

**Charakterisierung des Peroxiredoxins Bcp
von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

Dissertation

zur Erlangung des akademische Grades

Dr. rer. nat.

angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie/Mikrobiologie
der Fakultät für Biologie
der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Jutta Engemann

April 2006

Inhaltsverzeichnis

A.	Zusammenfassung	1
B.	Einleitung	3
1.	Bakterien-Pflanzen-Interaktionen	3
2.	Redoxregulation durch Disulfide	6
3.	Peroxiredoxine	8
4.	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	11
5.	Ziel der Arbeit	16
C.	Material und Methoden	17
I.	Material	17
1.	Bakterienstämme	17
2.	Pflanzenmaterial	18
3.	Plasmide und Vektoren	18
4.	Primer	20
5.	Chemikalien und Kits	21
6.	Enzyme und Enzymreaktionspuffer	22
7.	Nährmedien	23
8.	Zusätze zu den Nährmedien	25
9.	Puffer und Lösungen	25
9.1	Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung und –Reinigung.....	25
9.2	Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese.....	27
9.3	Puffer und Lösungen für DNA-DNA-Hybridisierungen.....	27
9.4	Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	28
9.5	Puffer und Lösungen für die isoelektrische Fokussierung.....	29
9.6	Lösungen für Coomassie-Färbung von SDS-Acrylamid-Gelen.....	29
9.7	Lösungen für Silberfärbung von SDS-Acrylamidgelen.....	30
9.8	Lösungen zur Resuspendierung/Lagerung von Bakterien.....	30
9.9	Lösungen zur Proteinisolierung und –reinigung.....	30
9.10	Puffer und Lösungen für den Western-Blot.....	31
9.11	Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie.....	31

10. Geräte.....	32
11. Computer Software.....	32
II. Methoden.....	33
1. Kultivierung und Konservierung von Bakterien.....	33
1.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	33
1.2 Kultivierung von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	33
1.3 Konservierung von Bakterienkulturen (Glyzerinkultur).....	33
2. DNA-Isolierung.....	33
2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	33
2.1.1 HB-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	33
2.1.2 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> durch alkalische Lyse.....	34
2.1.3 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit.....	34
2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit.....	35
2.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	36
2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	37
3. Reinigung und Konzentrierung von DNA.....	38
3.1 Alkoholfällung.....	38
3.2 Phenolextraktion.....	38
3.3 CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation.....	38
3.4 Sephadex-Behandlung.....	39
3.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	39
4. Techniken zur Charakterisierung von DNA-Molekülen.....	40
4.1 Eckhardt-Lyse von <i>Escherichia coli</i>	40
4.2 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	40
4.3 Agarosegelelektrophorese.....	41
4.4 Bestimmung des Molekulargewichtes von DNA.....	42
5. Klonierung von DNA-Fragmenten.....	42
5.1 5'-Dephospholierung mit alkalischer Phosphatase.....	42
5.2 Auffüllung überstehender 3'-Enden durch Klenow-Polymerase.....	43
5.3 Verdau überstehender 3'-Enden durch Nuclease S1.....	43
5.4 DNA-Fragment-Isolierung aus dem Agarosegel mittels QIAquick Gel Extraction Kit.....	43

5.5	Ligation von DNA-Fragmenten.....	44
6.	DNA-Transfer.....	44
6.1	Transformation von <i>E. coli</i>	44
6.1.1	Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl ₂ -Methode.....	44
6.1.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	45
6.2	Elektroporation von <i>E. coli</i>	45
6.2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	45
6.2.2	Elektroporation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	46
6.3	Elektroporation von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	46
6.3.1	Herstellung kompetenter <i>Cmm</i> -Zellen.....	46
6.3.2	Elektroporation kompetenter <i>Cmm</i> -Zellen.....	47
7.	DNA-DNA-Hybridisierung.....	48
7.1	Herstellung Digoxygenin-11-dUTP-markierter DNA-Sonden durch Random Priming (DIG DNA Labeling Kit).....	48
7.2	Überprüfung der Markierungsreaktion (Dot-Blot).....	48
7.3.1	DNA-Transfer durch Vakuumblotting.....	49
7.3.2	DNA-Transfer durch Kapillarblot.....	49
7.4	Prähybridisierung und Hybridisierung.....	50
7.5	Immunologischer Nachweis.....	50
8.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	51
8.1	PCR mit DNA als Template.....	51
8.2	PCR mit ganzen Zellen als Template.....	52
8.3	PCR zur Synthese von DNA-Abschnitten für die ortsspezifische Mutagenese (gene splicing by overlapped extension/gene SOEing)....	52
9.	Protein-Methoden.....	54
9.1	Überexpression von Proteinen in <i>E. coli</i>	54
9.2	Anzucht und Induktion.....	54
9.3	Kompartimenttest.....	54
9.4	Zellaufschluss mit der French Pressure Cell Press und Aufrei- nigung mittels Ni ²⁺ -Affinitätschromatografie (Protino® Ni1000 prepacked column kit).....	55
9.5	Proteinbestimmung mit BCA-Protein-Assay Reagent (Pierce).....	56
10.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	56
10.1	Proteinfärbung nach Coomassie.....	57

10.2	Silberfärbung von Proteingelen.....	57
10.3	Konservierung von Proteingelen.....	58
10.4	Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen.....	58
11.	Western-Blot.....	59
11.1	Elektroblot.....	59
11.2	Visualisierung der Proteinbanden auf der Nitrocellulose-Membran...59	
11.3	Western-Blot-Analyse.....	59
12.	2D-Gelelektrophorese.....	60
12.1	Isoelektrische Fokussierung (pH 3,5-10) und SDS-PAGE.....	60
13.	Präparation von Linolsäurehydroperoxid.....	61
14.	Wachstumsanalysen bei Hydroperoxid-Exposition.....	62
14.1	Agardiffusionstest mit <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	62
14.2	Wachstumsanalyse von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> bei Hydroperoxid-Exposition.....	62
15.	Messung der Peroxidaseaktivität.....	62
16.	Methoden zur Analyse der Pathogenität von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>.....	64
16.1	Petiolusinfektion.....	64
16.2	Wurzelinfektion.....	64
16.3	Welkeindex und Welkeverlauf.....	65
16.4	Größenbestimmung der Pflanzen.....	65
16.5	Gewichtsbestimmung der Pflanzen.....	65
16.5.1	Frischgewichtsbestimmung.....	65
16.5.2	Trockengewichtsbestimmung.....	65
16.6	Kolonisationstest.....	66
16.6.1	Reisolierung von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> aus Pflanzenhomogenat.....	66
16.6.2	Reisolierung von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> aus Xylemsaft.....	66
16.7	Hypersensitive Reaktion (HR) auf <i>Mirabilis jalapa</i>	67

D.	Ergebnisse.....	68
1.	„Bacterioferritin comigratory protein“.....	68
1.1	Konstruktion des Mutageneseplasmides pJE951.....	69
1.2	Inaktivierung des <i>bcp</i> -Gens durch Insertionsmutagenese.....	71
1.3	Nachweis der Pathogenitätsfaktoren <i>celA</i> und <i>pat-1</i>	74
2.	Physiologische Untersuchung der <i>bcp</i>-Mutante.....	75
2.1	Wachstumsverlauf der <i>bcp</i> -Mutante in Flüssigmedium.....	76
2.2	Wachstumsverlauf in Flüssigmedium mit Hydroperoxidzusatz.....	76
2.3	Agardiffusionstest mit verschiedenen Hydroperoxiden.....	78
3.	Phänotypische Analyse der <i>bcp</i>-Mutante im Pflanzentest.....	79
3.1	Analyse der <i>bcp</i> -Mutante auf Auslösung von Krankheitssymptomen bei der Wirtspflanze <i>Solanum lycopersicum</i>	79
3.2.	Analyse der mit pDM:: <i>bcp</i> -Konstrukt komplementierten <i>bcp</i> -Mutante im Pflanzentest mit <i>Solanum lycopersicum</i>	82
3.3	Konstruktion des Komplementationsplasmides pHN:: <i>bcp</i> , Ortsspezifischen Mutagenese von <i>bcp</i> und Überprüfung der Komplementation im Pflanzentest.....	85
3.4	Kolonisation von <i>Solanum lycopersicum</i> durch <i>Cmm</i>	89
3.5	Hypersensitive Reaktion bei der Nicht-Wirtspflanze <i>Mirabilis jalapa</i>	90
4.	Überexpression und biochemische Charakterisierung von Bcp....	91
4.1	Überexpression von Bcp in <i>E. coli</i>	91
4.2	Analyse des überexprimierten Bcp im SDS-Polyacrylamidgel.....	94
4.3	2D-SDS-PAGE.....	96
4.4	Bestimmung der Peroxidaseaktivität von Bcp.....	97
4.4.1	Peroxidaseaktivität von Bcp gegenüber H ₂ O ₂	97
4.4.2	Peroxidaseaktivität von Bcp gegenüber Cumenehydroperoxid.....	101
4.4.3	Peroxidaseaktivität von Bcp gegenüber t-Butylhydroperoxid.....	102
4.4.4	Peroxidaseaktivität von Bcp gegenüber Linolsäurehydroperoxid.....	103
5.	AhpE von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>....	103
5.1	Überexpression von AhpE in <i>E.coli</i>	105
5.2	Bestimmung der Peroxidaseaktivität von AhpE.....	107
6.	Vergleich der Peroxidaseaktivitäten von Bcp und AhpE.....	109

E.	Diskussion.....	111
1.	Charakterisierung der <i>bcp</i>-Mutante	111
1.1	Charakterisierung der <i>bcp</i> -Mutante <i>in vivo</i>	111
1.2	Charakterisierung der <i>bcp</i> -Mutante <i>in planta</i>	113
1.3	Charakterisierung des „Bacterioferritin comigratory proteins“ <i>in vitro</i>	118
2.	Charakterisierung des Peroxiredoxins AhpE <i>in vitro</i>.....	124
3.	Bakterielle Enzyme der ROS-Entgiftung.....	126
4.	Schlussbetrachtung.....	129
F.	Literatur.....	131
G.	Anhang.....	143
1.	Abkürzungen.....	143
2.	Proteinalignments.....	146
2.1	Bcp.....	146
2.2	AhpE.....	149
2.3	AhpE und Bcp.....	150
3.	Plasmidkarten.....	151

A. Zusammenfassung

Der Gram-positive phytopathogene Bakterienstamm *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) besiedelt das Xylem seiner Wirtspflanze *Solanum lycopersicum* (Tomate) und führt zur unifazialen Fiederblattwelke, zu Sprossläsionen und letztlich zum Absterben der Pflanzen. Für die Krankheitsauslösung direkt verantwortlich sind die plasmidkodierte Pathogenitätsfaktoren Pat-1, lokalisiert auf pCM2 (72 kb), und CelA, lokalisiert auf pCM1 (27,2 kb). Da ein plasmidfreier Stamm (Curingderivat CMM100) als Endophyt im Xylem der Tomate persistieren kann und keine Krankheit auslöst, sind Gene, die die Kolonisation der Tomate ermöglichen, chromosomal kodiert. In einem vorangegangenen Shotgun-Sequenzierungsprojekt wurde das für „Bacterioferritin comigratory protein“ (*Bcp*) kodierende Gen *bcp* identifiziert. *Bcp* gehört zur Familie der Alkylhydroperoxid-Reduktase C/Thiol-spezifische antioxidative Proteine (*AhpC/TSA*), auch Peroxiredoxine (*Prx*) genannt. *AhpC/TSA*-Proteine besitzen Peroxidaseaktivität für H_2O_2 und organische Hydroperoxide. Diese reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) werden in kompatiblen und inkompatiblen Bakterien-Pflanzen-Interaktionen im Verlauf des „oxidative burst“, einer Antwort auf den Pathogenbefall von Pflanzen, freigesetzt.

In dieser Arbeit wurde mittels Insertionsmutagenese eine *bcp*-Mutante von *Cmm* hergestellt. Die *bcp*-Mutante zeigte in Flüssigkultur und auf der Agarplatte kein verändertes Wachstum. Im Pflanzentest mit der Tomate führt die *bcp*-Mutante wie der Kontrollstamm CMM101 zu Welkesymptomen. Zusätzlich ist ein Effekt der *bcp*-Mutante auf das Pflanzenwachstum zu beobachten. Die mit der *bcp*-Mutante infizierten Tomatenpflanzen sind kleiner, als die mit dem Kontrollstamm infizierten Pflanzen. Die Komplementation der Mutante mit dem intakten *bcp*-Gen stellte im Pflanzentest den Phänotyp des Kontrollstammes CMM101 wieder her. In der Hypersensitiven Reaktion (HR) mit der Nichtwirtspflanze *Mirabilis jalapa* konnten keine Unterschiede zwischen der *bcp*-Mutante und den Kontrollstämmen festgestellt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde heterolog überexprimiertes, gereinigtes *Bcp*-Protein hinsichtlich seiner Konformation in reduzierter und nicht-reduzierter Form analysiert. *Bcp* besitzt N-terminal zwei konservierte reaktive Cysteine. Die durch ortsspezifische Mutagenese und Überexpression erhaltenen *Bcp*-Varianten C49S und C54S, sowie das ebenfalls gereinigte *Bcp*-Homolog *AhpE* wurden gleichermaßen bezüglich ihrer Konformation untersucht. *Bcp* wurde als atypisches 2-Cys

Prx bestätigt, AhpE gehört vermutlich zur Klasse der typischen 2-Cys Prx. Die Überprüfung der Peroxidase-Aktivität mittels FOX-Test zeigte für Bcp eine Thioredoxin- und DTT-unabhängige Aktivität für H₂O₂, hingegen eine Thioredoxin-abhängige Aktivität für Cumenehydroperoxid. t-Butylhydroperoxid und Linolsäurehydroperoxid werden durch Bcp nicht zu den entsprechenden Alkoholen umgesetzt. Cystein₄₉ konnte als primär reaktives Cystein identifiziert werden. Für AhpE wurden Thioredoxin-abhängige Peroxidase-Aktivitäten mit Präferenz für Cumenehydroperoxid vor H₂O₂ und mit etwa gleicher Aktivität Linolsäurehydroperoxid und t-Butylhydroperoxid bestimmt. Die Peroxidase-Aktivitäten von Bcp und AhpE sind damit redundant in *Cmm* vorhanden.

Die Ergebnisse der Pflanzentests sowie die Daten für die Peroxidaseaktivität deuten auf eine Beteiligung von Bcp im Frühstadium der Kolonisation der Wirtspflanze hin.

B. Einleitung

1. Bakterien-Pflanzen-Interaktionen

Bakterien-Pflanzen-Interaktionen können aufgrund ihrer Effekte auf die Pflanze als pathogen, saprophytisch oder symbiontisch unterteilt werden. Der bakterielle Angriff erfolgt dabei auf Blätter, Stamm oder Wurzel. Die Erkennung kann durch physikalische Interaktionen (Adhäsine, Fimbrien, Flagellen, Typ III- und Typ IV-Sekretionssysteme) oder durch kleine mikrobielle bzw. der pflanzlichen Zellwand entstammende Signalmoleküle (Elicitoren) veranlasst sein (Lugtenberg *et al.* 2002; Wojtaszek 1997). Bei Kontakt von Phytopathogenen und Pflanzen kommt es zu Abwehrmechanismen, die durch eine Kombination von konstitutiven und induzierbaren Antworten charakterisiert sind. Konstitutive Antworten sind durch generelle Barrieren (z. B. Verstärkung der Zellwand durch Kutin oder Lignin) oder vorher vorhandene biochemische Abwehr (antimikrobielle Enzyme) gekennzeichnet. Induzierbare Antworten können lokal begrenzt oder systemisch sein. Letztere sind komplexe Vorgänge, die die Erkennung des Pathogens durch die Wirtspflanze, Signaltransduktion und die Expression verschiedener Gene erfordern (Montesinos *et al.* 2002). Die systemische Abwehr setzt als Antwort auf Chemikalien, Mikroorganismen, Insekten, mechanische Beschädigung oder Stress ein Signal frei, das als Botenstoff in der Pflanze fungiert. Dieser Messenger kann Salicylsäure, Jasmonsäure, Stickoxid oder Ethylen sein (Baker *et al.* 1997). Der Messenger interagiert mit spezifischen Sensorproteinen, die die Transkription von „pathogenesis-related“ (PR) Genen als Antwort auf das Pathogen aktiviert. Zu den PR-Genprodukten gehören Enzyme wie z. B. Peroxidasen, Lipoxygenasen, Superoxiddismutase und Phenylalaninammoniumlyase (PAL), die in den pflanzlichen Sekundärmetabolismus und speziell in die Synthese phenolischer Komponenten involviert sind, oder es sind Phytoalexine, Glucanasen und Chitinasen mit antimikrobieller Aktivität (Montesinos *et al.* 2002).

Treffen Phytopathogen und Pflanze aufeinander, werden durch Oberflächen-Signalmoleküle Reaktionen ausgelöst, die bei virulentem Pathogen und Wirtspflanze zur kompatiblen Reaktion, d. h. zur Krankheitsausbildung, führen. Kennzeichnend für die inkompatible Reaktion zwischen Pathogen und resistentem Nichtwirt ist die Hypersensitive Reaktion (HR), die in einer schnellen lokalen Abwehrreaktion den programmierten Zelltod im Bereich der Infektionsstelle und damit die weitere Ausbreitung des Pathogens in periphere Pflanzenbereiche verhindert. In der an die

abgestorbenen Pflanzenzellen angrenzenden Zone beobachtet man eine Reihe von Zellveränderungen, wie die Auflagerung von Kallose (Kauss 1987) sowie die Verstärkung der Zellwand durch Lignin (Lamb *et al.* 1989). Verantwortlich für eine Interaktion von Gram-negativen Bakterien mit der Wirtspflanze sind pathogenkodierte Avirulenzgene (*avr*-Gene) und pflanzenkodierte Resistenzgene (*R*-Gene). Nach der Gen-für-Gen-Hypothese (Flor 1956; Flor 1971) wird die inkompatible Interaktion, d. h. die Pflanzenabwehr, nur dann induziert, wenn das pflanzlich exprimierte *R*-Genprodukt das komplementäre *avr*-Genprodukt erkennt. Innerhalb weniger Stunden bis zu 2 Tagen nach Aktivierung der Abwehrantwort sind die charakteristischen Nekrosen sichtbar. Die gut untersuchten *avr/R*-Systeme und TypIII-Sekretionssysteme der Gram-negativen Bakterien konnten bislang für Gram-positive Bakterien nicht bestätigt werden.

Neben der kompatiblen Interaktion mit Krankheitsauslösung zwischen dem Gram-positiven Bakterienstamm *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) und der Tomate (*Solanum lycopersicum*) ist die inkompatible Interaktion zwischen *Cmm* und den Nichtwirtspflanzen Japanischen Wunderblume (*Mirabilis jalapa*) und Tabak (*Nicotiana tabacum*) mit Auslösung der „Hypersensitiven Reaktion“ (HR) charakteristisch für virulente *Cmm*-Stämme. Für avirulente *Cmm*-Stämme wurde gezeigt, dass sie keine Welke bei der Tomate auslösen und mit der Nicht-Wirtspflanze *Mirabilis jalapa* keine HR auslösen (Gitaitis 1990; Bempohl 1996). Als initialem kurzlebigen Abwehrmechanismus im Rahmen der HR kommt dem „oxidative burst“, d. h. der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Wojtaszek 1997; Baker and Orlandi 1995; Levine *et al.* 1994; Mehdy 1994), Bedeutung zu. Analog zu den Beobachtungen bei *Cmm* wurde in frühen Versuchen mit kompatiblen und inkompatiblen Subspezies des Oomyceten *Phytophthora infestans* und Kartoffelknollengewebe festgestellt, dass nur inkompatible Subspezies während der Infektion einen „oxidative burst“ verursachen, nicht aber kompatible Subspezies (Doke 1983a, b). Dies lässt vermuten, dass es nur ohne „oxidative burst“ zu einer Krankheitsausprägung kommen kann, d. h. der „oxidative burst“ der Pflanzenzelle stellt eine Art Notfallsignal in der Expression der aktiven Abwehr in der Pflanze dar (Doke *et al.* 1997). Zu den ROS zählt man Superoxid-Radikale ($\cdot\text{O}_2^-$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyl-Radikale ($\cdot\text{OH}$), die in der Pflanze konstitutiv auf niedrigem Niveau in Chloroplasten, Mitochondrien, aber auch durch cytoplasmatische membrangebundene oder extrazelluläre Enzyme im Verlauf von Redoxreaktionen gebildet werden. Während der Hypersensitiven Reaktion werden als sehr frühe Reaktion in zwei Phasen in der ersten Stunde bzw. 2-6 h nach Infektion (Doke 1983b) große Mengen teilweise langlebiger ROS als Antwort auf

externe Stimuli freigesetzt (Doke and Ohashi 1988; Mehdy 1994; Levine *et al.* 1994). In lebenden Zellen kommt das schwach diffusible Superoxid-Radikal im Gleichgewicht mit seiner protonierten Form, dem Hydroperoxid-Radikal ($\cdot\text{OOH}$) vor. Dieses kann durch seine hydrophobere Natur leicht Membranen durchdringen und diese durch Bildung von Lipidhydroperoxiden schädigen (Wojtaszek 1997). Das Superoxid-Anion wird gewöhnlich rasch entweder nichtenzymatisch oder enzymatisch durch die Superoxiddismutase (SOD) zu H_2O_2 umgewandelt.

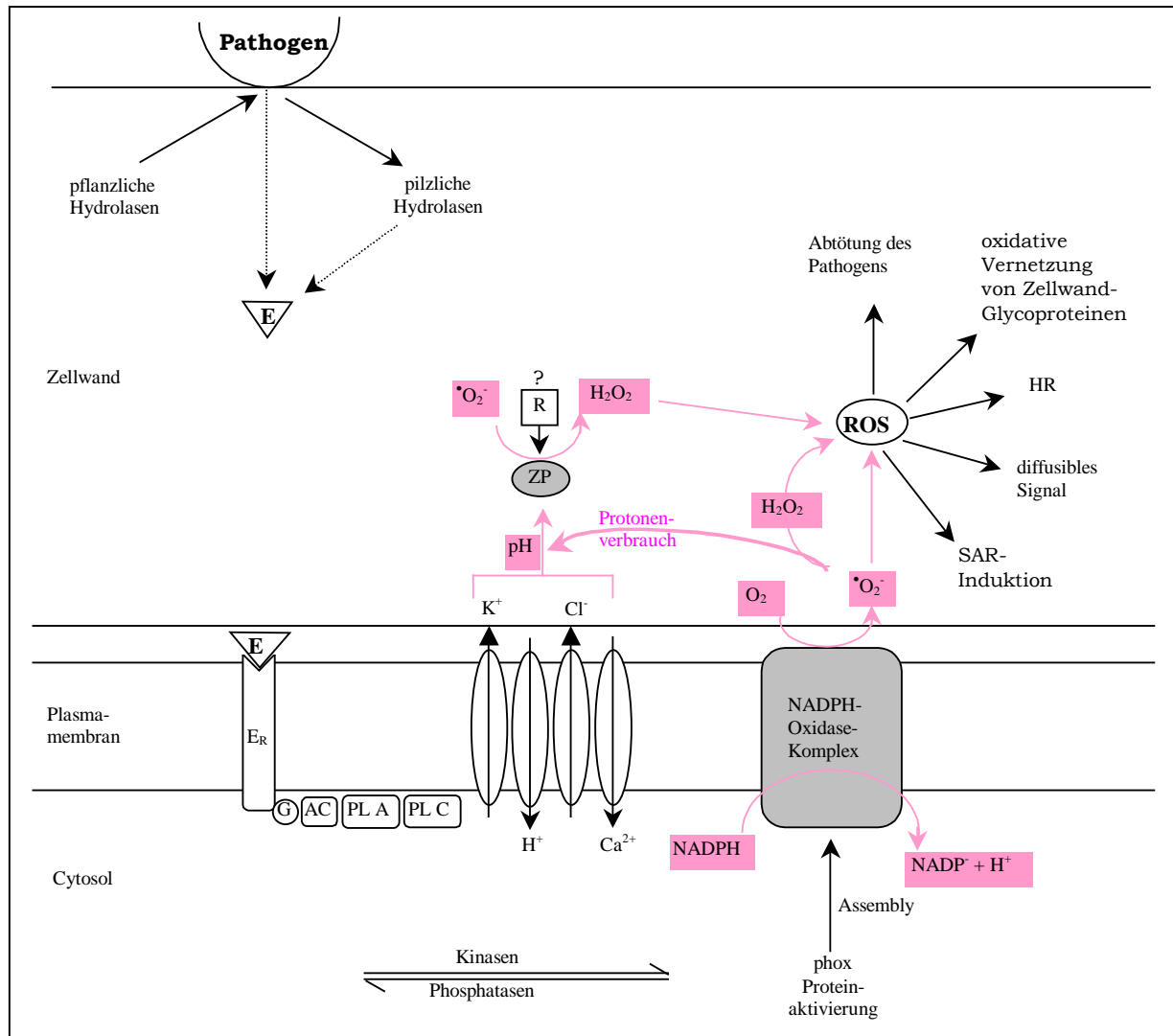


Abb. 1 Schematische Modelldarstellung der Hauptquellen der ROS-Produktion während des bei Pathogenangriff durch Pilz- und Pflanzenhydrolasen freigesetzten Zellwandfragmente (Elicitoren) ausgelösten „oxidative burst“. Bei Erkennung der Elicitoren durch plasmamembran-lokalisierte Rezeptoren (E_R) wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die zur Aktivierung der NADPH-Oxidase und/oder Zellwand-gebundener Peroxidasen (ZP) führt und in der Bildung der ROS sowie weiterer Pflanzenabwehrantworten resultiert. (AC Adenylatzyklase; G GTP-Bindeprotein; PL A und PL C Phospholipase A und C; R Reduktionsmittel) (Quelle: Wojtaszek 1997)

Zelluläre Schäden durch ROS treten erst nach Konversion des H_2O_2 zum Hydroperoxid-Radikal ($\cdot\text{OOH}$) auf, das ungesättigte Fettsäuren direkt angreift und

zu den entsprechenden Lipidperoxiden umsetzen kann (Halliwell and Gutteridge 1990), bzw. durch die Fenton-Reaktion in Gegenwart von Fe^{2+} zum extrem reaktiven freien Hydroxyl-Radikal ($\cdot\text{OH}$) umgewandelt wird, das Lipidperoxidation und DNA-Schädigungen auslösen kann. Haupteffekt der Lipidperoxidation ist die Abnahme der Membranfluidität, wodurch Membraneigenschaften verändert werden und membrangebundene Proteine in ihrer Funktion beeinträchtigt werden können (Cabiscol *et al.* 2000).

Der „oxidative burst“ in Pflanzen und die hiermit verbundene Bildung von H_2O_2 (siehe Abb. 1) wird der Aktivierung eines membrangebundenen NADPH-Oxidase-Komplexes zugeschrieben (Doke *et al.* 1996; Lamb and Dixon 1997; Orozco-Cárdenas *et al.* 2001; Nishiyama *et al.* 2001; Foreman *et al.* 2003) und ähnelt der in der tierischen Zelle während der Phagozytose induzierten Immunantwort (Morel *et al.* 1991). Als weitere mögliche Quelle der ROS-Produktion wird die pH-abhängige Aktivität einer Zellwand-Peroxidase angesehen.

Zusammen mit dem Erscheinen der HR wird in den weiter entfernten, nicht-infizierten Geweben eine zweite Resistenzantwort induziert („systemic acquired resistance“ (SAR)), die der Pflanze eine dauerhafte Immunität gegen eine große Bandbreite von Pathogenen vermittelt (Alvarez *et al.* 1998; Dangl and Jones 2001; Apel and Hirt 2004; Fobert and Després 2005). Erhöhte Salicylsäure-Konzentrationen, die an der Infektionsstelle, als auch in weiter entfernten systemischen Geweben auftreten, werden als ursächlich für die Expression von PR-Genen (pathogenesis related genes) und damit der Aktivierung der SAR angesehen.

2. Redoxregulation durch Disulfide

Disulfidbrücken bei Proteinen sind abhängig von der Lokalisation der beteiligten Cystein-Reste intermolekular, intramolekular oder als Mischung von beiden Typen möglich. Bei der intramolekularen Disulfidbrücke unterscheidet man weiterhin Bindungen innerhalb einer Sequenznachbarschaft bzw. weiter entfernten Positionen, welche die Tertiärstruktur des Proteins und damit seine Eigenschaften maßgeblich beeinflussen. Intermolekulare Disulfidbrücken findet man zwischen Thiolen verschiedener Peptide, oft kommt es hierbei durch Brückenbildung zwischen identischen Untereinheiten zur kovalenten Dimer-Bildung. Die gemischte Form findet man z. B., wenn ein Cystein mit einem oxidierten Glutathion-Molekül eine Disulfidbrücke bildet (Glutathionylierung).

Hauptaufgabe der Disulfidbrücken ist die Aufrechterhaltung der Tertiärstruktur von Proteinen. Diesen stabilisierenden Typ der kovalenten Modifikation findet man

in Pflanzen vor allem in sekretorischen und Speicherproteinen, die so vor Denaturierung geschützt werden.

Disulfidbrücken können reversibel oxidiert (S-S) oder reduziert (-SH HS-) sein. Der Wechsel zwischen beiden Redoxzuständen kann katalytische oder regulatorische Änderungen bewirken (Hogg 2003). Katalytische Disulfidbrücken werden oft zwischen zwei Cysteinen gebildet, die ein oder zwei Aminosäuren voneinander entfernt liegen und dabei als Elektronen-(Hydrogen-) Donor oder Akzeptor fungieren.

Die Glutathionylierung bewirkt den Schutz von SH-Gruppen. Beim oxidativen Stress können Thiole irreversibel zu Sulfin säuren (SO₂H) und Cysteinsäuren (SO₃H) oxidiert werden, welches im Allgemeinen zur Proteolyse des betroffenen Proteins führt. Die Bildung eines gemischten Disulfides mit Glutathion bewirkt hierbei den Schutz des Proteines.

Cystein-haltige Proteine mit Redoxfunktionen sind z. B. Thioredoxine, Glutaredoxine und Protein-Disulfidisomerasen. Thioredoxine sind ubiquitär vorkommende, kleine Proteine mit charakteristischem Strukturmotiv: 4 α -Helices umgeben ein β -Faltblatt aus 5 Ketten. Der Vergleich der Aminosäure-Sequenz von Thioredoxinen aus Prokaryonten und Eukaryonten zeigte eine enge Verwandtschaft dieser Moleküle. Pflanzen besitzen eine Vielzahl von Thioredoxinen, die im Chloroplast (bei *A. thaliana*: Trx *f*, *-m*, *-x* und *-y*) und Mitochondrien (Trx *o*) vorkommen, Trx *h* findet man in Cytosol, Nucleus, endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien. Thioredoxine enthalten eine konservierte redoxaktive Sequenz WC[G/P]PC in der Peripherie des Proteines. In Pflanzen wird eine zwischen zwei Cysteinen gebildete Disulfidbrücke im Chloroplasten durch Ferredoxin und Ferredoxin-Thioredoxinreduktase, in anderen Zellkompartimenten durch NADPH und NADPH-Thioredoxinreduktase reduziert. Thioredoxine fungieren ihrerseits hierbei als Elektronen-(Hydrogen)-Donor für die Regulation der Enzyme. Glutaredoxine sind den Thioredoxinen nahe verwandte, kleine Proteine mit ähnlicher Struktur (Höög *et al.* 1983; Eklund *et al.* 1984), aber positiverem Redoxpotential, die durch Glutathion reduziert werden (Rouhier *et al.* 2004). Glutaredoxine sind eine heterogene Gruppe. Die zuerst beschriebenen pflanzlichen Glutaredoxine („klassische Glutaredoxine“) besitzen das redoxaktive Disulfid innerhalb einer konservierten Sequenz CPYC (im Genom von *A. thaliana* teilweise mit Austausch des 2. Cysteins gegen ein Serin). Neben dem klassischen Typ gibt es einen CC-Typ mit dem Motiv CCxC/S/G und einen C-Typ mit einem einzigen Cystein in der konservierten Sequenz CGFS. Untersuchungen ergaben, dass nur das erste Cystein der beiden letzten Glutaredoxin-Typen essentiell für die

katalytische Aktivität mit Peroxiredoxin ist (Rouhier *et al.* 2002a; Rouhier *et al.* 2002b). In Pflanzen ist bislang relativ wenig von der großen Familie der Glutaredoxin Protein-Disulfid-Oxidoreduktasen bekannt. Neben der Kenntnis der Interaktionen mit Peroxiredoxinen wird eine Funktion in der Spaltung der gemischten Disulfide zwischen dem Cystein eines Proteins und einem Glutathion angenommen. Protein-Disulfidisomerasen sind Oxidoreduktasen, die typischerweise zwei, in einigen Fällen auch mehrere Thioredoxin-Domänen besitzen, die in die Bildung von Disulfidbrücken involviert sind. Protein-Disulfidisomerasen fungieren in ihrer reduzierten Form vermutlich in der Umstrukturierung inkorrekturer Disulfidbrücken, d. h. sie sind in erster Linie als Dithiol-Oxidase bei der Proteinfaltung aktiv (Frand *et al.* 2000). Man nimmt an, dass Thioredoxin und Glutaredoxin spezifische überlappende Funktionen in vielen Reduktionssystemen besitzen (Holmgren 1985). Die reduzierende Aktivität von Thioredoxin ist mehr als 1000fach höher als die von Glutathion (Nakamura 2004).

Man geht davon aus, dass die Aktivität jedes Enzyms, das durch Thiol-Disulfid-Wechsel reguliert ist, durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beeinflusst wird. Dies geschieht entweder direkt oder durch Wechsel des Verhältnisses an reduziertem zu oxidiertem Thioredoxin (Buchanan and Balmer 2005). Ebenso fördern oxidative Bedingungen die Glutathionylierung (Pompella *et al.* 2003).

3. Peroxiredoxine

Peroxiredoxine (Prx) bilden die ubiquitär vorkommende Familie der AhpC/TSA Proteine (Alkylhydroperoxid-Reduktase C/Thiol-spezifische antioxidative Proteine). Die ersten identifizierten Vertreter dieser Familie waren TSA von *Saccharomyces cerevisiae* (Chae *et al.* 1994) und AhpC von *E. coli* und *Salmonella typhimurium* (Storz *et al.* 1989). Prx vermitteln in den Zellen mit ihrer Peroxidaseaktivität ($\text{ROOH} + 2e^- \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$) antioxidativen Schutz vor H_2O_2 , Peroxynitrit und einer Vielzahl organischer Hydroperoxide, indem sie diese unter Verwendung von Thiolen durch Reduktion zu den entsprechenden Alkoholen entgiften (Hofmann *et al.* 2002; Bryk *et al.* 2000). Eine besondere Eigenschaft der Peroxiredoxine ist, dass sie Peroxidasen ohne prosthetische Gruppe sind und kein Häm enthalten (Rouhier and Jacquot 2002). Prx können in zwei große Gruppen eingeteilt werden: solche, die ein einziges konserviertes Cystein besitzen und Prx mit zwei konservierten Cysteinen, die in Prokaryonten, Mammalia und Pflanzen weit verbreitet sind (Takeda *et al.* 2004). Die 2-Cys Prx werden unterteilt in die häufiger vorkommenden „typischen“

und die „atypischen“ 2-Cys Peroxiredoxine (Dietz 2003). Diese Einteilung erfolgte auf Grund der Anzahl und Position der an der Reaktion beteiligten Cysteine.

Prx findet man vorwiegend im Cytosol, aber auch in Mitochondrien, Chloroplasten und Peroxisomen, assoziiert mit dem Nucleus oder mit Membranen und in mindestens einem Fall werden sie sekretiert (Wood *et al.* 2003). In Mammalia werden sechs Isoformen von Prx exprimiert (Prx I bis VI). TSA-Proteine aus Hefe und Mensch sind auf Aminosäureebene zu 65 % identisch und besitzen keine signifikante Sequenzähnlichkeit zu irgendeiner bekannten Katalase, Superoxiddismutase oder Peroxidase.

Die zuerst in *E. coli* und *Salmonella typhimurium* identifizierte Alkylhydroperoxidreduktase AhpCF setzt sich aus dem Prx AhpC und dem Flavoprotein AhpF zusammen. AhpF konnte auf Grund seiner Aminosäuresequenz klar als Mitglied des Thioredoxinreduktase-Zweiges der Flavoprotein-Pyridinnucleotid-Disulfid-Oxidoreduktase-Familie identifiziert werden (Storz *et al.* 1989). In diesem System katalysiert die NADH-Peroxiredoxin-Oxidoreduktase AhpF die Pyridinnucleotid-abhängige Reduktion des Peroxiredoxins AhpC, welches daraufhin H₂O₂ oder organische Hydroperoxide reduzieren kann. In *Enterobacteriaceae* und *Mycobacterium* subsp. wird *ahpC* durch das Gen *oxyR* reguliert (Dempfle, B. 1991; Deretic *et al.* 1996), welches einen globalen Regulator des Peroxidstress-Regulons kodiert. OxyR fungiert sowohl als Peroxidsensor, als auch als Transkriptionsregulator für Gene, die in den Peroxidstress-Schutz involviert sind (Storz *et al.* 1990). Homologe von *ahpC*, *ahpF* und *oxyR* wurden in verschiedenen Bakterien identifiziert, in den meisten Fällen liegen die Gene von *ahpC* und *ahpF* benachbart auf der DNA, in einigen Fällen werden sie co-reguliert (Antelmann *et al.* 1996; Poole 1996; Storz *et al.* 1989). Das Gen *oxyR* ist meist nicht in der Nähe lokalisiert (Loprasert *et al.* 1997).

Als weiteres Prx wurde „Bacterioferritin comigratory protein“ (Bcp) zuerst in *Escherichia coli* identifiziert (Andrews *et al.* 1991; Jeong *et al.* 2000). Das pflanzliche Homolog von Bcp ist PrxQ (Kong *et al.* 2000; Rouhier *et al.* 2004b).

Prx aller Typen katalysieren die Reduktion von Hydroperoxiden unter Bildung einer Sulfensäure am katalytisch aktiven Cystein („peroxidative cysteine“ S_p). Der Mechanismus, wie die Sulfensäure unter Bildung des aktivierten Thiolats rezykliert wird, variiert zwischen den einzelnen Typen (Abb. 2). Bei 1-Cys Prx reagiert die Sulfensäure vermutlich mit einem Thiol, gefolgt von der Reduktion mit einem zweiten Molekül des Reduktanten. Bei 2-Cys Prx reagiert ein Thiol eines anderen Cysteins („resolving cysteine“ S_R) im Molekül mit der Sulfensäure. Dieses

Cystein entstammt entweder derselben Untereinheit wie S_p (atypische 2-Cys Prx) oder von der Untereinheit eines anderen Homodimers (typische 2-Cys Prx).

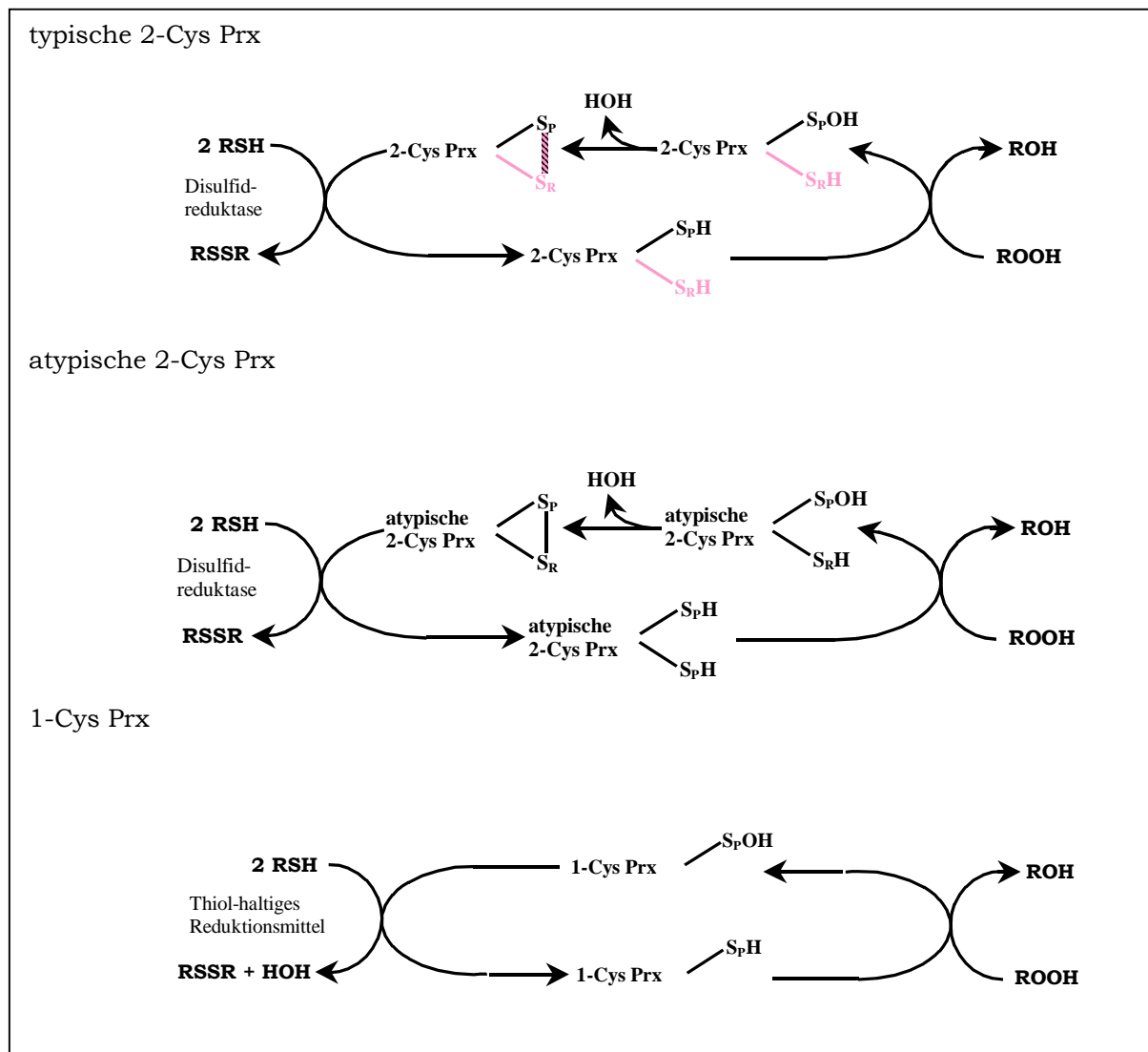


Abb. 2 Die unterschiedlichen Peroxiredoxin-Mechanismen der drei Prx-Typen.

($S_p\text{H}$ reduziertes peroxidatives Cystein; $S_R\text{H}$ reduziertes auflösendes Cystein; $S_p\text{OH}$ Sulfensäure; S_p-S_R Disulfid; im Falle eines typischen 2-Cys Prx-Dimers stammen S_p und S_R von verschiedenen Untereinheiten und bilden eine intermolekulare Disulfidbrücke; im Falle des atypischen 2-Cys Prx bilden S_p und S_R eines Monomers eine intramolekulare Disulfidbrücke; die Reduktion der 2-Cys Prx erfordert eine Flavoprotein-Disulfidreduktase und ein zusätzliches Protein oder eine Domäne mit CXXC-Motiv, das durch ein Dithiol (2 RSH) zu einem Disulfid (RSSR) oxidiert wird. Reduktionsmittel der 1-Cys Prx sind Thiole mit niedrigem Molekulargewicht, die physiologischen Partner sind bislang nicht identifiziert.)

(Quelle: Wood *et al.* 2003)

Für das Recycling der 2-Cys Prx wird generell reduziertes NADH oder NADPH als Elektronendonator, sowie eine Flavoprotein-Disulfidreduktase (z. B. Thioredoxinreduktase, AhpF) und ein zusätzliches Protein oder Molekül mit CXXC-Motiv (z. B. Trx, N-terminale Domäne von AhpF) benötigt (Poole *et al.* 2004; Wood *et al.* 2003).

Obwohl Bcp über 2 benachbarte, nur durch 4 Aminosäuren getrennte, Cysteine verfügt (Cys₄₉ und Cys₅₄), wurde es zunächst zur Klasse der 1-Cys Prx gerechnet (Jeong *et al.* 2000; Hofmann *et al.* 2002), da anhand von Untersuchungen mit *bcp*-Mutanten von *E. coli* dem ersten Cystein (Cys₄₅ in *E. coli*) die alleinige katalytische Wirkung zugeschrieben wurde. Im Gegensatz hierzu zählt eine andere Veröffentlichung (Rouhier and Jacquot 2002) sowohl Bcp als auch PrxQ zur Subklasse der monomeren Typ I Prx der 2-Cys-Prx. Rouhier und Jacquot (2002) unterteilen die 2-Cys Prx in die drei Klassen monomere und dimerer Typ I Prx und monomere Typ II Prx. Zu der letztgenannten Gruppe gehört Prx aus der Siebröhre der Pappel (*Populus trichocarpa*) (Rouhier *et al.* 2001), welches nur eines der beiden konservierten Cysteine für die Reaktion benötigt. Das Prx aus der Pappel kann neben Thioredoxin auch Glutaredoxin als Elektronendonator nutzen.

4. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Der 1910 erstmals von Smith beschriebene, die bakterielle Welke der Kulturtomate (*Solanum lycopersicum*) auslösende Stamm *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) gehört zur Gruppe der Actinomyceten. (Davies *et al.* 1984). Dieses Gram-positive, aerobe, asporogene, coryneforme (griech. κορυνη = Keule) Bodenbakterium infiziert seine Wirtspflanze über Wunden im Wurzel- oder Sprossbereich, bzw. über kontaminiertes Saatgut, und verbreitet sich in der Pflanze innerhalb weniger Tage über das Xylem und führt zu einer systemischen Tracheobakteriose. Titer von 10⁹-10¹⁰ Bakterien pro g Pflanzenfrischgewicht (Bermpohl *et al.* 1990) bzw. pro ml Xylemsaft (Meletzus *et al.* 1993; Kirchner 2003) deuten trotz der relativen Nährstoffarmut des besiedelten Raumes auf gute Wachstumsbedingungen hin, da bei Wachstumstests in Vollmedium bei 26-28 °C unter optimaler Sauerstoff- und Nährstoffversorgung ähnliche Titer erreicht werden.

Im Frühstadium der Infektion bewirkt *Cmm* ein verzögertes Wachstum der Tomatenpflanze, im weiteren Verlauf der Krankheit tritt als erstes sichtbares Symptom die unifaziale Fiederblattwelke auf (Abb. 3A). Diese ist gekennzeichnet durch das einseitige Einrollen der Fiederblätter zur Blattoberseite hin und anschließendem Verwelken, während die Fiederblätter auf der gegenüber liegenden Seite der Pflanze noch voll turgeszent sind (Strider 1969). Bei fortschreitender Erkrankung der Tomatenpflanze bilden sich im Sprossbereich helle Streifen (Abb. 3B), an denen der Spross einige Tage später aufreißt. Durch diese Sprossläsion (canker) (Abb. 3C) wird die Standfestigkeit der Pflanze zunehmend beeinträchtigt

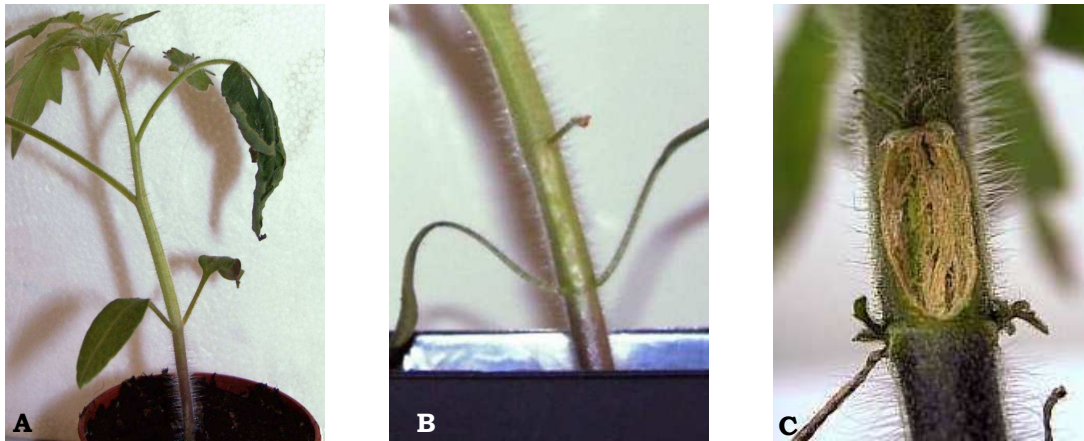


Abb. 3 Durch *Cmm* NCPPB382 verursachte Krankheitssymptome bei der Tomatenpflanze: unifaziale Fiederblattwelke (A), beginnende Sprossläsion (B), Sprossläsion im fortgeschrittenen Stadium („canker“) (C).

(Wallis 1977), sie kann an dieser Stelle abknicken und in der Folge absterben. Wie stark sich die geschilderten Krankheitssymptome ausprägen, hängt z. B. von Umweltfaktoren, Art der Infektion, sowie Pflanzenalter und –konstitution zum Infektionszeitpunkt ab (Gleason *et al.* 1993). Im späten Infektionsstadium kann sich *Cmm* in das das Xylem umgebende Gewebe ausbreiten. Kommt es bei infizierten Tomatenpflanzen zur Ausbildung und Reifung von Früchten, so werden diese ebenfalls durch *Cmm* besiedelt und es treten die charakteristischen „birds eyes“, von einem weißen Hof umgebene bräunliche Flecken, auf (Strider 1969). Als Folge ist auch das Saatgut kontaminiert. Die Früchte selbst bleiben durch die Infektion sehr klein und sind kommerziell nicht mehr nutzbar. Da bislang keinerlei Möglichkeiten existieren, den in Früchten und Samen persistierenden *Cmm* durch Desinfektionsmethoden unschädlich zu machen und auch keine resistenten Tomatenkultivare vorhanden sind, wurde *Cmm* unter die Quarantäne-Bestimmungen der EU (Europäische Union 1995) gestellt, welche die Verwendung zertifizierten Saatgutes vorschreibt. Weiterhin wurde festgestellt, dass *Cmm* je nach Standort und Klima mehrere Jahre auf Pflanzenresten überdauern kann und folglich nach einer Infektion auf Tomatenfeldern 2-3 Jahre andere Feldfrüchte angebaut werden sollten (Fatmi and Schaad 2002).

Die obligat aeroben, langsam wachsenden *Cmm*-Zellen sind mikroskopisch als unregelmäßig geformte Stäbchen von $0,45 \pm 0,15$ mal $1,1 \pm 0,3$ μm (Bryan 1930; Strider 1969) sichtbar (Abb. 4A). Sie sind unbeweglich und neigen in Lösung zum Verklumpen. Die Zellvermehrung erfolgt durch die charakteristische „snapping division“ (Abb. 4B), bei der direkt vor der Trennung der an einem Pol verbundenen Mutter- und Tochterzelle eine V-Form, gelegentlich eine Y-Form, mikroskopisch

sichtbar ist (Balows *et al.* 1992). Charakteristisch für die Koloniemorphologie von *Cmm* auf Agarplatten ist die Bildung eines kräftig gelben, glänzenden Schleimes, der auf einer starken Produktion von Exopolysacchariden (EPS) basiert (Abb. 4C).

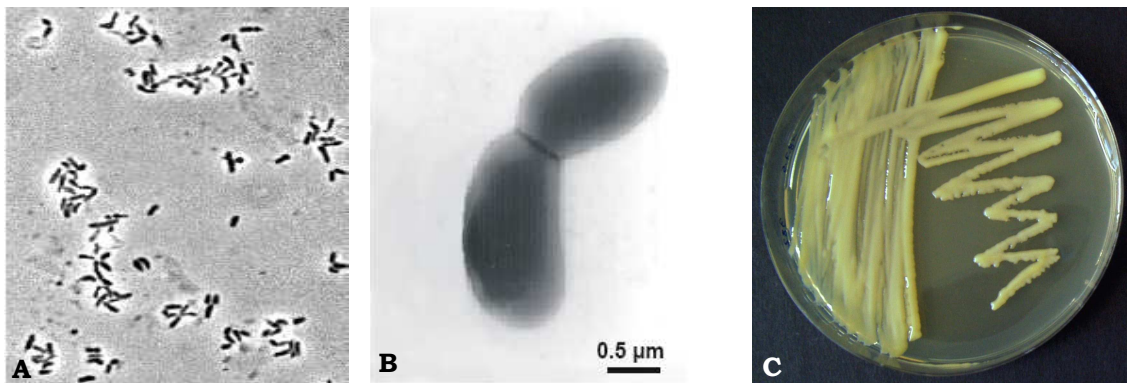


Abb. 4 Lichtmikroskopische Aufnahme von *Cmm* NCPPB382 (A), „snapping division“ (B), *Cmm* NCPPB382 auf einer Agarplatte (C). (Fotos A und B : H. Jahr)

Clavibacter michiganensis Subspezies sind Katalase-positiv, jedoch Oxidase-, Nitratreduktase-, Tyrosinase-, Urease- und Lipase-negativ (Balows *et al.* 1992). *Cmm* kann Mannitol, Melezitose, Citrat und Fumarat, jedoch nicht Ribose, Sorbitol, Inulin, Rhamnose, Acetat, Malonat, Propionat oder Formiat verwerten. *Cmm* in in der Lage, Acetoin zu bilden, sowie Stärke und Gelatine, nicht aber Casein abzubauen (Davis *et al.* 1984). Arabinose, Dextrose, Galaktose, Glucose, Glycerol, Laevulose, Maltose, Mannit, Mannose, Saccharose und Xylose können als Kohlenstoff-Quelle genutzt werden (Bryan 1930; Vidaver and Mandel 1974; Davis *et al.* 1984), die Verwertung anderer Zucker scheint Stamm- oder Subspezies-spezifisch zu sein. Für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* konnte die Produktion einer β -Xylosidase und einer α -Mannosidase (De Bruyne *et al.* 1992), sowie für *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* die Produktion einer Amylase (Metzler *et al.* 1997) gezeigt werden. *Cmm* ist auxotroph für Nicotinsäure, Thiamin und L-Methionin.

Auf Grund seiner 16S rRNA wird *Clavibacter michiganensis* der *Actinobacteriaceae*-Untergruppe *Microbacteriaceae* zugeordnet (Stackebrandt *et al.* 1997), zu der z. B. *Curtobacterium*, *Leifsonia* und *Rathayibacter* gehören. Viele Stämme dieser Gruppe besitzen phytopathogene Eigenschaften. Innerhalb der monophyletischen Gruppe *Clavibacter* mit der einzigen zugehörigen Art *Clavibacter michiganensis* (*Cm*) sind je nach Wirtspflanze 5 Subspezies zu unterscheiden:

Pathogen	Wirtspflanze	Krankheit
<i>Cm</i> subsp. <i>insidiosus</i>	<i>Medicago sativa</i> (Luzerne)	bakterielle Welke
<i>Cm</i> subsp. <i>michiganensis</i>	<i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate)	Welke, Sproßläsion
<i>Cm</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	<i>Zea mays</i> (Mais)	Blattflecken, Fäule
<i>Cm</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	<i>Solanum tuberosum</i> (Kartoffel)	Ringfäule
<i>Cm</i> subsp. <i>tesselarius</i>	<i>Triticum aestivum</i> (Weizen)	Blattflecken

Charakteristisch für *Clavibacter* ist seine Zellwand mit dem selten vorkommenden Peptidoglycantyp B2 γ (Davis *et al.* 1984; Davis 1986), durchsetzt von Teichonsäuren. Sie enthält Diaminobuttersäure anstelle der in coryneformen Bakterien verbreiteten m-Diaminopimellinsäure. Die Zellmembran von *Clavibacter* enthält keine Mycolsäuren.

Als eine mögliche Ursache für die Pathogenität von *Cmm* wurde unter anderem die Verstopfung der Xylemgefäße durch die massive Besiedelung und starke EPS-Produktion und dem daraus resultierenden Wasserstress angenommen (Van Alfen *et al.* 1987; BERPPOHL, 1993). Da aber auch das nicht-welkeauslösende plasmidfreie Curingderivat CMM100 ebenso stark schleimbildend wie der Wildtyp *Cmm* NCPPB382 ist, aber keine Welke auslöst, musste diese Hypothese verworfen werden (BERPPOHL 1996; Gartemann *et al.* 2003). Die Behinderung eines effektiven Wassertransports in den Xylemgefäßen durch das EPS verursacht lediglich eine verringerte Biomasse der infizierten Tomatenpflanze, erzeugt aber nicht die typischen Welkesymptome (BERPPOHL 1996). Als direkt den Xylemwandungen anhaftendem Biofilm bietet die EPS-Schicht der Bakterienpopulation möglicherweise Schutz vor pflanzlichen Abwehrreaktionen, z. B. durch Maskierung der Erkennung (Denny 1995), Blockierung von Agglutininen und Lectinen, sowie Detoxifikation von Phytoalexinen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Bradshaw-Rouse *et al.* 1981; Kiraly *et al.* 1997). Die EPS-Schicht erleichtert den Bakterien die Anheftung an biologische Oberflächen wie Bodenpartikel oder Pflanzenzellwände (Leigh and Coplin 1992). Sie dient als physikalische Barriere gegen Austrocknung, Detergentien und hydrophobe Substanzen sowie der Konzentration von Salzen, Nährstoffen und Enzymen.

Der GC-Gehalt der chromosomalen DNA von *Cmm* liegt bei annähernd 73 % (Sasaki *et al.* 1998; Vidaver and Mandel 1974; Engemann 2001). *Cmm* NCPPB382 besitzt zwei endogene zirkuläre Plasmide, pCM1 (27,2 kb) und pCM2 (ca. 72 kb), auf denen die Pathogenitätsfaktoren *celA* und *pat-1* lokalisiert sind. Der Nachweis für die Existenz jeweils mindestens eines Pathogenitätsfaktors auf den beiden Plasmiden

wurde durch Curing der Plasmide erbracht. Das *Cmm*-Curing-Derivat CMM101 ist nur noch im Besitz von pCM1 (Meletzus and Eichenlaub 1991), das Derivat CMM102 beherbergt lediglich pCM2. Daneben existiert das plasmidfreie Derivat CMM100. Im Pflanzentest mit *Solanum lycopersicum* (Tomate) konnte gezeigt werden, dass der Besitz nur noch eines der beiden endogenen Plasmide zu einer Abschwächung der Welkesymptome führt, während der Wildtyp mit beiden Plasmiden eine entsprechend starke Welke auslöst. Der plasmidfreie Stamm CMM100 kann die Wirtspflanze zwar effektiv kolonisieren, ist allerdings nicht in der Lage, die bakterielle Welke bei der Tomate auszulösen (Meletzus *et al.* 1993), er ist damit ein Endophyt.

Das auf pCM1 lokalisierte *celA*-Gen kodiert eine Endo- β -1,4-Glucanase (Jahr 2000; Jahr *et al.* 2000) von 476 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 78 kDA, deren Funktion die Degradation der nativen Zellwand sein könnte. Auf dem Plasmid pCM2 ist das Gen *pat-1* lokalisiert, dessen Funktion bislang nicht aufgeklärt werden konnte. BLAST-Abfragen (Altschul *et al.* 1997) für Pat-1 ergaben Ähnlichkeiten zu Serinproteasen vom Trypsin-Subtyp. Weitere Kopien von *pat-1* sind auf pCM2 lokalisiert (*phpA* und *phpB*, plasmidal homology of *pat-1*). Komplementationsversuche durch Einbringen von *pat-1* in CMM100 konnte den Welke-Phänotyp von *Cmm* wiederherstellen, analog angestellte Versuche mit *phpA* und *phpB* dagegen nicht (Burger *et al.* 2005). Pat-1 ist daher als ein ursächlicher Faktor für die Pathogenität von *Cmm* anzusehen. Weitere 7 homologe Gene zu *pat-1* sind als *chp*-Familie (chromosomal homology of *pat-1*) auf dem Chromosom von *Cmm* lokalisiert (*chpA* bis *chpG*) (Gartemann *et al.* 2003; Burger *et al.* 2005; Gräfen 2005). Drei dieser Gene (*chpA*, *chpB*, *chpD*) sind durch Stop-Codons im Leseraster und/oder Leserasterschübe Pseudogene und daher nicht funktionell. Eine *chpG*-Mutante zeigte keinen gegenüber dem Wildtyp veränderten Phänotyp. Eine *chpC*-Mutante konnte die Tomatenpflanze nicht effektiv kolonisieren und zeigte drastisch reduzierte Welkesymptome (Gräfen 2005). ChpC scheint damit Einfluss auf die Bakterien-Pflanzen-Interaktion im Rahmen der Kolonisation zu besitzen.

Weitere chromosomal kodierte Gene, die an der Wirtserkennung, der Infektion, der Reaktion gegenüber einer Pflanzenabwehr und der Kolonisation beteiligt sind, waren zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht bekannt. Aus diesem Grunde wurde in Vorarbeiten zu einem Genomprojekt von *Cmm* NCPPB382 im Rahmen meiner Diplomarbeit eine Shotgun-Sequenzierung des Chromosoms von *Cmm* NCPPB382 durchgeführt (Engemann 2001; Burger *et al.* 2005). Dieses Projekt lieferte Sequenzdaten von 125 zufällig ausgewählten Hybridplasmiden, die durch Klonierung von *Bam*HI-Fragmenten der DNA des plasmidfreien Stammes CMM100

in pUC13 erhalten wurden. Über Ansequenzierung der äußeren Insertbereiche über einen Bereich von 400-600 bp und Datenbankabfragen konnten Ähnlichkeiten zu 176 putativen Proteinen bekannter und unbekannter Funktion gezeigt werden. Einige dieser Gene kodieren für Proteine, die eine Bedeutung bei der Bakterien-Pflanzen-Interaktion haben könnten. Hierunter fällt auch das in dieser Arbeit charakterisierte „Bacterioferritin comigratory protein“ (Bcp), das durch das Gen *bcp* kodiert wird. Bcp gehört zur Familie der Thiol-spezifischen antioxidativen Proteine/Alkylhydroperoxid-Reduktase C (AhpC/TSA), mit Trivialnamen Peroxiredoxine, welche im vorangegangenen Abschnitt vorgestellt wurden.

Das derzeit fast abgeschlossene *Cmm*-Genomprojekt lieferte weitere Daten zum Chromosom und führte zur Identifizierung eines Homologs zu dem für Bcp kodierenden Gen *bcp*, dem AhpE kodierenden Gen *ahpE*

5. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollten, ausgehend von den durch das Shotgun-Sequenzierungsprojekt (Engemann 2001) ermittelten Protein-Homologien weitere Hinweise hinsichtlich der in die Bakterien-Pflanzen-Interaktion zwischen *Cmm* NCPPB382 und seiner Wirtspflanze Tomate (*Solanum lycopersicum*) involvierten Gene gesammelt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte dabei ein besonderes Augenmerk auf Gene gelegt werden, die eine Rolle in der Kolonisation bzw. in der Reaktion auf die Pflanzenabwehr spielen könnten. Exemplarisch wurde das für „Bacterioferritin comigratory protein“ (Bcp) kodierende Gen *bcp*, dem eine Rolle in der Entgiftung der während des „oxidative burst“ gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zugeschrieben wird, für eine Charakterisierung *in planta*, *in vivo* und in biochemischen Tests ausgewählt.

Das im Zuge des *Cmm* NCPPB382-Genomprojektes identifizierte Peroxiredoxin AhpE sollte hinsichtlich seiner biochemischen Eigenschaften mit Bcp verglichen werden.

C. Material und Methoden

I. Material

1. Bakterienstämme

Escherichia coli:

Stamm	Genotyp/relevante Eigenschaften	Herkunft/Referenz
JM109	F ⁻ <i>traD36 proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15/Δ(lac-proAB) glnV44e14⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17</i>	Yanish-Perron <i>et al.</i> 1985
WA337	F ⁻ <i>dcm-6 dam-3 metβ1 galK2 galT22 lacY1 tsx-78 supE44</i>	Stammsammlung W. Wackernagel, Universität Oldenburg,
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsd_B (r_B⁻ m_B⁻; E. coli B Stamm) mit DE3, ein T7 RNA Polymerase-Gen tragender λ-Prophage</i>	Studier <i>et al.</i> 1990

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*:

Stamm	Genotyp/relevante Eigenschaft	Herkunft/Referenz
<i>Cmm</i> NCPPB382	virulent, <i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate), pCM1 und pCM2	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, UK
CMM100	Curing-Derivat von NCPPB382, plasmidfrei	Meletzus and Eichenlaub 1991
CMM101	Curing-Derivat von NCPPB382, pCM1	Meletzus and Eichenlaub 1991
CMM102 _{Nm}	Nm ^R ; pCM2	Pieper 2001
<i>bcp</i> ⁻	Cm ^R ; pCM1, <i>bcp</i> ⁻ :: <i>cmx</i> ,	diese Arbeit
<i>bcp</i> (pDM:: <i>bcp</i>)	Cm ^R , Nm ^R , pCM1, <i>bcp</i> ⁻ komplementiert mit pDM302:: <i>bcp</i>	diese Arbeit
<i>bcp</i> (<i>bcp</i> ⁺)	Cm ^R , Nm ^R , Gn ^R ; pCM1, <i>bcp</i> ⁻ komplementiert mit pJE216- <i>bcp</i>	diese Arbeit
<i>bcp</i> (M49)	Cm ^R , Nm ^R , Gn ^R ; pCM1, <i>bcp</i> ⁻ komplementiert mit pJE216-M49	diese Arbeit
<i>bcp</i> (M54)	Cm ^R , Nm ^R , Gn ^R ; pCM1, <i>bcp</i> ⁻	diese Arbeit

	komplementiert mit pJE216M-54	
<i>bcp(pat)</i>	Cm ^R , Nm ^R ; pCM1, pCM2, <i>bcp</i> konjugiert mit CMM102 _{Nm}	diese Arbeit

2. Pflanzenmaterial

Pflanzensamen	Herkunft
<i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate) cv. "Moneymaker"	Erfurter Saatgut, N. L. Chrestensen, Erfurter Samen- und Pflanzenzucht GmbH
<i>Mirabilis jalapa</i> (Japanische Wunderblume)	Botanischer Garten, Universität Halle, Nachzucht 1991

3. Plasmide und Vektoren

Escherichia coli-Kloniervektoren:

Plasmid/Vektor	relevante Eigenschaft	Herkunft/Referenz
pUC13	Amp ^R ; <i>lacZ'</i> α - Komplementationssystem	Vieira and Messing 1982
pUC18	Amp ^R ; <i>lacZ'</i> α - Komplementationssystem	Yanish-Perron <i>et al.</i> 1985
pEC70	Cm ^R ; pK18 <i>mob</i> mit 3.1 kb <i>HpaI/HindIII</i> - Fragment von pTP10 aus <i>Corynebacterium striatum</i>	Tauch <i>et al.</i> 1998
pSmart	Amp ^R ; Kloniervektor	BaseClear Holding, Leiden, Netherlands
pHJ-1	Amp ^R , <i>celA</i>	Jahr <i>et al.</i> 2000
pSVB30:B7a	Amp ^R , <i>pat-1</i>	Dreier <i>et al.</i> 1997
rscmm95	Amp ^R ; <i>bcp</i> -Gen kloniert als <i>BamHI</i> - Fragment in pUC13; Shotgun-Sequenzier-Plasmid	Engemann 2001
pJE95	752 bp <i>KpnI/PstI</i> -Fragment aus rscmm95 in pUC18 <i>KpnI/PstI</i>	Engemann 2001
pJE951	pJE95 mit 1891 bp <i>BsaAI</i> - Fragment mit Cm ^R -Kassette aus pEC70 in <i>SmaI</i> , α -Orientierung	Engemann 2001
cmis2p0451h08	Amp ^R , geschertes 2,5 kb Fragment	Sequenzierungsprojekt

	aus <i>Cmm</i> 382 kloniert in pSmart, flankiert von <i>EcoRI</i> -Schnittstellen	<i>Cmm</i> NCPPB382
pJE49	Amp ^R , <i>bcp</i> -Gen mit Cys ₄₉ nach Ser ₄₉ Austausch, kloniert als 776 bp <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment in pUC18	diese Arbeit
pJE54	Amp ^R ; <i>bcp</i> -Gen mit Cys ₅₄ nach Ser ₅₄ Austausch kloniert als 776 bp <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment in pUC18	diese Arbeit

Escherichia coli-*Cmm*-Shuttlevektoren:

Plasmid/Vektor	relevante Eigenschaft	Herkunft/Referenz
pHN216	Gn ^R , Nm ^R ; pCM2-Derivat	Laine <i>et al.</i> 1996
pJE216- <i>bcp</i>	Nm ^R ; 776 bp <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment mit <i>bcp</i> -Gen aus pJE95 kloniert in pHN216	diese Arbeit
pJE216-M49	Nm ^R ; <i>bcp</i> -Gen mit Cys ₄₉ nach Ser ₄₉ Austausch, kloniert als 776 bp <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment in pHN216	diese Arbeit
pJE216-M54	Nm ^R ; <i>bcp</i> -Gen mit Cys ₅₄ nach Ser ₅₄ Austausch kloniert als 776 bp <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment in pHN216	diese Arbeit
pDM302	Km ^R , Cm ^R ; pCM1-Derivat	Meletzus <i>et al.</i> 1993
pDM302:: <i>bcp</i>	Km ^R ; 776 bp <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment mit <i>bcp</i> -Gen aus pJE95 kloniert in pDM302	diese Arbeit

Escherichia coli-Expressionsvektoren:

Plasmid/Vektor	relevante Eigenschaft	Herkunft/Referenz
pPROlar.A122	Km ^R ; Expressionsvektor mit N-terminalem Myc-tag	BD Biosciences
pET22b(+)	Amp ^R , Expressionsvektor mit N-terminaler <i>pelB</i> Signalsequenz und C-terminalem His-tag, T7 Promotor	Novagen
pET- <i>bcp</i>	Amp ^R , <i>bcp</i> -Gen kloniert als 480 bp <i>NdeI/NotI</i> PCR-Fragment in pET22b(+)	diese Arbeit
pET-C49S	Amp ^R , <i>bcp</i> -Gen mit Cys ₄₉ nach Ser ₄₉ Austausch, kloniert als 480 bp <i>NdeI/NotI</i> PCR-Fragment in pET22b(+)	diese Arbeit
pET-C54S	Amp ^R , <i>bcp</i> -Gen mit Cys ₅₄ nach Ser ₅₄ Austausch kloniert als 480 bp <i>NdeI/NotI</i> PCR-Fragment in pET22b(+)	diese Arbeit
pET- <i>ahpE</i>	Amp ^R , <i>ahpE</i> -Gen kloniert als 474 bp <i>NdeI/NotI</i> PCR-Fragment	diese Arbeit

4. Primer

Primer	5' → 3'-Sequenz
P 5 (pat-1)	GCG AAT AAG CCC ATA TCA A
P 6 (pat-1)	CGT CAG GAG GTC GCT AAT A
PFC 1 (celA)	GTC TGA GCT CTG GTA CAC AT
PRC 3 (celA)	TCG TCT CGA ACT TCG TAC CG
Neo-pDM1	GCT TTC TTG CCG CCA AGG
Neo-pDM2	GAA CTC CAG CAT GAG ATC C
M95uni	CCA TGA TTA CGA ATT CGA GCT CGG
M95rev	CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AG
cys49-1	GAC CCC CGG GAG CAC CAC GCA
cys49-2	TGC GTG GTG CTC CCG GGG GTC
cys54-1	CCA CGC AGG CGA GCG ACT TCC

cys54-2	GGA AGT CGC TCG CCT GCG TGG
bcp pET F1	GGG AAT TCC ATA TGA ACG AGA CCA CC
bcp pET R1	CTC GAG TGC GGC CGC GGC GTC GAC GCC GAG CTT C
ahpE pET F1	GGA ATT CCA TAT GGC CCT GGC CA
ahpE pET R1	GAG TGC GGC CGC GGC CGG GAC GAG C

5. Chemikalien und Kits

Bezugsquelle	Chemikalien/Kits
Aldrich	Xylenol Orange
Amersham	Hybond N-Filter
Baker	Wasserstoffhydroperoxid
Biozym	Agarose Seakem LE
Eurogentec	Elektroporationsküvetten (2mm Elektrodenabstand)
GibcoBRL	Select Agar, Select Peptone 140, Select Yeast Extract
Invitrogen	Random Hexamer Primer; SeeBlue Pre-Stained Standard (Proteinmarker),
Macherey-Nagel	Porablot NY, Protino Ni 1000 Prepacked Columns Kit, Total RNA Isolation Kit,
Merck	alle hier nicht aufgeführten Chemikalien und Materialien
Millipore	Sterilfilter
Peqlab	dNTPs
Pharmacia	Sephadex G50, Ampholin-Lösung
Pierce	BCA Protein Assay Reagent
Promega	RNasin Ribonuclease Inhibitor, Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System
Qiagen	QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, Taq PCR Core Kit, QIAquick PCR-Purification Kit
Riedel-deHaen	Schwefelsäure
Roche	Blocking-Reagenz, 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylpyrophosphat (BCIP), DIG-High Prime, DNA Molecular Weight Marker III (Digoxigenin-labeled), Nitrobluetetrazolium (NBT), Random Primed Labeling Kit
Roth	Acrylamid, Ammoniumperoxodisulfat, Ampicillin, Bisacrylamid, Dialysierschläuche Visking Typ 8/32, Essigsäure, Glasperlen, Glucose, Glycerin, Glycin,

	Maleinsäure, Methanol, NaCl, TEMED, Tween 80, X-Gal
Schleicher & Schuell	Nitrocellulose-Membran, Nylon-Membran, Sterilfilter
Serva	Bromphenolblau, Dithiothreitol, N-Laurylsarkosyl, Rinderserumalbumin, Silicone Solution, Nonidet P-40
Sigma	t-Butylhydroperoxid, Chloramphenicol, Cumenhydroperoxid, Dimethylformamid, EDTA, EGTA, Formaldehyd, Glutathion, Kanamycin, Laurylsulfat, Linolsäure, Natriumborat, Natriumdeoxycholat, Natriumhydroxid, Neomycin, Mineralöl, Ponceau S, Sorbitol, Tris-HCl, Triton-X-100, Xylenol-Orange
Waters	C18 Cartridges for Solid Phase Extraction
Whatman	3 MM Papier

6. Enzyme und Enzymreaktionspuffer

Bezugsquelle	Enzym
Biolabs	Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase
Fermentas	Restriktionsendonukleasen
Invitrogen	SuperScript II RNase H Reverse Transcriptase
Qiagen	Proof Start Polymerase, RNase-free DNase Set
Roche	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, Klenow-Polymerase
Serva	RNase A
Sigma	Lysozym, Lipoxidase

Restriktionsendonukleasen:

Enzym	Erkennungssequenz	Reaktionspuffer	Temperatur
<i>Bam</i> HI	G/GATTC	NEBuffer 2 oder <i>Bam</i> HI	37 °C
<i>Bgl</i> II	A/GATCT	NEBuffer 3	37 °C
<i>Bsa</i> AI	PyAC/GTPu	NEBuffer 3	37 °C
<i>Eco</i> RI	G/AATTC	NEBuffer 1-4	37 °C
<i>Eco</i> 47III	AGC/GCT	NEBuffer 3	37 °C
<i>Hind</i> III	A/AGCTT	NEBuffer 2	37 °C
<i>Kpn</i> I	GGTAC/C	NEBuffer 1	37 °C
<i>Nco</i> I	C/CATGG	NEBuffer 4	37 °C
<i>Nde</i> I	CA/TATG	NEBuffer 4	37 °C
<i>Not</i> I	GC/GGCCGC	NEBuffer 4	37 °C

<i>NruI</i>	TCG/CGA	NEBuffer 3	37 °C
<i>PstI</i>	CTGCA/G	NEBuffer 3	37 °C
<i>SmaI</i>	CCC/GGG	NEBuffer 4	25 °C
<i>SphI</i>	GCATG/C	NEBuffer 2	37 °C
<i>StuI</i>	AGG/CCT	NEBuffer 2	37 °C
<i>XhoI</i>	C/TCGAG	NEBuffer 2	37 °C

Enzymreaktionspuffer (10x konzentriert):

NEBuffer 1	10 mM	Bis Tris Propan-HCl
	10 mM	MgCl ₂
	1 mM	Dithiothreitol, pH 7,0
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	Mg-Acetat
	50 mM	K-Acetat
	1 mM	Dithiothreitol, pH 7,9
NEB Ligasepuffer	50 mM	Tris-HCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	DTT
	1 mM	ATP
	25 µg/ml	BSA, pH 7,5

7. Nährmedien

TBY-Medium	10 g	Pepton
	5 g	Yeast-Extract
	5 g	NaCl
		bidest. H ₂ O add. 1000 ml, pH 7,5

C-Medium	10 g	Pepton
	5 g	Yeast-Extract
	5 g	NaCl
	5 g	Glucose
		bidest. H ₂ O add. 1000 ml, pH 7,2-7,5
Minimalmedium (MM)	6 g	Na ₂ HPO ₄
	3 g	KH ₂ PO ₄
	0,5 g	NaCl
	1 g	NH ₄ Cl
		bidest. H ₂ O add. 800 ml, pH 7,4
	1 g	Glucose in 200 ml bidest. H ₂ O gelöst
		getrennt autoklavieren, auf 50 °C abgekühlt mischen
	100 µl	10x Spurenelemente
	2 ml	1 M MgSO ₄
	1 ml	0,1 M CaCl ₂
2,5 µl	200 mg/ml Thiamin	
2,5 µl	200 mg/ml Nicotinsäure	
	nach dem Autoklavieren zugeben	
	10 x Spurenelemente:	
2 g/l	FeCl ₃ ·6H ₂ O	
100 mg/l	CuCl ₂ ·2H ₂ O	
100 mg/l	MnCl ₂ ·4H ₂ O	
100 mg/l	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	
100 mg/l	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	
400 mg/l	ZnCl ₂	
SB-Medium	10 g	Pepton
	5 g	Yeast-Extract
	5 g	NaCl
	16 g	Agar (für Festmedium)
		bidest. H ₂ O add. 600 ml
	92 g	Sorbitol
	5 ml	5 M CaCl ₂
		bidest. H ₂ O add. 400 ml
	getrennt autoklavieren, auf 50 °C abgekühlt mischen	

SOC-Medium	20 g	Pepton
	5 g	Yeast-Extract
	0,6 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	2,5 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O
	2,1 g	MgCl ₂ ·6H ₂ O
		bidest. H ₂ O add. 400 ml, pH 7,0
3,9 g	Glucose	
	bidest. H ₂ O add. 400 ml	

getrennt autoklavieren, auf 50°C abgekühlt mischen

8. Zusätze zu den Nährmedien

Festmedium	15 g/l	Agar
Weichagar (Toplayer)	7,5 g/l	Agar
Blau-Weiß-Selektion	1,5 ml/l	2 % XGal
	300 µl/l	0,1 M IPTG in Dimethylformamid
Induktion Proteinexpression	0,4 mM	IPTG

Antibiotikum	Endkonzentration für <i>E. coli</i> [µg/ml]	Endkonzentration für <i>Cmm</i> [µg/ml]
Ampicillin (Amp)	150	-
Kanamycin (Km)	50	50
Chloramphenicol (Cm)	50 (in 70 % Ethanol)	10 (in 70 % Ethanol)
Neomycin (Nm)	50	75

9. Puffer und Lösungen

9.1 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung und -Reinigung

AK I	6,7 % (w/v)	Saccharose
	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA
BD I	50 mM	Glucose
	10 mM	CDTA
	25 mM	Tris-HCl, pH 7,5

BD II	0,2 M	NaOH
	1 % (v/v)	SDS
Chloroform-Isoamylalkohol		gemischt im Verhältnis 24:1
CsCl gesättigtes Isopropanol	37 g	CsCl in 41 ml H ₂ O 100 ml Isopropanol zufügen
DNase/RNase-Lösung	1 mg/ml	DNase I
	1 mg/ml	RNase A
	150 mM	NaCl
	44 % (v/v)	Glyzerin
	portionsweise bei -20 °C lagern	
E1F-Puffer	1 mM	EDTA
	20 % (w/v)	Saccharose
	7 % (w/v)	Ficoll, pH 8,4
	vor jeder Lyse frisch zugeben:	
	10 µg/ml	RNase A (DNase-frei)
	20 mg/ml	Lysozym
Kirby-Mix	88 ml	Phenol
	12 ml	Kresol
	0,1 g	Hydroxychinolin
	1 Vol	100 mM Tris-HCl, pH 8,0
P1	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
P2	200 mM	NaOH
	1 %	SDS
P3	3 M	K-Acetat, pH 5,5
Phenol-Chloroform		im Verhältnis 1:1 mit neutralem Phenol
QBT	750 mM	NaCl
	50 mM	4-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), pH 7,0
	15 % (v/v)	Isopropanol
	0,15 % (v/v)	Triton X-100

QC	1 M	NaCl
	50 mM	MOPS, pH 7,0
	15 % (v/v)	Ethanol
QF	1,25 M	NaCl
	50 mM	Tris-HCl, pH 8,5
	15 % (v/v)	Ethanol
QR (Qiagen-tip Regeneration)	2 M	NaCl
	50 mM	Tris-HCl, pH 8,5
TE (1x)	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA

9.2 Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese

Agarose	0,8-1,5 %	Agarose in TBE (1x) oder TA (1x) aufkochen
DNA-Gelladepuffer (5x)	40 %	Glyzerin
	125 mM	EDTA
	0,03 %	Bromphenolblau
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml	in H ₂ O
TA (50x)	2 M	Tris-HCl, pH 8,0
	500 mM	Na-Acetat
	50 mM	EDTA
TBE (10x)	108 g	Tris-Base
	9,3 g	EDTA
	55 g	Borsäure; bidest. H ₂ O add. 1000 ml

9.3 Puffer und Lösungen für DNA-DNA-Hybridisierung

Blocking-Stammlösung	10 % (w/v)	Blocking-Reagenz in DIG I
Blot I (Depurinierung)	250 mM	HCl
Blot II (Denaturierung)	1,5 M	NaCl
	0,5 M	NaOH

Blot III (Neutralisierung)	1 M	NH ₄ -Acetat
	0,02 M	NaOH
Denaturierungslösung	1,5 M	NaCl
	0,5 M	NaOH
Depurinierungslösung	0,25 M	HCl
DIG I	0,1 M	Maleinsäure
DIG II	2 % (v/v)	Blocking-Stammlösung in DIG I
DIG III	100 mM	Tris-HCl, pH 9,5
	100 mM	NaCl
	50 mM	MgCl ₂
DIG-Färbelösung	100 µl	NBT/BCIP Stock Solution in 20 ml DIG III
DIG-Waschpuffer	0,3 % (v/v)	Tween80 in DIG I
Hybridisierungslösung		Prähybridisierungslösung mit DIG-markierter Sonde
Neutralisierungslösung	1,5 M	NaCl
	0,5 M	Tris-HCl, pH 7,5
Prähybridisierungslösung	5 x	SSC
	2 %	Blocking-Stammlösung
	0,02 %	SDS
	0,1 %	N-Lauroylsarkosyl
SSC (20x)	3 M	NaCl
	300 mM	Na-Citrat, pH 7,0
Wash I	2 x	SSC
	0,1 %	SDS
Wash II	0,1 x	SSC
	0,1 %	SDS

9.4 Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

RB-Stammlösung (10x)	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)	Glyzerin
	0,2 % (w/v)	Bromphenolblau
Probenpuffer (nicht denaturierend)		ohne β-Mercaptoethanol-Zugabe

9.5 Puffer und Lösungen für die isoelektrische Fokussierung

IEF-Acrylamidlösung	15,1-17,1 g	Harnstoff
	3 ml	Ampholin-Mischung (pH 3,5-10)
	4,6 ml	bidest. H ₂ O
	6 ml	10 % Nonidet P-40
	4 ml	30 % Acrylamid/1,6 % Bisacrylamid
	1 µl	TEMED
	1 µl	10 % APS
Lysis-Lösung	14,3 g	Harnstoff
	0,5 ml	Ampholin-Mischung (pH 3,5-10)
	10 ml	bidest. H ₂ O
	5 ml	10 % Nonidet P-40
	1,25 ml	β-Mercaptoethanol

9.6 Lösungen für die Coomassie-Färbung von SDS-Acrylamid-Gelen

Färbelösung (Coomassie)	40 % (v/v)	Isopropanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
	1 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R 250
Entfärber (Coomassie)	25 % (v/v)	Isopropanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
Konservierungspuffer	40 % (v/v)	Isopropanol
	3 % (c/v)	Glyzerin

9.7 Lösungen für die Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

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)	Na ₂ CO 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)	Glyzerin

9.8 Lösungen zur Resuspendierung/Lagerung 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

9.9 Lösungen zur Proteinisolierung und -aufreinigung

Zellysepuffer	100 mM	Tris-HCl
	20 mM	EDTA, pH 8,5
	2 mg/ml	Lysozym (frisch zubereitet)
Waschpuffer	50 mM	Tris-HCl
	2,5 M	Harnstoff, pH 8,5
	optional 1,5 %	Triton X 100
LEW-Puffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl, pH 8
Elutionspuffer	50 mM	Na ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	250 mM	Imidazol, pH 8

9.10 Puffer und Lösungen für den Western-Blot

Blocking-Puffer	5 %	nonfat 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	40 mM	Capronsäure
	10 %	Methanol
TBS	50 mM	Tris, pH 7,5
	150 mM	NaCl
Waschpuffer	0,2 %	Tween 20 in TBS

9.11 Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie

K-P _i -Puffer	40 mM	KH ₂ PO ₄
	40 mM	K ₂ HPO ₄
		gemischt in variablem Verhältnis, gewünschter pH 7,0; autoklavieren
Xylenol-Orange-Lösung	6/10 Vol.	kaltes bidest. H ₂ O
	1/10 Vol.	250 mM H ₂ SO ₄
	1/10 Vol.	1 M Sorbitol*
	1/10 Vol.	2,5 mM (NH ₄) ₂ Fe(SO ₄)·6H ₂ O*
	1/10 Vol.	1,25 mM Xylenol-Orange*
		(* Haltbarkeit 1 Woche bei 4 °C) in angegebener Reihenfolge, jeweils frisch ansetzen

10. Geräte

Brutschränke, Firma Heraeus

Elektroporationsgerät, Gene Pulser + Pulse Controller, Firma BioRAD

Evaporationsgerät, Speed Vac Concentrator, Firma Savant

French Pressure Cell Press, Firma AMINCO

Heizblock: Block Heater, Firma Stuart Scientific

Hybridisierungsöfen: OV2, Firma Biometra

Kühlzentrifuge: Hermle Centrifuge H-401, Firma Kontron (Rotoren A6.9 und A8.24)

PCR-Gerät, Minicycler™, Firma MJ Research

PCR-Gerät, Robocycler Gradient 96, Firma Stratagene

Spannungsgeber

Tischschüttler, KS10 Firma Edmund Bühler

Tischzentrifuge, Centrifuge 5415D, Firma Eppendorf

UV-Vis-Spektrometer, UV-1202, Firma Shimadzu

Ultrazentrifuge, Optima LE-80K, Firma Beckman Coulter (Rotor Vti 65.2)

Vakuublott-Apparatur: LKB-Vacu-Gene XL, Firma Pharmacia

Vortex, Genie 2, Firma Bender & Hobein

Zentrifuge, Megafuge 10, Firma Heraeus Sepatech

11. Computer Software

Alignments	CLUSTAL X (1.83), BOXSHADE, UBC Bioinformatics Center, Vancouver (http://bioinformatics.ubc.ca/resources/tools/) Genedoc
Datenbankabfragen	FASTA, Virginia (http://fasta.bioch.virginia.edu/) BLOCKS 14.1/2005, Fred Hutchinson Research Center, Seattle (http://blocks.fhcrc.org/) ExpPASy Proteomic Server, Genf (www.expasy.org) Blast 2.2.11 , National Center for Biology Information, Bethesda (www.ncbi.nlm.nih.gov)
Software	Chromas 1.1, School of Biomolecular and Biomedical Science, Brisbane Clone 5, Scientific & Educational Software Lasergene 99, DNASTAR

II. Methoden

1. Kultivierung und Konservierung von Bakterien

1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgt auf festem oder in flüssigem TBY-Medium, ggf. unter Zusatz von Antibiotika, über Nacht bei 37 °C. Kleine Kultur-Volumina (3-5 ml) werden nach Überimpfen einer Einzelkolonie im Roller angezogen, größere Volumina (Erlenmeyer-Kolben-Maßstab) werden im Luftschüttler bei 200 U/min inkubiert.

1.2 Kultivierung von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Cmm wird auf festem oder in flüssigem C-, TBY- oder *Clavibacter*-Minimalmedium, ggf. unter Zusatz von Antibiotika, über 2-5 Tage bei 25-28 °C im Brutschrank oder Luftschüttler (150 U/min) angezogen.

1.3 Konservierung von Bakterienkulturen (Glyzerinkultur)

- Bakterien von einer frischen, gut gewachsenen Agar-Platte oder Flüssigkultur in ein Eppendorfgefäß überführen
- 400 µl PS-Puffer zufügen und sorgfältig resuspendieren (Vortex)
- ggf. Antibiotikum zugeben
- 600 µl 87 % Glyzerin zugeben und gut mischen
- Lagerung bei -20 °C oder für längere Lagerfähigkeit bei -80 °C

2. DNA-Isolierung

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

2.1.1 HB-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

(Klonanalyse)

- 1,5 ml Übernachtskultur im Eppendorfgefäß 5 min bei 6000 rpm pelletieren
- Pellet in 150 µl eiskaltem P1 resuspendieren
- 150 µl P2 zugeben, invertieren und max. 5 min inkubieren

- 150 µl P3 zugeben, 4-6x invertieren
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand in Eppendorfgefäß mit 500 µl Isopropanol überführen
- 30 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit 250 µl 70 % Ethanol waschen
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Pellet bei 70 °C kurz trocknen
- DNA in 20 µl bidest. H₂O oder 1x TE-Puffer lösen

2.1.2 Plasmidisolierung aus *E. coli* durch alkalische Lyse

(Birnboim and Doly 1979, modifiziert; zur Isolierung großer Mengen von pUC-Derivaten)

- 40 ml Übernachtskultur (angezogen unter Selektionsdruck) in Zentrifugenröhrchen überführen
- 5 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugieren (Rotor A8.24)
- Pellet in 8 ml BD I resuspendieren
- 16 ml BD II (frisch bereitet) zugeben, invertieren
- 10 min bei RT inkubieren
- 12 ml 3 M Na-Acetat pH 4,8 zugeben, sofort invertieren
- 10 min bei 0 °C inkubieren
- 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugieren (Rotor A8.24)
- Überstand auf zwei Zentrifugenröhrchen aufteilen
- 1 Vol Isopropanol zugeben, invertieren
- 30 min bei -70 °C inkubieren
- 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugieren (Rotor A8.24)
- Pellet trocknen lassen und in 5 ml TE-Puffer resuspendieren
- Reinigung der Plasmid-DNA durch CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation

2.1.3 Plasmidisolierung aus *E. coli* mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit

(zur schnellen Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA)

- 3 x 1,5 ml einer Übernachts-Flüssigkultur durch Zentrifugieren 5 min bei 6000 rpm pelletieren
- alternativ: Bakterien von einer Agarplatte in ein Eppendorfgefäß überführen
- Bakterien/Pellet in 250 µl P1 resuspendieren
- 250 µl P2 zugeben, 4-6 x invertieren

- 5 min bei RT inkubieren
- 350 µl N3 zugeben, 4-6 x invertieren
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- QIAprep-Säule in Sammelgefäß einsetzen, Überstand auf die Säule geben
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- 500 µl PB auf die Säule geben
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- Säule mit 750 µl PE waschen
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- Zentrifugationsschritt wiederholen zur restlosen Entfernung des PE
- Säule in ein neues Eppendorfggefäß setzen
- DNA-Elution: 50 µl EB oder bidest. H₂O in die Mitte der Säule geben, 1 min stehen lassen
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Lagerung bei -20 °C

2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit

(zur Isolierung kleiner Mengen hochreiner Plasmid-DNA)

- 3 x 1,5 ml Übernachtskultur im Eppendorfggefäß bei 13000rpm zentrifugieren
- Pellet mit 1 ml TE waschen
- Pellet in 250 µl P1 mit 25 µl RNase (10 mg/ml) und 1 µl RNaseT1 (1:300 mit bidest. H₂O verdünnt) resuspendieren
- 250 µl P2 zugeben, sofort mischen
- 5 min bei RT inkubieren
- 250 µl P3 zugeben, sofort mehrmals invertieren
- 10 min bei 0 °C inkubieren
- 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Qiagen Tip-20 Säule mit 1 ml QBT äquilibrieren, Durchlauf verwerfen
- Zentrifugationsüberstand auf die Säule geben
- 4 x mit 1 ml QC waschen
- DNA mit 0,8 ml QF von der Säule eluieren
- 700 µl Isopropanol zugeben, mischen
- 30 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit 200 µl 70 % Ethanol waschen
- Pellet bei 70 °C ca. 5 min trocknen und in 20 µl TE lösen

- Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Regeneration der Qiagen Tip Säule:
 - 2 x mit 1 ml QR waschen
 - 2 x mit 1 ml bidest. H_2O waschen
 - Lagerung in 50 % EtOH bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder RT
 - Verwendung max. 3-4 x

2.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

(nach Hopwood *et al.* 1985, modifiziert)

- 10 ml Flüssigkultur (2-Tage-Kultur) 10 min bei 6000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugieren (Rotor A8.24), Pellet weiterverwenden
alternativ: Bakterien einer 2 Tage alten Agar-Kultur in ein Eppendorfgefäß überführen
- Zellen in 500 μl AK I mit 10 mg/ml Lysozym gut resuspendieren
- 45-60 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubieren
- 200 μl 5 % SDS zugeben, vorsichtig mit blauer abgeschnittener Pipettenspitze durch Auf- und Abpipettieren mischen (Scheren der DNA vermeiden)
- 10-20 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubieren, gelegentlich invertieren
- langsam auf RT abkühlen lassen
- 200 μl neutrales Phenol-Chloroform (1:1) hinzufügen, mischen
- 20 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Oberphase in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- Phenolisierungsschritt wiederholen
- zu 600 μl des Überstandes 60 μl 3 M Na-Acetat (pH 8,0) und 600 μl Isopropanol zufügen
- invertieren, bis die DNA ausfällt
- präzipitierte DNA mit einer gelben Pipettenspitze oder Pasteurpipette durch Wickeln/Fischen in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- DNA 2 x mit 500 μl 70 % Ethanol waschen
- DNA in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- in 50-200 μl bidest. H_2O oder TE resuspendieren
- Lagerung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

(Kleinmaßstab nach Kuhs 2004; modifiziert)

- 20 ml TBY-Selektionsmedium mit *Cmm* animpfen und ca. 2 Tage bei 25-28 °C im Luftschüttler inkubieren
- 10 min bei 5500 rpm und 4 °C in Greinerröhrchen zentrifugieren (Rotor A8.24)
- Pellet mit 2 ml eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin waschen
- Glycerin abziehen und Pellet über Nacht bei -20 °C einfrieren
- Pellet in 300 µl P1 mit 100 µg RNase A und 7 mg/ml Lysozym vortexen und in Eppendorfgefäß überführen
- 15 min bei 37 °C inkubieren
- 300 µl P2 hinzufügen, 6 x invertieren
- 5 min bei RT inkubieren
- 300 µl P3 hinzufügen, 6 x invertieren
- 20 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- 700 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zugeben, invertieren bis zur Homogenität
- 30 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- 1/10 Vol. NaAcetat (pH 8,0) und 1 Vol. Isopropanol zufügen, invertieren
- 30 min bei -20 °C inkubieren
- 30 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol waschen
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand und Rücklauf vollständig abziehen
- Pellet bei 37 °C trocknen
- DNA in 50 µl TE resuspendieren
- Endkonzentration: 5 µl ~ 1 µg DNA

3. Reinigung und Konzentrierung von DNA

3.1 Alkoholfällung

- 1 Vol. DNA-Lösung mit 1/10 Vol. 3 M NaAcetat (pH 8,0) versetzen und mischen
- 2 Vol. Ethanol (bei kleinen DNA-Volumina) bzw. 1 Vol. Isopropanol (bei großen DNA-Volumina) hinzufügen, invertieren
- 30 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder besser bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubieren
- 30 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol waschen
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Pellet 5 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ trocknen
- Pellet in bidest. H_2O oder TE lösen

3.2 Phenolextraktion

- 1 Vol. DNA-Lösung mit 1 Vol. neutralem Phenol-Chloroform (1:1) mischen
- 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- anschließend Alkoholfällung des Überstandes durchführen

3.3 CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation

- 4,6-4,7 g CsCl in ein Corex-Röhrchen einwiegen
- 4,3 ml Plasmid-DNA-Lösung hinzufügen und durch Invertieren mischen
- 300 μl Ethidiumbromidlösung (2-3 mg/ml) zugeben und mischen
- bei low-copy-Plasmiden: 1 h bei 20000 rpm und $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugieren (Rotor A8.24)
- evtl. „clearing spin“ zur Entfernung einer Trübung: 20 min bei 20000 rpm und $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugieren (Rotor A8.24)
- klare Lösung in Quickseal™-Ultrazentrifugationsröhrchen (Beckman) luftblasenfrei einfüllen
- min 8 h (besser über Nacht) bei 50000 rpm und $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ in der Ultrazentrifuge zentrifugieren (Rotor VTi 65.2)
- unter UV-Licht ($\lambda=365\text{ nm}$) ccc-Plasmid-DNA (untere Bande) mit einer 1 ml-Spritze abziehen und in ein Eppendorfgefäß überführen

- EtBr 3-5 x nach Zugabe von jeweils 300 µl CsCl gesättigtem Isopropanol ausschütteln; Oberphase verwerfen, bis die Oberphase farblos ist
- Unterphase in einen sterilen Dialyseschlauch luftblasenfrei einfüllen
- mindestens 2 x 4 h gegen TE oder bidest. H₂O dialysieren

3.4 Sephadex-Behandlung

(nach Sambrook *et al.* 1989; zur Entfernung von Verunreinigungen wie Salzen, Nukleotiden, usw. aus Plasmid-DNA; Anwendung vor der Elektroporation)

- Sephadex G50-Pulver in bidest. H₂O quellen lassen und autoklavieren
- silikonisierte Glaskügelchen (Ø ca 2,5 mm) in blaue Pipettenspitze geben und in ein Weichagarröhrchen stellen
(Silikonisierung: Glaskügelchen in Silikonlösung tränken, Lösung abgießen, Kügelchen bei 100 °C in einer Glaspetrischale backen)
- 800 µl Sephadex G50-Lösung in die Spitze pipettieren
- 15 min bei 3000 rpm zentrifugieren (Megafuge)
- blaue Spitze in ein neues Weichagarröhrchen überführen
- DNA (mindestens 30 µl Volumen) auf die Sephadex-Säule auftragen
- 15 min bei 3000 rpm zentrifugieren
- gereinigtes DNA-Eluat weiterverwenden

3.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

(Sambrook *et al.* 1989)

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt, Proteinkonzentrationen misst man bei 280 nm.

Standardwerte (Maniatis *et al.* 1982):

doppelsträngige Plasmid-DNA	OD ₂₆₀ 1= 50 µg/ml
Oligonukleotide	OD ₂₆₀ 1=33 µg/ml
einzelsträngige DNA/RNA	OD ₂₆₀ 1=40 µg/ml
Reinheit der DNA	OD ₂₆₀ : OD ₂₈₀ > 1,8

4. Techniken zur Charakterisierung von DNA-Molekülen

4.1 Eckhardt-Lyse von *Escherichia coli*

(Eckhardt 1978)

Schnellmethode zur Darstellung und Größenbestimmung von Plasmiden mittels Lyse der Zellen im Agarose-Gel durch SDS-Behandlung.

- zu heißer 1 % Agarose in TA-Puffer 0,2 % SDS (Endkonzentration) hinzufügen
- pro Kolonie 5 µl TES-Puffer in eine Mikrotiterplatte pipettieren
- *E. coli*-Kolonie mit einem Zahnstocher von der Platte abnehmen und im TES-Puffer resuspendieren
- Zellsuspension mit 15 µl E1F-Puffer mischen, sofort in die Geltaschen füllen
- Gelvorlauf: ca. 15 min bei 20 V, bis die Taschen aufklaren
- Gelladepuffer als Marker in die äußeren Geltaschen pipettieren
- Gellauf bei 50-100 V

4.2 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltungen der Plasmid- und Gesamt-DNA werden entsprechend Hersteller-Empfehlung der Enzyme durchgeführt. Enzyminaktivierungen erfolgen durch Inkubation bei 70 °C für 10 min bzw. bei hitzestabilen Enzymen durch Phenolisierung.

Standardansatz zur Hydrolyse von Plasmid-DNA:

- 0,2-0,5 µg (1-5 µl) DNA in TE (pH8,0) oder bidest. H₂O
- 1,5 µl 10x Enzymreaktionspuffer zugeben
- 1 µl Restriktionsendonuklease (2-4 u) zugeben
- mit bidest. H₂O auf 15 µl Gesamtvolumen auffüllen
- Inkubation 1 h bei Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms
- Inaktivierung nach Herstellerangabe

Standardansatz zur Hydrolyse von Gesamt-DNA:

- 10 µl Gesamt-DNA
- 10 µl 10x Reaktionspuffer hinzufügen
- 1-2 µl Restriktionsendonuklease zugeben
- mit bidest. H₂O auf 100 µl Gesamtvolumen auffüllen
- Inkubation ü/N bei Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms
- Inaktivierung nach Herstellerangabe

4.3 Agarosegelelektrophorese

Diese Methode dient zur Auftrennung von DNA-Molekülen oder -Fragmenten im elektrischen Feld. Aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen wandern DNA-Moleküle im elektrischen Feld innerhalb der Agarose-Matrix aus glycosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch die Größe und Konformation der DNA-Moleküle (ss, ds, linear, oc, ccc), die Agarosekonzentration, sowie die angelegte Spannung beeinflusst.

Die Agarosekonzentration wird entsprechend des aufzutrennenden DNA-Molekulargewichtsbereiches gewählt:

Agarosekonzentration [% (w/v)]	Fragmentlänge [kb]
0,5	1-30
0,7	0,8-12
1,0	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

In dieser Arbeit wurde 0,8 % Agarose als Standardkonzentration gewählt, bzw. 1 % Agarose für Gele, mit denen die Southern Hybridisierung durchgeführt wurde. Als Elektrophoresepuffer dienen 1x Tris-Borat-Puffer (TBE) oder 1x Tris-Acetat-Puffer (TA). Die Auftrennung der DNA erfolgt bei einer Spannung von 90-120 V.

- Agarose in TBE- oder TA-Puffer unter Rühren aufkochen
- auf ca. 60 °C abkühlen lassen, in den Gelträger gießen und Kamm einsetzen
- Gel auspolymerisieren lassen (ca. 20 min)
- Gelträger in die mit TBE/TA-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer einsetzen und Kamm entfernen
- DNA-Proben mit 1/5 Vol. 5x Gelladepuffer versetzen
- Geltaschen mit Proben beladen
- Auftrennung bei einer Spannung von 90-120 V
- Gel nach Ende der Elektrophorese in einer Ethidiumbromid-Lösung anfärben
- Gel wässern und unter UV-Licht ($\lambda=302$ nm) fotografieren
- Gel ggf. in TBE-/TA-Puffer entfärben

4.4 Bestimmung des Molekulargewichtes von DNA

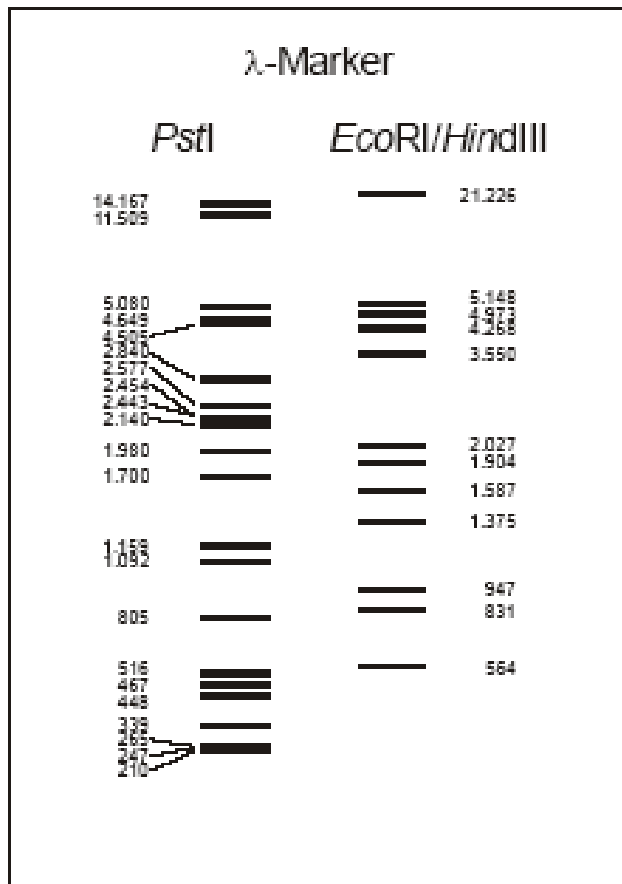


Abb. 5 Muster und Größe der Restriktionsfragmente *EcoRI/HindIII*- und *PstI*-hydrolysiertes λ -DNA

Die Mobilität von DNA-Molekülen ist in Agarosegelen bei angelegter Spannung umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes. Aus dem Vergleich mit Mobilitäten bekannter Größenstandards (in dieser Arbeit: *PstI*- oder *EcoRI/HindIII*-Restriktionsfragmente des Phagen λ ; Abb. 5) können die Molekulargewichte der Proben ermittelt werden.

Bei Hybridisierungsgelen wurden Digoxygenin-markierte *EcoRI/HindIII*-Restriktionsfragmente des Phagen λ als Marker eingesetzt.

5. Klonierung von DNA-Fragmenten

5.1 5'-Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

- 98 μ l linearisierte Vektor-DNA (Spaltungsansatz)
- 12 μ l 10x Phosphatase-Puffer zugeben, mischen
- 3 μ l alkalische Phosphatase (12 u) zugeben
- 7 μ l bidest. H₂O zugeben, mischen
- 30 min bei 37 °C inkubieren
- 6 μ l 100 mM EGTA (pH 7,0) zugeben, mischen
- 10 min bei 70 °C inaktivieren
- Phenolextraktion
- Ethanol-fällung
- DNA in 50 μ l bidest. H₂O aufnehmen

5.2 Auffüllung überstehender 3'-Enden durch Klenow-Polymerase

- 2 µg linearisierte DNA in Restriktionspuffer (nach Inaktivierung)
- 33 µM jedes dNTPs zugeben
- 0,5 µl Klenow-Polymerase (2,5 u) zugeben
- mit bidest. H₂O auf 50 µl auffüllen, mischen
- Inkubation 15 min bei 25 °C
- 2 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) zugeben
- Inaktivierung 10 min bei 70 °C

5.3 Verdau überstehender 3'-Enden durch Nuclease S1

- 25 µl inaktivierter Spaltungsansatz
- 5 µl Nuclease S1-Puffer zugeben
- 1 µl Nuclease S1
- auf 50 µl mit bidest. H₂O auffüllen und gut mischen
- inkubieren 10 min bei 37 °C
- 4 µl 0,25 mM EDTA (pH 8,0) zugeben
- 1 Vol. Phenol-Chloroform (1:1) zugeben, vortexen 20 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen
- 4 µl 3 M NaAcetat (pH 7,5) und 200 µl EtOH zugeben
- 20 min bei -20 °C inkubieren
- 20 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand abgießen
- Pellet 5 min bei 70 °C trocknen
- Pellet in 50 µl TE (pH 8,0) resuspendieren

5.4 DNA-Fragment-Isolierung aus dem Agarosegel mittels QIAquick Gel Extraction Kit

- Ausschneiden des gewünschten DNA-Fragmentes aus dem Agarosegel
- 3 Gel-Volumina QG zugeben (100 mg Gel ~ 100 µl Lösung), vortexen
- 10 min bei 50 °C inkubieren, ca. alle 3 min gut mischen
- 1 Gel-Volumen Isopropanol zugeben
- Säule in Sammelgefäß einsetzen, Lösung auf die Säule geben
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- 750 µl PE auf die Säule geben
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen

- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Entfernung der PE-Reste
- Säule in neues Eppendorfgefäß einsetzen
- 50 ml EB auf die Mitte der Säule geben, 1 min bei RT inkubieren
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Verwendung des Eluates zur Ligation oder Sonden-Herstellung bzw. Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

5.5 Ligation von DNA-Fragmenten

(Maniatis *et al.* 1982, modifiziert)

Vektor- und Insert-DNA werden nach der Restriktionsspaltung und Enzym-Inaktivierung im Verhältnis 1:2 bis 1:4 gemischt, d.h. die Insert-DNA liegt im Überschuß vor. Bei einem geringen Gesamtvolumen des Ligations-Ansatzes sollte die DNA-Konzentration möglichst hoch sein.

- 20 μl Vektor-Insert-DNA-Gemisch
- 3 μl 10x T4-Ligasepuffer
- 1 μl T4-DNA-Ligase
- mit bidest H_2O auf 30 μl auffüllen, mischen
- 4 h bei RT oder über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ ligieren
- 10 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ inaktivieren

6. DNA-Transfer

6.1 Transformation von *E. coli*

6.1.1 Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl_2 -Methode

- 1 ml ü/N-Kultur in 50 ml TBY-Vollmedium überimpfen
- bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Schüttler inkubieren bis zur log-Phase (ca. $2 \cdot 10^8/\text{ml}$ entspricht OD_{580} von 0,5-0,8 (2-4 h))
- 5 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 6500 rpm zentrifugieren (Rotor A8.24), Überstand verwerfen, Pellet auf Eis stellen
- Pellet in 5 ml eiskaltem 50 mM CaCl_2 resuspendieren
- 30 min auf Eis inkubieren
- 5 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 6500 rpm zentrifugieren (Rotor A8.24)
- Pellet vorsichtig in 2 ml eiskaltem 50 mM CaCl_2 resuspendieren

- 15 min auf Eis stellen
- zu 960 µl Zellsuspension 140 µl 87 % Glycerin zugeben und mischen
- Zellen à 200 µl in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotieren
- sofort bei -80 °C schockgefrieren, Lagerung bei -80 °C

6.1.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

- kompetente Zellen auf Eis auftauen lassen
- Zellen mit Ligationsansatz bzw. Plasmid-DNA mischen
- 30 min auf Eis inkubieren
- 2 min Hitzeschock bei 42 °C
- 0,7 ml TBY zugeben, invertieren
- 30 min bei 37 °C inkubieren
- Zellen 2 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet im Rücklauf resuspendieren und auf Selektionsmedium ausplattieren
- Inkubation ü/N bei 37 °C

6.2 Elektroporation von *E. coli*

6.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

- 250 ml TBY-Medium mit 2,5 ml ü/N-Kultur animpfen
- bei 37 °C im Luftschüttler bis zu einer OD₅₈₀ von 0,5-0,8 inkubieren (2-2,5 h)
- Zellen 15 min auf Eis stellen; alle weiteren Schritte werden bei 4 °C (auf Eis) durchgeführt, vorgekühlte Lösungen verwenden
- 250 ml Kultur 15 min bei 6000 rpm zentrifugieren (Rotor A6.9)
- Überstand und Rücklauf verwerfen
- Zentrifugenbecher 2 x mit ca. 20 ml bidest. H₂O vorsichtig ausschütteln, ohne das Pellet zu lösen
- Pellet vorsichtig in 5 ml bidest. H₂O resuspendieren
- 250 ml bidest. H₂O zugeben, mischen
- Zellen 15 min bei 6000 rpm pelletieren (Rotor A6.9), Überstand sofort abgießen
- Pellet im Rücklauf resuspendieren
- Zellsuspension auf zwei 40 ml Zentrifugenröhrchen aufteilen
- 25 ml 15 % Glycerin zugeben und mischen

- 15 min bei 6000 rpm zentrifugieren (Rotor A8.24), Überstand verwerfen
- Pellet in 1 ml 15 % Glycerin resuspendieren
- kompetente Zellen à 100 µl in vorgekühlte Eppendorfggefäße aliquotieren
- Lagerung bei -80 °C

6.2.2 Elektroporation kompetenter *E. coli*-Zellen

- kompetente Zellen auf Eis auftauen
- DNA und Elektroporationsküvetten (d=2 mm) auf Eis vorkühlen
- Gene-Pulser-Einstellungen:

Kapazität	25 µF
Parallelwiderstand	400 Ω
Spannung	12,5 kV/cm
- kompetente Zellen mit der zu transformierenden, durch Sephadex-Aufreinigung ionenfrei gemachten DNA (1-5 µl max. 10 µl DNA) mischen und in die Elektroporationsküvette füllen
- 30 – 60 s auf Eis inkubieren
- Küvette gut abtrocknen und in die Gene-Pulser-Apparatur stellen
- Puls auslösen (Zeitkonstante sollte bei 7-9 ms liegen)
- sofort nach dem Puls 1 ml SOC-Medium zur Zellsuspension zugeben
- Zellen in ein Eppendorfggefäß überführen
- 1 h bei 37 °C inkubieren
- Zellen in unterschiedlichen Volumina auf TBV-Selektionsmedium ausplattieren und ü/N bei 37 °C inkubieren

6.3 Elektroporation von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

6.3.1 Herstellung kompetenter *Cmm*-Zellen

(Kirchner 2003)

- 250 ml TBV-Medium mit *Cmm* animpfen
- ü/N bei 25-28 °C im Luftschüttler bis zur OD₅₈₀ von 1-1,2 anziehen
- mit TBV auf OD₅₈₀ von 0,3 verdünnen
- 218,5 ml dieser Kultur in neuen Kolben überführen und bei 25-28 °C bis OD₅₈₀ von 0,6 inkubieren (2-2,5 h)
- 31,5 ml 20 % Glycin zugeben (Endkonzentration 2,5 % Glycin)
- 2 h bei 25-28 °C Inkubation im Schüttler

- alle weiteren Schritte werden auf Eis durchgeführt, alle Lösungen auf Eis vorkühlen
- Zellsuspension in 500 ml-Zentrifugenbecher überführen
- 10 min bei 4 °C und 6500 rpm zentrifugieren (Rotor A.6.9), Rücklauf abziehen
- Pellet in 5 ml eiskaltem bidest. H₂O resuspendieren
- Suspension in 40 ml-Zentrifugenröhrchen überführen
- 25 ml eiskaltes bidest. H₂O zugeben, gut mischen
- 10 min bei 4 °C und 6500 rpm zentrifugieren (Rotor A8.24), Überstand restlos entfernen
- Pellet in 2 ml eiskaltem 10 % Glyzerin resuspendieren
- 25 ml eiskaltes 10 % Glyzerin zugeben, mischen
- 10 min bei 4 °C und 6500 rpm zentrifugieren (Rotor A8.24), Überstand restlos entfernen,
- Waschschrift wiederholen
- Pellet in 0,5 ml eiskaltem 15 % Glyzerin resuspendieren
- Zellen à 100 µl in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotieren
- kompetente Zellen sofort bzw. nach Lagerung auf Eis ü/N im Kühlraum verarbeiten; Lagerung bei -80 °C

6.3.2 Elektroporation kompetenter *Cmm*-Zellen

(Kirchner 2003; modifiziert)

- kompetente Zellen auf Eis auftauen
- Elektroporationsküvette (d=2 mm) auf Eis vorkühlen
- 400 µl SB-Medium in ein Eppendorfgefäß geben
- Gene-Pulser-Einstellungen:

Kapazität	25 µF
▪ Parallelwiderstand	600 Ω
▪ Spannung	12,5 kV/cm
- zu transformierende DNA mit kompetenten Zellen mischen und in eine Elektroporationsküvette überführen
- Küvette von außen gut abtrocknen, in die Gene-Pulser-Aparatur stellen und den Puls auslösen
- sofort 150 µl der 400 µl SB-Medium zu den Zellen geben, mischen
- den Inhalt der Küvette in das Eppendorfgefäß mit dem restlichen SB-Medium überführen

- 3,5 h bei 25-28 °C im Brutschrank inkubieren
- auf mindestens 3 SB-Selektionsmedium-Agarplatten ausplattieren
- Inkubation 4-5 Tage bei 25-28 °C

7. DNA-DNA-Hybridisierung

7.1 Herstellung Digoxygenin-11-dUTP-markierter DNA-Sonden durch Random Priming (DIG DNA Labeling Kit)

- 15 µl DNA-Lösung 10 min bei 98 °C denaturieren
- anschließend sofort auf Eis-Wasser stellen
- 2 µl Hexanukleotid-Mix, 2 µl dNTP-Mix (je 1 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,65 mM dTTP und 0,35 mM DIG-11-dUTP), 1 µl Klenow-Polymerase zugeben, mischen
- 60-90 min oder ü/N bei 37 °C inkubieren
- 2 µl 0,2 mM EDTA (pH 8,0) zugeben
- 10 min bei 70 °C inaktivieren
- DNA mit 2 µl 3 M Na-Acetat (pH 7,5) und 100 µl Ethanol fällen
- 10 min bei -20 °C inkubieren
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Pellet 5 min bei 70 °C trocknen
- in 50 µl TE resuspendieren, Lagerung bei -20 °C
- Hybridisierungslösung: Sonde mit 6 ml Prähybridisierungslösung mischen, Lagerung bei -20 °C
- Sonde vor jeder Hybridisierung 10-15 min bei 98 °C denaturieren und sofort zur Hybridisierung verwenden

7.2 Überprüfung der Markierungsreaktion (Dot-Blot)

- 1 µl der Sonden-DNA sowie 1 µl der Kontroll-DNA (DIG DNA Labeling Kit) auf Nylonmembran (Porablot NY) auftropfen
- bei RT trocknen lassen, anschließend 3-5 min UV-vernetzen ($\lambda=302$ nm)
- 1 min in DIG-Puffer I waschen
- 30 min in DIG-Puffer II inkubieren (Schüttler)
- 1 min in DIG-Puffer I waschen
- 30 min in DIG-Puffer II mit Antikörperkonjugat (1:10000) inkubieren (Schüttler)

- 2 x 15 min in DIG-Waschpuffer waschen
- 5 min mit DIG-Puffer III äquilibrieren
- Nylonmembran in 5 ml DIG-Puffer III mit 50 µl NBT/BCIP im Dunkeln färben
- zum Stoppen der Färbereaktion Nylonmembran 5 min in TE (pH 7,5) oder bidest. H₂O legen
- Membran trocknen und lichtgeschützt aufbewahren

7.3.1 DNA-Transfer durch Vakuumblothing

- hydrolysierte DNA-Proben durch Agarosegelelektrophorese auftrennen, mit Ethidiumbromid anfärben und unter UV-Licht ($\lambda=302$ nm) fotografieren
- Vakuumblothing-Apparatur mit geeigneter Maske zusammensetzen
- Nylonmembran (Porablot NY) auflegen
- Agarosegel luftblasenfrei auf die Membran auflegen
- Unterdruck (48 mbar) anlegen
- Depurinierungslösung auf das Gel geben, 4 min einwirken lassen
- Lösung absaugen
- Denaturierungslösung auf das Gel geben, 3 min einwirken lassen
- Lösung absaugen
- Neutralisierungslösung auf das Gel geben, 3 min einwirken lassen
- Lösung absaugen
- 20x SSC auf das Gel geben, 90 min einwirken lassen (Gel darf nicht trocken werden)
- Lösung absaugen
- Nylonmembran 3-5 min UV-vernetzen ($\lambda=302$ nm) oder 1 h bei 80 °C backen
- Membran anschließend zur Hybridisierung verwenden.

7.3.2 DNA-Transfer durch Kapillarblot

(Smith and Summers 1980)

- hydrolysierte DNA-Proben durch Agarosegelelektrophorese auftrennen, mit Ethidiumbromid anfärben und unter UV-Licht ($\lambda=302$ nm) fotografieren
- Agarosegel 5 min in Blot I inkubieren (Depurinierung), Lösung abgießen
- 2 x 15 min in Blot II inkubieren (Denaturierung), Lösung abgießen
- 2 x 15 min in Blot III inkubieren (Neutralisierung)
- 5 Lagen Whatmanpapier mit Blot III anfeuchten

- Frischhaltefolie faltenfrei mit Kreppband auf der Tischplatte spannen
- Agarosegel luftblasenfrei mit der Oberseite nach unten auf die Folie legen
- Nylonmembran luftblasenfrei auf das Gel legen
- das mit Blot III angefeuchtete Whatmanpapier luftblasenfrei auf die Membran legen
- ca. 5 cm hohen Stapel Einmal-Papierhandtücher auf das Whatmanpapier legen
- Stapel mit einer Platte und einem Gewicht bedecken
- DNA-Transfer auf die Membran ü/N bei RT
- Quervernetzung der Membran: 3-5 min unter UV-Licht ($\lambda=302$ nm) oder 1 h bei 80 °C backen
- Membran anschließend zur Hybridisierung einsetzen

7.4 Prähybridisierung und Hybridisierung

- Hybridisierungszylinder mit bidest. H₂O füllen, Nylonmembran mit der DNA-Seite nach innen in den Hybridisierungszylinder überführen, H₂O abgießen
- 20 ml Prähybridisierungslösung/100 cm² Membran zugeben
- mindestens 2 h bei 68 °C inkubieren (Rollvorrichtung)
- markierte Sonde zu 6 ml DIG-Prähybridisierungslösung geben und 10-15 min bei 98 °C denaturieren
- Prähybridisierungslösung abgießen und sofort Hybridisierungslösung zugeben
- ü/N bei 68 °C im Hybridisierungsofen inkubieren (Rollvorrichtung)

7.5 Immunologischer Nachweis

- Hybridisierungslösung abgießen und zur Wiederverwendung bei -20 °C lagern
- Membran 2 x 5 min bei RT mit 100 ml Wash I waschen (Rollvorrichtung), Lösung abgießen
- Membran 2 x 15 min bei 68 °C mit 100 ml Wash II waschen (Rollvorrichtung), Lösung abgießen
- Membran mit der Pinzette vorsichtig in eine Kunststoffschale überführen, die während der folgenden Schritte bei RT auf einen Schüttler gestellt wird
- 50 ml DIG I zugeben und 5 min inkubieren, Lösung abgießen
- 100 ml DIG II zugeben und 30 min inkubieren, Lösung abgießen

- 50 ml DIG I zugeben und 1 min inkubieren, Lösung abgießen
- 20 ml DIG II mit Antikörperkonjugat (1:10000) zugeben und 30 min inkubieren, Lösung abgießen
- 2x 15 min in 100 ml DIG-Waschpuffer inkubieren, Lösung abgießen
- Membran 5 min in 50 ml DIG II äquilibrieren, Lösung abgießen
- Membran in 20 ml DIG III mit 100 µl NBT/BCIP im Dunkeln färben
- zum Stoppen der Färbung Lösung gegen bidest. H₂O austauschen
- Membran trocknen und lichtgeschützt aufbewahren

8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

8.1 PCR mit DNA als Template

(Mullis *et al.* 1986)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht unter geeigneten Puffer- und Temperaturbedingungen sowie Verwendung der Taq DNA-Polymerase und spezifischer Oligonukleotid-Primer die *in vitro*-Amplifikation von DNA-Abschnitten. Ein dem Anfang und Ende des zu amplifizierenden DNA-Stranges komplementäres Primer-Paar mit gegenläufiger Syntheserichtung wird an die hitze-denaturierte Template-DNA angelagert. Die Taq-DNA-Polymerase synthetisiert unter Einbau von dNTPs den komplementären DNA-Strang auf. Durch 25-40 Wiederholungen des Zyklus „Denaturierung → Primer-Annealing → Primer-Extension“ wird eine Amplifikation des DNA-Abschnittes um den Faktor 10⁷ bis 10¹⁰ erreicht.

Als Template-DNA setzt man ungespaltene, verdünnte Gesamt-DNA oder hydrolysierte, 1:100 mit bidest. H₂O verdünnte Plasmid-DNA ein.

Die PCR mit 1:20 verdünnter *Cmm*-Gesamt-DNA als Template wird zum Nachweis der Plasmide pCM1 (cel-Primer) und pCM2 (pat-Primer), als auch zum Nachweis der Komplementation von *Cmm*-Mutanten (Neo-pDM-Primer) eingesetzt.

Reaktionsansatz (200 µl):	10 x PCR-Puffer	20 µl
	10 mM MgCl ₂	10 µl
	10 mM dNTP-Mix	10 µl
	10 mM Primer 1 + 2	je 5 µl
	DMSO	10 µl
	Template-DNA	10 µl
	bidest. H ₂ O	126 µl
	Taq-Polymerase	4 µl

- Reaktionsansatz auf die 8 Tubes eines PCR-Stripes aliquotieren
- jeden Ansatz mit 2 Tropfen PCR-Öl überschichten
- Reaktionsansätze in den Robocycler Gradient 96 stellen
- Einstellung des Standard-Programmes:

Zyklen	Dauer	Temperatur
1	5 min	94 °C
35	1 min	94 °C
	1,5 min	Annealingtemperatur
	1,5 min	72 °C
1	10 min	72 °C

- Charakterisierung der PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese
- Lagerung der PCR-Produkte bei -2 °C

8.2 PCR mit ganzen Zellen als Template

Reaktionansatz (200 µl):	10x PCR-Puffer	20 µl
	10 mM MgCl ₂	10 µl
	10 mM dNTP-Mix	10 µl
	DMSO	10 µl
	Primer 1 + 2	je 5 µl
	bidest. H ₂ O	136 µl
	Taq-Polymerase	4 µl

- Reaktionsansatz auf die 8 Tubes eines PCR-Stripes aliquotieren
- wenig Zellmaterial mit gelber Spitze von der Agarplatte abnehmen und im Reaktionsansatz resuspendieren
- Reaktionsansatz mit 2 Tropfen PCR-Öl überschichten und in den Robocycler Gradient 96 einsetzen
- Amplifikation nach dem Standard-Programm (siehe 8.1.) mit Ausnahme eines von 1 min auf 10 min verlängerten 1. Denaturierungsschrittes

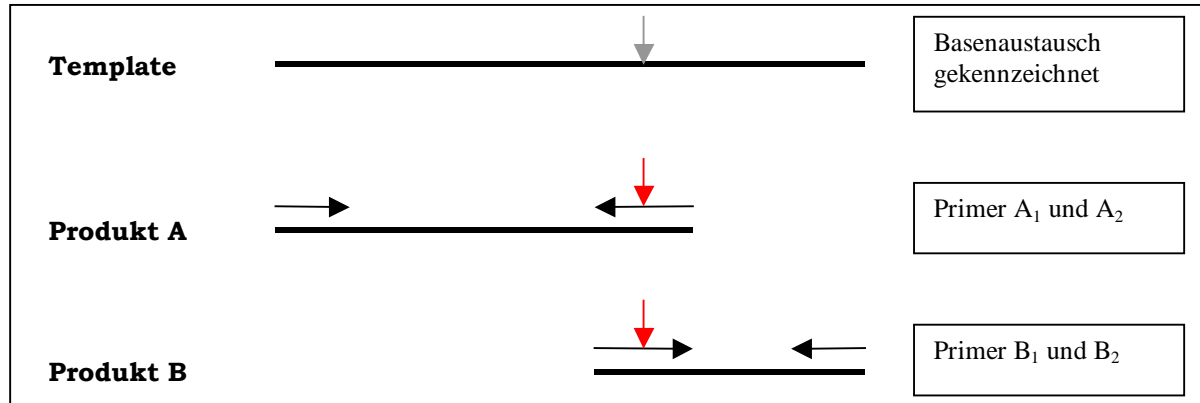
8.3 PCR zur Synthese von DNA-Abschnitten für die ortsspezifische Mutagenese (gene splicing by overlapped extension/gene SOEing)

(Horton 1995)

Unter dem so genannten "gene SOEing" hat eine Technik in der Molekularbiologie Einzug gefunden, die durch dreistufige PCR den gezielten Austausch eines

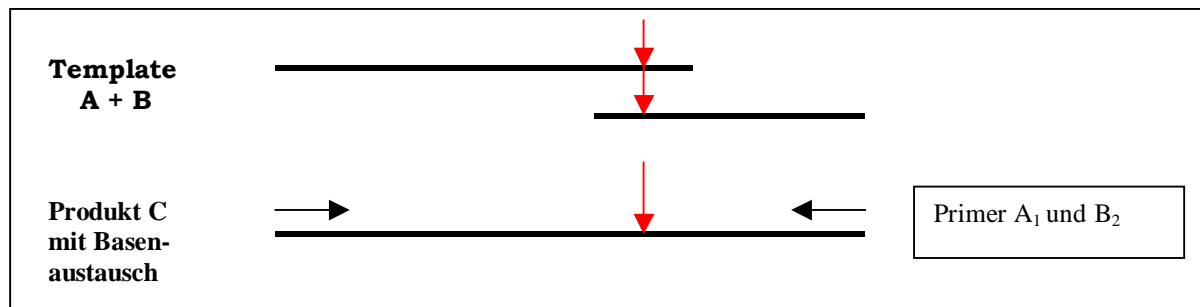
Nukleotids der Originalsequenz bewirkt. Die Methode kann zur Mutagenese durch veränderte Aminosäuresequenz eines Gens oder zum Eliminieren von Restriktionsschnittstellen eingesetzt werden.

1. und 2. Reaktion:



Reaktion 1 und 2 verwenden jeweils einen Primer mit Austausch des Nukleotids (A₂ bzw. der zu A₂ komplementäre Primer B₁ mit entgegengesetzter Syntheserichtung). Es resultieren 2 PCR-Produkte mit jeweils einem Basenaustausch an der gewünschten Stelle.

3. Reaktion:



Bei der 3. Reaktion dient ein Gemisch aus beiden PCR-Produkten als Template. Die äußeren Primer A₁ und B₂ dienen als Synthesestart für ein langes PCR-Produkt mit gewünschtem Nukleotidaustausch.

Für diese PCR-Reaktion ist die üblicherweise verwendete Taq-Polymerase ungeeignet, da sie nicht über eine Proofreading-Aktivität verfügt und somit Fehler in das synthetisierte Produkt eingebaut werden können. Man verwendet hier Polymerasen mit Proofreading-Aktivität wie z. B. die Vent-DNA-Polymerase oder die ProofStart-DNA-Polymerase. Die PCR-Bedingungen entsprechen dem Standard-Programm (siehe 8.1).

9. Protein-Methoden

9.1. Überexpression von Proteinen in *E. coli*

Für die Überexpression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* sind Vektoren und Wirts-Bakterienstämme erforderlich, die optimal aufeinander abgestimmt sein müssen. Das pET-System (Studier *et al.* 1986) bedient sich eines *E. coli*-Wirtsstammes, der für eine effektive Expression des Zielproteins über ein T7 RNA Polymerase-Gen (λ DE3 lysogen) verfügt. In λ DE3-lysogenen Stämmen ist die T7 RNA Polymerase unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors. Dies ermöglicht eine basale Transkription bei nicht-induzierten Zellen und in Abwesenheit weiterer Kontrollen ist es geeignet für die Expression von vielen Genen, deren Produkte für das Wirtszellwachstum unschädlich sind.

9.2. Anzucht und Induktion

- 250 ml TBY mit 150 μ g/ml Ampicillin im Erlenmeyerkolben mit Übernachtkultur von rekombinatem pET in *E. coli* BL21(DE3) 1:100 animpfen
- Inkubation bei 37 °C im Luftschüttler bis zur OD₅₈₀ 0,6-0,7
- 50 ml der Kultur als nicht-induzierte Kontrolle in frischen Erlenmeyerkolben geben
- Induktion der restlichen Kultur mit steriler 100 mM IPTG-Lösung (Endkonzentration 0,4 mM IPTG)
- Inkubation für 2-3 h bei 37 °C im Luftschüttler
- Messung der OD₅₈₀ von induzierter und nicht-induzierter Kultur
- Zellen durch Zentrifugation bei 6000 rpm und 4 °C abernten und bei -20 °C bis zum Zellaufschluss lagern
- parallel Kontrolle der Expression im SDS-PAGE

9.3. Kompartimenttest

Der Kompartimenttest dient zur Überprüfung der Lokalisation der rekombinant exprimierten Proteine und deren eventueller Abgabe in das Kulturmedium.

- je 1 ml Probe vor und nach der Induktion entnehmen
- 3 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Kulturüberstand abgießen und für die Kontrolle im SDS-PAGE aufheben

- Pellet in 50 µl Zellysepuffer (mit 2 mg/ml Lysozym) resuspendieren
- 10 min auf Eis inkubieren
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand (periplasmatische Proteine) sammeln und für die Kontrolle im SDS-Page aufheben
- Pellet in 50 µl Waschpuffer resuspendieren
- 2 x einfrieren und auftauen
- 7 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand (cytoplasmatische Proteine) sammeln und für die Kontrolle im SDS-PAGE aufheben
- Pellet (inclusion bodies)
- je 15 µl der Überstände mit 5 µl Laemmli-Puffer mischen; Pellet direkt mit 5 µl Laemmli-Puffer resuspendieren
- Überprüfung der Fraktionen im SDS-PAGE

9.4 Zellaufschluss mit der French Pressure Cell Press und Aufreinigung mittels Ni²⁺-Affinitätschromatografie (Protino®Ni 1000 prepacked column kit)

- Zellpellet auf Eis auftauen
- Zellen in 2 ml 1x LEW-Puffer resuspendieren
- 1 mg/ml Lysozym zugeben, mischen
- 30 min auf Eis inkubieren
- Zellen in der bei 4 °C vorgekühlten 3/8-Zelle bei 900 psi aufschließen
- je nach Viskosität der Suspension 1-2 x wiederholen
- Suspension in Greinerröhrchen überführen
- 30 min bei 4 °C und 10000 rpm zentrifugieren (Rotor A8.24)
- Überstand in ein neues Röhrchen überführen
- Ni²⁺-Säulen mit 2 ml 1x LEW-Puffer äquilibrieren
- geklärtes Lysat auf die Säule geben
- Säule 2 x mit 2 ml 1xLEW-Puffer waschen
- Elution 3 x mit 1,5 ml Elutionspuffer
- Elutions-Fractionen durch SDS-PAGE überprüfen, Fraktion mit dem höchsten Proteingehalt weiterverwenden.
- Dialyse 2 x 4 h bis ü/N bei 4 °C gegen 40 mM K-P_i-Puffer

9.5 Proteinbestimmung mit BCA-Protein-Assay Reagent (Pierce)

- 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.

10. 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 Wasserstoffstoffbrücken 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 µl	30 µl
10 % APS	50 µl	17 µl
TEMED	10 µl	5 µl

- 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 Isopropanol überschichten
- nach dem Auspolymerisieren (ca. 20 min) Isopropanol 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 für den Westernblot weiterverwendet, angefärbt (Coomassie- oder Silberfärbung) oder es werden nach Coomassiefärbung Proteinbanden für weitere Präparationen aus dem Gel isoliert.

10.1 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 nahe zu farblos ist

10.2 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 in Entwickler schütteln
- kurz mit bidest. H₂O waschen (optional)
- ca. 10 min in Stopplösung auf dem Schüttler inkubieren

10.3 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 vorgeweichte Einmachhaut in einen Kunststoffrahmen einspannen und ca. 48 h trocknen

10.4 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 (Invitrogen) verwendet:

Protein	Approximate Molecular Weights (kDa)				
	Tris-Glycine	Tricine	NuPAGE® MES	NuPAGE® MOPS	NuPAGE® Tris-Acetate
Myosin	250	210	188	191	210
BSA	98	78	62	64	71
Glutamic Dehydrogenase	64	55	49	51	55
Alcohol Dehydrogenase	50	45	38	39	41
Carbonic Anhydrase	36	34	28	28	n/a
Myoglobin	30	23	18	19	n/a
Lysozyme	16	16	14	14	n/a
Aprotinin	6	7	6	n/a	n/a
Insulin, B Chain	4	4	3	n/a	n/a

11. Western-Blot

11.1 Elektroblot

- auf dem Elektroblotter in der folgenden Reihenfolge stapeln:
 - 6 Lagen Whatman-Papier, getränkt mit Puffer 1
 - 3 Lagen Whatman-Papier, getränkt in Puffer 2
 - Nitrocellulose-Membran (Optitran BA-S-85 reinforced NC)
 - SDS-Gel (zuvor 5 min in Puffer 3 gewaschen)
 - 9 Lagen Whatman-Papier, getränkt in Puffer 3
- Blotter-Oberteil mit wenig Druck oben auflegen
- Transfer 1 h bei 60 mA

11.2 Visualisierung der Proteinbanden auf der Nitrocellulose-Membran

- Membran 2-3 x mit bidest. H₂O spülen
- Membran in eine Schale geben und mit bidest. H₂O gut bedecken
- Ponceau S (1 ml/50 ml H₂O) zugeben und durch Schwenken der Schale ca. 1 min färben
- Membran kurz mit bidest. H₂O spülen
- luftblasenfrei zwischen Overhead-Folie legen und fotokopieren oder einscannen
- Entfärbung der Folie: Membran in eine Schale mit bidest. H₂O geben, 2-3 ml 1 M Tris-Base zufügen und Farbe durch Schwenken entfernen
- Membran in bidest. H₂O abspülen und für die Analyse weiterverwenden

11.3 Western-Blot-Analyse

- Nitrocellulose-Membran in eine Schale überführen
- 20 ml Blocking-Puffer zugeben
- 1 h bei RT schütteln oder ü/N bei 4 °C inkubieren
- mit 1. Antikörper (1:10000) ü/N bei 4 °C inkubieren
- 2 x 5 min mit Waschpuffer auf dem Tischschüttler inkubieren
- mit 2. Antikörper in Blocking-Puffer (1:20000) 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubieren
- 4 x 10 min mit Waschpuffer auf dem Schüttler waschen
- 30 ml Detektionspuffer mit 100 µl NBT/BCIP versetzen

- im Dunkeln bis zur gewünschten Farbentwicklung färben
- zum Abstoppen der Färbung Färbelösung gegen bidest. H₂O austauschen
- Membran zwischen Whatman-Papier trocknen und dunkel lagern

12. 2D-Gelelektrophorese

12.1. Isoelektrische Fokussierung (pH 3,5-10) und SDS-PAGE

Die isoelektrische Fokussierung ermöglicht die Trennung von Proteinen nach ihrem isoelektrischen Punkt (1. Dimension). Hydroxidionen der in der Kathodenkammer befindlichen NaOH und Protonen der in der Anodenkammer befindlichen H₃PO₄ wandern bei angelegter Spannung zum entgegengesetzten Pol und bauen mit den Ampholinen (zwitterionische Verbindungen) in der Acrylamidmatrix einen stabilen pH-Gradienten auf, wobei die pH-Spannweite von den verwendeten Ampholinen abhängt. Die aufgetragenen Proteine verteilen sich entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt und können in einer sich anschließenden SDS-PAGE in der 2. Dimension nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden. Durch die isoelektrische Fokussierung erreicht man z. B. die Trennung von gleichen Proteinen, die sich nur durch ko- bzw. posttranslationale Prozessierung unterscheiden.

- in mit Parafilm versiegelte Kapillaren 100 µl IEF-Acrylamid-Lösung füllen
- mit 5 µl bidest. H₂O überschichten.
- Wasser nach ca. 1 h abziehen und durch Lysis-Lösung ersetzen
- Stäbchen ü/N bei RT vollständig auspolymerisieren
- Parafilm entfernen
- Kapillaren in die Fokussierungsvorrichtung der Gelkammer einspannen
- Lysislösung entfernen
- max. 20 µl der Proteinprobe (in Lysislösung) auf das Acrylamid-Stäbchen auftragen
- vorsichtig mit 0,02 M NaOH überschichten
- Kathodenkammer vollständig mit NaOH füllen, Anodenkammer mit 0,01 M H₃PO₄ füllen
- Spannung (über eine Länge von 6 cm) wie folgt regeln:
 - 30 min 100 V
 - 150 min 200 V
 - 15 min 400 V

- Stäbchen nach der Fokussierung bei -20 °C einfrieren
- Stäbchen waagrecht auf das Trenngel des SDS-Polyacrylamidgels legen und SDS-PAGE wie gewohnt durchführen. Molekulargewichtsmarker mitlaufen lassen.

13. Präparation von Linolsäurehydroperoxid

(Maiorino *et al.* 1990; Graff *et al.* 1990)

- 3,5 ml Linolsäure in 70 μl Chloroform lösen, Chloroform 1-2 min evaporieren lassen
- 10,8 ml 10 mM Na-Deoxycholat-Monohydrat zugeben und 5 min rühren lassen
- mit 25,2 ml 0,142 M Na-Borat (pH 9) verdünnen
- 6,7 mg Sojabohnen-Lipoxidase (Typ IV Sigma) in 600 μl der Reaktionslösung gelöst in drei Portionen zugeben
- nach der 1. (200 μl) und 2. Zugabe (200 μl) 5 min kräftig rühren
- nach der 3. Zugabe (200 μl) 20 min kräftig rühren
- mit einer 10 ml Spritze Sep-Pack C18 Säule in der folgenden Reihenfolge waschen (1-5 ml/min) mit
 - 10 ml bidest H_2O
 - 10 ml Methanol
 - 10 ml bidest. H_2O
- Reaktionslösung auf die Säule geben
- Säule mit 50-100 ml bidest. H_2O waschen
- Linolsäurehydroperoxid mit 8 ml Methanol von der Säule eluieren
- Methanol in einer Speed-Vac-Zentrifuge evaporieren
- Linolsäurehydroperoxid mit 0,75-1 ml Methanol resuspendieren
- Gehalt einer 1:100 verdünnten Lösung spektrophotometrisch bestimmen bei 234 nm ($E_{234} = 25\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)

14. Wachstumsanalysen bei Hydroperoxid-Exposition

14.1 Agardiffusionstest mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

- 3 ml TBY-oder C-Weichagar (ggf. mit Antibiotikazugabe) mit 100 μ l einer frischen *Cmm*-Kultur auf eine TBY- oder C-Medium-Agarplatte geben (variable Endkonzentration OD₅₈₀ 0,1-1,0) und verteilen
- ein steriles, mit 5 μ l 20 % Hydroperoxidlösung getränktes Plättchen Whatman-Papier (\varnothing 6 mm) zentral auflegen
- Inkubation 2 Tage bei 25-28 °C
- Ausmessen des Hemmhof-Durchmessers

14.2 Wachstumsanalyse von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* bei Hydroperoxid-Exposition

- eine frische *Cmm*-Kultur in C-Flüssigmedium (ggf. mit Antibiotika-Zugabe) auf eine Start-OD₅₈₀ 0,1 zurückverdünnen
- zu 20 ml vorbereiteter Flüssigkultur Hydroperoxide zugeben (Endkonzentration 0,5 mM)
- sofort Messung der OD₅₈₀
- Inkubation bei 26 °C für 24 h im Luftschüttler
- Messung der OD₅₈₀ über einen Zeitraum von 24 h

15. Messung der Peroxidase-Aktivität (FOX-Test 1)

(Wolff 1994)

Die FOX-Methode (Ferrous oxidation with xylenol orange) ist extrem sensitiv und wird angewendet zur Messung von wasserlöslichen Hydroperoxiden in geringer Konzentration (FOX 1), bzw. zur Messung von Hydroperoxiden in der Lipidphase (FOX 2).

Mit jeder frisch angesetzten Xylenol-Orange-Lösung muss eine Standardkurve erstellt werden:

- 20 μ l Ansatz der entsprechenden Peroxid-Verdünnungen (0-250 μ M/Ansatz) in K-P_i-Puffer in eine 1 cm Küvette geben
- 1000 μ l Xylenol-Orange-Lösung zugeben
- 5-15 min Reaktionszeit (je nach eingesetztem Hydroperoxid)
- Messung der Extinktion bei 560 nm (Reaktionszeit muss genau (!) eingehalten werden)

Die optimale Reaktionszeit für jedes Hydroperoxid muß durch die Kinetikmessung ermittelt werden und ist gekennzeichnet durch linearen Kurvenverlauf.

Für die Messung der Peroxidase-Aktivität muß vor jedem Ansatz ein Peroxid-DTT Mix frisch hergestellt werden:

96 µl	K-P _i -Puffer
2 µl	50 mM Peroxid (= 200 µM im Ansatz)
2 µl	100 mM DTT (= 400 µM im Ansatz)

Das Enzym ist vor der Reaktion mit K-P_i-Puffer so zu verdünnen, dass ein „glattes“ µl-Volumen eingesetzt werden kann. Für die Ansätze ohne DTT wird das Volumen entsprechend mit K-P_i-Puffer aufgefüllt.

Beispiel eines 20 µl Reaktionsansatzes, wenn 2 µl Enzym (Prx) eingesetzt werden muss:

	Reaktionsansatz	
	20 µl Ansatz	Mastermix (6x)
K-P _i -Puffer	12 µl	72 µl
Peroxid-DTT-Mix	4 µl	24 µl
X µM Prx	4 µl	24 µl

Wenn die Enzym-Kinetik in Gegenwart eines weiteren Enzyms (z.B. Trx) gemessen werden soll, setzt sich der 20 µl Ansatz analog zusammen:

	Reaktionsansatz		Blindwert	
	20 µl Ansatz	Mastermix(6x)	20 µl Ansatz	Mastermix(6x)
K-P _i -Puffer	8 µl	48 µl	12 µl	72 µl
X µM Trx	4 µl	24 µl	-	-
Peroxid-DTT-Mix	4 µl	24 µl	4 µl	24 µl
X µM Prx	4 µl	24 µl	4 µl	24 µl

(1. und 2. Enzym (Prx bzw. Trx) werden in gleichem Verhältnis eingesetzt.)

- nach 0, 2, 4, 6, 8 und 10 min jeweils 20 µl Reaktionsansatz in eine 1 cm Küvette überführen
- 1000 µl Xylenol-Orange Lösung zugeben
- 5-15 min Reaktionszeit (je nach eingesetztem Hydroperoxid)
- Messung der Extinktion bei 560 nm

16. Methoden zur Analyse der Pathogenität von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Als Testsystem für die Virulenz von *Cmm* diente in dieser Arbeit die Tomatenpflanze *Solanum lycopersicum* (Mill.) cv. MoneyMaker.

16.1 Petiolusinfektion

(van Steekelenburg 1985, modifiziert)

- Aussaat und Anzucht der Tomatenpflanzen in autoklavierter Erde
- Vereinzeln der Pflanzen im 2-Blattstadium (ca. 2 Wochen nach Aussaat) in Pflanztöpfe (Ø 12 cm)
- Infektion der Tomatenpflanzen im 5-6-Blattstadium durch Abschneiden des ersten Fiederblattes mit einem sterilen Skalpell und Auftrag von *Cmm*-Kulturmaterial mit einer gelben Pipettenspitze auf die Schnittstelle
- Anzucht der Tomatenpflanzen im Pflanzenraum bei 50-60 % rel. Luftfeuchtigkeit; Tag-Nacht-Rhythmus bei 25 °C/19 °C (Tag 16 h bei 12000 Lux durch Fluora-77-Lampen, Fa. Osram; Nacht 8 h im Dunkeln)
- tägliche Protokollierung der Welkesymptome

16.2 Wurzelinfektion

- Aussaat und Anzucht der Tomatenpflanzen in autoklavierter Erde
- Pflanzen im 2-Blattstadium (ca. 2 Wochen nach der Aussaat) der Pflanzschale entnehmen und die anhaftende Erde entfernen
- Bakteriensuspension (Kulturmaterial einer frischen *Cmm*-Agarplatte in sterilem Leitungswasser resuspendiert und auf OD₅₈₀ 8-8,5 eingestellt) à 1 ml in Eppendorfgefäßen aliquotieren
- jeweils 4-5 Pflanzen für 15-20 min in der Bakteriensuspension inkubieren
- Infizierte Pflanzen einzeln in Pflanztöpfe (Ø 6 cm)
- Anzucht der Tomatenpflanzen im Pflanzenraum bei 50-60 % rel. Luftfeuchtigkeit; Tag-Nacht-Rhythmus bei 25 °C/19 °C (Tag 16 h bei 12000 Lux durch Fluora-77-Lampen, Fa. Osram; Nacht 8 h im Dunkeln)
- tägliche Protokollierung der Welkesymptome

16.3 Welkeindex und Welkeverlauf

(Bermpohl 1990)

Der Welkeindex (WI) wird nach Serieninfektion (mindestens 32 Pflanzen) durch tägliche Beurteilung der Welkesymptome über einen Zeitraum von 28 Tagen bestimmt. Er gibt an, nach wieviel Tagen 50 % der infizierten Pflanzen deutliche Welkesymptome aufweisen. Die Beurteilung der Pflanzen erfolgt nach einem 5-stufigen Schema:

keinerlei Welkeanzeichen	-
beginnende Welke (schwaches Einrollen eines Fiederblattes)	(+)
deutliche Welke (Welke an mindestens 1 Fiederblatt)	+
starke Welke (Welke an mind. 2/3 der Fiederblätter)	++
abgestorbene Pflanze (keine Photosynthese mehr)	tot

16.4 Größenbestimmung der Pflanzen

28 Tage nach Infektion werden die Tomatenpflanzen direkt oberhalb der Erde mit einer sterilen Schere abgeschnitten und die Länge der Sprossachse gemessen.

16.5. Gewichtsbestimmung der Pflanzen

16.5.1 Frischgewichtsbestimmung

28 Tage nach Infektion werden die Tomatenpflanzen direkt oberhalb der Erde mit einer sterilen Schere abgeschnitten und das Frischgewicht durch Auswiegen bestimmt.

16.5.2 Trockengewichtsbestimmung

28 Tage nach Infektion werden die Tomatenpflanzen direkt oberhalb der Erde mit einer sterilen Schere abgeschnitten und in Einmal-Papierhandtücher eingewickelt. Die Inkubation der Pflanzen erfolgt bei 100 °C im Trockenschrank bis zum Erreichen der Gewichtskonstanz. Das Trockengewicht wird durch Wiegen bestimmt.

16.6. Kolonisationstest

16.6.1 Reisolierung von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* aus Pflanzenhomogenat

- Mörser und Pistill mit 100 % Ethanol durch Abflammen sterilisieren
- Pflanze direkt über der Erde mit einer sterilen Schere abschneiden, wiegen, die Länge der Sprossachse messen, in kleinen Stücke direkt in den Mörser geben
- zerkleinerte Pflanze mit flüssigem Stickstoff bedecken und mit dem Pistill zu einer homogenen Masse zerkleinern
- 1 Vol. PS-Puffer entsprechend dem Frischgewicht zugeben (1 ml PS/1 g Frischgewicht)
- Mörsern, bis eine homogene Suspension entstanden ist
- Anlegen von Verdünnungsreihen; 100 µl der ausgewählten Verdünnungsstufen auf TBY- oder C-Medium (ggf. mit Antibiotikumzusatz) ausplattieren
- 3-5 Tage bei 25-28 °C inkubieren
- Ermittlung des gewichteten Mittels der Koloniezahl aller Verdünnungsstufen und Berechnung des Bakterientiters bezogen auf 1 g Frischgewicht

16.6.2 Reisolierung von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* aus Xylemsaft

- Tomatenpflanzen gut wässern
- Pflanzen ca. 1 cm oberhalb der Erde mit einer sterilen Schere abschneiden
- 10 µl des austretenden Xylemsaftes mit Eppendorfpipette abnehmen und eine Verdünnungsreihe anlegen
- je 100 µl der entsprechenden Verdünnungsstufen auf TBY- oder C-Medium ausplattieren
- 3-5 Tage bei 25-28 °C inkubieren
- Ermittlung des gewichteten Mittels der Koloniezahl aller Verdünnungsstufen und Berechnung des Bakterientiters bezogen auf 1 ml Xylemsaft

16.7. Hypersensitive Reaktion (HR) auf *Mirabilis jalapa*

- *Mirabilis jalapa* bis zu einer Größe von 30-40 cm anziehen
- Bakterien einer frischen *Cmm*-Agarplatte in PS-Puffer resuspendieren und auf OD₅₈₀ 8-8,5 einstellen
- Bakteriensuspension mittels einer sterilen 2 ml Einweg-Spritze (ohne Nadel) in die Blattunterseite ohne Verletzen des Blattes infiltrieren
- 2-4 Tage bei RT inkubieren und auf Nekrosen an den Infiltrationsstellen überprüfen

D. Ergebnisse

Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen waren die im Rahmen eines Shotgun-Sequenzierungsprojektes des Chromosoms von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Engemann 2001; Burger *et al.* 2005) erhaltenen Sequenzdaten und die durch Datenbankabfragen ermittelten Ähnlichkeiten zu Proteinen. Exemplarisch für einige Gene, die für Proteine mit einer möglichen Funktion in der Bakterien-Pflanzen-Interaktion kodieren, wurde das für „Bacterioferritin comigratory protein“ kodierende Gen *bcp* für die Erzeugung einer *Cmm*-Mutante und die weitergehende Charakterisierung *in vivo*, *in planta* und im biochemischen Test ausgewählt. Als Mitglied der Familie der Alkylhydroperoxid-Reduktase C/Thiol-spezifische antioxidative Proteine (AhpC/TSA) wird für „Bacterioferritin comigratory protein“ (Bcp) eine Bedeutung als Schutzfaktor beim oxidativen Stress postuliert (Wang *et al.* 2005; Comtois *et al.* 2003).

1. „Bacterioferritin comigratory protein“

Das Bcp („Bacterioferritin comigratory protein“) kodierende, 480 bp umfassende Gen *bcp* (open reading frame CMM_1062 des Chromosoms) besitzt einen GC-Gehalt von 70,0 %, der dem durch das Shotgun-Projekt ermittelten durchschnittlichen GC-Gehalt von 72,8 % (Engemann 2001) gut entspricht. Das Genprodukt Bcp besteht aus 159 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 17211,5 Da. Da die Überprüfung der *bcp*-Sequenz mit dem Programm SignalP (von Heijne 1986) keine Signalsequenzen mit Spaltstelle vorhersagte, ist das *bcp*-Genprodukt als nicht-sekretiertes und damit cytoplasmatisches Protein anzusehen. Bcp ist Mitglied der ubiquitär vorkommenden Protein-Familie der AhpC/TSA (Alkylhydroperoxid-Reduktasen C/Thiol specific antioxidants), die auch als Peroxiredoxine bezeichnet werden. Durch BLAST-Abfragen ermittelte Ähnlichkeiten der Proteinsequenz von Bcp ergaben wie erwartet die größte Übereinstimmung mit Bcp von *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (98 % Identität), sowie mit Bcp des früher zum Genus *Clavibacter* gehörigen, reklassifizierten Stammes *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Evtushenko *et al.* 2000) mit zu 69 % identischer Proteinsequenz (77 % Ähnlichkeit). Weitere gute Übereinstimmungen bestehen zu *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (73 % Ähnlichkeit), *Mycobacterium tuberculosis* (72 % Ähnlichkeit) und *Streptomyces avermitilis* (75 % Ähnlichkeit) als Vertreter der Actinomyceten. Die Protein-Ähnlichkeiten zu Gram-negativen Bakterien liegen im Bereich von 50-65 %. Als Beispiele seien *Yersinia ruckeri* (51 %

Identität), *Yersinia pestis* (50 % Identität), *E. coli* (49 % Identität) und *Xylella fastidiosa* (35 % Identität, 53 % Ähnlichkeit) genannt.

Bcp hat zu Bcp-homologen Proteinen von Archaeobakterien Ähnlichkeiten von etwa 55-60 %. Beispiele sind *Methanococcoides burtonii* (39 % Identität) und *Halobacterium* sp. (43 % Identität) mit jeweils 60 % Ähnlichkeit. Weitere Homologe sind die in Pflanzen vorkommenden Peroxiredoxin Q (PrxQ), „Thiol-specific-antioxidant“ (TSA) in Hefen und Peroxiredoxin 2 (Prx2) in Tieren.

Bakterielle Bcp-Homologe sind in der Regel 155-160 Aminosäuren lang. Pflanzliche Homologe dieses Proteins besitzen N-terminal eine um ca. 30-60 Aminosäuren lange verlängerte Sequenz, die jedoch nicht abgespalten wird. Tierische und menschliche Bcp-Homologe weisen eine um etwa 40 Aminosäuren verlängerte Sequenz im C-terminalen Bereich auf (siehe Anhang 2.1).

Kennzeichnend für Bcp von *Cmm* ist ein Cystein-Rest an Position 49 sowie ein weiteres Cystein an Position 54 (in *E. coli* Cys₄₆ bzw. Cys₅₁). Diese beiden Cysteine werden als katalytisches Zentrum von „Bacterioferritin comigratory protein“ angesehen (Jeong *et al.* 2000; Hofmann *et al.* 2002). Das erste Cystein an Position 45-50 (bei den genannten pflanzlichen Vertretern an Position 111 bzw. 80) tritt ausnahmslos bei allen Bcp-Homologen auf (Anhang 2.1). Fast alle bakteriellen Bcp mit Ausnahme des Genproduktes von *Xylella fastidiosa* sowie PrxQ besitzen im Bereich von Aminosäure 50-55 einen weiteren konservierten Cystein-Rest. Bei den tierischen Homologen Prx2 ist das zweite Cystein in der Aminosäuresequenz im Abstand von 18 Aminosäuren lokalisiert, ein drittes Cystein findet man bei PrxQ im N-terminalen Bereich. Das Vorhandensein des ersten Cystein-Restes bei allen Bcp-homologen Proteinen lässt vermuten, dass dieses Cystein für die Funktion dieser Peroxiredoxine, d. h. die Entgiftung von Hydroperoxiden, essentiell ist. Auffällig sind ebenfalls die konservierten Aminosäurereste Leu₂₈, Phe₄₀, Pro₄₂, Thr₄₆, Ser₇₄ und Asp₇₆ (Aminosäureposition jeweils bezogen auf Bcp von *Cmm*) bei allen verglichenen Bcp-Homologen.

1.1 Konstruktion des Mutageneseplasmides pJE951

Um zu untersuchen, ob das Gen *bcp* eine Auswirkung auf die Bakterien-Pflanzen-Interaktion zwischen *Cmm* und der Tomatenpflanze hat, wurde das Gen durch gezielte Mutagenese inaktiviert und somit eine *bcp*-Mutante konstruiert. Ausgehend vom Shotgun-Sequenzierungs-Plasmid rscmm95, das das *bcp*-Gen in intakter Form enthält, wurde die in Abbildung 6 dargestellte Klonierungsstrategie durchgeführt.

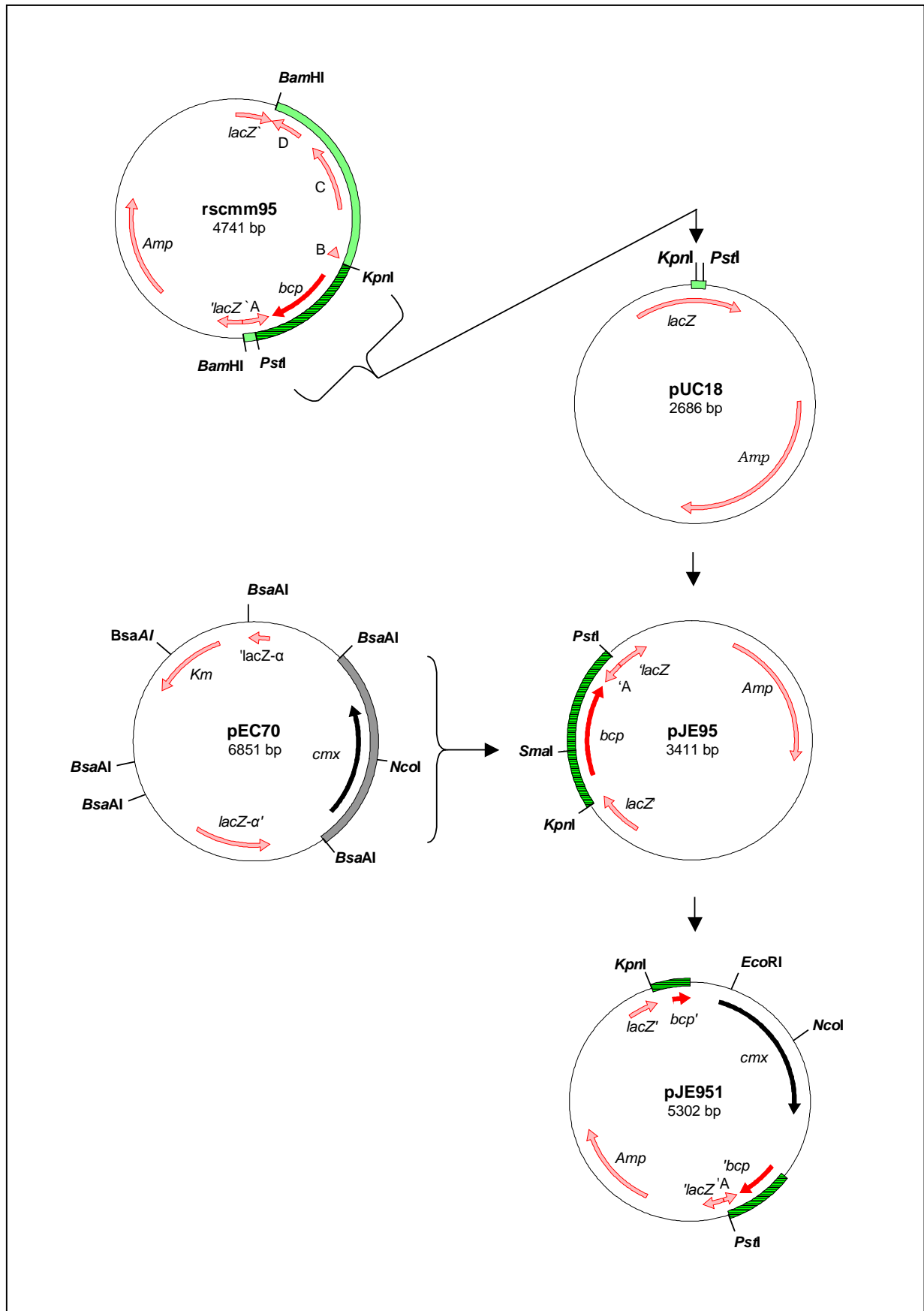


Abb. 6 Konstruktion des Plasmides pJE951 zur Erzeugung einer chromosomalen *bcp*-Mutante.

Durch Subklonierung eines 752 bp großen *KpnI/PstI*-Fragmentes in den mit *KpnI/PstI* linearisierten Vektor pUC18 wurde das Plasmid pJE95 erhalten, das eine singuläre *SmaI*-Schnittstelle an Position 142, d. h. 3 Basenpaare stromaufwärts des putativen reaktiven Cystein₄₉ aufweist, die zur Insertion einer Antibiotika-Resistenzkassette genutzt werden kann. Das Plasmid pJE95 enthält das intakte, 480 bp große *bcp*-Gen inklusive 130 bp langer Promotorregion. Mittels Insertion eines 1891 bp *BsaAI*-Fragmentes aus pEC70 mit intaktem Chloramphenicol-Resistenzgen (*cmx*) in das mit *SmaI* hydrolysierte Plasmid pJE95 wurde das *bcp*-Gen unterbrochen (pJE951). Die *cmx*-Resistenzkassette bewirkt neben der Unterbrechung des *bcp*-Gens eine gleichzeitige Änderung des Leserasters in dem sich anschließenden terminalen Genbereich. Das Plasmid pJE951 wurde durch Transformation von *E. coli* JM109 (*dam*⁺, *dcm*⁺) in methylierter und nachfolgend in *E. coli* WA337 (*dam*⁻, *dcm*⁻) in unmethylierter Form erhalten. Das Einbringen des unmethylierten Plasmides gewährleistet eine größere Überlebensdauer innerhalb der *Cmm*-Zelle durch Umgehung von Restriktionssystemen.

Vor der Durchführung der Elektroporation von pUC-Derivaten nach *Cmm* NCPPB382 wurde eine alkalische Denaturierung durchgeführt, da durch einzelsträngig vorliegende DNA die DNA-Reparatursysteme und damit die homologe Rekombinationsfrequenz positiv beeinflusst werden. Alle Vektoren der pUC-Familie sind in *Cmm* nicht zur Replikation fähig und gehen daher als sogenannte „suicide“-Vektoren verloren. Über Crossover besteht somit die Möglichkeit zum „gene replacement“, d. h. den Austausch von Genen oder Genbereichen innerhalb des Bakterienchromosoms. Mutanten entstehen lediglich durch ein Doppel-Crossover, ein einzelnes Crossover führt zur Integration des kompletten Mutageneseplasmides. Der Nachweis, ob *Cmm*-Klone, die nach der Elektroporation durch Crossover eine Resistenz erworben haben, als echte („gene replacement“) Mutanten anzusehen sind, kann mittels Southern Hybridisierung hydrolysierter Gesamt-DNA von resistenten *Cmm*-Transformanden überprüft werden.

1.2 Inaktivierung des *bcp*-Gens durch Insertionsmutagenese

Nach Elektroporation des denaturierten Mutageneseplasmides pJE951 in elektrokompetente Zellen von *Cmm* NCPPB382 wurden durch Selektion auf Chloramphenicolresistenz (Cm^R) 35 Cm-resistente Kolonien erhalten. Bei diesen Kolonien war zu unterscheiden, ob die erworbene Resistenz durch Integration des gesamten Plasmides, d. h. durch ein einzelnes Crossover, oder jedoch ein entsprechend selteneres zweites Crossover stattgefunden hat, bei dem Genbereiche

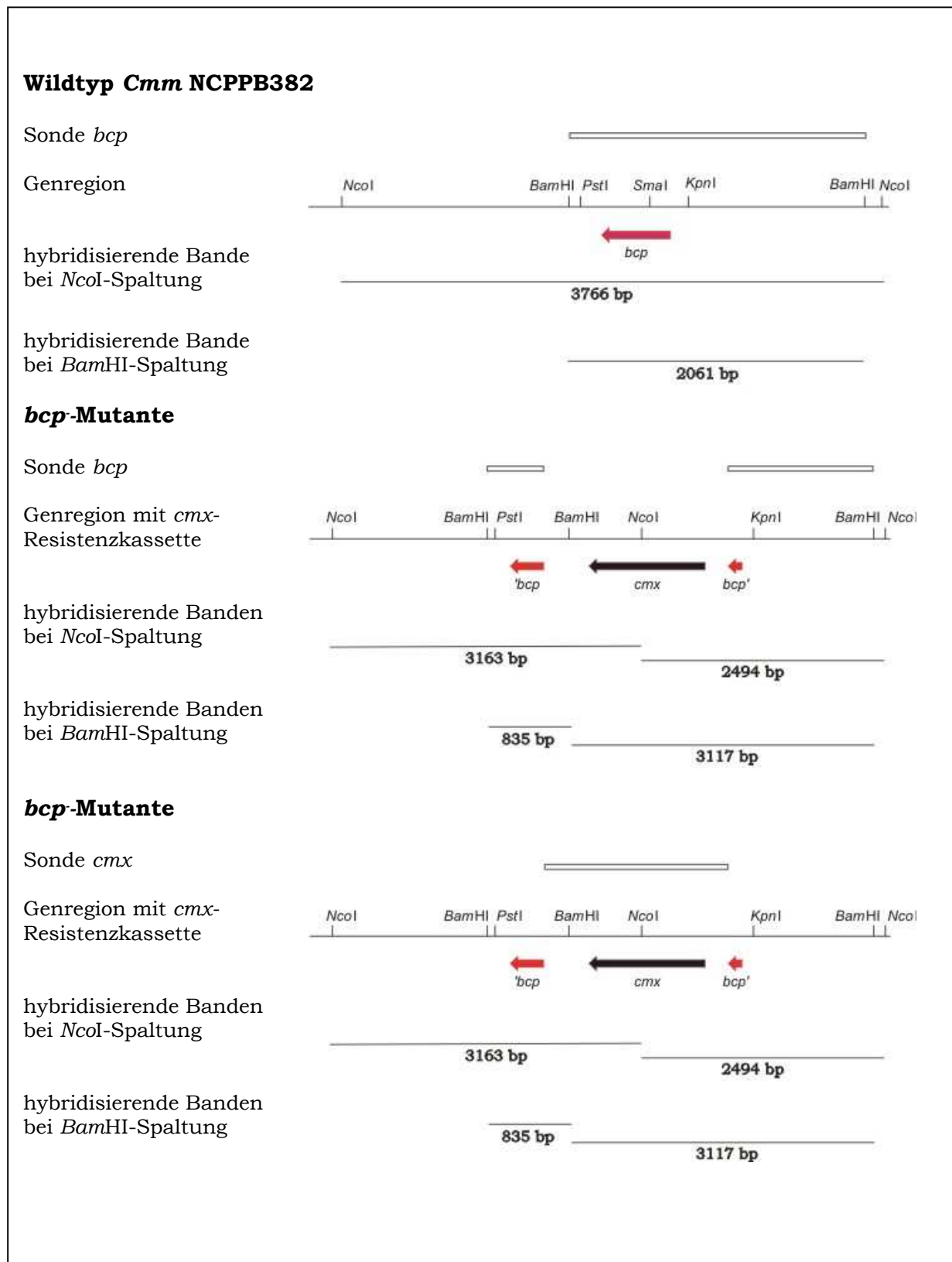


Abb. 7 Hybridisierungsbandenmuster von *NcoI*- und *BamHI*-gespaltener Gesamt-DNA der *bcp*-Mutante mit den Sonden *bcp* und *cmx*.

ausgetauscht werden („gene replacement“). Das Plasmid, welches hierbei eine Excision erfährt, trägt nun das Wildtypgen des Chromosoms und geht verloren. Bei dem letzteren Fall dürfen weder das intakte Wildtypgen, noch Plasmidanteile in der zu überprüfenden Gesamt-DNA nachweisbar sein. Der korrekte Austausch des Wildtypgens gegen das inaktivierte *bcp*-Gen wurde durch Southern Hybridisierung gespaltener Gesamt-DNA der erhaltenen Cm-resistenten *Cmm*-Klone mit verschiedenen, durch Random Priming mit DIG-11-dUTP-markierten, Sonden überprüft. Als potentiell falsch sind alle bei der Hybridisierung mit einer pUC-Sonde ein Signal gebenden Klone anzusehen. Bei der Hybridisierung mit einer spezifischen, gegen das Zielgen *bcp* gerichteten Sonde (2,06 kb *Bam*HI-Fragment aus rscmm95), sowie mit einer gegen das Chloramphenicolresistenzgen gerichteten *cmx*-Sonde (1,89 kb *Bsa*AI-Fragment aus pEC70) sind korrekte Mutanten durch ihr spezifisches Bandenmuster von Singlecrossover-Mutanten und durch illegitime Rekombination entstandene Mutanten zu unterscheiden. Letztere besitzen als Folge ihrer unterschiedlichen Plasmidintegration weitere Hybridisierungsbanden variabler Größe. Für die Identifikation der *bcp*-Mutante wurde *Bam*HI- und *Nco*I-gespaltene Gesamt-DNA zur Southern Hybridisierung eingesetzt.

Wie in Abbildung 7 dargestellt, muss eine echte *bcp*-Mutante bei Hybridisierung mit der *bcp*-Sonde als auch mit der *cmx*-Sonde bei *Bam*HI-gespaltener DNA dieselben Signale von 3117 bp und 835 bp Größe zeigen. Die entsprechenden hybridisierenden Banden bei *Nco*I-gespaltener Gesamt-DNA besitzen eine Größe von 2494 bp und 3163 bp.

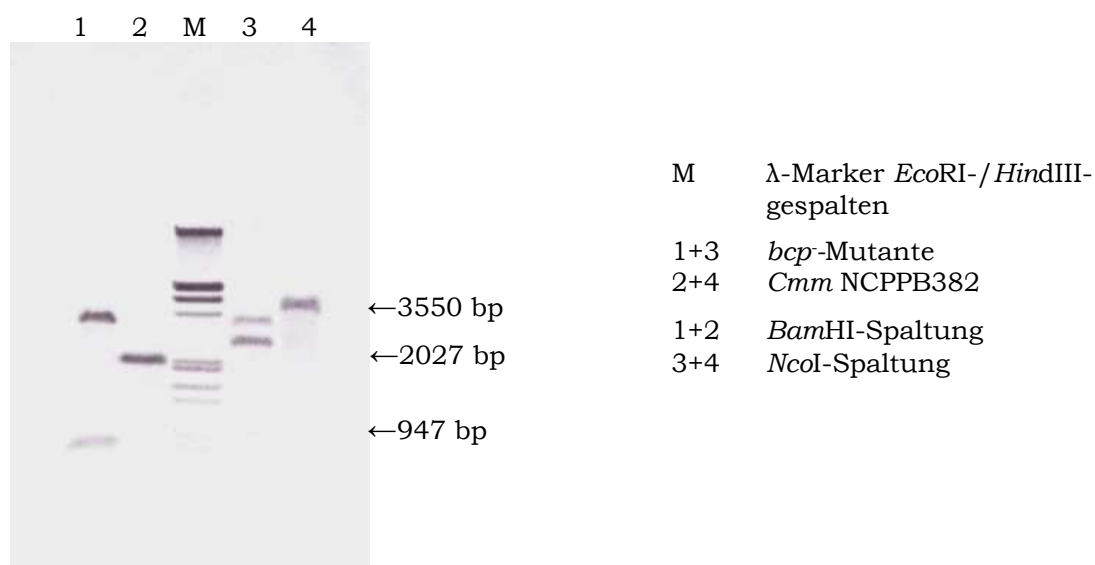


Abb. 8 Southern Hybridisierung *Bam*HI- und *Nco*I-gespaltener Gesamt-DNA der *bcp*-Mutante.

Von allen untersuchten Klonen zeigte nur ein einziger Klon kein Hybridisierungssignal mit der pUC-Sonde und ist damit als potentiell „richtig“ anzusehen. Nach Hybridisierung der hydrolysierten Gesamt-DNA dieses Klones mit der Zielsonde *bcp* sowie mit der *cmx*-Sonde wurden Banden mit den erwarteten Größen (Abb. 8) detektiert, sodass der Nachweis einer echten *bcp*-Mutante erbracht wurde.

1.3 Nachweis der Pathogenitätsfaktoren *celA* und *pat-1*

Cmm NCPPB382 besitzt die beiden endogenen Plasmide pCM1 (27,5 kb) und pCM2 (72 kb) mit den pathogenitäts-relevanten Faktoren *celA* bzw. *pat-1*. Der Erhalt beider Plasmide ist für eine vollständige Symptomausprägung der bakteriellen Welke essentiell. In früheren Untersuchungen wurde festgestellt, dass bei Erhöhung der Umgebungstemperatur auf über 30 °C der Verlust eines oder aber auch beider Plasmide resultieren kann. Diese Eigenschaft führte zur Erzeugung der Curingderivate CMM100 (plasmidfrei), CMM101 (mit pCM1) und CMM102 (mit pCM2), die keinerlei oder lediglich eine reduzierte Welke bei der Tomatenpflanze auslösen (Meletzus *et al.* 1993).

Auch bei der Elektroporation kompetenter *Cmm* NCPPB382-Zellen kann es zum Verlust eines oder beider Plasmide kommen, wobei in der Regel das größere Plasmid pCM2 verloren geht. Um in anschließenden Pflanzentests die erhaltene Mutante mit dem korrekten *Cmm*-Kontrollstamm vergleichen zu können, ist daher der Nachweis zu erbringen, ob die Mutante noch im Besitz eines oder beider endogenen Plasmide ist.

Die Detektion der *Cmm*-Plasmide durch Southern Hybridisierung ist mit Hilfe der auf ihnen lokalisierten Gene *celA* bzw. *pat-1* möglich. Diese liegen kloniert in den Plasmiden pHJ-1 bzw. pSVB30:B7a vor (Anhang 3.2). Durch *EcoRI*/*HindIII*-Spaltung von pHJ-1 wurde ein 3,2 kb großes Fragment für die Herstellung einer *celA*-Sonde, bzw. ein 0,8 kb und ein 3,05 kb großes Fragment aus pSVB30:B7a für die Herstellung einer *pat-1*-Sonde erhalten. Die Hybridisierung der markierten Sonden erfolgte mit *BglII*-gespaltener Gesamt-DNA der *bcp*-Mutante sowie mit *BglII*-gespaltener Gesamt-DNA von *Cmm* NCPPB382, CMM101 und CMM100 als Kontrollen. Abbildung 9A zeigt die Hybridisierung der hydrolysierten Gesamt-DNAs mit der *celA*-Sonde. Mit Ausnahme des plasmidfreien Curing-Derivates CMM100 ist die 3,2 kb *celA*-Bande, die die Anwesenheit des kleinen Plasmides pCM1 in den *Cmm*-Stämmen nachweist, in allen Spuren sichtbar.

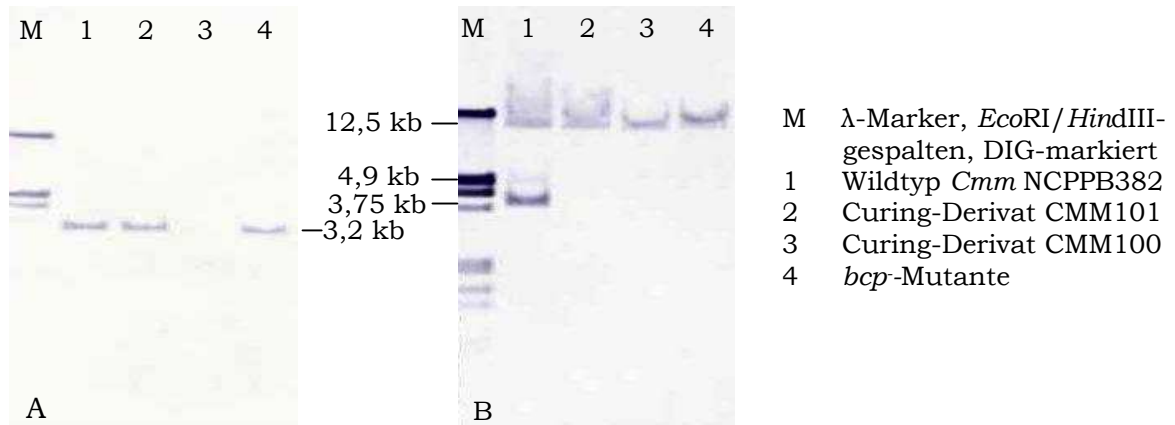


Abb. 9 Hybridisierung *BglII*-gespaltener Gesamt-DNA der *bcp*-Mutante mit der *ceaA*- (Abb. 9A) und der *pat-1*-Sonde (Abb. 9B).

Als direkter Nachweis für das große Plasmid pCM2 wird mit einer *pat-1*-Sonde hybridisiert. Bei Anwesenheit von pCM2 erscheinen eine 3,75 kb-*pat-1*-Bande und eine zusätzliche Bande von 4,9 kb, die die *pat-1*-homologen Gene *phpA* und *php* (plasmidal homology of p*at-1*) anzeigt. Nur der Wildtyp *Cmm* NCPPB382 besitzt beide Plasmide und zeigt daher Banden dieser Größe. Ein weiteres, 12,5 kb großes Hybridisierungssignal, das bei allen Stämmen zu sehen ist, weist auf das chromosomale *chpA*-Gen (chromosomal homology of p*at-1*) hin. Die durch Elektroporation in *Cmm* NCPPB382-Zellen erzeugte *bcp*-Mutante weist ein 3,2 kb großes Hybridisierungssignal mit der *ceaA*-Sonde, nicht aber Signale mit der *pat-1*-Sonde von 3,75 kb und 4,9 kb Größe auf (Abb. 9), es existiert in der Mutante also nur das kleine Plasmid mit dem Pathogenitätsfaktor *ceaA*, der relevante Kontrollstamm ist daher CMM101 (= CMM100 mit pCM1).

2. Physiologische Untersuchung der *bcp*-Mutante

Die Inaktivierung eines Genes kann Veränderungen des Wachstumsverhaltens einer Mutante verglichen mit dem Wildtyp bewirken. Durch Genmanipulation sind Veränderungen des Stoffwechsels möglich, die evtl. das Beschreiten alternativer Stoffwechselwege und damit ein verändertes oder reduziertes Wachstum zur Folge haben können. Der diesbezüglich veränderte Phänotyp kann sich schon bei Anzucht im Vollmedium, unter verschiedenen Labor-Bedingungen oder aber erst im natürlichen Lebensraum des Pathogens auswirken. Um dies zu überprüfen, wurde neben dem Test auf Kolonisation *in planta* eine Wuchskurve erstellt.

2.1 Wachstumverlauf der *bcp*-Mutante in Flüssigmedium

Das Wachstum der *bcp*-Mutante wurde in TBY-Flüssigmedium unter optimalen Laborbedingungen mit dem Wachstumsverhalten des *bcp*-Wildtypstammes CMM101 verglichen. Abbildung 10 zeigt die Wachstumskurven von *bcp* und CMM101, jeweils nach Animpfen einer 50 ml TBY-Kultur mit frischen *Cmm*-Übernachtskulturen (Start-OD₅₈₀ von 0,02) und Inkubation im Luftschüttler bei 140 rpm und 26 °C. Über einen Zeitraum von 3 Tagen wurde das Wachstum durch Messung der optischen Dichte bei 580 nm verfolgt. Abbildung 10 zeigt das Ergebnis einer Messreihe, die zwei mal wiederholt wurde.

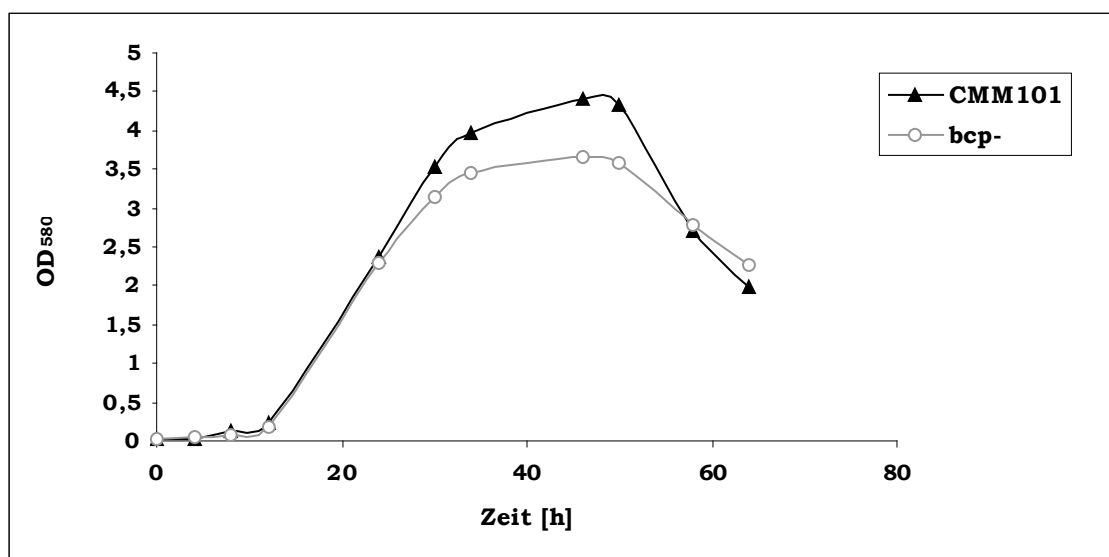


Abb. 10 Wachstumskurve der *bcp*-Mutante in TBY-Flüssigmedium im Vergleich zum Kontrollstamm CMM101.

Unter optimalen Kulturbedingungen zeigt der Kurvenverlauf bei beiden Stämmen den gleichen Verlauf. Auffällig ist der Unterschied des erreichten maximalen Titers, der in der Größenordnung von ca. OD₅₈₀ 0,7 liegt. Eine OD₅₈₀ von 0,1 entspricht dem *Cmm*-Titer von ca. 10⁸ cfu/ml. Die maximal erreichte Bakteriendichte in Flüssigkultur ist demnach bei der Mutante um 7·10⁸ cfu/ml gegenüber dem Kontrollstamm reduziert. Dieser geringfügige Unterschied im Wachstumsverlauf ist allerdings als nicht signifikant anzusehen.

2.2 Wachstumsverlauf in Flüssigmedium mit Hydroperoxidzusatz

Um zu überprüfen, ob die für „Bacterioferritin comigratory protein“ anderer Bakterienspezies (Jeong *et al.* 2000; Wang *et al.* 2005) ermittelte Fähigkeit zur Entgiftung von Hydroperoxiden auch für *Cmm* zutrifft, wurden Wachstumstests in flüssigem C-Medium unter Zusatz verschiedener Hydroperoxide durchgeführt. Als

Testsubstanzen dienten neben H_2O_2 , das als hauptsächliches Hydroperoxid des pflanzlichen Stoffwechsels anzusehen ist, die Hydroperoxide Cumenehydroperoxid und t-Butylperoxid, welche als Modellsubstanzen für organische Hydroperoxide Verwendung finden. Nach Verdünnung frischer Übernachtskulturen von *bcp* und *Cmm* NCPPB382 auf eine OD_{580} von 1 wurden diese zum Beimpfen von jeweils 20 ml C-Medium (Start- OD_{580} 0,1) verwendet. Nach Zugabe von jeweils 0,5 mM (Endkonzentration) Hydroperoxid (H_2O_2 , Cumenehydroperoxid bzw. t-Butylhydroperoxid) zu den Testkulturen der beide Stämme wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden die OD_{580} gemessen. Als Kontrollen dienten die unbehandelten Kulturen der eingesetzten Stämme.

Die Ergebnisse dieser Wachstumstests sind in den Abbildungen 11 bis 13 dargestellt. Das Wachstum in Medium mit oder ohne H_2O_2 -Zusatz zeigt keinerlei Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp. Dies liegt wohl darin begründet, dass alle aeroben Mikroorganismen zur Entgiftung von Wasserstoffperoxid zu O_2 und Wasser das Enzym Katalase besitzen, das große Stoffmengen umsetzen kann. Ein möglicherweise zusätzlich existierendes Enzym, das vielleicht nur geringe H_2O_2 -Mengen umsetzt, ist daher nicht erkennbar.

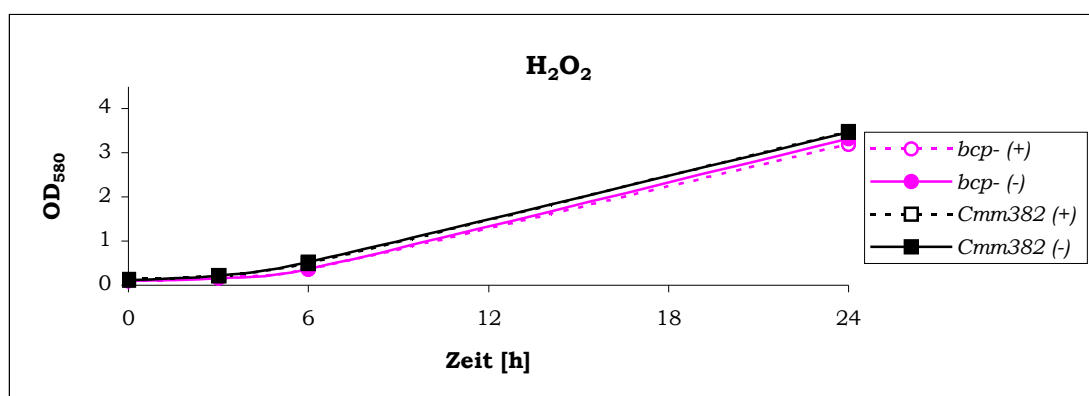


Abb. 11 Wachstumsverlauf von *bcp* und *Cmm* NCPPB382 unter Zusatz von 0,5 mM H_2O_2 (Endkonzentration) zum Kulturmedium (+) im Vergleich zur Kontrolle ohne H_2O_2 (-).

Sowohl im Testansatz mit Cumenehydroperoxid (CMOOH) (Abb. 12), als auch nach Zusatz von t-Butylhydroperoxid (t-BOOH) (Abb. 13) ist eine Wachstumsabschwächung zu erkennen. Dabei gibt es zwischen Wildtyp und Mutante keine signifikanten Unterschiede, wobei eine Endkonzentration von 0,5 mM t-Butylhydroperoxid zu einer geringeren Hemmung führt als 0,5 mM Cumenehydroperoxid.

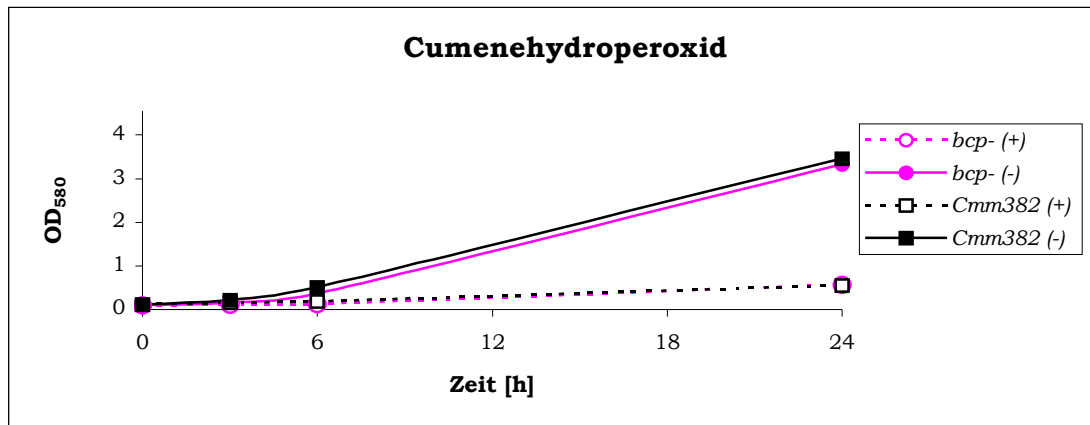


Abb. 12 Wachstumsverlauf von *bcp-* und *Cmm* NCPPB382 unter Zusatz von 0,5 mM Cumenehydroperoxid zum Kulturmedium (+) im Vergleich zur Kontrolle ohne CMOOH (-).

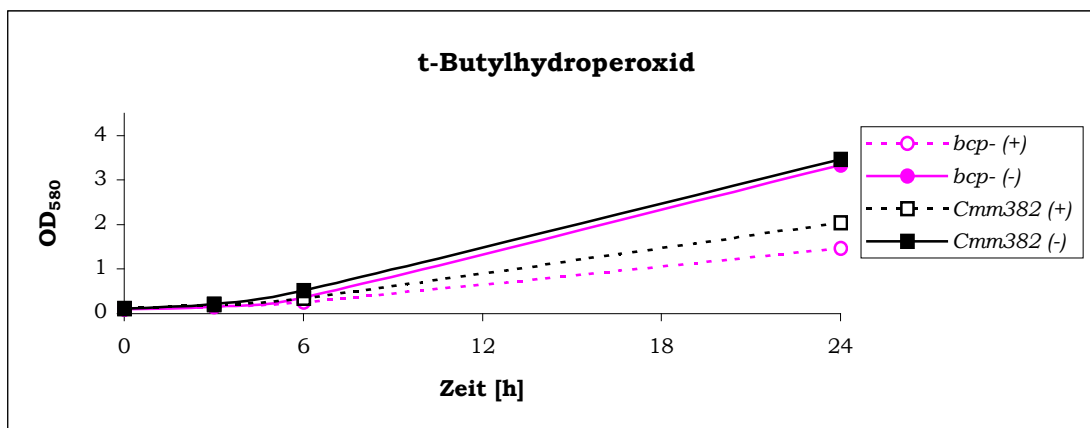


Abb. 13 Wachstumsverlauf von *bcp-* und *Cmm* NCPPB382 unter Zusatz von 0,5 mM t-Butylhydroperoxid zum Kulturmedium (+) im Vergleich zur Kontrolle ohne t-BOOH (-).

2.3 Agardiffusionstests mit verschiedenen Hydroperoxiden

Um zu überprüfen, wie groß der hemmende Effekt der Hydroperoxide H_2O_2 , Cumenehydroperoxid und t-Butylhydroperoxid in Festmedium ist, wurden jeweils 500 μ l einer logarithmisch wachsenden Kultur von *Cmm* NCPPB382 und der *bcp-* Mutante in C-Medium in 5 ml C-Weichagar suspendiert (OD_{580} 0,105) und auf C-Medium-Platten (ggf. mit Chloramphenicol-Zusatz) gegossen. Nach Erstarren des Agars wurde jeweils ein steriles Filterblättchen ($\varnothing = 6$ mm) auf die Mitte der Platte gelegt und mit 5 μ l 20 %igem Hydroperoxid getränkt. Abbildung 14 zeigt grafisch den Durchschnitt der nach 36-48 h Inkubation bei 25 °C gemessenen Hemmhofdurchmesser. Im Agardiffusionstest ist mit t-BOOH, im Gegensatz zur Wachstumshemmung in Flüssigkultur (siehe 2.2), keine Wuchshemmung zu erkennen. Nur mit Cumenehydroperoxid tritt eine starke Hemmung auf, wobei die mit CMOOH erhaltenen Hemmhöfe bei der Mutante geringfügig größer als beim

Wildtyp sind, der Unterschied von 2 mm ist allerdings nicht als signifikant anzusehen.

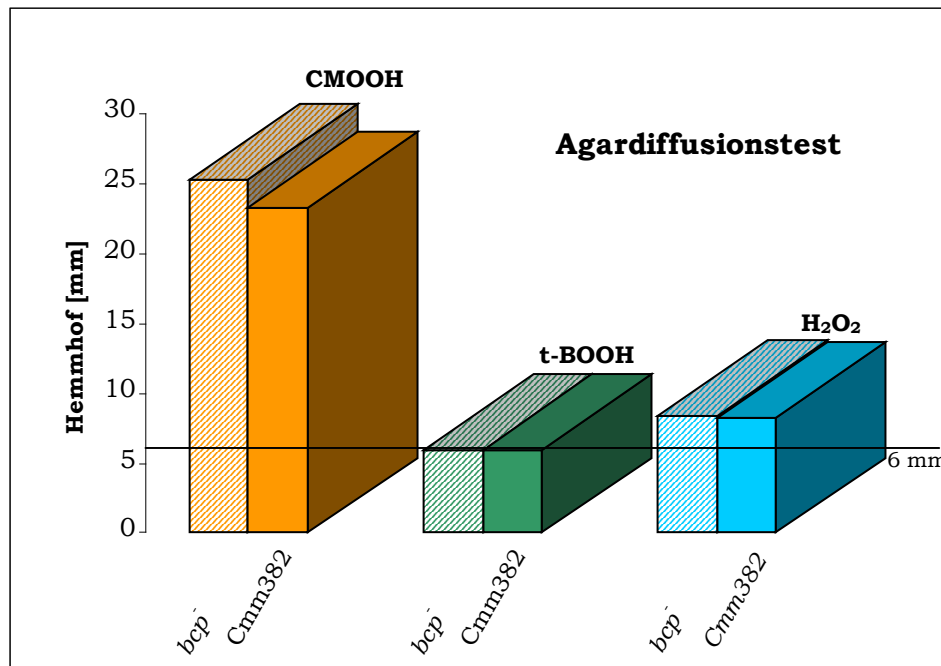


Abb. 14 Agardiffusionstest der *bcp*-Mutante und des Wildtyps *Cmm* NCPPB382 mit Cumenhydroperoxid (CMOOH), t-Butylhydroperoxid (t-BOOH) und H₂O₂.

3. Phänotypische Analyse der *bcp*-Mutante im Pflanzentest

3.1 Analyse der *bcp*-Mutante auf Auslösung von Krankheitssymptomen bei der Wirtspflanze *Solanum lycopersicum*

Im Pflanzentest wurden wurzelinfizierte Tomatenpflanzen über einen Zeitraum von 28 Tagen täglich auf einsetzende Welkesymptome und Sprossläsionen untersucht. Als Kontrollstämme wurden *Cmm* NCPPB382, der durch starke Krankheitssymptome charakterisiert ist, sowie als Negativkontrolle der Stamm CMM100, der nach Infektion keine Welkesymptome auslöst, eingesetzt. Als weitere Kontrollen wurden Pflanzen mit sterilem Leitungswasser statt mit Bakteriensuspension behandelt (Negativkontrolle) bzw. der Stamm CMM101 (direkte Positivkontrolle für die *bcp*-Mutante) verwendet, der durch Verlust eines Plasmides in seiner Symptomausprägung abgeschwächt ist.

Neben der täglichen Protokollierung der Welkesymptome wurden nach 28 Tagen von allen Pflanzen Größe und Frischgewicht, sowie bei etwa 10 % des jeweiligen Probenumfangs der Bakterientiter bei symptomtragenden Pflanzen bestimmt (Tabelle 1).

Stamm	Plasmid-status	WI	Symptome [% aller Pflanzen]	Größe [cm]	Gewicht [g]	Titer [cfu/g Pflanze]
<i>bcp</i> -Mutante n=446	pCM1	12	93,5	8,03 ±3,34	0,92 ±0,62	4,17·10 ⁹ n=47
CMM101 n=437	pCM1	14	83,1	9,80 ±3,52	1,43 ±1,10	7,12·10 ⁹ n=46
<i>Cmm</i> NCPB382 n=384	pCM1 pCM2	10-11	91,9	5,95 ±3,39	0,57 ±1,16	1,61·10 ¹⁰ n=48
CMM100 n=156	-	-	0	14,0 ±2,75	2,94 ±0,99	1,18·10 ⁹ n=18
H ₂ O n=116	-	-	0	27,83 ±11,16	4,24 ±1,11	-

Tab. 1 Ergebnisse der Pflanzentests 28 Tage nach Wurzelinfektion (WI: Welkeindex; Zeitraum in Tagen, nach dem 50 % der Pflanzen Welkesymptome aufweisen).

91,9 % aller mit *Cmm* NCPB382 infizierten Pflanzen zeigten nach 28 Tagen eindeutige Welkesymptome, 59,8% dieser Pflanzen waren bei Abschluss des Pflanzentests abgestorben. Dem gegenüber kam es bei CMM101 durch Verlust von pCM2 zu einer verzögerten Welke bei einer Welkerate von 83,1 %. Die Absterberate lag hier bei nur 7,3 %.

Der Anteil welkender Pflanzen ist bei der *bcp*-Mutante mit 93,5 % etwa gleich hoch wie bei dem Wildtyp *Cmm* NCPB382, aber ebenso wie bei dem direkten Kontrollstamm CMM101 wurden nur 7,4 % der Pflanzen innerhalb von 28 Tagen abgetötet. Für *Cmm* NCPB382 ist ein Bakterientiter in der Größenordnung von 10¹⁰ cfu/g Pflanzenfrischgewicht charakteristisch, während für die *bcp*-Mutante und die Curingderivate Titer von etwa 10⁹ cfu/g Frischgewicht bestimmt wurden. Insgesamt deutet ein niedrigerer Welkeindex, sowie ein höherer Anteil an erkrankten Pflanzen auf eine geringfügig stärkere Virulenz der *bcp*-Mutante im Vergleich zu CMM101. Der Welkeverlauf, der das Einsetzen der Welke, sowie deren Stärke zum jeweiligen Zeitpunkt berücksichtigt, ist in Abbildung 15 wiedergegeben. In diesen Diagrammen ist deutlich die starke Virulenz des Wildtypstammes *Cmm* NCPB382 zu erkennen, bei dem erste Welkesymptome frühzeitig einsetzen und zu einer starken Beeinträchtigung des Wachstums bzw. zum Absterben der Pflanze führen. CMM101 und *bcp* besitzen fast identische Welkeverlaufsdigramme mit nur wenigen abgestorbenen Pflanzen und lassen bei dieser Form der Darstellung keine

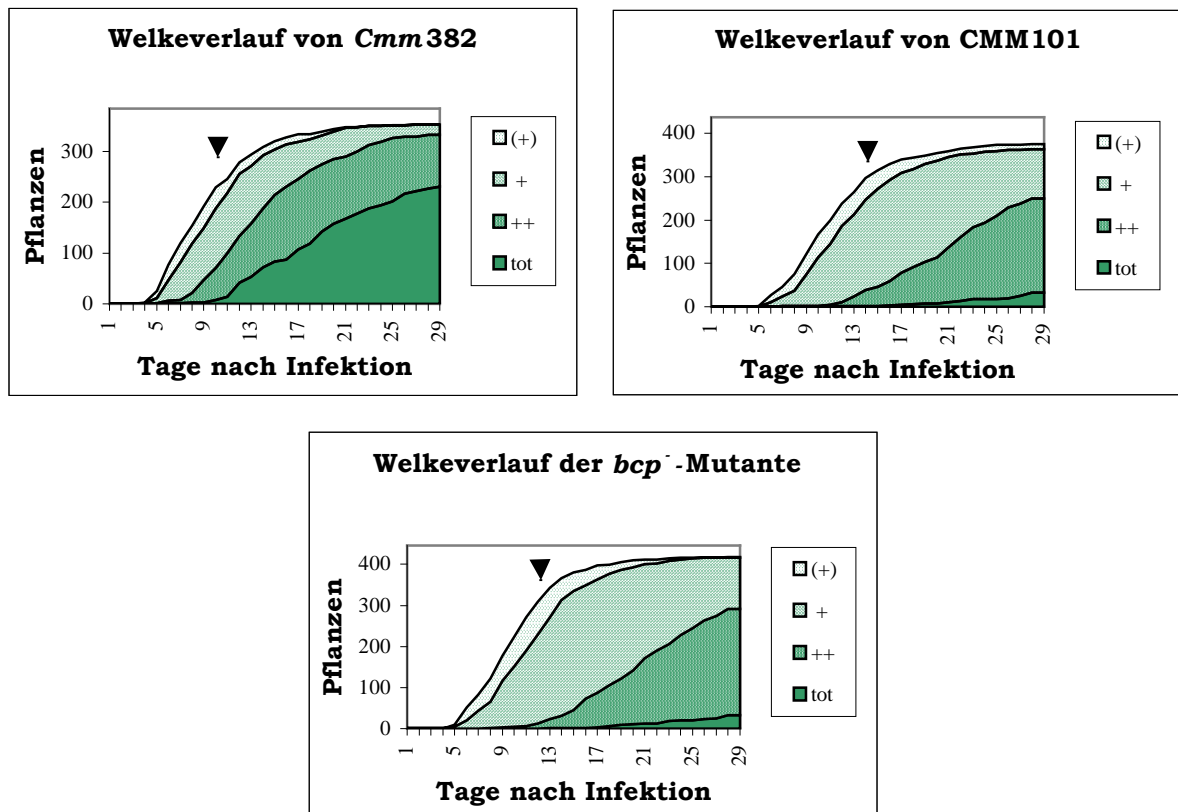


Abb. 15 Welkeverlaufdiagramme der mit den Stämmen *Cmm* NCPPB382 (n=384), CMM101 (n=437) und der *bcp*-Mutante (n=446) infizierten Pflanzen (Welkeindex markiert durch Pfeil)

Unterschiede in Virulenz bzw. Welke erkennen. Unterschiede im Pflanzentest zwischen diesen beiden Stämmen sind erst bei einem direkten Blick auf die infizierten Pflanzen ersichtlich.



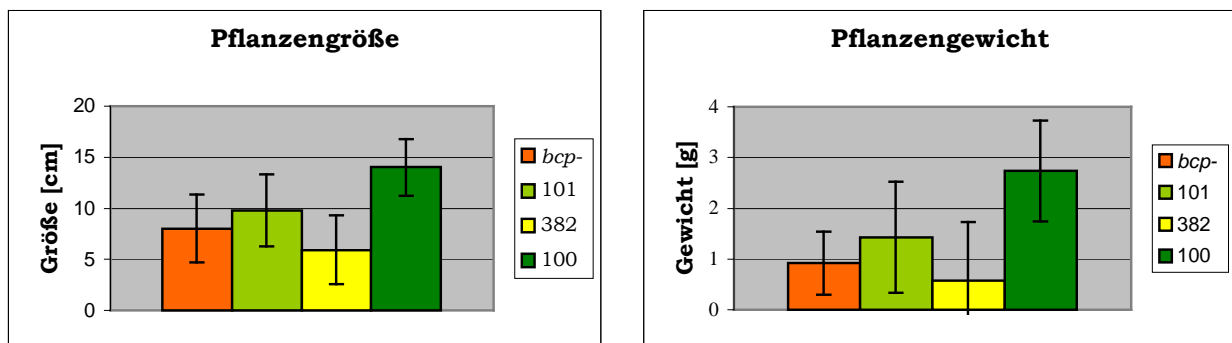
Abb. 16 Symptomausprägung bei den mit CMM101 bzw. der *bcp*-Mutante infizierten Tomatenpflanzen 28 Tage nach Wurzelinfektion.

Abbildung 16 veranschaulicht die geringfügig höhere Vitalität von CMM101 gegenüber der *bcp*-Mutante. Daneben sind die Unterschiede innerhalb beider Populationen gut zu erkennen; es existieren bei beiden Bakterienstämmen Pflanzen mit recht großen Abweichungen vom durchschnittlichen Erscheinungsbild (siehe Tabelle 1).

Augenfälliger sind diese Unterschiede in der Profilaufnahme der mit *bcp*- und CMM101 infizierten Tomatenpflanzen (Abb. 17). Die durchschnittlich ermittelten Größen- und Gewichtsunterschiede aller Pflanzentests belegen diesen Phänotyp (Abb. 18; siehe auch Tab. 1).



Abb. 17 Symptomausprägung bei den mit CMM101 bzw. der *bcp*-Mutante infizierten Pflanzen 28 Tage nach Wurzelinfektion.



Tab. 18 Durchschnitt der Pflanzengrößen und -gewichte aller Pflanzentests mit zugehörigen Standardabweichungen.

3.2 Analyse der mit *pDM::bcp*-Konstrukt komplementierten *bcp*-Mutante im Pflanzentest mit *Solanum lycopersicum*

Um den Nachweis zu erbringen, dass ein gegenüber dem Wildtyp verändertes Verhalten bzw. der Einfluss einer Mutante durch gezieltes Ausschalten eines Gens entstanden ist und keine weiteren Mutationen vorliegen, wird durch Einbringen einer intakten Kopie des mutierten Gens in die Mutante der ursprüngliche Phänotyp wiederhergestellt. Für die Komplementation von *Cmm*-Mutanten

existieren zur Zeit nur die auf den *Cmm*-Plasmiden pCM1 und pCM2 basierenden *E. coli*-*Cmm*-Shuttlevektoren der pDM- (Meletzus *et al.* 1993) bzw. der pHN-Familie (Nakhei 1993; Laine *et al.* 1996), die sich innerhalb der Familien nur durch unterschiedliche Antibiotika-Resistenzkassetten unterscheiden. Das genetische Arbeiten gestaltet sich bei beiden Vektorfamilien aufgrund Ihrer Größe von ca. 14 kb als schwierig. Bei der Elektroporation der Plasmide in *Cmm*-Zellen ist zum Einen die Transferrate relativ gering, zum Anderen besteht auch hier die Gefahr, dass die endogenen Plasmide pCM1 und pCM2 verloren gehen. Bei positiv selektionierten Klonen ist daher der Nachweis mittels PCR oder Southern-Hybridisierung zu erbringen, dass pCM1 und pCM2 in der Zelle noch vorhanden sind.

Erste Komplementationsversuche erfolgten mit dem pCM1-Derivat pDM302 (siehe Anhang 3.4). Es wurde zunächst ein 776 bp *EcoRI*/*HindIII*-Fragment aus pJE95 mit dem intakten *bcp*-Gen inklusive ca. 125 bp langem Promotorbereich in den *EcoRI*/*HindIII*-hydrolysierten und dephosphorylierten *E. coli*-*Cmm*-Shuttlevektor kloniert. Nach Einbringen des Konstruktes in *E. coli* WA337 wurde das unmethylierte Plasmid in kompetente Zellen von *bcp* elektroporiert. Cm- und Nm-resistente Kolonien (*bcp*(pDM::*bcp*)) wurden mittels Kolonie-PCR mit den Primern Neo pDM1 und 2 auf Anwesenheit des Neomycin-Resistenzgens überprüft, sowie mit den *cel*-Primern PFC1 und PRC3 auf Vorhandensein des endogenen Plasmides pCM1.

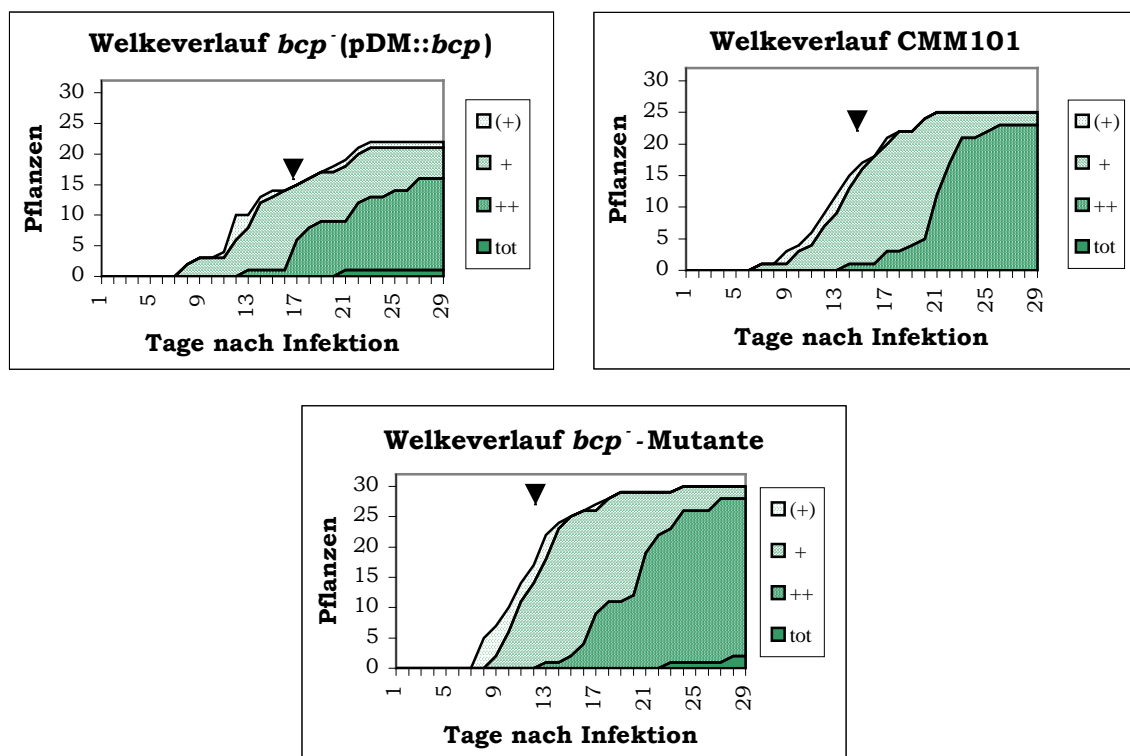


Abb. 19 Welkeverlauf der mit pDM::*bcp*-Konstrukt komplementierten *bcp*-Mutante, der *bcp*-Mutante und von CMM101 nach Wurzelinfektion im Pflanzentest (Welkeindex; je n=32)

Der komplementierte Stamm *bcp* (pDM::*bcp*) wurde in einem Pflanzentest mit jeweils 32 Pflanzen der Stämme *bcp*, *bcp* (pDM::*bcp*) und den Kontrollen *Cmm* NCPPB382, CMM101 und CMM100 untersucht. Das Welkediagramm der komplementierten Mutante wies keine großen Unterschiede zum Verlauf bei *bcp* bzw. CMM101 auf (Abb. 19). Die Anzahl der erkrankten Pflanzen ist reduziert bei gleichzeitig erhöhtem Welkeindex, was auf einen Gen-Dosis-Effekt hindeuten könnte. Die Ergebnisse des Pflanzentests sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Stamm	WI	Symptome [% aller Pflanzen]	Größe [cm]	Gewicht [g]	Titer [cfu/g]
<i>bcp</i>	12-13	93,8	9,75 ±2,06	1,07 ±0,43	7,26·10 ⁹ n=4
<i>bcp</i> (pDM:: <i>bcp</i>)	18	65,6	12,7 ±3,04	1,58 ±0,85	4,39·10 ⁸ n=4
CMM101	15	78,1	12,0 ±1,97	1,34 ±0,51	9,19·10 ⁹ n=4
<i>Cmm</i> NCPPB382	13	75,0	7,2 ±3,19	0,73 ±1,07	9,33·10 ⁹ n=4

Tab. 2 Resultate der Komplementation mittels pDM302-Konstrukt im Pflanzentest nach 28 Tagen (jeweils n=32).

Die Daten des Pflanzentests und die grafische Darstellung der Pflanzengrößen und -gewichte (Abb. 20) verdeutlicht dagegen die Rekonstitution der auch schon in früheren Pflanzentests festgestellten Größendifferenz der *bcp*-Mutante im Vergleich zum Kontrollstamm CMM101. Da die infizierten Pflanzen in diesem Pflanzentest generell größer als in früheren Tests war, wurden in die grafische Darstellung (Abb. 20) lediglich die aktuell erhaltenen Daten (Tab.2) einbezogen.

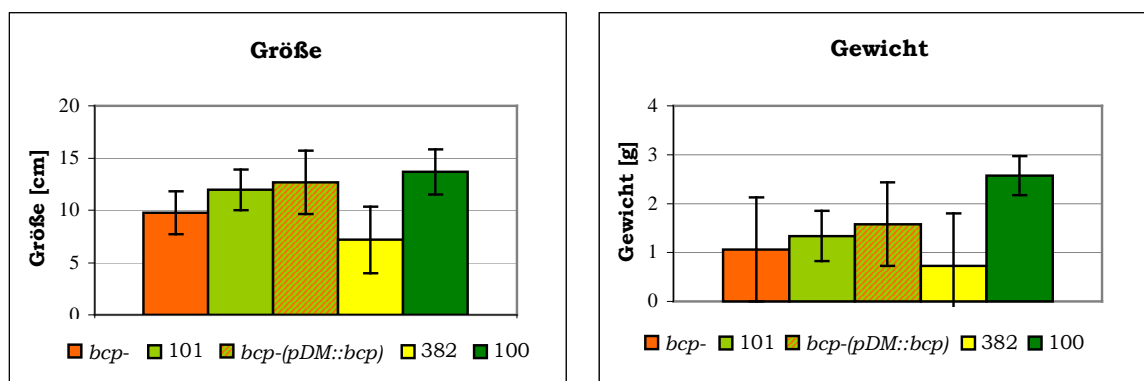


Abb. 20 Durchschnittliche Pflanzengrößen und -gewichte des Pflanzentests der Komplementation mittels pDM302-Konstrukt mit zugehörigen Standardabweichungen.

Ausgehend von den Größendaten dieses Pflanzentests scheint der „Phänotyp“ der *bcp*-Mutante komplementiert zu sein, die Größen der mit *bcp*(pDM::*bcp*) infizierten Tomaten erreichen die durchschnittliche Größe der mit dem Kontrollstamm CMM101 infizierten Pflanzen. Bei Betrachtung des Bakterientiters fällt jedoch auf, dass die mit Komplementations-Derivat infizierten Pflanzen um den Faktor 10 niedrigere Bakterientiter aufweisen. Ob dieses die Folge einer Inkompatibilität (z. B. Novick 1987; Austin and Nordström 1989) des Vektors pDM302 und des endogenen Plasmids pCM1 ist, bei der es innerhalb mehrerer Generationszeiten in der Pflanze zu einem teilweisen Plasmidverlust gekommen sein könnte, bleibt unklar. pCM1 liegt im Wildtyp *Cmm* NCPPB382 in ca. 5-6 Kopien vor (Gartemann, persönliche Mitteilung). Das Einbringen des Komplementationskonstruktes pDM::*bcp* führte zu einer Abschwächung der Virulenz mit einem Welkeindex von 18, der den in diesem Test für CMM101 ermittelten Index um 3 Tage übertrifft. Da nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte, dass es im vorliegenden Fall zu einer Inkompatibilitätsreaktion gekommen ist, wurde ein erneuter Komplementationsversuch unter Verwendung des pCM2-Derivates pHN216 unternommen. Ebenso wie pDM306 besitzt pHN216 das Replikon eines der beiden endogenen Plasmide, hier pCM2. Da bei der Herstellung der *bcp*-Mutante das Plasmid pCM2 bei der Elektroporation in den Wildtyp verloren ging, kann eine Inkompatibilität ausgeschlossen werden.

3.3 Konstruktion des Komplementationsplasmides pHN::*bcp*, Ortsspezifische Mutagenese von *bcp* und Überprüfung der Komplementation im Pflanzentest

Zur Konstruktion des Komplementationsplasmides pHN::*bcp* wurde *EcoRI*/*HindIII*-gespaltener Vektor pHN216 (Anhang 3.4) zunächst dephosphoryliert, um bei der Shotgun-Klonierung mit dem Insert eine Religation der zwei Vektor-*EcoRI*-Schnittstellen zu verhindern. Als Insert diente, wie schon bei der Konstruktion von pDM::*bcp*, das 776 bp große *EcoRI*/*HindIII*-Fragment mit intaktem *bcp*-Gen aus pJE95. Das nach Transformation in *E. coli* WA337 unmethyliert vorliegende Plasmid pHN::*bcp* wurde in elektrokompente Zellen von *bcp* elektroporiert. Auf C-Medium mit Cm- und Nm-Zusatz selektionierte Klone wurden zunächst mittels PCR mit den Neo-pDM1 und -2 Primern auf Vorhandensein des pHN-Konstruktes überprüft, sowie mit den *cel*-Primern das Vorhandensein von pCM1 nachgewiesen. Die als *bcp*(*bcp*⁺) bezeichnete komplementierte Mutante wurde danach im Pflanzentest eingesetzt. Um zu überprüfen, ob, wie in der Literatur (Jeong *et al.* 2000) beschrieben, die beiden Cysteine an Position 49 und 54 des *bcp*-Gens als

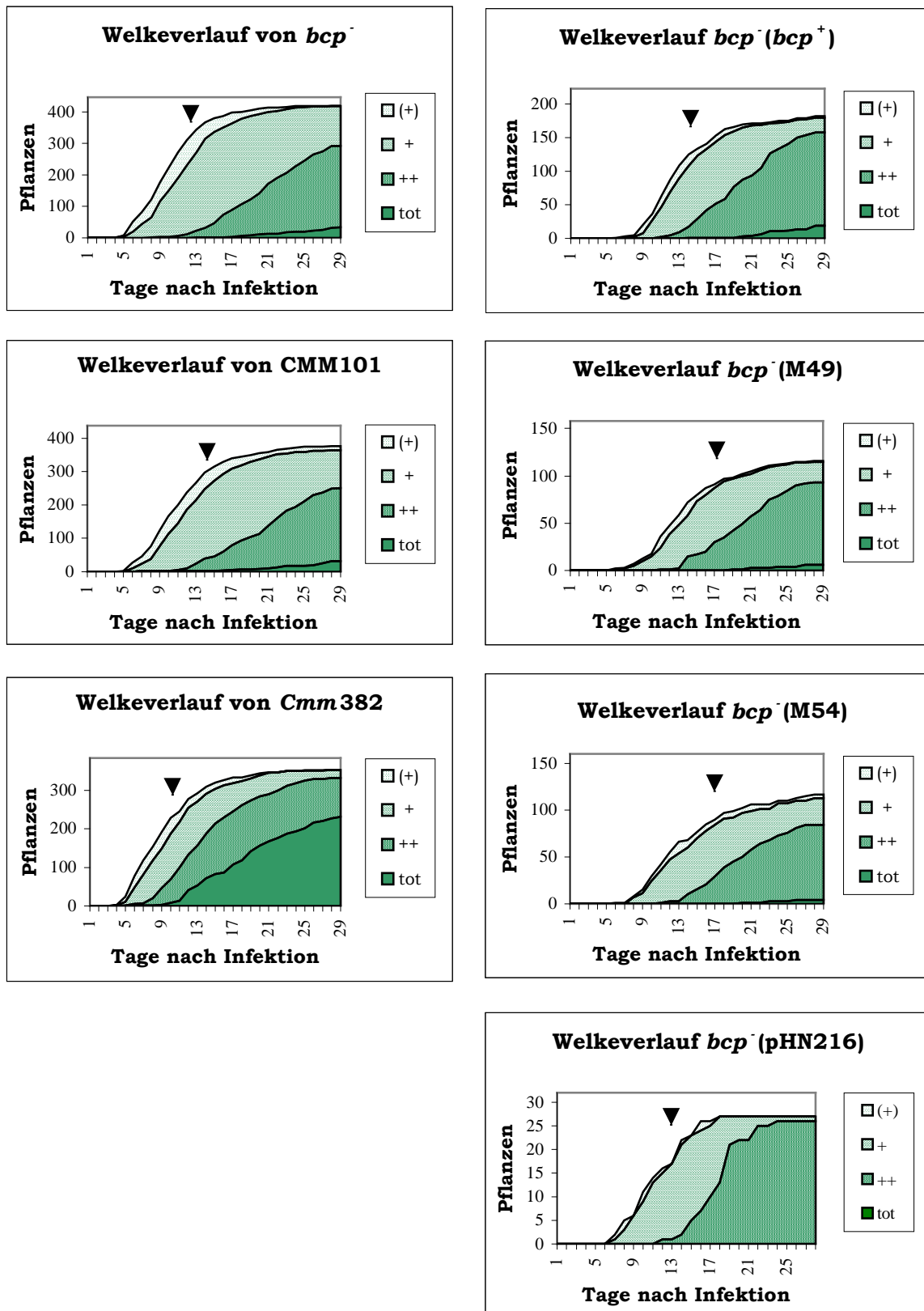


Abb. 21 Vergleich der Welkeverlaufdiagramme der mit pHN216-Konstrukten komplementierten bcp -Mutante sowie des Wildtyps *Cmm* NCPPB382 und der Kontrollen CMM101 bzw. bcp mit eingebrachtem Vektor pHN216 nach Infektion im Pflanzentest über 28 Tage. Die Diagramme von bcp , *Cmm* NCPPB382 und CMM101 zeigen den Verlauf aller durchgeführten Tests.

katalytisches Zentrum für die Entgiftung von Hydroperoxiden fungieren bzw., wie mehrfach beschrieben (Chae *et al.* 1994; Rhee *et al.* 2005), die Funktion einzig auf dem Cys₄₉ beruht, wurden weitere Komplementationsplasmide mit Austausch der konservierten Cysteine gegen Serin innerhalb des sonst intakten *bcp*-Gens konstruiert und in die *bcp*-Mutante eingebracht. Ausgehend von pJE95 als DNA-Template und den Primern M95uni und M95rev, sowie Cys49-1 und -2, bzw. Cys54-1 und -2 wurden durch „gene SOEing“ (Horton 1995) in einem dreistufigen Prozess PCR-Produkte amplifiziert, die dem Insert von pJE95 mit Austausch jeweils des Cysteins gegen ein Serin an Position 49 oder 54 des *bcp*-Gens entsprechen. Durch Subklonierung des jeweiligen PCR-Produktes als 776 bp *EcoRI/HindIII*-Fragment in pUC18 wurden die Plasmide pJE49 und pJE54 erhalten. Die Sequenz mit gewünschtem Cys₄₉Ser-/Cys₅₄Ser-Austausch wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Die korrekten Cys₄₉Ser- bzw. Cys₅₄Ser-Inserts wurden als 776 bp große *EcoRI/HindIII*-Fragmente aus pJE49 und pJE54 in *EcoRI/HindIII*-hydrolysierten Vektor pHN216 mittels Shotgun-Klonierung inseriert. Die nach Transformation in *E. coli* WA337 unmethyliert vorliegenden Plasmide pHN::M49 und pHN::M54 wurden in kompetente *bcp*-Zellen elektroporiert. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie oben beschrieben. Als weitere Kontrolle wurde durch Einbringen des intakten Plasmides pHN216 in die *bcp*-Mutante das Derivat *bcp*(pHN216) erhalten. Alle komplementierten *bcp*-Derivate wurden in drei Pflanzentest überprüft. Wie aus den Welkeverlaufdiagrammen (Abb. 21) zu ersehen, ist generell kein Unterschied zwischen den Welkeverläufen der *bcp*-Mutante und ihren komplementierten Derivaten feststellbar. Lediglich die Anzahl der erkrankten Pflanzen ist gegenüber der Mutante bzw. der mit dem Vektor pHN216 komplementierten Mutante reduziert. Die Kontrolle *bcp*(pHN216) weist gegenüber der Mutante eine geringe Reduktion von 84,4 % (WI 13) gegenüber 88,3% (WI 12) erkrankter Pflanzen dieser Tests auf.

Tabelle 3 gibt den Durchschnitt der Ergebnisse aus den drei Pflanzentests der Komplementation wieder. Im Allgemeinen sind die Unterschiede der Werte für Größe und Gewicht zwischen Wildtyp *Cmm* NCPPB382, *bcp*-Mutante und Kontrolle CMM101 hier geringer als die entsprechenden Durchschnittswerte aller Pflanzentests (siehe Tab. 1). Die generellen Größenunterschiede sind aber auch hier deutlich, die mit der Mutante infizierten Tomaten weisen eine Größe auf, die genau zwischen den mit Wildtyp und mit der Kontrolle infizierten beobachteten Pflanzengrößen zu finden ist.

Stamm	Symptome %	WI	Größe [cm]	Gewicht [g]	Titer [cfu/g Pflanze]
<i>bcp</i> n=128	88,3	13	8,07 ±2,64	0,87 ±0,62	3,52·10 ⁹ n=18
CMM101 n=128	78,1	15	8,76 ±3,59	1,18 ±1,21	6,54·10 ⁹ n=17
<i>Cmm</i> NCPPB382 n=128	93,0	12	7,30 ±3,79	0,80 ±1,43	2,16·10 ¹⁰ n=19
<i>bcp</i> (pHN216) n=32	84,4	13	8,18 ±2,96	0,64 ±0,38	5,07·10 ⁹ n=5
<i>bcp</i> (<i>bcp</i> ⁺) n=224	80,4	15	8,77 ±3,55	1,10 ±0,98	8,11·10 ⁸ n=28
<i>bcp</i> (M49) n=159	72,3	16	9,43 ±3,81	1,16 ±1,06	2,81·10 ⁹ n=24
<i>bcp</i> (M54) n=160	71,3	17	9,56 ±3,58	1,17 ±1,02	5,24·10 ⁹ n=24

Tab. 3 Resultate der Pflanzentests nach Komplementation mittels pHN216-Konstrukten. (28 Tage nach Wurzelinfektion).

Die Komplementation der Mutante mit dem intakten *bcp*-Gen scheint gelungen zu sein, *bcp*(*bcp*⁺) und CMM101 führen im Pflanzentest zu identischen Pflanzengrößen und Welkeindices, sowie den gleichen Anteilen an symptomtragenden Pflanzen bei Testende. Auffällig ist der im Verhältnis sehr niedrige Bakterientiter von *bcp*(*bcp*⁺), der fast um den Faktor 10 gegenüber CMM101 geringer ist. Im Vergleich zur Komplementation mit dem intakten *bcp*-Gen zeigen die mit *bcp*-Cys-Derivaten infizierten Tomatenpflanzen weniger erkrankte Pflanzen und damit höhere Welkeindices sowie um fast 10 % größere Pflanzen. Zwischen den Derivaten *bcp*(M49) und *bcp*(M54) sind dagegen keine Unterschiede ersichtlich.

Die *bcp*-Mutante erfährt durch die Anwesenheit des Vektors pHN216 keine Veränderung in Größe, Titer und Welkeindex.

Die Daten der Tabelle 3 sind in Abbildung 22 dargestellt. Die Grafik verdeutlicht die durchschnittlich erreichten Pflanzengrößen und -gewichte der Tomatenpflanzen nach Infektion der mittels pHN-Konstrukten komplementierten *bcp*-Mutante.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Pflanzentests auf einen Einfluss des *bcp*-Gens innerhalb der Pflanze. *In planta* löst das defekte Gen möglicherweise im Rahmen der Kolonisation eine Reaktion aus, die es gegenüber dem Kontrollstamm CMM101 mit intaktem *bcp*-Gen virulenter macht.

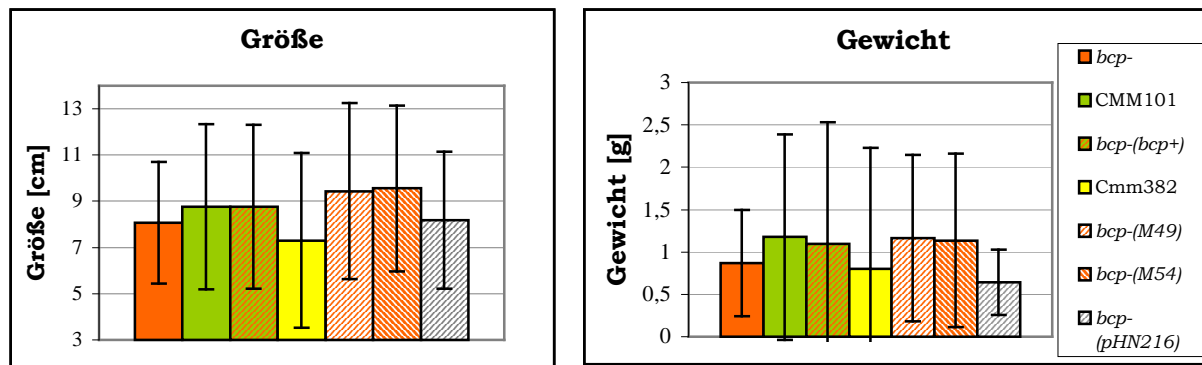


Abb. 22 Durchschnittliche Pflanzengrößen und -gewichte des Pflanzentests der Komplementation mittels pHN216-Konstrukten

3.4 Kolonisation von *Solanum lycopersicum* durch *Cmm*

Die Inaktivierung des *bcp*-Gens hat keinen Einfluss auf den Welkeverlauf infizierter Tomatenpflanzen, Mutante und Kontrolle CMM101 unterscheiden sich kaum. Phänotypische Unterschiede zeigten sich allerdings in geringeren Pflanzengrößen bei den mit der Mutante infizierten Tomaten. Um zu überprüfen, ob die Inaktivierung des *bcp*-Gens die Kolonisationsfähigkeit in der Tomatenpflanze beeinflusst, wurden zu verschiedenen Zeiten von je zwei mit der *bcp*-Mutante bzw. CMM101 wurzelinfizierten Pflanzen Pflanzenhomogenate hergestellt und der Bakterientiter bestimmt. Die Wuchskurve *in planta* der beiden *Cmm*-Stämme ist in Abbildung 23 dargestellt.

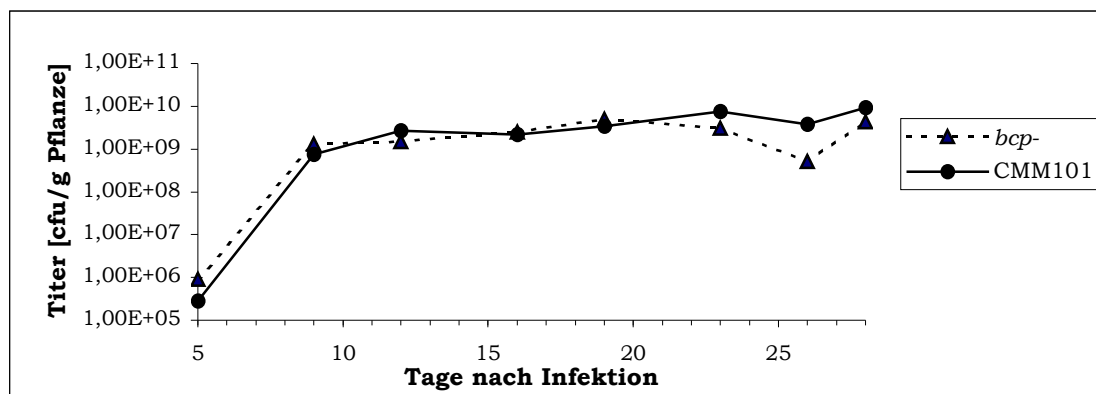


Abb. 23 Kolonisation von Tomatenpflanzen durch die *bcp*-Mutante und CMM101.

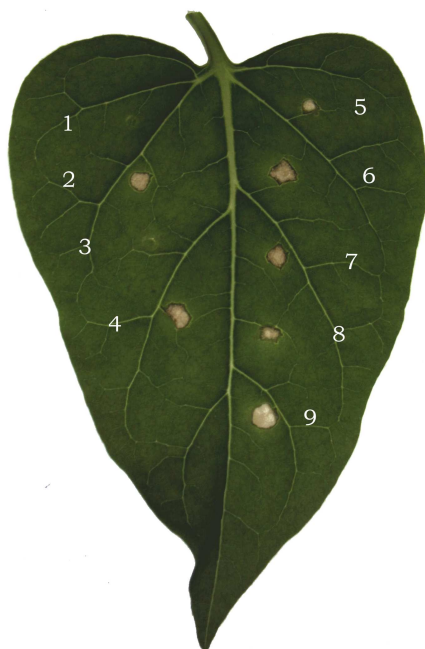
Im Verlauf der Kolonisation treten kleinere Schwankungen auf, die durch die geringe Anzahl der untersuchten Pflanzen und ihren unterschiedlich starken Welkegrad verursacht werden. Je ausgeprägter die Welke, um so höher der gefundene Bakterientiter. 5 Tage nach Infektion scheint die *bcp*-Mutante geringfügig besser zu besiedeln. Grundsätzlich kolonisieren beide Stämme etwa gleich gut und erreichen 28 Tage nach Infektion Titer von ca. 10^9 Bakterien pro

Gramm Pflanzenfrischgewicht. Die Kolonisation wird damit durch Ausschalten des *bcp*-Gens, zumindest im späteren Verlauf, offenbar nicht beeinflusst.

3.5 Hypersensitive Reaktion bei der Nicht-Wirtspflanze *Mirabilis jalapa*

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung eines Phytopathogens ist über die Auslösung der Hypersensitiven Reaktion (HR) gegeben. In der inkompatiblen Reaktion mit einer Nicht-Wirtspflanze wird bei Kontakt mit dem Pathogen eine pflanzliche Abwehrreaktion ausgelöst, die zum lokalen Zelltod (Nekrose) des betroffenen Gewebes führt. Durch Absterben der die Kontaktfläche umgebenden Pflanzenzellen wird eine Barriere für eine weitere Ausbreitung des Phytopathogens innerhalb der Pflanze geschaffen. Als Testpflanze für eine durch *Cmm* induzierte HR dient *Mirabilis jalapa*, wobei nur virulente Stämme von *Cmm* Nekrosen auslösen (Berpohl *et al.* 1996).

Es wurden Bakteriensuspensionen (OD₅₈₀ 8,0) verschiedener *Cmm*-Stämme in die Blattunterseite von *Mirabilis jalapa* infiltriert und über einen Zeitraum von 72 Stunden auf Entwicklung einer Hypersensitiven Reaktion beobachtet.



	Stamm	HR
1	PS-Puffer	-
2	<i>Cmm</i> NCPPB382	+
3	<i>Cmm</i> NCPPB515	-
4	CMM101	+
5	<i>bcp</i> ⁻	+
6	<i>bcp</i> (<i>bcp</i> ⁺)	+
7	<i>bcp</i> (M49)	+
8	<i>bcp</i> (M54)	+
9	<i>bcp</i> (pat) ¹⁾	+

Abb. 24 Induktion einer HR durch *Cmm*-Stämme bei *Mirabilis jalapa*. ⁽¹⁾ Konjugationsderivat der *bcp*-Mutante, *pat-1* tragend).

Die Ergebnisse (Abb. 24) zeigen sowohl für die *bcp*-Mutante, als auch für die komplementierten Derivate *bcp*(*bcp*⁺), *bcp*(M49) und *bcp*(M54) die für *Cmm* NCPPB382 und CMM101 typischen Nekrosen (Abb.19).

Der als Kontrolle verwendete avirulente Stamm *Cmm515* löst keine HR aus. Lediglich das *pat*-Konjugationsderivat *bcp(pat)* zeigt eine etwas stärkere Ausprägung der Nekrose. Das Genprodukt BCP hat damit keinen direkten Einfluss auf die Auslösung der hypersensitive Reaktion.

4. Überexpression und biochemische Charakterisierung von Bcp

Um Bcp hinsichtlich seiner enzymatischen Eigenschaften näher charakterisieren zu können, ist es zunächst erforderlich, eine Überexpression des Proteins nach Klonierung des Gens in einen geeigneten Vektor in *E. coli* zu erreichen, das rekombinante Protein zu isolieren und zu reinigen. Nach Überprüfung seiner Reinheit und Bestimmung des Proteingehaltes kann das Protein dann hinsichtlich seiner Enzymaktivität untersucht werden.

4.1 Überexpression von Bcp in *E. coli*

In ersten Versuchen zur Überexpression von Bcp wurde der Vektor pProlar.A122 (Anhang 3.5) verwendet. Dieser verfügt neben einer Kanamycin-Resistenz über einen *plac/ara-1* Hybrid-Promotor/Operator, eine RBS, ein N-terminales Myc-Tag und eine Enterokinase-Spaltstelle. Eine „Multiple-cloning-site“ erlaubt die variable Klonierung des zu exprimierenden Gens in verschiedenen Relationen zu RBS und Myc-Tag. Nach Klonierung eines PCR-Produktes des *bcp*-Gens, das geeignete Schnittstellen durch Primerdesign erhalten hat und Einführung in den Stamm *E. coli* DH5aPRO kann die Überexpression mit Arabinose und IPTG induziert werden.

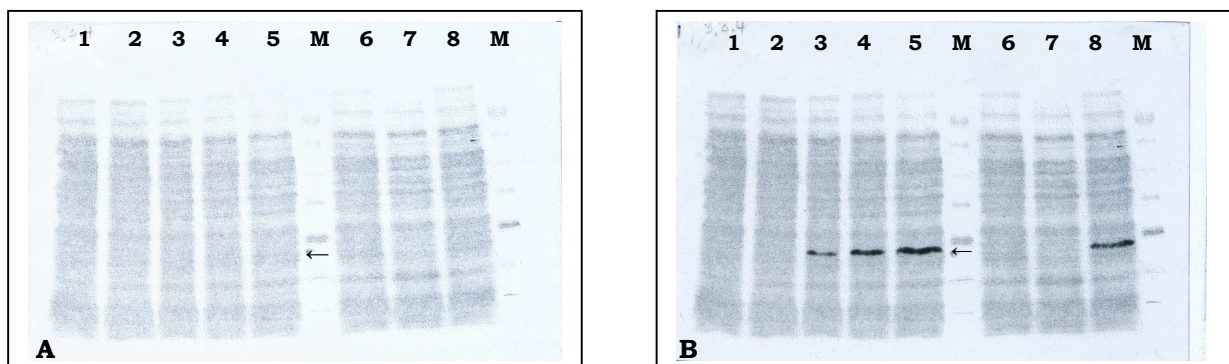


Abb. 25 Western-Blot von Bcp, exprimiert in pProlar; A. Membran angefärbt mit Ponceau S; B. Film nach Detektion (deckungsgleich aufgelegt auf die Membran); die Pfeile markieren die Proteingröße inkl. myc-Tag von 19,95 kDa (Spur 1+6 vor Induktion, Spur 2+7 Rohextrakt nicht induziert, Spuren 3,4,5+8 Rohextrakt induziert; M Proteinmarker).

Die Überprüfung des mittels Schnellaufschluss isolierten Rohextraktes im SDS-PAGE zeigte, dass dieses Vektor-System nicht geeignet ist, da nach Induktion keine Proteinbanden im Gel verstärkt auftreten. Der zur Kontrolle durchgeführte Western-Blot gegen einen Anti-Myc-Antikörper zeigte ein extrem schwaches Bcp-Signal (Abb. 25).

In einem erneuten Versuch zur Überexpression von Bcp wurde der Vektor pET-22b(+) (Anhang 3.5), der über eine Ampicillin-Resistenz, sowie über einen T7-Promotor, eine *pelB*-Signalsequenz stromabwärts der RBS, einen auf die MCS folgenden C-terminalen His-Tag und eine *lacI*-Sequenz verfügt, verwendet. Zunächst wurde ein PCR-Produkt von *bcp* mittels der Primer *bcp* pET-F1 und pET-R1 und der Template-DNA pJE95 hergestellt. Das PCR-Produkt setzt sich aus der *bcp*-Sequenz ohne Stopcodon und den flankierenden Restriktionsschnittstellen *NdeI* bzw. *NotI* zusammen. Durch Klonierung des *NdeI/NotI*-gespaltenen PCR-Produktes in den Vektor geht die Signalsequenz des Vektors verloren, die kodierende Sequenz von Bcp wird um 5 Codons und einen Epitop-Tag aus 6 Histidinen verlängert. Das Gesamtpeptid mit His-Tag hat ein Molekulargewicht von 18,49 kDa. Der resultierende Bcp-exprimierende Vektor pET::*bcp* wurde nach Bestätigung der korrekten Sequenz in den Stamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die Induktion der Expression erfolgte mittels IPTG. Abbildung 26 zeigt den nach Zellschnellaufschluss gewonnenen Rohextrakt des überexprimierten Bcp im SDS-Polyacrylamidgel.

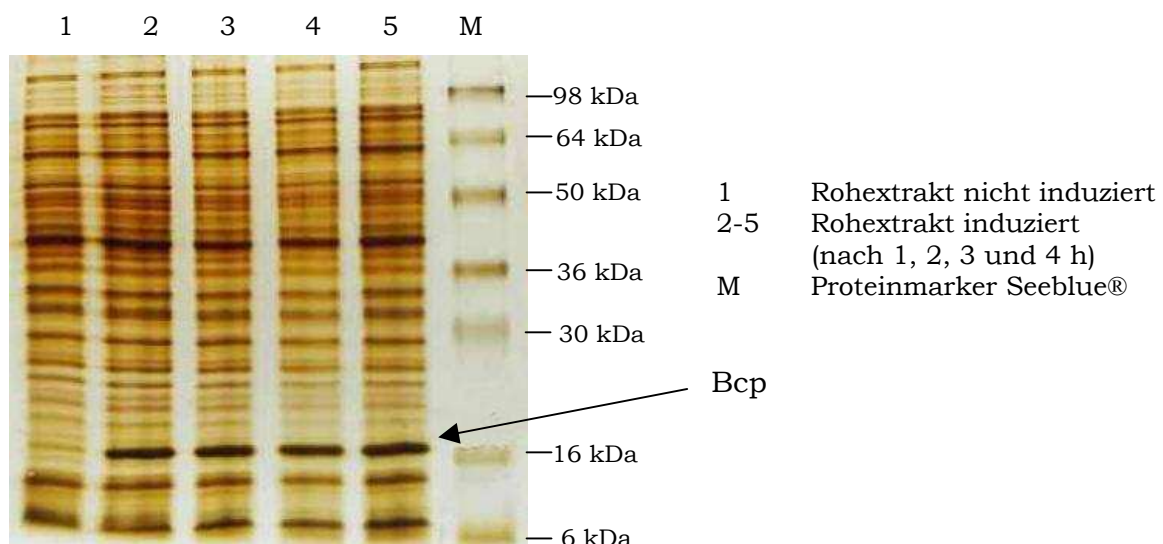


Abb. 26 SDS-PAGE der Bcp-Expression (Silberfärbung).

Analog wurden PCR-Produkte der *Cys*₄₉*Ser*/*Cys*₅₄*Ser*-Derivate von *bcp* mit Template-DNA von pJE49 bzw. pJE54 amplifiziert und in *NdeI/NotI*-gespaltenen

Vektor pET22b(+) kloniert. Es resultieren die Expressionsvektoren pET-C49S und pET-C54S. Die Proteingewichte betragen einschließlich C-terminalem His-Tag ebenfalls 18,49 kDa.

Die Überexpression von Bcp erfolgte durch Induktion einer logarithmisch wachsenden Kultur (OD_{580} ca. 0,6-0,7) mit 0,4 mM IPTG und Anzucht im Luftschüttler für 2-3 Stunden. Bcp-überexprimierende *E. coli*-Zellen wurden durch Zentrifugation abgeerntet und anschließend rasch unter Kühlung auf Eis weiterverarbeitet. Um zu überprüfen, in welchem bakteriellen Kompartiment Bcp exprimiert wird, wurde ein Kompartimenttest durchgeführt (Abbildung 27).

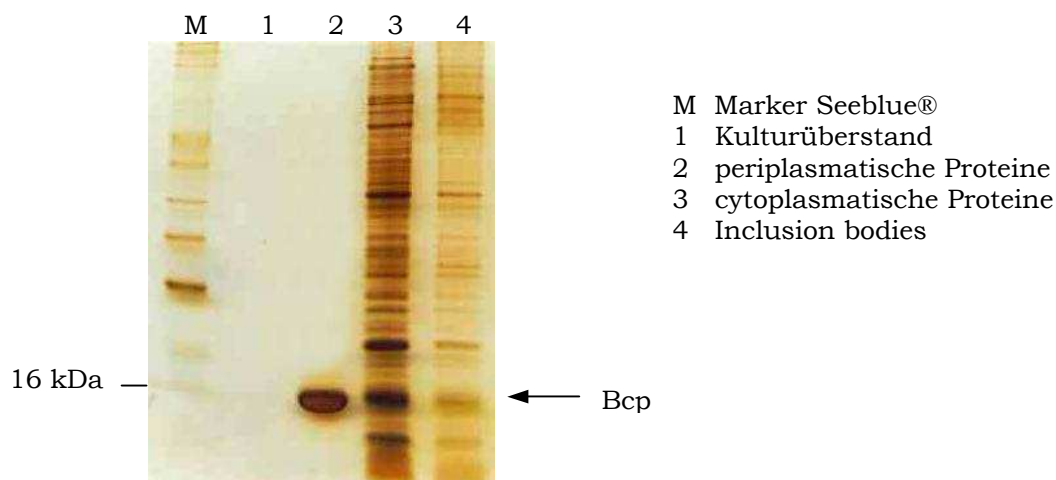


Abb. 27 Kompartimenttest des rekombinanten Bcp (SDS-PAGE, Silberfärbung).

Der Kompartimenttest zeigt, dass Bcp problemlos in hoher Konzentration isoliert werden kann, da es nicht in „Inclusion bodies“ vorliegt.

Zur weiteren Bearbeitung wurden die Bakterienzellen mit den überexprimierten Proteinen unter ständiger Kühlung in der French-Press aufgeschlossen. Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurde Bcp aus dem Lysat über Ni^{2+} -Affinitätschromatografie gereinigt und konzentriert. Fraktionen der einzelnen Reinigungsschritte wurden im SDS-PAGE hinsichtlich ihrer Reinheit und Konzentration überprüft. Abbildung 28 zeigt beispielhaft das SDS-PAGE der Aufreinigung von Bcp. Nach Dialyse gegen K- P_i -Phosphatpuffer wurde der Proteingehalt mit der BCA-Methode nach Pierce ermittelt. Aliquots der auf 20 μ M verdünnten Proteine wurden für nachfolgende biochemische Tests bei -80 °C gelagert.

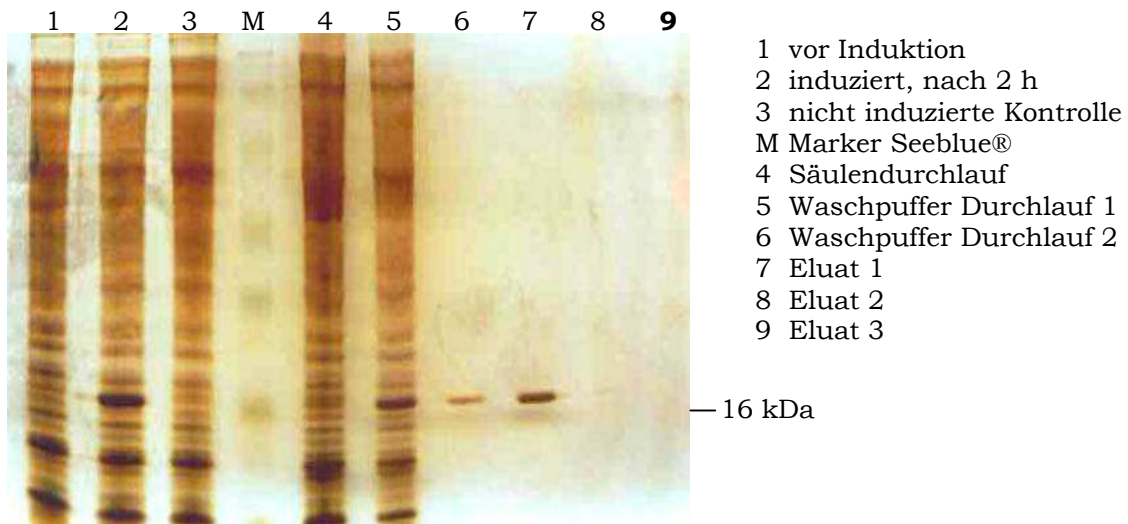


Abb. 26 SDS-PAGE der Reinigung von überexprimiertem Bcp mittels Ni^{2+} -Affinitäts-Säulenchromatografie (Silberfärbung).

4.2 Analyse des überexprimierten Bcp im SDS-Polyacrylamidgel

Um festzustellen, ob Bcp bei Übergang des reduzierten in den nicht-reduzierten Zustand die Konformation durch Verknüpfen oder Lösen inter- oder intramolekularer S-S-Brücken ändert, wurde das intakte Protein ebenso wie die überexprimierten Derivate C49S und C54S in beiden Redoxzuständen im SDS-PAGE analysiert. Abbildung 27 zeigt, dass reduziertes und nicht-reduziertes Bcp in der gleichen Konformation vorliegen. Das nicht-reduzierte Derivat C49S liegt im Gegensatz zur reduzierten Form teilweise auch als Dimer vor. Die Diskrepanz zum Wildtyp-Protein ist am deutlichsten bei der Mutante C54S sichtbar. Das reduzierte

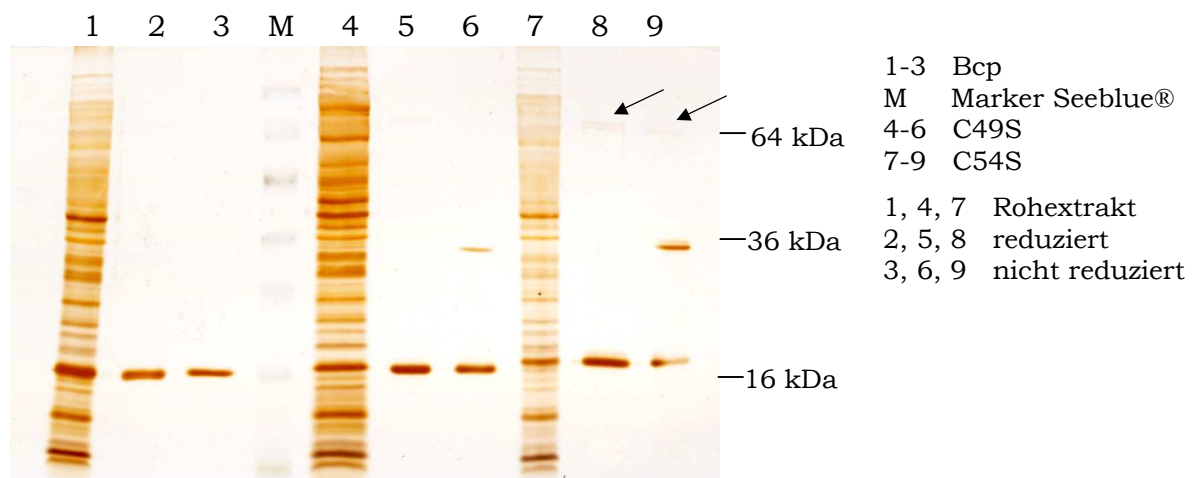


Abb. 27 SDS-Page von rekombinantem Bcp, C49S und C54S als Rohextrakt, reduziertem und nicht-reduziertem Protein (Silberfärbung).

C54S-Protein liegt hauptsächlich als Monomer, zu einem sehr geringen Anteil aber auch als Tetramer vor. Bei der nicht-reduzierten Form des C54S-Proteins sind monomere und dimere Form im Gleichgewicht mit zusätzlich sehr kleinem Vorkommen von Tetrameren (siehe Pfeile).

Die unveränderte Konformation bei Bcp und die Konformationsänderungen bei den C49S/C54S-Proteinen deuten daraufhin, dass bei Vorhandensein von 2 Cysteinen im Molekül eine intramolekulare S-S-Brücke gebildet wird. Bei den Derivaten mit nur jeweils einem Cystein kommt es zum Teil schon bei dem reduzierten Protein durch intermolekulare S-S-Brücken zur Oligomer-Bildung. Um weiterhin zu überprüfen, ob es bei Hydroperoxidzugabe in unterschiedlichen Mengen zu einem veränderten Laufverhalten des Proteines im SDS-PAGE kommt, wurden Gelshift-Assays mit 25 und 50 μM H_2O_2 (1 h bei RT) der reduzierten und der nicht-reduzierten Proteine durchgeführt. Sowohl bei H_2O_2 -Behandlung des reduzierten, als auch des nicht-reduzierten Bcp ist eine leichte Verschiebung zu größeren Molekulargewichten erkennbar (Abb. 28).

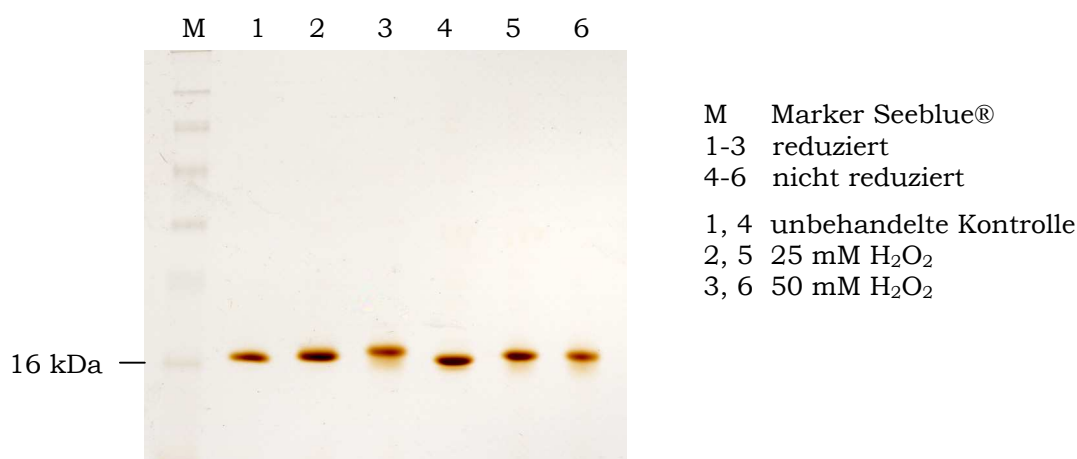


Abb. 28 Gelshift-Assay von Bcp (SDS-PAGE, Silberfärbung).

Mit zunehmender H_2O_2 -Konzentration wird die Proteinbande außerdem diffuser, welches auf intermediäre Proteinverbindungen schließen lässt. Abbildung 29A gibt die scheinbare Veränderung des Molekulargewichtes von C49S bei H_2O_2 -Behandlung wieder, 50 mM H_2O_2 können bei dem reduzierten C49S bereits einen deutlichen Anteil an Proteindimeren hervorrufen. Das nicht-reduzierte C49S liegt schon bei der unbehandelten Kontrolle als Monomer/Dimer-Gemisch vor. Die H_2O_2 -Behandlung bewirkt auch hier wie beim Wildtyp-Protein einen Shift des Monomer-Molekulargewichtes. Abbildung 29B weist ein ähnliches Bild für C54S auf, wobei zusätzlich in allen Spuren eine Proteinbande in Höhe des Tetramer-Molekulargewichtes auftritt.

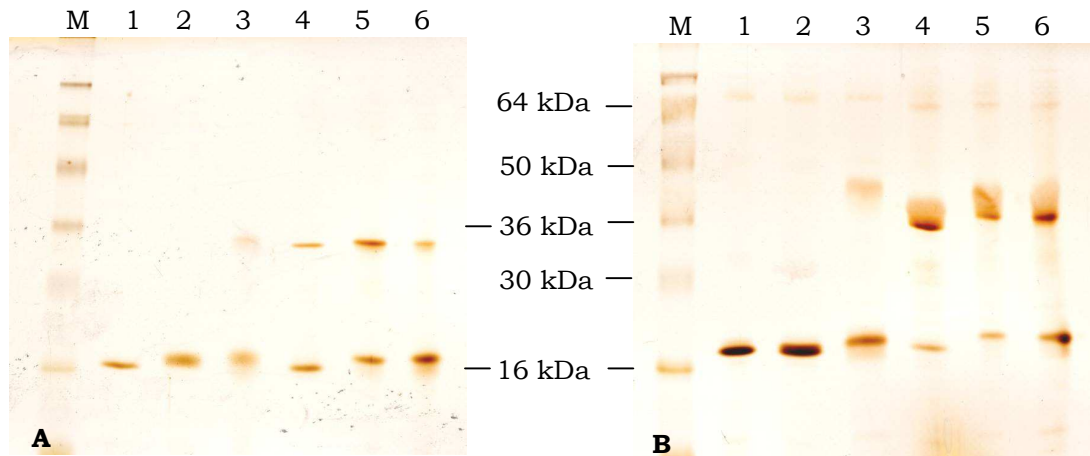


Abb. 29 Gelshift-Assay von C49S (A) und C54S (B) (SDS-PAGE, Silberfärbung).
(Legende wie Abb. 28)

4.3 2D-SDS-PAGE

Bei der zweidimensionalen SDS-Gelelektrophorese (2D) werden Proteingemische nach Fokussierung im elektrischen Feld (1. Dimension) in der 2. Dimension mittels eines Elektrophoreselaufes hinsichtlich ihres Molekulargewichtes (MG) aufgetrennt.

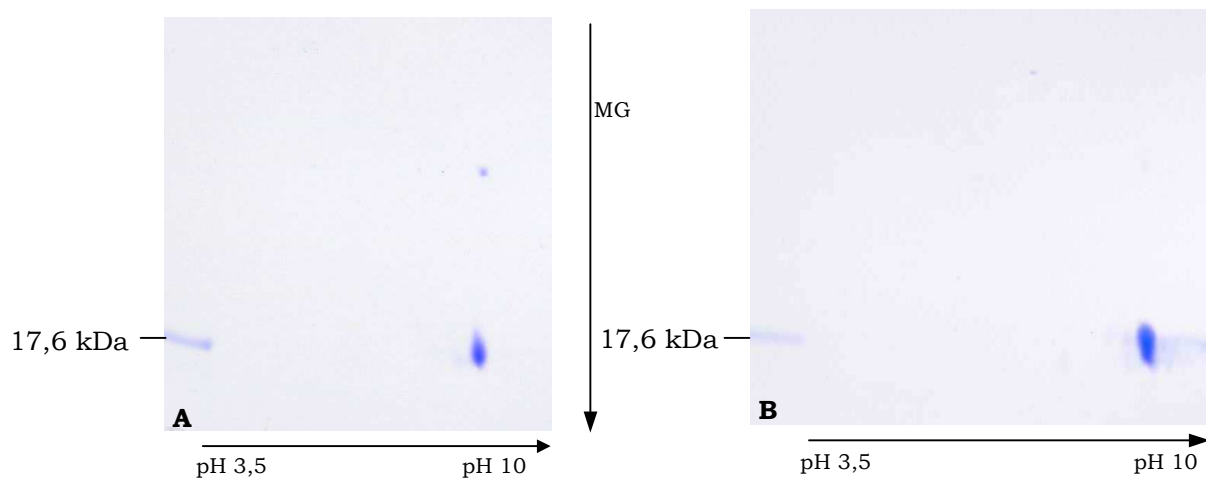


Abb. 30 2D-SDS-PAGE des überexprimierten Bcp unter reduzierenden (A.) und nicht-reduzierenden Bedingungen (B.) (Marker: Hüllprotein TMV 17,6 kDa; Coomassie-Färbung).

Bei Einsatz dieser Methode für ein isoliertes, aufgereinigtes Protein ist eine Beurteilung möglich, ob sich das aktive Protein aus einer oder mehreren Untereinheiten zusammensetzt und ob Modifikationen auftreten. Durch Vergleich des reduzierten und des nicht-reduzierten Proteins im 2D-SDS-Gel kann festgestellt werden, ob sich die Proteinkonformation z. B. durch Verknüpfen oder Lösen von

SH-Gruppen verändert, d. h. während einer Redoxreaktion Dimere oder Oligomere gebildet werden.

Die 2 D-Gelelektrophorese (Abb. 30) bestätigte, dass das aktive Bcp sowohl im reduzierten, als auch im nicht-reduzierten Zustand als Monomer vorliegt. Der zusätzliche Spot oberhalb des Bcp-Spots in Abbildung 30A deutet auf eine schwache Verunreinigung des isolierten Proteins.

4.4 Bestimmung der Peroxidaseaktivität von Bcp

Zur *in vitro* Aktivitätsmessung wurde der Xylenol-Orange-Test nach FOX 1 (ferrous oxidation with xylenol; Wolff 1994) angewandt. Dieser dient zur indirekten Messung gering konzentrierter, wasserlöslicher Hydroperoxide. In verdünnter Säure oxidieren Hydroperoxide Fe^{2+} -Ionen zu Fe^{3+} -Ionen. Letztere können photometrisch mit Eisenempfindlichen Farbstoffen zur indirekten Hydroperoxidbestimmung herangezogen werden. Wegen der geringen Stabilität der verwendeten Substrate Wasserstoffhydroperoxid (H_2O_2), Cumenehydroperoxid, t-Butylhydroperoxid und Linolsäurehydroperoxid, sowie der FOX-Lösung müssen mit jeweils frisch angesetzten Stammlösungen Eichkurven für jede Testreihe erstellt werden. Die optimale Reaktionszeit beträgt je nach Hydroperoxid 5 bis 15 Minuten. Um festzustellen, ob die Peroxidaseaktivität von Bcp Thioredoxin-abhängig ist, wurden Reaktionsansätze jeweils ohne und mit Thioredoxin durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurde zur Regeneration des oxidierten Enzyms der Elektronendonator DTT der frisch bereiteten Peroxid-Verdünnung zugefügt (400 μM DTT/Ansatz).

4.4.1 Peroxidaseaktivität von Bcp gegenüber H_2O_2

Zur Ermittlung der Peroxidaseaktivität von Bcp gegenüber H_2O_2 wurden jeweils ohne und mit Zusatz von rekombinantem *E. coli* Thioredoxin A (TrxA) beginnend bei Reaktionsstart über einen Zeitraum von 10 min in Abständen von 2 min Proben des Reaktionsansatzes zur Messung der nicht-umgesetzten H_2O_2 -Menge entnommen und mittels FOX-Lösung (Reaktionszeit 5 min) gemessen. Für die Reaktionsansätze wurden 4 μM rekombinantes Bcp, C49S bzw. C54S und 600 μM H_2O_2 (Startmenge) gewählt, gegebenenfalls unter Zusatz von 4 μM TrxA. Die Umsatzraten wurden durch jeweils drei Messungen von drei verschiedenen Enzympräparationen bestimmt. Abbildung 31 zeigt die Umsetzung von H_2O_2 durch heterolog exprimiertes Bcp bzw. seine C49S/C54S-Derivate.

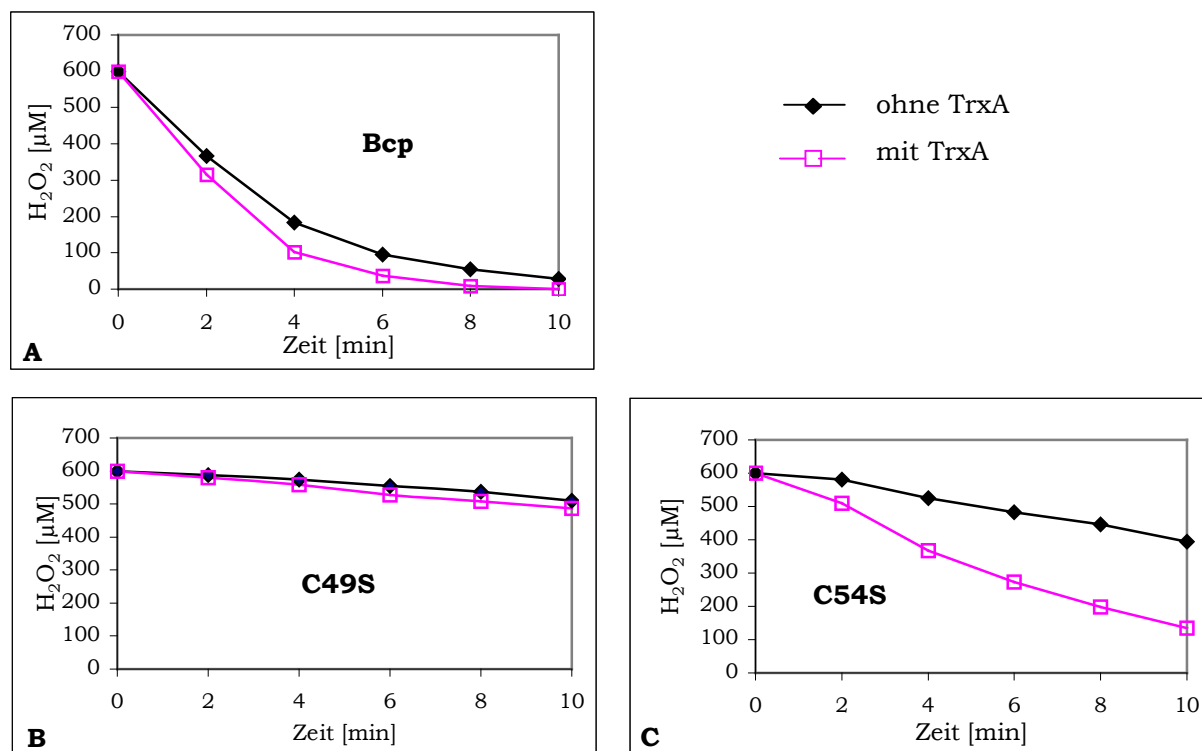


Abb. 31 Abbau von H₂O₂ durch Bcp (A), C49S (B) und C54S (C).

Die Reaktion zwischen Bcp und H₂O₂ scheint nicht Thioredoxin-abhängig zu sein. Dies steht im Widerspruch zu Literatur-Daten (Jeong *et al.* 2000; Wang *et al.* 2005). Das Derivat C49S weist keine nennenswerte Peroxidaseaktivität auf, dagegen besitzt C54S eine schwache Aktivität ohne Thioredoxin, die mit Thioredoxin etwa verdoppelt wird, jedoch nicht die Bcp-Aktivität erreicht.

Der maximale Substratumsatz innerhalb der ersten 2 min ist in Abb. 32 wiedergegeben. Bcp hat eine hohe Präferenz für H₂O₂, ohne Thioredoxin als Reaktionspartner werden 29,2 μM H₂O₂ μM Bcp⁻¹ min⁻¹ umgesetzt, mit Thioredoxin erhöht sich dieser Wert auf 35,6 μM H₂O₂ μM Bcp⁻¹ min⁻¹.

Die Aktivität des C54S-Proteins erreicht mit *E. coli* Thioredoxin A etwa 40 % des Wildtyps. Die ermittelten Daten deuten auf die Notwendigkeit beider Cysteine für eine volle Aktivität hin. Fehlt Cys₄₉ im Protein bei intaktem Cys₅₄, so ist keine Aktivität vorhanden. Ist dagegen Cys₄₉ intakt bei fehlendem Cys₅₄, so kann eine abgeschwächte Aktivität nachgewiesen werden. Cys₄₉ scheint damit für eine generelle Aktivität von Bcp essentiell zu sein.

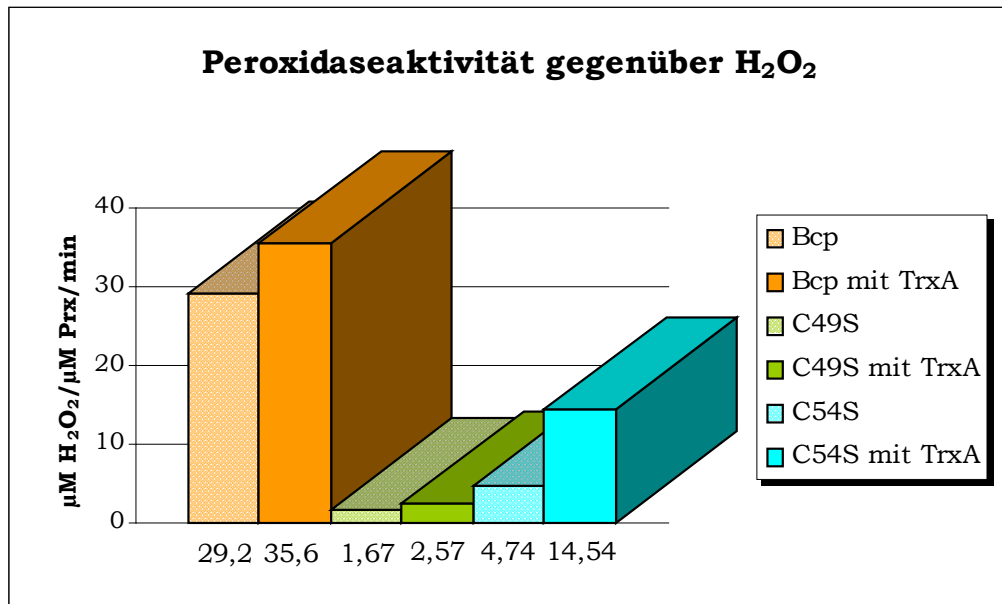


Abb. 32 Peroxidaseaktivität von Bcp und seinen C49S/C54S-Derivaten gegenüber H₂O₂ in den ersten 2 Minuten, angegeben als Umsatzrate in µMol H₂O₂ µMol Prx⁻¹ min⁻¹

Zur Kontrolle wurde die Testreihe ohne Zusatz des Elektronendonors DTT zu der Peroxidverdünung jeweils mit und ohne TrxA-Zusatz wiederholt. Erstaunlicherweise scheint Bcp die Umsetzung von H₂O₂ unabhängig von der Anwesenheit DTTs ohne erkennbaren Aktivitätsverlust durchführen zu können.

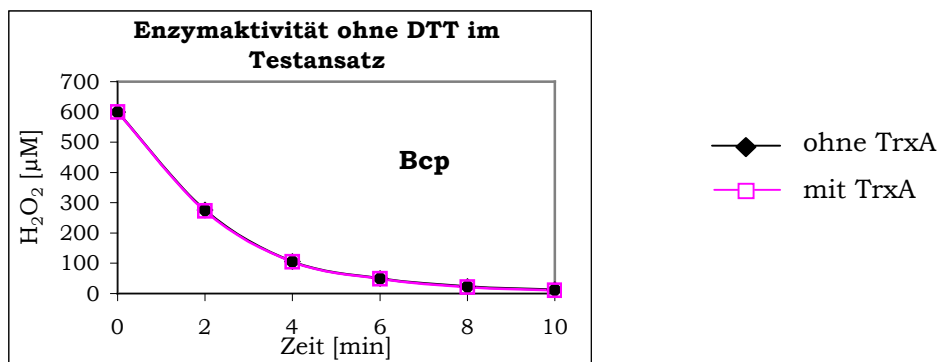


Abb. 33 Abbau von H₂O₂ durch Bcp (ohne Elektronendonor DTT im Testansatz).

Um zu überprüfen, ob Bcp für die Umsetzung von H₂O₂ auch andere Thioredoxine akzeptiert, wurde Thioredoxin TrxY1 von *Arabidopsis thaliana* für eine weitere Testreihe eingesetzt (Abb. 34A). Auch in diesem Fall wurde getestet, ob DTT für die Reaktion essentiell ist (Abb. 34B). Neben den Chloroplasten-Haupt-Thioredoxinen F und M, die *in vitro* spezifisch mit dem Calvin-Zyklus bzw. mit entweder Glucose-6-Phosphatdehydrogenase oder NADP-Malatdehydrogenase verbunden sind, existieren in geringer Menge die Thioredoxine X und Y, für die eine Peroxiredoxin-

Spezifität gezeigt werden konnte (Buchanan und Balmer 2005; Collin *et al.* 2003). Die Testergebnisse mit dem pflanzlichen Thioredoxin TrxY1 entsprechen den mit TrxA von *E. coli* ermittelten Ergebnissen, auch in diesem Fall scheint DTT nicht essentiell zu sein.

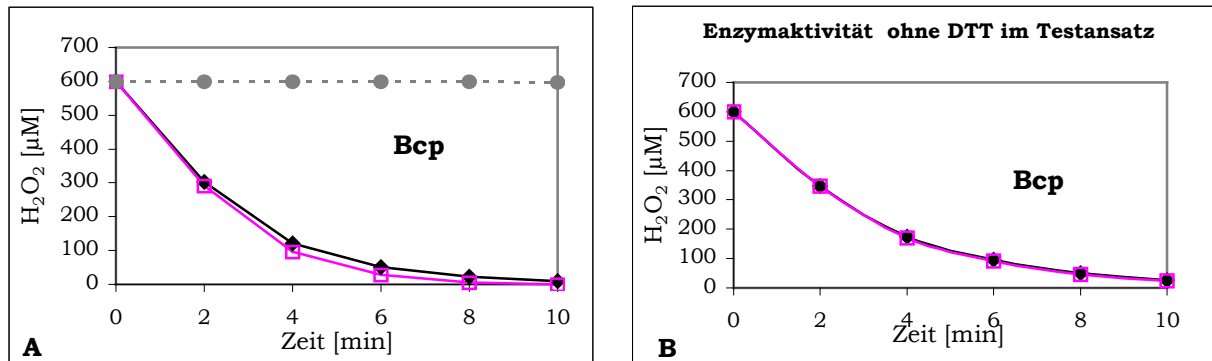


Abb. 34 Abbau von H₂O₂ durch Bcp ohne und mit Anwesenheit von TrxY1 von *A. thaliana* (A), sowie ohne Elektronendonator DTT im Testansatz (B).
(—◆— ohne TrxY1, —□— mit TrxY1, —●— Kontrolle)

In einem weiteren Test wurden statt Thioredoxin und DTT Glutaredoxin (Grx) und Glutathion (GSH) in den Konzentrationen 4 μM Grx und 500 μM GSH bei sonst unveränderten Testbedingungen eingesetzt (Abb. 35). Ebenso wie in den Messreihen mit Bcp und den getesteten Thioredoxinen zeigen die Ansätze für die Peroxidaseaktivität ohne und mit Glutaredoxin keine Unterschiede.

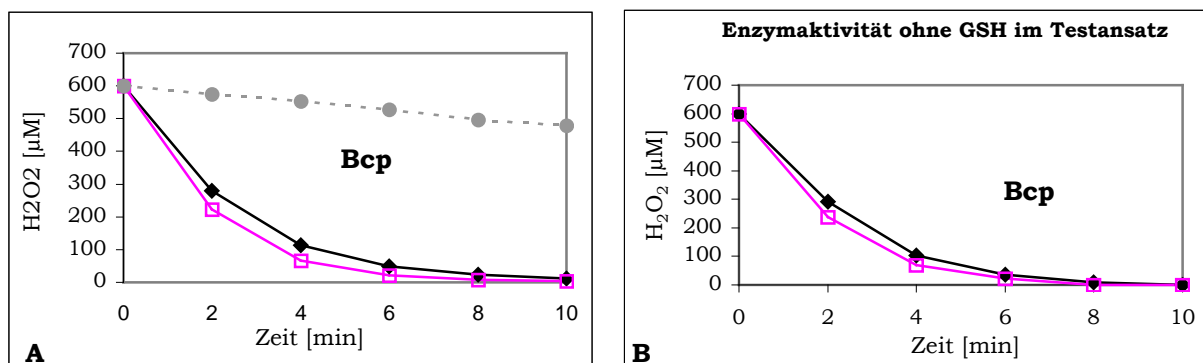


Abb. 35 Abbau von H₂O₂ durch Bcp im Testsystem Glutaredoxin/Glutathion ohne und mit Anwesenheit von Grx und mit GSH (A), sowie ohne Elektronendonator GSH im Testansatz (B).
(—◆— ohne Grx, —□— mit Grx, —●— Kontrolle)

Im Aktivitätstest von Bcp gegenüber H₂O₂ mit Glutaredoxin als Reduktionsmittel konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Reaktion unabhängig von der Anwesenheit des Elektronendonors Glutathion stattfindet, allerdings steigert die Anwesenheit von GSH die H₂O₂-Umsatzrate von 33,5 μM H₂O₂ μM Bcp⁻¹ min⁻¹ auf 40,1 μM H₂O₂ μM Bcp⁻¹ min⁻¹.

4.4.2 Peroxidaseaktivität von Bcp gegenüber Cumenehydroperoxid

Das Zell-toxische Cumenehydroperoxid dient neben t-Butylhydroperoxid als Modellsubstanz für Alkyl-Hydroperoxide. Analog zur Versuchsanordnung mit dem Substrat H_2O_2 wurden Testreihen mit $4 \mu\text{M}$ rekombinantem Bcp, C49S bzw. C54S und $200 \mu\text{M}$ Cumenehydroperoxid (CMOOH) durchgeführt, gegebenenfalls unter Zusatz von $4 \mu\text{M}$ *E. coli* TrxA. Die OD_{560} wurde in diesem Fall nach 14 min Reaktionszeit mit FOX-Lösung gemessen.

Für das Substrat Cumenehydroperoxid konnte für Bcp eine Thioredoxin-abhängige Peroxidaseaktivität gezeigt werden (Abb. 36A), das C49S-Derivat weist dagegen keinerlei Aktivität auf (Abb. 36B). Wie schon bei dem Versuchsansatz des Derivates C54S und dem Substrat H_2O_2 ist die Peroxidaseaktivität nachweisbar, jedoch gegenüber dem Wildtyp-Protein abgeschwächt. Die Reaktion des C54S-Protein ist ebenfalls Thioredoxin-abhängig (Abb. 36C). Wie schon in den Versuchen mit H_2O_2 gezeigt, deuten auch die mit dem Substrat Cumenehydroperoxid erhaltenen Ergebnisse auf Cys₄₉ als katalytisch essentiell für die Peroxidaseaktivität hin. Abbildung 37 veranschaulicht den maximalen Substratumsatz in den ersten 3 Minuten. Das C54S-Protein erreicht dabei etwa 1/3 der Wildtypaktivität.

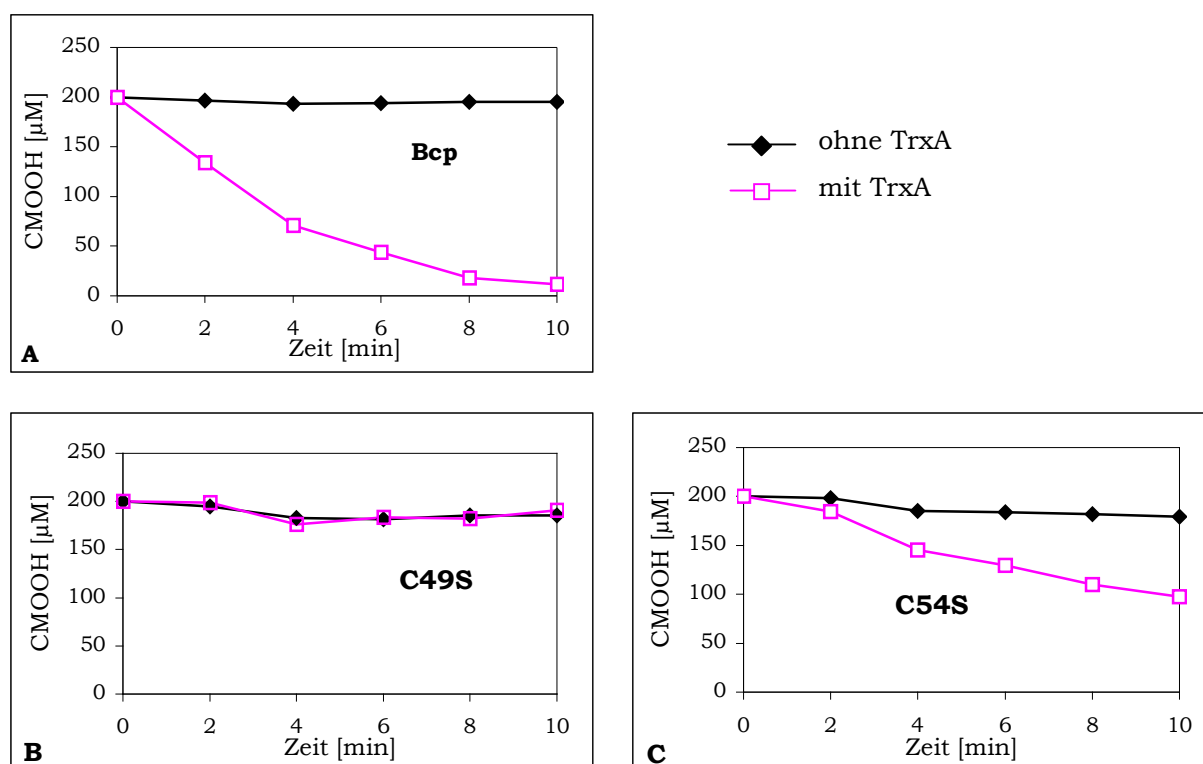


Abb. 36 Abbau von Cumenehydroperoxid (CMOOH) durch Bcp (A), C49S (B) und C54S (C).

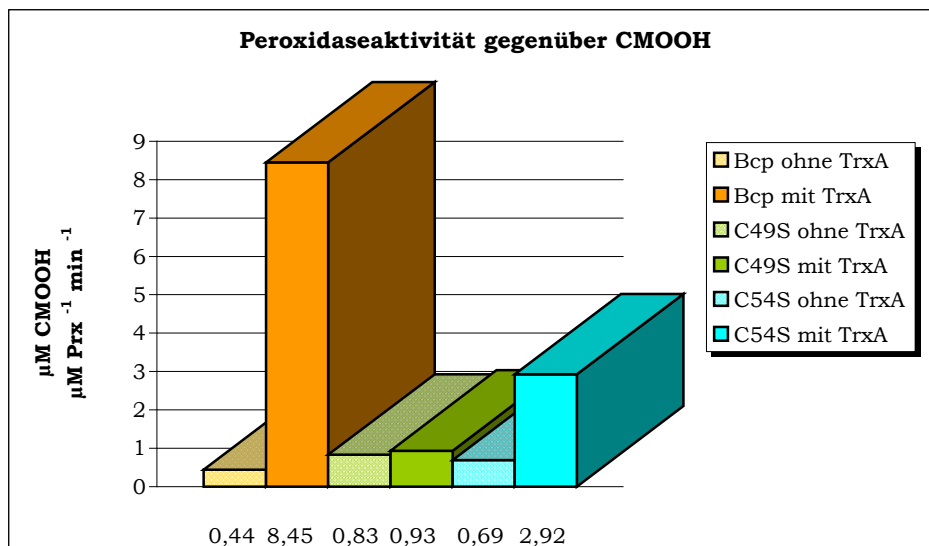


Abb. 37 Peroxidaseaktivität von Bcp und seinen C49S/C54S-Derivaten gegenüber Cumenhydroperoxid (CMOOH) in den ersten 3 Minuten, angegeben als Umsatzrate in $\mu\text{Mol CMOOH } \mu\text{Mol Prx}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

4.4.3 Peroxidaseaktivität von Bcp gegenüber t-Butylhydroperoxid

In einer weiteren Messreihe wurde das synthetische Hydroperoxid t-Butylhydroperoxid (BOOH), ein organisches Hydroperoxid mit einfachem Molekülaufbau, als Substrat gewählt. Versuchsanordnung und die gewählten Substratkonzentrationen entsprachen der Messung von Cumenhydroperoxid, als Startmenge für die Reaktion wurden ebenfalls 200 μM t-Butylhydroperoxid eingesetzt.

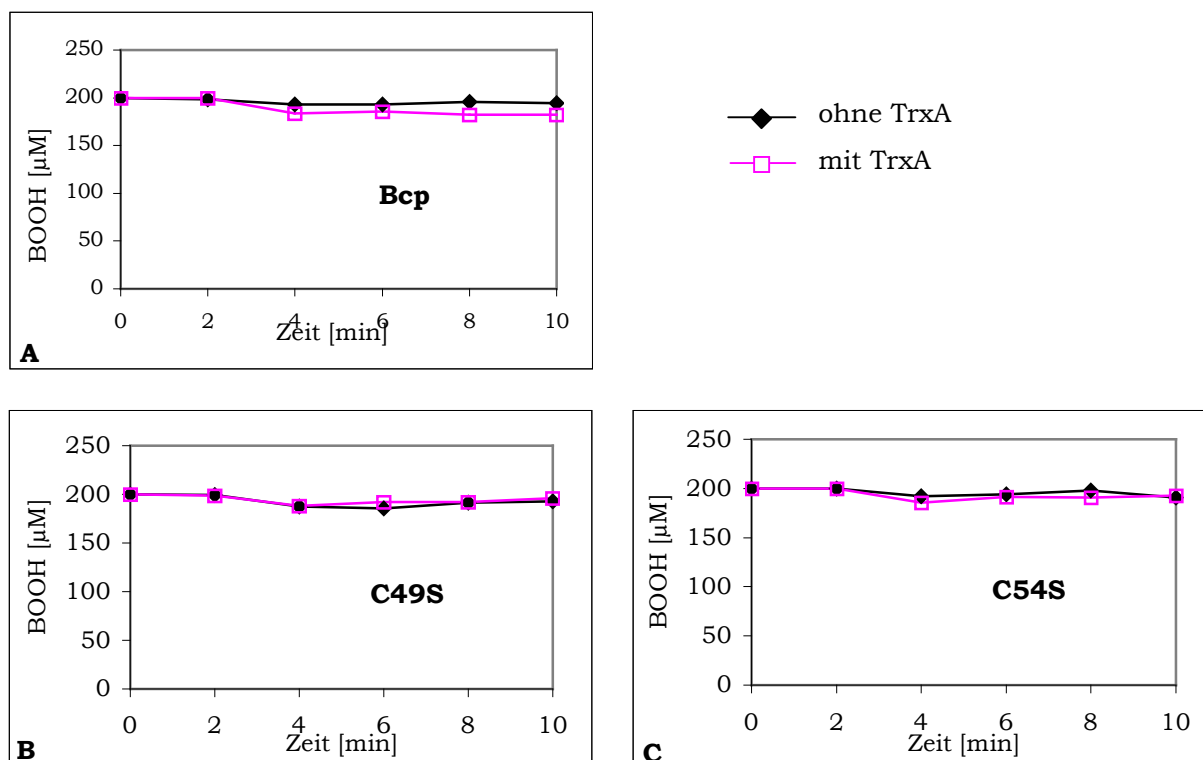


Abb. 38 Abbau von t-Butylhydroperoxid (BOOH) durch Bcp (A), C49S (B) und C54S (C).

Die Messung der OD₅₆₀ erfolgte nach 9 min Reaktionszeit mit FOX-Lösung. Die Ergebnisse (Abb. 38) belegen eindeutig, dass Bcp und seine Derivat-Proteine C49S und C54S keinerlei Aktivität für das Substrat t-Butylhydroperoxid besitzen.

4.4.4 Peroxidaseaktivität von Bcp gegenüber Linolsäurehydroperoxid

Als weiteres Substrat für den Test auf Peroxidaseaktivität von Bcp und seinen Derivaten wurde Linolsäurehydroperoxid (LaOOH) gewählt. Diese Substanz ist hoch toxisch für biologische Systeme. Hochreaktive Lipidhydroperoxide gehören zu den im Zuge der Pflanzenabwehr auf bakterielle Pathogene produzierten ROS (Jalloul *et al.* 2002). Die bei mikrobieller Invasion induzierten pflanzlichen Lipoxygenasen katalysieren dabei die Reaktion der Fettsäurevorstufen wie Linol- oder Linolensäure mit molekularem Sauerstoff zu Fettsäurehydroperoxiden (Kolomiets *et al.* 2000). Der Peroxidasetest wurde hinsichtlich Versuchsbedingungen, Enzym- und Substratkonzentrationen analog zu den Tests mit Cumenehydroperoxid bzw. t-Butylhydroperoxid durchgeführt. Wie in Abbildung 39 dargestellt, findet durch Bcp keinerlei Entgiftung des komplex aufgebauten Linolsäurehydroperoxids statt.

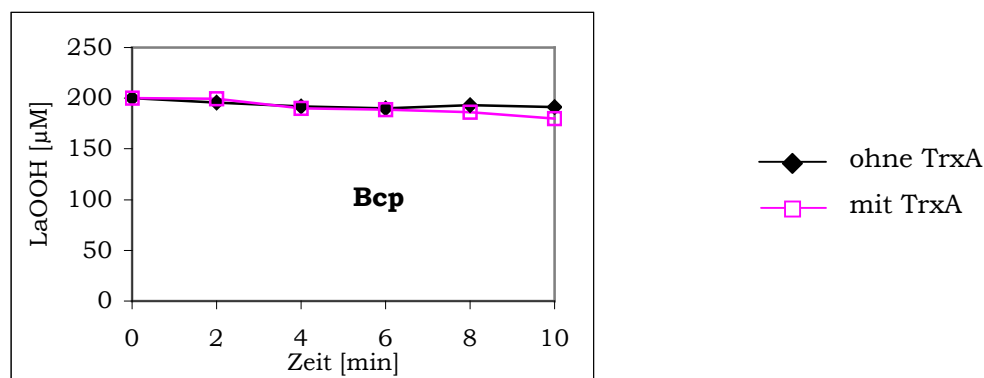


Abb. 39 Abbau von Linolsäurehydroperoxid (LaOOH) durch Bcp.

5. AhpE von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Im Zuge des Genomprojektes von *Cmm* NCPPB382 wurde ein weiteres *bcp*-homologes Gen identifiziert. Das AhpE (Alkylhydroperoxid Reduktase E) kodierende, 474 bp große Gen *ahpE* (open reading frame CMM_1622 des Chromosoms) besitzt einen GC-Gehalt von 69,2 %. Das Genprodukt AhpE besteht aus 157 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 17467,9 Da. Ebenso wie bei *bcp* ist auch in der *ahpE*-Sequenz keine Signalsequenz vorhanden, beide sind

atypische 2-Cys-Peroxiredoxine der AhpC/TSA-Familie und auf Proteinebene zu 32 % identisch (Abb. 40).

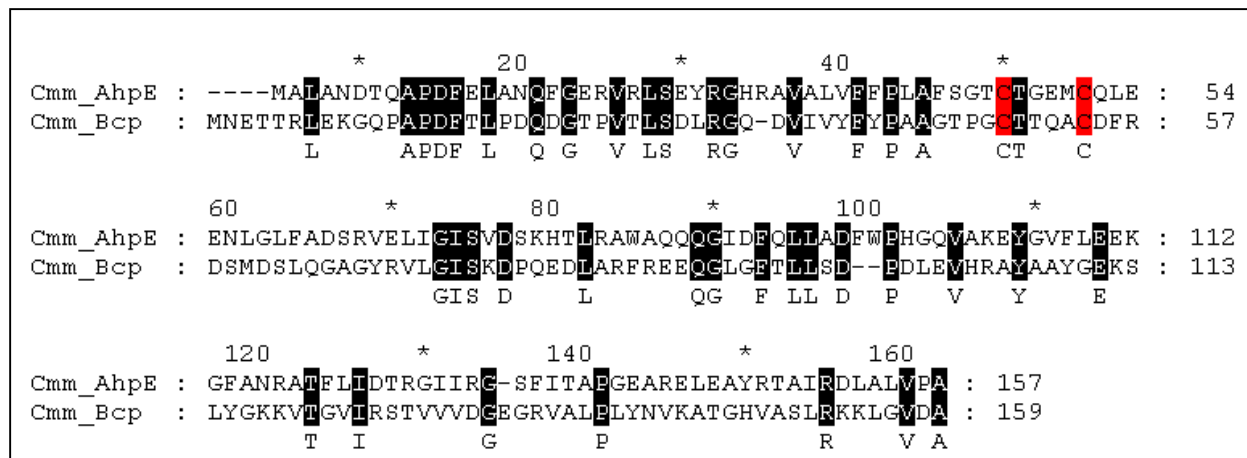


Abb. 40 Multiples Alignment von AhpE und Bcp von *Cmm* NCPPB382.

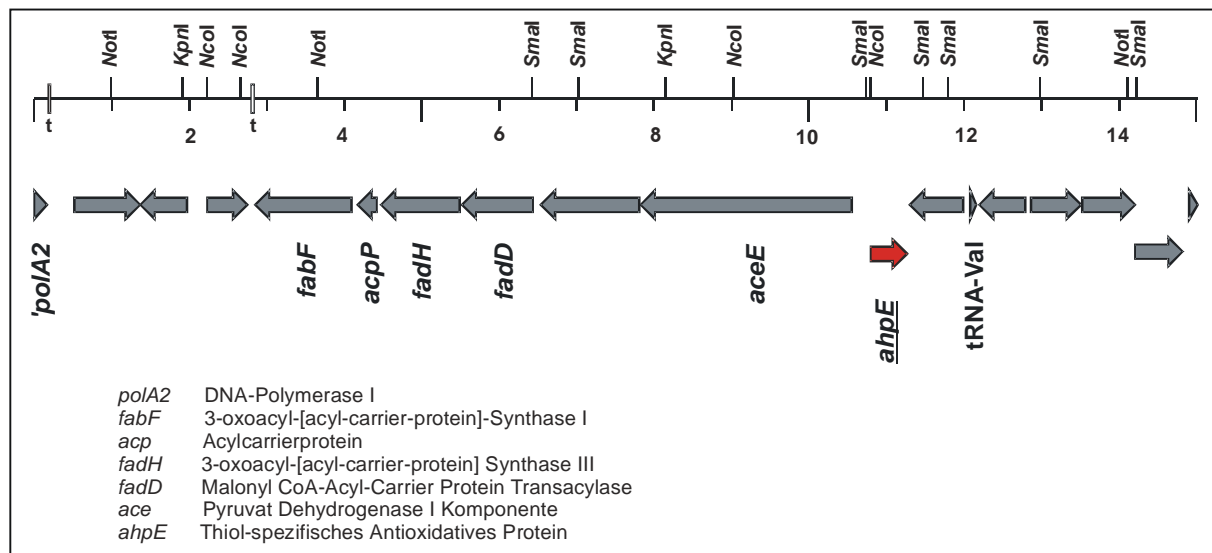


Abb. 41 Genregion von *ahpE* auf dem Chromosom von *Cmm* NCPPB382.

Homologievergleiche mit einigen bakteriellen AhpE-Proteinen sind in Tabelle 4 wiedergegeben (Protein-Alignments siehe Anhang 2.2). AhpE ist ein Homolog des 2-Cys-Peroxiredoxins AhpC. Beide Proteine existieren nebeneinander im Chromosom von *Mycobacterium tuberculosis* und weisen hier 34 % Sequenzidentität auf (Li *et al.* 2005). Daneben besitzt *M. tuberculosis* die chromosomal kodierten Alkylhydroperoxidreduktasen AhpD, AhpE, Bcp und BcpB, die vermutlich je nach Substratspezifität alternativ oder gemeinsam Entgiftungsreaktionen durchführen. Im Gegensatz hierzu besitzt *Cmm* keine für AhpC oder AhpD, sowie BcpB kodierenden Gene.

Herkunft	Aminosäuren	Identität	Ähnlichkeit
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	157 aa	98 %	99 %
<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	157 aa	70 %	81 %
<i>Arthrobacter</i> spec.	170 aa	56 %	72 %
<i>Streptomyces coelicolor</i>	152 aa	48 %	71 %
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	153 aa	46 %	64 %
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	153 aa	47 %	61 %

Tab. 4 Ähnlichkeit bakterieller AhpE-Proteine mit AhpE von *Cmm* NCPPB382.

Analog zur Insertionsmutagenese von *bcp* wurde versucht, das *ahpE*-Gen in *Cmm*382-Zellen bzw. Zellen *bcp*-Mutante zu inaktivieren, um dessen Phänotyp in der Interaktion mit der Tomate zu testen. Leider verliefen diese Versuche erfolglos. Die Charakterisierung von AhpE fand daher mittels des nach Überexpression in *E. coli* isolierten und gereinigten Proteins in enzymatischen Tests statt.

5.1 Überexpression von AhpE in *E. coli*

Als Ausgangs-DNA für die Konstruktion des Expressionsvektors diente das im Rahmen des *Cmm* NCPPB382-Genomprojektes hergestellte Sequenzierplasmid *cmis2p0451h08* (Anhang 3.6). Dieses trägt ein 2,5 kb Fragment des Chromosoms, auf dem *ahpE* liegt.

Die Konstruktion des Expressionsvektors *pET-ahpE* erfolgte über Amplifikation eines *ahpE*-PCR-Produktes mittels der Primer *ahpE pET-F1* und *pET-R1* sowie der Template *cmis2p0451h08*. Das PCR-Produkt besteht aus der *ahpE*-Sequenz ohne Stopcodon und flankierenden Restriktionsschnittstellen für *NdeI* und *NotI*. Das *NdeI/NotI*-gespaltene PCR-Produkt wurde in den ebenso hydrolysierten Expressionsvektor *pET22b(+)* kloniert, das Signalpeptid des Vektors geht dabei verloren. Der resultierende Vektor *pET::ahpE* enthält die kodierende Sequenz von *ahpE*, verlängert um 5 Codons und ein Epitop-Tag aus 6 Histidinen. Das Gesamtpeptid mit His-Tag hat ein Molekulargewicht von 18,75 kDa. Der Vektor *pET::ahpE* wurde nach Sequenzierung in den Stamm *E. coli* BL21(DE3) gebracht. Die Überexpression erfolgte analog der Überexpression von *Bcp* und seinen C49S/C54S-Derivaten durch Induktion mit IPTG.

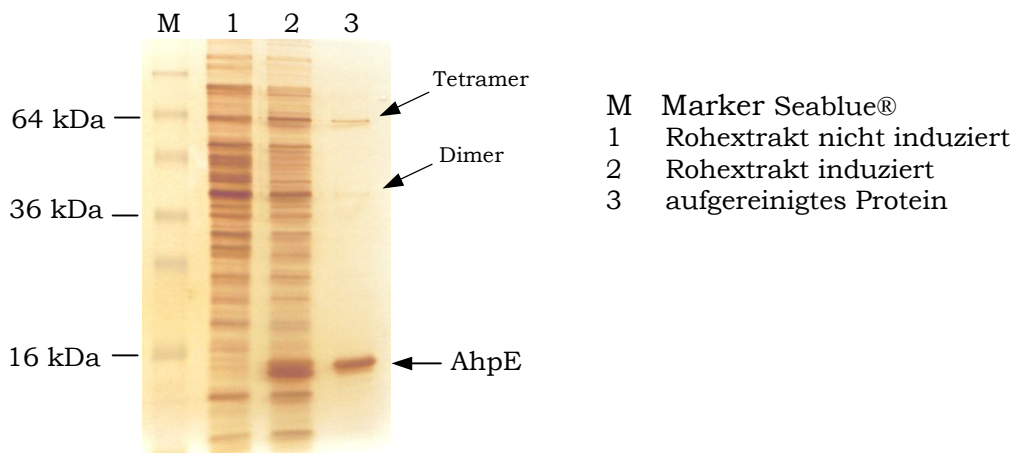


Abb. 42 SDS-PAGE der AhpE-Expression (Silberfärbung).

Das überexprimierte AhpE-Protein erscheint im SDS-PAGE (Abb 42) als diffuse Doppelbande. Dies deutet auf geringfügige Modifikationen des Moleküles und damit schwach verändertes Laufverhalten im Gel. Mögliche Ursache könnte ein Molekülgemisch von reduziertem und schwach oxidiertem Molekül sein.

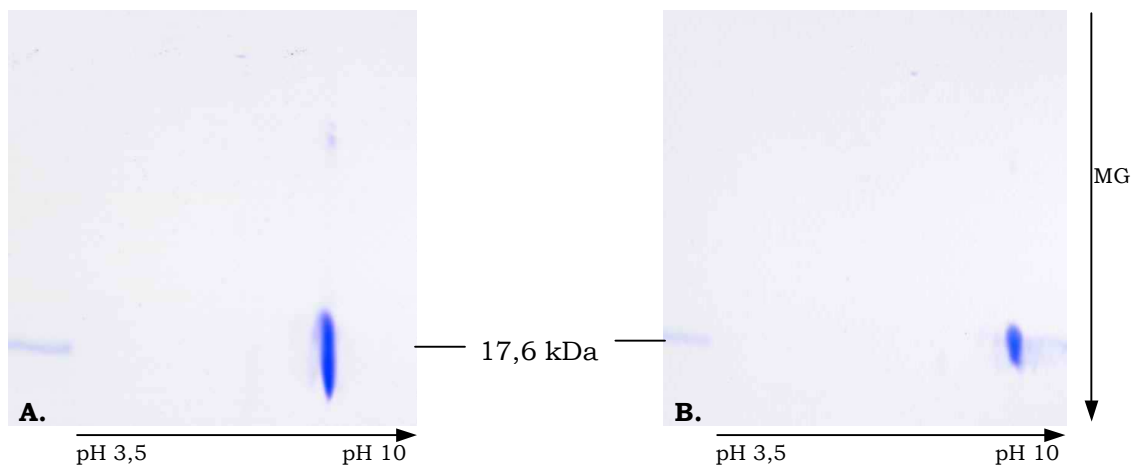


Abb. 43 2D-SDS-PAGE des überexprimierten AhpE unter reduzierenden (A.) und nicht-reduzierenden Bedingungen (B.) (Marker: Hüllprotein TMV 17,6 kDa) (Coomassie-Färbung).

Die Form des reduzierten Protein-Spots im 2D-SDS-PAGE (Abb. 43 A.) könnte ebenfalls ein Indiz hierfür sein. In beiden Polyacrylamidgelen erscheint die Proteingröße geringer als die durch Proteinmarker gekennzeichnete Bande. Dies könnte auf eine gegenüber Bcp veränderte Molekülform hinweisen, da Bcp und AhpE fast identische Molekulargewichte besitzen. Geringe Anteile gereinigten Proteins liegen als Dimer bzw. Tetramer vor (Abb. 42).

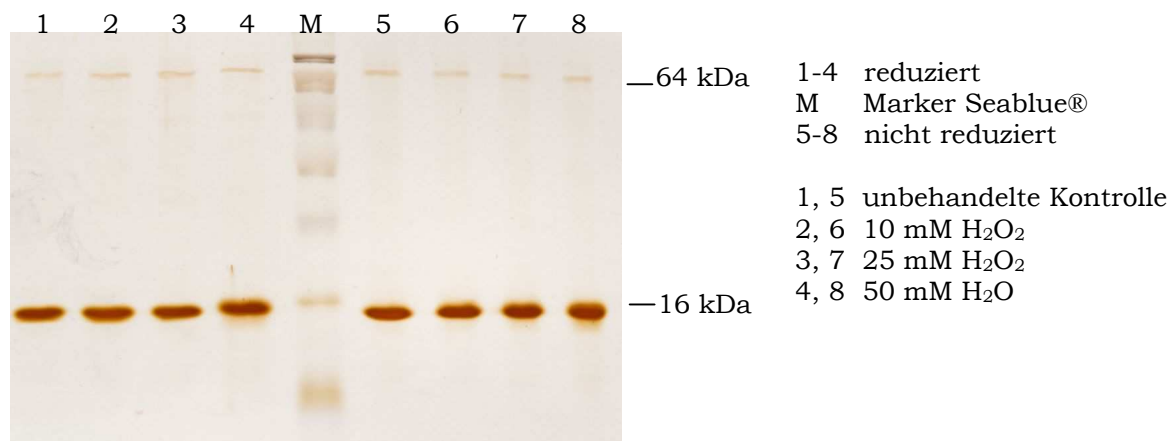


Abb. 44 Gelshift-Assay von AhpE (Silberfärbung).

Durch Behandlung des reduzierten bzw. nicht reduzierten Proteins mit variablen H₂O₂-Konzentrationen (für 1 h bei RT mit 10 mM, 25 mM und 50 mM H₂O₂) ist keinerlei Verschiebung zu größeren Molekulargewichten ersichtlich (Abb. 44). Lediglich die mit 50 mM H₂O₂ behandelten Proben erzeugen schwach diffuse Proteinbanden. Sowohl das reduzierte, als auch das nicht-reduzierte Protein liegt in geringer Menge als Tetramer vor.

5.2 Bestimmung der Peroxidaseaktivität von AhpE

Um eventuelle Unterschiede in der Bevorzugung einzelner Substrate sowie der Substrataktivitäten zwischen AhpE und Bcp festzustellen, wurde der FOX-Test von jeweils drei verschiedenen Proteinreinigungen in drei Parallelbestimmungen für die Substrate H₂O₂, Cumenehydroperoxid (CMOOH), t-Butylhydroperoxid (t-BOOH) und Linolsäurehydroperoxid (LaOOH) durchgeführt.

Die Reaktionsansätze wurden analog zu den Testansätzen von Bcp und seinen C49S/C54S-Derivaten mit 4 μM rekombinantem AhpE, gegebenenfalls Zusatz von 4 μM *E. coli* TrxA und Startkonzentrationen von 600 μM H₂O₂ bzw. jeweils 200 μM CMOOH, t-BOOH oder LaOOH durchgeführt, in allen Reaktionsansätzen war DTT enthalten. Reaktionszeiten wurden wie bei den Bcp-Peroxidaseaktivitätsmessungen beibehalten. Wie in Abbildung 45 zu sehen, scheint die Peroxidaseaktivität von AhpE strikt Thioredoxin-abhängig zu sein, wobei die Hauptaktivität auf der Entgiftung von Cumenehydroperoxid liegt.

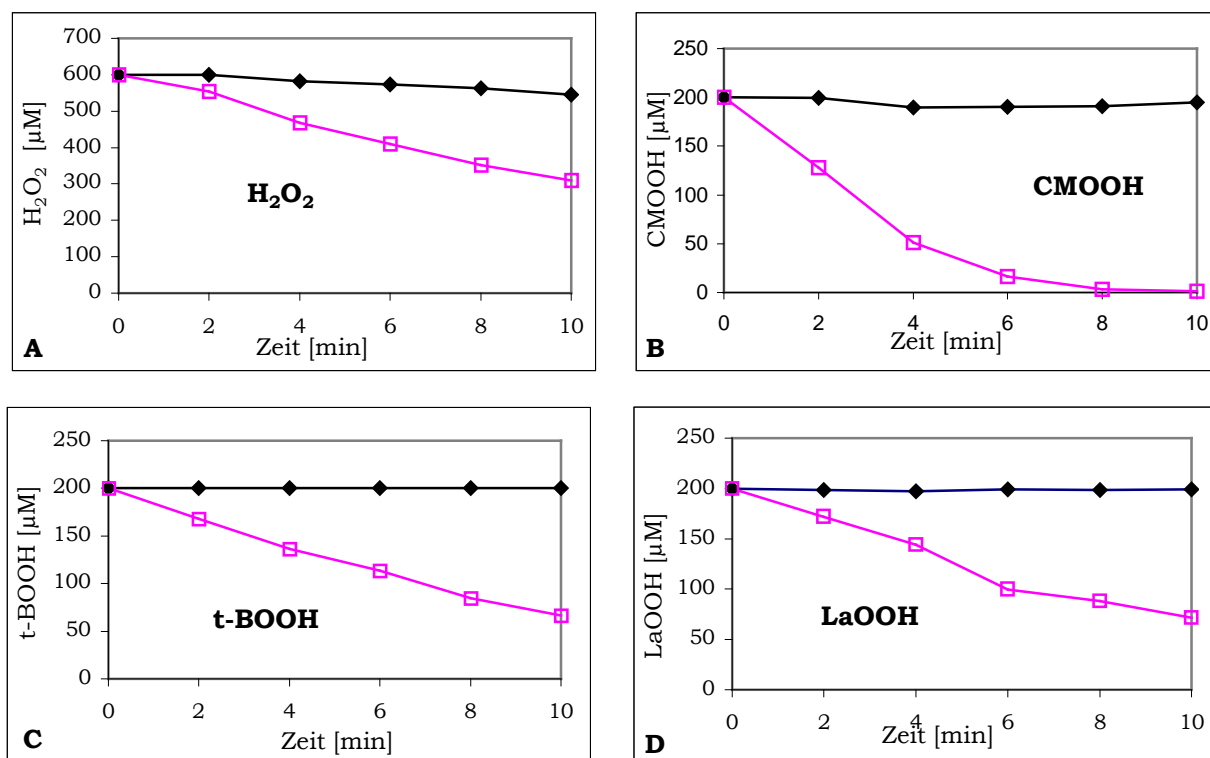


Abb. 45 Abbau von H₂O₂ (A), Cumenehydroperoxid (B), t-Butylhydroperoxid (C) und Linolsäurehydroperoxid (D) durch rekombinantes AhpE. (—◆— ohne TrxA, —□— mit TrxA)

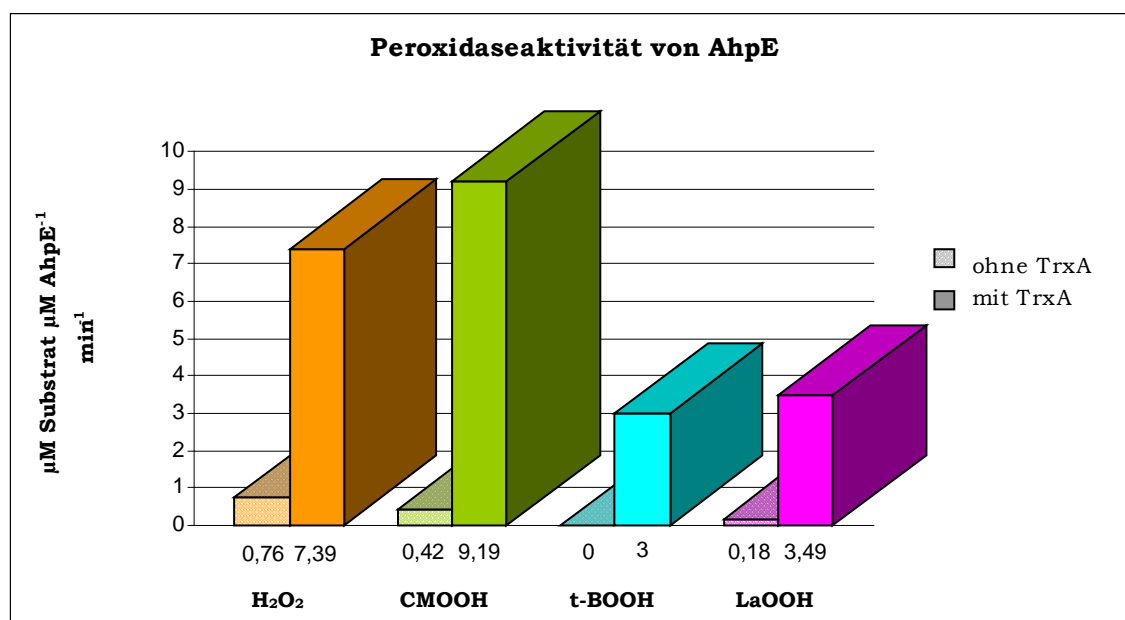


Abb. 46 Substratumsatz in μM Hydroperoxid μM AhpE⁻¹ min⁻¹ in den ersten 3 Minuten.

AhpE kann t-Butylhydroperoxid (t-BOOH) und Linolsäurehydroperoxid (LaOOH) etwa gleich gut abbauen. Die Abbaurate von Cumenehydroperoxid (CMOOH) ist dagegen mit 9,19 μM CMOOH μM AhpE⁻¹ min⁻¹ etwa dreimal so hoch, der Umsatz

von H_2O_2 beträgt ca. 80 % des CMOOH-Umsatzes. AhpE scheint also spezifisch für organische Hydroperoxide zu sein (Abb. 46).

Als weiteres Thioredoxin wurde TrxY1 von *A. thaliana* im Peroxidasetest mit AhpE und H_2O_2 eingesetzt. Es zeigte sich, dass dieses Reduktionsmittel nicht alternativ für TrxA von *E. coli* eingesetzt werden kann.

Um zu überprüfen, ob AhpE in Anwesenheit von Glutaredoxin Peroxidaseaktivität besitzt, wurden in einem weiteren Test Glutaredoxin und Glutathion in den Konzentrationen $4 \mu\text{M}$ Grx und $500 \mu\text{M}$ GSH (statt DTT) mit dem Substrat H_2O_2 (Startkonzentration $600 \mu\text{M}$) eingesetzt. Als Kontrolle diente ein Testansatz nur mit $500 \mu\text{M}$ GSH.

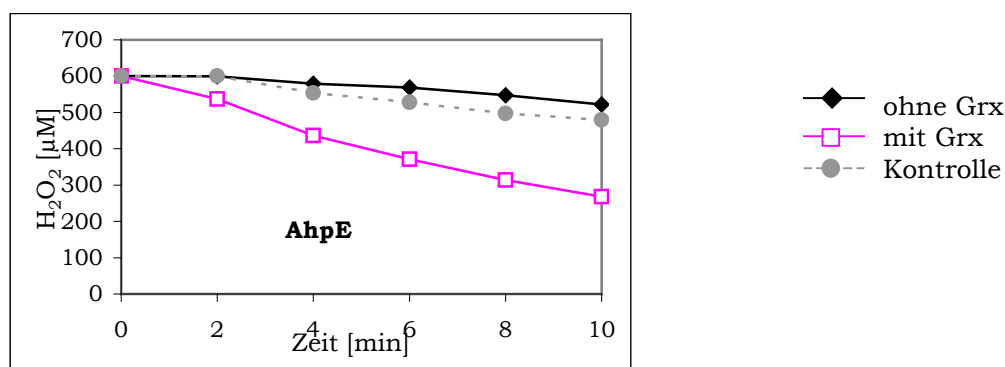


Abb. 47 Abbau von H_2O_2 durch AhpE im Testsystem Glutaredoxin/Glutathion.

AhpE kann H_2O_2 Grx-abhängig umsetzen. Die Umsatzrate in den ersten 3 Minuten liegt bei $0,9 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 \mu\text{M AhpE}^{-1} \text{min}^{-1}$ gegenüber einer Rate von $9,42 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 \mu\text{M AhpE}^{-1} \text{min}^{-1}$ bei Anwesenheit von Grx im Reaktionsansatz. Glutaredoxin ist damit ein geringfügig besseres Reduktionsmittel für AhpE mit H_2O_2 als Substrat, als TrxA von *E. coli*.

Die Substratpräferenz für AhpE liegt bei Cumenehydroperoxid > H_2O_2 > Linolsäurehydroperoxid > t-Butylhydroperoxid.

6. Vergleich der Peroxidaseaktivität von Bcp und AhpE

Bcp weist gegenüber H_2O_2 eine hohe Aktivität, die unabhängig von der Anwesenheit eines Thioredoxins bzw. Glutaredoxins und unabhängig von DTT im Reaktionsansatz ist, auf. Im Gegensatz hierzu besteht für AhpE eine moderate Aktivität gegenüber H_2O_2 (ca. 20 % der Bcp-Aktivität), die jedoch Thioredoxin-abhängig ist. Für das Substrat H_2O_2 erwies sich allerdings Glutaredoxin als das effektivere Reduktionsmittel. Sowohl Bcp, als auch AhpE können Cumenehydroperoxid (CMOOH) Thioredoxin-abhängig umsetzen, wobei die Umsatzraten bei beiden Peroxiredoxinen etwa gleich hoch sind. Im Gegensatz zu

AhpC ist Bcp nicht in der Lage, t-Butylhydroperoxid (t-BOOH) zu entgiften. Die Trx-abhängige Umsatzrate von t-BOOH für AhpE ist mit $3 \mu\text{M t-BOOH} \mu\text{M AhpE}^{-1} \text{ min}^{-1}$ jedoch recht niedrig. Linolsäurehydroperoxid kann durch Bcp nicht abgebaut werden. Im Gegensatz hierzu liegt die Trx-abhängige Umsatzrate von LaOOH durch AhpE bei einem niedrigen Wert von $3,49 \mu\text{M LaOOH} \mu\text{M AhpE}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

E. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war, über die bislang bekannten Gene hinausgehend, welche an der Bakterien-Pflanzen-Interaktion zwischen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und seiner Wirtspflanze Tomate (*Solanum lycopersicum*) beteiligt sind, weitere Gene zu identifizieren, die eine Rolle bei der Kolonisation oder in der Überwindung der Pflanzenabwehr spielen könnten. Die im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführte Shotgun-Sequenzierung (Engemann 2001) lieferte einige Hinweise zu möglicherweise interaktionsspezifischen chromosomalen Genen von *Cmm*. Eines dieser Gene, das für „Bacterioferritin comigratory protein“ kodierende *bcp*, wurde für die Herstellung einer Mutante und die weitergehende Charakterisierung ausgewählt.

1. Charakterisierung der *bcp*-Mutante von *Cmm*

Bcp wird zur ubiquitär vorkommenden Proteinfamilie der AhpC/TSA gerechnet, die mit allgemeinem Namen als Peroxiredoxine (Prx) bezeichnet werden (Chae and Rhee 1994; Chae *et al.* 1994a). Prx sind eine relativ neue Familie von Peroxidasen, die keine prosthetische Gruppe besitzen, sondern mittels redoxaktiver Cysteinreste unter Beteiligung von Thioredoxin, Thioredoxinreduktase und NADPH die Reduktion von H₂O₂ und organischen Hydroperoxiden zu den entsprechenden Alkoholen und Wasser katalysieren (Chae *et al.* 1994a). Innerhalb der Familie der AhpC/TSA-Proteine, die auf Grund der Anzahl und Lage der katalytisch wirksamen Cysteine in 1-Cys Prx sowie typische und atypische 2-Cys Prx klassifiziert werden (Wood *et al.* 2003), wurde Bcp zunächst der Klasse der 1-Cys Prx zugerechnet (Jeong *et al.* 2000; Hofmann *et al.* 2002). Bcp verfügt über zwei benachbarte Cysteine (Cys₄₅ und Cys₄₉ in *E. coli*), wobei das erste dieser beiden Cysteine als das katalytische Zentrum der Reaktion anzusehen ist (Jeong *et al.* 2000). Bcp von *Cmm* (159 aa, 17,2 kDa) besitzt die konservierten Cysteine an Aminosäure-Position 49 und 54. Um eine Auswirkung des *bcp*-Gens *in vivo* und *in planta* überprüfen zu können, wurde eine *bcp*-Mutante durch Insertionsmutagenese hergestellt.

1.1. Charakterisierung der *bcp*-Mutante *in vivo*

Die Überprüfung des Wachstumsverlaufes der *bcp*-Mutante in Flüssigkultur bei normalem Sauerstoffeintrag zeigte im Vergleich zum Wildtyp *Cmm* NCPPB382 keine signifikanten Unterschiede. Auch auf der Agarplatte ist keine veränderte Koloniemorphologie zu erkennen. Dies entspricht dem zu erwartenden Ergebnis, da

bislang nur eine *bcp*-Mutante des microaerophilen Bakterienstammes *Helicobacter pylori* bei Sauerstoffexposition eine gegenüber dem Wildtyp signifikante Sensitivität zeigte (Wang *et al.* 2005). Bei dem obligat anaeroben Bakterienstamm *Clostridium acetobutylicum* führte das Durchspülen einer Flüssigkultur mit 5 % Sauerstoff innerhalb von 10 Minuten zu einer hohen Expression von *bcp* (Kawasaki *et al.* 2005), d. h. mikro-aerobe Bedingungen können so überwunden werden. Eine *bcp*-Mutante des fakultativ anaeroben γ -Proteobakteriums *E. coli* zeigte bei aerobem Wachstum auf der Agarplatte ein gegenüber dem Wildtyp reduziertes Wachstum (Jeong *et al.* 2000). Ein Defekt im *bcp*-Gen könnte möglicherweise nur bei Wachstumstests bei fakultativ anaeroben oder mikroaerophilen Bakterien unter minimalem Sauerstoffpartialdruck einen Einfluss besitzen. Da *Cmm* jedoch zu den obligat aeroben Bakterienstämmen gehört, ist erst bei Zugabe von H_2O_2 oder organischen Hydroperoxiden zum Kulturmedium mit einer Wirkung auf das Wachstum zu rechnen.

Der Wachstumsverlauf bei H_2O_2 -Zugabe zeigte wahrscheinlich auf Grund der Aktivität der *Cmm*-eigenen, durch das *Cmm*-Genomprojekt identifizierten Häm- und Nichthäm-Katalasen (*katA* CMM_0737; Mn-haltige Katalase CMM_0426) sowie Superoxiddismutase *sodA* (CMM_1745) keine Beeinträchtigung des Wachstums. Um daher *in vivo* den Nachweis der H_2O_2 -Entgiftung durch Bcp erbringen zu können, wäre die Herstellung von Mehrfach-Mutanten erforderlich. Diese Mutanten von *Cmm* wären vermutlich jedoch auf Grund der Tatsache, dass *Cmm* ein obligat aerober Organismus ist, nicht lebensfähig.

Da im Genom von *Cmm* NCPPB382 zunächst keine anderen *bcp*-homologen Gene gefunden wurden, sollte die Zugabe der organischen Modell-Alkylhydroperoxide Cumenehydroperoxid (Jacobson *et al.* 1989) und t-Butylhydroperoxid eine größere Aussagekraft in Bezug auf Wachstumsunterschiede der *bcp*-Mutante haben. Organische Hydroperoxide können eine Lipidperoxidation-Kettenreaktion auslösen und infolgedessen vermehrt zu freien Radikalen führen, die DNA und Membranen schädigen (Halliwell and Gutteridge 1984).



Abb. 48 Strukturformeln von Cumenehydroperoxid (A) und t-Butylhydroperoxid (B)

Die Zugabe von Cumenehydroperoxid zur Flüssigkultur bewirkte eine starke Wachstumsbeeinträchtigung, die allerdings sowohl beim Wildtyp, als auch bei der Mutante in gleicher Stärke auftritt. Das gleiche Phänomen tritt in Flüssigkultur mit t-Butylhydroperoxid auf, das Wachstum ist hier jedoch weniger stark gehemmt. Die daraus folgende Vermutung, dass für Bcp innerhalb der Bakterienzelle ein weiteres Gen mit Hydroperoxidreduktionsaktivität vorhanden ist, konnte im weiteren Verlauf dieser Arbeit anhand der Enzymaktivitätstests des Bcp-Homologes AhpE bestätigt werden, welches die Entgiftung der beiden organischen Hydroperoxide durchgeführt haben könnte.

Auch die mittels Agardiffusionstest mit den Hydroperoxiden erhaltenen Hemmhöfe entsprechen dem in Flüssigkultur ermittelten Ergebnis hinsichtlich der kaum vorhandenen Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp. Im Gegensatz zu dem in Flüssigkultur ermittelten Ergebnis sind sowohl *Cmm* NCPPB382, als auch die *bcp*-Mutante nicht sensitiv gegenüber t-Butylhydroperoxid. Mit H₂O₂ wird eine schwach hemmende Wirkung bei *Cmm* erzielt, Cumenehydroperoxid tritt als starkes Zellgift mit großem Hemmhof in Erscheinung, wobei die *bcp*-Mutante minimal sensitiver als der Wildtyp *Cmm* NCPPB382 ist. Auch im Falle des Agardiffusionstestes ist somit die Peroxidaseaktivität von AhpE erkennbar.

Bcp-Mutanten von *E. coli* sind hypersensitiv für H₂O₂ und t-Butylhydroperoxid (Jeong *et al.* 2000). Die Bcp-Konzentrationen in *E. coli* scheinen während des exponentiellen Wachstums anzusteigen (Carmel-Harel and Storz 2000).

1.2. Charakterisierung der *bcp*-Mutante *in planta*

Als Kontrollsysteme für die Bakterien-Pflanzen-Interaktion dienen die kompatible Interaktion mit der Krankheitsauslösung in der Wirtspflanze, als auch die inkompatible Interaktion mit der Pflanzenabwehr (HR) der Nichtwirtspflanze.

Die *bcp*-Mutante und die *Cmm*-Kontrollstämme wurden im Pflanzentest mit der Wirtspflanze *Solanum lycopersicum* nach Wurzelinfektion über einen Zeitraum von 28 Tagen auf einsetzende Welkesymptome kontrolliert. Als direkte Kontrolle der *bcp*-Mutante müssen Vergleiche mit dem Curingderivat CMM101 (pCM1) angestellt werden. Insgesamt zeigen die Welkeverlaufdiagramme von *bcp* und CMM101 keine Unterschiede. Damit ist eindeutig belegt, dass Bcp keinerlei Auswirkungen auf die Krankheitsauslösung hat.

Die zeitliche Überprüfung der Kolonisation von Tomatenpflanzen durch die *bcp*-Mutante bzw. den Kontrollstamm CMM101 durch Titerbestimmung wurzelinfizierter Tomatenhomogenate zeigte ebenfalls keinerlei Unterschiede. Dies könnte daran

liegen, dass die früheste Titerbestimmung erst 5 Tage nach Infektion brauchbare Daten lieferte und somit die Titer der ersten Tage der Kolonisation nicht erfasst werden konnten. 5 Tage nach Infektion scheint die *bcp*-Mutante minimal besser zu kolonisieren. Bei beiden *Cmm*-Stämmen wurden erste Titer im Bereich von 10^5 - 10^6 cfu/g Pflanze gefunden, die Zellvermehrung erfolgt etwa gleich schnell.

Trotzdem könnte Bcp Einfluss auf die Kolonisation der Wirtspflanze besitzen. Dies wird durch Vergleich des Habitus der infizierten Pflanzen deutlich. Bei visuellem Vergleich der mit der *bcp*-Mutante infizierten Tomatenpflanzen fällt auf, dass sie gegenüber den mit CMM101 infizierten Pflanzen deutlich kleiner sind.

In *in vivo*-Expressionsstudien (IVET) von mit *Ralstonia solanacearum* infizierten Tomatenpflanzen wurden ca. 900 Gene identifiziert, die während des Wachstums in Pflanzen exprimiert werden (Brown and Allen 2004). IVET nutzt den Wirt als Selektivmedium für bakterielle Promotoren, die in der Wirtsumgebung hochreguliert werden (Rainey and Preston 2000). Die Analyse von 153 dieser Gene ergab, dass es sich bei ihnen um einzigartige, *in planta*-exprimierte (*ipx*) Gene handelt. Die quantitative Untersuchung der Expression dieser *ipx*-Gene 5 h nach Inokulation ergab, dass *bcp* eines der vier am stärksten induzierten Gene darstellt. Dabei wurde *in planta* eine 20fach erhöhte Expression festgestellt (Brown and Allen 2004). Dies deutet darauf hin, dass Bcp im Frühstadium der Kolonisation eine wichtige Rolle spielt. Da sowohl *Cmm*, als auch *R. solanacearum* das Xylem der Tomate besiedeln, könnten Bcp auch für *Cmm* wichtig sein. In der IVET-Studie wurde für *R. solanacearum* weiterhin eine veränderte bakterielle Membranstruktur festgestellt (Rainey and Preston 2004).

Sowohl bei der kompatiblen, als auch bei der inkompatiblen Bakterien-Pflanzen-Interaktion werden als erste schnelle Abwehrantwort auf das Pathogen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet (Lamb and Dixon 1997). Es wurde beschrieben, dass die Bildung von ROS in einem zweiphasigen Prozess erfolgt. Phase I tritt sowohl bei avirulenten, als auch bei virulenten Bakterienstämme auf, während das Ausbleiben von Phase II für virulente Pathogene charakteristisch ist (Levine *et al.* 1994; Apel and Hirt 2004). Als mögliche Erklärung für die zeitliche Verzögerung des 2. massiveren „burst“ nach 3-6 h dient die Vorstellung, dass das bakterielle Avirulenzsignal diese Zeit benötigt, um in den Pflanzenzellen so prozessiert zu werden, dass Erkennungsmechanismen ausgelöst werden können (Hammond-Kosack and Jones 1996). Es wäre daher denkbar, dass Bcp nach dem 1. „burst“ regulierend in die H_2O_2 -Konzentration eingreift.

In der Pflanze wird als Nebenprodukt bei der Photosynthese immer H_2O_2 gebildet, welches als leicht diffusibles Molekül in der Lage ist, als Signalüberträger zu fungieren und z. B. die Produktion von Phytoalexinen zu stimulieren (Apostol *et al.* 1989; Orozco-Cárdenas *et al.* 2001). Nach Exposition von H_2O_2 auf *A. thaliana*-Zellen zeigten 1-2 % aller Gene auf einem Microarray veränderte Expressionsmuster (Desikan *et al.* 2001). Von den 113 induzierten Genen kodierten einige für Proteine mit antioxidativer Funktion oder waren assoziiert mit Abwehrantworten oder anderen Stressreaktionen, einige kodierten für Proteine mit Signalfunktion. Da Bcp im Frühstadium der Kolonisation als verstärkt exprimierte Hydroperoxid-entgiftende Peroxidase sehr schnell eingreifen kann, könnte es mit seiner Aktivität dem umgebenden Xylem H_2O_2 entziehen und damit dessen Konzentration so niedrig halten, dass Signaltransduktionsprozesse, welche z. B. die Expression weiterer in Kolonisation oder Abwehr involvierter Gene regulieren, unterbunden werden.

Bei Infektion mit einer *bcp*-Mutante wäre auch eine Art H_2O_2 -Sensing der Pflanze denkbar, welche bei Ausbleiben einer Entgiftung durch das Pathogen von einer gelungenen Abwehr ausgeht und als Folge die Peroxidproduktion auf die Basismenge ohne Pathogenbefall reduziert. In diesem Falle wäre im Frühstadium der Kolonisation eine Begünstigung des Pathogens und damit schnellere Ausbreitung mit gegenüber dem Wildtyp stärkerem Einfluss innerhalb der Pflanze möglich. Der Effekt wäre eine Erhöhung der Virulenz mit nachfolgender Störung des normalen Pflanzenwachstums. Dies wäre eine Erklärung für die im Pflanzentest mit der Tomate bei der Mutante im Vergleich zum Kontrollstamm festgestellte Wachstumsbeeinträchtigung.

ROS sind kleine Moleküle und können über kurze Distanzen diffundieren. Für ihre Produktion gibt es verschiedene Mechanismen, von denen einige schnell und kontrollierbar sind und es gibt eine Vielzahl von schnellen Mechanismen, die ROS entfernen (Apel and Hirt 2004). In Pflanzen werden ROS kontinuierlich hauptsächlich in Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen produziert. Die Produktion der ROS und ihre Entgiftung müssen dabei im Gleichgewicht sein. Dieses Gleichgewicht wird durch bakteriellen Angriff gestört, da verstärkt ROS produziert werden, die durch die *bcp*-Mutante jedoch nicht ausreichend abgebaut werden. Damit wäre eine Auswirkung auf den normalen Stoffwechsel der Pflanze und ihr Wachstum möglich. Subletale Mengen von ROS bewirken die Gewöhnung von Pflanzen an biotische und abiotische Stressbedingungen und reduzieren das Pflanzenwachstum, vermutlich als Teil eines Akklimatisierungsmechanismus (Vranová *et al.* 2002). Man weiß, dass H_2O_2 eine in Eukaryonten evolutionär konservierte Kaskade von drei Proteinkinasen aktiviert (Mitogen-aktivierte

Proteinkinasekinasekinase [MAPKKK], Proteinkinase-kinase [MAPKK] und Proteinkinase [MAPK]) (Vranová *et al.* 2002; Neill *et al.* 2002). Diese Kaskade induziert in Pflanzen spezifische Stressgene und blockiert gleichzeitig die durch Auxin stimulierte Zellteilungsaktivität (Van Breusegem *et al.* 2001), die Pflanzen bleiben kleiner. In Pflanzen werden MAPK als Antwort auf extrazelluläre Signale wie Trockenheit, Kälte, Phytohormone, Pathogenangriff und osmotischen Stress aktiviert und führen zur Aktivierung von Signaltransduktionswegen, welche die Genexpression im Nukleus beeinflussen (Hirt 1997).

Durch Einbringen des intakten *bcp*-Gens in die *bcp*-Mutante und nachfolgende Infektion sollte überprüft werden, ob die im Pflanzentest gezeigte geringere Größe der mit der Mutante infizierten Pflanzen wieder Normalwerte wie bei der Infektion mit CMM101 erreicht. Die Überprüfung der Komplementation im Pflanzentest ergab identische Pflanzengrößen, -gewichte und Welkeindices für die komplementierte Mutante *bcp(bcp⁺)* im Vergleich zur Kontrolle CMM101. Lediglich ein geringerer Titer der komplementierten *bcp*-Mutante *in planta* gegenüber der Kontrolle CMM101 wirft weitere Fragen auf. Die Komplementation mit den Cys₄₉Ser/Cys₅₄Ser-Derivaten von *bcp* führte im Pflanzentest zu scheinbar geringerer Virulenz und wesentlich größeren Pflanzen bei im Vergleich zur *bcp*-Mutante und CMM101 unverändertem Titer, wobei zwischen den nach Komplementation mit *bcp* (M49) bzw. *bcp*(M54) infizierten Pflanzen keine Unterschiede feststellbar sind.

Bakterien-Pflanzen-Interaktionen zwischen Pathogen und Pflanze sind durch drei verschiedene mögliche Reaktionen charakterisiert:

1. die inkompatible Reaktion mit der Wirtspflanze ohne Krankheitsauslösung (rassenspezifische Resistenz);
2. die kompatible Interaktion mit der Wirtspflanze mit Krankheitsauslösung;
3. die inkompatible Reaktion mit der Nicht-Wirtspflanze, d. h. eine unspezifische Abwehrreaktion der Pflanze gegen das Eindringen eines Pathogens, begleitet durch lokalen programmierten Zelltod (HR).

Zwei dieser drei geschilderten Reaktionen können für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* nachvollzogen werden, die Krankheitsauslösung bei der Tomate sowie die Hypersensitive Reaktion bei den Nichtwirtspflanzen *Mirabilis jalapa* und *Nicotiana tabacum*. *Cmm*-resistente Tomatenkultivare wurden dagegen bislang nicht gefunden.

Ebenso wie bei der kompatiblen Reaktion kommt es auch bei der HR der Nichtwirtspflanze innerhalb von Sekunden nach Elicitierung zu einem Anstieg des

cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels. Dieser wird als Primärsignal für nachfolgende Prozesse (Bolwell *et al.* 2002), wie die Produktion von ROS, die Induktion der Expression von PR-Proteinen und Phytoalexinen, angesehen. Auf diese 1. Phase folgt bei Infektion mit dem Pathogen ein massiver 2. „burst“, der den lokalen programmierten Zelltod auslöst.

Die sogenannten Hypersensitive Reaktion- (HR) und Pathogenitäts-Gene (*hrp*) vermitteln bei Gram-negativen Bakterien die Entwicklung der HR in Nicht-Wirtspflanzen. Die Transkription der *hrp*-Gene wird hierbei durch eine kontakt-abhängige Signaltransduktionskaskade kontrolliert. Dieser Kontakt wird durch ein Typ-III-Sekretionssystem (TTSS) vermittelt. Genprodukte der *hrp*-Gene sind die als Harpin bezeichneten Proteine, welche für die Elicitierung der HR verantwortlich sind (Wei *et al.* 1992; Montesinos *et al.* 2002). Die *avr*-Genprodukte werden dabei durch das vom HRP-System kontrollierte TTSS in die Pflanzenzelle eingeschleust und lösen die Pflanzenabwehr aus.

In Gram-positiven Pathogenen wurde bislang kein dem HRP-System entsprechendes analoges System für die Einschleusung der *avr*-Genprodukte gefunden. Es wird vermutet, dass Pflanzenrezeptoren auf der Zelloberfläche für die Elicitorbindung verantwortlich sind. Bei Erkennung des Elicitors wird im Rahmen einer lokalen Abwehr ein Elektrolytverlust des Cytoplasmas und der „oxidative burst“ ausgelöst, das betroffene Pflanzengewebe reagiert mit programmiertem Zelltod. Ausgehend vom Infektionsort setzt die systemische Abwehr Signalmoleküle, z. B. Salicylsäure, Jasmonsäure, Stickoxid oder Ethylen, frei, welche mit spezifischen Bindeproteinen interagieren, die die Transkription von „pathogenesis-related“ (PR) Genen aktivieren. Die Produkte dieser Gene sind Enzyme wie Peroxidasen, Lipoxygenasen, Superoxiddismutase und Phenylalaninammonium-lyase (PAL), die in den Sekundärmetabolismus der Pflanze und die spezifische Synthese von phenolischen Substanzen involviert sind, oder aber Phytoalexine, Glucanasen und Chitinasen mit antimikrobieller Wirkung (Montesinos *et al.* 2002). Es wurden Bakteriensuspensionen von verschiedenen *Cmm*-Stämmen in die Blattunterseite der Nicht-Wirtspflanze *Mirabilis jalapa* infiltriert. Nach ca. 48 h waren deutliche Nekrosen an den Infiltrationsstellen erkennbar. Dabei traten mit Ausnahme der Negativkontrolle *Cmm* NCPPB515 bei allen getesteten Stämmen Nekrosen auf. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass nur *Cmm*-Stämme, welche virulent sind, bei der Nicht-Wirtspflanze HR auslösen können (Gitaitis 1990; Bempohl 1996). Da die *bcp*-Mutante, wie in der kompatiblen Interaktion mit der Tomate gezeigt, nicht direkt in die Krankheitsauslösung involviert ist, bestätigt die

deutlich ausgeprägte HR das erwartete Ergebnis. Das *bcp*-Gen ist somit nicht in HR-spezifische Interaktionen involviert.

1.3. Charakterisierung des „Bacterioferritin comigratory proteins“ *in vitro*

Bcp und seine Derivate C49S und C54S wurden nach Überexpression in *E. coli* im SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Die reduzierte Form von Bcp erscheint im Proteingel als scharfe Bande in Höhe von ca. 18 kDa. Dies entspricht der Molekülgröße des Proteins inklusive des Tags aus 6 Histidinresten. In seiner aktiven reduzierten Form liegt Bcp damit als Monomer vor. Auch die nicht-reduzierte Form zeigt keine veränderte Proteingröße, d. h. durch die Reduktion von Hydroperoxiden erfährt Bcp keine veränderte Konformation.

In Untersuchungen wurde festgestellt, dass Bcp (Jeong *et al.* 2000) und seine pflanzlichen Homologe PrxQ (Kong *et al.* 2000) monomere Enzyme sind, die als Reaktionsintermediat eine intramolekulare Disulfidbrücke knüpfen. Auf Grund der an der Reaktion beteiligten zwei N-terminalen konservierten Cysteine, welche mit Ausnahme des Homologs PrxV von Mammalia nur durch 4 Aminosäuren getrennt sind (Rouhier and Jacquot 2002), sowie der Art der Disulfidbrücke werden sie in neueren Veröffentlichungen (Rouhier and Jacquot 2002; Wood *et al.* 2003) zur Klasse der atypischen 2-Cys Prx gerechnet. Als erster Reaktionsschritt in der Entgiftung wird das Hydroperoxid durch das „peroxidative Cystein“ (in *Cmm* Cys₄₉, in *E. coli* Cys₄₅) nucleophil angegriffen und zum Intermediat Cystein-Sulfonsäure umgesetzt, welches im Falle des atypischen 2-Cys Prx mit dem auflösenden Cystein („resolving cysteine“; in *Cmm* Cys₅₄, in *E. coli* Cys₅₀) eine Disulfidbrücke bildet. Im Gegensatz zu Bcp von *Cmm* besitzt Bcp von *E. coli* ein drittes Cystein im C-terminalen Bereich (Cys₉₉) (Anhang 2.1). Das Recycling der oxidierten 2-Cys Prx erfordert eine Flavoprotein-Disulfidreduktase und ein Dithiol, welches durch die Prx-Reduktion zum Disulfid oxidiert wird (Wood *et al.* 2003). Die Untersuchung von *E. coli* Cystein/Serin-Substitutions-Derivaten der drei in der Sequenz vorkommenden Cysteine ergab einen vollständigen Aktivitätsverlust nur bei Cys₄₅Ser. Jeong *et al.* (2000) postulierten Cys₄₅ damit als das katalytisch primäre Cystein.

Um zu überprüfen, ob Cys/Ser-Substitutionen von Bcp veränderte Eigenschaften zeigen, wurden auch C49S und C54S von *Cmm* im reduzierten und nicht-reduzierten Zustand im SDS-Polyacrylamidgel getestet. Beide Derivate zeigten in reduzierter Form das Laufverhalten des Monomers, ein geringer Anteil von C54S lag jedoch auch als Tetramer vor. Die nicht-reduzierten Proteine von C49S und C54S

liegen als Monomer und Dimer, C54S zusätzlich auch als Tetramer vor. Damit wird auch für die Reaktion des Bcp von *Cmm* die Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke nachgewiesen. Da Bcp von *Cmm* nur über zwei Cysteine verfügt, führt die Ausschaltung eines der beiden Cysteine bei Oxidation des entsprechenden Bcp-Derivates im Rahmen des Protein-Recyclings mehr oder minder zwangsläufig durch intermolekulare Disulfidbrücken zur Dimerbildung, teilweise sogar zur Tetramerbildung.

Die Behandlung des nativen Bcp mit verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen zeigte sowohl bei reduziertem, als auch bei nicht-reduziertem Bcp eine leichte Verschiebung zu größeren Molekulargewichten, die möglicherweise auf vermehrt auftretende Intermediärverbindungen, d. h. Cysteinsulfonsäure-Reste zurückzuführen sind. Die gleiche Erscheinung, sowie insgesamt bei steigender H₂O₂-Menge diffuser werdende Banden, ist auch für die Derivate C49S und C54S festzustellen.

Die Überprüfung des isolierten, gereinigten Proteins bestätigte im zweidimensionalen SDS-Polyacrylamidgel für reduziertem und nicht-reduziertem Bcp die Monomer-Form. Bcp von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ist damit eindeutig der Klasse der atypischen 2-Cys Prx zuzuordnen. Auf Grund der unterschiedlichen Lokalisation des „resolving cysteine“ (C_p), welches mit dem „peroxidativen Cystein“ (C_p) eine Disulfidbrücke eingeht, wurde für 2-Cys Peroxiredoxine eine neue Klassifizierung vorgeschlagen, die eine weitere Einteilung der atypischen 2-Cys Prx vornimmt (Choi *et al.* 2003). Typische 2-Cys Prx sind durch Verknüpfung einer intermolekularen Disulfidbrücke mit einem identischen Monomer charakterisiert. Atypische 2-Cys Prx sind Monomere, die innerhalb des Moleküls mit einem weiteren Cystein eine intramolekulare Disulfidbrücke bilden. Die typische Proteinfaltung der Prx-Familie wird aus 7 verdrehten β -Faltblättern, umgeben von 4 α -Helices, aufgebaut. Die zu den atypischen 2-Cys Prx gehörigen Bcp (*E. coli*: Cys₄₅, Cys₅₀, Cys₉₉) *E. coli* Thiolperoxidase (Tpx; TSA-homolog; Cys₆₁, Cys₈₂, Cys₉₅) und humanes Peroxiredoxin V (PrxV; Cys₄₈, Cys₇₃, Cys₁₅₂) besitzen das konservierte „peroxidative Cystein“ (Cys₄₅, Cys₆₁ bzw. Cys₄₆) an einer Schlaufe (C_p-loop) zwischen Faltblatt β_3 und Helix α_1 . Das „auflösende Cystein“ (C_R) befindet sich an sehr unterschiedlichen Positionen: an der C-Kette des C_p-loop (Bcp), an der L-Kette zwischen Helix α_2 und Faltblatt β_5 (Tpx) bzw. an der R-Kette zwischen Faltblatt β_7 und Helix α_4 (PrxV). Im Molekül flankieren L- und R-Kette die Helix α_1 (linke bzw. rechte Kette). Auf Grund der Lokalisation des „resolving cysteine“ und des daraus resultierenden intramolekularen Disulfids wird eine Einteilung in C-atypische 2-Cys Prx (Bcp), sowie L-atypische (Tpx) und R-atypische 2-Cys Prx (PrxV)

vorgenommen (Abb. 49; Choi *et al.* 2003). Einige Bcp-Homologe, wie auch Bcp von *Cmm* besitzen nur 2 Cysteine.

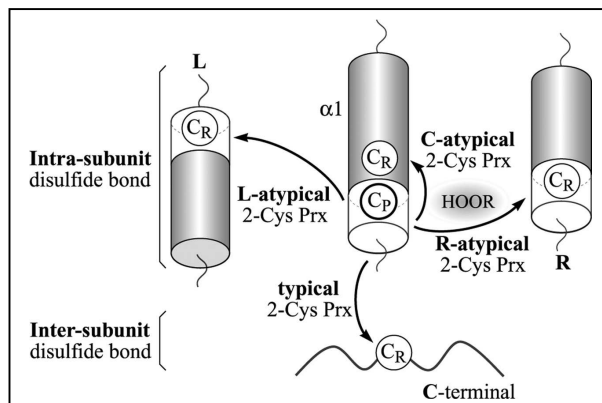


Abb. 49 Schematische Einteilung der 2-Cys Prx aufgrund der Disulfid-Lokalisation innerhalb des Proteinmoleküls. Aufteilung der atyp. 2-Cys Prx in drei Subfamilien: *E. coli* Tpx L-atyp. Typ, PrxV R-atyp. Typ, Bcp C-atyp. Typ. Die Pfeile geben die Richtung der Disulfidbildung an, graue Zylinder kennzeichnen die α -Helices, weiße Zylinder kennzeichnen die Region mit dem „resolving cysteine“ (C_R), das abhängig vom Redox-Status einen Übergang von „loop-to-helix“ oder „helix-to-loop“ durchläuft. (Quelle: Choi *et al.* 2003)

Für die weitere Charakterisierung von Bcp wurde die Peroxidase-Aktivität gegenüber H_2O_2 und verschiedenen organischen Hydroperoxiden ermittelt.

Die Aktivitätstests von rekombinantem Bcp gegenüber H_2O_2 wurden mit und ohne Zusatz von *E. coli* TrxA bzw. *A. thaliana* TrxY sowie jeweils mit und ohne DTT als Elektronendonator zum Ansatz durchgeführt.

a) Bei Anwesenheit von DTT im Reaktionsansatz konnte bereits eine hohe Aktivität von Bcp gegenüber H_2O_2 nachgewiesen werden. Im Testansatz mit zusätzlicher Trx-Anwesenheit zeigte sich ein kaum messbarer Aktivitätsgewinn. Es ist dabei kein signifikanter Aktivitätsunterschied zwischen dem Zusatz von bakteriellem TrxA oder pflanzlichem TrxY feststellbar.

b) Bei Fehlen von DTT im Reaktionsansatz ist ebenfalls eine hohe Peroxidaseaktivität von Bcp gegenüber H_2O_2 vorhanden, die durch Zusatz von zusätzlichem TrxA bzw. TrxY nicht verändert wird.

c) Die Überprüfung der Peroxidaseaktivität von Bcp gegenüber H_2O_2 im Testsystem Glutaredoxin/Glutathion, d. h. mit GSH statt DTT im Reaktionsansatz, lieferte mit und ohne Glutaredoxin identische Ergebnisse. Ebenso zeigten die ohne GSH wiederholten Tests eine hohe Peroxidaseaktivität, die sich vom Reaktionsansatz mit GSH nicht unterscheidet.

Im Falle des Substrates H_2O_2 ist somit weder eine Thioredoxin-Abhängigkeit, noch eine Glutaredoxin-Abhängigkeit für Bcp von *Cmm* vorhanden. Weiterhin scheint die Oxidation des Bcp von *Cmm* nicht die Anwesenheit eines Dithiols zu erfordern. Um

Reaktionen auszuschließen, die auf einer durch Verunreinigung des verdünnten Bcp z. B. mit Metallionen beruhen oder aber durch Katalase- bzw. Superoxiddismutase-ähnliche Umsetzungen erfolgen, wurden in einem geschlossenen System verschiedene Konzentrationen von Bcp und H_2O_2 zusammengebracht und mittels einer Sauerstoffelektrode auf Sauerstoffentwicklung überprüft. Da bei dieser Reaktion kein Sauerstoff freigesetzt wurde, ist der Nachweis erbracht, dass die Reaktionen von Bcp reduktiv erfolgen. Unklar ist, wie bei der biochemischen Reaktion mit H_2O_2 die hohe Reaktivität ohne Recycling des oxidierten Bcp gewährleistet wird. Im Falle des Substrates H_2O_2 müsste daher ein alternatives, bislang unbekanntes Reaktionsschema greifen.

In planta ist die Reduktion des oxidierten Bcp auf Grund der Bcp-Konzentration möglicherweise irrelevant. Da die Peroxidaseaktivität für das Substrat H_2O_2 relativ hoch ist, und im Frühstadium der Kolonisation von einer sehr starken Bcp-Expression ausgegangen werden kann, wie Versuche mit *Ralstonia solanacearum*-infizierten Tomatenpflanzen zeigten (Rainey and Preston 2004), wäre es denkbar, dass Bcp zusammen mit der Katalase eine hoch-konzentrierten Angriff auf das im Xylem vorhandene H_2O_2 vornimmt. Dabei wäre es möglich, dass Bcp auf Grund seiner hohen Expression in ausreichender Menge vorliegt und so eine Rückgewinnung für weitere Reaktionen nicht erforderlich ist. Eine *bcp*-Mutante kann vorhandene und eventuell zusätzlich durch die Pflanze gebildete ROS zu Anfang der Kolonisation nur durch Aktion der zelleigenen Katalase Widerstand bieten. Es wäre möglich, dass die Katalase-Wirkung gerade ausreicht, um der Toxizität entgegen zu wirken. Die H_2O_2 -Restkonzentration innerhalb der Pflanze könnte daraufhin den Stoffwechsel der Pflanze dahingehend beeinflussen, das das Wachstum beeinträchtigt wird (Vranová *et al.* 2002; Van Breusegem *et al.* 2001).

Die Peroxidase-Testreihen mit dem Substrat H_2O_2 und Elektronendonator DTT im Reaktionsansatz wurden mit den Bcp-Derivaten C49S und C54S wiederholt. C49S, welches das primär katalytisch wirksame Cystein verloren hat, zeigt keinerlei Peroxidaseaktivität, egal ob ohne oder mit Anwesenheit von *E. coli* TrxA im Reaktionsansatz. Das C54S-Protein besitzt das peroxidative Cys₄₉ als einziges Cystein im Molekül und ist folglich durch die Zerstörung des „resolving cysteine“ Cys₅₄ nicht mehr zur Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke fähig. Es muss mit einem 2. Molekül C54S eine intermolekulare Disulfidbrücke zur Auflösung des Intermediates Cystein-Sulfonsäure eingehen. Dies geht zu Lasten der Aktivität, die damit ohne TrxA im Ansatz nur sehr gering ist. In diesem Fall führt der Zusatz von Thioredoxin zum Testansatz zu einer Aktivitätssteigerung, d. h. es scheint hier eine

Thioredoxin-Abhängigkeit vorhanden zu sein. Möglicherweise ist Trx in diesem Fall ebenfalls in die Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken involviert.

Alkylhydroperoxide entstehen durch spontane chemische Reaktionen von ungesättigten organischen Substraten mit reaktiven Radikalen wie $\cdot\text{OH}$ oder durch enzymatische Reaktion von mehrfach ungesättigten Fettsäuren von Lipiden mit Lipoxygenasen (Dietz *et al.* 2002).

Als Modell-Substrat für organische Alkylhydroperoxide wurde Cumenehydroperoxid (CMOOH) für die Überprüfung der Peroxidaseaktivität von Bcp in Anwesenheit von Elektronendonator DTT im Reaktionsansatz eingesetzt. Bcp zeigte keinerlei Aktivität ohne Thioredoxin im Testansatz. Ist TrxA Reaktionspartner, so resultiert eine Peroxidaseaktivität gegenüber CMOOH, die ca. $\frac{1}{4}$ der H_2O_2 -Aktivität erreicht. Die Bcp-Derivate C49S und C54S sind ohne TrxA ebenfalls inaktiv, wobei C49S auch mit TrxA kein CMOOH umsetzen kann. C54S kann mit *E. coli* TrxA im Testansatz eine Reaktion mit CMOOH eingehen, die ca. $\frac{1}{3}$ der Aktivität der durch das native Bcp umgesetzten Menge entspricht. Da schon die Reaktion ohne Trx negativ verlief, wurde bei der Peroxidaseaktivitätsmessung gegenüber CMOOH auf Kontrollmessungen ohne den Elektronendonator DTT im Ansatz verzichtet,.

Das sehr kleine organische Alkylhydroperoxid t-Butylhydroperoxid (t-BOOH) wurde durch Bcp auch mit TrxA im Reaktionsansatz nicht abgebaut. Für Bcp von *Helicobacter pylori* konnte ebenfalls keine Aktivität für das Substrat t-BOOH nachgewiesen werden (Wang *et al.* 2005). Im Gegensatz hierzu besitzt Bcp von *E. coli* eine moderate Thioredoxin-abhängige Aktivität (Jeong *et al.* 2000), sowie „Thiol-specific antioxidant“ (TSA) von *Saccharomyces cerevisiae* eine Präferenz für t-BOOH. Die Bcp-homologen PrxQ von *Sedum lineare* und *Populus tremula* x *Populus tremuloides* bevorzugen als Substrat CMOOH vor t-BOOH (Kong *et al.* 2000; Rouhier *et al.* 2004b). Es scheint damit pflanzenspezifisch eine Präferenz für CMOOH zu existieren, während die bislang untersuchten Bcp von Gram-negativen Bakterien als Substrat Linolsäurehydroperoxid (LaOOH) bevorzugen.

Um zu überprüfen, ob Bcp des Gram-positiven Stammes *Cmm* gleichfalls Linolsäurehydroperoxid umsetzen kann, wurde als 4. Substrat LaOOH im Test eingesetzt.

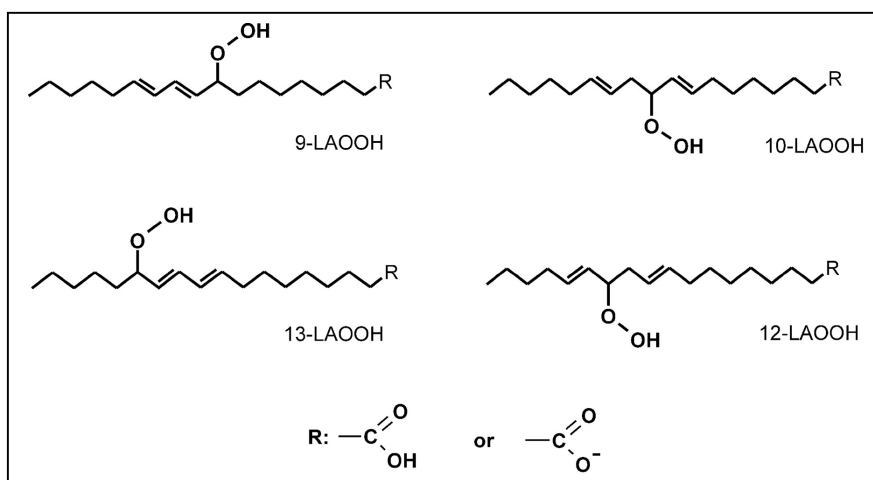


Abb. 50 Schema der 4 Isomere von Linolsäurehydroperoxid (LaOOH) und ihre dissoziierten Formen. LaOOH existiert in neutraler Form als undissoziiertes Carboxyl oder nach H^+ -Dissoziation des Carboxyls in anionischer Form (Quelle: Jabůrek *et al.* 2004)

Im Zuge der Pflanzenabwehr auf bakterielle Pathogene wurde LaOOH als reaktives Sauerstoffspezies (ROS) identifiziert (Jalloul *et al.* 2002). In der Fenton-Reaktion werden aus H_2O_2 mit Fe^{2+} Hydroxylradikale freigesetzt. Freie Radikale können direkt mehrfach ungesättigte Fettsäuren in Membranen angreifen und Lipidperoxidation verursachen. Hierbei wird primär die Membranfluidität verändert, membrangebundene Proteine können signifikant zerstört werden (Cabiscol *et al.* 2000). Es kommt eine Kettenreaktion in Gang, in deren Verlauf verstärkt Radikale gebildet werden. Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren werden zu einer Vielzahl verschiedener Produkte degradiert, z. B. zu sehr reaktiven Aldehyden, die Proteine schädigen können. Bei Phytopathogen-Infektion werden die für die Lipidperoxidation verantwortlichen pflanzlichen Lipoxygenasen induziert.

Im Peroxidasetest mit dem Substrat LaOOH konnte für Bcp von *Cmm* NCPPB keine Aktivität nachgewiesen werden.

Im Rahmen der Entgiftung von Hydroperoxiden konnte für Bcp von *Cmm* Substratspezifität für H_2O_2 und Cumenhydroperoxid nachgewiesen werden, wobei H_2O_2 in höheren Raten umgesetzt wird. Bcp zeigt keine Aktivität für t-Butylhydroperoxid und Linolsäurehydroperoxid. Die ermittelten Daten stehen im Widerspruch zu der für Bcp von *E. coli* und *Helicobacter pylori* gezeigten Substratpräferenz für LaOOH. t-Butylhydroperoxid und H_2O_2 können durch *E. coli* Bcp, nicht jedoch durch *H. pylori* Bcp, abgebaut werden. Eine eventuell vorhandene Aktivität für das Substrat CMOOH wurde für diese beiden Spezies nicht überprüft (Jeong *et al.* 2000; Wang *et al.* 2005). Ob die Unterschiede der Substratpräferenzen

zu Bcp von *Cmm* NCPPB382 in der unterschiedlichen Zellwand oder aber durch vorhandene andere redundante Entgiftungssysteme begründet sind, werden zukünftige Untersuchungen der Substrataktivität anderer Gram-negativer und Gram-positiver Bakterienstämme zeigen müssen. Bislang wurde kein „Bacterioferritin comigratory protein“ eines Gram-positiven Bakteriums in der Literatur charakterisiert. Die Bcp-homologen Proteine PrxQ von *Sedum lineare* und *Populus tremula* x *Populus tremuloides* zeigen Substratpräferenz für Cumenehydroperoxid, vor t-BOOH bzw. H₂O₂, letzteres kann von *Sedum lineare* PrxQ nicht abgebaut werden. Linolsäurehydroperoxid wurde als Substrat in diese Untersuchungen nicht mit einbezogen (Kong *et al.* 2000; Rouhier *et al.* 2004b).

2. Charakterisierung des Peroxiredoxins AhpE *in vitro*

Im Rahmen des Genomprojektes von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 wurde mit AhpE ein weiteres Bcp-homologes Protein der AhpC/TSA-Familie identifiziert. AhpE ist mit 157 aa und 17,5 kDa annähernd gleich groß wie Bcp und ist zu diesem auf Proteinebene zu 32 % identisch. Es weist die konservierten Cysteine an Position 46 und 51 auf. Auf Grund von Proteinalignments mit verschiedenen bakteriellen AhpE- und Bcp-homologen Proteinen (Anhang 2.3.) wurde das Bcp-Homolog von *Cmm* als AhpE und nicht als BcpB bezeichnet. AhpE von *Cmm* NCPPB382 besitzt auf Proteinebene zu AhpE von *Mycobacterium tuberculosis* 47 % Identität.

In der Literatur wurde bislang nur AhpE von *Mycobacterium tuberculosis* beschrieben (Li *et al.* 2005), das als 1-Cys Prx klassifiziert wurde, da es lediglich ein Cystein (Cys₄₅) besitzt. Das *Cmm*-AhpE ist im Gegensatz dazu vermutlich als typisches 2-Cys Prx einzuordnen.

Da die Herstellung einer Mutante nicht erfolgreich war, wurde überexprimiertes und aufgereinigtes AhpE von *Cmm* zunächst im SDS-Polyacrylamidgel überprüft. Hier erzeugte das reduzierte AhpE eine leicht diffuse Bande, die der Monomergröße entspricht, sowie eine schwache Bande, die dem Tetramer von AhpE entspricht. AhpE scheint damit im nativen Zustand immer zu einem geringen Anteil als Intermediat Cystein-Sulfonsäure und als Tetramer vorzuliegen. Durch H₂O₂-Behandlung von reduziertem und nicht-reduziertem AhpE verändert sich das Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel mit Ausnahme einer diffuser werdenden Monomerbande nicht. Reduzierter und nicht-reduzierter Zustand des Proteins zeigen im SDS-PAGE identischen Lauf und Proteinbanden. Damit unterscheidet

sich AhpE hinsichtlich der Proteinkonformation geringfügig von Bcp, welches im reduzierten und oxidierten Zustand ausschließlich Monomerform besitzt.

Die Überprüfung von AhpE hinsichtlich seiner Peroxidaseaktivität ergab für alle vier eingesetzten Substrate H_2O_2 , Cumenehydroperoxid (CMOOH), t-Butylhydroperoxid (t-BOOH) und Linolsäurehydroperoxid (LaOOH) eine Aktivität, welche generell Thioredoxin-abhängig ist. CMOOH scheint für AhpE das bevorzugte Substrat zu sein, gefolgt von H_2O_2 . Für t-BOOH und LaOOH besitzt AhpE eine moderate, etwa gleich starke Peroxidaseaktivität. Für AhpE von *M. tuberculosis* wurde lediglich eine Peroxidaseaktivität für H_2O_2 überprüft.

Ausgehend von den ermittelten Peroxidaseaktivitäten für Bcp und AhpE scheinen sich beide recht gut zu ergänzen. Während Bcp H_2O_2 vor CMOOH bevorzugt, sind diese Präferenzen bei AhpE umgekehrt verteilt. AhpE kann mit seiner Aktivität gegenüber t-BOOH und LaOOH jedoch zusätzlich Spezialaufgaben durchführen. Die Substratspezifität deutet daraufhin, dass Bcp nicht in die Pathogenabwehr der Hypersensitiven Reaktion involviert ist, AhpE jedoch mit seiner Aktivität gegenüber LaOOH, welches als ROS der pflanzlichen Pathogenabwehr nachgewiesen wurde (Jalloul *et al.* 2002), eine zumindest moderate Schutzfunktion für *Cmm* bei der Hypersensitiven Reaktion bieten könnte. Für die Freisetzung der Lipidhydroperoxide während der kompatiblen Pathogen-Interaktion von *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* mit Baumwolle wurde nur eine schwache Welle der pflanzlichen Lipoxygenaseaktivität mit einem Maximum 3 Tage nach Inokulation beobachtet, während in der inkompatiblen Interaktion eine Aktivitätsspitze bei 9 Stunden, gefolgt von einer langlebigen und intensiven Lipidperoxidation mit einem Maximum 24 h nach Inokulation gemessen wurde, welche eng verbunden mit dem Hypersensitiven Zelltod ist (Jalloul *et al.* 2002). Für die Freisetzung von H_2O_2 wurden in der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* mit *Capsicum annum* (Pfeffer) während des 1. „oxidative burst“ gleiche Level gemessen, der 2. „burst“ der inkompatiblen Interaktion 24 h nach Inokulation führte zu einer 6fach erhöhten H_2O_2 -Akkumulation (Do *et al.* 2003).

AhpE von *Cmm* NCPPB382 liefert durch seine Peroxidase-Aktivität für H_2O_2 und insbesondere für Linolsäurehydroperoxid ein Indiz für eine Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies. Ob AhpE allerdings tatsächlich in die Bakterien-Pflanzen-Interaktion involviert ist, bleibt durch Überprüfung einer AhpE-Mutante im Pflanzentest und in der Hypersensitiven Reaktion zu klären.

Da schon bei *Cmm* NCPPB382 zwei Peroxiredoxine der AhpC/TSA-Familie gefunden wurden, sowie ein weiteres putatives Peroxiredoxin (CMM_1205) durch das

Genomprojekt identifiziert wurde, stellt sich die Frage nach redundanten Entgiftungssystemen in bakteriellen Genomen.

3. Bakterielle Enzyme der ROS-Entgiftung

Zu den ROS-entgiftenden Enzymen gehören Katalase, Superoxiddismutase sowie Alkylhydroperoxid-Reduktase und Glutathion-Reduktase. Diese Enzyme kommen in unterschiedlichen Kombinationen in Bakterien vor und können sich in ihren Aktivitäten unterstützen und ergänzen. Die Ausstattung der einzelnen Bakterienstämme mit diesen Schutzenzymen kann nach Art und Anzahl sehr unterschiedlich sein.

Der am besten untersuchte Vertreter der Alkylhydroperoxid-Reduktasen ist das typische 2-Cys Prx AhpC, welches zuerst in *Salmonella typhimurium* identifiziert wurde (Jacobson *et al.* 1989). Bei Gram-negativen Stämmen wie *E. coli* und *Salmonella typhimurium* und einigen Gram-positiven Stämmen mit niedrigem GC-Gehalt (z. B. *Lactobacillus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) wird das Ahp-Peroxidasesystem durch das Flavoprotein AhpF vervollständigt (Carmel-Harel and Storz 2000; Poole *et al.* 2000; Jacobson *et al.* 1989; Poole and Ellis 1996; Bolotin *et al.* 2001; Kunst *et al.* 1997; Holden *et al.* 2004). AhpF gehört zur Familie der Thioredoxin-Reduktasen. *Mycobacterien* nutzen zur Reduktion von AhpC Elektronen von AhpD (Koshkin *et al.* 2004) bzw. von anderen Prx, die dem System Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase (Trx/TrxR) entstammen. Die bakteriellen AhpCF-Systeme stehen im Allgemeinen unter der Kontrolle eines OxyR-Regulons, welches durch H₂O₂ und organische Hydroperoxide aktiviert wird (Tartaglia *et al.* 1990; Loprasert *et al.* 2000; Mongkolsuk *et al.* 2000; Ochsner *et al.* 2000). Der Transkriptionsregulator OxyR kann mit seinen 2 Cysteinen direkt mit H₂O₂ durch Bildung eines Disulfides reagieren und darauf folgend die Expression der antioxidativen Abwehrmechanismen induzieren. OxyR stimuliert in *E. coli* und *S. typhimurium* als Antwort auf Peroxide mindestens 9 Gene (Jacobson *et al.* 1989), darunter *ahpC* und das Katalase-Gen *katG* (Seaver and Imlay 2001). Dies wurde auch für *Mycobacterium* gezeigt (Jaeger *et al.* 2004).

Für *bcp* von *E. coli* wurde gezeigt, dass es nicht Teil eines Operons ist, sondern monocistronisch transkribiert wird (Ghrist and Stauffer 1998). *Bcp* steht unter der Kontrolle eines eigenen Promotors.

In Bakterien existieren neben AhpC und Bcp oft Thiol-Peroxidasen; Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-Systeme können ebenfalls entgiftende Funktionen übernehmen. Man findet daher immer ein ganzes Set dieser Enzyme, wobei die Kombinationen sehr unterschiedlich sein können.

AhpC ist bis auf wenige Ausnahmen in allen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien zu finden. Zu diesen Ausnahmen gehören neben *Clavibacter* die Actinomyceten *Leifsonia xyli* und *Thermobifida fusca* (siehe Tab. 5). *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* ist wie *Cmm* Xylembesiedler und ist für die „ratoon stunting disease“ von Zuckerrohr verantwortlich. *Thermobifida fusca* ist ein schwach thermophiles Bodenbakterium (Kompostbewohner), das Pflanzenzellwände abbaut und Sporen mit Allergenwirkung bildet, welche bei Mammalia die „Farmer`s lung disease“ auslösen können. Das Fehlen der Alkylhydroperoxid-Reduktase bei den genannten Stämmen kann nur durch Vorhandensein weiterer effektiver Enzyme für die Peroxidentgiftung erklärt werden. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* besitzt neben Bcp und AhpE ein weiteres Protein der AhpC/TSA-Familie (CMM_1205 putatives Peroxiredoxin), das mit 221 Aminosäuren zwar ungefähr der Proteingröße des AhpC entspricht, bei BLAST-Abfragen jedoch eine größere Ähnlichkeit zu Bcp, als zu AhpC aufweist. *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* verfügt neben Bcp über ein Protein der AhpC-TSA-Familie, das große Ähnlichkeit zu AhpE von *Cmm* hat. *Thermobifida fusca* hat Bcp als einziges Peroxiredoxin. Da AhpC sowohl bei Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien, bei pathogenen und nicht-pathogenen Stämmen vorkommt, scheint es als Prx ubiquitär zu sein, die Ausnahmen folgen keiner Regel.

Auch das Vorkommen von Bcp ist bei Bakterien bis auf wenige Ausnahmen ubiquitär. Bcp kommt nicht in den Genomen von *Lactobacillus*, *Streptococcus* und *Lactococcus* vor, allesamt Gram-positiv, fakultativ aerobe Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt der Klasse der Bacilli, Ordnung *Lactobacillales*. Einige *Mycobacterien* besitzen zwei Bcp-Proteine (*M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*), ebenso *Streptomyces coelicolor* und *Streptomyces avermitilis*. Zusätzlich zu Bcp findet man bei *Mycobacterium* AhpE. Sehr häufig kommen weiterhin Thiol-Peroxidasen (Tpx) vor, nicht jedoch bei *Cmm* und seinem nahen Verwandten *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Als weitere Enzymausstattung verfügen alle Bakterien über eine variable Anzahl Thioredoxine und Thioredoxin-Reduktasen mit unterschiedlichen Spezifitäten. In Tabelle 5 sind *Actinobacteria* mit hohem GC-Gehalt hinsichtlich ihres Prx- und Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase (Trx/TrxR)-Vorkommens aufgelistet, Tabelle 6 zeigt die entsprechenden Daten für einige Gram-positive Stämme mit niedrigem GC-Gehalt sowie Gram-negative Bakterien.

Tabelle 6 zeigt, dass sogar innerhalb eines Genus Unterschiede bestehen können, *Ps. syringae* pv. *tomato* besitzt Bcp, *Ps. aeruginosa* dagegen nicht. Beide Stämme sind pathogen. Es wäre daher denkbar, dass nicht die bakterielle Ausstattung mit Hydroperoxid-entgiftenden Enzymen von Relevanz ist, sondern die

Substratspezifität und Reaktivität der vorhandenen Peroxiredoxine, d. h. die insgesamt vorhandene Kapazität des Bakteriums, auf Hydroperoxide einzuwirken.

Spezies	AhpC/TSA	Bcp	sonstiges Prx	Trx/TrxR (Anzahl)
<i>Cmm</i> NCPPB382	-	+	AhpE, Prx	6/3
<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> str. CTCB07	-	+	AhpE-hom.	3/1
<i>Nocardia farcinica</i> IFM10152	AhpCD	-	-	3/1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37RV	AhpCD	Bcp1 + 2	Tpx	6/1
<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	AhpCD	Bcp BcpB	AhpE, Tpx	6/1
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> NCTC13129	AhpCD	+	Tpx	6/1
<i>Corynebacterium jeikeium</i> K411	AhpCF	+	-	5/2
<i>Propionibacterium acnes</i> KPA171202	AhpCF	+	Tpx	4/1
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	AhpCD	Bcp BcpB	Prx	6/4
<i>Thermobifida fusca</i> YX	-	+	-	4/1
<i>Frankia</i> sp. Ccl3	2 AhpD	+	Prx	4/1
<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705	AhpC	+	-	2/2

Tab. 5 Prx- und Trx/TrxR-Enzyme von High-GC *Actinobacteria* (Quelle: Genomprojekte).

Spezies	AhpC/TSA	Bcp	sonstige Prx	Trx/TrxR (Anzahl)
<i>Lactobacillus plantarum</i> str. WCFS1	-	-	Tpx	4/2
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	-	-	Tpx	2/3
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403	AhpCF	-	Tpx	2/2
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	AhpCF	-	Tpx	3/2
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10987	AhpCF	+	Tpx	9/4
<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames	AhpCF	+	Tpx	6/3
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	AhpC	-	Tpx	3/2
<i>Staphylococcus aureus</i> RF122	AhpCF	+	-	3/2
<i>Clostridium perfringens</i> str. 13	AhpC	+	-	1/1
<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000	AhpC	+	Tpx, 2 Prx	3/1
<i>Escherichia coli</i> K12	AhpCF	+	Tpx	2/1
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	AhpCF	+	Tpx	3/1
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd KW20	TSA	+	Tpx	2/1
<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	AhpCF	+	-	4/1
<i>Pseudomonas syringae</i> pv tomato DC3000	AhpCF	-	Tpx	3/1
	AhpD-Core-Protein			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	AhpCF	+	Tpx	2/2
<i>Helicobacter pylori</i> J99	TSA	+	Tpx	2/2

Tab. 6 Prx- und Trx/TrxR-Enzyme von Low-GC Gram-positiven, sowie Gram-negativen Bakterien (Quelle: Genomprojekte).

Man kann man davon ausgehen, dass das bevorzugte bakterielle Habitat und die darin vorherrschenden Bedingungen evolutionär Einfluss auf den Erwerb und die Ausprägung der benötigten Peroxiredoxine ausgeübt haben. Diese könnten dem Bakterium damit eine individuelle Lebensnische mit Schutz vor anderen Mikroorganismen ermöglicht haben. Ein Blick auf die bevorzugt entgifteten Hydroperoxide (Tab. 7) könnte ein Hinweis auf die am dringendsten benötigte

Spezifität des einzelnen Bakteriums sein, d. h. auf die primäre Reaktion der Pathogen-Interaktion hindeuten.

Spezies	Enzym	Aktivität	keine Aktivität
E. coli ^{1/2)}	AhpCF	organische Hydroperoxide	
	Bcp	LaOOH>H ₂ O ₂ >t-BOOH	
	Tpx	Alkylhydroperoxide>H ₂ O ₂	
<i>S. typhimurium</i> ⁴⁾	AhpCF	CMOOH ~ H ₂ O ₂ ~t-BOOH	
H. pylori ⁵⁾	AhpC	H ₂ O ₂ ~ t-BOOH ~ LaOOH	
	Bcp	LaOOH	H ₂ O ₂ , t-BOOH
<i>M. tuberculosis</i> ³⁾	AhpCD	H ₂ O ₂ >t-BOOH>CMOOH>LaOOH	
	Bcp; BcpB	nicht analysiert	
<i>Cmm</i> NCPPB382 ⁶⁾	Bcp	H ₂ O ₂ >CMOOH	t-BOOH, LaOOH
	AhpE	CMOOH> H ₂ O ₂ >LaOOH~t-BOOH	

Tab. 7 Hydroperoxid-Reduktase-Aktivitäten von Peroxiredoxinen einiger Bakterienstämme (¹⁾Seaver and Imlay 2001; ²⁾Choi *et al.* 2003;³⁾Jaeger *et al.* 2004;⁴⁾Poole and Ellis 1996; ⁵⁾Wang *et al.* 2004; ⁶⁾diese Arbeit).

ROS werden in Pflanzen konstitutiv in signifikanten Konzentrationen produziert. Das hauptsächlich gebildete H₂O₂ wird in Zellen gefunden, die der Lignifizierung unterliegen, d. h. dem Gefäßsystem des Xylems und Phloemfasern und in einigen Epidermiszellen (Wojtaszek 1997).

Wenn beispielsweise, wie bei der Kolonisation des Xylems der Tomate, H₂O₂ das vorrangig zu entgiftende Substrat ist, ist das entsprechende primär H₂O₂-bevorzugende Enzym für die Entgiftung wichtig. Dies kann durch Bcp und *Cmm*-Katalasen erfolgen. Wird H₂O₂ schnell unschädlich gemacht, so können Folge-ROS, wie das hochreaktive Hydroxyl-Radikal auf niedrigem Niveau gehalten werden und die in anschließenden Reaktionen gebildeten weiteren ROS durch in geringerem Ausmaß vorhandene Peroxidaseaktivitäten, z. B. auch von AhpE, entgiftet werden. Die für *Cmm* NCPPB382 ermittelten Peroxidaseaktivitäten deuten auf eine wichtige Rolle von Bcp, und vermutlich auch AhpE, bei der Kolonisation.

4. Schlussbetrachtung

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein Peroxiredoxin eines strikt aeroben phytopathogenen Aktinomyceten charakterisiert. Im Wachstumstest unter Zusatz von verschiedenen Hydroperoxiden zeigte eine *bcp*-Mutante keinen gegenüber der ebenso behandelten Kontrollkultur veränderten Wachstumsverlauf. Im Pflanzentest mit *Solanum lycopersicum* (Tomate) bewirkte die Infektion der *bcp*-Mutante im

Vergleich zur Infektion mit dem Kontrollstamm CMM101 bei unverändertem Krankheitsverlauf ein reduziertes Pflanzenwachstum, das durch Komplementation wiederhergestellt werden konnte. Bcp hat keinen Einfluss auf den Verlauf der Hypersensitiven Reaktion mit *Mirabilis jalapa*. Die Peroxidase-Aktivitätsmessungen des heterolog überexprimierten, gereinigten Bcp-Proteins sowie seines Homologs AhpE zeigten unterschiedliche Substratspezifitäten und -präferenzen, die mit Ausnahme der Kombination Bcp/H₂O₂ Thioredoxin-abhängig durchgeführt werden. In diesem speziellen Fall scheint die Bcp-Expression *in planta* so hoch zu sein, dass nach H₂O₂-Umsetzung eine Reduktion des oxidierten Bcp nicht erforderlich ist. Bezüglich der Verwertung der anderen überprüften Substrate ergänzen sich beide *Cmm*-Peroxiredoxine. Es konnte auch für Bcp von *Cmm* gezeigt werden, dass das N-terminal konservierte Cystein₄₉ als primär reaktives, peroxidatives Cystein anzusehen ist. Die Untersuchungsergebnisse der Pflanzentests und der biochemischen Charakterisierung deuten darauf hin, dass Bcp im Frühstadium der Kolonisation der Wirtspflanze Tomate von Bedeutung ist. Ob dies auch für das Bcp-Homolog AhpE zutrifft, müsste im Pflanzentest mit einer *ahp*-Mutante gezeigt werden. Das im Genom von *Cmm* NCPPB382 identifizierte dritte putative Peroxiredoxin (CMM_1205) sollte weiterhin nach Herstellung einer Mutante im Pflanzentest mit der Tomate überprüft werden, als auch als gereinigtes Protein zur Bestimmung der Peroxidase-Aktivität eingesetzt werden. Weitere Erkenntnisse kann man von zukünftigen Transkriptionsstudien erwarten.

F. Literatur

- Abt, B. (2003). Etablierung eines Systems zur Komplementation von Transposonmutanten von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Mikrobiologie und Gentechnologie, Universität Bielefeld
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402
- Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P.-J., Ishikawa, A., Dixon, R. A. and Lamb, C. (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 773-784
- Andrews, S. C., Harrison, P. M. and Guest, J. R. (1991). A molecular analysis of the 53.3 minute region of the *Escherichia coli* linkage map. *J. Gen. Microbiol.* 137: 361-367
- Antelmann, H., Engelmann, S., Schmid, R. and Hecker, M. (1996). General and oxidative stress responses in *Bacillus subtilis*: cloning, expression and mutation of alkyl hydroperoxide reductase operon. *J. Bacteriol.* 178: 6571-6578
- Apel, K. and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399
- Apostol, I., Heinstejn, P. F. and Low, P. S. (1989). Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol.* 90: 109-116
- Austin, S. and Nordström, K. (1990). Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids. *Cell* 60: 351-354
- Baker, C. J. and Orlandi, E. W. (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33: 299-321
- Baker, L. M. S. and Poole, L. B. (2003). Catalytic mechanism of thiol peroxidase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 278: 9203-9211
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. and Dinesh-Kumar, S. P. (1997). Signalling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726-733
- Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (Eds.) (1992). *The prokaryotes* 2nd ed., Vol. I and II, Springer-Verlag, N.Y., Berlin
- Berpohl, A. (1990). Untersuchung der pathogenen Wechselwirkung zwischen *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* und der Tomate (*Lycopersicon esculentum*). Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld
- Berpohl, A., Dreier, J., Bahro, R. and Eichenlaub, R. (1996). Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. *Microbiol. Res.* 151: 391-399
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523

- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malmme, K., Weissenbach, J. and Ehrlich, S. D. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 11: 731-753
- Bolwell, G. P., Bindschedler, L. V., Blee, K. A., Butt, V. S., Davies, D. R., Gardner, S. L., Gerrish, C. and Minibayeva, F. (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Botany* 53: 1367-1376
- Bradshaw-Rouse, J. J., Whatley, M. H., Coplin, D. L., Woods, A., Sequeira, L. and Kelman, A. (1981). Agglutination of *Erwinia stewartii* strains with a corn agglutinin: correlation with extracellular polysaccharide production and pathogenicity. *Appl. Env. Microbiol.* 42: 344-350
- Brown, D. G. and Allen, C. (2004). *Ralstonia solanacearum* genes induced during growth in tomato: an inside view of bacterial wilt. *Mol. Microbiol.* 53: 1641-1660
- Bryan, M. (1930). Studies on bacterial canker of tomato. *J. Agric. Res.* 41: 825-851
- Bryk, R., Griffin, P. and Nathan, C. (2000). Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* 407: 211-215
- Bryk, R., Lima, C. D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Nathan, C. (2002). Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. *Science* 295: 1073-1077
- Buchanan, B. B. and Balmer, Y. (2005). Redox regulation: a broadening horizon. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 56: 187-220
- Burger, A., Gräfen, I., Engemann, J., Niermann, E., Pieper, M., Kirchner, O., Gartemann, K.-H. and Eichenlaub, R. (2005). Identification of homologues to the pathogenicity factor Pat-1, a putative serine protease of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Microbiol. Res.* 160: 417-427
- Cabiscol, E., Tamarit, J. and Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* 3: 3-8
- Carmel-Harel, O. and Storz, G. (2000). Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 439-461
- Chae, H. Z., Kim, I. H., Kim, K. and Rhee, S. G. (1993). Cloning, sequencing and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268: 16815-16821
- Chae, H. Z. and Rhee, S. G. (1994). A thiol-specific antioxidant and sequence homology to various proteins of unknown function. *Biofactors* 4: 177-180
- Chae, H. Z., Chung, S. J. and Rhee, S. G. (1994a). Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* 269: 27670-27678
- Chauhan, R. and Mande, C. (2002). Site-directed mutagenesis reveals a novel catalytic mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* alkylhydroperoxidase C. *Biochem. J.* 367: 255-261

- Choi, J., Choi, S., Choi, J., Cha, M.-K., Kim, I.-H. and Shin, W. (2003). Crystal structure of *Escherichia coli* thiol peroxidase in the oxidized state. *J. Biol. Chem.* 278: 49478-49486
- Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Marchand, C., Hirasawa, M., Lancelin, J.-M., Knaff, D. B. and Miginiac-Maslow, M. (2003). The *Arabidopsis* plastidial thioredoxins. *J. Biol. Chem.* 278: 23747-23752
- Comtois, S. L., Gidley, M. D. and Kelly, D. J. (2003). Role of the thioredoxin system and the thiol-peroxidases Tpx and Bcp in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in *Helicobacter pylori*. *Microbiol.* 149: 121-129
- Dangl, J. L. and Jones, D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833
- Davis, M. J., Gillaspie, A. G., Vidaver, A. K. and Harris, R. W. (1984). *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 107-117
- Davis, M. J. (1986). Taxonomy of plant-pathogenic coryneform bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24: 115-140
- De Bruyne, E., Swings, J. and Kesters, K. (1992). Enzymatic relatedness amongst phytopathogenic coryneform bacteria and its potential use für their identification. *System. Appl. Microbiol.* 15: 393-401
- Demple, B. (1991). Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annu. Rev. Genet.* 25: 315-337
- Denny, T. P. (1995). Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33: 173-197
- Deretic, V., Philipp, W., Dhandayuthapani, S., Mudd, M. H., Curcic, R., Garbe, T., Heym, B., Via, L. E. and Cole, S. T. (1996). *Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with an inactivated oxidative-stress regulatory gene: implications for sensitivity to isoniazid. *Mol. Microbiol.* 17: 889-900
- Desikan, R., Mackerness, A.-H., Hancock, J. T. and Neill, S. J. (2001). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* 127: 159-172
- Dietz, K.-J., Horling, F., König, J. and Baier, M. (2002). The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *J. Exp. Botany* 53: 1321-1329
- Dietz, K.-J. (2003). Plant peroxiredoxins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 93-107
- Do, H. M., Hong, J. K., Jung, H. w., Kim, S. H., Ham, J. H. and Hwang, B. K. (2003). Expression of peroxidase-like genes, H₂O₂ production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annuum*. *Mol. Plant. Microbe Int.* 16: 196-205

- Doke, N. (1983a). Involvement of superoxide anion generation in hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 345-357
- Doke, N. (1983b). Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 359-367
- Doke, N. and Ohashi, Y. (1988). Involvement of an O₂⁻ generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32: 163-175
- Doke, N., Miura, Y., Sanchez, L. M., Park, H.-J., Noritake, T., Yoshioka, H. and 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
- Dreier, J., Meletzus, D. and Eichenlaub, R. (1997). Characterization of the plasmid encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *MPMI* 10: 195-206
- Eckhardt, T. (1978). A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1: 584-588
- Eklund, H., Cambillau, C., Sjöberg, B.-M., Holmgren, A., Jörnvall, H., Höög, J.-O. and Brändén, C.-I. (1984). Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. *EMBO J.* 3: 1443-1449
- Engemann, J. (2001). Partielle Charakterisierung des Genoms von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* über Shotgun-Sequenzierung. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld
- Europäische Union (1995). Commission directive 95/4/EC amendment of the 21 Feb 1995 to the European Community Plant Health Directive (77/93/EEC). *Official Journal of the European Communities* L41: 56-60
- Evtushenco, L. I., Dorofeeva, L. V., Subbotin, S. A., Cole, J. R. and Tiedje, J. M. (2000). *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of *Corynebacterium aquaticum* Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis *et al.* 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis *et al.* 1984) gen. nov., comb. nov.. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:371-380
- Fatmi, M. and Schaad, N. W. (2002). Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Marocco. *Plant Pathol.* 51: 149-154
- Flor, H. H. (1956). The complementary genetic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 8: 29-54
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 275-296

- Fobert, P. R. and Després, C. (2005). Redox control of systemic acquired resistance. *Curr. Opin Plant Biology* 8: 378-382
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J. D., Davies, J. M. and Dolan, L. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-446
- Fournier, M., Aubert, C., Dermoun, Z., Durand, M.-C., Moinier, D., and Dolla, A. (2006). Response of the anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough to oxidative conditions: proteome and transcript analysis. *Biochimie* 88: 85-94
- Frand, A. R., Cuozzo, J. W. and Kaiser, C. A. (2000). Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol.* 10: 203-210
- Gartemann, K.-H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R. and Burger, A. (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *J. Biotechnol.* 106: 179-191
- Gitaitis, R., D. (1990). Induction of a hypersensitive-like reaction in four-o'clock by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Dis.* 74: 58-60
- Gleason, M. L., Gitaitis, R. D. and Ricker, M. D. (1993). Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. *Plant Disease* 77: 1069-1076
- 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
- Graff, G., Anderson, L. A. and Jaques, L. W. (1990). Preparation and purification of soybean lipoxygenase-derived unsaturated hydroperoxy and hydroxy fatty acids and determination of molar absorptivities of hydroxy fatty acids. *Anal. Biochem.* 189: 38-47
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85
- Hammond-Kosack, K. E. and Jones, J. D. G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791
- Hirt, H. (1997). Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends Plant Science* 2: 11-15
- Höög, J.-O., Jörnvall, H., Holmgren, A., Calquist, M. and Persson, M. (1983). The primary structure of *Escherichia coli* glutaredoxin. Distant homology with thioredoxins in a superfamily of small proteins with a redox-active cystine disulfide/cysteine dithiol. *Eur. J. Biochem.* 136: 223-232

- Hofmann, B., Hecht, H.-J. and Flohé, L. (2002). Peroxiredoxins. *Biol Chem.* 383: 347-364
- Hogg, P. J. (2003). Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem. Sci.* 28: 210-214
- Holden, M. T., Feil, E. J., Lindsay, J. A., Peacock, S. J., Day, N. P., Enright, M. C., Foster, T. J., Moore, C. E., Hurst, L., Atkin, R., Barron, A., Bason, N., Bentley, S. D., Chillingworth, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Clark, L., Corton, C., Cronin, A., Doggett, J., Diowd, L., Feltwell, T., Hance, Z., Harris, B., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., James, K. D., Lennard, N., Line, A., Mayes, R., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Quail, M. A., Rabbintowitsch, E., Rutherford, K., Sanders, M., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B. G., Spratt, B. G. and Parkhill, J. (2004). Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 9876-9791
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 237-271
- Horton, R. M. (1995). PCR-mediated recombination and mutagenesis. SOEing together tailor-made genes. *Mol. Biotechnol.* 3: 93-99
- Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. C., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M. and Schrepf, H. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual. John Innes Foundation, Norwich, UK
- Jabůrek, M., Miyamoto, S., Di Masci, P., Garlid, K. D. and Ježek, P. (2004). Hydroxy fatty acid cycling mediated by mitochondrial uncoupling protein UCP2. *J. Biol. Chem.* 51: 53097-53102
- Jacobson, F. S., Morgan, R. W., Christman, M. F. and Ames, B. N. (1989). An alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium* involved in the defense of DNA against oxidative damage. *J. Biol. Chem.* 264: 1488-1496
- Jaeger, T., Budde, H., Flohé, L. Menge, U., Singh, M., Trujillo, M. and Radi, R. (2004). Multiple thioredoxin-mediated routes to detoxify hydroperoxides in *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 423: 182-191
- 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
- Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D. Bahro, R. and 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-Microb. Interact.* 13: 703-714
- Jalloul, A., Montillet, J. L., Assigbetsé, K., Agnel, J. P., Delannoy, E., Triantaphylidès, C., Daniel, J. F., Marmey, P., Geiger J. P. and Nicole, M. (2002). Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction. *Plant J.* 32: 1-12

- Jeong, W., Cha, M.-K. and Kim, I.-H. (2000). Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the thiol-specific antioxidant protein (TSA)/alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) Family. *J. Biol. Chem.* 275: 2924-2930
- Kauss, H. (1987). Callose-Synthese: Regulation durch induzierten Ca^{2+} -Einstrom in Pflanzenzellen. *Naturwissenschaften* 74: 275-281
- Kawasaki, S., Watamura, X., Ono, M., Watanabe, T., Takeda, K. and Niimura, Y. (2005). Adaptive responses to oxygen stress in obligatory anaerobes *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium aminovalericum*. *Appl. Env. Microbiol.* 71: 8442-8450
- Kiraly, Z., El-Zahaby, H. M. and Klement, Z. (1997). Role of extracellular polysaccharide (EPS) slime of plant pathogenic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. *J. Phytopathol.* 145: 59-68
- Kirchner, O. (2003). Etablierung genetischer Methoden für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Charakterisierung von Mutanten mit veränderter Morphologie, Physiologie und Virulenz. Dissertation, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld
- Kolomiets, M.V., Chen, H., Gladon, R. J., Braun, E. J. and Hannapel, D. J. (2000). A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection. *Plant Physiol.* 124: 1121-1130
- Kong, W., Shiota, S., Shi, Y., Nakayama, H. and Nakayama, K. (2000). A novel peroxiredoxin of the plant *Sedum lineare* is a homologue of *Escherichia coli* bacterioferritin co-migratory protein (Bcp). *Biochem. J.* 351: 107-114
- Kuhs, S. (2004). Charakterisierung der welkeinduzierenden Eigenschaften von Genen des Plasmids pCM1 von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., et al. (126 other authors), and Danchin, A. (1997), The complete genome sequence of the grampositive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390: 249-256
- Lamb, C. and Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 251-275
- Lamb, C. J., Lawton, M. A., Dron, M. and Dixon, R. A. (1989). Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56: 215-224
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

- Laine, M. J., Nakhei, H., Dreier, J., Lehtilä, K., Meletzus, D., Eichenlaub, R. and Metzler, M. C. (1996). Stable transformation of the Gram-positive phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* with several cloning vectors. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1500-1506
- Leigh, J. A. and Coplin, D. L. (1992). Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 307-346
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive response. *Cell* 79: 583-593
- Li, S., Peterson, N. A., Kim, M.-Y., Kim, C.-Y., Hung, L.-W., Yu, M., Lakin, T., Segelke, B. W., Lott, J. S. and Baker, E. N. (2005). Crystal structure of AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*, a 1-Cys peroxiredoxin. *J. Mol. Biol.* 346: 1035-1046
- Loprasert, S., Atichartpongkum, S., Whangsuk, W. and Mongkolsuk, S. (1997). Isolation and analysis of the *Xanthomonas* alkyl hydroperoxide reductase gene and the peroxide sensor regulator genes *ahpC* and *ahpF-oxyR-orfX*. *J. Bacteriol.* 179: 3944-3949
- Loprasert, S., Fuangthong, M., Whangsuk, W., Atichartpongkul, A. and Mongkolsuk, S. (2000). Molecular and physiological analysis of an OxyR-regulated *ahpC* promoter in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Mol. Microbiol.* 37: 1504-1514
- Lugtenberg, B. J. J., Chin-A-Woeng, T. F. C. and Bleomberg, G. V. (2002). Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 373-383
- Maiorino, M., Gregolin, C. and Ursini, F. (1990). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods in Enzymol.* 186: 448-475
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, N.Y.
- Mehdy, M. C. (1994). Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105: 467-472
- Meletzus, D. and Eichenlaub, R. (1991). Transformation of the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* by electroporation and development of a cloning vector. *J. Bact.* 173: 184-190
- Meletzus, D., Bermpohl, A., Dreier, J. and Eichenlaub, R. (1993). Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *J. Bact.* 175: 2131-2136
- Metzler, M. C., Laine, M. J. and de Boer, S. H. (1997). The status of molecular biological research on the plant pathogenic genus *Clavibacter*. *FEMS Microbiol. Lett.* 150: 1-8
- Mongkolsuk, S., Whangsuk, W., Vattanaviboon, P., Loprasert, S. and Fuangthong, M. (2000). A *Xanthomonas* alkyl hydroperoxide reductase subunit C (*ahpC*) mutant showed an altered peroxide stress response and complex regulation of the compensatory response of peroxide detoxification enzymes. *J. Bacteriol.* 182: 6845-6849

- Montesinos, E., Bonaterra, A., Badosa, E., Francés, J., Alemany, J., Llorente, I. and Moragrega, C. (2002). Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *Int. Microbiol.* 5: 169-175
- Morel, F., Doussiere, J. and Vignais, P. V. (1991). The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur. J. Biochem.* 201: 523-546
- Mullis, K., Falloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Ehrlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant. Biol.* 51: 263-273
- Nakamura, H. (2004). Thioredoxin as a key molecule in redox signalling. *Antioxid. Redox. Signal.* 6: 15-16
- Nakhei, H. (1993). Entwicklung eines Vektorsystems für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* auf Basis des Plasmides pCM2. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D. and Hancock, J. T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Botany* 53: 1237-1247
- Nishiyama, Y., Massey, V., Takeda, K., Kawasaki, S., Sato, J., Watanabe, T. and Niimura, Y. (2001). Hydrogen peroxide-forming NADH-Oxidase belonging to the peroxiredoxin oxidoreductase family: existence and physiological role in bacteria. *J. Bact.* 183: 2431-2438
- Novick, R. P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* 51: 381-395
- Ochsner, U. A., Vasil, M. L., Alsabbagh, E., Parvatiyar, K. and Hassett, D. J. (2000). Role of the *Pseudomonas aeruginosa oxyR-regG* operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of the *katB-ankB*, *ahpB*, and *ahpC-ahpF*. *J. Bacteriol.* 182: 4533-4544
- Orozco-Cárdenas, M. L., Narváez-Vásquez, J. and Ryn, C. A. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin and methyl jasmonat. *Plant Cell* 13: 179-191
- Pieper, M. (2001). Untersuchungen am Plasmid pCM2 von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: Identifizierung der *pat-1*-homologen Gene *phpA* und *phpB* und Nachweis der Konjugation. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V. and Casini, A. F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* 66: 1499-1503
- Poole, L. B. and Ellis, H. R. (1996). Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 1. Purification and enzymatic activities of overexpressed AhpF and AhpC proteins. *Biochemistry* 35: 56-64

- Poole, L. B. (1996). Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 2. Cystein disulfides involved in catalysis of peroxide reduction. *Biochemistry* 35: 65-75
- Poole, L. B., Reynolds, C. M., Wood, Z. A., Karplus, P. A., Ellis, H. R. and Calzi, M. L. (2000). AhpF and other NADH:peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low M_r thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267: 6126-6133
- Poole, L. B., Karplus, P. A. and Claiborne A. (2004). Protein sulfenic acids in redox signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44: 325-347
- Rainey, P. B. and Preston, G. M. (2000). *In vivo* expression technology strategies: valuable tools for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 440-444
- Rhee, S. G., Chae, H. Z. and Kim, K. (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signalling. *Free Rad. Biol. Med.* 38: 1543-1552
- Rouhier, N., Gelhaye, E., Sautiere, P.-E., Brun, A., Laurent, P., Tagu, D., Gerard, J., de Fay, E., Meyer, Y. and Jacquot, J.-P. (2001). Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either Glutaredoxin or thioredoxin as a proton Donor. *Plant Physiol.* 127: 1299-1309
- Rouhier, N. and Jacquot, J.-P. (2002). Plant peroxiredoxins: alternative hydroperoxide scavenging enzymes. *Photosynth. Res.* 74: 259-268
- Rouhier, N., Gelhaye, E. and Jacquot, J.-P. (2002 a). Exploring the active site of plant glutaredoxin by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* 511: 145-149
- Rouhier, N., Gelhaye, E. and Jacquot, J.-P. (2002 b). Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* 277: 13609-13614
- Rouhier, N., Gelhaye, E. and Jacquot, J.-P. (2002c). Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from Poplar. Protein-protein interaction and catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* 277: 13609-13614
- Rouhier, N., Gelhaye, E. and Jacquot, J.-P. (2004a). Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 1266-1277
- Rouhier, N., Gelhaye, E., Gualberto, J. M., Jordy, M.-N., De Fay, E., Hirasawa, M., Duplessis, S., Lemaire, S. D., Frey, P., Martin, F., Manieri, W., Knaff, D. B. and Jacquot, J.-P. (2004b). Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense. *Plant Physiol.* 134: 1027-1038
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, New York
- Sasaki, J., Chijimatsu, M. and Suzuki, K.-I. (1998). Taxonomic significance of 2,4-diaminobutyric acid isomers in the cell wall peptidoglycan of actinomycetes and reclassification of *Clavibacter toxicus* as *Rathayibacter toxicus* comb. nov.. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 403-410
- Seaver, L. C. and Imlay, J. (2001). Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183: 7173-7181

- Smith, G. E. and Summers, M. D. (1980). A bidirectional transfer of DNA and RNA to nitrocellulose or diazobenzyloxymethyl-paper. *Anal. Biochem.* 109: 123-129
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. and Ward-Rainey, N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteriaceae* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 479-491
- Storz, G., Jacobson, F. S., Tartaglia, L. A., Morgan, R. W., Silveira, L. A. and Ames, B. N. (1989). An alkyl hydroperoxide reductase induced by oxidative stress in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: genetic characterization and cloning of *ahp*. *J. Bacteriol.* 171: 2049-2055
- Storz, G., Tartaglia, L. A. and Ames, B. N. (1990). Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* 248: 189-194
- Strider, D. L. (1969). Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. A literature review and bibliography. North Carolina Agricultural Experiment Station, Tech. Bull. 193
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. and Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* 185: 60-89
- Takeda, K., Nishiyama, Y., Yoda, K., Watanabe, T., Nimura-Matsune, K., Mura, K., Tokue, C., Katoh, T., Kawasaki, S. and Niimura, Y. (2004). Distribution of Prx-linked hydroperoxide reductase activity among microorganisms. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 698: 20-27
- Tauch, A., Zheng, Z., Pühler, A. and Kalinowski, J. (1998). *Corynebacterium striatum* chloramphenicol resistance transposon Tn5564: genetic organization and transposition in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid* 40: 126-139
- Van Alfen, N. K., McMillan, B. D. and Wang, Y. (1987). Properties of the extracellular polysaccharides of *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum* that may affect pathogenesis. *Phytopathology* 77: 496-501
- Van Breusegem, F., Vranová, E., Dat, J. F. and Inzé, D. (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161: 405-414
- Van Steekelenburg, N. A. M. (1985). Resistance to *Corynebacterium michiganense* in tomato genotypes. *Euphytica* 34: 245-250
- Vieira, J. and Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259-268
- Vidaver, A. K. and Mandel, M. (1974). *Corynebacterium nebraskense*, a new, orange-pigmented phytopathogenic species. *Int. J. Syst. Biol.* 24: 482-485
- von Heijne, G. (1986). A new method for prediction of signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids res.* 14: 4683-4690
- Vranová, E., Inzé, D. and Van Breusegem, F. (2002). Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53: 1227-1236

- Wallis, F. M. (1977). Ultrastructural histopathology of tomato plants infected with *Corynebacterium michiganense*. *Physiol. Plant Pathol.* 11: 333-342
- Wang, G., Conover, R. C., Benoit, S. Olczak, A. A., Olson, J. W., Johnson, M. K. and Maier, R. J. (2004). Role of a bacterial organic hydroperoxide detoxification system in preventing catalase inactivation. *J. Biol. Chem.* 279: 51908-51914
- Wang, G., Olczak, A. A., Walton, J. P. and Maier, R. J. (2005). Contribution of the *Helicobacter pylori* thiol peroxidase bacterioferritin comigratory protein to oxidative stress resistance and host colonization. *Infect. Immun.* 73: 378-384
- Wei, Z. M., Wie, Z., 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
- Wolff, S. P. (1994). Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Meth. Enzymol.* 233: 182-189
- Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322: 681-692
- Wood, Z. A., Schröder, E., Harris, J. R. and Poole, L. B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28: 32-40
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119

G. Anhang**1. Abkürzungen**

Ø	Durchmesser
% (w/v), % (v/v)	Gewichtsprozent, Volumenprozent
°C	Grad Celsius
µF	Mikro-Farad
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
add.	addieren
Amp, Amp ^R	Ampicillin, Ampicillin-resistent
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
<i>avr</i>	Avirulenz
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylpyrophosphat
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
ccc	supercoiled
CDTA	<i>trans</i> -1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
cfu	colony forming units
cm	Zentimeter
Cm, Cm ^R	Chloramphenicol, Chloramphenicol-resistent
<i>Cmm</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
<i>Cmm382</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB382
<i>Cms</i>	<i>Cavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>
<i>cmx</i>	Chloramphenicolexportergen
cv.	cultivar
Cys	Cystein
d	Abstand
Da	Dalton
d. h.	das heißt
DIG	Digoxygenin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-Aminoethylether)-tetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EPS	Exopolysaccharid
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G	Guanin
ggf.	gegebenenfalls
Gn, Gn ^R	Gentamycin, Gentamycin-resistent

Grx	Glutaredoxin
GSH	Glutathion
h	Stunde
HR	Hypersensitive Reaktion
<i>hrp</i>	hypersensitive reaction and pathogenicity
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
Km, Km ^R	Kanamycin, Kanamycin-resistent
kV	Kilo-Volt
l	Liter
LB	Luria Broth
ln	natürlicher Logarithmus
Lux	Beleuchtungsstärke
M	Mol, molar
mA	Milliampere
max.	maximal
mcs	multiple cloning site
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MM	Minimalmedium
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
ms	Millisekunde
MW	Molekulargewicht
NaAc	Natriumacetat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
NCPPB	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria
Nm, Nm ^R	Neomycin, Neomycin-resistent
nm	Nanometer
oc	open circle
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PR	pathogenesis related
Prx	Peroxiredoxin
PS	Puffersaline
Pu	Purin
pv.	pathovar
Py	Pyrimidin
RBS	Ribosomenbindestelle
<i>R</i> -Gen	Resistenzgen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reactive oxygen species
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAR	systemic acquired resistance
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
Ser	Serin
ss	einzelsträngig
SSC	Sodium-Saline-Citrat
subsp.	Subspezies
t	Zeit
T	Thymin

TA	Tris-Acetat
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat
TBY	Trypton-Broth-Yeast
TEMED	Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) Aminoetham
Trx	Thioredoxin
u	Unit
U	Umdrehungen
ü/N	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen
WI	Welkeindex
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

2. Proteinalignments

Die Graustufen der Proteinalignments geben die Übereinstimmung der Aminosäuren wieder. schwarz = 100 %; dunkelgrau > 80 %; hellgrau > 60 %

2.1. Bcp

Das Aligment zeigt Bcp-homologe Proteine mit dazugehöriger Accessionnummer der Gram-positiven Bakterienstämme: Bcp

Cmm: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Cms: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Lxx: *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (YP_062748)

Map: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (NP_961263)

Sav: *Streptomyces avermitilis* (NP_826353p)

Gram-negativen Bakterienstämme: Bcp

Yru: *Yersinia ruckeri* (AAV31124)

Eco: *Escherichia coli* K12 (NP_416975)

Xfa: *Xylella fastidiosa* (NP_779926)

Archaeobakterien: Bcp bzw. Alkyl hydroperoxide reductase/ Thiol specific antioxidant/ Mal allergen

Hal: *Halobacterium* sp. (NP_280089)

Mbu: *Methanococcoides buchneri* (ZP_00563586)

Pflanzen: Peroxiredoxin Q (PrxQ)

Ath: *Arabidopsis thaliana* (NP_189235)

Sli: *Sedum lineare* (BAA90524)

Grünalge: Peroxiredoxin

Crh: *Chlamydomonas reinhardtii* (CAC19677)

Hefe: Thiol-specific antioxidant protein (TSA)

Sce: *Saccharomyces cerevisiae* (AAA16374)

Tier/Mensch: Peroxiredoxin 2 (Prx2)

Rno: *Rattus norvegicus* (AAH58481)

Mmu: *Mus musculus* (AAC35744)

Hsa_a: *Homo sapiens* Isoform a (NP_005800)

Hsa_c: *Homo sapiens* Isoform c (NP_859428)

Die konservierten Cysteine sind rot markiert, weitere in den Sequenz enthaltene Cysteine sind orangefarbig gekennzeichnet.

```

          *           20           *           40           *           60
Cmm : ----- : -
Cms : ----- : -
Lxx : ----- : -
Map : -----MNRKG : 5
Sav : ----- : -
Yru : ----- : -
Eco : ----- : -
Xfa : ----- : -
Hal : ----- : -
Mbu : ----- : -
Ath : MAASSSSFTL NHTTLRLTLPKRKTLVTKTQFSVPTKSSESNNFFGSTLTHSSYISPVSSSS : 60
Sli : -----QTLQT-----SSQSQFHGLKFSHASSFKSPSAPL : 29
Crh : ----- : -
Sce : ----- : -
Rno : ----- : -
Mmu : ----- : -
Hsa_a : ----- : -
Hsa_c : ----- : -

```

```

          *           80           *           100          *           120
Cmm : --MNETTRLEK QPAPDF TLPDQD G---TPVTLSDLRGQDVIVVYFYPAAGT PGCTTQACD : 55
Cms : --MTETTRLEK QPAPDF TLPDQD G---SPVTLSDLRGQDVIVVYFYPAAGT PGCTTQACD : 55
Lxx : --MTD-ARLEA QQAAPAF TLKDQD G---KSVSLADYAGEQVIVVYFYPAAMT PGCTKEACD : 54
Map : LTLTETTRLAPGDKAPAFSLPDADG---KTVKLSDFKGRKVIIVYFYPAAST PGCTKQACD : 62
Sav : ---MSERLQPCDTAPAF TLPDAD G---NEVSLADHKGRKVIIVYFYPAALT PGCTKQACD : 53
Yru : ----MSPLKAGDIAPKFSLPDQD G---EQIALADFLGQRVLVYFYPKAMT PGCTVQACG : 52
Eco : ----MNPLKAGDIAPKFSLPDQD G---EQVNLTDFOQRVLVYFYPKAMT PGCTVQACG : 52
Xfa : ----MNI GDTLNHSLLNHPLMLSGG---TCKTSLSDYTNQWLVLVYFYPKDNT PGCTTEGLE : 53
Hal : ----MLSECTTAEDESLANQDD---ETVSLSSSEAGQHVVVYFYPRADT PGCTSEACE : 50
Mbu : ---MAKTSLSAGEKAPENLCLPDSEG---NDVTLNDLKGKWWVLYFYPRDNTSGCSIEAME : 54
Ath : LKGLIFAKVNGQAAPDF TLKDQNG---KPVSLKKYKPKPVVLYFYPADET PGCTKQACA : 117
Sli : RKNSIFAKVTKGSTPPPTLKDQEG---RPVSLSKFKPKPVVYFYPADET PGCTKQACA : 86
Crh : -RASHAEKPLVGSVAPDF KAQAVFDQEFQEITLSKYRGGKYVWLFYPLDFTFVCPTTEITA : 59
Sce : -----MVAQVQKQAPTEFKKTA VVDGVFDEVSLDKYKGGYVWLAETPLAF TFVCPTTEIIA : 54
Rno : ---MASGNAHICKPAPDF TATAVVDGAFKEIKLSDYRGGKYVWLFYPLDFTFVCPTTEIIA : 57
Mmu : ---MASGNAQICKSAPDF TATAVVDGAFKEIKLSDYRGGKYVWLFYPLDFTFVCPTTEIIA : 57
Hsa_a : ---MASGNARICKPAPDF KATAVVDGAFKEVKLSDYKGGKYVWLFYPLDFTFVCPTTEIIA : 57
Hsa_c : ---MASGNARICKPAPDF KATAVVDGAFKEVKLSDYKGGKYVWLFYPLDFTFVCPTTEIIA : 57

```

```

          *           140          *           160          *           180
Cmm : FRDSMSDSLQGAGYRVLGISKDPQEDLARFREE-----QGIGFTLLSDPDLEVHRAYAA : 108
Cms : FRDSMSDSLQGAGYRVLGISKDPQEDLARFREE-----QGIGFTLLSDPDLEVHRAYAA : 108
Lxx : FRDSLASLASSGYRVLGISKDPQEDLARFREE-----EGINFPLLSDEDLAVHSAYGA : 107
Map : FRDSLAE LNAGLDVVGIS PDKPEK LAKFRDA-----EKLTFP LLSDPDR TVLTAYGA : 115
Sav : ETDNLELLAGAGYDVIGVSPDKPEK LAKFREQ-----ENLKVTLVGDPDKQVLEAYGA : 106
Yru : LRDNMDTLKNAGVEVLGIS TDKPEK LSRFAEK-----ELINFTLLS DENHQVAEQFGV : 105
Eco : LRDNMDELKKAQVDVLGIS TDKPEK LSRFAEK-----ELINFTLLS DEDHQVCEQFGV : 105
Xfa : FNVLLPQFKQINATV LGVSRDSVKSHDSFCAK-----QGFTFP LVS DSDALLCKAFDV : 106
Hal : ERDNWGRYDDAGVPVVGISDDPVSELA AFKDK-----YNDPFDLLSDAGGEVATAYES : 103
Mbu : FTKLKDDFEKECAFILGVSKDSQASHKKFIEK-----KELGITLLSDEGTELQSSYDV : 107
Ath : FRDSYEKFKKAGAEVIGISGDS SASHKAFASK-----YKLPYTL LLSDEGNKVRKDWGV : 170
Sli : FRDSYEKFKKAGAEVVGISGDSSESHKAF AKK-----YKLPFTLLSDEGNKVRKEWGV : 139
Crh : FSDRYKEFKDINTEVLGVSVDSQFTHLAWIQTDRKEGGLGDLAYPLVADLKEISKAYGV : 119
Sce : FSEAAKKFEEQCAQVLEASTDSEYSL LAWTNI PRKEGGLGPINI PLLADTNHSLSRDYGV : 114
Rno : FSDHAEDFRKLCCEVLGVSVDSQFTHLAWINTPRKEGGLGPINI PLLADVTKSLSQNYGV : 117
Mmu : FSDHAEDFRKLCCEVLGVSVDSQFTHLAWINTPRKEGGLGPINI PLLADVTKSLSQNYGV : 117
Hsa_a : FSNRAEDFRKLCCEVLGVSVDSQFTHLAWINTPRKEGGLGPINI PLLADVTRRLSEDYGV : 117
Hsa_c : FSNRAEDFRKLCCEVLGVSVDSQFTHLAWYEQGPKR-----EVA AKLTPSG-- : 103

```

```

          *           200           *           220           *           240
Cmm  : YGEKSLYGKKVTGVIRSTVVVDGEGRVALPLYN-VKATGHVASLRKKLGVDA----- : 159
Cms  : YGEKSLYGKKVTGVIRSTVVVDGEGRVTLPLYN-VKATGHVASLRKKLGVDA----- : 159
Lxx  : YGEKKLYGKVVEGVIRSTFVLDTDGSVRLPLYN-VKATGHVTSLRKKLGLD----- : 157
Map  : YGEKQMYGKTVTGVIRSTFVVDEKGRIAVAQYN-VKATGHVAKLRRDLSV----- : 164
Sav  : FGEKKLYGKTVVGVIRSTVVVDEEGKVERALYN-VKATGHVAKLIKDLGI----- : 155
Yru  : WGEKSEFMGKTYDGIHRI SFLIDGEGKIEHVFDN-FKTTNHHDIVLAYLQONA----- : 156
Eco  : WGEKSEFMGKTYDGIHRI SFLIDADGKIEHVFDN-FKTTNHHDVVLNWLKEHA----- : 156
Xfa  : IKEKTMYGKQIIGIERSTFLIGPTHRIVEAWRQ-VKVPGHAEVLTCLKAHAEQ----- : 159
Hal  : YDEQEITGELMDVTLRNTYVIGPDGTITAAFEG-VDPEGHADEVLAIEDAA----- : 154
Mbu  : WHQKKMAGKEYMGTVRTTEFLIDPEGNLAKVWVK-VKAKGHAMEVLDLKMIAE----- : 160
Ath  : PG--DLFGALPG---RQTYVLDKNGVVQLIYNNQFQPEKHIDETLKLKAA----- : 216
Sli  : PS--DLFGTLPG---RETYVLDKNGVVQLVYNNQFQPEKHIDETLKLQSLK----- : 186
Crh  : LT-EDGIS-----LRGLFIIIDKEGVVQHATINNLAFGRSVDETKRVLQAIQYVQSNPDE : 172
Sce  : LIEEEGVA-----LRGLFIIIDPKGVIRHITINDLPVGRNVDEALRLVEAFQWTDKN-GT : 167
Rno  : LKNDEGIA-----YRGLFIIIDAKGVLQRITVNDLPVGRSVDEALRLVQAFQYTDEH-GE : 170
Mmu  : LKNDEGIA-----YRGLFIIIDAKGVLQRITVNDLPVGRSVDEALRLVQAFQYTDEH-GE : 170
Hsa_a : LKTDEGIA-----YRGLFIIIDGKGVLRQITVNDLPVGRSVDEALRLVQAFQYTDEH-GE : 170
Hsa_c : ---PSSVA-----SWPLLNLWNLRFPIVKIMETLPP-----KSLRMMTVISI----- : 142

```

```

          *           260           *
Cmm  : ----- : -
Cms  : ----- : -
Lxx  : ----- : -
Map  : ----- : -
Sav  : ----- : -
Yru  : ----- : -
Eco  : ----- : -
Xfa  : ----- : -
Hal  : ----- : -
Mbu  : ----- : -
Ath  : ----- : -
Sli  : ----- : -
Crh  : VCPAGWKPGDKTMKPDPKGSKEYFSAV--- : 199
Sce  : VLPCNWTPGAATIKPTVEDSKEYFEAANK- : 196
Rno  : VCPAGWKPGSDTIKPNVDDSKEYFSKHN-- : 198
Mmu  : VCPAGWKPGSDNIKPNVDDSKEYFSKHN-- : 198
Hsa_a : VCPAGWKPGSDTIKPNVDDSKEYFSKHN-- : 198
Hsa_c : ----- : -

```

2.2. AhpE

Gezeigt sind AhpE-homologe Proteine mit den zugehörigen Accessionnummern von:

AhpE_Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (AhpE)
AhpE_Cms	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> (AhpE)
Ahp_Lxx	AAT89109.1 <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> Stamm CTCB07 (Protein der AhpC/TSA-Familie)
Ahp_Art	ZP_00412844 <i>Arthrobacter</i> spec. (AhpC/TSA/Mal-Allergen)
TSA_Sco	NP_626616 <i>Streptomyces coelicolor</i> (TSA-Protein)
AhpE_Map	NP_960925 <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (AhpE)
AhpE_Mtu	NP_216754 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv (AhpE)

Die konservierten Cysteine sind rot markiert, weitere in den Sequenzen enthaltene Cysteine sind orangefarbig gekennzeichnet.

		*	20	*	40	*	60											
AhpE_Cmm	: MALAN-----DTQAPDFEIANCFGERVRLSEYRGHRAVALVFFPLAESG							: 44										
AhpE_Cms	: MALAN-----DTQAPDFEIANCFGERVRLSEYRGHRAVALVFFPLAESG							: 44										
Ahp_Lxx	: MALEN-----DTQAPDFEIPNCHGQAVELSDERGRKAVTIVFFPLAESG							: 44										
Ahp_Art	: MTLQQLQTVYGAGEAPAVPEVGDIAPDFEIVNRYGEEVRLSEIRGR-NVVVVVYFFFAESG							: 59										
TSA_Sco	: MAIQ-----VGDKAPDFELKDNHGATVRLSEFRGRKNVLLFFPFAFTG							: 44										
AhpE_Map	: MLSVG-----TEAPDFEIRDNQQRVLLSSYRGSKNVLLVFFPLAFTG							: 43										
AhpE_Mtu	: MLNVG-----ATAPDFEIRDNQQRVLLIRGYRGAKNVLLVFFPLAFTG							: 43										
	M		APDF	L	q	V	Ls	RG	V	vF	P	AF	G					
		*	80	*	100	*	120											
AhpE_Cmm	: TCTGEMCQLEENIGLEADSRVELIGISVDSKHTLRAWAQQCGIDFQILLADFWPHGQVAKE							: 104										
AhpE_Cms	: TCTGEMCQLEENIGLEADSRVELIGISVDSKHTLRAWAQQCGIDFQILLADFWPHGQVAKE							: 104										
Ahp_Lxx	: TCTGELCELRDNLALFEDHRVELLAVSVDSKFTLRAWEEHGYGFSLLADFWPHGGIAKE							: 104										
Ahp_Art	: ICTGELCEIRDNLSEEDANATVLAISVDSKFTVRAYAEKBCYGEDLLADFWPHGAVAAQ							: 119										
TSA_Sco	: VCTGELCEVRDNLPCFESDRDTEVLAVSNDISIHLRVFAEQBCLEYPLLSDFWPHGNVSRA							: 104										
AhpE_Map	: ICQGELDQLRDHLPEFENDDSAVLAISVGPPTTHRIWALESCFTFPVLSDFWPHGAVSQA							: 103										
AhpE_Mtu	: ICQGELDQLRDHLPEFENDDSAAALAIISVGPPTTHKIWAATQSGFTFPVLSDFWPHGAVSQA							: 103										
	C	GE		L	F		Sv	T	r	a	G	f	ll	DFWPHG	v			
		*	140	*	160	*												
AhpE_Cmm	: YGVFLEEKGFANRATEFLIDTRGIIRGSFITAPGEARELEAYRTAIRDLALVPA							: 157										
AhpE_Cms	: YGVFLEKGFANRATEFLIDTRGIIRGSFITAPGEARELEAYRTAIRDLALVPA							: 157										
Ahp_Lxx	: YGVFLPEKGFANRATEFVIDESGIIRASFITAPGRARSIDTYRTALDILPAHVG							: 157										
Ahp_Art	: YGVFDPNSGMAQRCTFIIDAGIIRYVVVNPRQARDLAAYRAALSELGGN--							: 170										
TSA_Sco	: YGVFDEDKGCVRGTFVIDQEGVVRWTVVNALPDARDLAEYVKALDAIL----							: 152										
AhpE_Map	: YGVFNDEAGYSNRGTFVVDRSGIIRFAEMKQPGESRDQRLWTDALAAALKA---							: 153										
AhpE_Mtu	: YGVFNEQACIENRGTFVVDRSGIIRFAEMKQPGEVDRDQRLWTDALAAALTA---							: 153										
	YGVF		G	a	R	T	F	D	G	i	i	R		g	R		A	L

2.3. AhpE und Bcp

Gezeigt sind Ahp- und Bcp-homologe Proteine mit den Accessionnummern von:

AhpE_Cmm: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*
 AhpE_Cms: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*
 AhpE_Map: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (NP_960925)
 AhpE_Mtu: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (NP_216754)

Bcp_Cmm: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*
 Bcp_Cms: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*
 Bcp_Map: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (NP_961263)
 BcpB_Map: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (NP_960236)

Die konservierten Cysteine sind rot markiert, weitere in den Sequenzen enthaltene Cysteine sind orangefarbig gekennzeichnet.

```

                *           20           *           40           *           60
AhpE_Cmm : -----MALANDTQAPDFEELANQFGERVRLSEYRG : 29
AhpE_Cms : -----MALANDTQAPDFEELANQFGERVRLSEYRG : 29
AhpE_Map : -----MLSVGTAPDFETLRDONQQRVTLSSYRG : 28
AhpE_Mtu : -----MLNVGATAPDFETLRDONQQLVTLRGYRG : 28
BcpB_Map : MARPARGCNATANSRPIFRRGVTTGGGARSVSPMKPGDTVADFELEPDQTGTPRKLSDLLA : 60
Bcp_Cmm : -----MNETTR-----LEKQAPDFETLEPDQDGTPTVTLSDLRG : 33
Bcp_Cms : -----MTETTR-----LEKQAPDFETLEPDQDGTPTVTLSDLRG : 33
Bcp_Map : --MNRKGLTLTETTR-----LAPGDKAAEASLEPDADGKTVKLSDFKG : 40

                *           80           *           100          *           120
AhpE_Cmm : HRAVALVFFPLAFSGTCTGEMCQLEENLGLFADSRVELTGISVDSKHTLRAWAQQQGGIDE : 89
AhpE_Cms : HRAVALVFFPLAFSGTCTGEMCQLEENLGLFADSRVELTGISVDSKHTLRAWAQQQGGIDE : 89
AhpE_Map : SKNVLLVFFPLAFSGTCTGEMCQLEENLGLFADSRVELTGISVDSKHTLRAWAQQQGGIDE : 88
AhpE_Mtu : AKNVLLVFFPLAFSGTCTGEMCQLEENLGLFADSRVELTGISVDSKHTLRAWAQQQGGIDE : 88
BcpB_Map : AGPVVLFYPAAMTPGCTKEACHFRDLAAEFAAVGANRVGTSADPVDKQAKFADLQKFDY : 120
Bcp_Cmm : Q-DVIVRYFYPAAGTPGCTTQACDFRDSMDSLQAGYRVLTGISKDPQEDLARFREEQGLGF : 92
Bcp_Cms : Q-DVIVRYFYPAAGTPGCTTQACDFRDSMDSLQAGYRVLTGISKDPQEDLARFREEQGLGF : 92
Bcp_Map : R-KVIVRYFYPAASTPGCTKQACDFRDSMDSLQAGYRVLTGISKDPQEDLARFREEQGLGF : 99

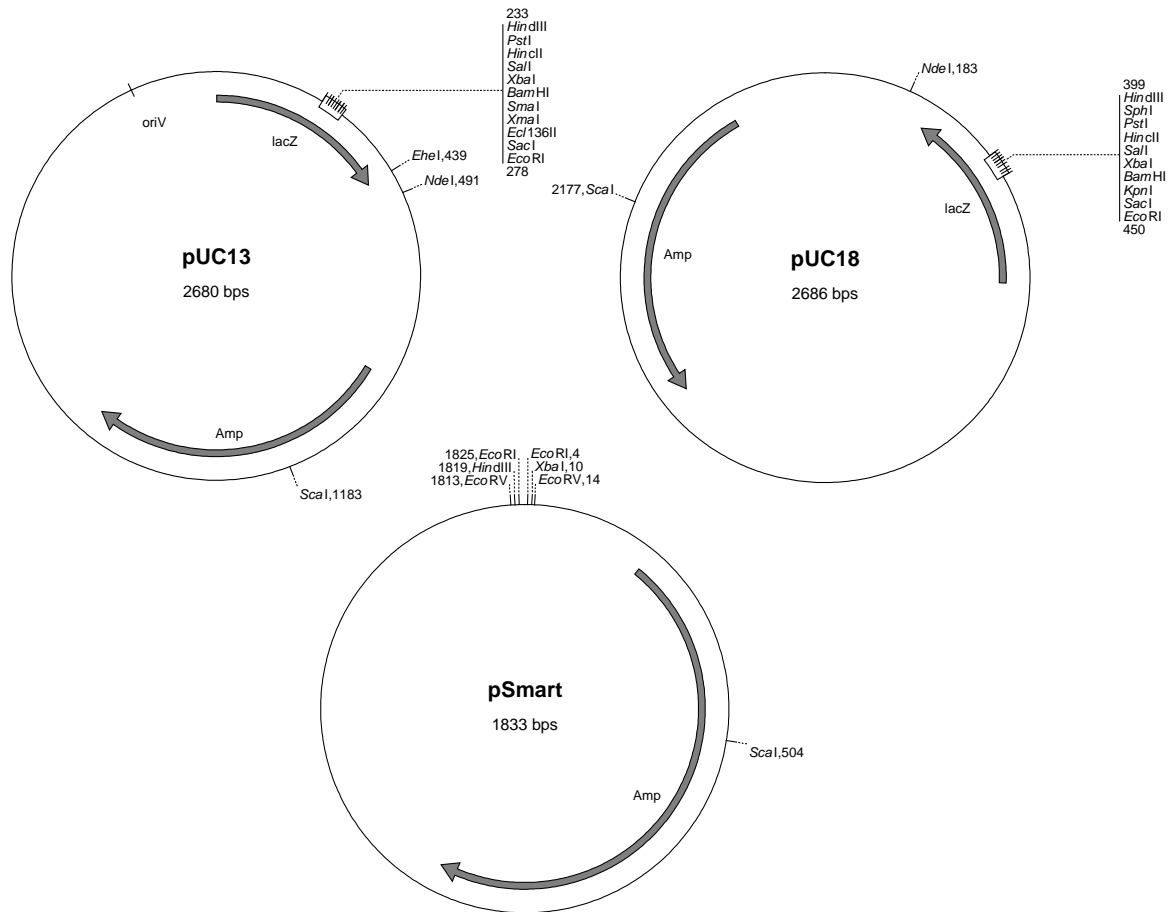
                *           140          *           160          *           180
AhpE_Cmm : QLLADFWPHGQVAKEYGVFLEBKGFANRAFLIDTRGIIIRGSFITAPGEARELEAYRTAI : 149
AhpE_Cms : QLLADFWPHGQVAKEYGVFLEBKGFANRAFLIDTRGIIIRGSFITAPGEARELEAYRTAI : 149
AhpE_Map : PVLSDFWPHGAVSQSYGVFNDEAGYSNRGTFVWDRSGIIRFAEMKQPGEVSRDQRLWTDAL : 148
AhpE_Mtu : PLLSDFWPHGAVSQSYGVFNDEAGYSNRGTFVWDRSGIIRFAEMKQPGEVSRDQRLWTDAL : 148
BcpB_Map : PLLSD--TDGAVAAQFQV--RGLLSKLLP-VKRTTFVIDTDRTVLDVIVSSEFNMDTHAD : 175
Bcp_Cmm : TLLSD--PDLEVHRAVAAYGEEKSLYGKKTGVIRSTVVVD-GEGRVALPLYNVKATGHVA : 149
Bcp_Cms : TLLSD--PDLEVHRAVAAYGEEKSLYGKKTGVIRSTVVVD-GEGRVTLPLYNVKATGHVA : 149
Bcp_Map : PLLSD--PDRTVLTAYCAYGEEKQMYGKTGVIRSTFVVD-EKGRIAVAQYNVKATGHVA : 156

                *
AhpE_Cmm : RDLALVPA-- : 157
AhpE_Cms : RDLALVPA-- : 157
AhpE_Map : AALKA----- : 153
AhpE_Mtu : AALTA----- : 153
BcpB_Map : KALATLRARA : 185
Bcp_Cmm : SLRKKLGVDA : 159
Bcp_Cms : SLRKKLGVDA : 159
Bcp_Map : KLRRDLSV-- : 164

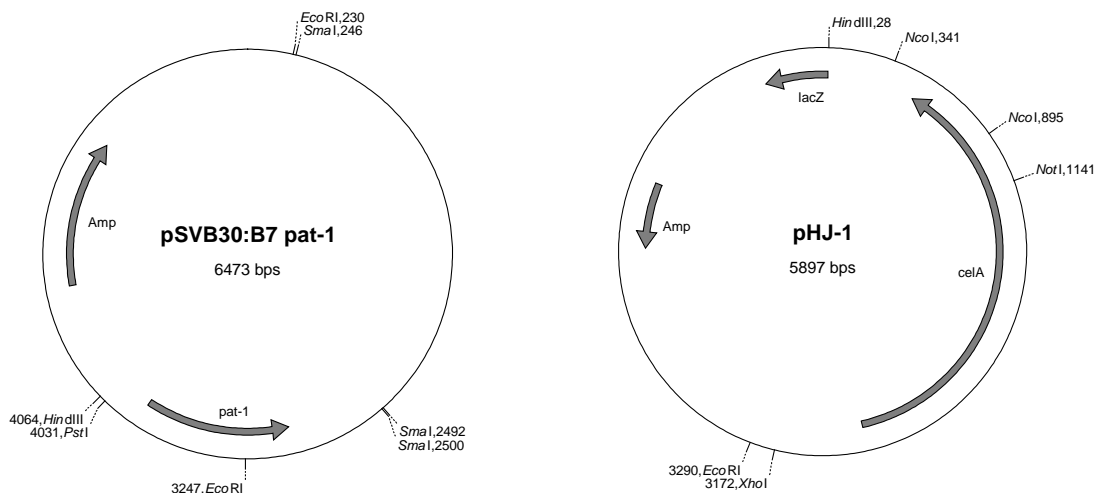
```

3. Plasmidkarten

3.1 Physikalische Karten der *E. coli*-Kloniervektoren pUC13, pUC18 und pSmart mit ausgewählten Schnittstellen

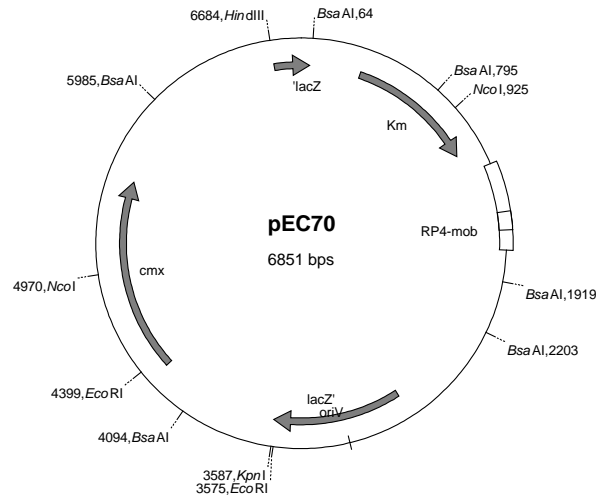


3.2 Physikalische Karten der Vektoren pSVB30:B7a und pHJ-1 mit den Pathogenitäts-Determinanten *pat-1* und *celA* (eingezeichnet sind ausgewählte Schnittstellen)



3.3 Physikalische Karte des Resistenzplasmides pEC70 (mit ausgewählten Schnittstellen)

cmx:: Chloramphenicolexporter-Gen

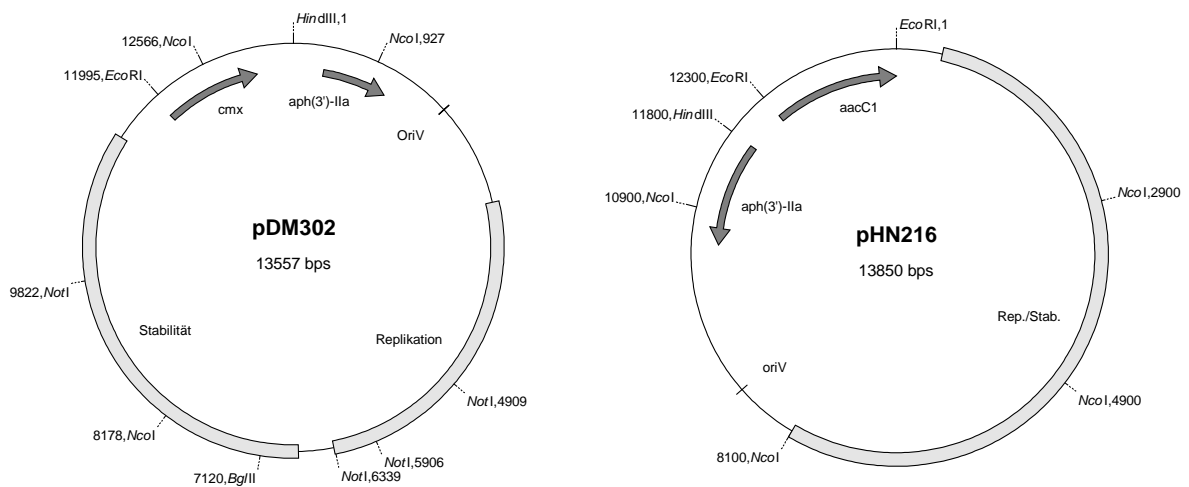


3.4 Physikalische Karten der *E. coli*/*Clavibacter*-Shuttle-Vektoren pDM302 und pHN216 mit ausgewählten Schnittstellen (Postionsangaben bei pHN216 sind geschätzt, da pHN216 nicht sequenziert wurden)

aph(3')-IIa: Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gen

aacC1: Gentamycin-Acetyltransferase-Gen

cmx: Chloramphenicolexporter-Gen



3.5 Physikalische Karten der *E. coli*-Expressionsvektoren pProlar und pET22b(+) mit ausgewählten Schnittstellen

plac/ara-1: Plac/*ara-1*-Hybridpromotor

T: Terminator

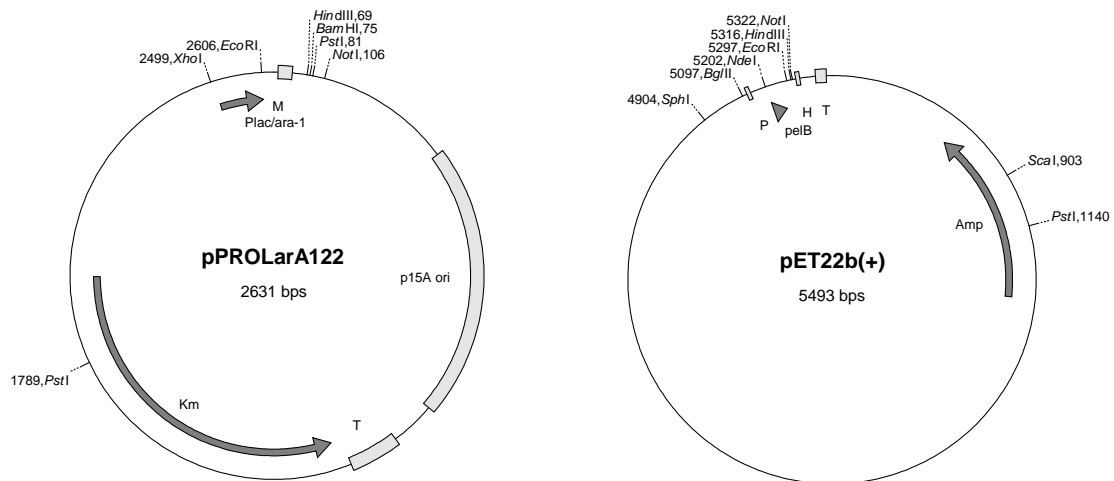
M: Myc-Tag

P: T7 Promotor

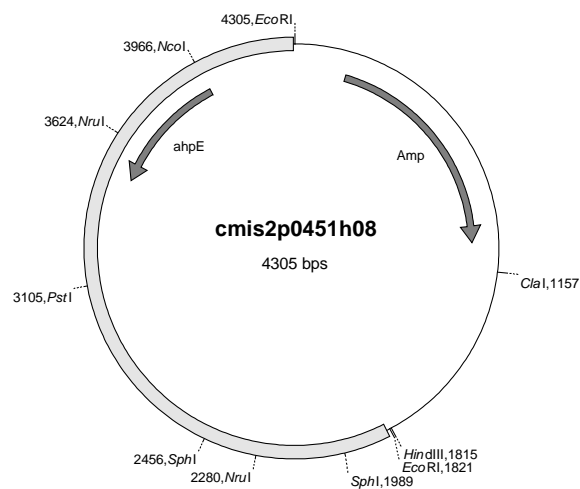
T: T7 Terminator

H: His-Tag

pelB: *pelB*-Leadersequenz

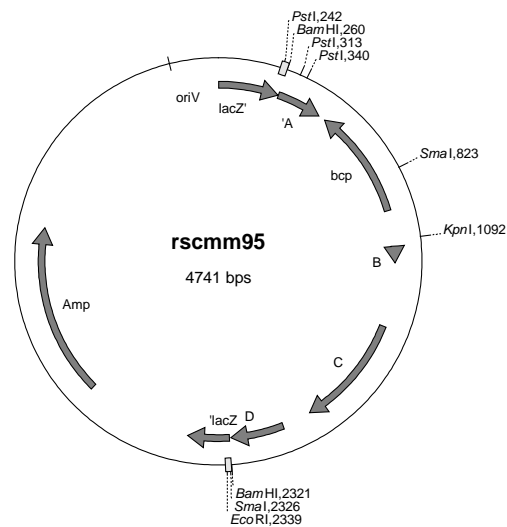


3.6 Physikalische Karte des *Cmm*-Genomprojekt-Sequenzierplasmides cmis2p0451h08 mit *ahpE* (ausgewählte Schnittstellen sind eingezeichnet)



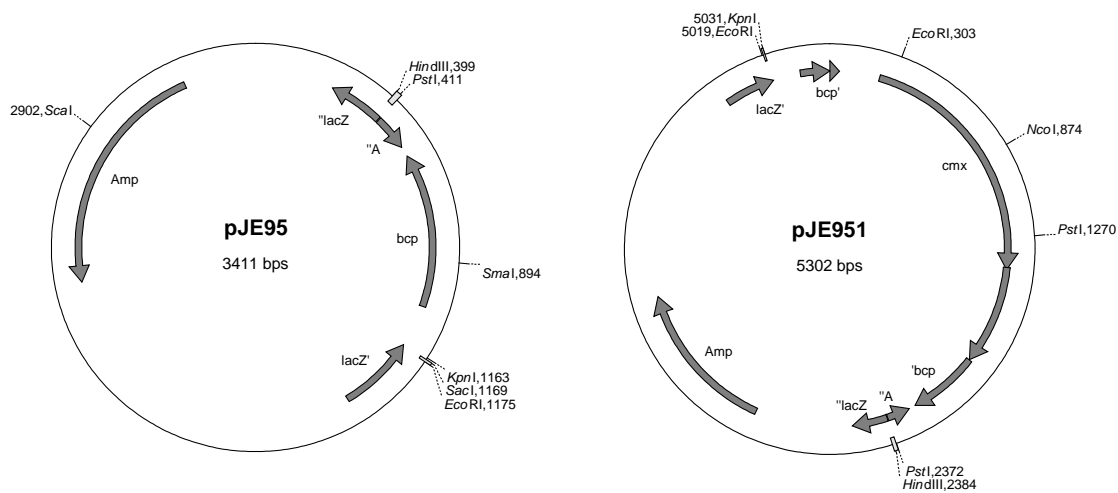
3.7 Physikalische Karte des Shotgun-Sequenzier-Plasmides *rscmm95* mit ausgewählten Schnittstellen

- A: Membranprotein C-terminaler Bereich
- B: t-RNA Lysin
- C: Transkriptionsfaktor
- D: hypothetisches Protein



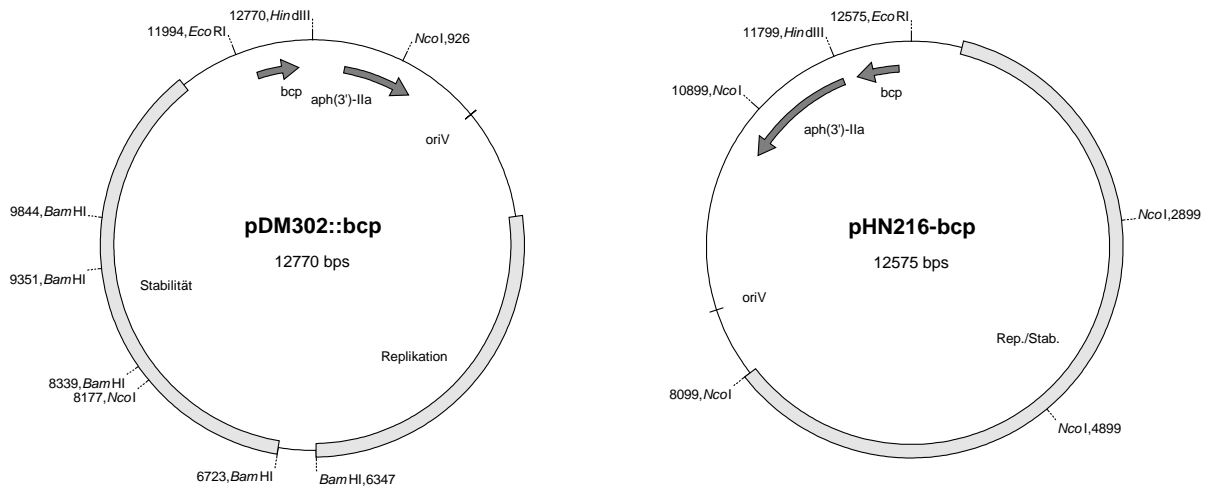
3.8 Physikalische Karten der in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Plasmide JE95 (752 bp *KpnI*/*PstI*-Fragment mit *bcp*-Gen aus *rscmm* in pUC18) und pJE951 (1,89 kb *BsaA1*-Fragment mit Chloramphenicolexportergen *cmx* in *SmaI*-Schnittstelle von pJE95) mit ausgewählten Schnittstellen

- A: Membranprotein C-terminaler Bereich



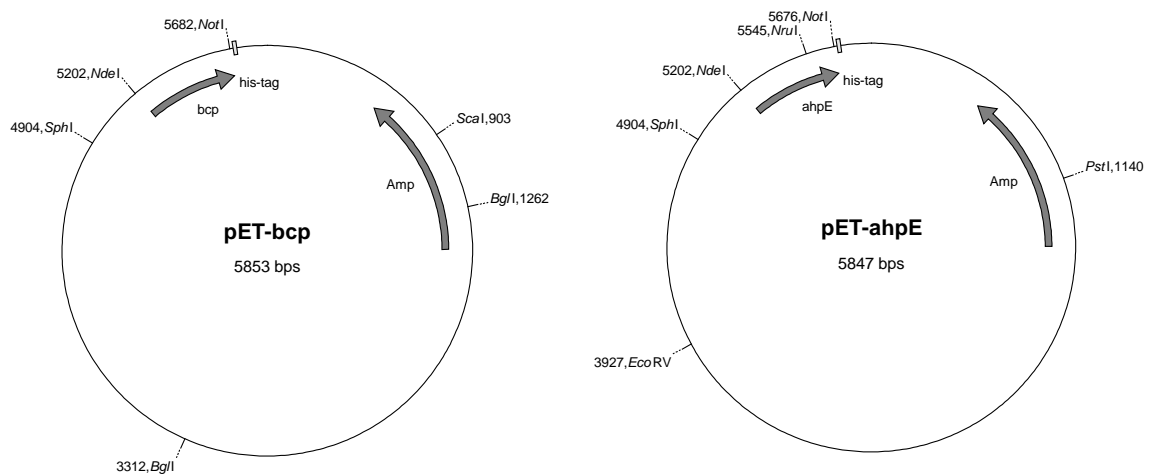
Die physikalischen Karten von pJE49 und pJE54 entsprechen pJE95 mit Cys₄₉Ser bzw. Cys₅₄Ser-Austausch im *bcp*-Gen.

3.9 Physikalische Karten der Komplementations-Plasmide pDM302::*bcp* und pHN216-*bcp* (jeweils als *EcoRI*/*HindIII*-Fragment aus pJE95 in pDM302 bzw. pHN216) mit ausgewählten Schnittstellen (Positionsangaben bei pHN216-*bcp* sind geschätzt)



Die physikalischen Karten von pHN216-M49 und pHN216-M54 entsprechen pHN216-*bcp* mit Cys₄₉Ser bzw. Cys₅₄Ser-Austausch im *bcp*-Gen.

3.10 Physikalische Karten der Expressionsplasmides pET-*bcp* (480 bp *NdeI*/*NotI*-PCR-Produkt von *bcp* in pET22b(+)) und pET-*ahpE* (474 bp *NdeI*/*NotI*-Pcr-Produkt von *ahpE* in pET22b(+))



Die physikalischen Karten von pET-C49S und pET-C54S entsprechen pET-*bcp* mit Cys₄₉Ser bzw. Cys₅₄Ser-Austausch im *bcp*-Gen.

Eigene Publikationen

Burger, A., Gräfen, I., Engemann, J., Niermann, E., Pieper, M., Kirchner, O., Gartemann, K.-H. and Eichenlaub, R. (2005).

Identification of homologues to the pathogenicity factor Pat-1, a putative serine protease of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Microbiol. Res. 160: 417-427

Gartemann, K.-H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R. and Burger, A. (2003).

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* : first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium.

J. Biotechnol. 106: 179-191

In Bearbeitung:

Engemann, J. and Eichenlaub, R.

Characterization of the “Bacterioferritin comigratory protein” of the phytopathogenic Actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Erklärung

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

Bad Oeynhausen, April 2006

.....

Jutta Engemann

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Eichenlaub für die Bereitstellung des interessanten Themas, die stete Gesprächsbereitschaft und die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. Karl-Heinz Gartemann für zahlreiche kritische Diskussionen und konstruktive wissenschaftliche Anregungen, sowie hilfreiche Korrekturvorschläge bei der Niederschrift dieser Arbeit.

Vielen Dank der gesamten *Clavibacter*-Arbeitsgruppe, die durch ihre Hilfsbereitschaft und die nette Atmosphäre das Arbeiten im Labor sehr angenehm gemacht hat.

Herzlichen Dank an Dipl. Biol. Christiane Wiegand, Biochemie III, die mir bezüglich der praktischen Proteinbiochemie wertvolle Tipps geben konnte und so manche Mittagspause nicht nur mit Privatgesprächen bereichert hat.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, die mich stets ermutigt hat und mit sehr viel Verständnis und Geduld die Realisierung dieser Arbeit unterstützt hat.