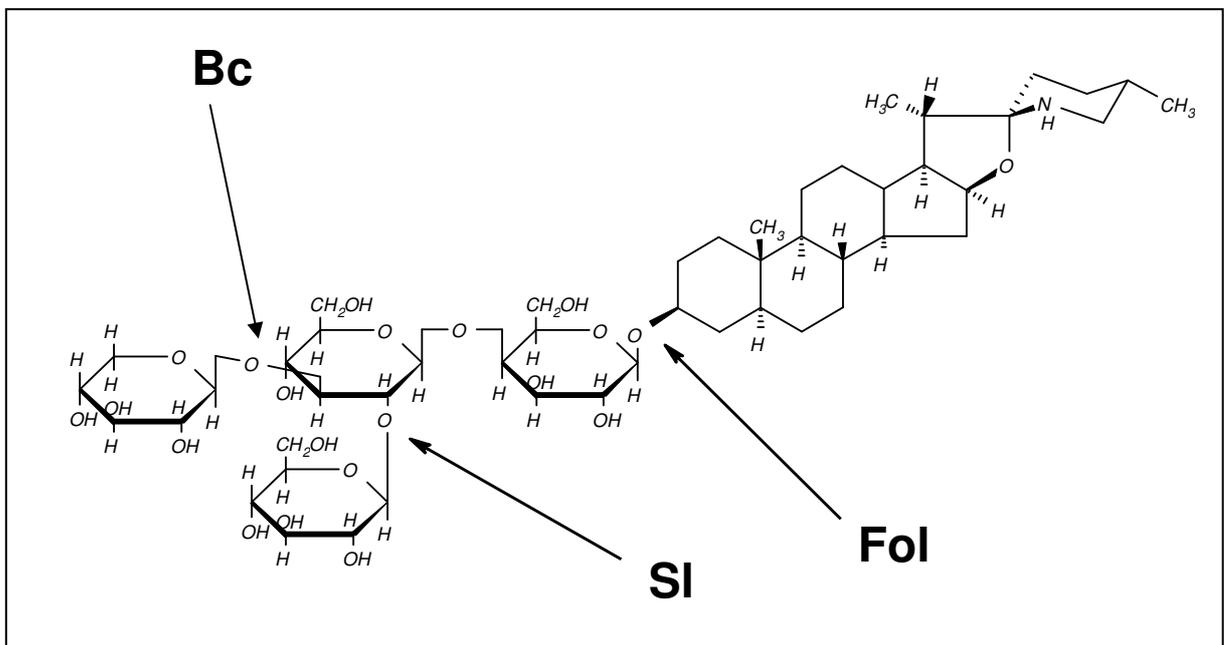


Abb. 3: α -Tomatin: Spaltstellen von Hydrolasen phytopathogener Pilze; Bc: *Botrytis cinerea*, Sl: *Septoria lycopersici*, Fol: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Die Rolle von Tomatinasen bei der Pathogenität phytopathogener Pilze scheint unklar. Mutanten des Pilzes *Septoria lycopersici*, bei denen das Tomatinase-kodierende Gen inaktiviert wurde, zeigten keine reduzierte Virulenz an den getesteten Tomatensorten (Martin-Hernandez et al., 2000). Für die Tomatinase aus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* konnte nachgewiesen werden, dass eine Infektion mit der Mutante, die das Tomatinasegen *tom1* konstitutiv exprimiert, zu einer verstärkten Krankheitssymptomausprägung bei infizierten Pflanzen führt. Gleichzeitig führte eine Infektion mit *tom1*-knock-out-Mutanten zu einer Verzögerung des Krankheitsprozesses (Pareja-Jaime, et al., 2008). Dieses belegt, dass die Tomatinase aus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* nicht essentiell für die Pathogenität, aber für die volle Virulenzausprägung, notwendig ist.

Tomatinasen haben neben dieser direkten katalytischen Funktion noch eine weitere indirekte Funktion auf die Pathogen-Pflanzen-Interaktion. Sie spielen eine Rolle in der Unterdrückung der induzierten Pflanzenabwehr (Bourab et al., 2002; Ito et al., 2004). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Hydrolyseprodukte Lycotetraose und Tomatidin, die durch die Hydrolyse von α -Tomatin durch *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* freigesetzt werden, die induzierte Pflanzenabwehr unterdrücken. In Tomatenzellkulturen inhibieren beide α -Tomatin-Abbauprodukte den *oxidative burst* und den programmierten Zelltod (Ito et al., 2004).

IV. *Clavibacter michiganensis* – ein phytopathogenes Bakterium

Clavibacter michiganensis gehört zur Klasse der *Actinobacteria* und darunter zur Familie der *Microbacteriaceae*. *Clavibacter michiganensis* zeigt eine coryneforme Morphologie, ist Gram-positiv, nicht begeißelt und weist mit 72,6 % einen relativ hohen G+C-Gehalt der DNA auf (Davis et al., 1984, Gartemann et al., 2008). In der Gattung *Clavibacter* gibt es nur eine Art, *Clavibacter michiganensis*, welche mehrere Subspezies umfasst. Alle Subspezies infizieren das vaskuläre System verschiedener Wirtspflanzen und führen zu einer systemischen Infektion mit charakteristischen Erkrankungen (siehe Tab. 2).

Phytopathogen	Wirtspflanze	Krankheitsbild
<i>Cm</i> subspecies <i>insidiosus</i>	versch. Leguminosen, z. B. Luzerne	bakterielle Welke
<i>Cm</i> subspecies <i>michiganensis</i>	versch. Solanaceen, z. B. Tomate, Paprika	bakterielle Welke
<i>Cm</i> subspecies <i>nebraskensis</i>	Mais	Blatt- und Stängelfäule
<i>Cm</i> subspecies <i>sepedonicus</i>	Kartoffel, Aubergine	Bakterienringfäule
<i>Cm</i> subspecies <i>tessellarius</i>	Weizen	Blattfleckung

Tab. 2: Subspezies von *Clavibacter michiganensis* (*Cm*) mit ihren spezifischen Wirtspflanzen und Krankheitsbildern (Metzler et al., 1997)

Die Wirtspflanze von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) ist die Tomate, *Solanum lycopersicum*, bei der *Cmm* eine charakteristische Welkeerkrankung, „bacterial wilt and cancer“, hervorruft. *Cmm* dringt über äußere Wunden in die Wirtspflanze ein und kolonisiert das Xylem der Tomate, was zu einer systemischen Infektion der Pflanze führt (Strider et al., 1969). Auch eine Infektion über Hydatoden (Carlton et al., 1998) und infiziertes Saatgut (Strider et al., 1969) ist möglich. Die ersten Krankheitssymptome beginnen meist mit einer unifazialen Fiederblattwelke, die sich im weiteren Krankheitsverlauf schnell auch auf weitere Blätter ausdehnt. Im Spätstadium können Sprossläsionen auftreten, die zum Verlust der Standfestigkeit und somit zum Absterben der Pflanze führen (siehe Abb. 4). In der Pflanze erreicht *Cmm* dabei einen Titer von über 10^9 CFU pro Gramm Pflanzenhomogenat (Meletus et al., 1993). Werden Pflanzen erst im späten Stadium von *Cmm* befallen, können die Samen von *Cmm* infiziert werden. Durch kontaminiertes Saatgut kann *Cmm* dadurch an die nächste Generation weitergegeben werden, welches wohl einer der Hauptgründe für Ausbrüche von *Cmm* in der Landwirtschaft ist (Tsiantos, 1987). Im Erdreich kann *Cmm* über mehrere Jahre persistieren, wenn es mit abgestorbenem Pflanzenmaterial assoziiert ist (Fatmi et al., 2002). Dementsprechend verursacht diese Krankheit, bedingt durch *Cmm*, aufgrund von Ernteverlusten und dem Ausfall von kontaminierten Agrarflächen für den Tomatenanbau über mehrere Jahre einen großen wirtschaftlichen Schaden.

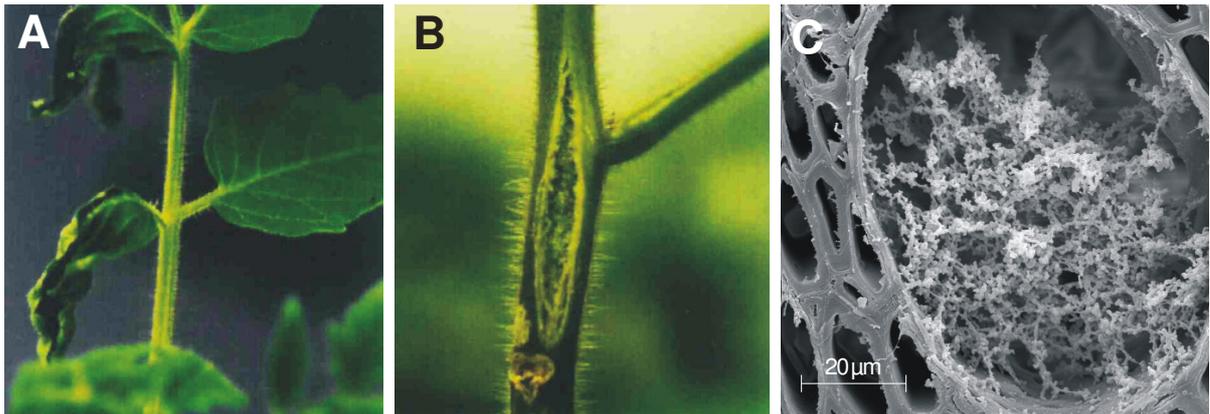


Abb. 4: Von *Cmm* infizierte Tomatepflanze, A: unifaziale Fiederblattwelke, B: Sprossläsion, C: REM-Aufnahme infizierter Xylemgefäße (Fotos: A und B: H. Jahr, C: T. Trapphoff)

Genetische Aspekte und Pathogenitätsfaktoren

Das Chromosom des *Cmm* Stammes NCPPB382 ist zirkulär und hat eine Größe von 3,3 Mbp (Gartemann et al., 2008). Im Genom konnten zahlreiche Gene für Funktionen in der Degradation der pflanzlichen Zellwand identifiziert werden: u. a. Cellulasen, Polygalakturonasen, Xylanasen. Der Wildtyp *Cmm* NCPPB382 besitzt zwei Plasmide pCM1 (27,4 kb) und pCM2 (70,0 kb), die für die Pathogenität relevante Gene tragen (Meletzus et al., 1993). Dazu gehört das Gen *celA*, lokalisiert auf pCM1, das für eine β -1,4-Endoglucanase kodiert (Jahr et al., 2001) und das Gen *pat-1*, lokalisiert auf pCM2, das für eine putative Serinprotease kodiert (Dreier et al., 1997).

Mutanten des Wildtyps *Cmm* NCPPB382, bei denen *celA* oder *pat-1* fehlt, weil eines der beiden Plasmide verloren ging, zeigen eine deutlich abgeschwächte Virulenz. Der Plasmid-freie Stamm CMM100 ruft bei der Tomatenpflanze *Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker keine sichtbaren Krankheitssymptome hervor, kann das Xylem aber noch effektiv kolonisieren. Allerdings zeigen CMM100-infizierte Pflanzen eine geringe Biomasseabnahme (10 – 20 %) gegenüber nicht infizierten Kontrollpflanzen. Diese Tatsache führte zu der Annahme, dass Gene, die für die Wirtserkennung, die Kolonisation des Wirtes und die Unterdrückung der Pflanzenabwehr notwendig sind, chromosomal kodiert sein müssen.

Freilandisolate von *Cmm* aus Israel, die zwar noch mindestens eines der beiden Plasmide aufwiesen, trotzdem aber nicht mehr virulent waren, wurden genetisch näher

charakterisiert (Steingröver, 2003; Schott, 2004; Kleitmann et al., 2008). Bei diesen Stämmen konnte der Verlust einer chromosomalen Region nachgewiesen werden, die 129 kb umfaßt (Gartemann et al., 2008). Durch vorangegangene Arbeiten (Jahr, 2000; Abt, 2002; Kaup, 2002; Gräfen, 2006; Engemann, 2006) und durch Sequenzierung des gesamten Genoms von *Cmm* (Gartemann et al., 2008) konnte nachgewiesen werden, dass diese Region notwendig für eine effektive Kolonisation der Tomatenpflanze ist. Für *chpC*, ein Gen mit hoher Ähnlichkeit zu dem plasmidkodierten Pathogenitätsfaktor Pat-1, konnte gezeigt werden, dass bei Inaktivierung des Gens der Titer von *Cmm* in infizierten Tomatenpflanzen um zwei Zehnerpotenzen reduziert ist (Gräfen, 2006). Diese 129 kb große, als ‚*chp/tomA* region‘ bezeichnete Pathogenitätsinsel weist einen deutlich niedrigeren G+C-Gehalt auf und umfasst zwei Unterregionen: 1.) Die *chp*-Region (79 kb, G+C = 64,8 %) beinhaltet unter anderem die Gene *chpA-G*, chromosomale Homologe des plasmidkodierten Gens *pat-1*. 2.) Die *tomA*-Region (50 kb, G+C = 66,8 %) enthält zahlreiche Gene, die Proteine für Aufnahme und Metabolismus von verschiedenen Zuckern kodieren und zudem mehrere regulatorische Elemente. Außerdem ist in dieser Region das der Region den Namen verleihende Gen *tomA* lokalisiert. TomA weist auf Proteinebene Homologien zu Tomatinasen phytopathogener Pilze auf, die α -Tomatin, einen Abwehrstoff der Pflanze, deglykosylieren.

Das Gen *tomA* von *Cmm*

Bereits vor der Sequenzierung des kompletten Genoms von *Cmm* wurde ein Transposonmutageneseverfahren für *Cmm* entwickelt (Gartemann, 1999; Kirchner et al., 2001), das auf dem Insertionselement IS1409 aus *Arthrobacter* sp. basiert. In einer Transposonmutagenese konnte damit u. a. ein Gen mit einer hohen Ähnlichkeit auf Proteinebene (68 %) zu der Tomatinase aus dem phytopathogenen Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* identifiziert werden. Aufgrund dieser hypothetischen Funktion wurde das Gen als *tomA* bezeichnet. Zu Beginn dieser Arbeit waren Tomatinasen nur von phytopathogenen Pilzen, also Eukaryoten, beschrieben. Aufgrund der diskutierten Wirkungsweise des α -Tomatins auf die eukaryotische Membran war bis dato auch eine Wirkung auf prokaryotische Membranen in der Fachwelt kaum vorstellbar (Schlösser, 2002). Zum Ende der vorliegenden Doktorarbeit wurden mittlerweile auch Tomatinasen

aus anderen phytopathogenen Bakterienarten identifiziert, die eine noch größere Ähnlichkeit zu TomA aus *Cmm* aufweisen, dazu zählt die Tomatinase aus *Streptomyces thurgidiscabies* (77 %), einem bakteriellen Kartoffelpathogen (siehe Abb. 5).

Die katalytische, N-terminale Domäne der Tomatinase TomA von *Cmm* umfasst 340 Aminosäuren und gehört zur Glykosylhydrolase-Familie 10, einer zuckerspaltenden Enzym-Familie, die hauptsächlich Xylanasen umfaßt. Die Ähnlichkeit innerhalb dieser Familie ist dabei am größten zu der Tomatinase aus *Streptomyces thurgidiscabies* (77 %), welche sich über den gesamten kodierenden Bereich, inklusive der zweiten C-terminalen Domäne, des Genes *tomA* erstreckt. Die Homologie zur Tomatinase aus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* erstreckt sich jedoch nur über einen etwa 356 Aminosäuren großen N-terminalen, katalytischen Bereich. Unter anderem gibt es weitere Homologien zu zahlreichen putativen und bereits charakterisierten Xylanasen u. a. von *Kineococcus radiotolerans* (75 %), *Thermobifida fusca* (51 %), *Thermotoga maritima* (51 %), sowie verschiedenen Arten von *Streptomyces*, wie z. B. *Streptomyces halstedii* (54 % Ähnlichkeit), die sich aber nur über den etwa 356 Aminosäuren großen N-terminalen Bereich von TomA erstrecken (siehe auch Abb. 46, Alignment im Anhang).

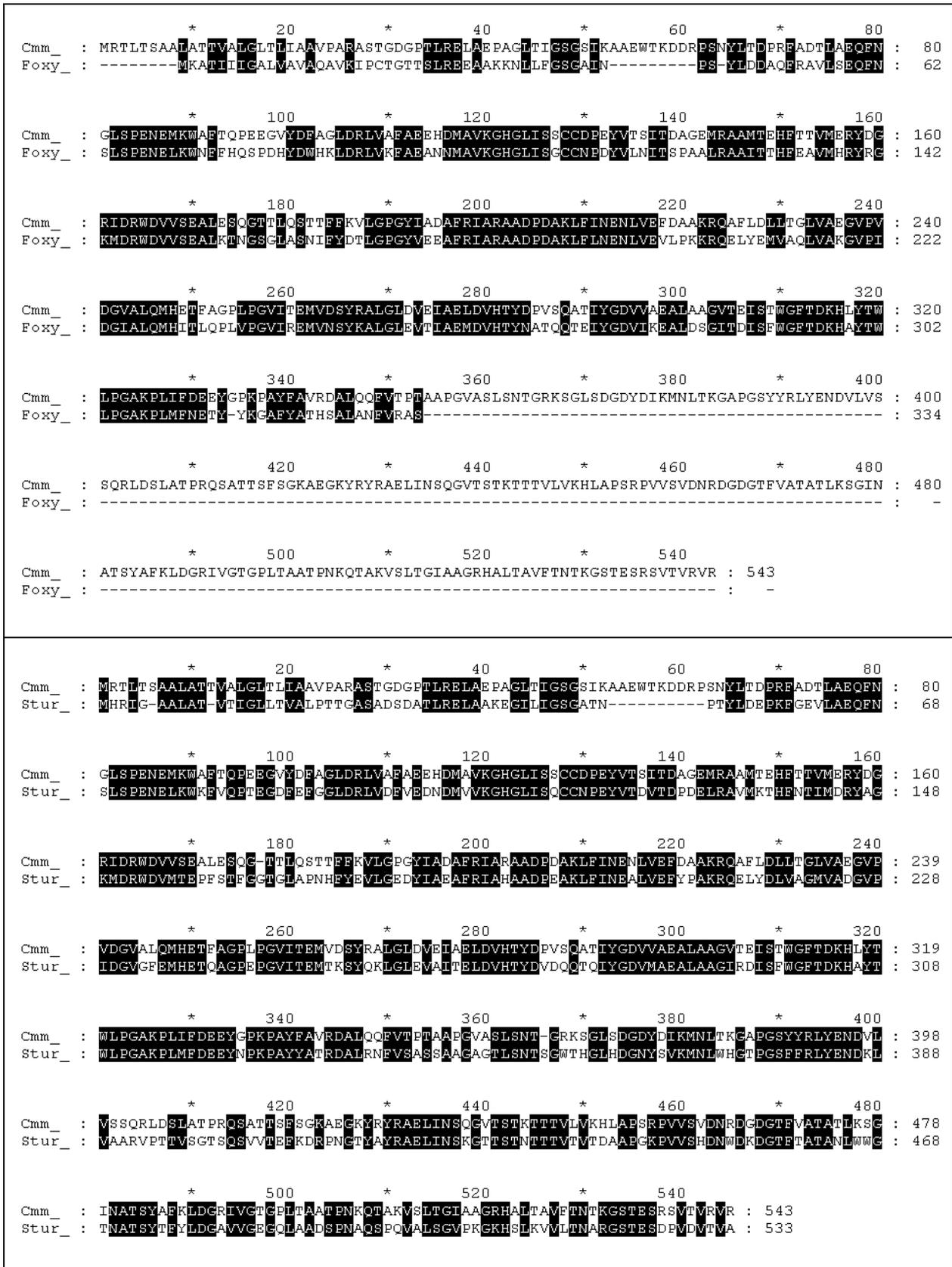


Abb. 5: Alignments des Genproduktes von *tomA* aus *Cmm* (Cmm_) und der Tomatinase aus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Foxy_), oben und *Streptomyces turgidiscabies* (Stur_) unten. Alignments wurden mit CLUSTAL X1.81 (Thompson et al., 1994) erstellt.

Am N-Terminus von TomA wurde mit Hilfe des Programms SignalP ein Signalpeptid zur Ausschleusung des Genproduktes vorhergesagt. Im Anschluss an die Signalsequenz wird TomA in zwei Bereiche eingeteilt: eine katalytische Domäne und eine C-terminale zweite Domäne (siehe auch Abb. 7). Die vordere, katalytische Domäne zeigt hohe Homologien zur bis *dato* einzigen auch nachgewiesenen Tomatin-spaltenden Tomatinase aus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Durch Datenbankabfragen konnte in diesem N-terminalen Bereich (Aminosäuren 1 – 340 von TomA) die konservierte Domäne der Glycosylhydrolase Familie 10 nachgewiesen werden (Pfam 00331, Marchler-Bauer et al., 2007). Der C-terminale Bereich zeigt sehr schwache Homologien zu Fibronectin-III-ähnlichen Domänen. Diese Domänen findet man auch bei Glycosylhydrolasen von Bakterien, wobei die exakte Funktion dieser Domänen innerhalb der bakteriellen Proteine unklar ist (Saito, et al., 2003; Little et al., 1994).

Das Gen *tomA* ist umgeben von regulatorischen Elementen

Durch Klonierung und Sequenzierung konnten auch angrenzende Bereiche von *tomA* charakterisiert werden (Gräfen, 2001) (siehe Abb. 6). Stromaufwärts befinden sich die Gene *regA* und *regB*, die einen Zweikomponentenregulator kodieren. Zweikomponentenregulatoren sind weit verbreitete Regulationssysteme bei Bakterien, die es dem Organismus ermöglichen, gezielt und direkt auf sich verändernde Umweltbedingungen zu reagieren. Der generelle Aufbau dieser Regulatoren ist dabei immer der gleiche. Er besteht aus zwei Komponenten, einer Histidinkinase, die als „Sensor“ funktioniert, hier *regA*, und einem sogenannten „response-regulator“-Protein, hier *regB*. Stromabwärts befindet sich in entgegengesetzter Orientierung zu *tomA* das Gen *catR*, welches für einen Katabolitrepresor vom *lacI*-Typ kodiert. Ebenfalls weiter stromabwärts befindet sich das Gen *bglA*, welches für eine β -Glykosidase kodiert.

Den regulatorischen Elementen RegA, RegB und CatR, sowie der β -Glykosidase BglA wurden bisher nur aufgrund ihrer Ähnlichkeiten zu Datenbankeinträgen diese Funktionen zugeordnet (Daten nicht gezeigt), ein experimenteller Nachweis für eine postulierte Regulatorfunktion existierte zu Beginn dieser Arbeit noch nicht.

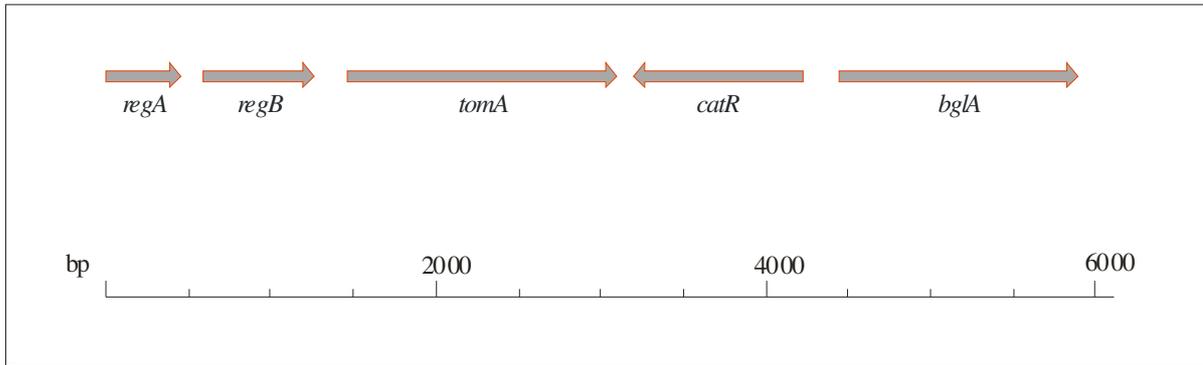


Abb. 6: Umgebung von *tomA*

Mutanten von *tomA*

Zu Beginn dieser Arbeit lagen bereits Insertionsmutanten verschiedener Gene vor. Wie bereits erwähnt, konnte durch Transposonmutagenese das Gen *tomA* identifiziert werden. Bei der zugehörigen Transposonmutante *CmmC7* ist das Leseraster des Gens *tomA* im N-terminalen Bereich durch Integration des Transposons *Tn1409Cβ* unterbrochen. In einer anschließenden Diplomarbeit wurde als Ergänzung zur Etablierung der Methode eine Insertionsmutante hergestellt, bei dem ein großer Teil des *tomA*-Gens durch Insertion einer Chloramphenicol-Resistenzkassette ausgetauscht wurde (Kaup, 2002) (siehe Abb. 7).

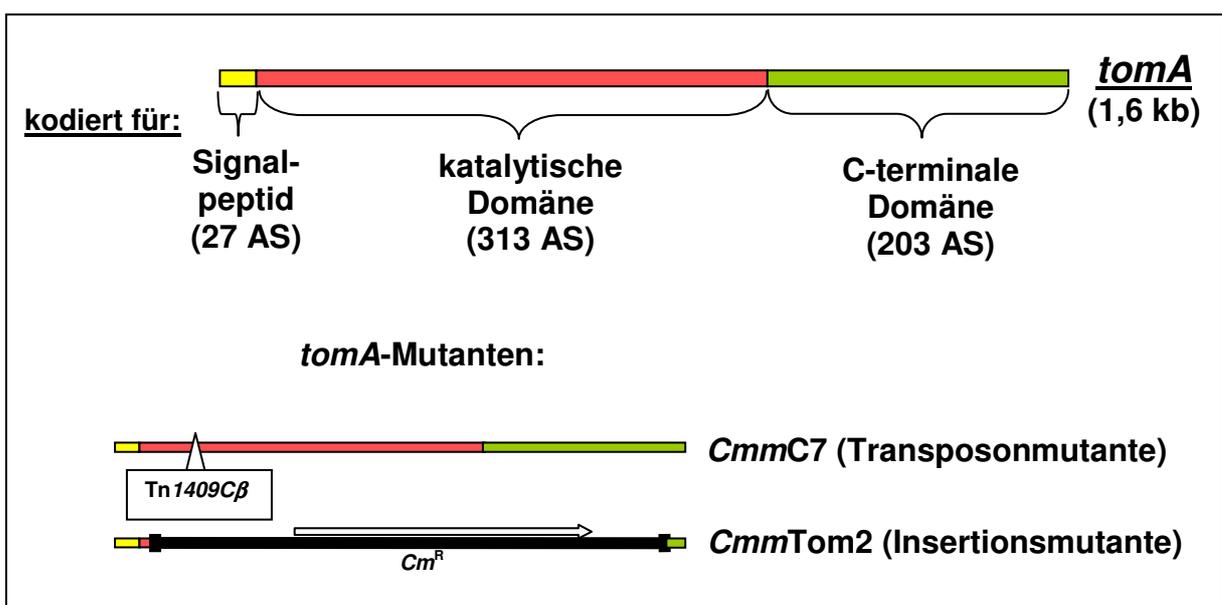


Abb. 7: Mutanten von *tomA*

In der Diplomarbeit wurde ebenfalls eine Insertionsmutante von *Cmm* angefertigt, bei der durch homologe Rekombination im *regB*-Gen eine *cmx*-Kassette inseriert wurde und dadurch *regB* inaktiviert wurde (Kaup, 2002). Eine Infektion mit dieser Mutante zeigte in dem durchgeführten Pflanzentest an *Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker keine veränderte Virulenz im Vergleich zur Infektion mit der *Cmm* Wildtypkontrolle.

Um einen möglichen regulatorischen Einfluss von CatR auf die Tomatinase untersuchen zu können, wurde eine weitere Mutante konstruiert, bei der durch Insertionsmutagenese das Gen *catR* deletiert wurde (Mayer, 2006).

C. Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob das Genprodukt von ORF CMM_0090, der aufgrund seiner guten Übereinstimmungen zu bereits charakterisierten Tomatinasen phytopathogener Pilze mit *tomA* bezeichnet wurde, α -Tomatin hydrolysieren kann. Dabei sollte mit Hilfe der bereits vorliegenden *tomA*-Mutanten auch der Einfluss von α -Tomatin auf das Wachstum von *Cmm in vitro* untersucht werden.

Des Weiteren war es beabsichtigt herauszufinden, welche Bedeutung *tomA* in der Pathogen-Pflanzen-Interaktion hat. Dazu sollte in Pflanzentests mit den *tomA*-Mutanten und entsprechenden Kontrollstämmen überprüft werden, ob die Inaktivierung des *tomA*-Gens zu einer Veränderung in der Virulenz führt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der näheren biochemischen Charakterisierung der Tomatinase. Hierzu sollte das Gen *tomA* in *E. coli* überexprimiert und die rekombinant hergestellte Tomatinase anschließend verwendet werden, um die enzymatischen Eigenschaften des Enzyms näher zu charakterisieren; dabei sollten auch Aussagen zur katalytischen Domäne und der Substratspezifität erzielt werden. Ferner sollte überprüft werden, ob die Tomatinase durch die angrenzenden regulatorischen Gene in der Nachbarschaft von *tomA* in ihrer Expression beeinflusst wird.

D. Material und Methoden

I. Material

1. Bakterienstämme

Stamm	Genotyp/relevante Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96</i> (Nal ^R), <i>thi-1, relA1, hsdR17, supE44,</i> Δ (<i>lac-proAB</i>), F λ , <i>traD36, proAB, lacI^q,</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15	Yanisch-Perron et al., 1985
WA337	F ⁻ , <i>dcm-6, dam-3, metβ1, galK2,</i> <i>galT22, lacY1, tsx-78, supE44</i>	Stammsammlung Wackernagel, Universität Oldenburg
BL21 DE(3) RIPL	F ⁻ , <i>ompT, gal, dcm, lon, hsd_B, (r_B- m_B⁻;</i> <i>E. coli</i> B Stamm) mit DE(3), ein T7 RNA Polymerasegen tragender λ -Prophage	Studier et al., 1990
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm)		
Cmm NCPPB382	pCM1, pCM2, virulent	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, UK
CMM100	Curing-Derivat von Cmm NCPPB382, plasmidfrei, avirulent	Meletzus et al., 1991
CMM101	Curing-Derivat von Cmm NCPPB382, pCM1, virulent	Meletzus et al., 1991
CmmTom2	Cm ^R , pCM1, <i>tomA::cmx</i>	Kaup, 2002
CmmC7	Cm ^R , pCM1, <i>tomA::Tn1409cβ</i>	Gartemann, unveröffentlicht
CmmTom2K1	CmmTom2, pDM302/Tom	diese Arbeit
CmmReg2	Cm ^R , pCM1, <i>regB::cmx</i>	Kaup, 2002
CmmCatR7 β	Cm ^R , pCM1, <i>catR::cmx</i>	Mayer, 2006

Tab. 3: In der vorliegenden Arbeit verwendete Bakterienstämme

2. Plasmide und Vektoren

Plasmid/Vektor	relevante Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> – Vektoren		
pUC13	Ap ^R , <i>lacZ</i> α Komplementationssystem	Vieira und Messing, 1982
pIG2	pUC13::3,9 kb <i>Pst</i> I/ <i>Eco</i> RI (<i>regB</i> , <i>tomA</i>) aus <i>Cmm</i> ; Ap ^R	Gräfen, 2001
pOKU9-cmBα	pUC19::1,5 kb <i>Bam</i> HI (<i>cmx</i>); Ap ^R , Cm ^R	Kirchner, unveröffentlicht
pOKU9-cmHcfα	pUC19::1,5 kb <i>Hinc</i> II (<i>cmx</i>); Ap ^R , Cm ^R	Kirchner, unveröffentlicht
<i>Escherichia coli</i> – <i>Clavibacter</i> - „Shuttle“ – Vektoren		
pDM302	<i>E. coli</i> - und <i>Cmm</i> -Replikon vorhanden; Cm ^R , Nm ^R	Meletzus et al., 1993
pDM302/Tom	pDM302:: 4 kb <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III aus pIG2; Nm ^R	Kaup, 2002
<i>Escherichia coli</i> – Expressionsvektoren		
pET-22b	Amp ^R , Expressionsvektor mit N-terminaler <i>pelB</i> Signalsequenz und C-terminalem His-Tag, T7 Promotor	Fa. Novagen
pET-15b	Amp ^R , Expressionsvektor mit N-terminalem His-Tag, T7 Promotor	Fa. Novagen
pTom16 _{EC}	Amp ^R , 1639 bp <i>tomA</i> kloniert in pET-22b	diese Arbeit
pTom16 _E	Amp ^R , 1555 bp <i>tomA</i> kloniert in pET-22b	diese Arbeit
pTom11	Amp ^R , 1011 bp <i>tomA</i> kloniert in pET-15b	diese Arbeit

Tab. 4: In der vorliegenden Arbeit verwendete Plasmide und Vektoren

3. Nährmedien

SB-Medium	10 g	Trypton
	5 g	Yeast-Extract
	4 g	NaCl
	mit Millipore H ₂ O auffüllen auf 500 mL	
	460 mL	1 M Sorbitol
	20 mL	1 M CaCl ₂
	20 mL	1 M MgCl ₂

Ansätze getrennt autoklavieren, abkühlen und vereinigen.

TBY-Medium	10 g/L	Trypton
	5 g/L	Yeast-Extract
	5 g/L	NaCl
		pH 7,5

C-Medium		TBY-Medium
	add	1 g/L Glucose

3.1 Zusätze zu Nährmedien

Agar	15 g	pro 1000 mL Festmedium
lacZ- ω -Komplementation	2 mL	2 % X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid) in DMF (Dimethylformamid)
	0,4 mL	0,1 M IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid)
		pro 1000 mL Festmedium

3.2 Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Abkürzung	Selektion für <i>E. coli</i> [$\mu\text{g/mL}$]	Selektion für <i>Cmm</i> [$\mu\text{g/mL}$]
Ampicillin	H ₂ O	Amp	150	–
Chloramphenicol	70 % Ethanol	Cm	10	10
Kanamycin	H ₂ O	Km	50	–
Neomycin	H ₂ O	Nm	50	50 – 75

Tab. 5: In der vorliegenden Arbeit verwendete Antibiotika.

4. Puffer und Lösungen

4.1 Lösungen für Gelelektrophorese

Agarose-Lösung, 0,8 % (w/v)

Agarose in TBE-Puffer aufkochen

Ethidiumbromidlösung

10 mg/mL in bidest. H₂O

Gel-Ladepuffer

0,03 % (w/v) Bromphenolblau

40 % (v/v) Glycerin

117 mM EDTA

TBE (10x)

108 g Tris-Base

9,3 g EDTA

55 g Borsäure

4.2 Lösungen zur DNA-Isolierung

AK I

6,7 % Saccharose

50 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 mM EDTA

CIA

Chloroform/Isoamylalkohol

im Verhältnis 24:1 mischen

Phenol (neutral)	1 Vol. saures Phenol add. ½ Vol. 1 M Tris-HCl, pH 8,8 add. ½ Vol. 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0
TE	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 7,5
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

4.3 Lösungen zur Vorbereitung des Agarosegels für Southern Blot

Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Depurinierungslösung	250 mM HCl
Neutralisierungslösung	1 M NH ₄ -Acetat 0,02 M NaOH

4.4 Lösungen für die Southern Hybridisierung

DIG-Färbelösung	50 µL 10 mL	NBT/ BCIP Stock Solution DIG-Puffer 3
DIG-Hybridisierungslösung		DIG-Prähybridisierungslösung mit DIG-markierter DNA-Probe
DIG-Prähybridisierungslösung	5x SSC 2 % (w/v) 0,1 % (v/v) 0,02 %	Blocking-Stammlösung N-Laurylsarkosin (w/v) SDS
DIG-Puffer 1	0,1 M 0,15 M	Maleinsäure NaCl pH 7,5
DIG-Puffer 2		2 % (w/v) DIG-Blocking-Reagenz in DIG-Puffer 1
DIG-Puffer 3	100 mM 100 mM 50 mM	Tris-HCl, pH 9,5 NaCl MgCl ₂
DIG-Waschpuffer		DIG-Puffer 1 mit 0,3 % (v/v) Tween 20
SSC (20x)	3,0 M 0,3 M	NaCl Na-Citrat pH 7,0
Wash I	2x 0,1 % (w/v)	SSC SDS

Wash II	0,1x	SSC
	0,1 % (w/v)	SDS

4.5 Lösung für proteinbiochemische Methoden

α -Tomatin-Lösung	10 mM	α -Tomatin
	50 mM	Na-Citrat
		pH 4,0

Kompartimenttest:

Zellysepuffer	100 mM	Tris-HCl
	20 mM	EDTA
	2 mg / 100 mL	Lysozym (frisch dazugeben)
		pH 8,5

Waschpuffer	50 mM	Tris-HCl
	2,5 M	Harnstoff
optional:	1,5 %	Triton X 100
		pH 8,5

Isolierung von *Inclusion Bodies*:

LSB 1	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	1 %	Triton
	0,2 mM	dTT
LSB 2	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	0,1 %	Triton
LSB 3	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5

Nickel-NTA-Affinitätschromatografie:

QiaB-Puffer	100 mM	NaH ₂ PO ₄
	10 mM	Tris-HCl
	8 M	Harnstoff
	pH 8,0 mit NaOH einstellen, nicht autoklavieren	

Waschpuffer

		QiaB-Puffer
add.	20 mM	Imidazol

Elutionspuffer

		QiaB-Puffer
add.	250 mM	Imidazol

Renaturierung:

Roti-Fold (1x)	200 mL	PBS (2x)
	50 mL	Roti [®] -Fold (8x)
	bidest. H ₂ O add. 1000 mL	
	mit bidest. H ₂ O auf 400 mL auffüllen	

PBS-Puffer (1x)

8 g	NaCl
0,2 g	KCl
1,8 g	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
0,24 g	KH ₂ PO ₄
mit bidest. H ₂ O auf 1000 mL auffüllen	
pH 7,4	

PBS-Puffer kann auch als 2x oder 10x konzentrierte Lösung angesetzt werden.

4.6 Lösungen für SDS-PAGE

RB-Stammlösung (10 x)	121 g	Glycin
	75 g	Tris-Base
		bidest H ₂ O add. 1000 mL

RB-Gebrauchslösung	100 mL	RB-Stammlösung
	10 mL	10 % SDS
		bidest H ₂ O add. 1000 mL

Probenpuffer (Laemmli)	10 mM	Tris-HCL, pH 6,8
	1 M	β-Mercaptoethanol
	6 % (w/v)	SDS
	12 % (w/v)	Glycerin
	0,2 % (w/v)	Bromphenolblau

Coomassiefärbung:

Färber:	40 % (w/v)	2-Propanol
	10 % (w/v)	Essigsäure
	1 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R 250

Entfärber:	25 % (w/v)	2-Propanol
	10 % (w/v)	Essigsäure

Konservierungspuffer	40 % (w/v)	2-Propanol
	3 % (w/v)	Glycerin

Silberfärbung:

Fixierer:	50 % (v/v)	Methanol
	12 % (v/v)	Eisessig
	0,02 % (v/v)	Formaldehyd

Färbelösung:	0,02 % (w/v)	Silbernitrat
	0,05 % (v/v)	Formaldehyd

Entwickler:	6 % (w/v)	NaCO ₃
	0,02 % (v/v)	Formaldehyd
	0,004 % (w/v)	Na ₂ S ₂ O ₃
Stopplösung:	50 % (v/v)	Methanol
	12 % (v/v)	Eisessig
Konservierungslösung:	40 % (v/v)	Methanol
	3 % (v/v)	Glycerin

4.7 Lösungen für Nachweis beim Westernblot

Blocking-Puffer	5 % (w/v)	non fat dry milk (Roche) in Waschpuffer
Detektionspuffer	100 mM	Tris-HCl, pH 9,5
	100 mM	NaCl
	50 mM	MgCl ₂
Puffer 1	300 mM	Tris
	10 %	Methanol
Puffer 2	30 mM	Tris
	10 %	Methanol
Puffer 3	25 mM	Tris
	40 mM	Capronsäure
	10 %	Methanol
TBS	50 mM	Tris, pH 7,5
	150 mM	NaCl
Waschpuffer	0,2 %	Tween 20 in TBS

4.8 Lösung zur Konservierung von Bakterien

PS-Puffer	7 g	Na ₂ HPO ₄
	3 g	KH ₂ PO ₄
	5 g	NaCl
	bidest. H ₂ O add. 1000 mL	
	pH 7,0	

Glycerin	100 %
----------	-------

4.9 Lösung zur Bestimmung der Menge an reduzierenden Zuckern: (Miller, 1959)

3,5-DNS Reagenz	1 % (w/v)	3,5-Dinitrosalicylsäure
	0,2 % (w/v)	Phenol
	0,05 % (w/v)	Natriumsulfit
	1 % (w/v)	Natriumhydroxid
	1 mM	D-Galaktose
in bidest. H ₂ O lösen		

4.10 Lösungen zur Isolierung der nativen Tomatinase aus *Cmm*

Phosphatpuffer (10 mM)	1,81 g	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O
	0,24 g	KH ₂ PO ₄
	bidest. H ₂ O add. 1000 mL	
pH 7,2		

Elutionspuffer	5 M	LiCl
	lösen in Phosphatpuffer	

5. Enzyme und Chemikalien

5.1 Enzyme

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

Tab. 6: In der vorliegenden Arbeit verwendete Enzyme

5.2 Restriktionsendonukleasen und dazugehörige Puffer

Enzym	Reaktionspuffer	Erkennungssequenz
<i>Bgl</i> II	NEBuffer 3	A/GATCT
<i>Eco</i> RI	NEBuffer 2	G/AATTC
<i>Hind</i> III	NEBuffer 2	A/AGCTT
<i>Nde</i> I	NEBuffer 4	CA/TATG
<i>Nco</i> I	NEBuffer 4	C/CATGG
<i>Not</i> I	NEBuffer 3	GC/GGCCGC
<i>Pst</i> I	NEBuffer 3	CTGCA/G
<i>Sph</i> I	NEBuffer 2	GCATG/C

Tab. 7: In der vorliegenden Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen

Enzymreaktionspuffer; 10x konzentriert (Firma New England Biolabs):

NEBuffer 2	10 mM	Tris-HCl
	10 mM	MgCl ₂
	50 mM	NaCl
	1 mM	Dithiothreitol
		pH 7,9

NEBuffer 3	50 mM	Tris-HCl
	10 mM	MgCl ₂
	100 mM	NaCl
	1 mM	Dithiothreitol
		pH 7,9
NEBuffer 4	20 mM	Tris-Acetat
	10 mM	Magnesium-Acetat
	50 mM	Kalium-Acetat
	1 mM	Dithiothreitol
		pH 7,9

Ligase-Puffer (Firma New England Biolabs)

5.3 Oligonucleotidprimer für PCR

Nr.	Primer	Sequenz (5' 3')
1	TomA-Hind	5'-CCCA AAGCTT ATGAGAACACTGACATCCGCAG-3' (<i>HindIII</i>)
2	Hind_oS_tomA	5'-CCCA AAGCTT TCGACCGGCGATGGACCTA-3' (<i>HindIII</i>)
3	Tom-Not-ohne	5'- GCGGCCG CGCGACCCTGACGGTGAC-3' (<i>NotI</i>)
4	Nde-p-toma-f	5'-GGAATTC CA TATGCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGG CCCTCGACCGGCGATGGACCT-3' (<i>NdeI</i>)
5	TomA-r11-nde	5'-GGAATTC CA TATGAGCGGTGGGCGTGACGAAC-3' (<i>NdeI</i>)

Tab. 8: In dieser Arbeit verwendete Oligonucleotidprimer zur Amplifizierung des *tomA*-Gens. Fett markiert: Erkennungssequenz für die zur Klonierung verwendete Restriktionsendonuklease (Bezeichnung in Klammern).

5.4 Materialien und Chemikalien

Bezugsquelle	Substanz
Amicon	Microcon Ultracel YM-30, 30.000 MWCO, <i>centrifugal filter device's</i>
Biozym	Agarose Seakem LE

GibcoBRL	Agar, Pepton, Trypton, Yeast-Extract
Qiagen	QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, Ni-NTA Super-Flow
Macherey-Nagel	NucleoSpin Extract II
Roche	DIG DNA Labeling and Detection Kit, Nitrobluetetrazolium (NBT), 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylpyrophosphat (BCIP), Blocking Reagenz
Serva	Bromphenolblau, IPTG, Tween80
Sigma	Ampicillin, Chloramphenicol, Dimethylformamid, EDTA, Kanamycin, N-Laurylsarkosin, Saccharose, Tris-HCl, α -Tomatin, Tomatidin, α -Solanin, Solanidin, Protein A Sepharose 4B Fast Flow von <i>Staphylococcus aureus</i> , Ponceau S Solution
Roth	Roti-Fold Renaturierungsreagenz
Merck	DC-Folie (Kieselgel 60, r_{254}), sowie alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien

Tab. 9. In der vorliegenden Arbeit verwendete Chemikalien

6. Geräte

Tischzentrifuge, Centrifuge 5415 D, Firma Eppendorf

Zentrifuge, Hermle Centrikon H-401, Firma Kontron

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

Hybridisierungsöfen OV2, Firma Biometra

RoboCycler Gradient 96, Firma Stratagene

Transilluminator VL, Firma Vilber Lourmat

French Pressure Cell Press, Firma AMINCON

Speed Vac Concentrator SVC100H, Fa. Savant Instruments

vacUubrand, Drehschieber Vakuumpumpe RD-4, Fa. Brand

Voyager-DE BioSpectrometry Workstation, Fa. Applied Biosystems

Vakuumbiotapparatur: LKB-Vacu-Gene XL, Fa. Pharmacia

NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, Fa. NanoDrop Technologies

7. Pflanzensamen

Solanum lycopersicum (Mill.) cv. „Moneymaker“

Herkunft: Erfurter Saatgut, N. L. Chrestensen, Erfurter Samen- und Pflanzenzucht GmbH

Lycopersicum pimpinellifolium, (Mill.)

Herkunft: Botanischer Garten Göttingen,

Index Seminum 2004, BG Göttingen, Index Nr. 2505

II. Methoden

1. Kultivierung von Bakterienstämmen

1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

E. coli-Stämme wurden auf festem oder in flüssigem Medium unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika bei einer Temperatur von 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert. Flüssigkulturen wurden in einer Rollvorrichtung inkubiert.

1.2 Kultivierung von *Cmm*

Cmm-Stämme wurden auf festem TBY-Medium oder C-Medium unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika bei einer Temperatur von 25–28 °C im Brutschrank für 3-4 Tage inkubiert, nachdem diese mit Einzelkolonien beimpft worden waren. C-Medium wurde dabei ausschließlich zur Anzucht von *Cmm* nach erfolgter Elektroporation verwendet.

1.3 Konservierung von Bakterienkulturen

- Bakterien einer ü/N-Kultur (Agar-Platte) in ein Schraubdeckelgefäß überführen
- add. 400 µL PS-Puffer, resuspendieren
- add. 600 µL Glycerin, resuspendieren
- Lagerung bei einer Temperatur von – 80 °C

Die Bakterien dieser Kultur sind Jahre lebensfähig.

1.4 Titerbestimmung von Bakterien in Flüssigkultur

Das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur kann durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 580$ nm überprüft werden. Als Referenz diente das jeweilige sterile Nährmedium, in dem die Bakterien kultiviert wurden, bzw. der entsprechende Resuspensionspuffer.

Bei *Escherichia coli* entspricht eine OD₅₈₀ von 0,1 einem Lebendtiter von ca. $2 \cdot 10^7$ Zellen/mL, bei *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* entspricht eine OD₅₈₀ von 0,1 einem Lebendtiter von ca. $1 \cdot 10^8$ Zellen/mL.

1.5 Agardiffusionstest mit *Cmm*

- 3 mL TBY-Weichagar (TBY-Medium mit 6 % Agar)
- mit 5 μ L *Cmm* Suspension, OD₅₈₀ = 6, mischen
- als Toplayer auf TBY-Agar geben
- sterilisierte Papierplättchen (Whatman), Durchmesser 6 mm, mit definierten Mengen an α -Tomatin, gelöst in Na-Citratpuffer 50 mM, pH 4, auf den erkalteten Nährboden legen
- Negativkontrolle: Papierplättchen nur mit Na-Citratpuffer 50 mM, pH 4
- Inkubation: 3 Tage, 26 °C
- Hemmhöfe ausmessen: Höfe um Papierplättchen zeigen die Hemmung des Wachstums durch α -Tomatin an

2. DNA-Isolierung

2.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus *Cmm* (modifiziert nach Hopwood et al., 1985)

Durch eine Lysozymbehandlung der Bakterien im isotonischen Milieu wurden zuerst Protoplasten hergestellt, die anschließend mit Hilfe von Detergenzien lysiert wurden. Nach Entfernung der Proteine (durch Phenol) wurden die Nukleinsäuren mit 2-Propanol/Ethanol konzentriert und entsalzt.

- 5 – 7 mL (ü/N) Bakterienflüssigkultur pelletieren
- Pellet in 500 µL AK I - Lösung (mit Lysozym 8 mg/mL und 200 µL RNaseA 10 mg/mL) resuspendieren
- 60 - 90 min bei 37 °C inkubieren (gelegentlich invertieren)
- add. 250 µL 2 % SDS, vortexen
- add. 250 µL neutrales Phenol, homogenisieren
- 20 min bei 13000 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen
- add. 250 µL CIA, mischen
- 20 min bei 13000 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Oberphase abnehmen und in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- add 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 7,5), mischen
- vorsichtig mit 600 µL 2-Propanol überschichten, nicht mischen
- mit einer sterilen Glaspipette an der Interphase ausgefallene DNA aufwickeln
- Pipette mit der aufgewickelten DNA zuerst in 500 µL 70 % Ethanol, dann in 98 % Ethanol und nochmals in 70 % Ethanol überführen, jeweils 2-3 min stehen lassen
- Pipette mit gewickelter DNA an der Luft trocknen lassen
- Pipette mit gewickelter DNA in ein neues Eppendorfgefäß überführen und die DNA in 100 µL TE lösen
- Lagerung der DNA bei 4 °C

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

HB-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA Klonanalyse (Hopwood et al., 1985)

- Bakterienkultur in ein Eppendorfgefäß überführen
- Zellen mit 200 µL P1 resuspendieren
- add. 200 µL P2, 4-6 x invertieren
- 5 min bei RT inkubieren
- add. 200 µL 4 °C kalten P3, sofort 4-6 x invertieren
- 5 min auf Eis inkubieren
- 20 min bei 13000 rpm zentrifugieren, (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- 600 µL des Überstandes in neues Eppendorfgefäß überführen
- add. 600 µL 2-Propanol, mischen

- 30 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand entfernen
- mit 500 µL 70 % (v/v) Ethanol waschen
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- DNA-Pellet trocknen
- DNA in 20 µL H₂O bidest. oder 1 x TE-Puffer (pH 8,0) resuspendieren
- Lagerung kurzfristig bei 4 °C, langfristig bei -20 °C

Isolierung von Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit

Methode zur Isolierung von sehr reiner Plasmid-DNA

Durchführung nach Qiagen-Handbuch (2001)

- 1,5 mL ü/N-Flüssigkultur 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand entfernen
- Zellpellet in 250 µL Puffer P1 resuspendieren
- add. 250 µL Puffer P2, 4-6 x invertieren
- 5 min bei RT inkubieren
- add. 350 µL Puffer N3, sofort 4-6 x invertieren
- 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- QIAprep-Säule in Collection-Tube einsetzen
- Überstand auf die Säule geben
- 30-60 s bei 13000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- 500 µL Puffer PB auf die Säule geben
- 30-60 s bei 13000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- 750 µL Waschpuffer PE auf die Säule geben
- 30-60 s bei 13000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- nochmal 60 s bei 13000 rpm zentrifugieren, um Waschpuffer vollständig zu entfernen, Durchlauf verwerfen
- Säule in neues Eppendorfgefäß einsetzen
- 50 µL Puffer EB oder bidest. H₂O auf die Mitte der Säule geben, 60 s bei RT inkubieren
- 60 s bei 13000 rpm zentrifugieren, um DNA zu eluieren
- DNA bei -20 °C lagern

3. DNA-Reinigung / Konzentrierung und -Denaturierung

3.1 Alkoholfällung

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten und zum Entfernen kleinerer DNA-Fragmente.

In Anwesenheit von Alkohol und einwertigen Kationen (Na^+) wird der DNA das Hydratwasser entzogen und sie bildet ein Präzipitat, das sich durch Zentrifugation pelletieren lässt. Ethanol wird zur Konzentrierung kleiner Volumina und 2-Propanol zur Konzentrierung großer Volumina eingesetzt.

- 1 Vol. DNA-Lösung
- add. 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat, pH 7,5
- add. 2 Vol. Ethanol (p.a.) oder 1 Vol. 2-Propanol invertieren
- 20 bis 30 min -70°C
- 20 min bei 13000 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand verwerfen
- Pellet mit 500 μL 70 % (v/v) Ethanol waschen
- 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Pellet trocknen und in TE-Puffer (pH 7,5) oder Millipore- H_2O resuspendieren

3.2 Denaturierung (alkalisch) von Plasmid-DNA (Gartemann, 1992)

- 18 μL DNA-Lösung
- add. 2 μL 2 M NaOH, 2 mM EDTA
- 5 min RT
- add. 2 μL 2 M NH_4 -Acetat, pH 4,6; mischen
- add. 75 μL 95 % Ethanol, invertieren
- 20 min -70°C
- 20 min bei 13000 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Pellet mit 200 μL 70% EtOH waschen
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Pellet trocknen
- Pellet in H_2O oder TE resuspendieren

3.3 Aufreinigung von PCR-Produkten mit NucleoSpin Extract II (nach Macherey-Nagel, User manual, April 2004)

- DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausschneiden
- add. 200 µL NT pro 100 mg Gel
- 50 °C, 5-10 min
- Säule in Sammelgefäß stecken, Lösung auf Säule geben
- 1 min, 11000 x g zentrifugieren
- Durchlauf verwerfen
- add. 600 µL NT3
- 1 min, 11000 x g zentrifugieren
- Durchlauf verwerfen
- nochmals 2 min, 11000 x g zentrifugieren, zur Trocknung der Säule
- Durchlauf verwerfen
- Säule in neues Eppendorfgefäß stecken
- 15-50 µL NE auf die Säule geben, inkubieren: 1 min RT
- 1 min, 11000 x g zentrifugieren, um DNA zu eluieren
- Lagerung bei 4 °C

4. Techniken zur Charakterisierung von DNA-Molekülen

4.1 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsspaltungen wurden nach den für jedes Enzym spezifischen vom Hersteller (Firma New England Biolabs) empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Die für jedes Enzym optimalen Reaktionsbedingungen wurden durch die Zugabe der entsprechenden Menge 10fach konzentrierten Reaktionspuffers erreicht.

Hydrolyse von Plasmid-DNA

Volumen des Restriktionsansatzes: 20 µL

- 0,2-0,5 µg DNA (2 µL) in TE-Puffer (pH 7,5) oder Millipore H₂O
- add. 2 µL 10x Reaktionspuffer (1/10 Vol des Gesamtvolumens)
- add. 0,5-1 µL Restriktionsendonuklease

- add. Millipore H₂O bis Gesamtvolumen von 20 µL
- 1-2 h, besser ü/N bei Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms inkubieren
- 20 min bei 70 °C inaktivieren, wenn Hitzeinaktivierung möglich ist

Hydrolyse von Gesamt-DNA

Volumen des Restriktionsansatzes: 50 µL

- 15 µL Gesamt-DNA
- add. 5 µL 10x Reaktionspuffer (1/10 Vol des Gesamtvolumens)
- add. 1-2 µL Restriktionsendonuklease
- add. 29 µL bidest. H₂O
- ü/N bei Temperaturoptimum (25-37 °C) des jeweiligen Enzyms inkubieren
- 20 min bei 70 °C inaktivieren, wenn Hitzeinaktivierung möglich ist

4.2 Agarose-Gelelektrophorese

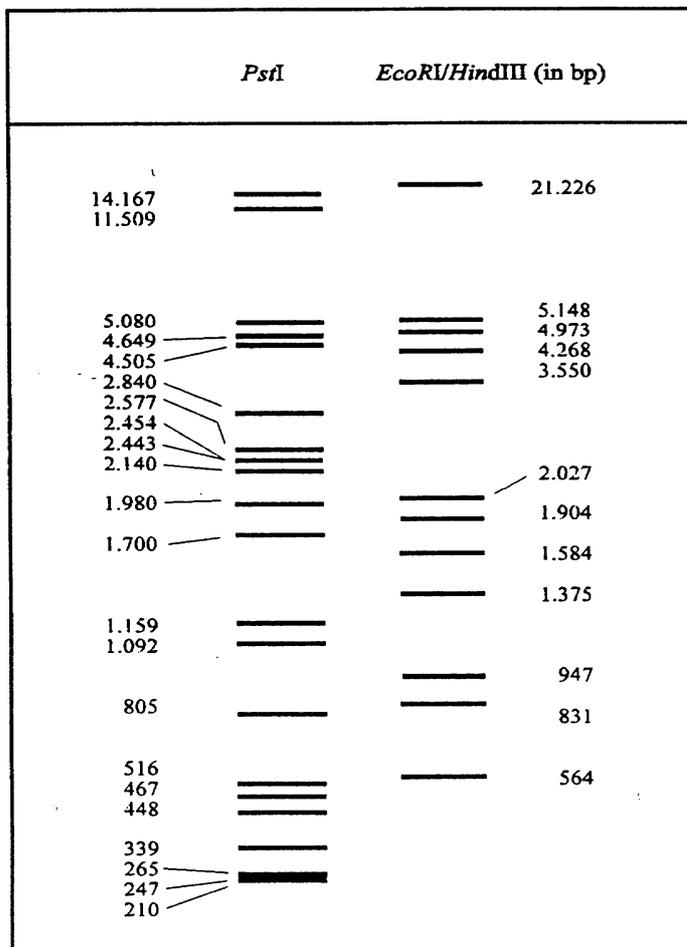
Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung und Charakterisierung von DNA (z. B. nach Isolation oder Restriktion). Aufgrund der negativ geladenen Phosphatreste kann die DNA im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von Größe und Konformation der Moleküle (ss, ds, linear, oc, ccc), der Konzentration der Agarose und der Stärke des elektrischen Feldes. Die verwendete Agarose-Konzentration von 0,5-1,5 % (w/v) richtet sich nach der erwarteten Größe der DNA bzw. der Restriktionsfragmente.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich 0,8%ige Agarosegele verwendet. Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte in TBE-Puffer in entsprechenden Elektrophoresekammern. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Moleküle mit dem interkalierenden und fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid (EtBr) angefärbt und im UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) als Banden sichtbar gemacht.

- 0,8 % Agarose in TBE-Puffer unter Rühren aufkochen
- auf ca. 60 °C abkühlen lassen
- in eine Gelkammer gießen und einen Kamm einsetzen

- nach der Auspolymerisation des Gels (ca. 20 min) in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer einsetzen und den Kamm entfernen
- DNA-Proben mit 2 μ L Gel-Lade-Puffer versetzen
- Geltaschen mit Proben beladen
- Auftrennung bei einer Spannung von 100 bis 130 Volt für 1,5 bis 2,5 h
- Gel nach Beendigung der Elektrophorese 5-10 min mit Ethidiumbromidlösung (1 μ g/mL) anfärben
- Gel in TBE-Puffer entfärben und unter UV- Licht fotografieren

4.3 Bestimmung des Molekulargewichts von DNA-Fragmenten



Die Mobilität von linearen DNA-Fragmenten ist bei der Gelelektrophorese annähernd umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molekulargewichte. Durch Vergleiche mit Mobilitäten bekannter Größenstandards lassen sich so die Größen unbekannter DNA-Fragmente ermitteln. Als Größenstandards wurden *Pst*I-Restriktionsfragmente der DNA des Phagen λ sowie unmarkierte und Digoxigenin-markierte *Eco*RI/*Hind*III-Restriktionsfragmente der DNA des Phagen λ eingesetzt.

Abb. 8: Restriktionsfragmente der DNA des Phagen λ , hydrolysiert mit *Pst*I oder *Eco*RI/*Hind*III als DNA Längen-Marker.

4.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (Maniatis et al., 1982)

Die Konzentration einer wässrigen DNA-Lösung korreliert weitestgehend linear mit ihrer optischen Dichte bei $\lambda = 260$ nm. Zur Bestimmung der Konzentration der DNA wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen das verwendete Lösungsmittel gemessen. Die Reinheit der Probe bestimmt der Quotient OD_{260}/OD_{280} .

Es gelten folgende Standardwerte für doppelsträngige DNA:

$OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Reine DNA liefert einen OD_{260}/OD_{280} - Quotienten von 1,65 – 1,85.

4.5 Sequenzierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Sequenzierung von DNA erfolgte als externe Auftragsarbeit durch das Isotopenlabor der Universität Bielefeld.

5. Klonierung von DNA-Fragmenten

5.1 Isolierung von Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen

Für gezielte Klonierungen sind definierte Restriktionsfragmente erforderlich. Dazu wurde die jeweilige DNA mit Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde nur schwach mit Ethidiumbromid angefärbt und die gewünschte Bande aus dem Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten. Mit einem kommerziellen Gelextraktions-Kit der Fa. Qiagen wurde die DNA aus dem Agarosegel eluiert, um für Ligationen verwendet zu werden.

DNA-Restriktionsfragmentisolierung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit

Durchführung nach Qiagen-Handbuch (2001)

- DNA-Restriktionsfragment aus dem Agarose-Gel ausschneiden
- add. 300 μL Puffer QG pro 100 μg Gel, mischen
- 15 min bei 50 °C inkubieren, alle 3 min mischen
- add. 100 μL 2-Propanol pro 100 μg Gel

- Säule in Sammelgefäß einsetzen
- Lösung auf die Säule geben
- 45-60 s bei 13000 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf), Durchlauf verwerfen
- add. 500 µL Puffer QG
- 45-60 s bei 13000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- add. 500 µL Puffer PB
- 45-60 s bei 13000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- add. 750 µL Puffer PE
- 45-60 s bei 13000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- nochmal 60 s bei 13000 rpm zentrifugieren
- Säule in neues Eppendorfgefäß einsetzen
- 50 µL Puffer EB oder bidest. H₂O in die Mitte der Säule geben
- 60 s bei 13000 rpm zentrifugieren
- DNA-Lagerung bei -20 °C

5.2 Klenow-Auffüllung von 5'-Überhängen (Maniatis et al., 1982)

- 10 µL DNA (bis zu 1 µg in 10 µL)
- add. 1 µL 2 mM dNTPs
- add. 2,5 µL 10x Nick-Translationspuffer (alternativ: Polymerase-Puffer)
- mit H₂O auf 25 µL auffüllen
- add. 0,5 µL Klenow-Fragment
- 15 – 30 min bei 22 °C inkubieren
- Hitzeinaktivierung 10 min, 70 °C

5.3 Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten (Maniatis et al., 1982, modifiziert)

Restriktionsfragmente, die durch die Ligasereaktion miteinander verknüpft werden sollten, wurden nach der Restriktion der DNA und Inaktivierung der

Restriktionsendonuklease im geeigneten Verhältnis gemischt. Das Verhältnis von Insert-DNA zu Vektor-DNA sollte 3:1 betragen.

25 µL Ansatz:

- 20 µl Vektor-DNA/Insert-DNA-Gemisch (1:2 bis 1:3)
- add. 2,5 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer (1/10 Vol.)
- add. 1 µl T4-DNA-Ligase
- add. 1,5 µL bidest. H₂O
- 1,5-2 h bei RT oder ü/N bei 16 °C inkubieren

5.4 Shotgun-Klonierung

Diese Methode der ungezielten Klonierung wurde nur eingesetzt bei der Konstruktion des pDM302/Tom. Dabei entfällt die Auftrennung des Restriktionsansatzes des Vektors in der Elektrophorese und damit die DNA-Extraktion aus dem Agarosegel. Die Ligation erfolgt sofort nach der Restriktionsspaltung des Vektors mit dem zu inserierenden DNA-Fragment.

6. Transformation von Bakterien

Unter Transformation wird die Aufnahme von freier DNA aus dem Medium durch eine Bakterienzelle verstanden. Manche Bakterienspezies verfügen über eine natürliche Kompetenz. *Cmm* und *E. coli* besitzen kein natürliches Transformationssystem. Daher ist eine spezielle Vorbehandlung notwendig, die diesen Bakterien die Aufnahme von DNA aus dem Medium ermöglicht.

Die Elektroporation ist eine Transformationsmethode, bei der durch das Anlegen einer Wechselspannung kurzfristig „Löcher“ in der Zellmembran der Bakterien entstehen, durch die Plasmid-DNA in die Zelle gelangen kann.

6.1 Transformation von *E. coli* nach der CaCl₂-Methode

Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen

(Cohen et al., 1972, modifiziert)

- 0,2 mL ü/N-Flüssigkultur in 20 mL TBY-Medium überimpfen
- bei 37 °C inkubieren bis zu einem Zelltitert von $2 \cdot 10^8$ mL⁻¹
- 5 min bei 6500 rpm zentrifugieren, Überstand entfernen
- alle folgenden Schritte werden bei 0-4 °C durchgeführt, alle Lösungen vorkühlen
- Pellet in 10 mL 100 mM CaCl₂ vorsichtig resuspendieren
- 30 min bei 0 °C inkubieren
- 5 min bei 6500 rpm zentrifugieren
- Überstand entfernen
- Pellet in 2 mL 100 mM CaCl₂ vorsichtig resuspendieren
- 5 min bei 6500 rpm zentrifugieren
- Überstand entfernen
- Pellet in 2 mL 100 mM CaCl₂ / 20 % Glycerin vorsichtig resuspendieren
- Zellen zu 200 µL in vorgekühlten Eppendorfgefäßen aliquotieren
- Lagerung bei -80 °C

Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

(Morrison, 1979)

- 200 µL kompetente *E. coli*-Zellen auf Eis auftauen
- 25 µL des Ligationsansatzes bzw. 5 µL der zu transformierenden Plasmid-DNA zugeben, mischen
- 20 min auf Eis inkubieren
- 3 min bei 42 °C Hitzeschock
- 5 min bei 0 °C inkubieren
- add. 1000 µL TBY-Medium, invertieren
- 45 min bei 37 °C inkubieren
- 150 µL auf eine Nährbodenplatte mit entsprechendem Selektionsmedium ausplattieren
- Restmenge 2,5 min bei 13000 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)

- Überstand entfernen
- Pellet im Rücklauf resuspendieren
- Zellsuspension auf einer weiteren Nährbodenplatte mit entsprechendem Selektionsmedium ausplattieren
- Inkubation ü/N bei 37 °C

6.2 Transformation von *Cmm* durch Elektroporation

Präparation von *Cmm*-Zellen zur Elektroporation

(Kirchner et al., 2001)

- 250 mL flüssiges TBY mit *Cmm* animpfen
- Inkubation bei 25 °C ü/N bis $OD_{580} = 1-1,2$
- mit TBY auf $OD_{580} = 0,3$ verdünnen
- 218,5 mL dieser Verdünnung in neuen Kolben überführen und bei 25 °C bis ca. $OD_{580} = 0,6$ inkubieren (2-2,5 h)
- add. 31,5 mL Glycin (entspricht einer Glycin-Endkonzentration von 2,5 %)
 - alternativ: add. 15,75 mL Glycin und 15,75 mL H₂O (entspricht einer Glycin-Endkonzentration von 1,25 %)
- 2 h bei 25 °C inkubieren
- Zellsuspension in 500 mL-Zentrifugengefäße überführen
- 10 min bei 6000 rpm zentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor A6.9, Firma Kontron)
- Überstand entfernen
- alle folgenden Schritte bei 0-4 °C durchführen, alle Lösungen vorkühlen
- Pellet in 5 mL bidest. H₂O resuspendieren
- Suspension in 40 mL-Zentrifugengefäße überführen
- add. 25 mL bidest. H₂O, mischen
- 10 min bei 8000 rpm zentrifugieren (Rotor A8.24), Überstand entfernen
- Pellet in 1 mL bidest. H₂O resuspendieren
- add. 25 mL bidest. H₂O
- 10 min bei 8000 rpm zentrifugieren (Rotor A8.24),
- Überstand entfernen
- Waschvorgang zweimal mit 10 % Glycerin wiederholen
- Überstand entfernen

- Pellet in 1 mL 15 % Glycerin resuspendieren
- Zellen zu 100 μ L in vorgekühlten Eppendorfgefäßen aliquotieren
- Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

Elektroporation präparierter *Cmm*-Zellen mit Plasmid-DNA

(Kirchner et al., 2001)

Einstellungen des Gene Pulser (Firma Bio-RAD): Kapazität: 25 μ F
Parallelwiderstand: 600 Ω
Spannung: 12,5 kV/cm

- pro Elektroporationsansatz ein Eppendorfgefäß mit 400 μ L SB-Medium vorbereiten
- DNA und Elektroporations-Küvetten (d = 2 mm) auf Eis stellen
- 100 μ L präparierte *Cmm*-Zellen auf Eis auftauen
- add. 5 μ L DNA
- Suspension in Küvette geben
- Küvette abtrocknen, in die Apparatur stellen und Puls auslösen
- sofort 150 μ L SB-Medium in die Küvette geben, mischen
- Suspension in das Eppendorfgefäß mit dem restlichen SB-Medium überführen
- 3 h bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubieren (Regeneration)
- gleichmäßig auf drei Nährbodenplatten mit SB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattieren
- Inkubation 4-5 Tage bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

7. Southern Hybridisierung

Bei der Southern Hybridisierung wird die Eigenschaft zweier komplementärer DNA-Einzelstränge genutzt, sich über spezifische Basenpaarungen zu einem Doppelstrang zusammenzulagern (Hybridisierung). DNA-Restriktionsfragmente wurden nach elektrophoretischer Auftrennung zu Einzelsträngen denaturiert, auf eine Nylonmembran transferiert und dort fixiert. Eine spezifische markierte einzelsträngige DNA-Probe (Hybridisierungssonde) kann mit komplementären Nukleotidsequenzen auf der Membran

hybridisieren. Die entsprechenden Restriktionsfragmente auf der Membran können anschließend über die Markierung der Hybridisierungssonde detektiert werden.

7.1 Nichtradioaktive Markierung der Hybridisierungssonde durch Random-Priming mit Digoxigenin-dUTP

(DIG DNA Labeling Kit der Firma Roche Diagnostics, Mannheim)

- 0,5-3 µg DNA in 15 µL bidest. H₂O verdünnen
- 10 min bei 100 °C inkubieren (Denaturierung)
- sofort auf Eis stellen
- add. 2 µL Hexanucleotid-Mix
- add. 2 µL dNTP-Mischung (je 1 mM dATP, dCTP, dGTP; 0,65 mM dTTP; 0,35 mM Dig-UTP)
- add. 1 µL Klenow-Polymerase
- 1-24 h bei 37 °C inkubieren
- 10 min 65 °C
- add. 2 µL 3 M Na-Acetat (pH 7,5) und 75 µL EtOH
- 2 Std. -20 °C
- 15 min 13000 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Pellet mit 50 µL 70 % EtOH waschen
- Pellet trocknen
- resuspendieren in 50 µL TE
- add. 5 mL Prähybridisierungslösung; mischen
- Lagerung bei -20 °C
- Sonde vor jedem Gebrauch 10 min bei 100 °C aufkochen

7.2 Transfer der DNA auf eine Nylonmembran durch Kapillarblotting

- restringierte DNA-Proben durch Agarose-Gelelektrophorese auftrennen
- DNA mit Ethidiumbromid-Lösung anfärben, unter UV-Licht fotografieren, Gel entfärben
- Depurinierungslösung auf das Agarosegel geben
- 5 min inkubieren, abgießen
- Denaturierungslösung auf das Agarosegel geben

- 10 min inkubieren, abgießen, Inkubierungsschritt wiederholen
- Neutralisierungslösung auf das Agarosegel geben
- 15 min inkubieren, abgießen, Inkubierungsschritt wiederholen
- Blot wie folgt von unten nach oben aufbauen, dabei alle verwendeten Elemente der Größe des Agarosegels anpassen:
 - beginnen mit einer Lage Whatmanpapier (mit Neutralisierungslösung angefeuchtet)
 - Agarosegel blasenfrei auflegen
 - Nylonmembran blasenfrei auflegen
 - eine Lage Whatmanpapier (mit Neutralisierungslösung angefeuchtet)
 - 4-5 Lagen Whatmanpapier (trocken)
 - ca. 10 cm zugeschnittene Papier-Einmaltücher
 - Aufbau von oben mit einem Gewicht beschweren
- Transfer der DNA ü/N
- DNA mit der Nylonmembran 3 min unter UV-Licht ($\lambda=302$ nm) quervernetzen

7.3 Prähybridisierung und Hybridisierung unter stringenten Bedingungen

Durch die Prähybridisierung der Membran sollen unspezifische Hybridisierungsreaktionen vermieden werden. Bei der Hybridisierung lagert sich die Digoxigenin-markierte DNA (Hybridisierungssonde) an die homologen Sequenzen der einzelsträngigen DNA auf der Nylonmembran an. Das Waschen der Membran nach der Hybridisierungsreaktion ist notwendig, um unspezifisch gebundene Proben-DNA von der Membran abzulösen.

Der Hybridisierungszylinder bzw. die Hybridisierungsschalen wurden während der gesamten Hybridisierung und Nachweisreaktion bewegt, um eine gleichmäßige Benetzung der Membran zu gewährleisten.

- Nylonmembran mit der DNA-Seite nach innen in einen Hybridisierungszylinder überführen
- add. 20 mL DIG-Prähybridisierungslösung
- mindestens 2 h bei 68 °C im Hybridisierungsofen inkubieren (in einer Rollvorrichtung)
- Digoxigenin-markierte Hybridisierungssonde 10 min bei 100 °C denaturieren
- Prähybridisierungslösung gegen Hybridisierungssonde austauschen
- ü/N bei 68 °C im Hybridisierungsofen inkubieren (in einer Rollvorrichtung)

7.4 Immunologische Nachweisreaktion unter stringenten Bedingungen

- Hybridisierungssonde abgießen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern
- Membran zweimal 5 min mit jeweils 100 mL Wash I bei RT waschen (in einer Rollvorrichtung), Lösung abgießen
- Membran zweimal 15 min mit jeweils 100 mL Wash II bei $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ waschen (in einer Rollvorrichtung), Lösung abgießen
- Membran in eine Hybridisierungsschale überführen
- 1 min mit 40 mL DIG-Puffer 1 bei RT inkubieren (auf einem Schüttler), Lösung abgießen
- 30 min mit 40 mL DIG-Puffer 2 bei RT inkubieren (auf einem Schüttler), Lösung dekantieren
- 30 min mit Antikörper-Konjugat (1:10000 in 20 mL DIG-Puffer 2,2 μL) bei RT inkubieren (auf einem Schüttler)
- zweimal 15 min mit jeweils 100 mL DIG-Waschpuffer bei RT inkubieren (auf einem Schüttler), Lösung abgießen
- Membran 1 min in 40 mL DIG-Puffer 3 inkubieren (auf einem Schüttler), Lösung abgießen
- add. Färbelösung (10 mL Puffer 3 + 50 μL NBT/BCIP)
- im Dunkeln inkubieren, bis Farbreaktionen auftreten
- Reaktion durch bidest. H_2O stoppen
- Membran trocknen und im Dunkeln aufbewahren

8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis, 1986)

8.1 DNA-Amplifikation von *tomA*

Alle PCR Amplifikationen wurden mit dem Proof Start Polymerase Kit (Fa. Qiagen, Hilden) geringfügig modifiziert nach den Anweisungen des Herstellers unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Reaktionsansatz (50 μ L):	1 μ L	Polymerase
	2 μ L	Primerpaar
	5 μ L	10x Puffer
	10 μ L	Q-Solution
	1,5 μ L	dNTPs
	29 μ L	H ₂ O
	1,5 μ L	DNA

- Als Template-DNA ungespaltene, verdünnte (1:20) Gesamt-DNA von *Cmm* einsetzen.
- Reaktionsansatz mit 25 μ L PCR-Öl beschichten, um ein Verdampfen zu vermeiden
- Reaktionsansätze in den PCR-Cycler geben und folgendes Programm durchführen:

Zyklen	Dauer [min]	Temperatur [°C]
1	3	94
35	1	94
	1	64
	1,5	72
1	10	72

- nach Reaktionsende PCR-Produkt in der Agarosegelelektrophorese überprüfen

9. Proteinbiochemische Methoden

9.1 Induktion von *Cmm* durch α -Tomatin

- 20 mL TBY im Erlenmeyerkolben mit einer Kolonie eines entsprechenden *Cmm*-Stammes animpfen und über Nacht bei 28 °C im Luftschüttler inkubieren
- 100 mL TBY mit der Übernachtskultur auf OD₅₈₀ 0,7-0,9 einstellen
- Zugabe von 200 μ L α -Tomatin-Lösung (10 mM)
- Kultur für 6 Stunden bei 28 °C im Luftschüttler inkubieren
- Zellen durch Zentrifugation bei 4000 g, 4 min, 4 °C, pelletieren
- Pellet resuspendieren in 2 mL PS-Puffer und zur Gewinnung des Proteinrohextraktes mit der French Press aufschließen
- Kulturüberstand durch Dialyse gegen festes PEG konzentrieren

9.2 Isolation von *Cmm*-Gesamtprotein mit der French Press

- resuspendierte Bakterien-Pellet-Suspension nach α -Tomatin-Induktion in die bei 4 °C vorgekühlte 3/8-Zelle (AMINCON) geben und mechanisch bei 900 psi in der French Press aufschließen
- Durchgang dreimal wiederholen
- zentrifugieren: 10.000 x g, 30 min
- vom klaren Überstand Proteinkonzentration (BCA-Methode) bestimmen
- Proteinprobe bei - 18 °C lagern

9.3 Konzentrierung von *Cmm* Kulturüberstand

- Zellfreier Kulturüberstand nach α -Tomatin-Induktion in Dialyse-Schläuche (10.000-Da cutoff) überführen
- Dialyse über Nacht gegen festes PEG 40.000 (Serva, Heidelberg) bei 4 °C
- nach Ende restliches, anhaftendes festes PEG mit bidest. H₂O abwaschen
- 1-2 h Dialyse gegen bidest. H₂O, 4 °C
- konzentrierte Kulturüberstände aus den Schläuchen in Eppendorfgläser überführen
- Proteinkonzentration bestimmen (BCA-Methode)
- Proteinprobe bei - 18 °C lagern

9.4 Anzucht und Induktion von *E. coli* zur Überexpression von TomA

Verschiedene Amplifikate von *tomA* wurden in unterschiedliche pET-Vektoren (Fa. Novagen) kloniert und in dem *E. coli* Stamm BL21(DE3) überexprimiert.

- 50 mL TBY im Erlenmeyerkolben mit einer Kolonie eines entsprechenden *E. coli*-Stammes animpfen und über Nacht bei 37 °C im Luftschüttler inkubieren
- 350 mL TBY mit der Übernachtskultur auf OD₅₈₀ = 0,5 einstellen
- Kultur mit 1 mM IPTG induzieren
- Kultur für 3-4 Stunden bei 37 °C im Luftschüttler inkubieren
- stündlich jeweils 20 μ L Probe für die SDS-PAGE entnehmen
- Zellen durch Zentrifugation bei 5800 rpm, 4 °C, pelletieren
- Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -18 °C lagern.

9.5 Kompartimenttest

Der Kompartimenttest dient zur Überprüfung der Lokalisation der rekombinant exprimierten Proteine in *E. coli*.

- je 1 mL Probe vor und nach der Induktion entnehmen
- 3 min, 13000 rpm (Tischzentrifuge, Fa. Eppendorf)
- Kulturüberstand abgießen und für die Kontrolle im SDS-PAGE aufheben
- Pellet in 50 µL Zelllysepuffer (mit 2 mg/mL Lysozym) resuspendieren
- 10 min auf Eis inkubieren
- 1 min, 13000 rpm
- Überstand (enthält periplasmatische Proteinfraction) für SDS-PAGE aufheben
- Pellet in 50 µL Waschpuffer resuspendieren
- 2 x einfrieren (-18 °C) und auftauen
- 7 min, 13000 rpm
- Überstand (enthält zytoplasmatische Proteinfraction) für SDS-PAGE aufheben
- Pellet (enthält Inclusion Bodies) für SDS-PAGE aufheben
- je 15 µL der einzelnen Proteinfractionen und des nativen Kulturüberstandes mit 5 µL Laemmli-Puffer mischen und komplett für SDS-PAGE einsetzen

9.6 Isolation von *E. coli*-Gesamtprotein zum direkten Einsatz im Enzymtest

- Bakterien-Pellet nach IPTG-Induktion in 5 mL PS-Puffer resuspendieren
- Suspension in die bei 4 °C vorgekühlte 3/8-Zelle (AMINCON) geben und mechanisch bei 900 psi in der French Press aufschließen
- Durchgang dreimal wiederholen
- zentrifugieren: 10.000 x g, 30 min
- vom klaren Überstand Proteinkonzentration bestimmen (BCA-Methode)
- Proteinprobe bei - 18 °C lagern

9.7 Konzentrierung von *E. coli* Kulturüberstand zum direkten Einsatz im Enzymtest

- Zellfreier Kulturüberstand nach IPTG-Induktion in Dialyse-Schläuche (10.000 -Da cutoff) überführen

- Dialyse über Nacht gegen festes PEG 40.000 (Serva, Heidelberg) bei 4 °C
- nach Ende restliches, anhaftendes festes PEG mit bidest. H₂O abwaschen
- 1-2 h Dialyse gegen bidest. H₂O, 4 °C
- konzentrierte Kulturüberstände aus den Schläuchen in Eppendorfgefäße überführen
- Proteinkonzentration bestimmen (BCA-Methode)
- Proteinprobe bei - 18 °C lagern

9.8 Isolierung von Inclusion Bodies mit der French press

- eingefrorenes Zellpellet auf Eis auftauen, in 5 mL LSB 1 resuspendieren
- Zellsuspension in der bei 4 °C vorgekühlten 3/8-Zelle bei 900 psi aufschließen
- Durchgang dreimal wiederholen
- Suspension mit LSB 1 auf 20 mL auffüllen, invertieren,
- zentrifugieren bei 12000 g, 30 min
- Pellet resuspendieren in 15 mL LSB 2
- zentrifugieren bei 12000 g, 30 min
- Pellets 2x waschen in LSB 3
- Pellet (Inclusion Bodies) sofort zur Aufreinigung durch Nickel-Affinitätschromatografie verwenden oder bei -18 °C lagern

9.9 Aufreinigung über Nickel-Affinitätschromatografie unter denaturierenden Bedingungen

- Pellet (Inclusion Bodies) in 4 mL Puffer QiaB (+ 20 mM Imidazol) aufnehmen
- Inkubation auf dem Roller bei RT für 30 min
- 3000 rpm, 5 min
- 400 µL Ni-NTA Superflow (Fa. Qiagen) zum Überstand geben
- Inkubation auf dem Roller bei 4 °C für 60 min
- alle weiteren Schritte in der Kühlkammer bei 4 °C durchführen
- Chromatografie-Röhrchen mit Fritte vorbereiten, mehrere Male mit bidest. H₂O spülen
- Zellysat-Nickel-NTA-Superflow-Gemisch in Chromatografieröhrchen überführen
- abwarten bis sich Chromatografiematerial auf der Fritte abgesetzt hat

- Durchfluss für SDS-PAGE Analyse auffangen
- Säule 10 x mit 1 mL Puffer QiaB (+ 20 mM Imidazol) waschen
- 3., 6. und 9. Waschfraktion für SDS-PAGE Analyse auffangen
- Elution 5 x mit 400 µL Puffer QiaB (+ 250 mM Imidazol)
- Elutionsfraktionen durch SDS-PAGE überprüfen, Proteinkonzentration mit Nano-Drop quantifizieren, Fraktionen mit höchster Reinheit und mit höchstem Proteingehalt zur Renaturierungsdialyse weiterverwenden

9.10 Renaturierung durch Dialyse

Ausgangspunkt für die Renaturierung sind in Puffer QiaB (+ 250 mM Imidazol) über Nickel-Affinitätschromatografie gereinigte Proteine. Die Renaturierung erfolgt mit dem Renaturierungsreagenz Roti-Fold® (Fa. Roth) nach Angabe des Herstellers.

- 910 µL der Proteinfraction werden mit 90 µL Roti-Fold (8x) versetzt
- Dialyse gegen 200 mL Roti-Fold (1x) bei 4 °C für mind. 4 Std.
- Weitere schrittweise Verdünnung der Dialysierlösung jeweils in 2 Std. Intervallen:
- Zugabe von 50 mL PBS zur Dialysierlösung
- Zugabe von 150 mL PBS zur Dialysierlösung
- 200 mL der Dialysierlösung mischen mit 200 mL PBS
- 200 mL der Dialysierlösung mischen mit 200 mL PBS
- Dialyse gegen 200 mL PBS

9.11 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinbestimmung mit BCA-Protein-Assay Reagent

(Pierce, Rockford, IL)

- Arbeitsreagenz: 1 Vol. Reagenz B mit 50 Vol. Reagenz A mischen
- 1 ml Arbeitsreagenz in der Küvette mit 50 µl Probe mischen
- Inkubation 2 h bei RT, 30 min bei 37 °C oder 30 min bei 60 °C
- Reaktion auf Eis abstoppen
- Messung der Extinktion bei 562 nm gegen bidest. H₂O
- Blindwert: 1 ml Arbeitsreagenz mit 50 µl bidest. H₂O

Eichkurve:

Aus einer BSA-Stammlösung (10 mg/ml) werden Proteinverdünnungen mit 2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml und 0,025 mg/ml hergestellt. Die Proteinbestimmung erfolgt analog der Probenbehandlung. Die Konzentration wird gegen die Extinktion bei 562 nm aufgetragen.

Proteinbestimmung mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer

(Fa. NanoDrop Technologies, Wilmington, USA)

Durchführung nach Angabe des Herstellers

- Gerät mit 2 µL bidest. H₂O normieren
- 2 µL der Pufferlösung auf den unteren Probenträger pipettieren, Probenarm schließen, Nullabgleich bei A 280 nm vornehmen, Probenträger reinigen
- auf die gleiche Weise 2 µL der Proteinprobe gegen den Blindwert bei A 280 nm vermessen
- Proteinkonzentration ablesen
- Probenträger und Probenarm reinigen

9.12 Konservierung von isolierten Proteinen

ausgehend von 500 µL Proteinlösung:

- Proteingehalt bestimmen (NanoDrop)
- add. 490 µL Glycerin
- add. 10 µL Dithiothreitol (100 mM)
- mischen, Lagerung bei -18 °C

9.13 SDS-PAGE

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(Laemmli, 1970)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Bei der Probenbehandlung nach Laemmli

bindet Natriumdodecylsulfat (SDS) an die Proteine. Durch Hitzebehandlung werden Wasserstoffbrücken gelöst und gleichzeitig durch Molekülstreckung die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins aufgebrochen. Durch optionalen Zusatz von β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol zum Probenpuffer können Disulfidbrücken reduziert werden. Die Probenbehandlung führt zu einer ellipsoiden Form der Proteine. Eine sehr gute Proteinauftrennung wird durch Verwendung eines Tris-Glycin Puffersystem bei der Gelelektrophorese erreicht.

Präparation eines Minigels:

	17,5% Trenngel	5 % Sammelgel
30 % Acrylamid	4,38 mL	0,42 mL
1 % bis - Acrylamid	0,55 mL	0,33 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,7	1,68 mL	-
1 M Tris-HCl, pH 6,8	-	0,31 mL
bidest. H ₂ O	0,80 mL	1,43 mL
10 % SDS	100 μ L	30 μ L
10 % APS	50 μ L	17 μ L
TEMED	10 μ L	5 μ L

- gereinigte Glasplatten mit Ethanol entfetten
- Glasplatten mit Spacer zusammensetzen, mit heißer 1 % Agarose abdichten, Kamm einsetzen
- Trenngel sofort nach Zugabe von APS und TEMED gießen, bis ca. 1 cm unterhalb des Kammes
- vorsichtig mit ca. 0,5 mL 2-Propanol überschichten
- nach dem Auspolymerisieren (ca. 20 min) 2-Propanol sorgfältig abgießen
- sofort nach Zugabe von APS und TEMED Sammelgel gießen
- nach dem Auspolymerisieren das Gel direkt verwenden bzw. in feuchtem Milieu bei 4 °C bis zu mehreren Tagen lagerfähig
- unteren Spacer entfernen, Glasplatten mit Gel in die Elektrophoresekammer einsetzen
- 1x RB-Puffer in die Kammer einfüllen, Kamm vorsichtig ziehen, Luftblasen unterhalb des Gels entfernen

- Proben 4:1 mit Laemmli-Puffer mischen, 5-8 min bei 98 °C denaturieren, Proben kurz zentrifugieren und in die Probentaschen des auspolymerisierten Gels pipettieren
- Elektrophoreselauf ca. 2 h bei 20 mA

Nach dem Elektrophoreselauf wird das Gel angefärbt (Coomassie- oder Silberfärbung), oder für den Westernblot weiterverwendet.

Proteinfärbung nach Coomassie

- Gel ca. 60 min in Coomassie-Färbelösung auf dem Schüttler inkubieren
- Färbelösung abgießen, Gel mit H₂O abspülen
- in Entfärber auf dem Schüttler ü/N entfärben, bis der Hintergrund nahezu farblos ist

Silberfärbung von Proteingelen

Die Silberfärbung ist eine sehr empfindliche Methode zur Anfärbung von Proteingelen. Es wird nur ca. ¼ Vol. der für eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung verwendeten Probe und des Proteinmarkers benötigt.

- SDS-Gel in eine Schale geben und kurz mit bidest. H₂O abspülen
- 15 min in Fixierer auf dem Schüttler inkubieren, abgießen
- 3 x 10 min in 50 % Ethanol auf dem Schüttler inkubieren, abgießen
- 1 min in 0,02 % Na₂S₂O₃ inkubieren, abgießen
- 3 x 20 s mit bidest. H₂O waschen
- 15 min in AgNO₃-Färbelösung auf dem Schüttler inkubieren, abgießen
- 20 s in bidest. H₂O waschen
- ca. 1 min bis zur gewünschten Färbung im Entwickler schütteln
- kurz mit bidest. H₂O waschen (optional)
- ca. 10 min in Stopplösung auf dem Schüttler inkubieren

Konservierung von Proteingelen

- 5 min in bidest. H₂O auf dem Schüttler inkubieren, abgießen
- 20 min in Konservierungspuffer auf dem Schüttler inkubieren, abgießen
- Gel luftblasenfrei zwischen eingeweichte Einmachhaut in einen Kunststoffrahmen einspannen und ca. 48 h trocknen

9.14 Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen

Die negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld gemäß ihrem relativen Molekulargewicht zur Anode. Durch Auftrag eines Markers, der eine Mischung von Proteinen bekannter Molekulargewichte darstellt, ist eine Abschätzung des Proteinmolekulargewichtes möglich. In dieser Arbeit wurde der SeeBlue® Pre-stained Standard (Fa. Invitrogen) verwendet.

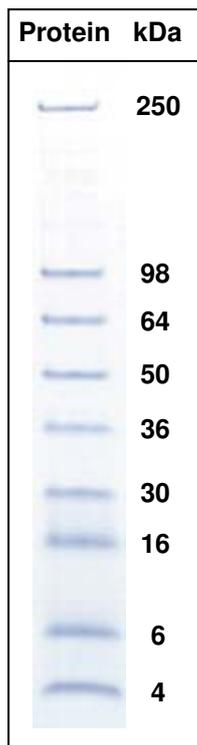


Abb. 9: Proteinmarker „SeeBlue® Pre-Stained Standard“ (Fa. Invitrogen), Proteinbanden mit apperentem Molekulargewicht bei Verwendung eines Tris-Glycin-Puffers.

9.15 Westernblot

Semi Dry Fast Blot mit Elektrobloetter

- SDS-PAGE nach Ende der Elektrophorese kurz in bidest. H₂O spülen
- benötigte Filterpapiere und Nitrozellulose auf die Größe des Gels schneiden
- auf die untere Blot-Apparatur folgende Schichtung aufbauen:
 - 2 Filterpapiere mit 300 mM Tris, 10 % MeOH (Puffer 1)
 - 1 Filterpapier mit 30 mM Tris, 10 % MeOH (Puffer 2)
 - 1 Nitrozellulose mit bidest. H₂O befeuchtet
 - SDS-Gel aus bidest. H₂O
 - 3 Filterpapiere mit 25 mM Tris, 10 % MeOH, 40 mM Capronsäure (Puffer 3)
- mit einer Glaspipette über die Schichtung rollen, um Luftblasen zwischen den Komponenten zu entfernen
- obere Blotplatte auflegen, mit einem mit Eis gefüllten Becherglas beschweren
- Transfer für ein Minigel: 100 mA für 60 min

9.16 Ponceaufärbung und Immunologischer Nachweis

- Nitrozellulose nach Beendigung des Semi Dry Fast Blot ein- bis zweimal in bidest. H₂O waschen
- Färbung mit Ponceaurot:
 - 5 mL Ponceau-Lösung (Sigma) in 95 mL bidest. H₂O mischen
 - Nitrozellulosemembran für ein bis zwei Minuten mit Ponceaurot anfärben
- danach kurz mit bidest. H₂O waschen.
- Proteinbanden sind kräftig bis zart rosa gefärbt. Die Markerbanden können mit einem stumpfen Bleistift markiert werden, die Nitrozellulose kann, zwischen 2 Folien, kopiert oder gescannt werden.
- zum Entfärben 5 mL TRIS Base in 95 mL H₂O mischen, darin die Membran für 2-5 Minuten entfärben, danach kurz in bidest. H₂O spülen
- Absättigung/Prähybridisierung: 5 % Milchpulver in PBS, 4 °C, ü/N
- Lösung abgießen, danach 1-2 mal mit bidest. H₂O spülen
- Membran äquilibrieren: 0,5 % Milchpulver in PBS, 1 min, 4 °C

- 1. Antikörper (Anti-Tom-IgG) in 0,5 % Milchpulver in PBS auf die Membran geben, 4 °C, ü/N, Verdünnung 1:5000.
- Antikörperlösung abnehmen und Nitrozellulosemembran waschen (jeweils 10 min, RT):
 - 3x waschen mit 0,5 % Milchpulver in PBS, danach
 - 2x waschen mit 0,5 % Milchpulver in TBS
- 2. Antikörper (Anti-Rabbit-IgG gekoppelt mit Peroxidase) in 0,5 % Milchpulver in TBS auf die Membran geben, 1 h, RT, Verdünnung 1:3000
- Antikörperlösung abnehmen und Nitrozellulosemembran waschen (jeweils 10 min, RT):
 - 2x waschen mit 0,5 % Milchpulver in TBS, Tween 0,02 % danach
 - 2x waschen mit TBS

9.17 ECL (Enhanced Chemilumineszens) Nachweis

(Firma Roche)

- Farbillumineszenzlösung ansetzen: 300 µL Reagenz 1, 300 µL Reagenz 2 und 300 µL H₂O mischen
- in der Dunkelkammer:
- auf die Membran 200 µL Farbillumineszenzlösung geben, zwischen zwei Folien legen.
- Röntgenfilm (Fa. Amersham) auflegen für 1 min (bzw. 30 s) in einer lichtdichten Kassette exponieren
- Filmentwicklung: Membran nacheinander in Entwickler, Stopplösung, Fixierer und bidest. H₂O geben

9.18 Enzymtests

Standard Enzymtest zur Hydrolyse von α -Tomatin mit *Cmm* oder *E. coli* Proteinrohextrakt oder konzentrierten Kulturüberständen.

20 μ L α -Tomatin Stammlösung (10 mM)
20 μ L Natriumacetat, 0,2 M, pH 5,5
500 μ g Proteinrohextrakt bzw. konz. Kulturüberstand
2 μ L dTT, 100 mM
add. H₂O

Summe: 200 μ L

Inkubation: 22 h, 32 °C

Standard Enzymtest zur Hydrolyse von α -Tomatin mit in *E. coli* überexprimierten, aufgereinigten Proteinproben.

40 μ L α -Tomatin Stammlösung
20 μ L Natriumacetat, pH 5,5
20 μ L Proteinlösung
8 μ L dTT, 100mM
112 μ L H₂O

Summe: 200 μ L

Inkubation: 1 h, 32 °C

Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte über Dünnschichtchromatografie oder mit der 3,5-DNS-Methode.

9.19 Dünnschichtchromatografie der Reaktionsprodukte

Vorbereitung der Proben (nach Ende der Inkubationszeit des Enzymtests):

- 72 °C, 10 min zur Inaktivierung des Enzyms
- mit einer heißen Nadel drei Löcher in den Deckel des Eppendorfgefäßes bohren

- in der Speed Vac bis zur Trockene vakuumtrocknen
- Rückstand in 80 µL Methanol resuspendieren
- 3 min, 13000 rpm, (Tischzentrifuge Fa. Eppendorf)
- Probe mittels Dünnschichtchromatografie auftrennen

Auftrennung der Reaktionsprodukte in der Dünnschichtchromatografie

- 20 µL der in Methanol resuspendierten Probe auf Kieselgel 60 DC-Platten auftragen
- Standard α -Tomatin/Tomatidin 1mM auftragen
- mit dem Laufmittel aus Ethylacetat, Methanol, Essigsäure, H₂O (30:20:10:1) auftrennen
- am Ende des Laufs, Lösemittelfront mit Bleistift markieren
- DC-Platte trocknen lassen
- mit 50 % H₂SO₄ dünn besprühen
- 10-20 min bei 110 °C entwickeln

α -Tomatin erscheint als schwarzer Spot in der Nähe des Startpunktes, Tomatidin erscheint als dunkelgrüner Spot in der Nähe der Lösungsmittelfront.

9.20 3,5-DNS-Methode zur Bestimmung der Menge an reduzierenden Zuckern in einer Lösung

- 200 µL 3,5 DNS-Reagenz zu 200 µL Probe geben, mischen
- 10 min, 100°C
- auf Raumtemperatur abkühlen
- 600 µL H₂O zugeben
- Absorption bei 520 nm gegen Blindwert bestimmen

9.21 Präparation löslichen Xylans

- Xylan, Oat Spelts, Firma SIGMA, X-0627
- 10 g Xylan resuspendieren in 200 mL H₂O

- pH 10 einstellen mit NaOH
- 1h, RT rühren
- zentrifugieren, 10000 x g, 10 min
- Überstand neutralisieren, mit Essigsäure
- Überstand danach lyophilisieren

9.22 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Analysen wurden am Lehrstuhl für Bioorganische und Organische Chemie von Prof. Sewald an der Universität Bielefeld durchgeführt. Die Spektren wurden mit einer Voyager-DE BioSpectrometry Workstation (Fa. Applied Biosystems) mit einem 1.20 m Flugrohr im Positivmodus aufgenommen. Die Ionisierung erfolgte mit einem LSI-Stickstoff-Laser ($\lambda = 337$ nm, Pulsbreite: 3 ns, Wiederholungsrate: 3 Hz), Beschleunigungsspannung: 24 kV. Als Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure verwendet. Die Kalibrierung erfolgte mit Polyethylenglykol als externen Standard auf demselben Träger.

10. Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen TomA

10.1 Antigengewinnung und Erzeugung des polyklonalen Antikörpers

Zur Gewinnung des Antigens für einen polyklonalen Antikörper gegen die rekombinante Tomatinase wurde Tom16_E in *E. coli* überexprimiert, denaturiert über Nickelaffinitätschromatografie aufgereinigt, wieder renaturiert, aufkonzentriert und dann zur Immunisierung eines Kaninchens als Auftragsarbeit an die Firma Pineda Antikörperservice, Berlin übersandt. Nachdem mehrere Präimmunseren verschiedener Versuchstiere in einem Western Blot vorab getestet wurden (Daten nicht gezeigt), wurde ein geeignetes Tier ausgewählt und die Immunreaktion des Tieres über die Dauer von drei Monaten durch wiederholte Proteinapplikationen stimuliert. Die Immunisierung des Tieres verlief nach folgendem Infektionsschema:

1. Tag Primärimmunisierung, Applikation: intradermal mit „Freund's complete adjuvant“
20. Tag 1. Boost, Applikation: subcutan mit “Freund's incomplete adjuvant”

30. Tag 2. Boost, Applikation: subcutan mit "Freund's incomplete adjuvant"
40. Tag 3. Boost, Applikation: subcutan mit "Freund's incomplete adjuvant"
61. Tag 1. Blutentnahme, 4. Boost
75. Tag, 5. Boost
90. Tag, Blutentnahme

Nach Beendigung der Immunstimulierung wurde die gesamte IgG-Fraktion durch die Firma Pineda gereinigt. Dazu wurde nochmals überexprimiertes, aufgereinigtes, renaturiertes Protein Tom16_E zur Verfügung gestellt, welches über Immunoaffinitätschromatografie dazu verwendet wurde, monospezifische IgG-Antikörper aus der IgG-Gesamtfraktion zu isolieren. Die gereinigten Antikörper sowie der hergestellte Affinitätsträger wurden in Puffer-Lösung mit 0,02 % NaN₃ bzw. Thimerosal als Präservativ geliefert.

11. Isolierung der nativen Tomatinase aus *Cmm*

(modifiziert nach: Harlow, 1999)

11.1 Kopplung des polyklonalen Antikörpers an Protein A Sepharose

- 1 mL Protein A Sepharose zentrifugieren, 2 min, 3000 x g
- Überstand abpipettieren
- add. 0,5 mL PBS, vortexen
- zentrifugieren, 2 min, 3000 x g
- Überstand abpipettieren
- add. 1 mL PBS, vortexen
- zentrifugieren, 2 min, 3000 x g
- Überstand quantitativ entfernen
- auffüllen mit PBS auf ca. 1 mL, resuspendieren
- in 12 mL Schraubdeckelröhrchen überführen
- add. 3,3 mL Antikörper-Lösung (entspricht 2 mg Antikörper)
- add. 5,7 mL PBS
- Inkubation auf einer Rollvorrichtung, 1 h, RT
- zentrifugieren, 2 min, 3000 x g

- Überstand abpipettieren
- 2 x waschen mit jeweils 10 mL Na-Borat (0,2 M; pH 9,0)
- Überstand quantitativ entfernen
- mit Na-Borat (0,2 M; pH 9,0) auf 10 mL auffüllen, resuspendieren
- add. 51,8 mg Dimethylpimelimidat (entspricht 20 mM Endkonzentration)
- Inkubation auf einer Rollvorrichtung, 30 min, RT
- Reaktion stoppen durch Waschen der Protein A Sepharose mit Ethanolamin (0,2 M; pH 8,0)
- resuspendieren in 10 mL Ethanolamin (0,2 M; pH 8,0)
- Inkubation auf einer Rollvorrichtung, 2 h, RT
- Protein A Sepharose 1 x mit PBS waschen
- zur Konservierung resuspendieren in 0,01 % Thiomersal in PBS

11.2 Reinigung der nativen Tomatinase

- mit Antikörper gekoppelte Protein A Sepharose in geeignetes Chromatografiesäulengefäß geben
- gekoppelte Protein A Sepharose mit 20 mL PBS waschen
- konzentrierte Kulturüberstände von *Cmm* (siehe 9.3) durch Verwendung einer geeigneten mechanischen Pumpe mit 1 mL/h über die vorbereitete Säule führen
- Waschschritt I: Säule mit 20 mL PBS waschen
- Waschschritt II: Säule mit 20 mL Phosphatpuffer waschen
- Elution der nativen Tomatinase mit 5 x 0,5 mL Elutionspuffer
- Proben von Durchfluss-, Wasch-, und Elutionsfraktionen mit SDS-PAGE analysieren
- Elutionsfraktionen auf Ultracell YM-30 Filtereinheiten, 30.000 MWCO, (Fa. Amicon) geben
- nach Angabe des Herstellers zentrifugieren, bis auf einen Rest von etwa 50 µL
- 3 x mit 0,5 mL PBS waschen
- zentrifugieren bis zu einem finalen Rest von 100-150 µL
- Proteinkonzentration bestimmen (mit NanoDrop)
- Konservierung und Lagerung siehe 9.12

12. Analyse des Pathogenitätsverhaltens von *Cmm*

12.1 Wurzelinfektion

- Aussaat und Anzucht der Tomatenpflanzen in steriler Pflanzenerde
- Pflanzen im 2-Blatt-Stadium entnehmen und anhaftende Erde entfernen
- Pflanzen 15-20 min in *Cmm*-Bakteriensuspension bei RT inkubieren (vorher Bakterien in 500 µL sterilem Leitungswasser im Eppendorfgefäß resuspendieren. OD₅₈₀ ca. 8)
- Anzucht der Pflanzen im Pflanzenraum bei 40 - 50 % relativer Feuchtigkeit im Tag-Nacht-Rhythmus bei 25 °C (Tag 16 h bei 12000 Lux, Nacht 8 h)

12.2 Kolonisationsschnelltest

- infizierte Tomatenpflanzen im Anzuchtgefäß gut wässern
- Tomatenpflanzen 10 mm oberhalb des Erdbodens mit einem abgeflamnten Skalpell abschneiden
- 1-2 µL des austretenden Xylemsaftes abnehmen und auf TBY-Nährboden geben
- Inkubation 4 Tage bei 25-28 °C

12.3 Hypersensitive Reaktion (HR) an *Mirabilis jalapa*

- zu testende *Cmm*-Stämme in PS-Puffer resuspendieren, OD₅₈₀ ca. 8 - 9
- mit einer Einwegspritze ohne Nadel die Bakteriensuspension von der Blattunterseite direkt in das Blattparenchym infiltrieren, ohne dabei das Blatt zu durchstechen
- Negativkontrolle: PS-Puffer
- Auswertung nach 5 Tagen Inkubation bei 25-28 °C im Tag-Nachtrhythmus
- eine positive Reaktion ist gekennzeichnet durch eine lokal begrenzte Nekrose an der Infiltrationsstelle

13. Datenbanken und Softwarepakete

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., 2007).

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).

E. Ergebnisse

I. Enzymatische Aktivität von TomA

Pflanzen bilden unterschiedliche Abwehrstoffe, um dem gezielten Eindringen von Pathogenen zu begegnen. Bei der Tomatenpflanze zählt zu diesen Stoffen u. a. das Saponin α -Tomatin, ein glykosiliertes steroidähnliches Molekül, welches beim Pathogen membranschädigend wirkt. Pathogene Mikroorganismen, die mit Pflanzen interagieren, haben unterschiedliche Strategien entwickelt, um der Abwehr der Pflanze zu begegnen. Eine Möglichkeit für ein Phytopathogen so einen Pflanzenabwehrstoff abzuwehren, ist die gezielte Inaktivierung durch geeignete Enzyme.

Das offene Leseraster CMM_0090 von *Cmm* zeigt auf Proteinebene gute Übereinstimmung zu Tomatinasen, also α -Tomatin spaltenden Enzymen, z. B. von *Fusarium oxysporum* (Ito et al., 2004; Lairini et al., 1996) und *Streptomyces thurgidiscabies* (Kers et al., 2005) und wird deshalb als *tomA* bezeichnet. Ferner wurde durch Analyse der Proteinsequenz mit dem Programm SignalP ein N-terminales Leaderpeptidmotif beim Genprodukt von *tomA* identifiziert, welches der Ausschleusung des Proteins aus der Zelle dienen könnte.

Um diese Vermutungen zu bestätigen sollte der Nachweis erbracht werden, dass TomA aus der Zelle geschleust wird und tatsächlich in der Lage ist α -Tomatin zu hydrolysieren.

Für diesen Zweck wurden zwei *Cmm*-Mutanten, *CmmTom2* und *CmmC7*, die zu Beginn dieser Arbeit vorlagen, deren *tomA*-Gene durch Mutation inaktiviert wurden, mit dem Wildtyp-Kontrollstamm CMM101, in Bezug auf ihre Fähigkeit α -Tomatin zu hydrolysieren, untersucht. Bei *CmmTom2* wurde durch Insertionsmutagenese ein Großteil des *tomA*-Gens durch Einschub einer Chloramphenicolresistenzkassette deletiert (Kaup, 2001) und *CmmC7* ist eine Mutante, bei der das Leseraster von *tomA* durch Insertion des Transposons *Tn1409C β* (Gartemann, 1999) nahe dem N-Terminus unterbrochen wurde.

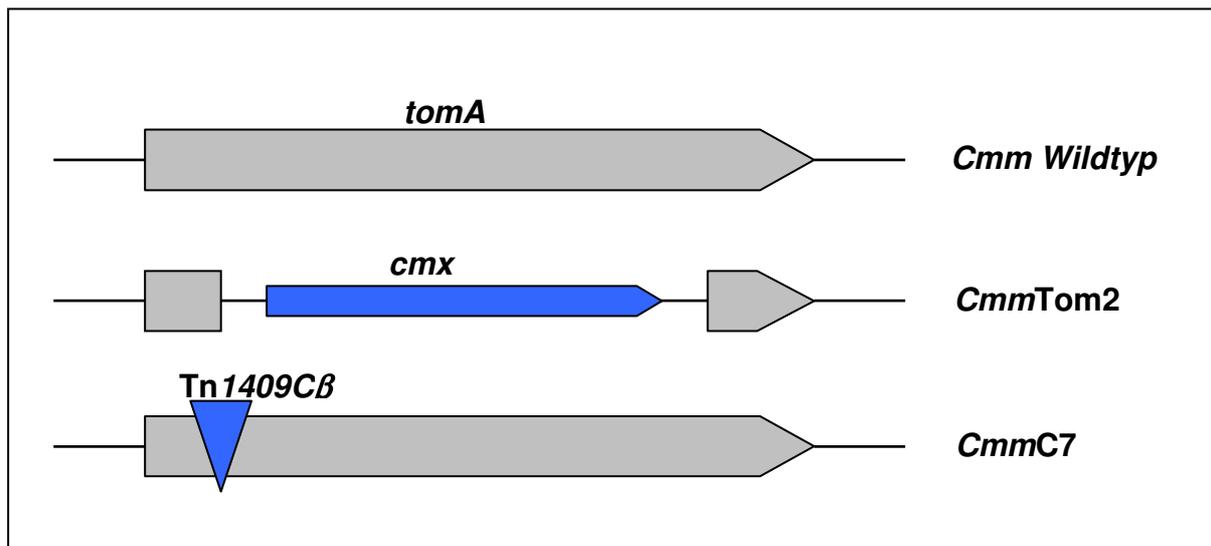


Abb. 10: Schematische Übersicht der *tomA*-Mutationen in *CmmTom2* und *CmmC7*. *Tn1409C β* : Insertionselement aus *Arthrobacter* sp. (Gartemann, 1999), *cmx*: Chloramphenicolresistenzgen

Um zu zeigen, dass es sich bei dem Genprodukt von *tomA* um eine katalytisch aktive Tomatinase handelt, wurden die *tomA*-Mutanten mit dem Wildtypstamm auf ihre Fähigkeit α -Tomatin zu hydrolysieren verglichen.

Die Mutanten und der Wildtyp-Kontrollstamm wurden dazu in Vollmedium in Gegenwart von 0,02 mM α -Tomatin angezogen, um sicherzustellen, dass die Tomatinase exprimiert wird, falls Induktion der Genexpression durch α -Tomatin notwendig ist. Für *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* konnte gezeigt werden, dass die Tomatinase bei einer Konzentration von 20 μ g/mL α -Tomatin im Medium induziert wird (Lairini et al., 1996). Daraufhin wurden sowohl Proteinrohextrakte als auch Kulturüberstände, die durch Dialyse gegen festes Polyethylenglykol etwa 10-15 fach konzentriert wurden, für einen Enzymtest eingesetzt. Es wurden jeweils 500 μ g Proteinrohextrakt bzw. konzentrierter Kulturüberstand in Gegenwart von 1 mM α -Tomatin für 22 Stunden bei 28 °C inkubiert und die entstandenen Produkte zur Analyse in einer Dünnschichtchromatografie aufgetrennt. Das Ergebnis ist in Abb. 1 dargestellt.

Durch die Dünnschichtchromatografie können das Substrat, α -Tomatin, und das mögliche Hydrolyseprodukt, Tomatidin (vergl. Einleitung) gut voneinander getrennt werden. Dazu wird ein Laufmittel verwendet, bestehend aus Ethylacetat, Methanol, Essigsäure, und Wasser im Verhältnis 30:20:10:1. Durch Besprühen der DC-Platten mit 50%iger Schwefelsäure und Inkubation bei 110 °C für 10 min können zudem Substrat

und Produkt farblich unterschieden werden, da sich das Tomatidin dunkelgrün färbt, während α -Tomatin schwarz erscheint. Das Spaltprodukt Lycotetraose kann unter diesen Bedingungen nicht detektiert werden. Die Nachweisgrenze sowohl für α -Tomatin als auch Tomatidin liegt bei diesem Verfahren etwa bei 2 μ g (Daten nicht gezeigt).

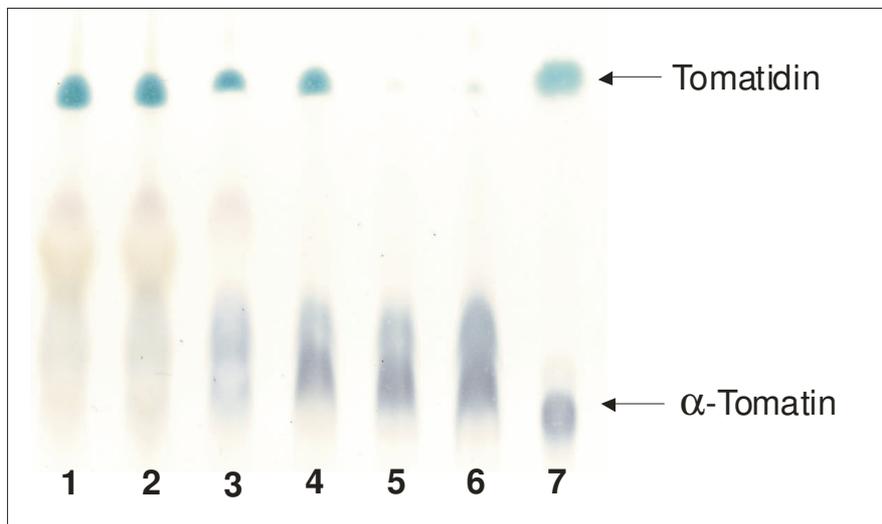


Abb. 11: Hydrolytische Aktivität von CMM101, *CmmTom2*, *CmmC7*.

Dünnschichtchromatografie der Hydrolyse von α -Tomatin durch Proteinrohextrakt von CMM101 (Spur 1), *CmmTom2* (Spur 2), *CmmC7* (Spur 3) und durch konzentrierte Kulturüberstände von CMM101 (Spur 4), *CmmTom2* (Spur 5), *CmmC7* (Spur 6). Standard: Gemisch aus α -Tomatin und Tomatidin, je 1 mM, gelöst in Methanol (Spur 7).

In der Spur 7 ist als Standard ein Gemisch aus α -Tomatin und Tomatidin aufgetragen. Das Abbauprodukt Tomatidin ist als grüngrauer Fleck zu erkennen, der sehr gut mit dem verwendeten Laufmittel mitwandert, während das Substrat α -Tomatin vom verwendeten Laufmittel kaum mobilisiert wird.

In den Spuren 1-3 sind die Reaktionsprodukte der Enzymtests mit Proteinrohextrakten der Mutanten und des Wildtyps aufgetragen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Rohextrakte sowohl der Mutante als auch des Wildtyps α -Tomatin hydrolysieren, da in allen drei Spuren der Spot für das gebildete Tomatidin vorhanden ist.

In den Spuren 4-6 sind die Reaktionsprodukte der Enzymtests mit Kulturüberständen derselben Stämme dargestellt. Nur bei dem Wildtyp, Spur 4, zeigt der Tomatidin Spot an, dass der eingesetzte Kulturüberstand α -Tomatin spalten kann. In den Spuren 5 und 6 der beiden *tomA*-Mutanten gibt es keinen Spot für das Produkt Tomatidin. Die Kulturüberstände von *CmmTom2* und *CmmC7* sind nicht mehr in der Lage α -Tomatin zu hydrolysieren.

Die Ergebnisse der Dünnschichtchromatografie (Spuren 4-6) zeigen deutlich, dass das Genprodukt von *tomA* α -Tomatin hydrolysiert und als Hydrolyseprodukt Tomatidin freisetzt, wie die Tomatinase von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, die α -Tomatin in Tomatidin und Lycotetraose spaltet (siehe Einleitung). Außerdem konnte bei diesem Test die Aktivität in den Kulturüberständen nachgewiesen werden und dadurch wurde auch eine Ausschleusung des Genproduktes aus der Zelle nachgewiesen. Da sich die eingesetzten *tomA*-Mutanten und der Wildtyp nur in der Deletion des *tomA*-Gens unterscheiden, muss dieser Effekt auf das *tomA* Gen zurückzuführen sein.

Ferner wird an den Ergebnissen der Dünnschichtchromatografie (Spuren 1-3) deutlich, dass es vermutlich innerhalb der Zelle von *Cmm* weitere Enzyme geben muss, die auch in der Lage sind, α -Tomatin zu spalten. Hier ist kein Effekt zu erkennen, der mit der Ausschaltung des *tomA*-Gens zusammenhängt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es sich innerhalb der Zelle um unspezifisch wirkende Hydrolasen handeln muss, die auch α -Tomatin spalten können.

Für die weiteren Untersuchungen wurde, bis auf einige Ausnahmen, ausschließlich die *tomA*-Mutante *CmmTom2* verwendet, bei der der größte Teil des *tomA* Gens deletiert und durch eine Antibiotikaresistenzkassette ersetzt worden ist.

Komplementation der *tomA*-Mutante

Um nachzuweisen, dass der Verlust der Hydrolyseaktivität der *tomA*-Mutante nur auf die Deletion des *tomA*-Gens und nicht auf mögliche sekundäre Mutationen zurückzuführen ist, wurde über Komplementation des defekten Gens die Wildtyp-Eigenschaft wiederhergestellt. Das intakte *tomA* Gen wurde dazu durch einen Shuttle-Vektor, der sowohl in *E. coli* als auch in *Cmm* stabil repliziert, in den Stamm *CmmTom2* eingebracht. Der Erfolg der Komplementation kann auf biochemischer Ebene anhand der wiederhergestellten Fähigkeit α -Tomatin zu hydrolysieren demonstriert werden.

Konstruktion des Komplementationsplasmides

Der Vektor pDM302 repliziert sowohl in *E. coli* als auch in *Cmm* (Meletzus et al., 1993). Nach Hydrolyse des Vektors mit *EcoRI* und *HindIII* wurde ein etwa 1,5 kb großes Fragment entfernt und durch das 3,9 kb große *EcoRI/HindIII* Fragment aus pIG2, welches

das *tomA* Gen trägt, ersetzt (Kaup, 2002). Dieses Plasmid-Konstrukt, pDM302/Tom, wurde in die *tomA*-Mutante, *CmmTom2*, eingebracht.

In einer Southern-Hybridisierung wurde der Erfolg der Komplementation des *tomA*-Gens entsprechend überprüft. Als *tomA*-Sonde diente ein 3,9 kb *PstI/EcoRI*-Fragment aus pIG2. Folgende Bandenmuster sind für die untersuchten Stämme bei dieser Hybridisierung zu erwarten:

<i>Cmm</i> Wildtyp:	6,1 kb
<i>tomA</i> -Mutante, <i>CmmTom2</i> :	3,3 kb; 2,9 kb
komplementierte <i>tomA</i> -Mutante, <i>CmmTom2K1</i> :	6,1kb; 3,3 kb; 2,9 kb

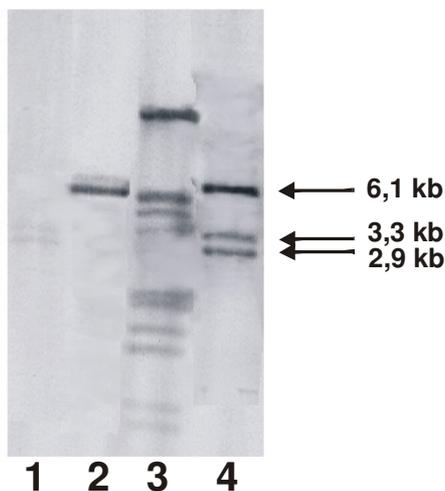


Abb. 12: Hybridisierung *PstI* gespaltener Gesamt-DNA von *CmmTom2* (Spur 1), CMM101 (Spur 2) und *CmmTom2K1* (Spur 4); Längenmarker: Lambda-DNA, hydrolysiert mit *EcoRI/HindIII* (Spur 3). Sonde: 3,9 kb *PstI/EcoRI*-Fragment aus pIG2.

Bei der Hybridisierung mit der *tomA*-Sonde ist bei dem Wildtyp deutlich die 6,1 kb große Bande für das intakte *tomA*-Gen zu erkennen (Spur 2). Bei der *tomA*-Mutante sind, wenn auch nur sehr schwach, die beiden Banden von 3,3 kb und 2,9 kb Größe für das deletierte *tomA*-Gen zu erkennen (Spur 1). Und die komplementierte Mutante *CmmTom2K1* (Spur 4) weist alle drei Banden auf: 6,1 kb für das intakte *tomA*-Gen neben 3,3 kb und 2,9 kb für das deletierte *tomA*-Gen. Damit konnte gezeigt werden, dass auf genetischer Ebene die Komplementation der *tomA*-Mutante *CmmTom2* erfolgreich war.

Durch einen Enzymtest mit anschließender Analyse der Abbauprodukte in einer Dünnschichtchromatografie sollte auch der Nachweis der Komplementation auf physiologischer Ebene erbracht werden.

Konzentrierte Kulturüberstände der *Cmm*-Stämme CMM101, *CmmTom2* und *CmmTom2K1* wurden mit α -Tomatin als Substrat für 2 Stunden bei 32 °C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend in einer Dünnschichtchromatografie aufgetrennt (siehe Abb. 13).

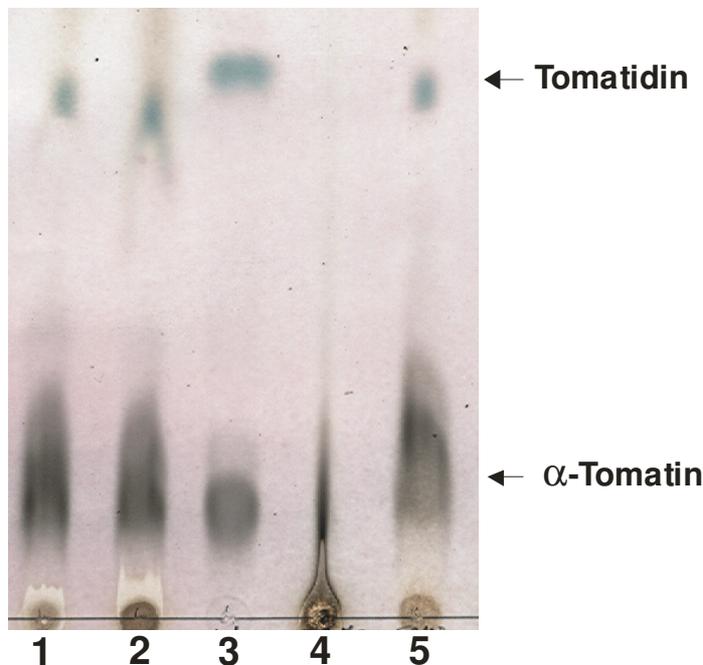


Abb. 13: Dünnschichtchromatografie der Hydrolyse von α -Tomatin durch konzentrierte Kulturüberstände von *Cmm382* (Spur 1), CMM101 (Spur 2), *CmmTom2* (Spur 4) und *CmmTom2K1* (Spur 5). Standard: Gemisch aus α -Tomatin und Tomatidin, je 1 mM, gelöst in Methanol (Spur 3).

In allen Spuren, mit Ausnahme von Spur 4, ist anhand des grünlichen Spots im oberen Bereich der Dünnschichtchromatografie die Bildung des Hydrolyseproduktes Tomatidin nachgewiesen worden. Nur in Spur 4, in der die Reaktionsprodukte des Enzymtests mit dem Kulturüberstand der *tomA*-Mutante aufgetragen wurden, fehlt dieser Spot. Somit ist die komplementierte Mutante, *CmmTom2K1*, (Spur 5) wieder in der Lage, α -Tomatin zu hydrolysieren, ebenso wie der Wildtyp (Spuren 1 und 2).

Damit konnte gezeigt werden, dass der Phänotyp von *CmmTom2* ausschließlich auf die defekte Tomatinase zurückzuführen ist. Es handelt sich bei dem Genprodukt von *tomA* somit um ein Enzym, das die Hydrolyse von α -Tomatin katalysiert und dabei das zuckerfreie Aglycon Tomatidin freisetzt. Ob dies nur eine Nebenaktivität einer Xylanase ist, muss noch geklärt werden. Dazu muss das Enzym überexprimiert und aufgereinigt werden, welches im Teil Aufreinigung und Charakterisierung besprochen wird.

Einfluss von α -Tomatin auf das Wachstum von *Cmm*

α -Tomatin wird in der Natur als Abwehrstoff der Tomatenpflanze gebildet um Pathogene abzuwehren. Aufgrund der polaren Zuckerreste auf der einen Seite und des relativ unpolaren tetrazyklischen Restes auf der anderen Seite ist α -Tomatin membranaktiv und kann beim Pathogen die Membranfluidität stören bzw. kann zur Porenbildung und damit zum Absterben der Zelle führen. Es wurde daher der toxische Effekt von α -Tomatin auf das Wachstum von Wildtyp und *tomA*-Mutante untersucht.

Hierzu wurden Agardiffusionstests durchgeführt, bei denen die *tomA*-Mutante *CmmTom2* mit dem Wildtyp-Kontrollstamm CMM101 verglichen wurde. Jeweils 3 mL Weichagar, beimpft mit 5 μ L der entsprechenden *Cmm*-Kultur ($OD_{580} = 6$), wurden gleichmäßig auf TBY-Nähragar verteilt. Nach dem Erstarren der Weichagarschicht wurden Filterpapierplättchen, die mit definierten Mengen an α -Tomatin versehen wurden (0,05 bis 0,3 μ mol), aufgelegt. Nach Inkubation für 3 Tage bei 26 °C konnten die Hemmhöfe, die sich durch den Einfluss des α -Tomatins um die Plättchen gebildet hatten, ausgemessen werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 und Tab. 10 dargestellt.

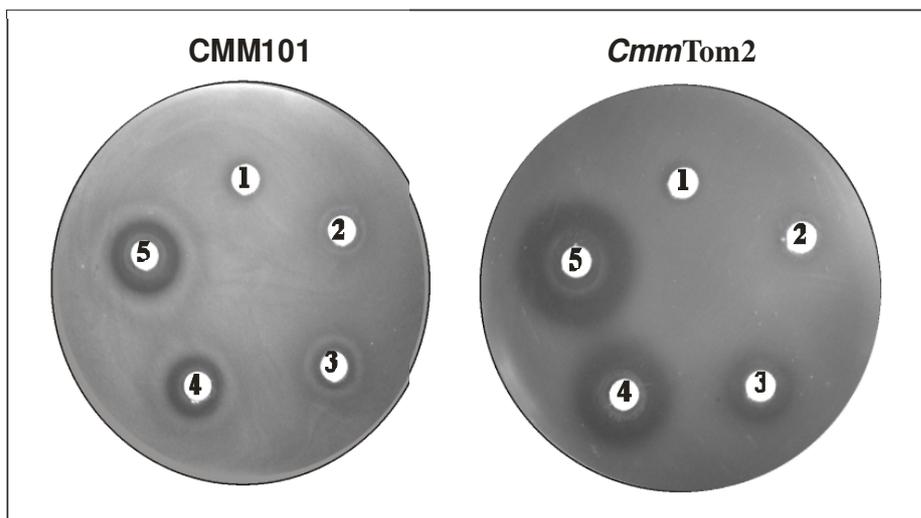


Abb. 14: Agardiffusionstest: Toxizität von α -Tomatin auf das Wachstum von CMM101 und *CmmTom2*. Papierplättchen mit Na-Citratpuffer, 50 mM, pH 4, als Kontrolle (1), bzw. ansteigenden Mengen von α -Tomatin 0,05 μ mol (2), 0,1 μ mol (3), 0,2 μ mol (4), 0,3 μ mol (5) gelöst in Na-Citratpuffer, 50 mM, pH 4.

α -Tomatin (μ mol)	Hemmhof-Durchmesser (mm)		Zuwachs des Hemmhofes (%) ^b
	CMM101	<i>CmmTom2</i>	
0 ^a	/	/	/
0,05	6 \pm 0	6,8 \pm 0,4	13,3
0,1	7,6 \pm 0,7	11,0 \pm 0,4	52,6
0,2	11,6 \pm 0,5	17,3 \pm 0,4	49,1
0,3	15,1 \pm 0,6	22,7 \pm 1,0	50,3

Tab. 10: Hemmhof-Durchmesser bei Wachstum von CMM101 und *CmmTom2* gegen α -Tomatin. n = 5.

a: Kontrolle, nur Na-Citratpuffer, b: Zunahme des Hemmhof-Durchmessers in Prozent, bezogen auf den Hemmhof-Durchmesser des Wildtyp-Kontrollstamms CMM101.

In Abb. 14 ist zu erkennen, dass sich bei beiden Stämmen (Wildtyp und Mutante) Hemmhöfe um die mit α -Tomatin versehenen Plättchen bilden. Bei beiden Stämmen ist erkennbar, dass der Hemmhofdurchmesser jeweils mit der applizierten Menge an α -Tomatin ansteigt. Der Vergleich der Hemmhofdurchmesser von CMM101 und *CmmTom2* bei gleichen α -Tomatin Mengen zeigt allerdings, dass die Hemmhöfe bei *CmmTom2* stets größer sind als bei CMM101. Bei einer aufgetragenen Menge von 0,1 (0,3) μ mol α -Tomatin beispielsweise, beträgt der Hemmhofdurchmesser beim Wildtyp 7,6 (15,1) mm und bei der Mutante 11,0 (22,7) mm. Das entspricht einem Zuwachs des Hemmhofes um 52,6 % (50,3 %). Die *tomA*-Mutante, die nicht mehr in der Lage ist das α -Tomatin in ihrer Umgebung zu hydrolysieren, wird also deutlich stärker in ihrem Wachstum gehemmt als der Wildtyp, der über die aktive Tomatinase verfügt.

Wuchskurve in Flüssigkultur in Gegenwart von α -Tomatin

In einem Agardiffusionstest konnte die toxische Wirkung von α -Tomatin auf das Wachstum von *Cmm* gezeigt werden. Außerdem zeigten die Ergebnisse, dass eine aktive Tomatinase den toxischen Effekt des α -Tomatins abmildern kann.

Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse aus dem Agardiffusionstest sollten auch Wuchskurven von *Cmm*-Stämmen in Flüssigmedium bei verschiedenen α -Tomatin Konzentrationen aufgenommen werden. Dazu wurden jeweils Wuchskurven von *Cmm*-Stämmen in Gegenwart von α -Tomatin Konzentrationen von 0,075 mM und 0,75 mM im Medium mit einer α -Tomatin-freien Kontrolle verglichen. Der relative hohe Wert von 0,75

mM orientiert sich dabei an den in Blättern von *Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker gemessenen, physiologischen Konzentrationen von 0,775 mM α -Tomatin (Beimen et al., 1994). Der 10fach geringere Wert von 0,075 mM liegt etwa in der Größenordnung der verwendeten Induktionskonzentration von 0,02 mM α -Tomatin für die enzymatischen Nachweise von TomA im Kulturüberstand.

Die Wachstumstests wurden im kleinen Maßstab (10 mL) mit den Stämmen *Cmm382*, *CMM101* und *CmmTom2* durchgeführt, die über einen Zeitraum von 25 Stunden jeweils sowohl im α -Tomatin-freien Medium, als auch in Gegenwart von 0,75 mM und 0,075 mM α -Tomatin mit einer Start-OD₅₈₀ von 0,25 bei 28 °C inkubiert wurden.

Die aufgenommenen Messreihen lieferten keine eindeutigen Ergebnisse, da in Gegenwart der hohen α -Tomatin-Konzentration von 0,75 mM bereits nach 7 Stunden Inkubation keine homogene Lösung mehr vorlag. Es kam zu Zellaggregatbildungen, die keine repräsentative fotometrische Messung der Zelldichte mehr zuließ. Die Zellaggregate sind so stabil, dass sie sich mechanisch nicht mehr homogenisieren lassen. Auch bei der niedrigeren Konzentration von 0,075 mM α -Tomatin kam es, allerdings erst am Ende der Messzeit, nach 25 Stunden zu einer ähnlichen, aber deutlich schwächeren Aggregatbildung.

Da sich die Wuchsverläufe der untersuchten Stämme *Cmm382*, *CMM101* und *CmmTom2* bei jeweils gleicher α -Tomatinkonzentration im Medium aufgrund der Aggregatbildung nicht signifikant unterscheiden (Daten nicht gezeigt) sind in Abb. 15 exemplarisch nur die Ergebnisse für den Wildtypkontrollstamm *CMM101* gezeigt. Transparent dargestellt sind die Messpunkte, die aufgrund der Aggregatbildung stark fehlerbehaftet sind.

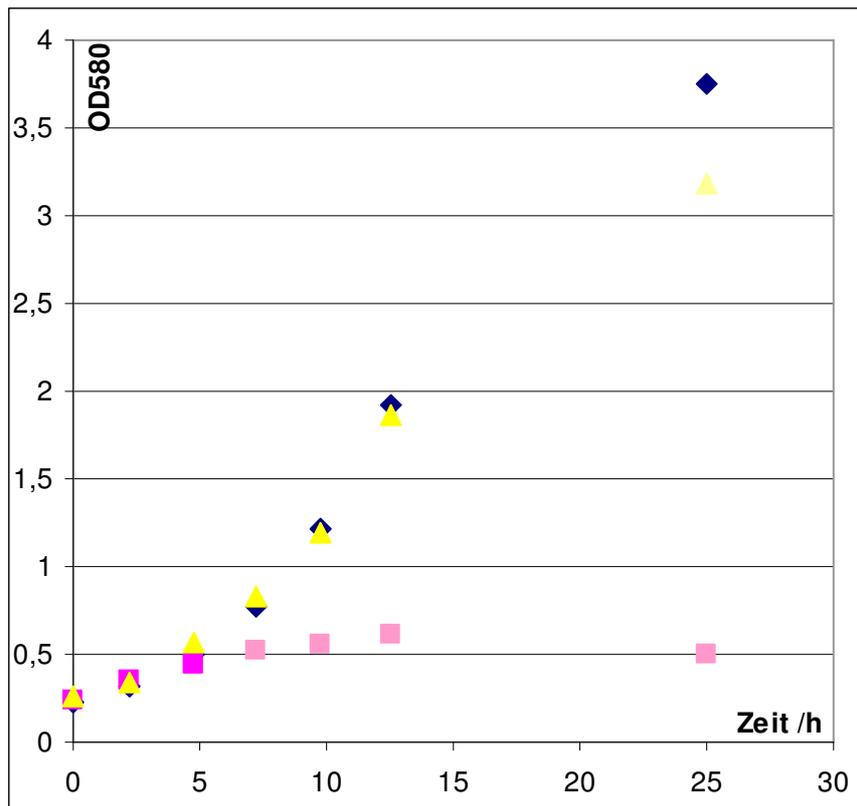


Abb. 15: Wuchskurve CMM101; ohne (blau), in Gegenwart von 0,075 mM (gelb), bzw. 0,75 mM α -Tomatin (magenta) im Kulturmedium

Man erkennt deutlich das ungehemmte, exponentielle Wachstum von CMM101, wenn kein α -Tomatin im Medium vorhanden ist (blaue Kurve). Ist nur eine geringe Menge α -Tomatin von 0,075 mM vorhanden wird das Wachstum kaum gehemmt (gelbe Kurve). Bei der 10fach höheren Konzentration an α -Tomatin sieht man eine deutliche Wuchshemmung (magenta Kurve). Bei beiden Kurven mit Zusatz von α -Tomatin im Medium sind die letzten Werte (farblich blasser dargestellt) allerdings sehr stark fehlerbehaftet. Dieses hängt mit der Inhomogenität der Lösung zusammen, aufgrund der einsetzenden Zellaggregatbildung, die für eine starke Enttrübung der Lösung sorgt (siehe Abb. 16). Auch bei den anderen untersuchten *Cmm* Stämmen *Cmm382* und *CmmTom2* trat etwa in gleichem Maße Zellaggregatbildung auf.

Es wurden auch Messungen bei einer mittleren Konzentration von 0,5 mM α -Tomatin durchgeführt. Aber auch dabei wurde eine deutliche Zellaggregatbildung beobachtet, so dass keine aussagekräftigen Messreihen aufgenommen werden konnten (siehe Abb. 16).



Abb. 16: Zellaggregatbildung von CMM101 bei Anzucht in TB in Gegenwart von 0,5 mM α -Tomatin. links: ohne α -Tomatin Zusatz; rechts: 0,5 mM α -Tomatin im Medium (TB), 12 Stunden nach Zugabe.

Aufgrund dieser großen Messungenauigkeiten konnten die Wuchskurven bei der höheren, physiologischen α -Tomatin Konzentration von 0,75 mM nicht analysiert werden und somit auch nicht mit der *tomA*-Mutante verglichen werden. Bei der zehnfach niedrigeren α -Tomatin Konzentration von 0,075 mM unterschied sich die Wuchskurve der *tomA*-Mutante kaum von der Wuchskurve von CMM101 (Daten nicht gezeigt). Nach 25 Stunden Inkubation lag die Mutante *CmmTom2* mit einer OD_{580} von 3,6 etwa im gleichen Bereich wie der Wildtyp CMM101 mit einer OD_{580} von 3,3.

Rückschlüsse auf einen Effekt der Tomatinase auf das Wuchsverhalten in einer Flüssigkultur bei Anwesenheit von α -Tomatin konnten somit nicht gezogen werden. Der wuchshemmende Effekt machte sich erst dann bemerkbar, wenn Verklumpungen der Zellen eintraten und dann konnte mit einer fotometrischen Messung keine Aussage mehr über die Zelldichte gemacht werden, da die Lösung nicht mehr homogen war. Die Zellaggregatbildung trat bei geringen α -Tomatin Konzentrationen erst nach längerer Inkubationszeit auf und bei höheren α -Tomatin Konzentrationen bereits nach kürzeren Inkubationszeiten.

Vermutlich waren aber die Zellen auch bei der hohen α -Tomatin Konzentration nicht abgestorben, denn in der Pflanze herrschen vergleichbar hohe Konzentrationen an α -Tomatin und dort erreicht *Cmm* Titer von über 10^9 Bakterien pro Gramm Pflanzenhomogenat (Meletzus et al., 1993). Ein Titer von 10^9 pro Milliliter Kulturlösung entspräche einer OD_{580} von 2 (persönliche Mitteilung M. Flügel).

II. Regulation und Induktion der Tomatinase

Im Genom von *Cmm* wird das *tomA*-Gen von drei Genen für regulatorische Elemente flankiert. Stromaufwärts liegen *regA* und *regB*, Zweikomponentenregulatoren und stromabwärts, in entgegengesetzter Orientierung transkribiert, liegt *catR*, ein zur LacI-Familie gehörendes Katabolitrepresorgen. Aufgrund dieser direkten Nachbarschaft zu *tomA* liegt die Vermutung nahe, dass diese Elemente einen regulatorischen Einfluss auf die Expression von *tomA* haben könnten.

Es lagen bereits Deletionsmutanten vor, in denen das Gen *regB*, bzw. das Gen *catR* durch Insertionsmutagenese inaktiviert waren (Kaup, 2002; Mayer, 2006). Diese beiden Deletionsmutanten, *CmmReg2* und *CmmCatR7 β* , sowie der Wildtyp *Cmm382* wurden in TBY-Medium in Gegenwart von 0,02 mM und ohne α -Tomatin angezogen. Die Kulturüberstände wurden nach Konzentrierung für einen Enzymtest eingesetzt und dann in einer Dünnschichtchromatografie analysiert.

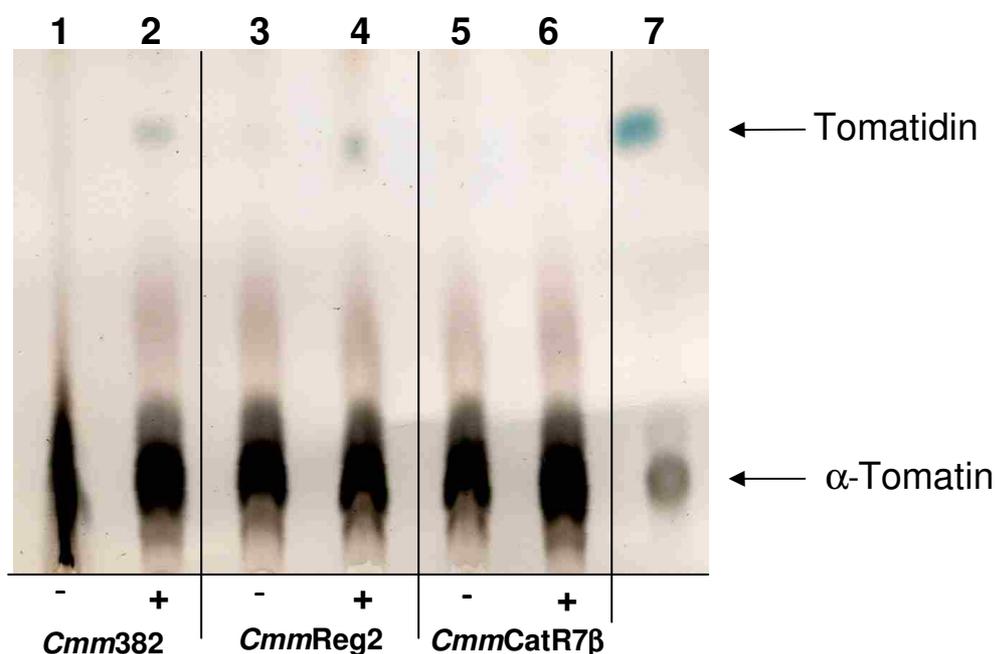


Abb. 17: Dünnschichtchromatografie der Reaktionsprodukte nach Enzymtest mit konzentrierten Kulturüberständen von *Cmm382* (Spuren 1 und 2), *CmmReg2* (Spuren 3 und 4) und *CmmCatR7 β* (Spuren 5 und 6) jeweils ohne (-) und mit (+) 0,02 mM α -Tomatin im Kulturmedium während der Anzucht. Standard: α -Tomatin/Tomatidin gelöst in Methanol (Spur 7).

Es ist in Abb. 17 zu erkennen, dass der Wildtyp, *Cmm* NCPPB382, nur dann eine aktive Tomatinase in das Kulturmedium sekretiert, wenn er mit α -Tomatin angezogen wird, das Gen also induziert wird. Die Mutante *CmmReg2* zeigt diesbezüglich keine phänotypische Veränderung gegenüber dem Wildtyp. Hingegen ist bei der Mutante *CmmCatR7 β* trotz Anwesenheit von α -Tomatin bei der Anzucht keine hydrolytische Aktivität im Kulturmedium nachweisbar; offensichtlich wird keine Tomatinase gebildet. Demnach sieht es so aus, als ob CatR einen positiv wirkenden Regulator für die Expression der Tomatinase darstellt. In zwei weiteren unabhängigen Wiederholungsexperimenten, in denen wahlweise auch der Stamm CMM101 als Wildtyp-Kontrolle eingesetzt wurde, konnten diese Ergebnisse reproduziert werden. Dabei zeigte der Stamm CMM101, der nur noch das eine Plasmid pCM1 trägt, physiologisch das gleiche Bild wie *Cmm382*, der beide Plasmide trägt (Daten nicht gezeigt). Winter (2007) konnte diese Ergebnisse in seiner Diplomarbeit ebenfalls reproduzieren und damit bestätigen und den Verlust der Tomatinaseinduktion durch Komplementation der *catR*-Mutante mit dem Wildtypgen wiederherstellen.

III. Phänotypische Untersuchungen der *tomA*-Mutante im Pflanzentest

Um Erkenntnisse über das Pathogenitätsverhalten der *tomA*-Mutante zu erhalten, wurde die Mutante *CmmTom2* in mehreren Pflanzentests untersucht.

Die natürliche Wirtspflanze von *Cmm* ist die Tomatenpflanze. *Cmm* dringt über äußere Verletzungen in die Pflanze ein, kolonisiert das Xylem, führt zu Welkeerscheinungen und schließlich zum Absterben der Pflanze. Dabei erreicht *Cmm* hohe Titer von 10^9 - 10^{10} CFU pro Gramm Pflanzenhomogenat. Da in vorhergehenden Arbeiten bereits Pflanzentests mit *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker durchgeführt worden waren, wurde zunächst dieses Kultivar für einen Pflanzentest ausgewählt.

Pflanzentests wurden grundsätzlich dreimal durchgeführt. Ein Pflanzentest umfasste 32 Pflanzen, die mit einem Bakterienstamm über Wurzelinfektion infiziert wurden. Neben den *tomA*-Mutanten wurde CMM101 als Wildtyp-Kontrollstamm mitgeführt, da dieser Stamm über den gleichen Plasmidstatus verfügt wie die *tomA*-Mutanten. Dies muss berücksichtigt werden, da der Plasmidstatus wesentlich für die Virulenz und das Ausmaß

der Krankheit bei der Pflanze ist (siehe Einleitung). Über einen Zeitraum von 28 Tagen wurden die Krankheitssymptome protokolliert, der Welkeindex bestimmt und nach Ablauf des Tests von einer repräsentativen Auswahl an Pflanzen der *in planta* Titer der Bakterien bestimmt.

Pflanzentest an *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker

In Abb. 18 ist ein repräsentativer Krankheitsverlauf über 28 Tage dargestellt. Dabei wurde täglich das Ausmaß der sichtbaren Symptome jeder Pflanze nach Infektion mit *Cmm* differenziert in verschiedenen Stadien der Erkrankung protokolliert: „-“ keine Welkesymptome, „(+“ beginnende Welkesymptome, „+“ eindeutige Welkesymptome, „++“ mindestens 2/3 der Blätter zeigen Welkesymptome, „tot“ Pflanze ist tot. Durch die grafische Auftragung der Symptome über die Zeit des Versuches erhält man ein entsprechendes Welkediagramm. Bei den durchgeführten Pflanzentests konnte beim Ausmaß der Welkeerscheinungen und im Welkeindex innerhalb aller getesteten *tomA*-Mutanten (*CmmTom2* und *CmmC7*) kein Unterschied festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund ist exemplarisch nur das Welkediagramm von *CmmTom2* gegenüber dem Wildtyp Kontrollstamm CMM101 in Abb. 18 aufgeführt.

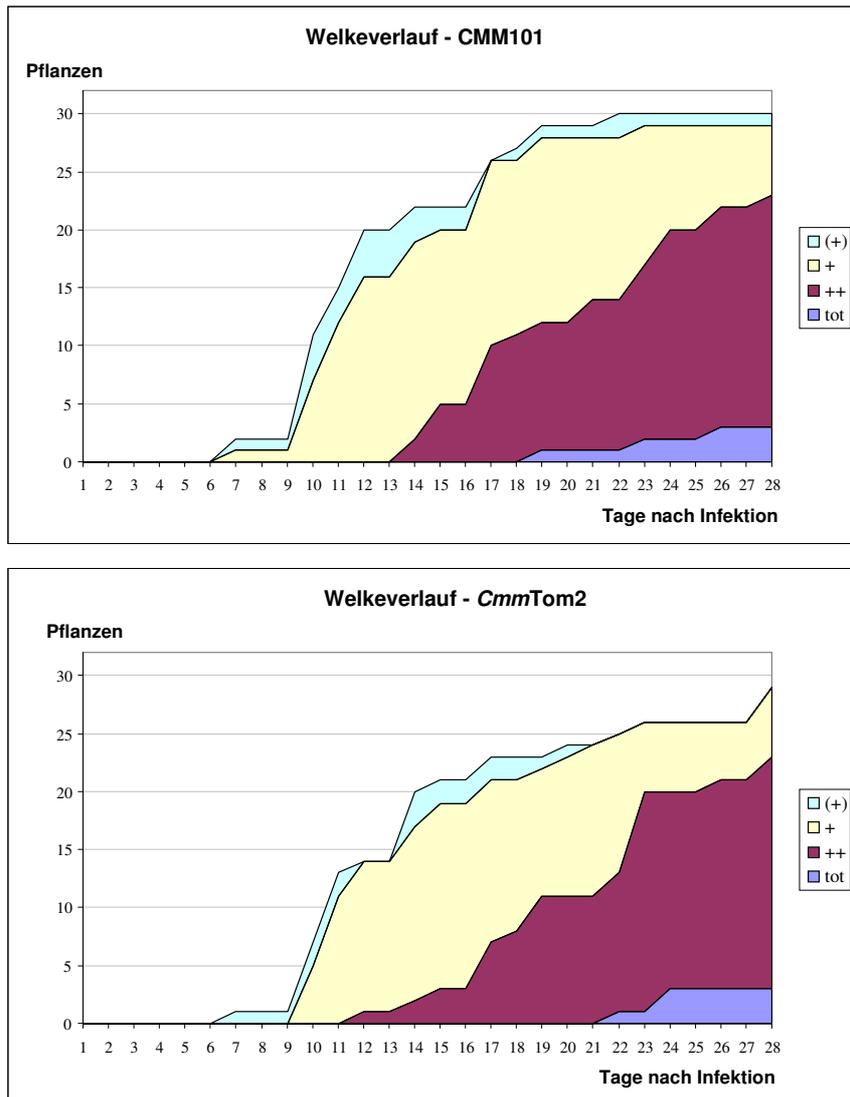


Abb. 18: Welkediagramme von *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker nach Infektion mit CMM101 (oben) und CmmTom2 (unten).

	CMM101	CmmTom2/CmmC7
Welkeindex in Tagen	14,3 ± 0,9	14,1 ± 1,0
Titer CFU / g Pflanzenhomogenat	5,70 ± 2,14*10 ⁹	7,24 ± 4,30*10 ⁹

CFU: colony forming units

Tab. 11: Welkeindex und Titer von CMM101 gegenüber den *tomA*-Mutanten (*CmmTom2* + *CmmC7*) nach Infektion von *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker, Welkeindex: arithmetisches Mittel aus drei unabhängigen Tests; Titerbestimmung: CMM101, n=10 Pflanzen; *CmmTom2/CmmC7*, n=25 Pflanzen

Es sind weder im Welkeverlauf noch im Titer deutliche Unterschiede zwischen den *tomA*-Mutanten (*CmmTom2* und *CmmC7*) und dem Wildtyp-Kontrollstamm (CMM101) zu erkennen. Der Welkeindex, der durch drei unabhängige Tests bestimmt wurde, beträgt für

die *tomA*-Mutanten $14,1 \pm 1,0$ Tage und unterscheidet sich damit nicht auffällig von dem des Kontroll-Stammes CMM101 mit $14,3 \pm 0,9$ Tagen. Darüber hinaus ist der Bakterientiter in der Pflanze bei Infektion mit den *tomA*-Mutanten *CmmTom2/CmmC7* ($7,24 \pm 4,30 \cdot 10^9$ CFU/g Pflanzenhomogenat) in derselben Größenordnung wie bei Infektion mit dem Kontrollstamm CMM101 ($5,70 \pm 2,14 \cdot 10^9$ CFU/g Pflanzenhomogenat). Auch ein durchgeführter t-Test zeigte, dass sich die Daten der Titer zwischen CMM101 und den *tomA*-Mutanten nicht signifikant unterscheiden. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass *tomA* bei der Interaktion mit *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker unter den gewählten Bedingungen keinen notwendigen Virulenzfaktor darstellt.

Solanum lycopersicum cv. Moneymaker ist eine Zuchtpflanze, die in der Tomatenproduktion eingesetzt wird. Sie zeichnet sich durch kräftigen, raschen Wuchs aus und liefert hohe Erträge. Es ist vorstellbar, dass bei der Züchtung von Tomaten Eigenschaften und wichtige Funktionen für die Bakterien-Pflanzen-Interaktion gegenüber Wildpflanzen verloren gegangen sein könnten. Dies liegt vermutlich daran, dass durch Züchtungen auch versucht wurde einen süßeren Geschmack der Tomatenfrüchte zu erzielen. Gerade Saponine, zu denen α -Tomatin gehört, haben einen an Seife erinnernden Geschmack. Ein hoher Gehalt an Saponinen in der reifen Frucht wirkt sich dementsprechend eher ungünstig auf den Geschmack aus. Asano et al. (1996) und Furui et al. (1997) konnten zeigen, dass der Gehalt an α -Tomatin in Tomaten-Kultivarsorten gegenüber Wildtomaten häufig erniedrigt ist. Aus diesem Grund sollte dieser Pflanzentest mit *Lycopersicon pimpinellifolium*, einer Wild-Tomatenart, wiederholt werden. Die Früchte dieser Tomatenart sind deutlich kleiner, nur etwa kirschgroß, und im Ganzen ist der Wuchs dieser Tomatenart zarter, krautartiger (siehe Abb. 19). Die Früchte weisen ein eher beeriges, säuerliches Aroma auf.

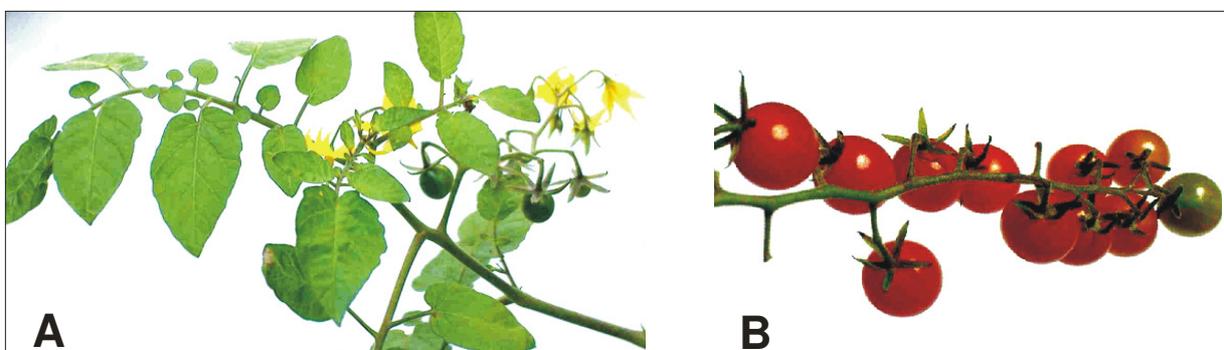


Abb. 19: *Lycopersicon pimpinellifolium*: A, krautartiger Wuchs; B, kirschgroße Früchte (eigene Fotoaufnahmen, Kaup (2008))

Pflanzentest an *Lycopersicon pimpinellifolium*

An der Wildtomatenart *Lycopersicon pimpinellifolium* als Wirtspflanze sind bisher noch keine Infektionsexperimente durchgeführt worden. Es gibt dazu keine Daten bezüglich Ausmaß der Welke, Welkeindex und Bakterientiter bei Infektion mit *Cmm* Stämmen. Um den Krankheitsverlauf von *L. pimpinellifolium* bei Infektion mit *Cmm* mit dem von *S. lycopersicum* cv. Moneymaker vergleichen zu können, wurde die Infektion genauso durchgeführt wie bei *S. lycopersicum* cv. Moneymaker und ebenfalls zweimal wiederholt (n=3).

Im Experiment zeigte sich, dass es Unterschiede im Ausmaß der Krankheitssymptome zwischen diesen beiden Tomatenarten bei Infektion mit *Cmm*-Stämmen gibt. Nur der Wildtypstamm *Cmm382*, der beide Pathogenitätsdeterminanten *celA* und *pat-1* trägt, löst bei *L. pimpinellifolium* eine ähnlich starke Welke mit den klassischen Welkesymptomen wie bei *S. lycopersicum* cv. Moneymaker aus. Bei einer Infektion mit dem Stamm CMM101, der nur noch das eine Plasmid pCM1 trägt, bilden sich über den beobachteten Zeitraum keine sichtbaren Welkesymptome aus. Dieser Stamm führt nicht zu äußerlich sichtbaren Krankheitssymptomen, kann aber die Pflanze noch effektiv kolonisieren. Um die *tomA*-Mutante *CmmTom2* mit dem Wildtyp-Kontrollstamm CMM101 zu vergleichen, kann deshalb nur der Titer betrachtet werden, da ein klassisches Welkediagramm analog dem Pflanzentest mit *S. lycopersicum* cv. Moneymaker nicht erstellt werden kann.

	<i>Cmm382</i>	CMM101	<i>CmmTom2</i>
Titer CFU / g Pflanzenhomogenat	$8,21 \pm 8,10 \cdot 10^9$	$1,08 \pm 0,90 \cdot 10^8$	$0,68 \pm 1,04 \cdot 10^7$
Welkeindex	12	-	-

Tab. 12: Bakterientiter pro Gramm Pflanzenhomogenat von *Cmm382*, CMM101 und *CmmTom2* 28 Tage nach Infektion von *Lycopersicon pimpinellifolium*. Welkeindex (in Tagen) von *Cmm382* bestimmt aus drei unabhängigen Tests, je 28 Pflanzen, Titerbestimmung: *Cmm382*, n=14 Pflanzen; CMM101, n=15 Pflanzen; *CmmTom2*, n=18 Pflanzen

Betrachtet man den Titer, den der Wildtypstamm *Cmm382* welcher beide Plasmide trägt, 28 Tage nach Infektion in *L. pimpinellifolium* erreicht, so sieht man, dass dieser mit $8,21 \cdot 10^9$ CFU/g Pflanzenhomogenat vergleichsweise so hoch ist wie nach Infektion von *S. lycopersicum* cv. Moneymaker mit *Cmm382* bzw. CMM101 (Meletzus et al., 1993).

Der vergleichende Titer der Stämme CMM101 und *CmmTom2* zeigt einen Unterschied zwischen *tomA*-Mutante und Wildtyp. Der Bakterientiter, der von der *tomA*-Mutante *CmmTom2* in der Pflanze erreicht wird, ist reduziert gegenüber dem Wildtyp-Kontrollstamm CMM101. Eine Infektion mit der *tomA*-Mutante führt vier Wochen nach der Infektion zu einem Titer von nur $0,7 \cdot 10^7$ CFU/g Pflanzenhomogenat, CMM101 hingegen erreicht einen Titer von etwa $1,1 \cdot 10^8$ Pflanzenhomogenat. Aufgrund der hohen Standardabweichung ist auf den ersten Blick nicht zu ersehen, ob dieser deutliche Unterschied tatsächlich signifikant ist.

Da die Daten in diesem Fall nicht normalverteilt sind, konnte zur Überprüfung ein t-Test nicht durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde der Wilcoxon-Rangsummentest gewählt. Dabei wurde untersucht, ob die Titer von CMM101 und *CmmTom2* gleich sind (Nullhypothese, H_0). Mit einem p-Wert kleiner als 0,05 wurde diese Nullhypothese eindeutig abgelehnt. Somit konnte gezeigt werden, dass hier ein signifikanter Unterschied in dem Titer von *CmmTom2* gegenüber CMM101 vorliegt.

Im Gegensatz zur Infektion von *S. lycopersicon* führte der Defekt in der Tomatinase von *Cmm* bei Infektion der Wildtyp-Tomate zu einem niedrigerem Titer *in planta*.

Hypersensitive Reaktion (HR) an *Mirabilis jalapa*

Zur weiteren Analyse der Mutante wurde die hypersensitive Reaktion an einer Nichtwirtspflanze untersucht. Hiermit sollte überprüft werden, ob die untersuchten Bakterienstämme noch als pathogene Organismen erkannt werden können.

Dazu wurde eine Bakteriensuspension von der Blattunterseite in das Blattgewebe infiltriert. Nach drei Tagen wurde überprüft, ob hypersensitive Reaktionen als Antwort auf die infiltrierten Bakterienstämme induziert wurde. Bei der hypersensitiven Reaktion handelt es sich um einen lokalen Zelltod der Gewebezellen, der als Reaktion auf das eingedrungene Pathogen in der unmittelbaren Nähe der Eintrittsstelle ausgelöst wird. Dieser geht einher mit durch polymerisierte Phenole meist dunkel gefärbte Nekrosen, die dazu führen, dass das Pathogen eingekapselt wird und so an der Ausbreitung in der Pflanze gehindert wird. Die Ausprägung einer möglichen hypersensitiven Reaktion wurde an *Mirabilis jalapa* durchgeführt (Gitaitis et al., 1990).

Bei diesem Test wurden als Negativkontrolle der Resuspendierungspuffer (PS-Puffer) und als Positivkontrollen die Stämme *Cmm382*, CMM101, CMM100 mitgeführt.

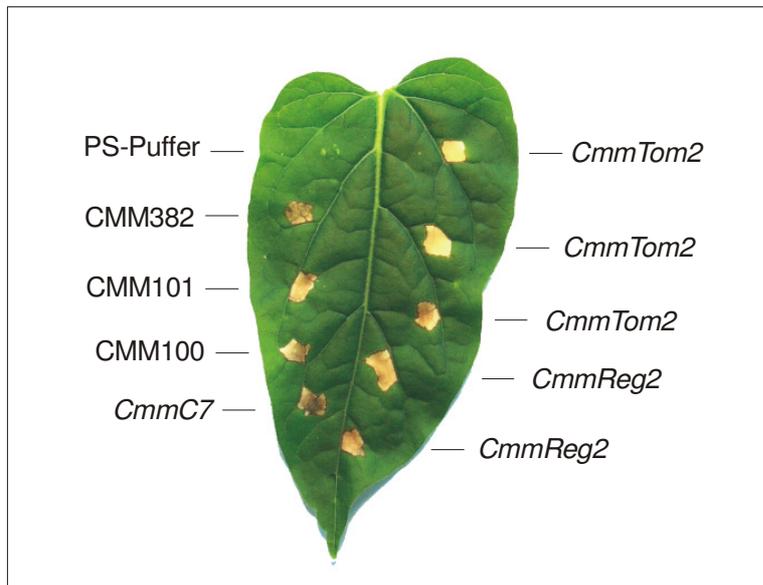


Abb. 20: Induktion der hypersensitiven Reaktion durch *Cmm* Stämme bei *Mirabilis jalapa*.

Man erkennt eindeutig, dass sowohl die Kontroll-Stämme *Cmm382*, *CMM101*, *CMM100* als auch die *tomA*-Mutanten *CmmTom2* und *CmmC7*, sowie die *regB*-Mutante *CmmReg2* eine hypersensitive Reaktion auslösen. In diesem Test auf HR gibt es also keinen Unterschied zwischen den *tomA*-Mutanten und den Wildtyp-Kontrollstämmen. Alle lösen bei *Mirabilis jalapa* eindeutig eine hypersensitive Reaktion aus.

IV. Überexpression und Reinigung der Tomatinase aus *E. coli*

Zur weiteren Charakterisierung der Tomatinase TomA sollten deren enzymatischen Eigenschaften analysiert werden. Dazu war es notwendig, dass die Tomatinase gereinigt in geeigneter Konzentration vorlag. Das *tomA*-Gen wurde dazu in einem geeigneten Expressionsvektor kloniert, in *E. coli* überexprimiert und anschließend über Nickel-Affinitätschromatografie aufgereinigt. Das aufgereinigte Protein konnte dann für weitere Enzymtests eingesetzt werden.

Klonierung

Als Expressionsvektoren wurden Vektoren der pET-Familie (Novagen) gewählt. Die pET-Vektoren verfügen über ein Ampicillinresistenzgen zur Selektion der Klonierungsprodukte, starke σ^{70} -Promotoren für die Expression des gewünschten Proteins und C-terminale (pET 22b) bzw. N-terminale (pET 15b) His-Tags zur Reinigung der Expressionsprodukte über Nickel-Affinitätschromatografie. Der Vektor pET 22b trägt außerdem noch ein N-terminales *E. coli* - Signalpeptid-Gen (*pelB*-leader), welches einer Ausschleusung des exprimierten Genprodukts in das Periplasma dienen soll.

Durch die Wahl unterschiedlicher Primer (siehe Tab. 8, Material und Methoden) wurden drei verschiedene PCR-Produkte des *tomA*-Gens amplifiziert. Diese wurden daraufhin über die entsprechenden Restriktionsschnittstellen (siehe Tab. 8, Material und Methoden) in die Expressionsvektoren pET-22b und pET-15b kloniert.

Es wurde ein PCR-Produkt über den kompletten kodierenden Bereich von *tomA* amplifiziert (Primer a und c), welches über die flankierenden Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *NotI* in den Vektor pET-22b kloniert wurde.

Ein weiteres PCR-Produkt wurde über den kodierenden Bereich von *tomA* aber ausschließlich des von SignalP vorhergesagten Signalpeptids amplifiziert (Primer b und c), welches über die flankierenden Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *NotI* ebenfalls in den Vektor pET-22b kloniert wurde. Ein drittes PCR-Produkt wurde über die N-terminale katalytische Domäne des *tomA* Gens ausschließlich des von SignalP vorhergesagten Signalpeptids hergestellt (Primer d und e), welches über die flankierenden Restriktionsschnittstellen *NdeI* in den Vektor pET-15b kloniert wurde.

Auf diese Weise wurden drei verschiedene Expressionsvektoren konstruiert, die

- a) das komplette *tomA* Gen (pTom16_{EC})
- b) das *tomA* Gen, ohne Signalpeptid (pTom16_E)
- c) nur die vordere katalytische Domäne ebenfalls ohne Signalpeptid (pTom11) enthalten (siehe Abb. 21).

a) und b) besitzen darüber hinaus noch den *pelB*-leader, ein *E. coli* spezifisches Signalpeptid. Somit trägt das erste Konstrukt N-terminal zwei Signalpeptide – das von *E. coli* und von *Cmm*, das zweite nur das *E. coli*-Signalpeptid und das dritte weder *E. coli*-, noch *Cmm*-Signalpeptid. Bei den ersten beiden Konstrukten ist der His-Tag C-terminal, beim letzten N-terminal lokalisiert.

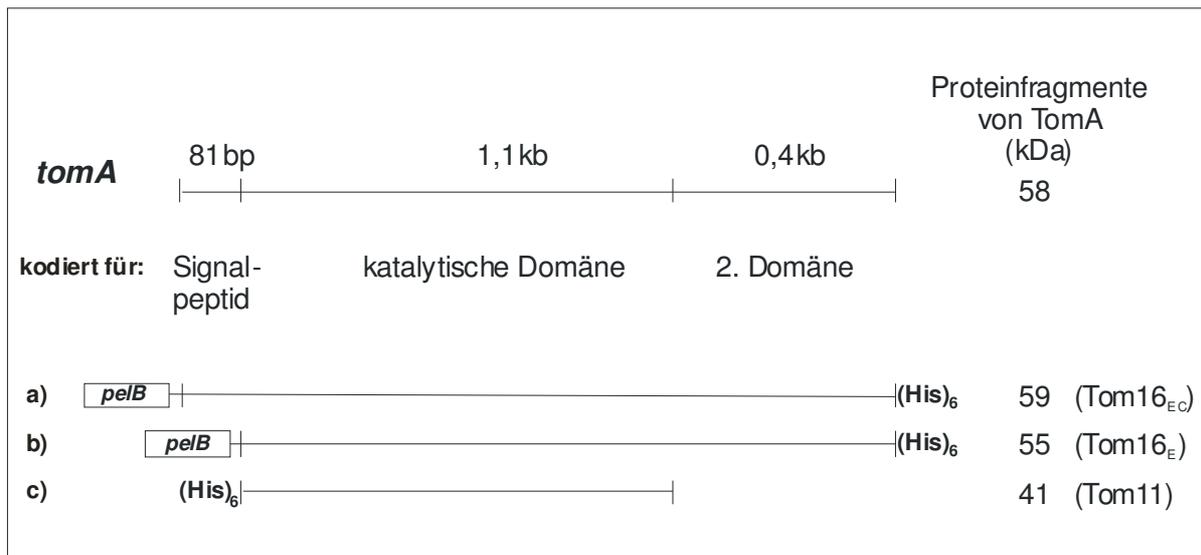


Abb. 21: Unterschiedliche Amplifikate des *tomA* Gens wie sie in den verschiedenen Expressionsvektoren vorliegen: a) pTom16_{EC}; b) pTom16_E; c) pTom11.

Hinweise zur gewählten Nomenklatur der drei unterschiedlichen Expressionskonstrukte Tom16_{EC}, Tom16_E, Tom11:

„Tom16“: amplifiziertes *tomA*-Fragment mit 1,6 kb Länge über beide Domänen

„Tom11“: amplifiziertes *tomA*-Fragment mit 1,1 kb Länge nur über N-terminale katalytische Domäne

Index „E“: *E. coli*-leader N-terminal

Index „C“: *Cmm*-Signalpeptid N-terminal

Bei allen drei Expressionsplasmiden wurde nach der Klonierung durch entsprechende Sequenzierungen bestätigt, dass keine Mutation im *tomA*-Gen stattgefunden hatte. Sie weisen weder Basenaustausche, *frame shifts*, noch sonstige Mutationen auf.

Diese drei unterschiedlichen Amplifikate von *tomA* sind so gewählt worden, dass bei den nachfolgenden Enzymtests überprüft werden konnte, ob für die katalytische Funktion der Tomatinase das komplette Gen, oder nur der vordere N-terminale Bereich, welcher gute Homologien zu Xylanasen der Glycosylhydrolasefamilie 10 aufweist, für die Tomatinaseaktivität notwendig ist. Außerdem konnte überprüft werden, ob das Fehlen der vorhergesagten Signalpeptiddomäne die katalytische Funktion des Genproduktes von *tomA* beeinflusste.

Expression

Die Expression aller drei TomA-Proteine erfolgte im Stamm *E. coli* BL21(DE)3. Nach Induktion mit 1 mM IPTG war die Zunahme des gebildeten Proteins über einen untersuchten Zeitraum von vier Stunden deutlich zu erkennen. Abb. 22 zeigt die Expression des gebildeten Proteins exemplarisch für Tom16_{EC}.

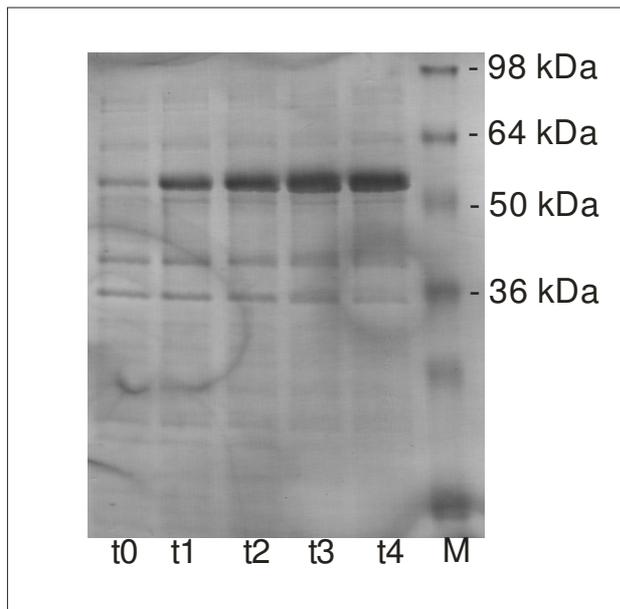


Abb. 22: SDS-PAGE, Coomassiefärbung: *E. coli* BL21(DE)3 transformiert mit pTom16_{EC}; t0-t4: je 20 µL Kultur 0, 1, 2, 3, 4 Stunden nach Induktion mit IPTG 1mM; M: 7,5 µL Proteinmarker „SeeBlue“

In Abb. 22 ist deutlich die Zunahme einer Proteinbande im zeitlichen Verlauf zu erkennen, die der für das *tomA*-Genprodukt zu erwartenden Größe von etwa 59 kDa entspricht (vergleiche auch Abb. 21).

Auch bei einer Induktion der anderen beiden Expressionsvektoren pTom16_E und pTom11 mit 1 mM IPTG wird ein Protein entsprechend der zu erwartenden Größe gebildet (s. Abb 21).

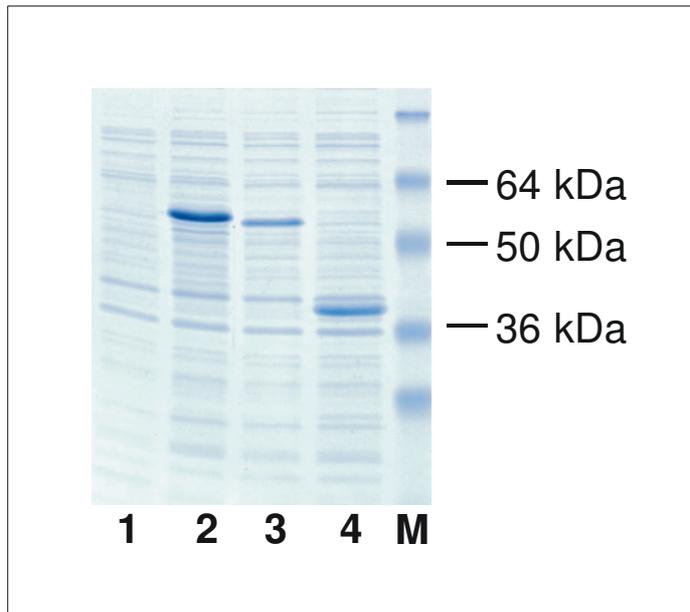


Abb. 23: SDS-PAGE, Coomassiefärbung: je 20 μ L der Kulturen von *E. coli* BL21(DE)3 vier Stunden nach Induktion mit IPTG (1 mM) transformiert mit 1) pET-22b (Kontrolle); 2) pTom16_{EC}; 3) pTom16_E; 4) pTom11; M) Proteinmarker „SeeBlue“, 8 μ L

In Spur 1 ist zur Kontrolle eine Probe des *E. coli* Expressionsstammes, der nur mit dem Expressionsvektor pET-22b, ohne Insert, transformiert wurde, aufgetragen. Dieser Stamm bildet wie erwartet, nach Induktion mit IPTG, kein Protein in der Größe eines der drei TomA-Konstrukte. Bei Induktion aller drei hergestellten Expressionsvektoren werden Proteine in der zu erwartenden Größe gebildet: 59 kDa in Spur 2 für Tom16_{EC}; 55 kDa in Spur 3 für Tom16_E und 41 kDa in Spur 4 für Tom11. Diese entsprechen den erwarteten Größen (vergleiche Abb. 21).

Aktivitätsnachweis

Es sollte überprüft werden, ob die in *E. coli* exprimierten TomA-Proteine enzymatisch aktiv sind. Dazu wurden Enzymtests mit konzentrierten Kulturüberständen und Proteinrohextrakten der *E. coli* Stämme, transformiert mit den drei TomA-Expressionsvektoren, durchgeführt, bei denen analog zu den in Kapitel I beschriebenen Enzymtests mit *Cmm* vorgegangen wurde.

Die drei *E. coli*-Stämme wurden aus einer ü/N Vorkultur auf 100 mL OD₅₈₀ 0,6 verdünnt und nach Induktion mit 1 mM IPTG für drei Stunden bei 37 °C kultiviert. Danach wurden sowohl Proteinrohextrakte als auch konzentrierte Kulturüberstände gewonnen und für

Enzymtests mit α -Tomatin als Substrat eingesetzt. Substrat und Reaktionsprodukte wurden in einer Dünnschichtchromatografie analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 24 dargestellt.

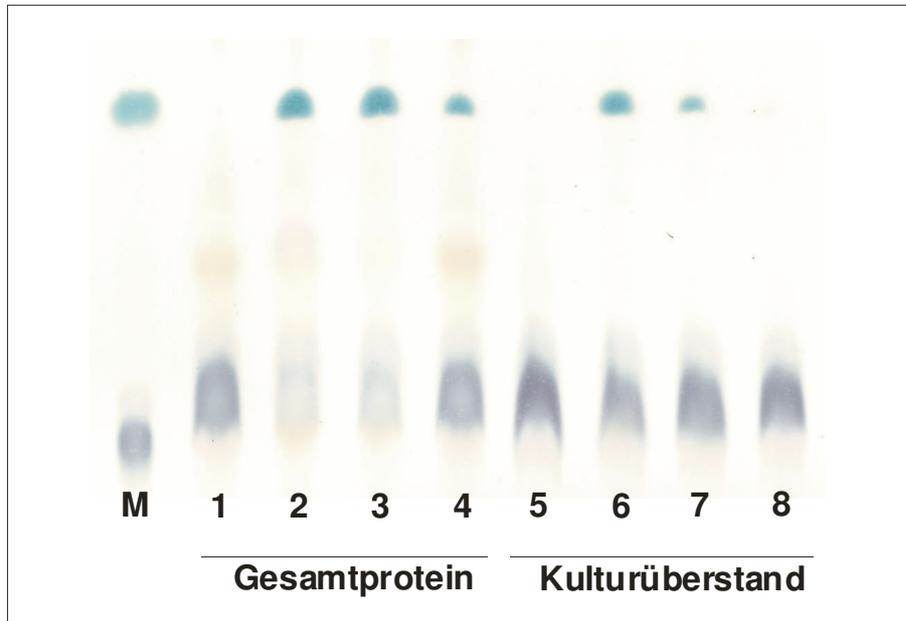


Abb. 24: Dünnschichtchromatografie nach Enzymtest mit α -Tomatin als Substrat. Eingesetzt wurden je 500 μ g Gesamtprotein (Spuren 1-4) und konzentrierte Überstände (Spuren 5-8) des *E. coli* Expressionsstammes BL21(DE)3 transformiert mit pET-22b (Spur 1, 5); pTom16_{EC} (Spur 2, 6); pTom16_E (Spur 3, 7); pTom11 (Spur 4, 8); M: Standard, α -Tomatin und Tomatidin gelöst in Methanol

In der Dünnschichtchromatografie (Abb. 24) sind die Reaktionsprodukte nach erfolgtem Enzymtest gegen α -Tomatin aufgetragen. Alle drei *E. coli* - Konstrukte zeigten nach der Expression in BL21(DE)3 katalytische Aktivität. In den Spuren 1 – 4 sind jeweils die Reaktionsprodukte des Enzymtests aufgetragen, welche mit Gesamtprotein der *E. coli*-Transformanden durchgeführt wurden. Als Negativ-Kontrolle wurde Proteinrohextrakt eines *E. coli* Stammes verwendet, der mit dem Vektor pET-22b, ohne kloniertes *tomA*-Fragment, transformiert worden ist (Spur 1). Durch Verwendung dieses Proteinrohextraktes, bei dem sich kein Abbau des eingesetzten α -Tomatins zeigte, wurde demonstriert, dass das verwendete Expressionssystem (*E. coli* BL21(DE)3 mit pET-22b) α -Tomatin nicht hydrolysieren konnte. Der Proteinrohextrakt der drei eingesetzten Konstrukte (pTom16_{EC}, pTom16_E, pTom11) hydrolysierte in allen drei Fällen das eingesetzte α -Tomatin (Spuren 2-4). Ebenso wurden konzentrierte Kulturüberstände für den Enzymtest eingesetzt, um zu sehen, welche *E. coli*-Konstrukte das gebildete Protein aus der Zelle ausschleusen (Spuren 5-8). Der Kulturüberstand des *E. coli*-Stammes, der

nur mit dem Vektor, ohne Insert, transformiert wurde, zeigt, wie erwartet, keine Aktivität (Spur 5). Spur 6 und 7 zeigten hydrolytische Aktivität. Hier wurden Überstände der *E. coli*-Kulturen verwendet, die Konstrukte mit dem N-terminalen *E. coli*-leader *pelB* tragen, welcher für eine Ausschleusung des gebildeten Proteins in das Kulturmedium sorgt. Eine katalytische Aktivität in dem Kulturüberstand der *E. coli*-Kultur, transformiert mit dem kurzen 1,1 kb *tomA*-Fragment ohne *E. coli*- und *Cmm*-Signalpeptid, blieb aus (Spur 8).

Damit konnte gezeigt werden, dass alle drei *E. coli*-Konstrukte auch katalytisch aktiv waren, also in dem *E. coli* Stamm BL21(DE)3 exprimiert und korrekt zu einem aktiven Enzym gefaltet wurden. Außerdem zeigte sich, wie erwartet, dass das *E. coli pelB*-Signalpeptid für eine Ausschleusung des gebildeten Proteins aus der *E. coli* Zelle sorgt. Dabei wurden aber nicht alle gebildeten Proteine aus der Zelle ausgeschleust, ein Teil der exprimierten Proteine blieb in der *E. coli* Zelle zurück. Der Enzymtest mit dem eingesetzten Gesamtprotein zeigte dieses an: In allen Fällen, wo Gesamtprotein eingesetzt wurde, fand auch eine Hydrolyse des Substrates α -Tomatin statt.

Anhand dieses Experimentes konnte auch gezeigt werden, dass die katalytische Funktion von der N-terminalen Domäne von TomA ausgeht. Die hintere Domäne von TomA muss nicht vorhanden sein, um α -Tomatin zu hydrolysieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch die vorhergesagte Signalpeptid-Domäne von *tomA* nicht vorhanden sein muss, um ein katalytisch aktives Protein zu erhalten.

Reinigung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass alle drei TomA-Proteine in *E. coli* exprimiert werden und zudem auch katalytisch aktiv sind, wurden diese gereinigt. Alle drei Konstrukte besitzen einen Histidin-Tag, bestehend aus sechs aufeinander folgenden Histidinresten, der C-terminal (Tom16_{EC} und Tom16_E), bzw. N-terminal (Tom11) bei den exprimierten Tomatinase-Proteinen lokalisiert ist. Durch eine Affinitätschromatografie, bei der Nickelionen an einem entsprechenden Trägermaterial fixiert sind, konnten diese Konstrukte gereinigt werden. Die exprimierten Proteine haben durch die sechs Histidinreste eine hohe Affinität zu diesen immobilisierten Nickelionen, binden daran und können nach mehreren Waschschritten mit Imidazol von dem Säulenmaterial wieder eluiert werden.

Reinigung des Expressionskonstruktes Tom16_E

Um festzulegen aus welchem Kompartiment von *E. coli* nach erfolgter Überexpression das Protein isoliert werden sollte, musste untersucht werden, in welchen Kompartimenten von *E. coli* sich die exprimierte Tomatinase quantitativ befindet. Hierzu wurde ein Kompartimenttest durchgeführt, bei dem Kultur und Zellpellet schrittweise aufgereinigt wurden, so dass man Fraktionen vom Überstand, Periplasma, Zytoplasma und eventuell vorhandenen *Inclusion Bodies* gewinnen und die einzelnen Fraktionen in einer SDS-PAGE analysieren konnte. In den *Inclusion Bodies* befinden sich Proteine grundsätzlich in einem denaturierten Zustand, da in *Inclusion Bodies* häufig Proteine abgelegt werden, die nicht korrekt gefaltet wurden. Dieses kann häufig bei einer starken, induzierten Expression der Fall sein. In den anderen Fraktionen, Überstand, Periplasma, Zytoplasma liegen die Proteine in nativer, also katalytisch aktiver Form, vor.

Anhand des durchgeführten Kompartimenttests zeigte sich, dass sich sowohl in der Zytoplasmafraktion als auch insbesondere in *Inclusion Bodies* viel Proteinmaterial befand (Daten nicht gezeigt).

Aufreinigung durch Affinitätschromatografie

Zur Isolierung des Proteins schließt sich an die Expression eine Aufreinigung über den His-Tag an. Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten der Aufreinigung: nativ oder denaturiert.

Eine Aufreinigung unter nativen Bedingungen ist immer die erste Wahl, da das Protein in der Form gereinigt wird, von der angenommen wird, bzw. in diesem Fall sogar bekannt ist, dass es katalytisch aktiv ist. In diesem Fall zeigte sich allerdings, dass das His-getagte Protein unter nativen Bedingungen nicht oder nur unzureichend an das verwendete Nickel-Säulenmaterial bindet (Daten nicht gezeigt). Dazu wurde die Zytoplasmafraktion nach Zellaufschluss mit der French Press auf das entsprechende Säulenmaterial gegeben. Nach mehreren Waschschritten und abschließender Elution mit Imidazol konnte aber kein bzw. kaum Protein weder in den Waschschritten noch in der Elutionsfraktion nachgewiesen werden. Hingegen zeigte sich viel Protein in der Durchflussfraktion (Daten nicht gezeigt). Das liegt möglicherweise daran, dass unter nativen Bedingungen der C-terminale His-Tag nicht frei zugänglich ist und das überexprimierte Protein nicht an das Säulenmaterial binden kann.

Somit musste unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet werden. Durch die Denaturierung mit 8 Mol Harnstoff verliert das Protein seine aktive Konformation und somit auch seine Aktivität, bindet aber deutlich besser an das Säulenmaterial. Da unter

denaturierenden Bedingungen gearbeitet werden sollte, wurde das Protein aus den *Inclusion Bodies* aufgereinigt. In *Inclusion Bodies* liegen Proteine in nicht löslicher Form vor, dafür aber in einem vorgereinigten Zustand, da sie bereits isoliert von restlichen zellulären Proteinen sind. Der Kompartimenttest zeigte, dass sich ein hoher Anteil der exprimierten Proteine in *Inclusion Bodies* befand.

Zur Gewinnung der *Inclusion Bodies* wurden die Zellen mit 1 mM IPTG induziert, nach 4 Stunden Inkubation auf dem Schüttler bei 37°C geerntet und mit der French Press aufgeschlossen. Das Abtrennen der *Inclusion Bodies* von den übrigen Zellproteinen, welches bereits einen ersten Reinigungsschritt darstellt, erfolgte durch mehrere aufeinander folgende Reinigungsschritte mit verschiedenen Puffern. Danach wurden die isolierten *Inclusion Bodies* in 8 Mol Harnstoff gelöst und unter diesen Bedingungen über die Nickel-Affinitätschromatografie gereinigt.

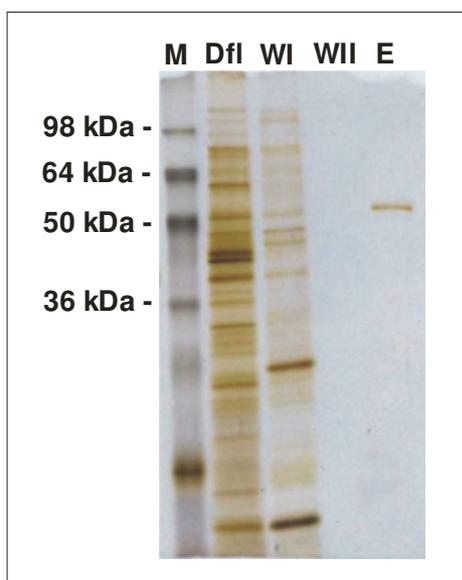


Abb. 25: SDS-PAGE, Silberfärbung: Aufreinigung durch Nickelaffinitätschromatografie unter denaturierenden Bedingungen von Tom16_E. M: Marker SeeBlue, Dfl: Säulendurchflussfraktion, WI: Waschfraktion 1, WII: Waschfraktion 2, E: Elutionsfraktion 500 mM Imidazol

In Abb. 25 ist die Aufreinigung am Beispiel von Tom16_E anhand einer SDS-PAGE dokumentiert, dargestellt. Aufgetragen sind Durchfluss-, Wasch-, und Elutionsfraktionen der Affinitätschromatografie. Es ist deutlich zu erkennen, dass in der Durchflussfraktion und in der Waschfraktion 1 noch verschiedene Proteinbanden auftauchen. Aber im Eluat (Spur E) befindet sich nur noch eine singuläre Bande in der für Tom16_E zu erwartenden Größe von 55 kDa.

Gelöst in 8 Mol Harnstoff liegt das Protein völlig denaturiert und somit enzymatisch inaktiv vor. Um die Aktivität wieder herzustellen, muss das Protein renaturiert, also in die aktive Konformation überführt werden. Durch Dialyse wird schrittweise der Harnstoff aus der Proteinlösung entfernt. Das Protein faltet sich zurück und erhält seine aktive Konformation wieder. Die Dialyse erfolgte gegen den Renaturierungspuffer Roti-Fold der Fa. Roth.

Analog dem Vorgehen bei der Aufreinigung zu Tom16_E sind auch die anderen beiden Expressionsprodukte, Tom16_{EC} und Tom11 unter denaturierenden Bedingungen aus Inclusion Bodies über Nickel-Affinitätschromatografie aufgereinigt worden und durch Dialyse gegen den Renaturierungspuffer Roti-Fold renaturiert worden. Alle drei Konstrukte wurden auf diese Weise gereinigt, da alle drei Konstrukte unter nativen Bedingungen schlecht an das verwendete Säulenmaterial banden. Zudem wurde dadurch die Vergleichbarkeit der aufgereinigten Proteine erhöht, da alle drei Proteine nach dem gleichen Aufreinigungsprozess isoliert wurden.

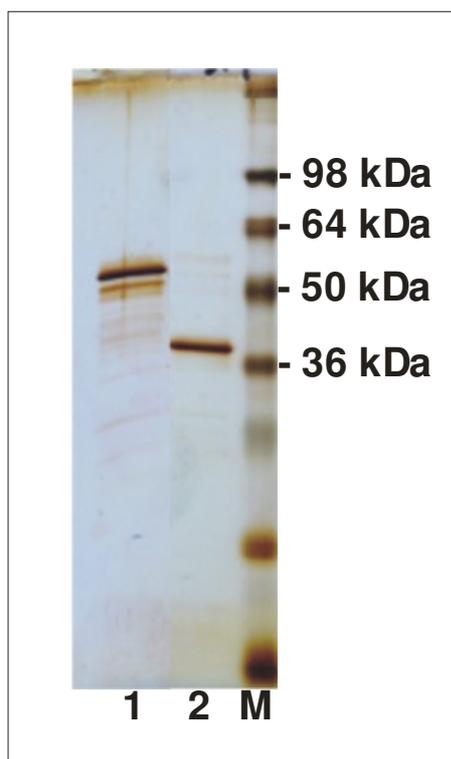


Abb. 26: SDS-PAGE, Silberfärbung: Aufgereinigte Proteine nach Renaturierung (je 10 μ L). Spur 1: Tom16_{EC}, Spur 2: Tom11, Spur M: Proteinmarker, SeeBlue®, 5 μ L

In Abb. 26 erkennt man den Erfolg der Affinitätsreinigung für die anderen beiden TomA-Konstrukte, Tom16_{EC} (Spur 1) und Tom11 (Spur 2). Aufgetragen sind jeweils die

Elutionsfraktionen nachdem die Proteine über die Säule gegeben und mit Waschsritten gereinigt wurden. Eluiert wurde mit 500 mM Imidazol.

Es wurden Banden in der zu erwartenden Größenordnung für beide Proteine erhalten, 59 kDa für Tom16_{EC}, und 41 kDa für Tom11. In der SDS-PAGE zeigte sich aber auch, dass Tom16_{EC} neben der Hauptbande von 59 kDa geringfügige Verunreinigungen enthält.

Aktivitätsnachweis der aufgereinigten Expressionsprodukte

Um zu überprüfen, ob die TomA-Proteine nach dieser Aufreinigungsprozedur noch katalytisch aktiv sind, wurde mit allen drei aufgereinigten und renaturierten Konstrukten ein Aktivitätstest durchgeführt. Dazu wurden gleiche Mengen an gereinigtem Protein der überexprimierten Konstrukte für einen Enzymtest mit α -Tomatin als Substrat eingesetzt. Die Reaktionsprodukte und -produkte wurden in einer Dünnschichtchromatografie analysiert (Abb. 27).

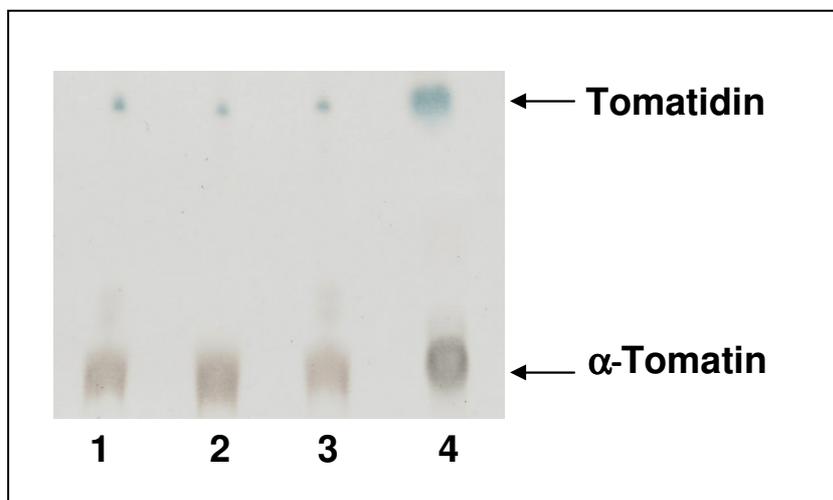


Abb. 27 Dünnschichtchromatografie der Reaktionsprodukte nach Enzymtest gegen α -Tomatin als Substrat mit folgenden Proteinen als Enzym: Spur 1: Tom16_{EC}, Spur 2: Tom16_E, Spur 3: Tom11, Spur 4: Standard α -Tomatin/Tomatidin gelöst in MeOH

Abb. 27 zeigt, dass alle drei Proteine nach der Dialyse katalytisch aktiv sind, da in allen drei Fällen das Abbauprodukt Tomatidin nachgewiesen werden konnte. Somit konnte gezeigt werden, dass am Ende dieses aufwendigen Aufreinigungsprozesses katalytisch aktive Proteine erhalten wurden. Dieses ist nicht selbstverständlich, denn bei der Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen handelt es sich um ein sehr

drastisches Verfahren, das für das Protein nicht gerade schonend ist. Außerdem ist im Vorfeld nie gänzlich sicher, ob bei der anschließenden Dialyse die korrekte Rückfaltung wirklich stattfindet.

Massenspektrometrische Analyse der Hydrolyseprodukte von α -Tomatin

Mittels Dünnschichtchromatografie kann die Hydrolyse von α -Tomatin zu Tomatidin gezeigt werden. Um auszuschließen, dass bei der Hydrolyse des α -Tomatins neben den Abbauprodukten Tomatidin und Lycotetraose nicht doch noch weitere Produkte gebildet werden, die mit der Methode der Dünnschichtchromatografie nicht entdeckt werden können, wurden die Reaktionsprodukte der Enzymtests zusätzlich mit MALDI-MS untersucht.

Dazu wurden jeweils 100 μ L aller drei aufgereinigten Tomatinase-Konstrukte mit 20 μ L α -Tomatin (10 mM) über Nacht bei 28 °C inkubiert, danach bei 72 °C für 10 Minuten inaktiviert und denaturierte Proteine abzentrifugiert. Der Reaktionsüberstand wurde in einer Massenspektrometrie analysiert (siehe Abb. 28).

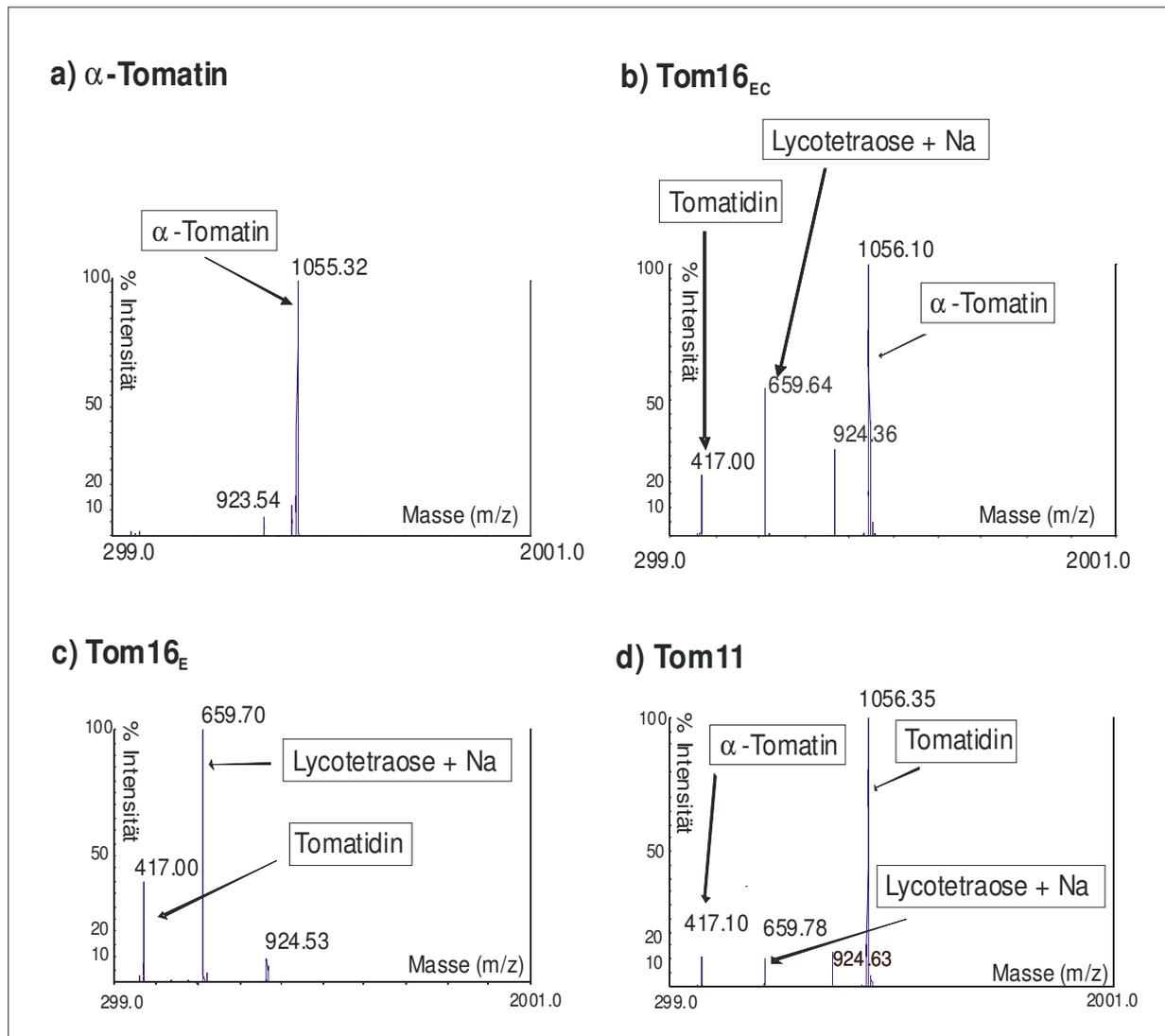


Abb. 28: MALDI-MS Analysen der Reaktionsprodukte nach Enzymtest

a) Reinsubstanz α -Tomatin, 10 mM, gelöst in Na-Citrat-Puffer, 50 mM, pH 4; b) - d) Überstände der Reaktionsansätze mit den Tomatinase-Konstrukten: Tom16_{EC}, 8,8 μ g Protein (b); Tom16_E, 24,2 μ g Protein (c) und Tom11, 2,9 μ g Protein (d) und jeweils 0,2 μ mol α -Tomatin als Substrat

In a) ist das Substrat α -Tomatin, gelöst in Natriumcitratpuffer, wie es in den Enzymtests eingesetzt wird, vermessen worden. Man erkennt, dass neben der Masse für α -Tomatin (1055 m/z), noch eine weitere Masse detektiert wurde (923 m/z). Hierbei handelt es sich um Verunreinigungen in dem Substrat. Laut Hersteller (Fa. Sigma) handelt es sich bei diesem α -Tomatin um ein Isolat aus der Natur, welches produktionsbedingt geringfügige Verunreinigungen enthält. Der Hersteller gibt die Reinheit mit 89 % an. Zu diesen Verunreinigungen muss somit auch das Signal mit dem Wert 923 m/z zählen, das sich sowohl in der vermessenen Reinsubstanz, als auch in allen weiteren Maldi-MS Analysen wiederfindet und somit kein Abbauprodukt des α -Tomatins durch die eingesetzten Tomatinase-Konstrukte darstellt.

In b), c) und d) sind die Reaktionsprodukte eines Enzymtestes mit den drei Tomatinase-Konstrukten Tom16_{EC}, Tom16_E, und Tom11 untersucht worden. In allen drei Fällen tauchen jeweils nur zwei neue Signale auf, die eindeutig den Reaktionsprodukten Tomatidin (417 m/z) und Lycotetraose (659 m/z) zugeordnet werden können. Für die einzelnen Enzymtests wurden zwar die gleichen Volumina an Enzymlösung eingesetzt, da bei einer nachträglichen Kontrolle aber große Schwankungen in den Konzentrationen festgestellt wurden, resultierten daraus unterschiedliche Mengen an absoluter, eingesetzter Enzymmenge. Daher sind nach Ablauf des Enzymtests zum Teil noch Rest-Substratmengen in den Proben vorhanden. Nur bei c) wird das eingesetzte Substrat α -Tomatin vollständig hydrolysiert, wohingegen bei b) und d) am Ende des Tests noch Substrat vorhanden ist und somit noch der Massenwert für α -Tomatin (1055 m/z) in dem Massenspektrogramm erscheint. In allen drei Fällen konnte aber gezeigt werden, dass neben der Lycotetraose und dem Tomatidin keine weiteren Reaktionsprodukte entstehen und somit die Tomatinase von *Cmm* das komplette Tetrasaccharid vom α -Tomatin abspaltet und keine weiteren Reaktionsprodukte gebildet werden.

V. Biochemische Charakterisierung der Tomatinase

Da die heterolog in *E. coli* exprimierte Tomatinase nun gereinigt und in katalytisch aktiver Form vorlag, konnten verschiedene enzymatische Tests zur weiteren Charakterisierung des Enzyms durchgeführt werden.

Der bisherige Nachweis zur Überprüfung der Funktionalität der Tomatinase-Konstrukte, die Dünnschichtchromatografie, bietet nur die Möglichkeit einer qualitativen Umsatzbestimmung. Für eine genauere Charakterisierung der Tomatinase benötigt man jedoch eine quantitative Bestimmungsmöglichkeit der umgesetzten Substratmenge.

Mit Hilfe der 3,5-Dinitrosalicylsäure (3,5-DNS Methode) kann die Menge an freien, reduzierenden Zuckern in einer Lösung durch eine Farbreaktion quantifiziert werden (Miller, 1959). Der Zucker in der zu untersuchenden Lösung reduziert dabei die 3,5-Dinitrosalicylsäure, deren Reduktionsprodukt gefärbt ist. Die Konzentration an reduzierenden Zuckern in einer Lösung ist dabei proportional der Farbreaktion und kann fotometrisch durch Bestimmung der Absorption bei 520 nm bestimmt werden. Das

eingesetzte Reagenz enthält neben der 3,5-Dinitrosalicylsäure NaOH für die Reduktionsreaktion der Dinitrosalicylsäure, Phenol zur Erhöhung der Farbintensität, Sulfid zur Stabilisierung des Farbkomplexes und eine geringe Menge Zucker (1 mM Galaktose), um auch noch geringe Zuckerkonzentrationen im linearen Messbereich detektieren zu können.

Bei der Hydrolyse des α -Tomatin-Moleküls durch die Tomatinase entsteht als Produkt neben dem Tomatidin auch das Tetrasaccharid Lycotetraose. Dieses Zuckermolekül weist nach der katalytischen Hydrolyse ein reduzierendes Ende an dem Galaktoserest auf. Die Menge an freigewordener Lycotetraose kann somit indirekt durch Bestimmung der Zunahme der reduzierenden Zucker in der Lösung bestimmt werden und damit die katalytische Hydrolyse von α -Tomatin durch die Tomatinase quantifiziert werden.

Zunächst wurde eine Eichkurve mit Galaktose in verschiedenen Konzentrationen erstellt. Abgestimmt auf die nachfolgenden Enzymreaktionen wurde die Eichreihe mit Galaktosekonzentrationen von 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 und 5 mM Galaktose in der zu bestimmenden Probe von jeweils 200 μ L Volumen angesetzt. Dadurch ergaben sich absolute Stoffmengen an Galaktose von 0,02 μ mol bis 1 μ mol, die mit dieser Methode linear detektiert werden können (siehe Abb. 29).

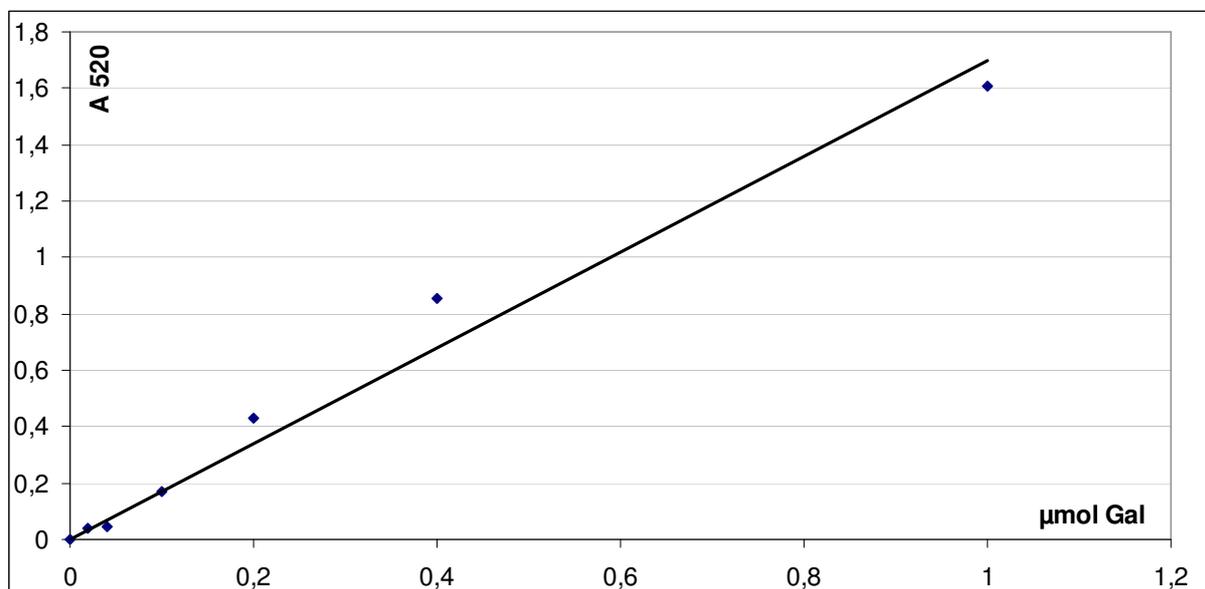


Abb. 29: 3,5-DNS-Methode: Eichreihe mit Galaktose. Linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration an reduzierenden Zuckern (Galaktose) und Absorption bei 520 nm

Bestimmung des Temperatur-Optimums

Zur Bestimmung des Temperatur-Optimums der Tomatinase (siehe Abb. 17) wurden Reaktionsansätze mit definierter Enzym- und Substratmenge bei verschiedenen Temperaturen von 4 °C bis 55 °C inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wurde mit der 3,5-DNS-Methode die Menge an freigesetzten, reduzierenden Zuckern, die äquivalent der Menge des gebildeten Hydrolyseproduktes Lycotetraose ist, bestimmt. Eingesetzt wurde Tom16_{EC}.

Es ergibt sich eine Gauß'sche Glockenkurve mit einem Maximum bei 32 °C. Folglich weist die Tomatinase bei 32 °C die maximale Umsatzrate auf.

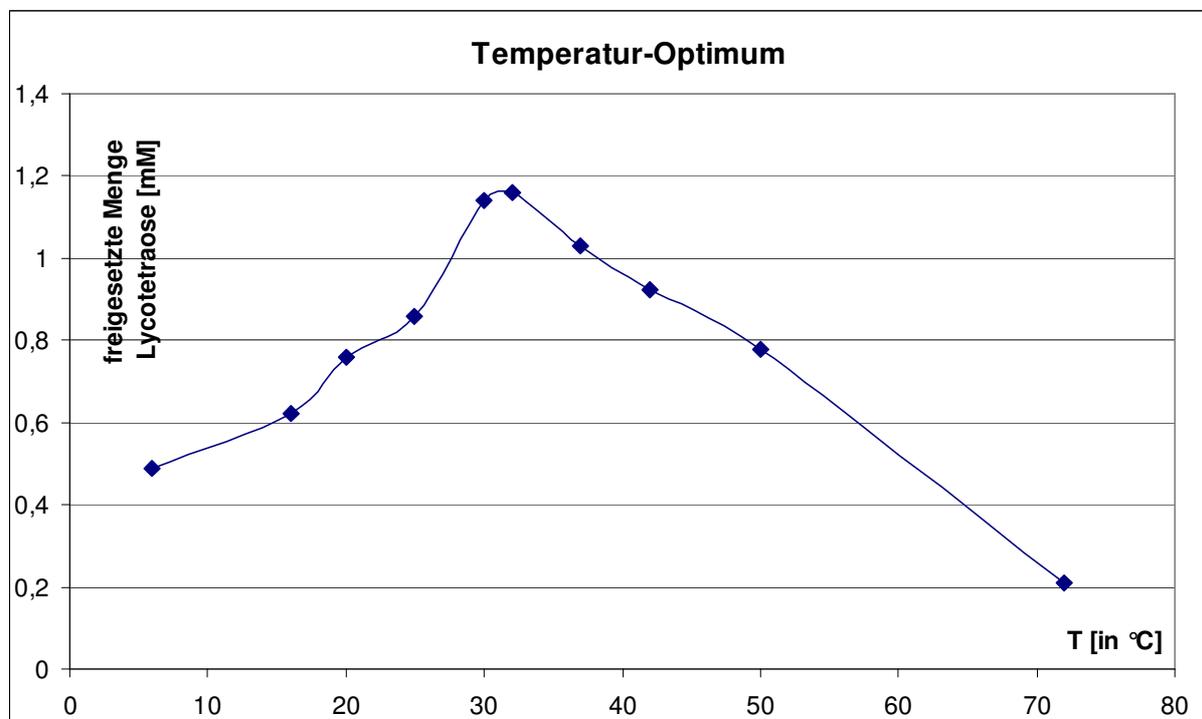


Abb. 30: Bestimmung des Temperatur-Optimums der Tomatinase

Bestimmung des pH-Optimums

Analog dem Temperatur-Optimum wurde auch das pH-Optimum der Tomatinase bestimmt (siehe Abb. 31). Dazu wurden Reaktionsansätze mit gleicher Enzymmenge von Tom16_{EC} und gleicher Substratmenge in Gegenwart eines Puffers mit pH-Werten von pH 3,5 bis pH 9,5 für 2 Std. bei 32 °C inkubiert. Die entstandene Produktmenge wurde mit

der 3,5-DNS-Methode quantifiziert. Auch hier ergeben die Werte einen Gauß'schen Kurvenverlauf. Das pH-Optimum der Tomatinase liegt demnach bei pH 5,5.

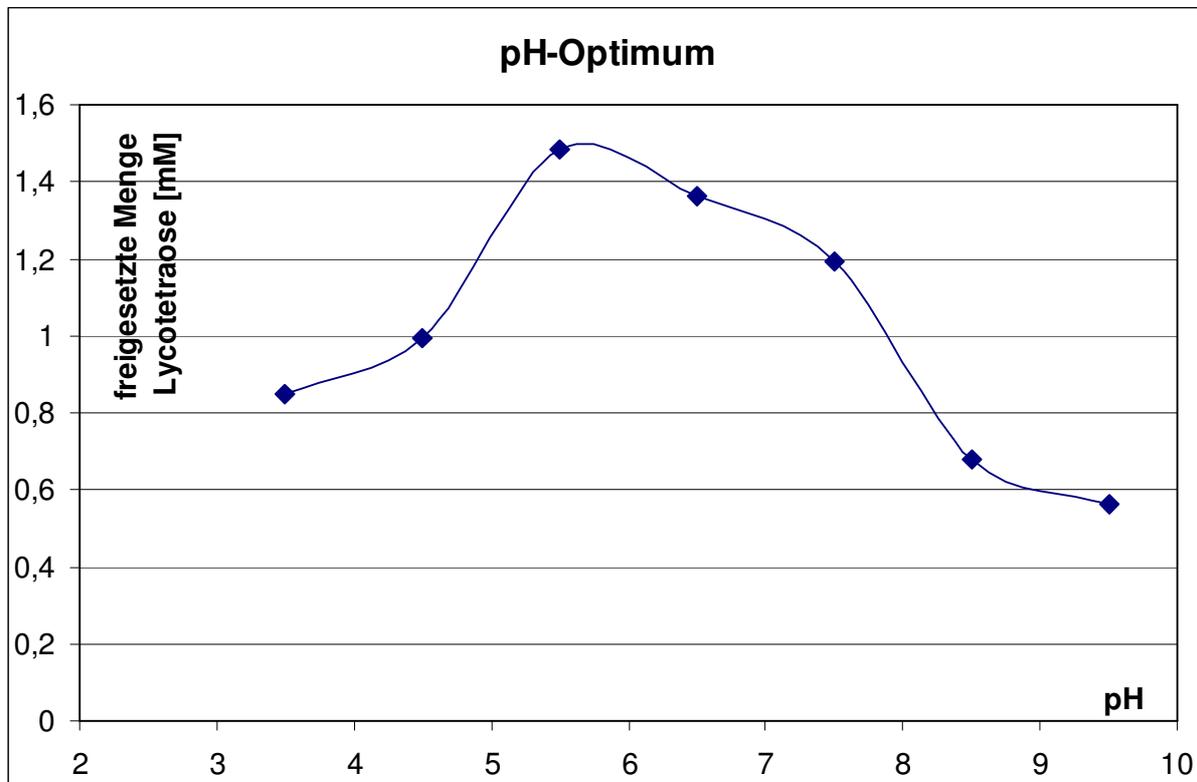


Abb. 31: Bestimmung des pH-Optimums der Tomatinase

Einfluss von zweiwertigen Kationen auf die Tomatinase

Es sollte untersucht werden, ob die Tomatinase TomA von *Cmm* zweiwertige Kationen als Cofaktoren für die katalytische Aktivität benötigt. In einer Versuchsreihe wurde dazu durch Zugabe von Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} bzw. EDTA zur Enzymreaktion analysiert, ob dadurch die Umsatzmenge gesteigert werden kann.

Von den angegebenen Kationen und EDTA wurden 100 mM Stammlösungen angesetzt, sterilfiltriert und dann dem Enzymreaktionsansatz jeweils in einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt. Der Umsatz wurde nach einer Stunde Reaktionszeit bei 32 °C betrachtet. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollen mitgeführt: Ein Ansatz ohne Zugabe von zweiwertigen Kationen und ein Ansatz mit zusätzlicher Zugabe von EDTA zur Entfernung von zweiwertigen Kationen, die eventuell als Verunreinigungen im

Reaktionsansatz vorhanden sein könnten. Nach Ende der Reaktionszeit wurde die Umsatzmenge anhand der 3,5-DNS-Methode quantifiziert. Als Enzym wurde bei allen Ansätzen Tom16_{EC} verwendet.

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass bei keinem der Reaktionsansätze, bei denen zweiwertige Kationen zugesetzt wurden, die Umsatzmenge gegenüber dem Kontrollansatz ohne Zusatz zweiwertiger Kationen gesteigert werden konnte. Neben den Reaktionsansätzen mit Zusatz zweiwertiger Kationen wurde auch ein Reaktionsansatz mit EDTA zur Komplexbildung von zweiwertiger, vom Enzym eventuell bereits gebundener, Kationen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Umsatzmenge gegenüber der Kontrolle nicht verringert wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse wird eine Notwendigkeit von zweiwertigen Kationen als Cofaktoren für die Enzymreaktion von TomA ausgeschlossen.

Zusammenfassend kann an dieser Stelle anhand der bisherigen Ergebnisse festgestellt werden, dass die rekombinante Tomatinase von *Cmm* die optimale Umsatzrate bei 32 °C und pH 5,5 entwickelt. Zweiwertige Kationen als Cofaktoren werden nicht benötigt.

Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Tomatinase wurde nach dem Modell von Michaelis und Menten bestimmt. Dazu wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Tomatinase bei verschiedenen Konzentrationen von α -Tomatin bestimmt und nach der Darstellung von Lineweaver/Burk in einem Diagramm aufgetragen (siehe Abb. 32). Als Enzym wurde Tom16_E eingesetzt.

Für die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten wurde der Umsatz an Produkt nach 10 Minuten Reaktionszeit für unterschiedliche Substratkonzentrationen gewählt. Aufgrund der begrenzten Löslichkeit des Substrates α -Tomatin in Natriumcitratpuffer werden Reaktionsansätze mit 0,5; 0,75; 1; 2,5; 5 und 6,5 mM α -Tomatin eingesetzt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms zum Reaktionsansatz gestartet und nach 10 Minuten gestoppt, indem der Reaktionsansatz bei 72 °C inaktiviert wurde. Danach wurde die Menge an reduzierenden Zuckern mittels der 3,5-DNS Methode bestimmt.

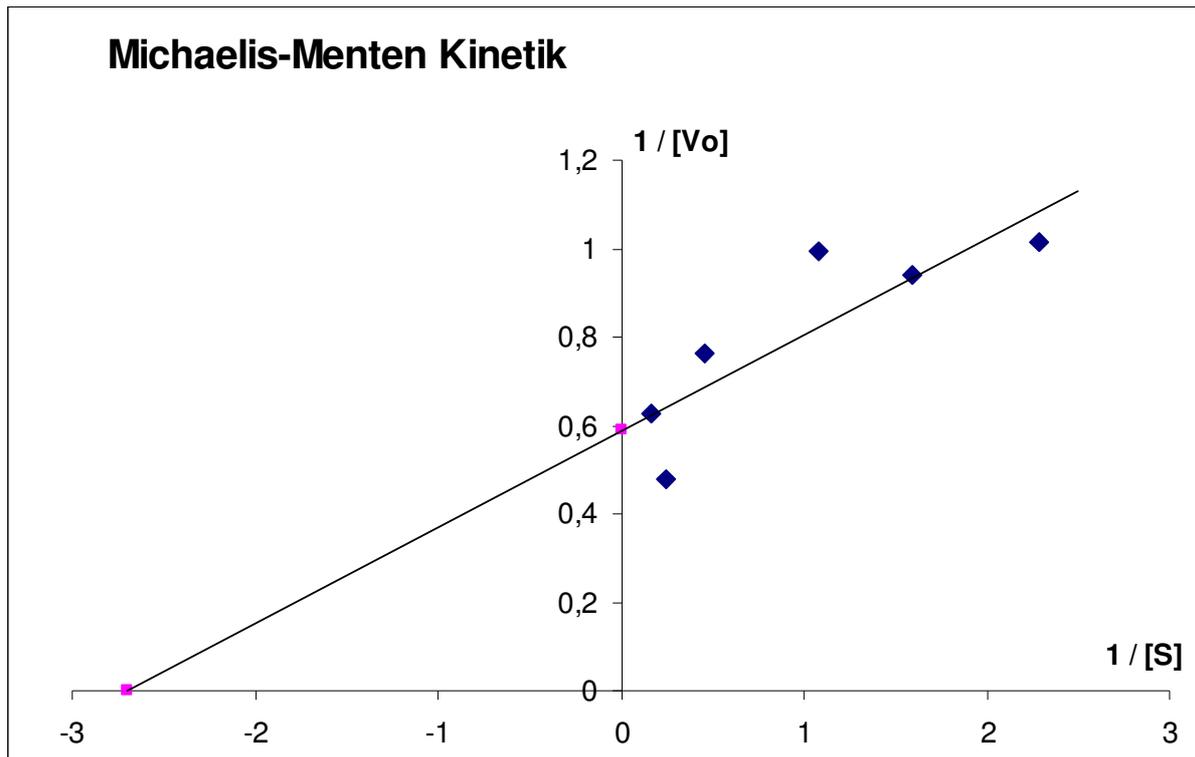


Abb. 32: Bestimmung von K_M und V_{Max} ; Auftragung nach Lineweaver-Burk

Durch die Werte der Anfangsgeschwindigkeiten wird eine Gerade gelegt. Der y-Achsenabschnitt entspricht der Maximalgeschwindigkeit (V_{Max}) und der Abschnitt der x-Achse der Michaelis Konstante ($-1/K_M$), welches der Sättigung bei halbmaximaler Geschwindigkeit entspricht.

Somit erhält man $V_{Max} = 1,70 \text{ nmol} / (\text{min} * \mu\text{g Enz.})$ und $K_M = 0,37 \text{ mM}$.

Substratspektrum der Tomatinase

α -Solanin

Das α -Solaninmolekül, das Hauptsaponin der Kartoffel, ist dem Aufbau des α -Tomatins sehr ähnlich. Es besteht ebenfalls aus einem hydrophoben, steroidähnlichen Grundgerüst, das über das C_3 mit einem hydrophilen Trisaccharid, bestehend aus Glucose, Galactose und Rhamnose verbunden ist (siehe Abb. 33). Datenbankvergleiche von TomA zeigen unter anderem hohe Ähnlichkeiten/Homologien vom TomA zur Tomatinase von *Streptomyces turgidiscabies*, einem Kartoffelpathogen (siehe Einleitung). Aus diesen Gründen sollte überprüft werden, ob die Tomatinase aus *Cmm* auch α -Solanin hydrolysieren kann.

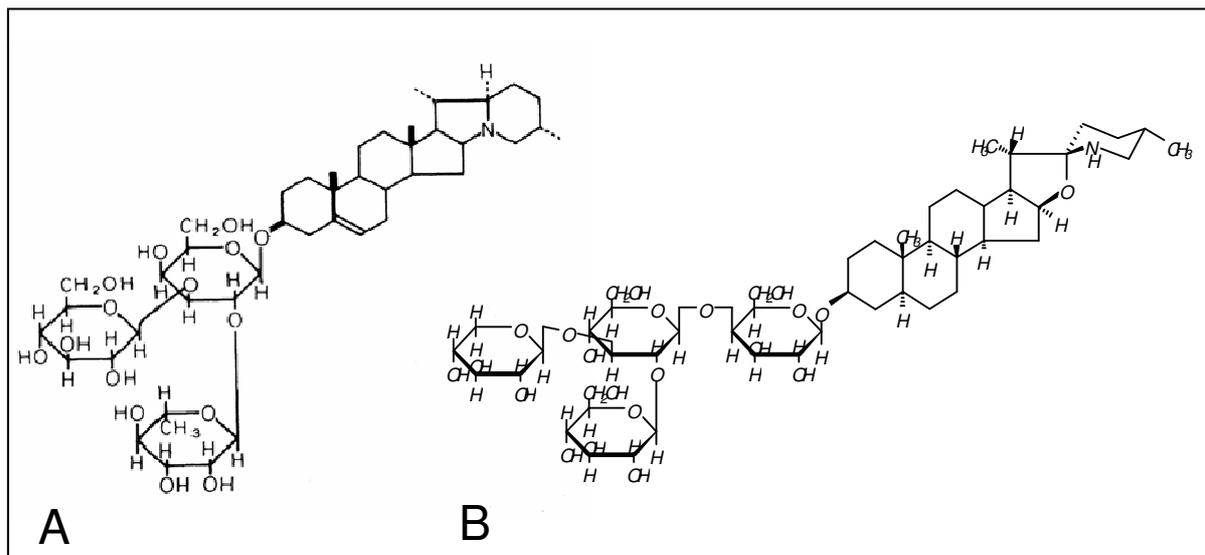


Abb. 33: (A): α -Solanin, Saponin der Kartoffel im Vergleich zu (B): α -Tomatin, Saponin der Tomate

Es wurde ein Enzymtest mit α -Solanin als Substrat und Tom16E als Enzym durchgeführt. Dazu wurde α -Solanin in dem gleichen Puffer und der gleichen Konzentration wie α -Tomatin gelöst und für den Enzymtest eingesetzt. Parallel zu dem Enzymtest mit α -Solanin wurde ein Enzymtest mit α -Tomatin als Substrat und gleicher Enzymmenge als Kontrolle durchgeführt, um zu dokumentieren, dass die eingesetzte Enzymmenge katalytisch aktiv ist. Nach Inkubation für 2 Std. bei 32°C wurden die Reaktionsansätze in einer Dünnschichtchromatografie entwickelt. Es wurden α -Solanin und Solanidin, das Hydrolyseprodukt nach Abspaltung des Trisaccharides, als Standard in der Dünnschichtchromatografie mitgeführt.

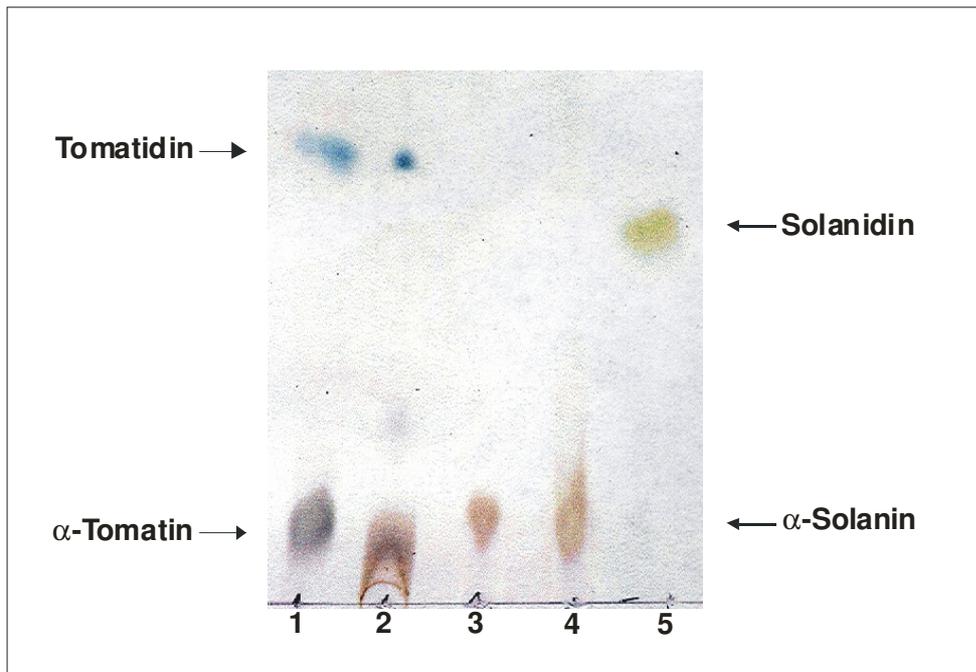


Abb. 34: Dünnschichtchromatografie nach Enzymtest, Hydrolyse von α -Tomatin bzw. α -Solanin. Spur 1: Standard, Gemisch aus α -Tomatin und Tomatidin, je 1 mM, gelöst in Methanol; Spur 2: Reaktionsansatz Hydrolyse von α -Tomatin; Spur 3: Reaktionsansatz Hydrolyse von α -Solanin; Spur 4: Reinsubstanz α -Solanin; Spur 5: Reinsubstanz Solanidin

In Abb. 34 ist zu erkennen, dass die Tomatinase α -Solanin nicht hydrolysieren kann. In Spur 3 ist der Enzymtest mit α -Solanin als Substrat aufgetragen. Es erscheint nur ein Spot für das eingesetzte Substrat (α -Solanin) nicht aber für das Abbauprodukt (Solanidin). Als Standard sind diese beiden Reagenzien in Spur 4 (Substrat: α -Solanin) und in Spur 5 (Hydrolyseprodukt: Solanidin) aufgetragen. In Spur 2 ist der Reaktionsansatz der Hydrolyse von α -Tomatin aufgetragen. Dort erscheint der Spot für das gebildete Produkt (Tomatidin). Als Standard sind α -Tomatin und Tomatidin in Spur 1 aufgetragen. Durch den Umsatz von α -Tomatin wird die Funktionalität des Enzyms belegt. Gleichzeitig wird durch den Enzymtest mit α -Solanin als Substrat gezeigt, dass TomA α -Solanin nicht hydrolysieren kann.

Xylan

Die Tomatinase von *Cmm* zeigt hohe Übereinstimmungen zu Mitgliedern der Familie 10 der Glycosylhydrolasen, in der sich hauptsächlich Xylanasen befinden. In einem weiteren Versuch wurde deshalb TomA auch auf eine mögliche Xylanaseaktivität hin untersucht.

Xylan ist ein pflanzliches Heteropolysaccharid, welches zu den Hemicellulosen gehört. Der Hauptbestandteil ist Xylose. Die Hauptkette wird von β -1,4-glykosidisch verknüpften Xylopyranoseeinheiten gebildet. Es werden mono-, di-, oder oligomere Seitenketten ausgebildet, überwiegend bestehend aus Arabinose, Xylose und Uronsäuren, deren Häufigkeit und Verteilung von der Herkunft des Xylans abhängen. Außerdem können unterschiedlich stark ausgeprägte O-Acetylierungen der Xyloseeinheiten vorliegen, die Einfluss auf die Löslichkeit dieses Naturstoffes nehmen (Sjostrom et al., 1981).

Bei der enzymatischen Hydrolyse des Xylanpolymers entstehen kleine Oligo-Zuckereinheiten mit reduzierenden Resten. Die Menge an gebildeten reduzierenden Zuckereinheiten wird mit Hilfe der 3,5-DNS-Methode quantitativ bestimmt und, bezogen auf die Eichkurve mit Galaktose, als Äquivalent der Stoffmengenkonzentration an Galaktose in mM angegeben. Dadurch erhält man eine Aussage zur enzymatischen Hydrolyse der eingesetzten Xylane durch die verwendeten Tomatinasefragmente.

Als Substrat werden Xylane verschiedener Herkunft gewählt: Xylan aus *Birchwood* (Birke) und Xylan aus *Oat spelts* (Hafer). Letzteres wird dabei sowohl als Suspension als auch gelöst nach alkalischer Vorbehandlung verwendet.

In einer ersten Versuchsanordnung wurde gelöstes Xylan aus *Birchwood* und *Oat spelts* der Hydrolyse jeweils durch das lange Tomatinasefragment (Tom16_E) und das kurze Tomatinasefragment (Tom11) unterzogen. Dazu wurden jeweils gleiche Mengen Protein und Substrat eingesetzt (Tab. 13).

Tomatinase	Hydrolysemenge, entspricht einer Konzentration an reduzierenden Zuckern (mM):	
	<i>Birchwood</i> (Lösung)	<i>Oat spelts</i> (Lösung)
Tom16 _E	0,46	0,39
Tom11	0,35	0,22

Tab. 13: Vergleich der Hydrolyse von Xylanen verschiedener Herkunft durch das lange Tomatinasefragment (Tom16_E) und das kurze Tomatinasefragment (Tom11). Bestimmt wurde die Menge an freigesetzten, reduzierenden Zuckern mit der 3,5-DNS-Methode; jeweils 8 μ g Enzym; 1,6 mg Xylan (0,4 mg α -Tomtatin); 32 °C, 120 min

Es zeigte sich, dass beide Xylane sowohl von dem langen als auch von dem kurzen Tomatinasefragment hydrolysiert werden, wobei man eindeutig sieht, dass das lange Tomatinasefragment am Ende der Reaktionszeit mehr Produkt gebildet hat, als das kurze Tomatinasefragment, bei dem Xylan *Birchwood* 0,46 mM gegenüber 0,35 mM bzw. 0,39 mM gegenüber 0,22 mM bei *Oat spelts* Xylan. Insgesamt ist dieses aber eine noch recht geringe Hydrolysemenge, denn im Vergleich dazu setzt die gleiche Menge des langen Tomatinasefragmentes etwa 1,48 mM Lycotetraose bei der Hydrolyse von α -Tomatin frei.

In einer weiteren Versuchsanordnung sollte herausgefunden werden, welchen Einfluss die Löslichkeit des Substrates auf die Hydrolyseeigenschaften der Tomatinase hat.

Dazu wurden gleiche Mengen des *Oat spelts* Xylan als Suspension und als Lösung nach alkalischer Vorbehandlung und als Enzym das lange Tomatinasefragment (Tom16_{EC}) und das kurze Fragment (Tom11) eingesetzt. Die Ansätze wurden unter identischen Bedingungen inkubiert und nach Reaktionsende die Menge an freien reduzierenden Zuckern bestimmt (siehe Tab. 14). Die Inkubationszeit wird auf 90 Minuten reduziert, damit Unterschiede in der umgesetzten Hydrolysemenge besser zu erkennen sind, denn es ist davon auszugehen, dass die Aktivität der Enzyme am Ende der 120 minütigen Inkubationszeit bereits abnimmt.

Tomatinase	Hydrolysemenge, entspricht einer Konzentration an reduzierenden Zuckern (mM):	
	<i>Oat spelts</i> (Lösung)	<i>Oat spelts</i> (Suspension)
Tom16 _{EC}	0,24	0,24
Tom11	0,13	0,12

Tab. 14: Vergleich der Hydrolyse von Xylan (*Oat spelts*), als gelöst und als Suspension vorliegend durch das lange Tomatinasefragment (Tom16_{EC}) und das kurze Tomatinasefragment (Tom11).

Bestimmt wurde die Menge an freigesetzten, reduzierenden Zuckern mit der 3,5-DNS-Methode; jeweils 2,8 μ g Enzym; 0,4 mg Xylan; 32 °C, 90 min.

In Tab. 14 zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem langen und dem kurzen Tomatinasefragment. Während das lange Fragment, Tom16_{EC}, 0,24 mM reduzierende Zucker freisetzt, setzt Tom11 nur etwa die Hälfte, 0,12 bzw. 0,13 mM, an reduzierenden Zuckern frei, und das sowohl bei dem gelösten als auch dem in Suspension vorliegenden Xylan aus *Oat spelts*.

Beim Abbau des Xylans konnte somit ein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Tomatinasefragmenten gezeigt werden, wohingegen bei der Hydrolyse des α -Tomatins kein Unterschied zu erkennen ist. Trotzdem ist die Xylanhydrolysefähigkeit der Tomatinase eher untergeordnet gegenüber der Fähigkeit α -Tomatin zu hydrolysieren.

VI. Antikörper gegen Tomatinase

Die vorangegangenen, bisherigen Untersuchungen zur Charakterisierung der Tomatinase von *Cmm* wurden mit isolierten TomA-Fractionen durchgeführt, die in *E. coli* überexprimiert und anschließend aufgereinigt wurden. Es wäre wünschenswert die native Tomatinase, isoliert aus *Cmm*, mit der in *E. coli* überexprimierten Tomatinase vergleichen und biochemisch analysieren zu können. Dazu wurde eine aufgereinigte Proteinfraction der in *E. coli* überexprimierten Tomatinase zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers eingesetzt. Mit diesem Antikörper sollte TomA danach durch Immunoaffinitätschromatografie aus dem Überstand von *Cmm* isoliert werden.

Außerdem würde somit auch ein Antikörper gegen die Tomatinase für weitergehende immunologische Untersuchungen und für weitergehende mikroskopische Lokalisierungsexperimente von TomA in infizierten Tomatenpflanzen zur Verfügung stehen.

Herstellung/Gewinnung des Antikörpers gegen Tom16_E

Das lange Proteinfragment, Tom16_E, wurde in *E. coli* überexprimiert, denaturiert, über Nickelaffinitätschromatografie aufgereinigt, wieder renaturiert und aufkonzentriert. Nachdem die Funktionalität in einem Enzymtest (mit anschließender Dünnschichtchromatografie) überprüft wurde, wurde es zur Immunisierung eines Kaninchens als Auftragsarbeit an die Firma Pineda Antikörperservice, Berlin übersandt. Nachdem mehrere Präimmunseren verschiedener Versuchstiere in einem Western Blot vorab getestet wurden (Daten nicht gezeigt), wurde ein geeignetes Tier ausgewählt und

eine mehrstufige Immunisierung des Tieres mit insgesamt 4 Boost-Injektionen über einen Zeitraum von 3 Monaten durchgeführt.

Die nach Abschluss der Immunisierung erhaltene IgG-Fraktion wurde von der Firma Pineda Antikörperservice über Immunoaffinitätschromatografie spezifisch aufgereinigt. Die so erhaltene monospezifische IgG-Fraktion wurde dann für weitere immunologische Tests eingesetzt.

Funktionalität des Antikörpers (Western Blot)

In einem WesternBlot wurde die Funktionalität und Spezifität des hergestellten Anti-Tomatinase-IgG getestet. Ferner sollten bei diesem Western Blot auch unspezifische Kreuzreaktionen zu *E. coli*-Gesamtprotein und Tomatenpflanzenextrakt überprüft werden. Dazu wurden in einer SDS-PAGE neben einer aufgereinigten Tomatinasefraktion auch Fraktionen von *E. coli* - Gesamtprotein, *Cmm* - Gesamtprotein, *Cmm* -Kulturüberstand und Tomatenblätterextrakt aufgetrennt. Anschließend wurde das SDS-PAGE-Gel auf Nitrozellulose geblottet (Abb. 35) und ein Westernblot mit Anti-TomA-IgG als spezifischer Antikörper durchgeführt (Abb. 36).

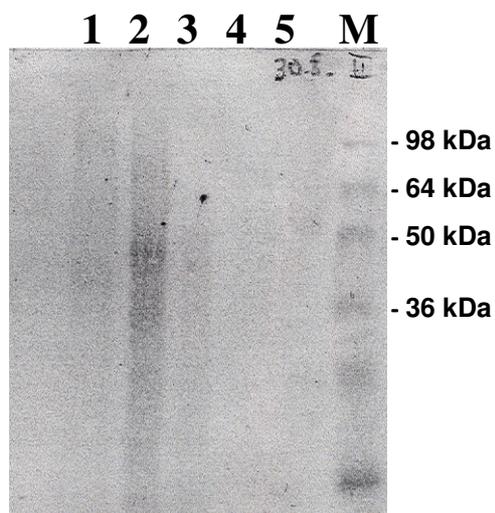


Abb. 35: Nitrozelluloseblot der SDS-PAGE, angefärbt mit Ponceaurot
Spur 1: Tomatenblätterextrakt, Spur 2: Proteinrohextrakt *Cmm382* (Anzucht ohne α -Tomatin im Medium), Spur 3: *Cmm382* Kulturüberstand (ohne α -Tomatin im Medium), Spur 4: *E. coli* BL21DE(3) pTom16_E, Kultur, 4h nach Induktion mit IPTG 1 mM, Spur 5: Tom16_E aufgereinigt, Spur M: Proteinmarker SeeBlue

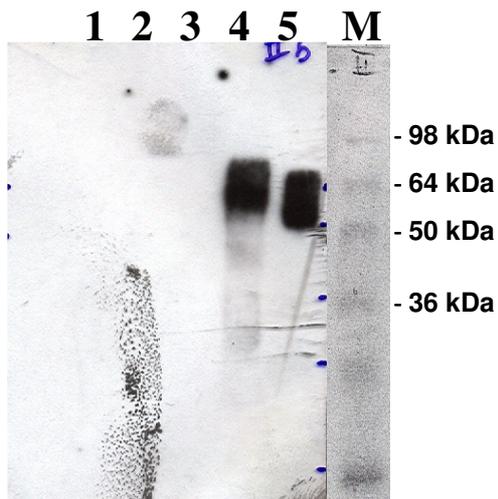


Abb. 36: Western Blot, ECL-Nachweis, spezifischer Antikörper: Anti-TomA-IgG

Spur 1: Tomatenblätterextrakt, Spur 2: Proteinrohextrakt *Cmm382* (Anzucht ohne α -Tomatin im Medium), Spur 3: *Cmm382* Kulturüberstand (ohne α -Tomatin im Medium), Spur 4: *E. coli* BL21DE(3) pTom16_E, Direktkultur, 4h nach Induktion mit IPTG 1 mM, Spur 5: Tom16_E aufgereinigt, SpurM: Marker SeeBlue

In dem Westernblot (Abb. 36) zeigte sich, dass zwei deutliche Signale von etwa 55 kDa für die Tomatinase in den Spuren 4 und 5 auftauchten. In Spur 4 ist eine unbehandelte Probe aus einer *E. coli* Expressionskultur, transformiert mit pTom16_E, vier Stunden nach Induktion aufgetragen und in Spur 5 die aufgereinigte, überexprimierte Tomatinase Tom16_E. In den Spuren 2 und 3 sind Proteinextrakte von *Cmm382* aufgetragen, welcher nicht in Gegenwart von α -Tomatin kultiviert wurde. Somit sind in den Spuren, wie erwartet, auch keine Signale zu sehen. Da auf diesem Blot keine weiteren Signale, außer denen in Spur 4 und 5, auftreten, kann ausgeschlossen werden, dass es mit anderen *Cmm*-Proteinen oder *E. coli*-Proteinen oder Pflanzenproteinen Kreuzreaktionen gibt. Der hergestellte polyklonale Antikörper ist somit monospezifisch für die Tomatinase. Da davon ausgegangen werden kann, dass der Antikörper nicht nur die in *E. coli* überexprimierte Tomatinase sondern auch die native Tomatinase aus *Cmm* erkennt, sollte die native Tomatinase aus *Cmm* über Immunoaffinitätschromatografie mit dem Antikörper isoliert werden können.

Aufreinigung der Tomatinase aus *Cmm*

Zur Aufreinigung der Tomatinase über Immunoaffinitätschromatografie muss ein Chromatografiematerial gewählt werden, an das speziell Anti-TomA-IgG gebunden werden kann. Dazu wird Protein A gekoppelte Sepharose verwendet. Protein A stammt von *Staphylococcus aureus*, der dieses Protein als Pathogenitätsfaktor an seiner Zelloberfläche exponiert, um Immunglobuline spezifisch über den F_C-Teil zu binden. Der spezifisch gegen die Tomatinase gerichtete Antikörper wird somit über das Protein A an die Sepharose gebunden. Der so hergestellte Immunoaffinitätsträger kann nun eingesetzt werden, um aus konzentrierten Kulturüberständen vom *Cmm* Wildtyp die Tomatinase zu isolieren.

Dazu wurden konzentrierte Kulturüberstände von *Cmm*382, der in Gegenwart von α -Tomatin angezogen wurde, auf die Chromatografiesäule gegeben. Nach einigen Waschschrritten wurde die native Tomatinase mit 5 M Lithiumchlorid eluiert, um möglichst schonend die Antigen-Antikörperbindung zu lösen.

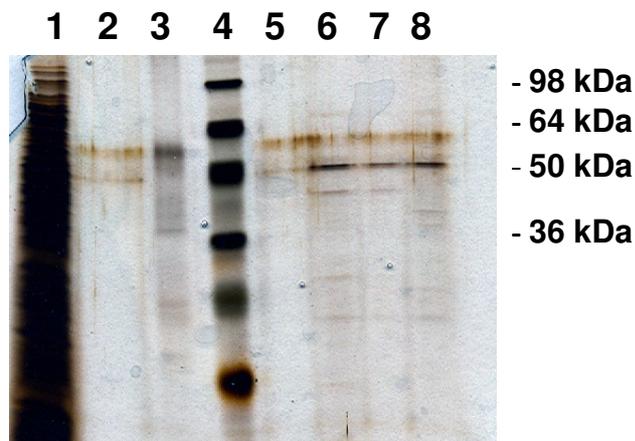


Abb. 37: SDS-PAGE (Silberfärbung): Aufreinigung der Tomatinase aus *Cmm* durch Immunoaffinitätschromatografie. Spur 1: Durchfluss Säule, Spur 2: Waschfraktion, Spur 3: Tom16_E -Fraktion aufgereinigt aus *E. coli* (Kontrolle), Spur 4: Marker „See Blue“, Spur 5: Elutionsfraktion 1, Spur 6: Elutionsfraktion 2, Spur 7: Elutionsfraktion 3: Spur 8: Elutionsfraktion 3 (wdh.)

Abb. 37 zeigt die verschiedenen Fraktionen der Chromatografie in der SDS-PAGE. In den Spuren, in denen die Eluatfraktionen aufgetragen sind, wird keine singuläre Bande erhalten (Spuren 5-8). Man erkennt (neben ein paar unspezifischen Artefakten) im Wesentlichen zwei Banden: eine schwache, bräunliche Bande (55 kDa), die etwa in der Höhe der Kontrollbande der überexprimierten Tomatinase von Tom16_E (vergleiche Spur

3) läuft und eine recht deutliche, schwarze Bande (50 kDa), etwas unterhalb dieser. Da sich die schwache, bräunliche Bande auch in der Waschfraktion befindet, wird es sich vermutlich bei der nativen Tomatinase aus *Cmm* um die untere, diskrete, schwarze Bande handeln, vor allem, da diese auch erst in den Elutionsfraktionen auftaucht. Sie läuft allerdings deutlich unterhalb der Kontrollbande der überexprimierten Tomatinase von Tom16_E. Wenn es sich bei dieser Bande um die Tomatinase handelt, spräche das eventuell für eine posttranslationale Prozessierung der Tomatinase in *Cmm*, die dadurch das Laufverhalten im Gel verändert hätte. Durch eine MALDI-MS mit anschließender Mascot-Analyse könnte man den eindeutigen Nachweis erbringen, welche Bande der Tomatinase zuzuordnen ist. Die Banden waren allerdings einerseits mit Silber angefärbt und andererseits zu schwach und damit ungeeignet für diese Analyseverfahren.

Als Nächstes wurde die hydrolytische Aktivität der Eluatfraktionen überprüft. Dazu wurden die Elutionsfraktionen 2 und 3 durch Ultrafiltration aufkonzentriert, entsalzt, in PBS umgepuffert und mit Glycerin und dTT zur Konservierung bei -20 °C gelagert. Die so gewonnene Tomatinasefraktion aus *Cmm*, Proteingehalt 0,075 mg/mL, wurde zur Überprüfung ihrer Funktionalität in einem Enzymtest zur Hydrolyse von α -Tomatin eingesetzt.

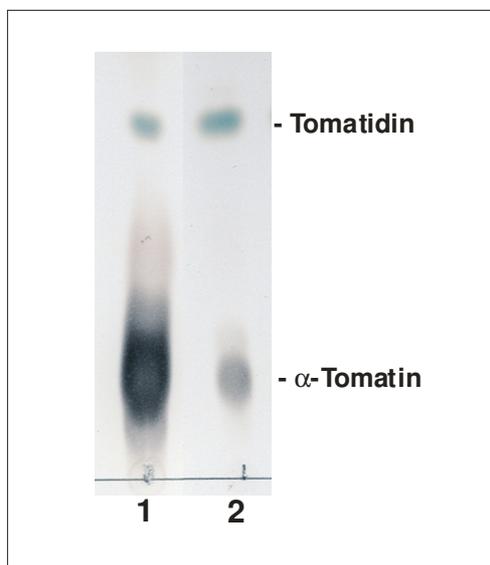


Abb. 38: Dünnschichtchromatografie der Reaktionsprodukte nach Enzymtest gegen α -Tomatin. Spur 1: Eluat 2 und Eluat 3 aufkonzentriert, Spur 2: α -Tomatin/Tomatidin als Standard, je 1 mM, 5 μ L aufgetragen

In Abb. 38 erkennt man, dass die native, aus *Cmm* durch Immunoaffinitätschromatografie isolierte, Fraktion katalytische Aktivität besitzt und α -

Tomatin hydrolysiert: In der Dünnschichtchromatografie in Spur 1 erscheint, zwar schwach, aber eindeutig der Fleck für das Produkt Tomatidin.

Somit konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des Antikörpers gegen die rekombinant hergestellte Tomatinase Tom16_E die native Tomatinase aus *Cmm* isoliert werden kann.

F. Diskussion

I. Enzymatische Aktivität

Es ist bekannt, dass das Saponin α -Tomatin in allen Teilen der Tomatenpflanze gebildet wird, um potentiell pathogene Mikroorganismen abzuwehren. Das tomatenpathogene Bakterium *Cmm* NCPPB382 besitzt ein Gen, *tomA*, dessen Sequenz auf Proteinebene gute Übereinstimmungen zu α -Tomatin-spaltenden Hydrolasen aufweist.

Der Kulturüberstand einer *Cmm* NCPPB382-Kultur, der in Gegenwart von α -Tomatin kultiviert wurde, ist in der Lage, α -Tomatin zu hydrolysieren. Diese hydrolytische Aktivität fehlt bei der Insertionsmutante *CmmTom2*, bei der das *tomA* Gen deletiert ist. Aus dieser Tatsache resultieren zwei Schlussfolgerungen:

- 1) Das Genprodukt von *tomA* ist für die α -Tomatin-spaltende Aktivität des Wildtyps verantwortlich.
- 2) Das Genprodukt von *tomA* wird aus der Zelle ausgeschleust.

Die Hydrolyse von α -Tomatin ist demnach eindeutig auf *tomA* zurückzuführen. Das zeigt auch die durchgeführte Komplementation der *tomA*-Mutante, bei der das inaktivierte chromosomale *tomA*-Gen durch ein intaktes *tomA*-Gen auf dem Vektor pDM302 komplementiert wurde. Bei der komplementierten Mutante konnte auf physiologischer Ebene gezeigt werden, dass der Phänotyp des Wildtyps wiederhergestellt werden konnte und dieser wieder in der Lage ist, α -Tomatin zu spalten.

Anhand der durchgeführten Dünnschichtchromatografien zur Analyse der Reaktionsprodukte nach Hydrolyse von α -Tomatin konnte die Entstehung von Tomatidin, dem zuckerfreien Aglycon als Spaltprodukt nachgewiesen werden. Somit konnte hier gezeigt werden, dass TomA das komplette Tetrasaccharid von dem α -Tomatinmolekül abspaltet, so wie es auch für die Tomatinase von *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici* beschrieben wurde (Lairini et al., 1996; Osbourn et al., 1998). Die Tomatinase von *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici* gehört wie TomA zur Glycosylhydrolase Familie 10, die aus der Zelle ausgeschleust wird (Lairini et al., 1996). Die Homologie der Tomatinase von *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici* erstreckt sich aber nur über den N-terminalen Bereich von TomA. Dieses deutet darauf hin, dass für die katalytische Funktion möglicherweise nur der N-terminale Bereich von TomA erforderlich ist.

Hemmung des Wachstums von *Cmm* durch α -Tomatin *in vitro*

Saponine, zu denen auch α -Tomatin gehört, interagieren mit den Steroiden der Lipidmembranen von Eukaryoten und haben dadurch eine membranaktive Wirkung. Dieses wurde bereits in der Vergangenheit mit diversen Experimenten bestätigt (Nes et al., 1974; Osbourn et al., 1998).

In einem Agardiffusionstest konnte gezeigt werden, dass durch α -Tomatin das Wachstum vom *Cmm* Wildtyp gehemmt wird. Auch die *tomA*-Mutante wird durch α -Tomatin gehemmt, jedoch deutlich stärker als der Wildtyp. α -Tomatin wirkt demnach toxisch auf *Cmm* und durch die Inaktivierung des Gens *tomA* wird dieser Effekt deutlich verstärkt. Dadurch zeigt sich, dass *tomA* eine wichtige Rolle bei der Detoxifikation des α -Tomatins für den Prokaryoten spielt und spiegelt damit die Bedeutung des Enzyms für *Cmm* gegen den Abwehrstoff α -Tomatin der Tomate wider.

Ferner ergibt sich hieraus die Schlussfolgerung, dass auch Prokaryoten durch α -Tomatin nicht unbeeinflusst bleiben. Damit muss das Modell von der Wirkungsweise von Saponinen, hier speziell von α -Tomatin, auf die Membran überdacht werden. Bisher wird allgemein davon ausgegangen, dass α -Tomatin mit Steroiden wie Cholesterin der eukaryotischen Membran interagiert und dadurch die Membranfluidität und -integrität nur bei Eukaryoten stört (siehe auch Abb. 1) (Schlösser, 1975, Schlösser, 1997; Osbourn, 1998). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass α -Tomatin offensichtlich auch auf Prokaryoten, in deren Zellmembran keine Steroide vorkommen, wachstumshemmend wirkt. Folglich muss es entweder Strukturen in der Zellmembran von *Cmm* geben, mit denen α -Tomatin interagieren kann, oder die amphotheren Eigenschaften des α -Tomatins reichen bereits aus, dass sich α -Tomatin ohne weiteren Interaktionspartner in die bakterielle Zellmembran einlagert und diese schädigt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass auch in Zellmembranen von zahlreichen Bakterien cholesterinähnliche Substanzen vorkommen (Fuchs, 2006). Diese sogenannten Hopanoide, wie das Diplopterol oder das Tetrahydroxybacteriohopane (siehe Abb. 39) sind Vertreter einer Klasse pentacyclischer Triterpenoide, die sowohl im Aufbau als auch in der Funktion den Steroiden der eukaryotischen Membran ähneln (Poralla et al., 1980 und 1982). Speziell bei pflanzenassoziierten Bakterien, wie z. B. *Bradyrhizobium*, konnten Hopanoide nachgewiesen werden, deren Synthese über den Squalenbiosyntheseweg verlaufen (Kannenberg et al., 1996). Ob *Cmm* Hopanoide in der Zytoplasmamembran besitzt, ist unklar. Im Genom von *Cmm* findet sich aber ein Gen (CMM_2887) mit guten Übereinstimmungen zu Squalen/Phytoen-Synthasen von verschiedenen Bakterien

(*Agromyces mediolanus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*). Dieses ist ein Hinweis darauf, dass *Cmm* steroidähnliche Bausteine in der Zytoplasmamembran haben könnte, die mit α -Tomatin interagieren könnten.

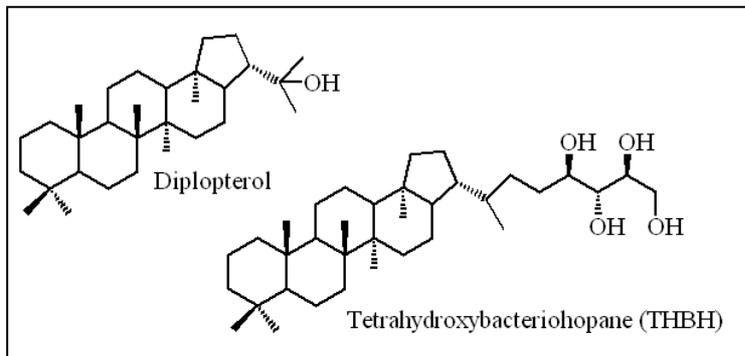


Abb. 39: Diplopterol (Hopan-22-ol) und Tetrahydroxybacteriohopane (THBH), zwei Vertreter von Hopanoiden, isoliert aus prokaryotischen Zytoplasmamembranen (Ourisson et al., 1987).

In Flüssigkultur konnten keine Wuchskurven von *Cmm* in Gegenwart von α -Tomatin aufgenommen werden, da es bereits kurze Zeit nach Zugabe von α -Tomatin zum Kulturmedium zu Bildung von Zellaggregaten kam. Bei beiden verwendeten Konzentrationen von α -Tomatin (0,075 mM und 0,75 mM) tritt diese Aggregatbildung ein, bei der niedrigeren Konzentration allerdings erst deutlich später. Die niedrigere Konzentration von 0,075 mM liegt dabei etwas oberhalb der Konzentration, die zur Induktion der Tomatinase von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ entspricht etwa 0,02 mM) verwendet wurde (Lairini et al., 1996, Roldan-Arjona et al., 1999). Die eingesetzte Konzentration von 0,75 mM α -Tomatin im Kulturmedium entspricht den physiologischen Konzentrationen (0,775 mM) von α -Tomatin, die im Blattgewebe von *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker nachgewiesen wurden (Beimen et al., 1992).

Möglicherweise lysieren einige *Cmm*-Zellen durch den Einfluss von α -Tomatin und die freigesetzte DNA führt zur Verklumpung der noch vitalen Zellen. Da *Cmm* in der Pflanze einen sehr hohen Titer erreicht (über 10^9 CFU pro Gramm Pflanzenhomogenat) kann aber nicht davon ausgegangen werden, dass durch diese α -Tomatin-Konzentration viele *Cmm*-Zellen lysieren. Es könnte aber auch sein, dass durch die Zugabe von α -Tomatin die Bildung eines Biofilms induziert wird. Dieser könnte *in vivo* zur besseren Haftung am Pflanzengewebe und zum Schutz vor antimikrobiellen Substanzen, wie z. B. α -Tomatin, dienen. Actinomyceten neigen zu einem myzelartigen Wachstum. Gerade in der Pflanze scheint *Cmm* dieses myzelartige Wachstum besonders stark auszubilden, wie auch an

der REM-Aufnahme zu erkennen ist (siehe Abb. 40 und Einleitung, Abb. 4). Es ist denkbar, dass α -Tomatin diese Wuchsform initiiert und diese in Flüssigkultur die beobachtete Aggregatbildung verursacht.

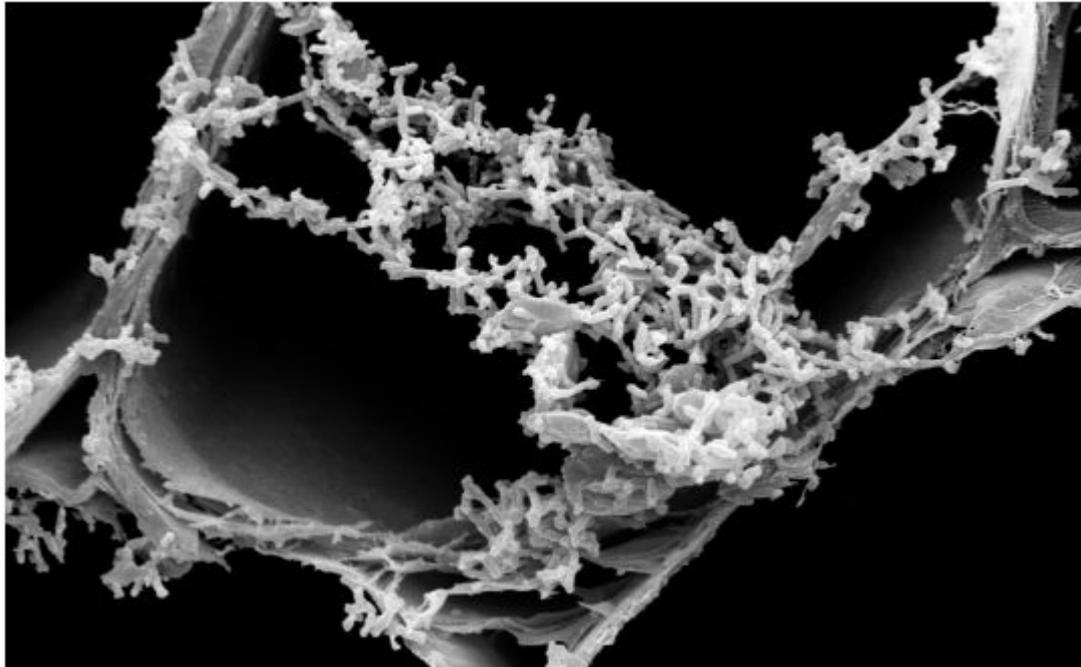


Abb. 40: REM-Aufnahme: Xylemquerschnitt von *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker nach Infektion mit *Cmm*, 3900fach vergrößert. Foto: T. Trappoff

II. Regulation der Tomatinase

Das Gen *tomA* ist umgeben von regulatorischen Elementen. Stromaufwärts bilden die beiden Gene *regA* und *regB* einen Zweikomponentenregulator und stromabwärts befindet sich das Gen *catR*, ein Vertreter der *lacI*-Familie. Aufgrund der räumlichen Nähe zu *tomA* könnten diese Gene an einer Regulation von *tomA* beteiligt sein. Mit den beiden Mutanten *CmmReg2* und *CmmCatR7 β* wurde ein möglicher regulatorischer Einfluss auf *tomA* überprüft. Diese beiden Mutanten und der Wildtyp *CmmNCPB382* wurden jeweils mit und ohne α -Tomatin kultiviert. Der anschließend durchgeführte Enzymtest mit konzentrierten Kulturüberständen dieser drei Stämme zeigte, dass die Tomatinase von *Cmm* durch ihr eigenes Substrat, α -Tomatin, induziert wird. Der Kulturüberstand des Wildtyp-Stammes, der mit α -Tomatin angezogen wurde, weist eine katalytische Aktivität auf. Ohne α -Tomatin im Kulturmedium ist diese Aktivität beim Wildtyp-Stamm nicht

nachweisbar. Dabei reicht eine geringe Konzentration (0,02 mM) an α -Tomatin für die Induktion bereits aus. Auch für die Tomatinase von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* wurde eine Induktion durch ihr eigenes Substrat nachgewiesen, wobei ebenfalls 20 $\mu\text{g/mL}$ (entspricht etwa 0,02 mM) ausreichend sind, um die Tomatinase zu induzieren (Lairini et al., 1996; Roldan-Arjona et al., 1999).

Der Vergleich der Regulator-Mutanten mit dem Wildtyp zeigte, dass *regB* keinen Einfluss auf die Induktion der Tomatinase hat, denn in der Tomatinaseaktivität zwischen der Mutante *CmmReg2* und dem *Cmm*-Wildtypkontrollstamm war kein Unterschied zu erkennen. Ist allerdings *catR* inaktiviert, kann trotz Anwesenheit von α -Tomatin im Kulturmedium keine Tomatinaseaktivität im Kulturüberstand nachgewiesen werden. CatR stellt für *tomA* also einen positiv wirkenden Regulator, einen Aktivator, dar. Dieses Ergebnis konnte auch Winter (2008) bestätigen und durch Komplementation des inaktivierten *catR* Gens den Wildtyp Phänotyp wieder herstellen.

Das Genprodukt von *catR* weist gute Übereinstimmungen zu BxIR, einem Regulator aus *Streptomyces thermoviolaceus* auf. BxIR wirkt regulatorisch auf die Aufnahme von Xylanabbauprodukten und auf die Xylandegradation (Tsujiho, et al., 2003). BxIR bindet an einer spezifischen Sequenz vor dem Xylobiose-Transport-Operon und wirkt als Repressor. Diese Bindung wird durch geringe Konzentrationen von Xylose inhibiert. Für BxIR konnte gezeigt werden, dass dieser Regulator an einem 4 bp inverted repeat, 5'-CGAA-Nx-TTCG-3', bindet. Im Promotorbereich von *tomA* findet sich eine ähnliche Sequenz wieder: 5'-CGAAA-Nx-TTTCG-3'. 5'-RACE-Experimente zur Bestimmung des Transkriptionsstartes von *tomA* sowie EMSA-Experimente mit gereinigtem CatR-Protein zur Bestimmung der Bindestelle von CatR im Promotorbereich von *tomA* lieferten jedoch keine eindeutigen Hinweise, weder auf den Transskriptionsstart noch auf eine mögliche Bindestelle von CatR im Promotorbereich von *tomA* (Winter, 2008).

Für die Tomatinase von *Streptomyces scabies* konnte gezeigt werden, dass das Tomatinasegen mit dem Gen SCAB77311, dessen Genprodukt zur Glycosylhydrolasefamilie 1 gehört, kotranskribiert wird (Seipke et al., 2008). Seipke et al. (2008) vermuten, dass bei *S. scabies* das Genprodukt von SCAB77311 zusammen mit der Tomatinase in der Hydrolyse des Tetrasaccharides vom α -Tomatinmolekül involviert ist und dabei das Tetrasaccharid weiter in Di- oder Monosaccharide gespalten wird. Interessanterweise weist das Genprodukt von SCAB77311 die beste Homologie (73 % identisch) zum Genprodukt von *bgIA* von *Cmm* auf (Seipke et al., 2008). Das Gen *bgIA* ist bei *Cmm* stromabwärts im direkten Anschluss an *tomA* und *catR* lokalisiert (siehe Einleitung, Abb. 6). Die Vermutung liegt nahe, dass auch bei *Cmm* die Genprodukte von

tomA und *bgIA* gemeinsam an der Degradation von α -Tomatin beteiligt sein könnten. In diesem Zusammenhang sollte zukünftig die genaue Funktion des Genproduktes von *bgIA* charakterisiert werden, vor allem im Hinblick auf Lycotetraose als mögliches Substrat für BglA. Ferner sollte überprüft werden, ob CatR auch einen regulatorischen Einfluss auf BglA hat und möglicherweise auch im Promotorbereich von BglA bindet.

III. Phänotypische Untersuchungen im Pflanzentest

Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass α -Tomatin einen toxischen Einfluss auf *Cmm* hat und dass eine Inaktivierung von *tomA* zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber α -Tomatin führt. α -Tomatin wird als ein Abwehrstoff gegen mikrobielle Schädlinge von Tomatenpflanzen gebildet. Ob die gesteigerte Sensitivität gegen α -Tomatin der *tomA*-Mutante auch *in vivo* zu einer reduzierten Virulenz im Vergleich zum Wildtyp von *Cmm* führt, wurde *in planta* überprüft.

Dabei muss immer die pH-abhängige Wirkung von α -Tomatin berücksichtigt werden. Sinkt der pH-Wert deutlich unter pH 4,0, ist der Stickstoff im Tomatidin-Rest protoniert und damit das α -Tomatin nicht mehr membranaktiv. Im Xylem der Tomate, dem Kolonisationsort von *Cmm*, herrscht aber ein pH-Wert von pH 5,0, der bei Wassermangel bis auf pH 8,0 ansteigt (Wilkinson et al., 1998). Somit sind mögliche Einschränkungen der Wirkungsweise von α -Tomatin durch pH-Effekte bei den durchgeführten Pflanzentests an der Tomate auszuschließen.

Der durchgeführte Pflanzentest an der Wirtspflanze *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker zeigte keine auffälligen Unterschiede zwischen *tomA*-Mutante und Wildtypkontrollstamm. Weder im Virulenzverhalten noch im Titer *in planta* unterscheidet sich die *tomA*-Mutante signifikant vom Wildtyp. Martin-Hernandez et al. (2000) konnten ebenfalls keine makroskopisch sichtbare Veränderung in der Virulenz des tomatenpathogenen Pilzes *Septoria lycopersici* erkennen, nachdem das Tomatinasegen, ebenfalls durch *gene replacement*, inaktiviert wurde. Sie verwendeten ebenfalls *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker als Wirtspflanze. Die *tomA*-Mutante des Pilzes *S. lycopersici* zeigte aber ebenso *in vitro* eine gesteigerte Sensitivität gegenüber α -Tomatin, im Vergleich zum Wildtyp. Die vorliegenden Ergebnisse und die Ergebnisse von Martin-

Hernandez et al. (2000) zeigen, dass die Inaktivierung der Tomatinase eines Phytopathogens offensichtlich nicht zur Reduktion der Virulenz gegenüber der Wirtspflanze *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker führt.

S. lycopersicon cv. Moneymaker ist eine Zuchtpflanze, die so gezüchtet worden ist, dass sie große Erträge bei mild-fruchtigem Geschmack liefert. Es ist davon auszugehen, dass durch die Züchtung auch indirekt der Tomatingehalt bei *S. lycopersicon* cv. Moneymaker reduziert wurde. Der Tomatingehalt in den Blättern ist mit 775 nmol/g Frischgewicht (entspricht 793,6 µg/g) (Beimen et al., 1992) geringer als der mittlere α -Tomatingehalt von Blättern (975 µg/g), den Friedmann et al. (2002) bei ihren Untersuchungen von Tomatenpflanzen bestimmten (vergleiche Einleitung, Tab. 1).

Somit war es von Interesse zu untersuchen, wie sich das Pathogenitätsverhalten der *tomA*-Mutante von *Cmm* auf eine Wildtomate auswirkte. Als Testpflanze wurde dafür die Wildtomatenart *Lycopersicon pimpinellifolium* gewählt, die sich bereits im Wuchs deutlich von der Zuchtsorte *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker unterscheidet. Stängel und Blätter sind viel zarter und krautartiger und die Früchte sind nur etwa kirschgroß. Ein eher bitterer Geschmack der Früchte spricht bereits für einen erhöhten Tomatingehalt der Früchte. Entsprechend konnten Asano et al. (1996) zeigen, dass die Früchte von Wildtomaten allgemein einen höheren Tomatingehalt als Zuchttomaten haben. Der Tomatingehalt in den Früchten von *L. pimpinellifolium* war mit 8,39 mg/kg dabei etwa doppelt so hoch wie in Früchten der untersuchten kommerziellen Zuchttomaten. Juvik et al. (1982a) konnten zeigen, dass Früchte und Blätter von gezüchteten, im kommerziellen Anbau verwendeten Tomaten signifikant geringere Mengen an α -Tomatin als Früchte und Blätter von verschiedenen Wild-*Lycopersicon* spezie aufwiesen. In einer weiteren Untersuchung zeigten sie, dass der α -Tomatingehalt in den Blättern von vier verschiedenen getesteten *L. pimpinellifolium* Isolaten im Mittel 12,5 mg/g Trockengewicht betrug. Im Gegensatz dazu betrug der α -Tomatingehalt der Blätter von vier untersuchten Kultivarsorten von *Lycopersicon esculentum* (neue Bezeichnung: *Solanum lycopersicum*) im Mittel nur 3,5 mg/g Trockengewicht, also etwa nur ein Viertel gegenüber *L. pimpinellifolium* (Juvik et al., 1982b). Bedauerlicherweise war die Kultivarsorte „Moneymaker“ nicht unter den getesteten Kultivaren, so dass ein direkter Vergleich zwischen *L. pimpinellifolium* und *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker bezüglich des α -Tomatingehaltes im Blattgewebe nicht möglich ist. Es ist aber anzunehmen, dass der α -Tomatingehalt bei *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker ähnlich gering ist, wie in den von Juvik et al. (1982b) getesteten *Lycopersicon*

esculentum Kultivaren. Somit kann davon ausgegangen werden, dass bei *L. pimpinellifolium* vermutlich in allen Pflanzenteilen ein wesentlich höherer α -Tomatingehalt vorliegt als bei der Zuchttomate *S. lycopersicum* cv. Moneymaker.

Bei der Wurzelinfektion von *L. pimpinellifolium* mit *Cmm* stellte sich heraus, dass sich die Symptome und der Krankheitsverlauf bei *L. pimpinellifolium* so entwickelten wie bei *S. lycopersicum* cv. Moneymaker, allerdings nur bei Infektion mit dem *Cmm*-Wildtyp NCPPB382, der beide Plasmide und somit beide Pathogenitätsdeterminanten, *celA* und *pat-1* trägt. Bei Infektion von *L. pimpinellifolium* mit dem Wildtyp-Kontrollstamm CMM101, der nur das Plasmid pCM1 mit *celA* trägt, traten keine Welkesymptome auf. Ebenso traten auch bei Infektion mit *CmmTom2*, der den gleichen Plasmidstatus wie CMM101 hat, keine Welkesymptome auf. Diese Ergebnisse deuten an, dass *L. pimpinellifolium* *celA* möglicherweise nicht als Pathogenitätsfaktor wirkt.

Der Titer, den die *tomA*-Mutante *CmmTom2* gegenüber der Wildtypkontrolle CMM101 in *L. pimpinellifolium* erreichte, war um mehr als eine Zehnerpotenz reduziert. Dies deutet an, dass *tomA* einen Einfluss auf die Etablierung des Erregers in dem Wirt und somit auf die Pathogenität von *Cmm* hat. Als Folgerung ergibt sich, dass ein vermutlich erhöhter α -Tomatingehalt im Stängel bzw. Xylemsaft von *L. pimpinellifolium* dazu führt, dass die *tomA*-Mutante mit ihrer gesteigerten Sensitivität gegenüber α -Tomatin im Wachstum reduziert ist und daher einen niedrigeren Titer in der Pflanze erreicht. Vermutlich ist bei *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker der Tomatingehalt im Stängel bzw. im Xylem so gering, dass es keinen großen Unterschied macht ob *Cmm* eine Tomatinase besitzt oder nicht.

L. pimpinellifolium besitzt neben dem α -Tomatin und Tomatidin aber noch weitere Tomatin-verwandte Moleküle. Dazu zählt das β 2-Tomatin, welches aus α -Tomatin nach Abspaltung des endständigen Glucoserestes hervorgeht, also nur noch ein Trisaccharid enthält, und ein Tomatidinderivat, welches als „Pimpinellifolidin“ bezeichnet wurde (siehe Abb. 41) (Ripperger et al., 1994).

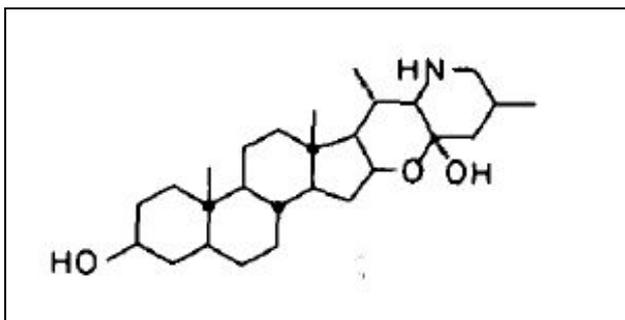


Abb. 41: Pimpinellifolidin, isoliert aus den Wurzeln von *Lycopersicon pimpinellifolium* (aus: Ripperger et al., 1994)

Beide Tomatinderivate, das β 2-Tomatin und das Pimpinellifolidin, wurden bei *L. pimpinellifolium* unter anderem in der Wurzel gefunden. Pimpinellifolidin wurde durch saure Hydrolyse aus den Wurzeln von *L. pimpinellifolium* isoliert. Es ist gut vorstellbar, dass β 2-Tomatin und Tomatinderivate, bei denen Pimpinellifolidin das Aglycon bildet, in ihrer Wirkung ähnlich dem α -Tomatin sind. Sie könnten, da sie in der Wurzel nachgewiesen wurden, eine zusätzliche chemische Barriere für *Cmm* bei der durchgeführten Wurzelinfektion darstellen. Ob die Tomatinase TomA eine oder mehrere dieser Substanzen hydrolysieren kann, ist unklar und sollte zukünftig in weitergehenden Experimenten überprüft werden. Darüber hinaus sollte durch alternative Infektionsmethoden untersucht werden, ob die Reduktion des Titors bei der *tomA*-Mutante mit dem Infektionsort der Wurzel zusammenhängt. Ist dies der Fall, wäre es ein Hinweis darauf, dass gerade diese α -Tomatinderivate bei *L. pimpinellifolium* ein Eindringen von *Cmm* über die Wurzel erschweren könnten.

In der Interaktion der *tomA*-Mutante mit einem Nicht-Wirt wurde ferner untersucht, ob die *tomA*-Mutante noch in der Lage ist, eine hypersensitive Reaktion (HR) auszulösen. Es konnte nachgewiesen werden, dass sie an *Mirabilis jalapa* die hypersensitive Reaktion auslöst und sich damit nicht von der Wildtypkontrolle CMM101 unterscheidet. Damit konnte gezeigt werden, dass das *tomA*-Gen offenbar nicht an der Auslösung der HR bei der Nicht-Wirtspflanze beteiligt ist.

III. Überexpression und Reinigung der Tomatinase von *Cmm*

Zu einer genaueren Charakterisierung der Tomatinase von *Cmm* musste diese in einer isolierten, gereinigten Form und in größeren Mengen verfügbar sein. Hierzu wurde *tomA* in *E. coli* überexprimiert. Um weitere Aufschlüsse über die katalytische Aktivität zu erhalten, wurden neben dem Amplifikat über die Gesamtlänge von *tomA* (Tom16_{EC}) auch zwei weitere Amplifikate von *tomA* in verkürzter Länge in *E. coli* überexprimiert und über Affinitätschromatografie aufgereinigt - einmal ohne Signalsequenz (Tom16_E) und einmal ohne Signalsequenz und ohne hintere Domäne (Tom11) (siehe Abb. 21). Alle drei Amplifikate lieferten in *E. coli* Proteine, die aufgereinigt werden konnten und katalytisch

aktiv waren. Damit konnte eindeutig die katalytische Aktivität auf den vorderen N-terminalen Bereich des TomA-Proteins eingegrenzt werden. Weder die Signalsequenz zur Ausschleusung, noch die hintere Domäne sind notwendig für die Hydrolyse von α -Tomatin.

Für die Aufreinigung mussten die Proteine zuerst mit 8 M Harnstoff denaturiert und im späteren Verlauf durch schrittweise Dialyse wieder renaturiert werden, um am Ende katalytisch aktive Proteine zu erhalten. Dieses zeigt, dass die Tomatinase ein relativ robustes, stabiles Protein ist, welches trotz De- und Renaturierung noch Aktivitäten zeigt.

IV. Charakterisierung der Tomatinase

Mit den in *E. coli* rekombinant hergestellten TomA-Fragmenten konnten nun weitere biochemische Tests durchgeführt werden, um die Tomatinase weiter zu charakterisieren. Das ermittelte Temperaturoptimum von TomA ist mit 32 °C höher als die optimale Wachstumstemperatur von *Cmm* (26 – 28 °C). Bakterielle Infektionen von Tomatenpflanzen spielen eher in wärmeren Ländern eine Rolle, z.B. Israel, Spanien, Italien, Türkei. Dort sind tagsüber während der Sommermonate Temperaturen über 30 °C keine Seltenheit. Damit wäre das Temperaturoptimum von TomA zu erklären. Möglicherweise könnte dies aber auch als Indiz für den Erwerb dieses Gens durch horizontalen Gentransfer gedeutet werden. Lairini et al. (1996) bestimmten für die Tomatinase von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ein Temperatur-Optimum von 45 – 50 °C, was deutlich über dem von TomA liegt.

Das ermittelte pH-Optimum von TomA liegt bei pH 5,5. *Cmm* kolonisiert das Xylem der Tomate. Der pH-Wert des Xylems von *Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker liegt zwischen pH 4 und pH 6,5 (persönliche Mitteilung M. Flügel). Für *Solanum lycopersicum* allgemein (alte Bezeichnung: *Lycopersicon esculentum*) konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert des Xylemsaftes bei pH 5,0 liegt und bei Wassermangel auf pH 8,0 ansteigt (Wilkinson et al., 1998). Somit liegt das pH-Optimum von TomA in dem pH Bereich des natürlichen Lebensraums von *Cmm*. Die Tomatinase von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* zeigt ein pH-Optimum von pH 5,5 bis 7 (Lairini et al., 1996), und entspricht somit in etwa dem der Tomatinase von *Cmm*.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass für die katalytische Aktivität von TomA keine zweiwertigen Kationen als Cofaktoren benötigt werden. Durch Zusatz der getesteten

zweiwertigen Kationen zum Reaktionsansatz des Enzymtests konnte keine Umsatzsteigerung erzielt werden. Auch ein Entzug möglicher anwesender zweiwertiger Kationen durch Zugabe von EDTA führte zu keiner Reduktion des Umsatzes. Das deutet darauf hin, dass für die katalytische Funktion von TomA tatsächlich keine der getesteten zweiwertigen Metallionen als Cofaktoren benötigt werden. Für die Tomatinase aus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass keine zweiwertigen Kationen als Cofaktoren benötigt werden (Lairini et al., 1996).

Mit dem langen Tomatinasefragment Tom16_E wurden Kinetikexperimente durchgeführt. Für α -Tomatin als Substrat wurde die Michaeliskonstante ($K_m = 0,37$ mM) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ($V_{max} = 1,70$ $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$) nach dem Modell von Michaelis und Menten bestimmt. Für die Tomatinase von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* wurde mit $K_m = 1,1$ mM eine Michaelis-Konstante beschrieben, die etwa in der gleichen Größenordnung liegt wie die Tomatinase von *Cmm*. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ist allerdings mit $V_{max} = 118$ $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ deutlich höher als bei der Tomatinase von *Cmm* (Lairini et al., 1996). Lairini et al. (1996) ermittelten die Kinetikwerte für die native Tomatinase, welche aus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isoliert wurde. Es ist möglich, dass die Tomatinase von *Cmm* bei der Expression in *E. coli* und der anschließenden Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen zum teilweisen Verlust der Aktivität führte. Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass sich das gesamte Protein zu 100 % korrekt zurückgefaltet hat. Außerdem ergeben sich noch Fehler durch die begrenzte Löslichkeit des α -Tomatins. Zur Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeiten von TomA, wie es für die Auftragung nach Lineweaver-Burk notwendig ist, konnten deshalb Substratkonzentrationen von α -Tomatin nur in einem eingeschränkten Bereich eingesetzt werden. Aufgrund dieser Unwägbarkeiten und Fehlerquellen liefern die Ergebnisse zur Kinetik der Tomatinase von *Cmm* nur orientierende Werte.

Ob bei der Hydrolyse von α -Tomatin durch TomA wirklich nur Lycotetraose und Tomatidin entstehen, sollte mit einer präziseren Nachweismethode als der Dünnschichtchromatografie geklärt werden. Die Reaktionsansätze nach Hydrolyse von α -Tomatin durch die überexprimierten TomA-Fragmente wurden dazu massenspektrometrisch analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass als einzige Abbauprodukte der α -Tomatinhydrolyse das Tetrasaccharid Lycotetraose und der steroidale Rest Tomatidine entstehen. Mit diesen Analysen wurde bestätigt, dass

ausschließlich das komplette Tetrasaccharid vom α -Tomatin-Molekül abgespalten wurde, und keine weiteren Intermediate auftraten, bei denen z. B. nur ein oder zwei Zuckerreste abgespalten wurden. Diese Ergebnisse haben auch gezeigt, dass das Substrat α -Tomatin nicht absolut rein ist, sondern unter anderem eine Verunreinigung mit der Masse 924 g/mol enthält, die in allen MALDI-Analysen präsent ist.

In der Dünnschichtchromatografie, der Standard-Nachweismethode der Reaktionsprodukte nach α -Tomatinhydrolyse, tauchten dunkle Schatten zwischen Edukt (α -Tomatin) und Produkt (Tomatidin) auf, die weder dem Edukt noch dem Produkt eindeutig zugeordnet werden konnten. Die dunkel gefärbten Schatten befinden sich im unteren Drittel der Laufstrecke oberhalb des α -Tomatin Spots. Sie tauchen nur auf, wenn noch α -Tomatin im Reaktionsansatz vorhanden ist und finden sich nicht im Kontrollstandard, in dem die Reinsubstanzen α -Tomatin und Tomatidin in Methanol gelöst sind. Aufgrund der schwarzen Färbung und der Nähe zum α -Tomatin Spot liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Schatten auch um α -Tomatin handelt, welches mit dem Citrat des Puffers, indem es gelöst ist, oder mit Proteinresten der Probe teilweise interagiert bzw. komplexiert und dadurch stärker mobilisiert im Laufmittel diffus mitwandern könnte. Die MALDI-Analysen konnten aber eindeutig zeigen, dass keine weiteren Produkte bei der Enzymreaktion auftreten.

Um die Substratspezifität von TomA zu überprüfen wurden weitere Substrate getestet. Es zeigte sich, dass das verwandte Saponin der Kartoffel, α -Solanin (siehe Abb. 33), durch TomA nicht hydrolysiert werden kann. Auch die Tomatinase von *Streptomyces scabies*, kann α -Solanin nicht hydrolysieren (Seipke et al., 2008). Diese Tatsache mag verwundern, da es sich bei *Streptomyces scabies* um ein Kartoffelpathogen handelt, aber es zeigt auch die enge Substratspezifität von TomA bezogen auf die Hydrolyse der Saponine.

Xylane wiederum können durch TomA hydrolysiert werden; im Gegensatz zur Tomatinase von *Streptomyces scabies*, die bezogen auf Xylan, keine hydrolytische Aktivität zeigt (Seipke et al., 2008). Die Fähigkeit Xylane hydrolysieren zu können, zeigt die Gruppenzugehörigkeit von TomA zur Glykosylhydrolase Familie 10 in der sich auch viele Xylanasen finden (siehe Einleitung). Im Vergleich zu α -Tomatin als Substrat ist die Aktivität aber eher gering. Alle drei hergestellten Tomatinasefragmente von TomA können Xylan hydrolysieren, allerdings unterschiedlich stark. Bei unlöslichem Xylan als Substrat setzt das kurze TomA-Fragment weniger Substrat als das lange TomA-Fragment in der

gleichen Zeiteinheit um. Durch diese Ergebnisse ergeben sich auch indirekt Hinweise auf die hintere Domäne von TomA. Das kurze, nur den N-Terminus beinhaltende TomA-Fragment setzt in der gleichen Zeit weniger Substrat um als das lange TomA-Fragment, welches die katalytische und die C-terminale Domäne umfasst. Dieses Ergebnis untermauert die Vorstellung, dass die hintere Domäne eine Bindedomäne für Xylane darstellen könnte. Speziell bei weniger löslichen Xylanen könnte diese Domäne die Bindung und in Folge dessen die Hydrolyse der vorderen katalytischen Domäne unterstützen. Absolut betrachtet ist die Umsatzmenge an Xylan pro Zeiteinheit im Vergleich zu α -Tomatin als Substrat aber eher gering. Dies deutet darauf hin, dass TomA als Mitglied der Glycosylhydrolase-Familie 10 zwar noch Xylanaseaktivität hat, aber die Tomatinaseaktivität wesentlich stärker ist.

In weiteren Experimenten sollte gezielt die hintere Domäne von TomA, die eine mögliche Bindedomäne darstellt, untersucht werden. Dazu wäre es sinnvoll diese in *E. coli* zu überexprimieren und mit dem aufgereinigten Protein Studien zur Substratbindung und zur katalytischen Aktivität durchzuführen. Wenn es Anhaltspunkte für konkrete Bindemotive gäbe, könnte man auch alternativ durch gezielte Mutagenese in der Bindedomäne überprüfen, ob es die Bindung an das Substrat beeinflusst und damit die Funktion als Bindedomäne bestätigt.

V. Antikörper gegen TomA

Gegen TomA wurde ein Antikörper hergestellt. Dazu wurde ein in *E. coli* rekombinant hergestelltes Fragment von TomA, welches die vordere und hintere Domäne ohne Signalpeptid umfasst, einem Kaninchen appliziert. Nach Stimulation der Immunantwort wurde auf diese Weise ein polyklonaler Antikörper erhalten. Im Westernblot konnte gezeigt werden, dass dieser Antikörper nicht nur die rekombinante Tomatinase aus *E. coli* erkennt, sondern auch das native TomA Protein aus *Cmm*. Damit konnte gezeigt werden, dass das TomA Protein bei der Überexpression in *E. coli* und nach anschließender Aufreinigung korrekt gefaltet wurde, da seine Sekundär- und Tertiärstruktur dem der aus *Cmm* entsprechen muss, da der Antikörper sonst nicht die Tomatinase aus *Cmm* erkennen würde. Ferner konnte gezeigt werden, dass dieser Antikörper hochspezifisch ist und keine Bindung an weitere Proteine von *E. coli*, *Cmm* oder des Xylemsaftes von *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker nachgewiesen werden konnte.

Mit diesem hochspezifischen Antikörper wurde die native Tomatinase aus *Cmm* aufgereinigt. Der Antikörper wurde dazu über Protein A an Sepharose immobilisiert. Mit diesem so hergestellten Chromatografiematerial konnte aus konzentrierten Kulturüberständen von *Cmm*, welche mit α -Tomatin angezogen wurden, die native Tomatinase isoliert werden. Diese ist katalytisch aktiv: sie hydrolysiert von α -Tomatin das Tetrasaccharid und setzt das Aglycon Tomatidin frei. SDS-PAGE Analysen der aufgereinigten Tomatinase aus *Cmm* zeigten allerdings zwei weitere, bräunliche Banden, die aber auch in den Waschfraktionen auftauchen. Für weitergehende MALDI Analysierung mit anschließender MASCOT-Identifizierung lag nicht genug Proteinmaterial vor, deshalb konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, welche Bande der nativen Tomatinase aus *Cmm* zuzuordnen ist. Das SDS-PAGE Gel wurde sehr lange mit Silber angefärbt, um auch schwache Banden sichtbar zu machen, was daran zu erkennen ist, dass der Marker überfärbt ist. Betrachtet man vor diesem Hintergrund die Banden der aufgereinigten Tomatinasefraktion, so spricht dieses eher dafür, dass die kleinere, diskrete, schwarze Bande der Tomatinase zuzuordnen ist. Außerdem taucht diese ausschließlich in den Elutionsfraktionen auf. Die größere, bräunlichere Bande deutet auf eine Verunreinigung hin, zumal diese auch in den Waschfraktionen zu erkennen ist. Sollte sich in einer Wiederholung dieses Experimentes mit anschließender Analyse der Proteinbanden durch MASCOT-Analysen bestätigen, dass die kleinere, schwarze Bande TomA zuzuordnen ist, könnte es andeuten, dass die Tomatinase von *Cmm* prozessiert wurde.

Um zu überprüfen, an welcher Stelle das N-terminale Signalpeptid zur Ausschleusung des Genproduktes von *tomA* abgespalten wird, wurde bereits eine N-terminale Sequenzierung der aus *Cmm* aufgereinigten TomA bei der Firma Toplab in München in Auftrag gegeben. Dazu wurden sämtliche Eluatfraktionen aufkonzentriert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran geblottet, die entsprechende Bande ausgeschnitten und zur Sequenzierung gegeben. Die Menge an TomA war aber nicht ausreichend, um den N-Terminus sicher zu bestimmen.

Es konnte gezeigt werden, dass durch Kopplung des Antikörpers gegen rekombinante TomA die Tomatinase aus *Cmm* aufgereinigt werden kann. Diese Methode sollte in Zukunft weiter optimiert werden, um größere Mengen an TomA analysieren zu können. Nach Verifizierung von TomA durch MALDI- und MASCOT-Analysen stehen dann eine Vielzahl interessanter Möglichkeiten zur weiteren Charakterisierung von TomA an. Dabei sollte erneut versucht werden, den N-Terminus zu bestimmen, um zu sehen an welcher Stelle das Signalpeptid von TomA abgespalten wird. Wenn genügend Protein zur

Verfügung steht, können weitere biochemische Tests durchgeführt und mit der rekombinanten Tomatinase aus *E. coli* verglichen werden. Es sollte unter anderem die Reaktionsgeschwindigkeit untersucht werden, um Hinweise auf mögliche Verluste der Aktivität von TomA bei der aufwendigen Aufreinigung aus *E. coli* zu erhalten. Mit dem Antikörper könnten außerdem Untersuchungen zur Expression von TomA in der Pflanze vorgenommen werden. Es könnten gezielt infizierte Gewebe der Tomate analysiert werden, um herauszufinden, in welchen Stadien der Infektion der Tomatenpflanze die Tomatinase exprimiert wird.

VI. Fazit und Ausblick

Zu Beginn dieser Arbeit waren ausschließlich Tomatinasen phytopathogener Pilze bekannt. Mit TomA von *Cmm* konnte somit die erste Tomatinase bakterieller Herkunft beschrieben werden (Kaup et al., 2005). Neben der Identifikation von TomA als Tomatinase hat diese Arbeit dazu beigetragen, die enzymatischen Eigenschaften von TomA biochemisch zu charakterisieren. Dabei wurde auch festgestellt, dass die katalytische Funktion in der vorderen Domäne von TomA lokalisiert ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von TomA durch das Gen *catR* positiv reguliert wird. In weiterführenden Experimenten sollte untersucht werden, an welcher Stelle CatR im Promotorbereich von *tomA* bindet und ob weitere Gene von CatR reguliert werden. Dabei sollte auch das Gen *bglA* in der Nachbarschaft von *tomA* einbezogen werden, da es Hinweise darauf gibt, dass *bglA* in den weiteren Hydrolyseschritten von α -Tomatin beteiligt sein könnte (Seipke et al., 2008).

Eine wichtige Frage, die in dieser Arbeit geklärt werden sollte, war: Welche Bedeutung hat die Tomatinase in der Pathogen-Pflanzen-Interaktion? Hier zeigte sich, dass die Tomatinase in der Interaktion von *Cmm* mit der Wildtomatenart *Lycopersicon pimpinellifolium* einen Pathogenitätsfaktor darstellt. Denn eine Infektion mit Mutanten von *Cmm*, bei denen das Tomatinasegen inaktiviert wurde, führte zu einem signifikant reduzierten Titer von *Cmm* in der Pflanze. Dagegen scheint die Tomatinase auf die Interaktion von *Cmm* mit der Kulturtomate *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker, die aufgrund von Züchtungen offensichtlich einen geringeren Gehalt an α -Tomatin hat, keinen Effekt zu haben. In diesem Zusammenhang könnte eine Bestimmung des α -

Tomatin-Gehaltes des Xylemsaftes Aufschluss darüber geben, ob eine Expression der Tomatinase bei der Kolonisierung des Xylems überhaupt eine Rolle spielt.

Zur Beantwortung dieser Frage kann auch der Antikörper, der gegen die rekombinante Tomatinase hergestellt wurde, verwendet werden. Dieser polyklonale Antikörper erkennt die native Tomatinase aus *Cmm* und kann somit eingesetzt werden, um zu überprüfen, in welchen Pflanzengeweben die Tomatinase im Wirt exprimiert wird. Damit ließe sich beantworten, ob TomA nur während der Infektionsphase oder auch noch im späteren Krankheitsverlauf, bei der Etablierung des Erregers im Xylem, exprimiert wird.

Des Weiteren konnte durch Immobilisierung des Antikörpers an Protein A die native Tomatinase aus *Cmm* isoliert werden. Mit dieser ausgearbeiteten Methode können nun die Erkenntnisse über die biochemischen Eigenschaften der rekombinanten Tomatinase mit der nativen Tomatinase aus *Cmm* verglichen werden. Durch Sequenzierung des N-Terminus der nativen Tomatinase sollte damit auch die Prozessierungsstelle von TomA in *Cmm* bestimmt werden.

G. Literatur

- Abt, B. (2003): Etablierung eines Systems zur Komplementation von Transposonmutanten von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Abt, B. (2008): Untersuchungen zur Stabilität und Konjugation der Plasmide pCM1 und pCM2 von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Dissertation, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Asano, M., Shirota, K., Anan, T., Yamashoji, S., Isshiki, K. (1996): Measurement of tomatine content in tomatoes with bioassay procedure. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi* 43(3):275-280.
- Balashova, I. T., Verderevskaya, T. D., Kintya, P. K. (1984): Antiviral activity of steroid glycosides on a model of tobacco mosaic virus (TMV). *S-kh. Biol.* 83-86.
- Beimen, A., Bempohl, A., Meletzus, D., Eichenlaub, R., Barz, W. (1992): Accumulation of phenolic compounds in leaves of tomato plants after infection with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains differing in virulence. *Z. Naturforsch.* 47c:898-909.
- Benhamou, N., Lafitte, C., Barthe, J. P., Esquerre-Tugaye, M. T. (1991): *Plant Physiol.* 97:234-244.
- Bergey, D. H., Holt, J. G. (2004): *Bergey's manual of systemic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Binns, A. N., Thomashow, M. F. (1988): Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. *Annu. Rev. Microbiol.* 42:575-606.
- Bouarab K., Melton R., Peart J., Baulcombe D., Osbourn A. (2002): A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* 418:889-892.

- Chandra, R. P., Bura, R., Mabee, W. E., Berlin, A., Pan, X., Saddler, J. N. **(2007)**: Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 108:67-93.
- Davis, M. J., Gillaspie, A. G., Vidaver, A. K., Harris, R. W. **(1984)**: *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., supsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov. pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. *Int. J. Syst. Bact.* 34:107-117.
- Doke, N., Miura, Y., Sanchez, L. M., Park, H.-J., Noritake, T., Yoshioka, H., Kawakita, K. **(1996)**: The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence – a review. *Gene* 179:45-51.
- de Torres, M., Mansfield, J. W., Grabov, N., Brown, I. R., Ammouneh, H., Tsiamis G., Forsyth, A., Robatzek, S., Grant, M., Boch, J. **(2006)**: *Pseudomonas syringae* effector AvrPtoB suppress basal defense in Arabidopsis. *Plant J.* 47:368-382.
- Dreier, J. **(1995)**: Molekulargenetische Analyse der *pat-1*-Genregion des Plasmids pCM2 von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Entwicklung eines diagnostischen Nachweisverfahrens. Dissertation, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Dreier, J., Meletzus, D., Eichenlaub, R. **(1997)**: Characterization of the plasmid encoded virulence region *pat-1* of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Mol. Plant-Microbe Int.* 10:195-206.
- Elferink, J. G. R. **(1977)**: The hemolytic action of saponins. *Pharm. Weekbl.* 112:1-10.
- El-Raheem, A., El-Shanshoury, R., El-Sououd, S. M., Awadalla, O. A., El-Bandy, N. B. **(1995)**: Formation of tomatine in tomato plants infected with *Streptomyces* species and treated with herbicides, correlated with reduction of *Pseudomonas solanacearum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Acta Microbiol. Pol* 44: 255-66.

- Engemann, J. (2006): Charakterisierung des Peroxiredoxins Bcp von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Dissertation, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Fatmi, M., Schaad, N. W., (2002): Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in infected tomatoe stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathol.* 51:149-154.
- Felix, G., Duran, D., Volko, S., Boller, T. (1999): Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18:265-276.
- Flor, H. H. (1955): Host-parasite interaction in flax rust – its genetics and other implications. *Phytopathology* 45 : 680-685.
- Flor, H. H. (1971): Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9:275-296.
- Fontaine, T. D., Irving, G. W., Jr., Ma, R. N., Poole, J. B., Doolittle, S. P. (1948): Isolation and partial characterization of crystalline tomatine, an antibiotic agent from the plant. *Arch. Biochem.* 18:467-475.
- Friedman, M., Fitch, T. E., Yokoyama, W. E. (2000): Lowering of plasma LDL cholesterol in hamsters by the tomato glycoalkaloid tomatine. *Food Chem. Toxicol.* 38:549-53.
- Friedman, M. (2002): Tomato Glycoalkaloids: Role in Plant and in the diet. *J. Agric. Food Chem.* 50:5751-5780.
- Friedmann, M., Levin, C. E. (1998): Dehydrotomatine content in tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* 46:4571-4576.
- Fuchs, G., Schlegel, H. G., (2006): Allgemeine Mikrobiologie. 8. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart.

- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., Pugin, A. (2006): Early signaling events induced by elicitor of plant defenses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19(7):711-724.
- Gartemann, K.-H., (1999): Genetische Charakterisierung der 4-Chlorbenzoat-Dehalogenasen verschiedener *Arthrobacter* Spezies und Entwicklung eines Transposon-Mutagenesesystems. Dissertation, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Gartemann, K.-H., and Eichenlaub, R. (2001): Isolation and characterization of IS1409, an insertion element of 4-chlorobenzoate-degrading *Arthrobacter* sp. strain TM1 and development of a system for transposon mutagenesis. *J. Bacteriol.* 183:3729-3736.
- Gartemann, K.-H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., Gaigalat, L., Goesmann, A., Gräfen, I., Kalinowski, J., Kaup, O., Kirchner, O., Krause, L., Linke, B., McHardy, A., Meyer, F., Pohle, S., Rückert, C., Schneiker, S., Zellermann, E.-M., Pühler, A., Eichenlaub, R., Kaiser, O., and Bartels, D. (2008): The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J. Bacteriol.* 190(6):2138-2149.
- Gitaitis, R. D. (1990): Induction of a hypersensitive-like reaction in four-o'clock by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Dis.* 74:58-60.
- Gräfen, I. (2001): Herstellung einer Cosmid-Genbank von *Clavibacter michiganensis* susp. *michiganensis* und Analyse der *chp-1*-Genregion. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- 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.

- Greenberg, J. T. (1997): Programmed cell death in plant pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:525-545.
- Hahn, M. G., Darvill, A. G., Albersheim, P. (1981): Host-Pathogen Interactions: XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiol.* 68 (5):1161-1169.
- Harlow, E., Lane, D. (1999): Using antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Hartung, J. S., Beretta, J., Brlansky, R. H., Spisso, J., Lee, R. F. (1994): Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* 84:591-597.
- Hayward, A. C. (1991): Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:65-87.
- He, S. Y., Huang, H. C., Collmer, A. (1993): *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin_{PSS}: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* 73:1255-1266.
- Hock, B., Elstner, E. F. (1995): Schadwirkungen auf Pflanzen: Lehrbuch der Pflanzentoxikologie. 3. Aufl., Spektrum Akad. Verl., Heidelberg.
- Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M., Schrempf, H. (1985): Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. John Innes Foundation, Norwich.
- Hostettmann, K. A., Marston, A. (1995): Saponins. Chemistry and pharmacology of natural products. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Irving, G. W., Jr., Fontaine, T. D., Doolittle, S. P. (1945): Lycopersicon, a fungistatic agent from the tomato plant. *Science*, 102:9-11.

- Irving, G. W., Jr., Fontaine, T. D., Doolittle, S. P. (1946): Partial antibiotic spectrum of tomatine, an antibiotic agent from the tomato plant. *J. Bacteriol.* 52:601-607.
- Ito, S., Kawaguchi, T., Nagata, A., Tamura, H., Matsushita, H., Takahara, H., Tanaka, S., Ikeda, T. (2004a): Distribution of the FoTomI gene encoding tomatinase in formae speciales of *Fusarium oxysporum* and identification of a novel tomatinase from *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, the causal agent of Fusarium crown and root rot of tomato. *J. Gen. Plant Pathol.* 70:195-201.
- Ito, S., Eto, T., Tanaka, S., Yamauchi, N., Takahara, H., Ikeda, T. (2004b): Tomatidine and Lycotetraose, hydrolysis products of α -tomatine by *Fusarium oxysporum* tomatinase suppress induced defense responses in tomato cells. *FEBS Lett.* 571(1-3):31-4.
- Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R., Eichenlaub, R. (2000): The endo- β -1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:703-714.
- Jahr, H. (2000): Characterization of the endo- β -1,4-glucanase CelA, a phytopathogenic determinant secreted by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and its role in symptom development. Dissertation, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Jones, J. D., Dangl, J. L. (2006): The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Juvik, J. A., Stevens, M. A. (1982a): Inheritance of foliar α -tomatine content in tomatoes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 107(6):1061-1065.
- Juvik, J. A., Stevens, M. A., Rick, C. M. (1982b): Survey of the genus *Lycopersicon* for variability in α -tomatine content. *HortScience* 17:764-766.
- Kannenbergh, E. L., Perzl, M., Müller, P., Härtner, T., Poralla, K. (1996): Hopanoid lipids in *Bradyrhizobium* and other plant associated bacteria and cloning of the *Bradyrhizobium* squalene-hopene cyclase gene. *Plant and Soil* 186:107-112.

- Kaup, O. (2002): Erzeugung von Insertionsmutanten in den Genen *tomA* und *regB* von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Kaup, O., Gräfen, I., Zellermann, E.-M., Eichenlaub, R., Gartemann, K.-H. (2005): Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18(10):1090-1098.
- Kers, J. A., Cameron, K. D., Joshi, M. V., Bukhalid, R. A., Morello, J. E., Wach, M. J., Gibson, D. M., Loria, R. (2005): A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *J. Mol. Microbiol.* 55(4):1025-1033.
- Keukens, E. A. J., de Vrije, T., van dem Boom, C., de Waard, P., Plasmna, H. H., Theil, F., Chupin, V., Jongen, W. M. F., de Kruijff, B. (1995): Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta* 1240:216-228.
- Kirchner, O., Gartemann, K.-H., Zellermann, E.-M., Eichenlaub, R., Burger, A. (2001): A highly efficient transposon mutagenesis system for the tomato pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:1312-1318.
- Kleitman, F., Barash, I., Burger, A., Iraki, N., Falah, Y., Sessa, G., Weinthal, D., Chalupowicz, L., Gartemann, K.-H., Eichenlaub, R., Manulis-Sasson, S. (2008): Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *Eur. J. Plant Pathol.* 121:463-475.
- Kozukue, N., Han, J-S., Lee, K-R., Friedmann, M. (1994): Dehydrotomatine and α -tomatine content in tomato fruits and vegetative plant tissues. *J. Agric. Food Chem.* 52:2079-2083.
- Lamb, C., Dixon, R. A. (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:251-275.

- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
- Lairini, K., Perez-Espinosa, A., Pineda, M., Ruiz-Rubio, M. (1996): Purification and Characterization of Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1604-1609.
- Lairini, K., Ruiz-Rubio, M. (1997): Detection of tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in infected tomato plants. *Phytochemistry* 45: 1371-1376.
- Lavie, Y., Harel-Orbital, T., Gaffield, W., Liscovitch, M. (2001): Inhibitory effect of steroidal alkaloids on drug transport and multidrug resistance in human cancer cells. *Anticancer Res.* 21:1189-1194.
- Leach, J. E., White, F. F. (1996): Bacterial avirulence genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:153-179.
- Lee, K. R., Kozukue, N., Han, J. S., Park, J. H., Chang, E. Y., Baek, E. J., Chang, J. S., Friedman M. (2004): Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 52(10):2832-9.
- Leyns, F., DeCleene, M., Swings, J. G., Deley, J. (1984): The host range of genus *Xanthomonas*. *Bot. Rev.* 50:308-356.
- Little, E., Bork, P., Doolittle, R. (1994): Tracing the spread of fibronectin type III domains in bacterial glycohydrolases. *J. Mol. Evol.* 39:631-643.
- Loria, R., Kers., J., Joshi, M. (2006): Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:16.1-16.19.
- Lykidis, A., Mavromatis, K., Ivanova, N., Anderson, I., Land, M., DiBartolo, G., Martinez, M., Lapidus, A., Lucas, S., Copeland, A., Richardson, P., Wilson, D. B., Kyrpides, N. (2007): Genome sequence and analysis of the soil cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca* YX. *J. Bacteriol.* 189(6):2477-2486.

- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. **(1982)**: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Maramorosh, K., Plavsic-Banjac, B., Bird, J., Liu, L. J. **(1973)**: Electron microscopy of ratoon stunted sugarcane: microorganisms in the xylem. *Phytopathol. Zeitschrift* 77:270-273.
- Marathe, R., Dinesh-Kumar, S. P. **(2003)**: Plant defense: one post, multiple guards? *Mol. Cell* 11(2):284-246.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hao, L., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Krylov, D., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yin, J. J., Zhang, D., Bryant, S. H. **(2007)** *CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis*. *Nucleic Acids Res.* 35(Database issue):D237-240.
- Martin-Hernandez, A. M., Dufresne, M., Hugouvieux V., Melton R., Osbourn A. **(2000)**: Effects of targeted replacement of the tomatinase gene on the interaction of *Septoria lycopersici* with tomato plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 1301-1311
- Mayer, K., **(2006)**: Versuche zur Identifikation regulatorischer Proteine bei *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Mc Lean, F. **(1921)**: A study of the structure of the stomata of two species of citrus in relation to citrus canker. *Bull. Torrey Bot. Club*, 48:101-105.
- Meletzus, D., Eichenlaub, R. **(1991)**: Transformation of the pathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by electroporation development of a cloning vector. *J. Bacteriol.* 173:184-190.
- Meletzus, D., Bermpohl, A., Dreier, J., Eichenlaub, R. **(1993)**: Evidence for plasmid encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *J. Bacteriol.* 175:2131-2136.

- Metzler, M. C., Laine, M., De Boer, S. H. (1997): The status of molecular biological research on the plant pathogenic genus *Clavibacter*. FEBS Letters 150:1-8.
- Miller, G. L. (1959): Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31(3):426-428.
- Morrison, D. A. (1979): Transformation and preservation of competent bacterial cells by freezing. Meth. Enzymology 68:387-418.
- Morrissey, J. P., Osbourn, A. E. (1999): Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. Am. Soc. Microbiol. 63:708-724.
- Mudgett, M. B. (2005): New insights to the function of phytopathogenic bacteria type III effectors in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 56:509-531.
- Mullis, K., Falloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Ehrlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant. Biol. 51:263-273.
- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Nelson, W. C., Ketchum, K. A., McDonald, L., Utterback, T. R., Malek, J. A., Linher, K. D., Garrett, M. M., Stewart, A. M., Cotton, M. D., Pratt, M. S., Phillips, C. A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., White, O., Salzberg, S. L., Smith, H. O., Venter, J. C., Fraser, C. M. (1999): Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. Nature 399(6734):323-329.
- Nes, W. R. (1974): Role of sterols in membranes. Lipids 9:596-612.
- Nishie, K., Norred, W. P., Swain, A. P. (1975): Pharmacology and toxicology of chaconine and tomatine. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 12:657-668.
- Nicholas, K. B., Nicholas, H. B. J., Deerfield, D. W. I. (1997): Genedoc: Analysis and visualization of genetic variation. Embnew. News, 4:14.

- Nürnberg T., Scheel, D. (2001): Signal transmission in the plant immune response. Trends Plant Sci. 6(8):372-379.
- Nürnberg T., Brunner, F. (2002): Innate Immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen associated molecular patterns. Curr. Opin. Plant Biol. 5(4):318-324.
- Osbourn, A. E. (1998): Saponins in plant defense. in: Recent advances in Phytochemistry Vol. 32, Plenum Press, New York.
- Ourisson, G., Rohmer, M., Poralla, K. (1987): Prokaryotic hopanoids and other polyterpenoid sterol surrogates. Annu. Rev. Microbiol. 41:301-333.
- Papadopoulou, K., Melton, R. E., Leggett, M., Daniels, M. J., Osbourn, A. E. (1999): Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. PNAS, 96:12923-12928.
- Pareja-Jaime, Y., Roncero, M. I. R., Ruiz-Roldan, M. C. (2008): Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is required for full virulence on tomato plants. Mol. Plant Microbe Interact. 21(6):728-736.
- Poralla, K., Kannenberg, E., Blume, A. (1980): A glycolipid containing hopan isolated from the acidophilic, thermophilic *Bacillus acidocaldarius*, has a cholesterol-like function in membranes. FEBS Letters 113:107-110.
- Poralla, K. (1982): Hopanoide: Steroidäquivalente in Membranen von Bakterien und ein möglicher Seitenzweig bei der Evolution der Steroidbiosynthese. Forum Mikrobiologie 5:176-179.
- Quidde, T., Osbourn, A., Tudzynski, P. (1998): Detoxification of α -tomatine by *Botrytis cinerea*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 52:151-165.
- Rick, C. M., Uhlig, J. W., Jones, A. D. (1994): High α -tomatine content in ripe fruit of Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*: Development and genetic aspects. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:12877-12881.

- Ripperger, H., Porzel, A. (1994): Pimpifolidine and 22-Isopimpifolidine, 22,26-Epimino-16,23-Epoxycholestane alkaloids from the wild tomato *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Phytochemistry* 35(3):813-815.
- Roldan-Arjona, T., Pérez-Espinosa, A., Ruiz-Rubio, M. (1999): Tomatinase from *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* defines a new class of saponinases. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:852-861.
- Ruiz-Arribas, A., Sanchez, P., Calvete, J. J., Raida, M., Fernandez-Abalos, J. M., Santamaria, R. I. (1997): Analysis of *xysA*, a gene from *Streptomyces halstedii* JM8 that encodes a 45-kilodalton modular xylanase, Xys1. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(8):2983-2988.
- Sackmann, W., Kern, H., Wiesmann, E. (1959): Studies on the biological effects of solanine and tomatine. *Schweiz. Z. Allg. Pathol. Bakteriolog.* 22:557-563.
- Saglio, P., Lhospital, M., Lafleche, D., Dupont, G., Bove, J. M., Tully, J. G., Freundt, E. A. (1973): *Spiroplasma citri* gen. and sp. nov.: a mycoplasma-like organism associated with stubborn disease of citrus. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23:191-204.
- Saito, A., Fujii, T., Miyashita, K. (2003): Distribution and evolution of chitinase genes in *Streptomyces* species: involvement of gene duplication and domain deletion. *Antonie Leeuwenhoek* 84:7-16.
- Sandrock, R. W., Della Penna, D., VanEtten, H. D. (1995): Purification and characterization of β_2 -tomatinase, an enzyme involved in the degradation of α -Tomatin and isolation of the gene encoding β_2 -tomatinase from *Septoria lycopersici*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:852-861
- Schlösser, E. (1975): Role of saponins in antifungal resistance. IV. Tomatine dependent development of fruit rot organisms on tomato fruits. *Z. Pfl. Krankh. Pfl. Schutz*, 82:476-484.
- Schlösser, E. (1997): *Allgemeine Phytopathologie*, 2. Aufl., Thieme Verlag ,Stuttgart, New York.

- Schlösser, E. (2002): Persönliche Stellungnahme zur Wirkungsweise von α -Tomatin auf Mikroorganismen. Abschlusstagung des trilateralen Projektes: „The molecular pathogenicity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* and *E. herbicola* pv. *betae*“, Bielefeld.
- Schott, Sandra (2004): Charakterisierung von Transposonmutanten von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* mit veränderter Virulenz. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Schroth, M. N., Thomson, S. V., Hildebrand, D. C., Moller, W. J. (1974): Epidemiology and control of fire blight. *Annu. Rev. Phytopathol.* 12:389-412.
- Seipke, R. F., Loria, L. (2008): *Streptomyces scabies* 87-22 possesses a functional tomatinase. *J. Bac.* 190(23):7684-7692.
- Simon-Plas, F., Elmayan, T., Blein, J. P. (2002): The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J.* 31(2):137-147.
- Sjostrom, E. (1981): *Wood chemistry: fundamentals and applications*. Academic Press, 2nd Edit., Washington DC, USA.
- Strasburger, E., Noll, F., Schenk, H., Schimper, A. F. W., Bresinsky, A., Körner, C., Kadereit, J. W., Neuhaus, G., Sonnewald, U. (2008): *Lehrbuch der Botanik*, 36. Aufl., Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg.
- Steingröver, M. (2003): Charakterisierung der *chp*-Region von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Strider, D. L. (1969): Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. A literature review and bibliography. North Carolina Agricultural Experiment Station, Tech. Bull. no. 193.

- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn J. J., Dubendorff, J. W. **(1990)**: Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* 185:60-89.
- Sulemann, P., Tohamy, A. M., Saleh, A. A., Madkour, M. A., Straney, D. C. **(1996)**: Variation in sensitivity to tomatine and rishitin among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, and strains not pathogenic on tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48:131-144.
- Syrový, L. and Hodný, Z. **(1991)**: Staining and quantification of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Chromatog.* 569:175-196.
- Tenhaken, R., Levine, A., Brisson, L. F., Dixon, R. A., Lamb, C. **(1995)**: Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(10):4158-4163.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. **(1994)**: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22:4673-4680.
- Tsiantos, J. **(1987)**: Transmission of *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. *J. Phytopathol.* 119: 142-146.
- Tsujibo, H., Kosaka, M., Ikenishi, S., Sato, T., Miyamoto, K., Inamori, Y. **(2003)**: Molecular characterization of a high affinity xylobiose transporter of *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 and its transcriptional regulation. *J. Bac.* 186:1029-1037.
- van den Berg, M. A., Albang, R., Albermann, K., Badger, J. H., Daran, J. M., Driessen, A. J., Garcia-Estrada, C., Fedorova, N. D., Harris, D. M., Heijne, W. H., Joardar, V., Kiel, J. A., Kovalchuk, A., Martin, J. F., Nierman, W. C., Nijland, J. G., Pronk, J. T., Roubos, J. A., van der Klei, I. J., van Peij, N. N., Veenhuis, M., von Dohren, H., Wagner, C., Wortman, J., Bovenberg, R. A. **(2008)**: Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *J. Nat. Biotechnol.* 26(10):1161-1168.

- VanEtten, H. D., Mansfield, J. W., Bailey, J. A., Farmer, E. E. **(1994)**: Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus „phytoanticipins“. *Plant Cell* 6:1191-1192.
- Vieira, J., Messing, J. **(1982)**: The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertionmutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259-268.
- Vorwerk, S., Somerville, S., Somerville, C. **(2004)**: The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci.* 9:203-209.
- Wei, Z. M., Laby, R. J., Zumoff C. H., Bauer D. W., He, S. Y., Collmer, A., Beer, S. V. **(1992)**: Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257:85-88.
- Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H. Y., Weisberg, W. G., Mandelco-Paul, L., et al. **(1987)**: *Xylella fastidiosa* new-genus new-species Gram-negative xylem-limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:136-143.
- Winter, M. **(2008)**: Charakterisierung von Transkriptionsregulatoren von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Wojtaszek, P. **(1997)**: Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322:681-692.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. **(1985)**: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.
- Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., Durner, J. **(2004)**: Innate Immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:15811-15816.

H. Anhang

I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
AS	Aminosäure(n)
Abb.	Abbildung
add.	additiv
Amp	Ampicillin
Ap ^R	Ampicillin-resistent
APS	Ammoniumperoxodisulfat
avr	Avirulenz
NBT/BCIP	Nitroblau-Tetrazoliumsalz / 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylpyrophosphat
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cfu	colony forming units
Cm	Chloramphenicol
Cm ^R	Chloramphenicol-resistent
<i>Cmm</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subspezies <i>michiganensis</i>
<i>Cmm382</i>	Wildtyp: <i>Clavibacter michiganensis</i> subspezies <i>michiganensis</i> NCPPB382
<i>cmx</i>	Chloramphenicol-Exporter-Gen
cv.	cultivar
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
dTT	Dithiotreithol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
et al.	et alii (= und andere)
h	Stunde
HR	hypersensitive Reaktion
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
Km ^R	Kanamycin-resistent
L	Liter
M	molar
MeOH	Methanol
min	Minuten
Millipore-H ₂ O	entionisiertes Wasser aus der Millipore™-Analge
mL	Milliliter
mM	millimolar
MW	Molekulargewicht
NCPPB	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria
Nm	Neomycin
OD	optische Dichte

ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
PEG	Polyethylenglycol
p.i.	post infection (= nach Infektion)
PCR	polymerase chain reaction (= Polymerasekettenreaktion)
PS	Puffersaline
R-Gen	Resistenzgen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reactive oxygen species
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SSC	Sodium-Saline-Citrat
Std.	Stunde
subsp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
TBY	Trypton-Broth-Yeast
TEMED	Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
u	Unit
ü/N	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
Vol.	Volumen
WI	Welkeindex
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid

II. Plasmidkarten und Protein-Alignment

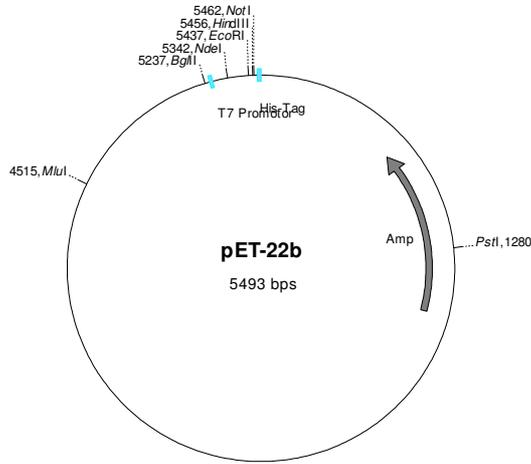


Abb. 42: Plasmidkarte des *E. coli* Expressionsvektors pET-22b (Fa. Novagen). T7 Promotor und His-Tag (blau dargestellt), Amp: β -Laktamase-Gen

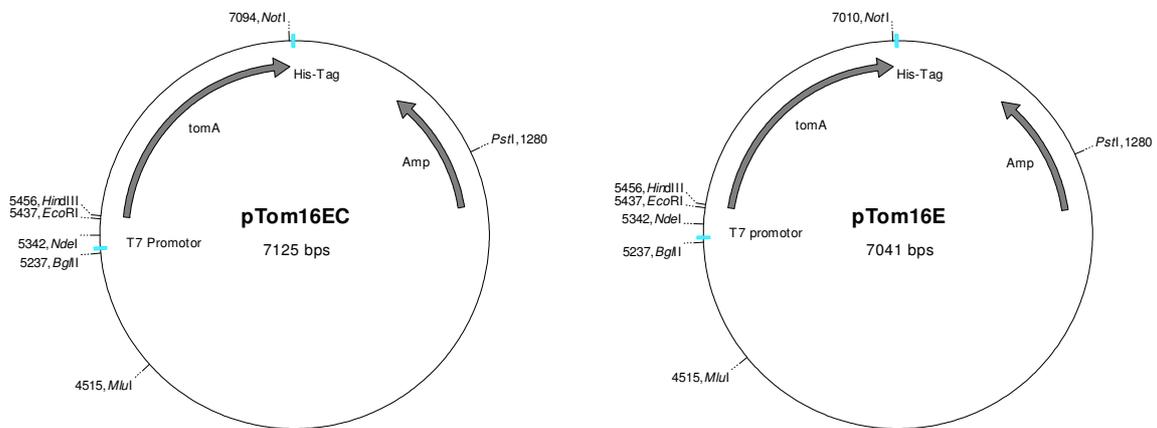


Abb. 43: Plasmidkarten der Expressionsplasmide pTom16_{EC} (1639 bp *HindIII/NotI* PCR-Produkt von *tomA* in pET-22b) und pTom16_E (1555 bp *HindIII/NotI* PCR-Produkt von *tomA* in pET-22b). T7 Promotor und His-Tag (blau dargestellt), Amp: β -Laktamase-Gen

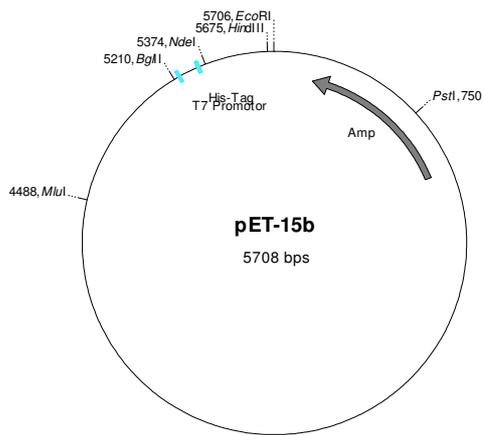


Abb. 44: Plasmidkarte des *E. coli* Expressionsvektors pET-15b (Fa. Novagen). T7 Promotor und His-Tag (blau dargestellt), *Amp*: β -Laktamase-Gen

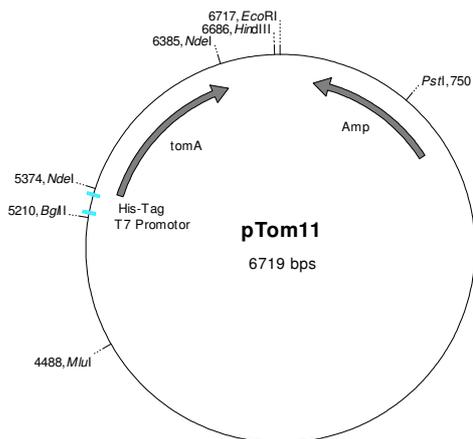


Abb. 45: Plasmidkarte des Expressionsplasmides pTom11 (1011 bp *NdeI* PCR-Produkt von *tomA* in pET-15b). T7 Promotor und His-Tag (blau dargestellt), *Amp*: β -Laktamase-Gen

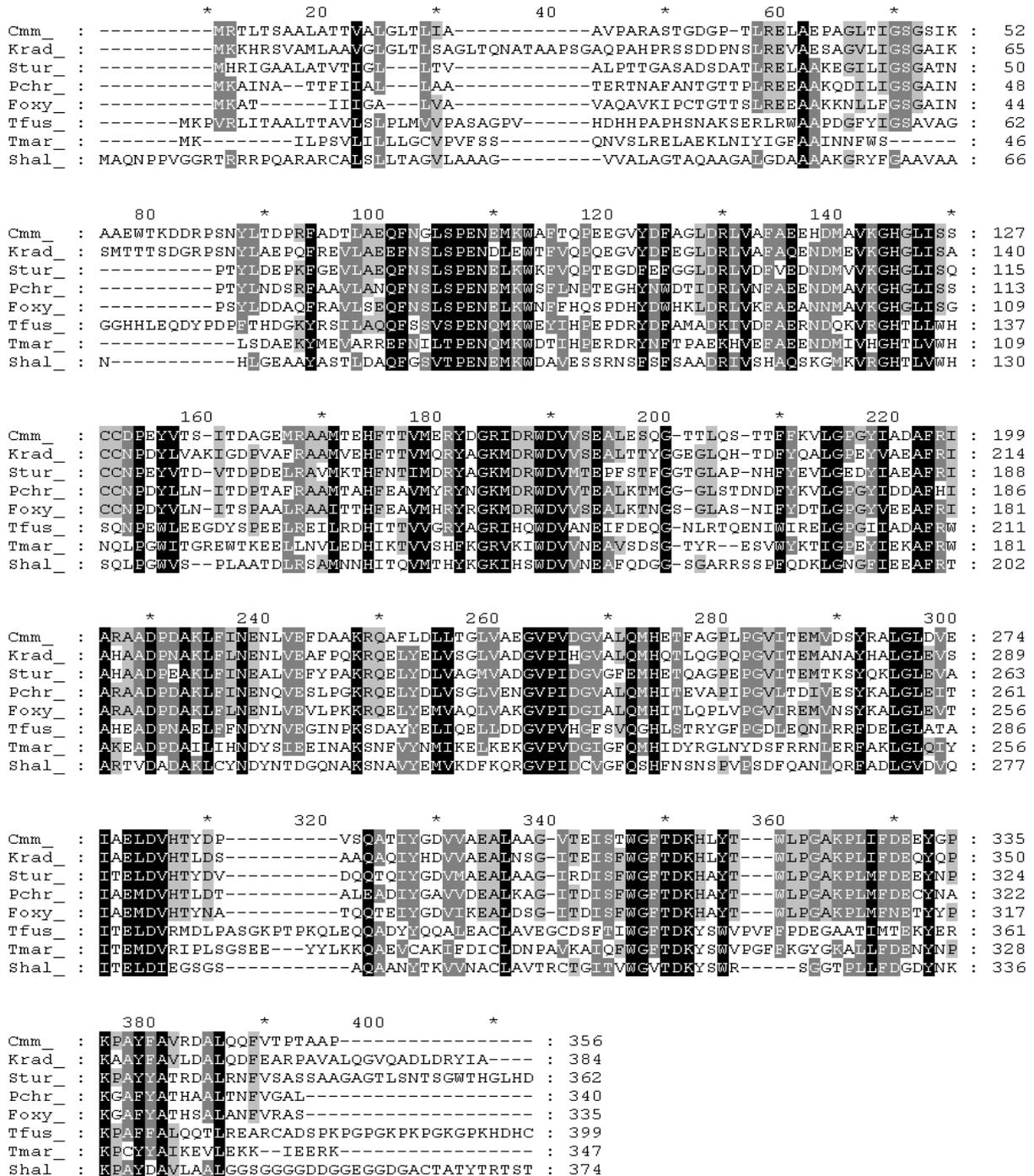


Abb. 46: Alignment der N-terminalen, katalytischen Domäne von TomA mit verschiedenen Mitgliedern der Glykosylhydrolase-Familie 10. Verwendete Sequenzen ("accession"-Nummern in Klammern): Cmm_ : TomA von Cmm, AS: 1 - 356; Krad_ : endo-1,4-β-Xylanase von *Kineococcus radiotolerans*, AS 1 - 384, (YP_001362287); Stur_ : putative Tomatinase von *Streptomyces thurgidiscabies*, AS: 1 - 362, (AAW49296) (Kers et al., 2005); Pchr_ : hypothetisches Protein von *Penicillium chrysogenum* Wisconsin (CAP93841) (van den Berg et al., 2008); Foxy_ : Tomatinase von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (CAA10112) (Roldan-Arjona et al., 1999); Tfus_ : Xylanase von *Thermobifida fusca* (YP_290847) (Lykidis et al., 2007); Tmar_ : endo-1,4-β-Xylanase von *Thermotoga maritima* (NP_227886) (Nelson et al., 1999); Shal_ : Xys1 (Xylanase) von *Streptomyces halstedii* (AAC45554), AS: 1- 374, (Ruiz-Arribas et al., 1997)

III. Daten zu Pflanzentests

1. Pflanzentest an *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker

Stamm	Nr.	Titer
CMM101	1	7,82E+09
CMM101	2	3,33E+09
CMM101	3	8,47E+09
CMM101	4	1,36E+09
CMM101	5	6,14E+09
CMM101	6	5,86E+09
CMM101	7	7,51E+09
CMM101	8	6,73E+09
CMM101	9	6,20E+09
CMM101	10	3,62E+09
<i>CmmTom2</i>	1	6,74E+09
<i>CmmTom2</i>	2	1,22E+10
<i>CmmTom2</i>	3	2,94E+09
<i>CmmTom2</i>	4	3,14E+09
<i>CmmTom2</i>	5	5,93E+09
<i>CmmTom2</i>	6	3,93E+09
<i>CmmTom2</i>	7	4,64E+09
<i>CmmTom2</i>	8	5,89E+09
<i>CmmTom2</i>	9	6,42E+09
<i>CmmTom2</i>	10	6,96E+09
<i>CmmTom2</i>	11	6,47E+09
<i>CmmTom2</i>	12	5,55E+09
<i>CmmTom2</i>	13	1,58E+10
<i>CmmTom2</i>	14	1,80E+10
<i>CmmTom2</i>	15	9,05E+09
<i>CmmC7</i>	1	1,24E+09
<i>CmmC7</i>	2	4,74E+09
<i>CmmC7</i>	3	5,98E+09
<i>CmmC7</i>	4	9,12E+09
<i>CmmC7</i>	5	8,79E+09
<i>CmmC7</i>	6	7,38E+09
<i>CmmC7</i>	7	1,59E+10
<i>CmmC7</i>	8	3,68E+09
<i>CmmC7</i>	9	8,54E+09
<i>CmmC7</i>	10	2,11E+09

CMM101	
Mittelwert	Stabw.
5,70E+09	2,14E+09

alle <i>tomA</i> -Mutanten	
Mittelwert	Stabw.
7,24E+09	4,30E+09

Tab. 15: Titer von *Cmm* in Tomatenpflanzen 28 Tage nach Infektion, aus drei unabhängigen Tests. Einzeltiter in cfu/g Pflanzenhomogenat. Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabw.) von CMM101 (n = 10 Pflanzen) und allen *tomA*-Mutanten (n = 25 Pflanzen), Angaben in cfu/g Pflanzenhomogenat

2. Pflanzentest an *Lycopersicon pimpinellifolium*

Stamm	Nr.	Titer
CMM101	1	1,89E+08
CMM101	2	1,40E+08
CMM101	3	1,08E+07
CMM101	4	6,58E+07
CMM101	5	1,25E+08
CMM101	6	1,97E+08
CMM101	7	1,01E+08
CMM101	8	1,51E+08
CMM101	9	3,47E+08
CMM101	10	3,26E+07
CMM101	11	9,45E+07
CMM101	12	2,56E+07
CMM101	13	2,99E+07
CMM101	14	7,90E+07
CMM101	15	2,66E+07
<i>CmmTom2</i>	1	7,02E+06
<i>CmmTom2</i>	2	1,13E+07
<i>CmmTom2</i>	3	5,58E+06
<i>CmmTom2</i>	4	3,32E+07
<i>CmmTom2</i>	5	2,97E+06
<i>CmmTom2</i>	6	7,47E+06
<i>CmmTom2</i>	7	3,38E+07
<i>CmmTom2</i>	8	8,10E+05
<i>CmmTom2</i>	9	9,00E+05
<i>CmmTom2</i>	10	1,98E+06
<i>CmmTom2</i>	11	6,50E+05
<i>CmmTom2</i>	12	5,68E+05
<i>CmmTom2</i>	13	3,23E+05
<i>CmmTom2</i>	14	8,95E+05
<i>CmmTom2</i>	15	1,21E+07
<i>CmmTom2</i>	16	3,02E+05
<i>CmmTom2</i>	17	1,55E+06
<i>CmmTom2</i>	18	1,33E+06

Stamm	Nr.	Titer
<i>Cmm382</i>	1	1,75E+10
<i>Cmm382</i>	2	2,49E+09
<i>Cmm382</i>	3	4,56E+09
<i>Cmm382</i>	4	5,73E+09
<i>Cmm382</i>	5	2,27E+10
<i>Cmm382</i>	6	6,43E+09
<i>Cmm382</i>	7	1,53E+10
<i>Cmm382</i>	8	1,99E+09
<i>Cmm382</i>	9	1,01E+09
<i>Cmm382</i>	10	2,41E+10
<i>Cmm382</i>	11	1,59E+09
<i>Cmm382</i>	12	5,95E+09
<i>Cmm382</i>	13	2,09E+09
<i>Cmm382</i>	14	3,52E+09

<i>Cmm382</i>	
Mittelwert	Stabw.
7,24E+09	4,30E+09

CMM101	
Mittelwert	Stabw.
7,24E+09	4,30E+09

<i>CmmTom2</i>	
Mittelwert	Stabw.
7,24E+09	4,30E+09

Tab. 16: Titer von *Cmm* in Tomatenpflanzen, 28 Tage nach Infektion, aus drei unabhängigen Tests. Einzeltiter in cfu/g Pflanzenhomogenat. Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabw.) von *Cmm382* (n = 14 Pflanzen), CMM101 (n = 15 Pflanzen) und *CmmTom2* (n = 18 Pflanzen), Angaben in cfu/g Pflanzenhomogenat

I. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits in Fachzeitschriften publiziert:

Gartemann, K.-H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., Gaigalat, L., Goesmann, A., Gräfen, I., Kalinowski, J., Kaup, O., Kirchner, O., Krause, L., Linke, B., McHardy, A., Meyer, F., Pohle, S., Rückert, C., Schneiker, S., Zeller mann, E.-M., Pühler, A., Eichenlaub, R., Kaiser, O., and Bartels, D. **(2008)**: The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J. Bacteriol.* 190(6):2138-2149.

Kaup, O., Gräfen, I., Zeller mann, E.-M., Eichenlaub, R., Gartemann, K.-H. **(2005)**: Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18(10):1090-1098.

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

Diese Arbeit wurde gedruckt auf alterungsbeständigem Papier ° ° ISO 9706.

Bielefeld, im Mai 2009

Olaf Kaup

