

**Etablierung genetischer Methoden für
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*
und Charakterisierung von Mutanten
mit veränderter Morphologie, Physiologie und Virulenz**

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften

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

vorgelegt von
Oliver Kirchner
aus Worms

Juni 2003

Für \mathcal{K}, \mathcal{K} .

*"Was wir wissen, ist ein Tropfen,
was wir nicht wissen, ein Ozean."*

Sir Isaac Newton (1643 - 1727)

I	Zusammenfassung	1
II	Einleitung	2
1	Taxonomie, Morphologie und Physiologie von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	2
2	Die "bakterielle Tomatenwelke": Interaktion von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> mit der Pflanze	4
3	Physiologische und genetische Grundlagen der Fähigkeit von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> Welke auszulösen	9
4	Genetische Methoden für <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	12
4.1	Vektoren	12
4.2	Elektroporation/Elektrotransformation	13
4.3	Transposon-Mutagenese	14
5	Problemstellung	16
III	Material und Methoden	17
III.A	Material	17
1	Bakterienstämme	17
2	Pflanzenmaterial	18
3	Plasmide und Vektoren	19
4	Nährmedien	21
5	Medienzusätze	22
6	Puffer und Lösungen	22
6.1	Puffer zur Resuspension/Lagerung von Bakterien	22
6.2	Lösungen und Puffer für Gelelektrophorese	23

6.3	Lösungen und Puffer für DNA-Isolierung (Eckhardt-Lyse, alkalische Lyse)	23
6.4	Lösungen zur Behandlung von Agarosegelen für Southern-Hybridisierungen	25
6.5	Puffer und Lösungen für Hybridisierungen	25
7	Enzyme, Chemikalien und Kits	26
7.1	Enzyme	26
7.2	Chemikalien und Kits	27
8	Geräte	27
9	Oligonukleotid-Primer für PCR und Standardsequenzierungen ...	28
III.B	Methoden	29
1	Bakterienanzucht/-lagerung	29
1.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	29
1.2	Anzucht von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	29
1.3	Konservierung von Bakterienkulturen (Gefrier-/Glycerinkultur)	29
1.4	Titerbestimmung von Bakterien in Flüssigkultur	29
2	DNA-Isolierung	30
2.1	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	30
2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	30
2.2.1	HB-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA (Klonanalyse)	30
2.2.2	Plasmidisolierung aus <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	31
3	DNA-Reinigung (und -Konzentration)	32
3.1	CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation	32
3.2	Alkoholfällung	32
3.2.1	Ethanolfällung	32
3.2.2	Isopropanolfällung	32
3.3	Phenolisierung	33
3.4	Sephadex-Behandlung	33
3.5	Bestimmung der DNA-Konzentration	34

4	Techniken zur Charakterisierung von DNA-Molekülen	34
4.1	Eckhardt-Lyse von <i>Escherichia coli</i>	34
4.2	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	34
4.2.1	Hydrolyse von Plasmid-DNA	34
4.2.2	Hydrolyse von Gesamt-DNA	35
4.3	Agarose-Gelelektrophorese	35
4.4	Bestimmung des Molekulargewichts von DNA	36
5	Klonierung von DNA-Fragmenten	37
5.1	5'-Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase	37
5.2	Erzeugung von "blunt ends" durch Behandlung mit Klenow-Polymerase	37
5.3	Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten	38
5.4	"Shotgun"-Klonierung	38
5.5	α - ω -Komplementation (Blau-Weiß-Selektion)	38
6	DNA-Transfer	39
6.1	Elektroporation von <i>Escherichia coli</i>	39
7	DNA-DNA-Hybridisierung	40
7.1	Markierung der Hybridisierungssonde	40
7.2	Überprüfung der Markierungsreaktion (Dot Blot)	40
7.3	DNA-Transfer auf eine Membran	40
7.3.1	Transfer der DNA durch Passiv-Blot	40
7.3.2	Transfer der Cosmid-DNA für Koloniehybridisierung	41
7.4	Prähybridisierung und Hybridisierung unter stringenten Bedingungen	41
7.5	Immunologische Nachweisreaktion unter stringenten Bedingungen	42
8	Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
8.1	PCR mit Gesamt-DNA als Template	42
8.2	PCR mit ganzen Zellen als Template	43
9	Untersuchungen zur Stabilität von Plasmiden	44
9.1	Untersuchung der Plasmidstabilität in Flüssigkultur	44
9.2	Untersuchung der Plasmidstabilität <i>in planta</i>	44
9.3	Berechnung des gewichteten Mittelwerts	44

10	Methoden zur Analyse des Pathogenitätsverhaltens von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	45
10.1	Petiolusinfektion	45
10.2	Wurzelinfektion	45
10.3	Ermittlung des Welkeindex und Welkeverlaufs	46
10.4	Gewichtsbestimmung der Pflanzen	46
10.5	Größenbestimmung der Pflanzen	46
10.6	Kolonisationstest	46
10.6.1	Reisolation von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> aus Xylemsaft	46
10.6.2	Reisolation von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> aus Pflanzenhomogenat	47
IV	Ergebnisse	48
IV.A	Etablierung von genetischen Methoden für <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	48
1	Elektrotransformation/Elektroporation	48
1.1	Optimierung der Elektrotransformation von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	48
1.1.1	Hitzeschock-Behandlung	50
1.1.2	Verwendung von Glycin, einer zellwandschädigenden Substanz, bei der Anzucht der Zellen	52
1.1.3	Elektrische Parameter	54
1.1.4	Methylierung der eingesetzten DNA	55
1.1.5	Eingesetzte DNA-Menge	56
1.1.6	Einfluss der Lagerung von elektrokompetenten Zellen	58
1.2	Optimiertes Elektroporationsprotokoll für <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	58
1.2.1	Versuchsvorschrift für die Elektroporation von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	59
1.3	Etablierung der Transposon-Mutagenese für <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	61
1.3.1	Voraussetzungen/Vorarbeiten	61
1.3.2	Transposon-Mutagenese von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	61
1.3.3	Integrationsorte von Tn1409C β in <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> /Zielspezifität	65

1.3.4	Transposon-Mutagenese in zu <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> nah verwandten Stämmen	67
2	Weitere genetische Werkzeuge (Vektoren/Resistenzgene)	68
2.1	Der Kloniervektor pT19MECA2	68
2.2	Entfernung der <i>EcoRI</i> -, <i>PstI</i> - und <i>SacI</i> -Schnittstelle aus dem <i>cmx</i> -Gen mittels "gene SOEing"	70
2.3	Stabilität und Nutzbarkeit von Shuttle-Vektoren in <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	74
2.3.1	Vektoren auf Basis von pGA1, pNG2 und RSF1010	74
2.3.2	Vektoren auf Basis von pCM1 und pCM2	75
2.3.2.1	Stabilität von pHN205/pHN216 unter unselektiven Bedingungen in CMM100	76
2.3.2.2	Test auf Inkompatibilität von pDM302 und pCM1	77
IV.B	Analyse und Charakterisierung von Mutanten von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	79
1	Test der Virulenz von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>-Mutanten <i>in planta</i>	81
2	Titerung von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> <i>in planta</i>	85
3	Transposon-Mutanten	85
3.1	Transposon-Mutanten mit veränderter Morphologie/Physiologie	85
3.1.1	Die Transposon-Mutante TM382 β 371-23 - eine schleimigere Mutante mit reduzierter Virulenz	85
3.1.2	Die Transposon-Mutante TM100 β 113-35 - eine pigmentfreie Mutante	92
3.1.2.1	Gerichtete Integrationsmutagenese ("gene-disruption"/"gene-replacement") zur Herstellung einer pigmentfreien Mutante	98
3.2	Transposon-Mutanten mit veränderter Virulenz	101
3.2.1	Die Transposon-Mutanten TM382 β 324-50 und TM382 β 370-45 - zwei Mutanten mit reduzierter und verzögerter Virulenz	101
3.2.2	Die Transposon-Mutante TM382 β 330-18 - eine Mutante mit stark reduzierter Kolonisationsfähigkeit	107

V	Diskussion	113
1	Etablierung genetischer Methoden für <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	113
1.1	Elektroporation/Elektrotransformation	115
1.2	Transposon-Mutagenese	117
1.3	Gerichtete Mutagenese durch "gene-disruption"/"gene-replacement"	119
1.4	Weitere genetische Werkzeuge (Vektoren, Resistenzgene)	122
2	Charakterisierung von Mutanten	126
2.1	EPS-Mutanten	126
2.2	Pigment-Mutanten	128
2.3	Mutanten mit verzögerter Virulenz	134
3	Fazit/Ausblick	140
VI	Literaturverzeichnis	142
VII	Anhang	159
1	Abkürzungsverzeichnis	159
2	Southern-Hybridisierung von Transposon-Mutanten gegen die Standard-Sonden	160
3	Plasmidkarten	161
4	Alignments	169
4.1	Proteine der Carotinoid-Biosynthese (TM100 β 113-35)	169
4.2	Alignments der Proteine unbekannter Funktion von <i>Xylella fastidiosa</i> (TM382 β 324-50 und TM382 β 370-45)	179
4.3	Vergleich der Chp/Pat-homologen Proteine	182
4.4	PSI-BLAST-Ergebnisse für Rhs-Protein von TM382 β 371-23	184
5	In den Tabellen der BLAST-Ergebnisse verwendete Abkürzungen der Organismennamen	186
6	Betreute Laborpraktika/Diplomarbeiten	187

I Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untergliedert sich in zwei Teile. Ein Schwerpunkt lag in der Entwicklung und Etablierung von molekulargenetischen Techniken für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), dem Erreger der "Bakteriellen Welkekrankheit" der Kulturtomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Der zweite Schwerpunkt lag in der Identifizierung und Charakterisierung von Mutanten von *Cmm*, insbesondere mit veränderter Virulenz, die mit den neu etablierten Techniken erzeugt worden waren.

Als eine essentielle Voraussetzung für viele molekulargenetische Techniken, die eine hohe Transformationseffizienz mit heterologer DNA in *Cmm* benötigen, wurde die Elektrotransformation nach *Cmm* u. a. mit Hilfe einer Glycinbehandlung und dem Einsatz von nicht methylierter DNA optimiert. Mit einer Erhöhung der Transformationsrate um etwa den Faktor 1000 auf $\sim 5 \cdot 10^6$ Transformanten/ μg DNA konnte die Voraussetzung für die Transposon-Mutagenese, zur Erzeugung von zufälligen Mutationen im Chromosom von *Cmm*, und die Kassettenmutagenese mittels "gene-disruption"/"gene-replacement" geschaffen werden. Mit dem Transposon Tn1409C - abstammend von IS1409 aus *Arthrobacter* sp. (GARTEMANN und EICHENLAUB, 2001) - konnte ein Transposon-Mutagenese-System in *Cmm* und anderen *Clavibacter michiganensis*-Subspezies etabliert werden, bei dem bis zu 3.000 Transposanten/ μg DNA erhalten werden können.

Ausgehend von einer pigmentfreien Mutante wurde ein Operon identifiziert, welches die gesamte Carotinoid-Biosynthese von *Cmm* bis zu dem potentiellen C₅₀-Carotin kodiert. In einer Mutante mit verändertem EPS konnte ein Gen identifiziert werden, das für ein sehr großes, wahrscheinlich zellwandassoziiertes Protein kodiert und Ähnlichkeiten zu Rhs-Proteinen aufweist, dessen Funktion aber noch unklar ist.

Unter den ca. 1500 *in planta* getesteten Transposon-Mutanten von *Cmm* konnten mit Hilfe eines verfeinerten Welkeindices drei Mutanten identifiziert und charakterisiert werden, die eine deutlich verringerte Virulenz besaßen. In zwei von ihnen war das Transposon in die gleiche DNA-Region inseriert und hatte dort im Abstand von ca. 3,5 kb zwei ORFs unterbrochen, deren Genprodukte Ähnlichkeiten zu Proteinen unbekannter Funktion aus den pflanzenpathogenen Bakterien *Xylella fastidiosa* und *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* aufweisen. Bei diesen könnte es sich um sekretierte Serin-Proteasen handeln. Hierin zeigen sie Ähnlichkeiten zu den sechs ebenfalls in dieser Großregion liegenden Homologen zu dem Pathogenitätsprotein Pat-1 des endogenen Plasmids pCM2. Diese auf einem ca. 130 kb großen *VspI*-Fragment liegende DNA-Region ist zumindest zum Teil in der dritten Mutante deletiert, die die Wirtspflanze Tomate nicht mehr erfolgreich kolonisieren kann. Alles deutet darauf hin, dass mit dieser DNA-Region ein für die Bakterien-Pflanzen-Interaktion wichtiger Bereich gefunden wurde, in dem erstmals chromosomale Gene identifiziert werden konnten, die zusätzlich zu den bekannten plasmidkodierten Genen *pat-1* und *celA* für die Virulenz von *Cmm* notwendig sind.

II Einleitung

1 Taxonomie, Morphologie und Physiologie von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Die bakterielle Welkekrankheit der Kulturtomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) wurde erstmals 1910 von SMITH beschrieben. Da die Erkrankung in Grand Rapids im Bundesstaat Michigan/USA entdeckt wurde, nannte SMITH sie "Grand Rapids disease" und das verursachende Bakterium "*Bacterium michiganense*". Später bürgerte sich für die Erkrankung die Bezeichnung "Bakterielle (Tomaten-)Welke" (im Englischen "bacterial wilt and cancer") ein. Die Namensgebung für das Bakterium kann auf eine wechselhafte Geschichte zurückblicken, die Ausdruck der Verfeinerung der taxonomischen Techniken in den letzten 100 Jahren ist: von *Pseudomonas michiganensis* (STEVENS, 1913) wechselte die Eingruppierung über *Aplanobacter michiganense* (SMITH, 1914), *Phytomonas michiganense* (BERGEY *et al.*, 1923), *Mycobacterium flavum* subsp. *michiganense* (KRASIL'NIKOV, 1945) und *Corynebacterium michiganense* (JENSEN, 1934) zu dem 1986 von Davis eingeführten und bis heute gültigen Gattungsnamen *Clavibacter*, in den die pflanzenpathogenen Corynebakterien ausgegliedert wurden. Die Gattung *Clavibacter* bildet inzwischen eine monophyletische Gruppe (LEE *et al.*, 1997), die aus nur einer einzigen Art - *Clavibacter michiganensis* - besteht, welche im Wesentlichen aufgrund der verschiedenen Wirtspflanzen in fünf Subspezies untergliedert wird: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (*Cmi*), *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (*Cmn*), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) und *Clavibacter michiganensis* subsp. *tesselarius* (*Cmt*). *Clavibacter* gehört zu der Klasse der *Actinobacteria* (hoch GC-reiche, Gram-positive Bakterien) und wird aufgrund von 16S rRNA-Stammbäumen in die Gruppe der *Microbacteriaceae* eingeordnet (eine Schwestergruppe der *Micrococcaceae*, zu der auch die Gattung *Arthrobacter* gehört) (STACKEBRANDT, 1997). Den *Microbacteriaceae* gehören neben *Clavibacter* die Gattungen *Agreia*, *Agrococcus*, *Agromyces*, *Cryobacterium*, *Cryocola*, *Curtobacterium*, *Frigoribacterium*, *Leifsonia*, *Leucobacter*, *Microbacterium*, *Mycetocola*, *Okibacterium*, *Plantibacter*, *Rathayibacter*, *Rhodoglobus*, *Subtercola* und *Xylanomicrobium* an. Ein Großteil der Gattungen umfasst phytopathogene Arten.

Die Gattung *Clavibacter* zeichnet sich u. a. dadurch aus, dass vorwiegend die Menachinone MK-10 und MK-9 in der Zellmembran vorhanden sind (COLLINS und JONES, 1983) und

die Zellwand zu dem seltenen Peptidoglycantyp B2 γ gehört (DAVIS *et al.*, 1984, DAVIS, 1986). Die Zellwand enthält statt der für viele coryneforme Bakterien typischen meso-Diaminopimelinsäure Diaminobuttersäure, und es sind keine Mycolsäuren in der Zellmembran vorhanden, was die Gattung z. B. von *Corynebacterium* abgrenzt. Trotzdem gehören beide Gattungen zu den sog. "coryneformen Bakterien" (SMITH *et al.*, 1986), die bei der Zellteilung eine typische V-Form annehmen (sog. "snapping division") (BRYAN, 1930; BALOWS *et al.*, 1992), welche leicht im Lichtmikroskop erkennbar ist (Abb. II.1 B und C). Sie beruht auf dem ungleichmäßigen Aufreißen der Zellwand bei der Zellteilung. Oft trennen sich die Zellen nicht vollständig voneinander und verbleiben in kleinen Aggregaten (Abb. II.1 B), insbesondere während der logarithmischen Wachstumsphase. Das Bakterium hat eine pleomorphe, meist hantel- oder keulenförmige Gestalt (griech.: κορυνη = Keule, als Kennzeichen für die coryneformen Bakterien) und eine Größe von etwa 0,5 x 1 x 0,5 μm (BRYAN, 1930; STRIDER, 1969).

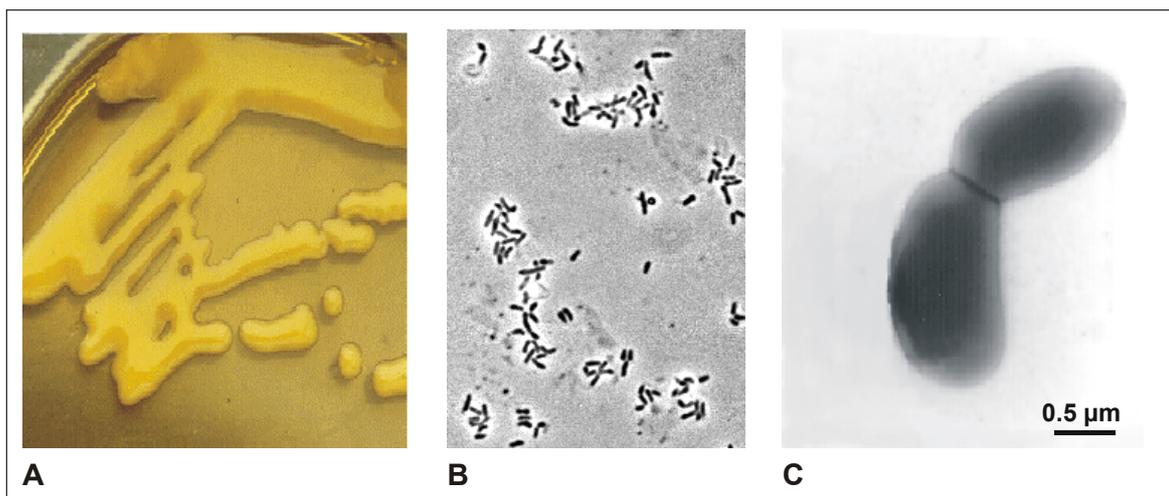


Abb. II.1: A: Koloniemorphologie von *Cmm* NCPPB382 auf einer Agarplatte. B: lichtmikroskopische, C: transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahme von *Cmm*. Die bei der Teilung typische Abwinkelung der Tochterzellen, die sog. "snapping division", ist deutlich zu erkennen. (Fotos: A: J. DREIER; B und C: H. JAHR)

Auf Festmedien bildet *Cmm* die typischen kräftig gelb gefärbten Kolonien (Abb. II.1 A), die aufgrund der Produktion erheblicher Mengen von Exopolysacchariden (EPS) eine schleimige Konsistenz aufweisen und bei längerer Bebrütung ineinander fließen. *Clavibacter michiganensis* ist strikt aerob, nicht sporulierend und unbegeißelt.

Alle Subspezies sind Katalase-positiv, jedoch Kovacs-Oxidase-, Lipase-, Nitratreduktase- und Urease-negativ (BALOWS *et al.*, 1992). *Cmm* kann Citrat, Fumarat, Melezitose und Mannitol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen, nicht jedoch Formiat, Inulin,

Malonat, Propionat, Rhamnose, Ribose und Sorbitol. Gelatine und Stärke können hydrolysiert werden, jedoch kein Casein (DAVIS *et al.*, 1984). Nur für die Nutzung von Arabinose, Dextrose, Galaktose, Glukose, Glycerin, Levulose, Maltose, Mannit, Mannose, Saccharose und Xylose als Kohlenstoffquelle liegen eindeutige Hinweise vor (BRYAN, 1930, VIDAVER und MANDEL, 1974; DAVIS *et al.*, 1984), die Nutzung anderer Zucker ist wahrscheinlich stammabhängig. Die Produktion einer α -Mannosidase, β -Xylosidase (DE BRUYNE *et al.*, 1992) und einer Endo- β -1,4-Glukanase/Zellulase (JAHR *et al.*, 2000) sind für *Cmm* beschrieben, sowie einer Amylase für *Cms* (METZLER *et al.*, 1997). *Cmm* benötigt zum Wachstum Nikotinsäure, Thiamin und L-Methionin im Medium (A. BURGER, unveröffentlicht).

Die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 25 °C und 28 °C (STRIDER, 1969). Der durchschnittliche GC-Gehalt der DNA ist mit etwa 72 % sehr hoch (VIDAVER und MANDEL, 1974; SASAKI *et al.*, 1998; ENGEMANN, 2001). *Cmm* besitzt wahrscheinlich ein lineares Chromosom (K.-H. GARTEMANN, unveröffentlicht). Der von der Bielefelder Arbeitsgruppe verwendete Stamm *Cmm* NCPPB382 wurde 1954 in England isoliert.

2 Die "bakterielle Tomatenwelke": Interaktion von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* mit der Pflanze

Alle fünf Subspezies der Art *Clavibacter michiganensis* sind Erreger von Krankheiten in Pflanzen mit z. T. großer wirtschaftlicher Bedeutung (SHIRAKAWA *et al.*, 1991):

<i>Clavibacter michiganensis</i>	Wirtspflanze	Erkrankung	Quelle
subsp. <i>michiganensis</i>	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	bakterielle Welke	SMITH, 1910; STRIDER 1969
subsp. <i>insidiosus</i>	Luzerne (<i>Medicago sativa</i>)	Welke	MCCULLOCH, 1925
subsp. <i>nebraskensis</i>	Mais (<i>Zea mays</i>)	Fleckenkrankheit	VIDAVER und MANDEL 1974; SCHUSTER, 1975
subsp. <i>sepedonicus</i>	Kartoffel (<i>Solanum tuberosum</i>)	Ringfäule	MANZER und GENEUREUX, 1981
subsp. <i>tesselarius</i>	Weizen (<i>Triticum aestivum</i>)	Mosaik-Fleckenkrankheit	CARLSON und VIDAVER, 1982

Bei der von *Cmm* verursachten bakteriellen Welke handelt es sich um eine systemische Tracheobakteriose. *Cmm* gehört zu den wenigen pflanzenpathogenen Bakterien, die sich primär über die Xylemgefäße in der Pflanze ausbreiten und dort vermehren können und erst im späteren Infektionsstadium in die umgebenden Gewebe und das Phloem eindringen. Bisher wurden nur wenige Bakterien beschrieben, die das Xylem besiedeln können, z. B. *Leifsonia xyli* (PURCELL und HOPKINS, 1996), ein Gram-positiver Endophyt in Bermuda-gras, einige Gram-negative phytopathogene Bakterien, sowie endophytisch lebende Stickstoff-Fixierer der Gattung *Azoarcus* (REINHOLD-HUREK und HUREK, 1998).

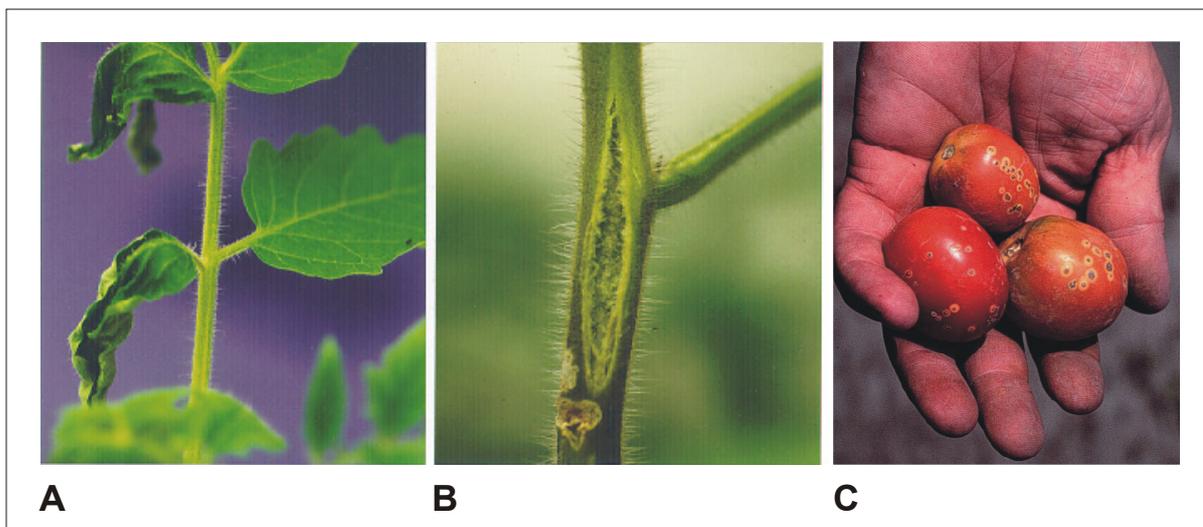


Abb. II.2: A: Typische unifaziale Fiederblattwelke, hervorgerufen von *Cmm* NCPPB382. Während die Blätter auf der linken Spross-Seite bereits welken, sind die Blätter auf der rechten Seite des Fiederblatts noch voll turgeszent. B: Sprossläsionen (englisch "canker") im späteren Infektionsstadium. C: Durch *Cmm* verursachte Fruchtflecken (englisch "bird's eyes"). (Fotos: A und B: J. DREIER, C: MISSISSIPPI STATE UNIVERSITY)

Das von der Tomate ausgebildete Krankheitsbild ist sehr charakteristisch. Zuerst fangen die Blätter einer Seite, die von den befallenen Leitbündeln versorgt werden, zu welken an. Es kann anfangs ein Verlust der Turgeszenz oder gleich ein tütenförmiges Einrollen der Teilblätter an den Blattseiten/-spitzen eines Fiederblatts nach oben beobachtet werden (unifaziale Fiederblattwelke, Abb. II.2 A). Die Blätter welken mehr und mehr, werden braun und vertrocknen letztlich vollständig. Die Symptome breiten sich zuerst einseitig aus, später auch auf die gesamte Pflanze. Im späteren Verlauf treten, hervorgerufen durch massive Gewebemazeration, so genannte "Sprossläsionen" (englisch "canker") auf (Abb. II.2 B). Hierbei reißt der Spross oft an mehreren Stellen auf. Dies beeinträchtigt zunehmend die Standfestigkeit der Pflanze und sie knickt letztendlich meist ab und verdorrt vollends. Kommt es bei infizierten Pflanzen dennoch zur Ausbildung von Früchten, so tragen diese

meist typische bräunliche Flecken, die von einem weißen Hof umgeben sind (im Englischen so genannte "bird's eyes"; siehe Abb. II.2 C) (STAPP *et al.*, 1956; STRIDER, 1969), da *Cmm* in der Lage ist, in die Frucht einzudringen.

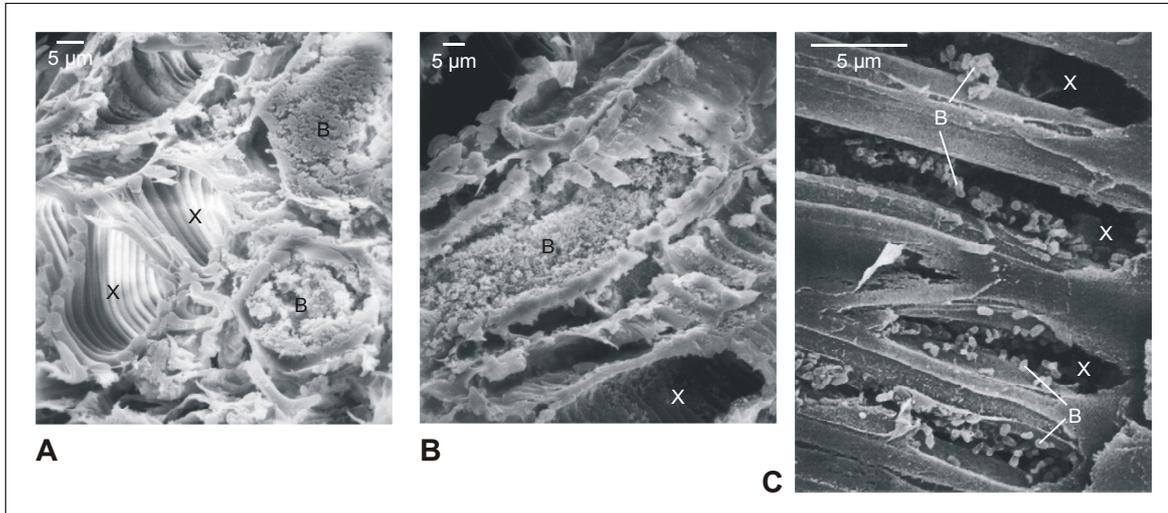


Abb. II.3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Xylemgefäßen der Tomate und der Besiedlung mit *Cmm* in verschiedenen Auflösungen. A: Querschnitt durch mehrere Xylemgefäße. Einige von ihnen noch ohne Bakterien in ihrem Inneren (X), andere bereits von *Cmm* besiedelt (B), sodass praktisch das gesamte Lumen ausgefüllt ist. B: Anschnitt von Xylemgefäßen, Beschriftung wie in A. C: Höher aufgelöste REM-Aufnahme, Beschriftung wie in A. (Fotos: R. EICHENLAUB)

Bemerkenswerterweise werden im Xylem von *Cmm* extrem hohe Titer erreicht, die 10^{10} (MELETZUS *et al.*, 1993; diese Arbeit) Bakterien pro g Frischgewicht der Pflanze überschreiten können. Die befallenen Leitbündel sind fast vollständig ausgefüllt von Bakterien (Abb. II.3). Dies ist insofern erstaunlich, als der Xylemsaft von Pflanzen den geringsten Anteil an Nährstoffen aller pflanzlichen Gewebe enthält (PURCELL und HOPKINS, 1996): Er enthält anorganische Ionen (ENGELS und MARSCHNER, 1993; DAMBRINE *et al.*, 1995), Carbonsäuren, eine Vielzahl von Aminosäuren (SCHNEIDER *et al.*, 1994) und Zucker (ANDERSEN *et al.*, 1995), allerdings nur in Konzentrationen im Millimolbereich, sowie Spuren von Proteinen und Phytohormonen (BILES und ABELES, 1991; ELSE *et al.*, 1994; MOTOSUGI *et al.*, 1996) und zusätzlich Glutamin und Arginin in überproportional hohen Konzentrationen (ZIMMERMANN *et al.*, 1994). Der pH-Wert ist mit pH 4,5 - 5,5 relativ sauer (RICHARDSON und BAKER, 1982; ENGELS und MARSCHNER, 1993).

Ursprünglich wurde vermutet, dass ein physikalisches Verstopfen der Xylemgefäße mit Bakterien Ursache der Welkesymptome ist. Dies konnte jedoch widerlegt werden, da der nicht mehr zur Auslösung der Welkesymptome fähige Stamm CMM100, der in der Pflanze

einen fast unverändert hohen Titer erreicht, nur zu einer sehr geringen Reduktion der Biomasse im Vergleich zu uninfizierten Pflanzen führt.

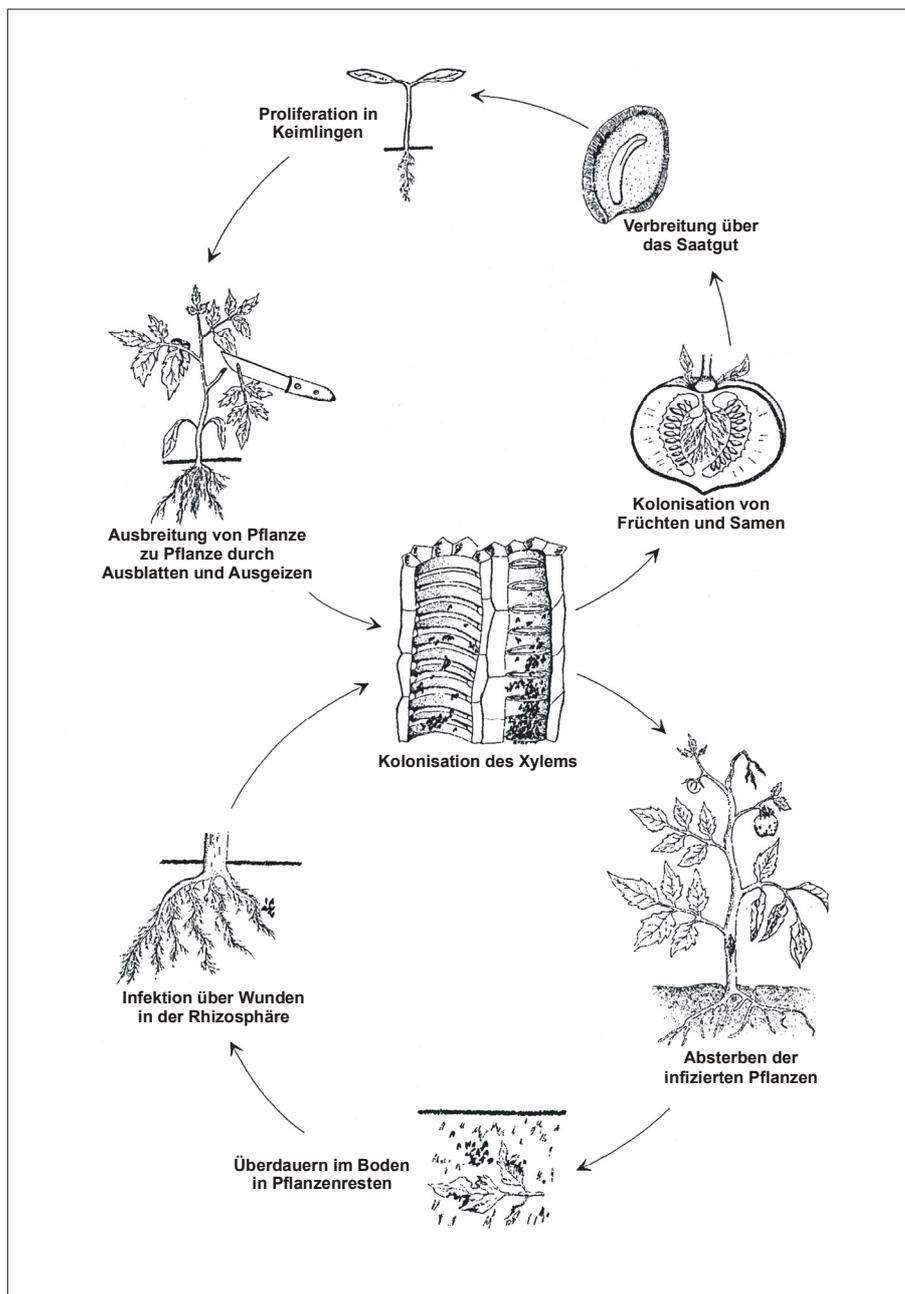


Abb. II.4: Infektionszyklus von *Cmm* (nach A. BERMPHOHL).

Der Infektionszyklus von *Cmm* ist in Abb. II.4 dargestellt. Ausgehend von einer infizierten Pflanze kann die Verbreitung der Erkrankung prinzipiell auf drei Wegen vonstatten gehen. Zum einen kann *Cmm* durch abgestorbene Pflanzen in den Boden gelangen und dort durchaus mehrere Jahre überdauern. Wenn neue Stecklinge in den Boden gepflanzt werden, kann *Cmm* über kleine Wunden im Wurzelbereich in die Pflanze eindringen (WALLIS, 1977). Auf mit *Cmm* kontaminierten Böden sollen erst nach fünfjähriger Pause wieder

Tomaten angebaut werden (ROTHWELL, 1968). Damit *Cmm* nicht in den Boden gelangt, werden die Pflanzen gerodet und verbrannt. Zur Dekontamination des Bodens wird oft die so genannte Solarisation angewendet, dabei wird das infizierte Feld mit schwarzen Kunststoffplanen abgedeckt. Durch die Sonnenbestrahlung erhitzen sich die oberen Bodenschichten so stark, dass praktisch alle Mikroorganismen abgetötet werden.

Ein sehr wichtiger Übertragungsweg von *Cmm* ist direkt von einer Pflanze zur nächsten bei dem Vorgang des "Ausblattens" bzw. "Ausgeizens". Hierbei handelt es sich um eine Pflegemaßnahme im Tomatenanbau, bei der überzählige Seitentriebe und Blätter abgeschnitten werden, um die Biomasseproduktion der Pflanzen möglichst in die Ausbildung von Früchten zu lenken. Dabei kann *Cmm* über kontaminiertes Werkzeug sehr leicht und effektiv von einer Pflanze auf die nächste übertragen werden.

Wirtschaftlich relevant ist außerdem die Verbreitung über infiziertes Saatgut. *Cmm* ist in der Lage, über das vaskuläre System auch in die Früchte von Tomatenpflanzen einzudringen (BRYAN, 1930). Es kommt durchaus vor, dass die Früchte nicht die typischen weiß/braunen Fruchtflecken aufweisen, obwohl sie mit *Cmm* infiziert sind. Bei schwerer Infektion der Früchte fallen diese oft ab, was zusammen mit den vor der Fruchtbildung abgestorbenen Pflanzen zu großen Ernteeinbußen von 50 % bis zu 80 % führen kann (NATTRAS und CICCARONE, 1946; BATES, 1963). In den Früchten persistiert *Cmm* auch in den Samen unterhalb der Samenhaut (STAPP *et al.*, 1956), jedoch nicht im Embryo oder Endosperm (PATINO-MENDEZ, 1964). Dies führt dazu, dass mit *Cmm* infiziertes Saatgut nicht mit den üblichen äußerlich angewandten Desinfektionsmethoden, wie der Behandlung mit Quecksilberchlorid oder hypochloriger Säure, sterilisiert werden kann, was die Gefahr einer Ausbreitung durch kontaminiertes Saatgut enorm verstärkt. Erschwerend kommt hinzu, dass mit züchterischen Maßnahmen bisher keinerlei resistente Kultivare der Tomate erhalten werden konnten. Die einzige Möglichkeit, die Verbreitung von *Cmm* zu verhindern, liegt folglich in der konsequenten Verwendung zertifizierten Saatguts (CHANG *et al.*, 1991). Insbesondere deshalb, da *Cmm*, wie auch *Cms*, in der EU unter die Quarantäneverordnung fällt (EUROPÄISCHE UNION, 1995), die u. a. besagt, dass nur zertifiziertes Saatgut im- bzw. exportiert werden darf. Glücklicherweise gibt es mittlerweile hochspezifische Nachweismethoden auf PCR-Basis für *Cmm* (DREIER, 1995; DREIER *et al.*, 1995; SANTOS *et al.*, 1997; BURGER *et al.*, unveröffentlicht), die die bis dato notwendigen langwierigen Pflanzentests ablösen könnten. Trotzdem treten in praktisch allen Anbaugebieten der Tomate immer wieder von *Cmm* ausgelöste Epidemien auf.

3 Physiologische und genetische Grundlagen der Fähigkeit von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Welke auszulösen

Ein wichtiger Faktor in der Interaktion der meisten pflanzenpathogenen Bakterien mit ihrem Wirt sind die Exopolysaccharide (EPS), die eine Vielzahl von wichtigen biologischen Aufgaben übernehmen. Auch *Cmm* bildet eine dicke Schicht von EPS auf seiner Oberfläche aus (vergl. auch Abb. II.1 A). Als mit Wasser gefüllte Matrix um das Bakterium helfen EPS vor der Austrocknung zu schützen (SUTHERLAND, 1977; LEIGH und COPLIN, 1992). EPS sind meist sauer, können als Ionentauscher wirken, gelöste Mineralien sowie Nährstoffe konzentrieren und toxische Komponenten binden und so die Zelle vor ihnen schützen. In der Interaktion zwischen phytopathogenen Bakterien und ihren Wirtspflanzen sind vielfältige Mechanismen beschrieben (vergl. DENNY, 1995): Die Erkennung durch die Abwehr der Wirtspflanze kann durch EPS verhindert werden, die Wirkung von Agglutininen und Lectinen kann abgeblockt werden, Phytoalexine und reaktive Sauerstoffspezies können detoxifiziert werden (BRADSHAW-ROUSE *et al.*, 1981; ROMEIRO *et al.*, 1981; YOUNG und SEQUEIRA, 1986; KIRALY *et al.*, 1997). Weiterhin können EPS die Adhäsion an abiotische und biotische Oberflächen beeinflussen, sowie eine Infektion und Kolonisation der Wirtspflanze unterstützen oder erst möglich machen (THARAUD *et al.*, 1994; BERMPOHL *et al.*, 1996; SAILE *et al.*, 1997). Außerdem ist eine UV-B (280 - 320 nm) absorbierende Wirkung von EPS in *Xanthomonas phaseoli* beschrieben (LEACH *et al.*, 1957).

Das Molekulargewicht der EPS von *Cmm* liegt zwischen 1 und 10 MDa. Die Zusammensetzung der von *Cmm* gebildeten Exopolysaccharide wurde von VAN DEN BULK *et al.* (1991) und von BERMPOHL *et al.* (1993, 1996) aufgeklärt. Sie besteht aus L-Fucose, D-Galaktose und D-Glukose im Gesamtgewichtsverhältnis von 2:1:1, dekoriert mit Acetat- und Pyruvat-Seitengruppen. Die EPS von *Cmi* sind identisch aufgebaut, bei *Cms* sind zusätzlich Mannose-Reste enthalten. Für die EPS verschiedener *Clavibacter michiganensis* Subspezies wurde ein Einfluss auf die Pathogenität postuliert (FULKERSON, 1960; RAI und STROBEL, 1968; VAN ALFEN *et al.*, 1987; DENNY, 1995). Untersuchungen zeigten, dass die EPS von *Cmm* eine Art Phytotoxin darstellen könnten, da sie auf Schnitten des Epicotyls von Tomaten Welke hervorrufen (VAN DEN BULK *et al.*, 1989), die Auflösung der Thylakoidmembranen isolierter Chloroplasten bewirken (KRÄMER und LEISTNER, 1986) und die Regeneration von Minicalli von Tomatenpflanzen aus Tomatenprotoplasten verhindern (VAN DEN BULK *et al.*, 1990). Demgegenüber konnte eine veränderte Virulenz von *Cmm*-

Mutanten, die nur noch ca. 10 % der ursprünglichen EPS-Menge produzieren, bisher nicht nachgewiesen werden (BERMPOHL *et al.*, 1996). EPS⁰-Mutanten konnten nicht erzeugt werden, entweder ist dies letal für die Zelle, oder es existieren mehrere einander zumindest teilweise komplementierende Biosynthesewege. Die EPS von *Cmm* können also nicht der wichtigste Faktor bei der Auslösung der Welkesymptome sein, auch wenn sie sicherlich eine wichtige Rolle in der Bakterien-Pflanzen-Interaktion spielen, da z. B. Stämme von *Cmm*, die ein verändertes EPS produzieren, nicht mehr in der Lage sind, die Wirtspflanze erfolgreich zu kolonisieren (BERMPOHL *et al.*, 1996).

Es konnte für *Cmm* gezeigt werden, dass die Pathogenitätsfaktoren plasmidkodiert sind (MELETZUS *et al.*, 1993; DREIER *et al.*, 1997; JAHR *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu hat das 51 kb große endogene Plasmid pCS1, welches in vielen virulenten Stämmen von *Cms* vorhanden ist, keinen Einfluss auf die Virulenz (MOGEN *et al.*, 1988). In den anderen Subspezies konnte ebenfalls keine Korrelation zwischen Plasmidstatus und Virulenz nachgewiesen werden (VIDAVER, 1982). *Cmm* trägt zwei endogene Plasmide, pCM1 (27,5 kb) und pCM2 (~72 kb) (Abb. II. 5).

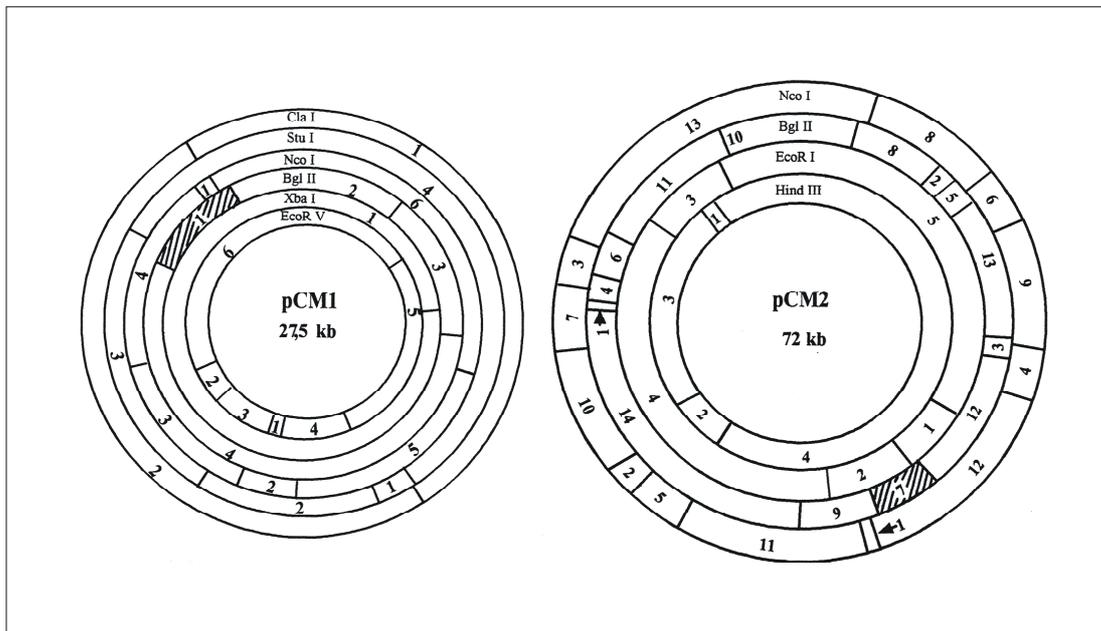


Abb. II.5: Physikalische Karten der beiden endogenen Plasmide von *Cmm*, pCM1 (links) und pCM2 (rechts). Dargestellt sind in konzentrischen Kreisen die Restriktionsfragmente und ihre Größe bei der Spaltung mit *Bgl*II, *Cla*I, *Eco*RV, *Nco*I, *Stu*I und *Xba*I (pCM1) bzw. *Bgl*II, *Eco*RI, *Hind*III und *Nco*I (pCM2). Die Fragmente sind nach aufsteigender Größe durchnummeriert. Die beiden schraffiert markierten Fragmente (*Bgl*-1, pCM1 und *Bgl*-7, pCM2) zeigen die Position der beiden Pathogenitätsgene *celA* (pCM1) und *pat-1* (pCM2) an.

Werden beide Plasmide (CMM100) bzw. nur eines von beiden (CMM101, nur pCM1 vorhanden; CMM102, nur pCM2 vorhanden) durch ein Plasmid-Curing z. B. durch Kultivierung bei erhöhter Temperatur entfernt, so ändert sich die Virulenz der erhaltenen Derivate. CMM101 und CMM102 zeigen eine leicht verringerte Virulenz, was sich in einer geringfügig verzögerten und langsameren Ausbildung der Welke zeigt (vergl. auch Ergebnisse Kapitel IV.B 1, Seite 89). Der Stamm CMM100 ohne Plasmide zeigt überraschenderweise keinerlei Virulenz mehr, kann aber die Pflanze trotzdem in annähernd gleichem Maße kolonisieren wie der Wildtyp, wird also zu einem Endophyten. Da CMM100 ebensoviel EPS produziert wie der Wildtyp, unterstützt dies den Befund, dass der Wassertransport nicht durch Kolonisation des Xylems und Bildung von EPS physikalisch so eingeschränkt wird, dass Welke resultiert. Dies zeigt weiterhin, dass die Gene, die zur Adhäsion, Invasion, Proliferation und Kolonisation der Wirtspflanze notwendig sind, chromosomal kodiert sein müssen. Allerdings ist eine leichte Biomassereduktion bei den mit CMM100 infizierten Pflanzen zu beobachten. Auf jedem der beiden endogenen Plasmide konnte jeweils ein Gen identifiziert werden, das Virulenz auslöst (vergl. Abb. II.5).

Bei dem auf dem 3,75 kb großen *Bgl*II-Fragment von pCM2 lokalisierten Gen handelt es sich um das *pat-1*-Gen (DREIER *et al.*, 1997). Die Funktion von Pat-1 konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Abfragen in der BLAST-Datenbank (ALTSCHUL *et al.*, 1997) ergeben Ähnlichkeiten zu Serin-Proteasen vom Trypsin-Subtyp. Die für diese Proteinfamilie typischen, konservierten katalytisch aktiven Aminosäuren (das Histidin an Position 105, das Aspartat an Position 124 und das Serin im GDSGG-Motiv an Position 231, vergl. Alignment auf Seite 186 im Anhang) sind vorhanden. Ein putatives Sortase-Motiv an Position 251 könnte auf eine kovalente Verankerung des Pat-1-Proteins in der Zellwand hindeuten. Trotz intensiver Suche konnte bisher weder ein Substrat für Pat-1 noch eine Proteaseaktivität nachgewiesen werden. Auf dem Plasmid pCM2 liegen benachbart zu *pat-1* zwei weitere Gene, deren Genprodukte auf Aminosäureebene Ähnlichkeiten zu Pat-1 aufweisen. Die Gene wurden *phpA* und *phpB* genannt (für plasmidal homology of *pat-1*). Werden sie einzeln oder zusammen in pDM302 kloniert in CMM100 eingebracht, so führen sie nicht zu Welkesymptomen (PIEPER, 2002). Es existiert eine Kopie des *pat-1* Gens im Chromosom (Identität der DNA-Sequenz ca. 88 %), welche mit *chpA* bezeichnet wurde (für chromosomal homology of *pat-1*) (MELKONYAN, 1993; I. GRÄFEN, unveröffentlichte Daten). Das Gen wird jedoch von zwei "frameshifts" und zwei Stopcodons unterbrochen und das von 283 AS auf 97 AS verkürzte Protein dürfte nicht funktional sein. Einen

Einfluss auf die Virulenz scheint *chpA* nicht zu besitzen, wie der nicht virulente Stamm CMM100 zeigt.

Auf dem 3,2 kb großen *Bgl*II-Fragment von pCM1 liegt das *celA*-Gen, welches für eine Endo- β -1,4-Glukanase/Zellulase kodiert (JAHR *et al.*, 2000). Über die chromosomalen Gene, die in die Bakterien-Pflanzen-Interaktion involviert sind, war bisher nichts bekannt.

4 Genetische Methoden für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

4.1 Vektoren

Auf Basis der beiden endogenen Plasmide pCM1 und pCM2 sind für *Cmm* einige Shuttle-Vektoren konstruiert worden. Dies ist eine der essentiellen Voraussetzungen, um genetisch mit *Cmm* arbeiten zu können. Dazu wurden entsprechende Restriktionsfragmente der Plasmide in *Escherichia coli*-Kloniervektoren inseriert, in *Cmm* transformiert und auf Replikationsfähigkeit und Stabilität in *Cmm* getestet. Es stehen jeweils zwei Shuttle-Vektoren auf Basis von pCM1 - pDM302 und pDM306 (MELETZUS *et al.*, 1993) - und auf Basis von pCM2 - pHN205 und pHN216 (NAKHEI, 1993; LAINE *et al.*, 1996) - zur Verfügung (Karten siehe Anhang, Abb. VII.4 und VII.5, Seite 162). Sie bestehen jeweils aus dem Replikon von pCM1 bzw. pCM2, einem pBR-Replikon, einer Neomycin/Kanamycin-Resistenzkassette (*aph(3')-IIa*) und zusätzlich einer Chloramphenicol- (*cmx*; TAUCH *et al.*, 1998) bzw. Gentamicin-Resistenzkassette (*aacCI*; WOHLLEBEN *et al.*, 1989). Die Replikons sind mit etwa 8 kb leider sehr groß und singuläre Restriktionsschnittstellen zur Klonierung von DNA-Fragmenten dementsprechend nur in sehr geringer Anzahl vorhanden. Außerdem wurden bisher keine Ergebnisse darüber veröffentlicht, wie hoch die Stabilität der Vektoren ist, wenn sie zusammen mit den ursprünglichen endogenen Plasmiden in ein und derselben Zelle vorhanden sind. Normalerweise würde man eine gegenseitige Verdrängung aufgrund von Inkompatibilität erwarten (zur Replikation und Stabilität von Plasmiden siehe z. B. NORDSTRÖM und AUSTIN, 1989; AUSTIN und NORDSTRÖM, 1990; WILLIAMS und THOMAS, 1992; DEL SOLAR *et al.*, 1998 und GERDES *et al.*, 2000).

4.2 Elektroporation/Elektrotransformation

Um mit *Cmm* genetisch arbeiten zu können, muss eine effiziente Methode zur Einbringung von DNA vorhanden sein. Prinzipiell kommen dazu vier Methoden in Frage: die Protoplasten-Transformation, Konjugation, Transduktion und Elektrotransformation, auch Elektroporation genannt. Die meisten dieser Verfahren konnten für eine Transformation von *Cmm* bisher nicht etabliert werden. Bisher sind keine Plasmide beschrieben, die von anderen Spezies auf *Cmm* durch Konjugation transferierbar sind. Transfektion/Transduktion mittels Phagen wurde bisher ebenfalls nicht beschrieben.

Die Protoplasten-Transformation ist ein sehr aufwendiges Verfahren mit oft großen Problemen bei der Reproduzierbarkeit und sehr schlechter bis mäßiger Transformationseffizienz, sodass sich die Bemühungen zur Etablierung eines nutzbaren Verfahrens auf die Elektrotransformation konzentrierten. Bereits 1991 wurden von MELETZUS und EICHENLAUB erste Ergebnisse zur Elektrotransformation von *Cmm* veröffentlicht, bei denen im Wesentlichen das Elektroporationsprotokoll von *E. coli* mit leichten Modifikationen übernommen wurde. Die Transformationsraten blieben mit ca. $2,3 \cdot 10^3$ cfu/ μ g DNA unter Verwendung homologer DNA sehr gering, aber erstmals war es überhaupt möglich, *Cmm* zu transformieren. Eine verbesserte Methode für *Cms* wurde 1996 von LAINE *et al.* beschrieben, bei der die Transformationseffizienz auf $4,6 \cdot 10^4$ cfu/ μ g DNA erhöht werden konnte. Eine leicht veränderte Version dieser Methode wurde 2000 von MELETZUS *et al.* für *Cmm* veröffentlicht, doch ohne Zahlen für die Elektroporationseffizienz zu nennen. Eine deutliche Erhöhung ließ sich aber anscheinend nicht erreichen. Beide Methoden verwendeten eine Lysozymbehandlung der Zellen nach dem Aufarbeiten und vor der Elektroporation, um die Zellwand aufzulockern, was allerdings gewisse Probleme bei der Reproduzierbarkeit mit sich brachte.

Es wurde bereits 1991 bzw. 2000 von MELETZUS und Mitarbeitern beschrieben, dass *Cmm* wahrscheinlich ein starkes Restriktionssystem besitzt, weil die Transformationsrate mit heterologer DNA aus *E. coli* um den Faktor 50 - 100 gegenüber homologer DNA verringert war. Für die effiziente Einbringung von Fremd-DNA, z. B. für eine Transposon-Mutagenese mittels "Suicide"-Plasmid oder eine gezielte Mutagenese durch "gene-disruption" bzw. "gene-replacement", reichten die Transformationsraten also nicht aus, sodass eine Optimierung der Elektrotransformation von *Cmm* geboten war.

4.3 Transposon-Mutagenese

Zur Inaktivierung und gleichzeitiger Markierung von Genen ist die Transposon-Mutagenese auch in Zeiten der Genomprojekte eine wichtige und hilfreiche Methode, da mit ihr auch Gene identifiziert werden können, über deren Funktion bisher nichts bekannt ist und über die mittels einer Analyse von Datenbankvergleichen keine Hinweise verfügbar sind. Die bisher verwendete Methode der chemischen Mutagenese hat den Nachteil, dass nie sicher ist, ob nur eine Mutation zu dem beobachteten Phänotyp führt und dass der Mutationsort nicht markiert ist. Transposons gehören, wie die IS-Elemente, zu den so genannten mobilen genetischen Elementen (zur generellen Übersicht zu IS-Elementen und Transposons siehe GALAS und CHANDLER, 1989; MAHILLON und CHANDLER, 1998). Die auf ihnen kodierte Transposase verleiht ihnen die Fähigkeit, sich durch Duplikation bzw. Exzision und anschließende Insertion an andere Stellen im Genom zu transferieren und das am Zielort evtl. vorhandene Gen zu unterbrechen. IS-Elemente besitzen fast ausschließlich nur ein einziges offenes Leseraster, welches für die Transposase kodiert und von zwei „inverted repeats“ eingerahmt wird. Transposons tragen neben Genen, die in die Transposition involviert sind, noch weitere Gene. IS-Elemente und Transposons können bzgl. der Insertionsstelle eine mehr oder minder stark konservierte Konsensussequenz bevorzugen. Viele von ihnen besitzen jedoch keine solche Präferenz oder sie ist nur schwach ausgeprägt. Da sie mit etwa gleicher Wahrscheinlichkeit in jedes Gen transponieren können, macht sie das zu wertvollen Hilfsmitteln für die Genetik, sofern sie mit selektierbaren Markern versehen sind bzw. versehen werden können.

Bisher war kein Transposon verfügbar, welches in *Cmm* eingesetzt werden konnte. Im Rahmen der Doktorarbeit von K.-H. GARTEMANN wurde in *Arthrobacter* sp. - einem nah verwandten Aktinomyzeten - angrenzend an ein Operon, welches die Enzyme für die Dehalogenierung von 4-Chlorbenzoat, einem aromatischen, chlorierten Kohlenwasserstoff, kodiert, ein neues IS-Element gefunden (IS1409, Abb. II.6). Dieses war für die Konstruktion einer Gruppe von artifiziellen Transposons (Tn1409, Abb. II.7) geeignet. Die von K.-H. GARTEMANN konstruierten Transposon-Mutageneseplasmide ließen sich für die erfolgreiche Mutagenese in *Arthrobacter* einsetzen (GARTEMANN, 1999; GARTEMANN und EICHENLAUB, 2001), und es gab erste Hinweise, dass sie auch zur Mutagenese in *Cmm* verwendet werden könnten. Dem sollte u. a. in dieser Arbeit nachgegangen und, falls möglich, das Verfahren optimiert werden.

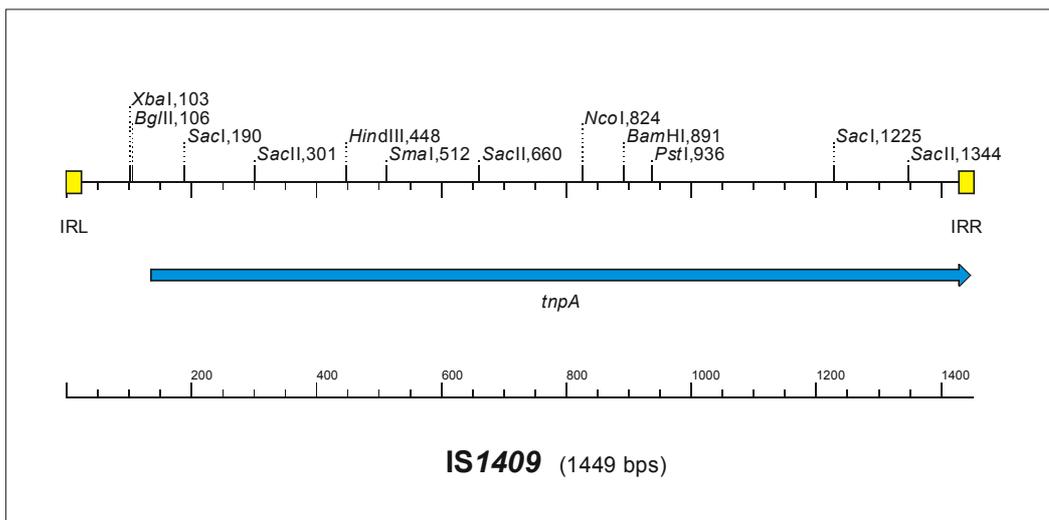


Abb. II.6: Physikalische Karte des IS-Elements IS1409 aus *Arthrobacter* sp. (GARTEMANN, 1999; GARTEMANN und EICHENLAUB, 2001). Das Transposase-Gen *tnpA* ist als Pfeil dargestellt, der linke bzw. rechte "inverted repeat" (IRL/IRR) als gelbes Rechteck.

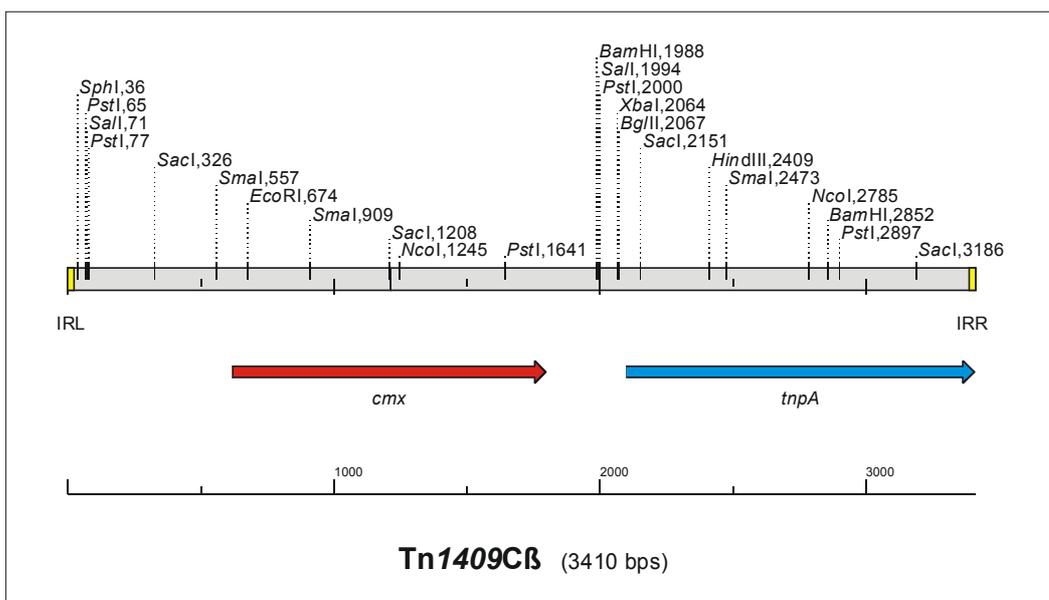


Abb. II.7: Physikalische Karte des artifiziiellen Transposons Tn1409Cβ (GARTEMANN, 1999; GARTEMANN und EICHENLAUB, 2001). Gene sind als Pfeile dargestellt, der linke bzw. rechte "inverted repeat" (IRL/IRR) als gelbes Rechteck. *cmx*: Chloramphenicol-Exporter-Gen (TAUCH *et al.*, 1998); *tnpA*: Transposase-Gen von IS1409/Tn1409C.

5 Problemstellung

In dieser Arbeit sollten mehrere Ziele verfolgt werden: Zum einen die methodischen Grundlagen dafür zu legen, dass es möglich wird, chromosomale Gene zu identifizieren, die Teil der Bakterien-Pflanzen-Interaktion zwischen *Cmm* und der Tomate sind. Als Mittel der Wahl ist hier die Etablierung der Transposon-Mutagenese zu nennen, um die chemische Mutagenese zu ersetzen. Als Voraussetzung dafür ist eine hocheffiziente Methode zur Einbringung von DNA in *Cmm* vonnöten. In diesem Fall sollte die Technik der Elektroporation soweit optimiert werden, dass sie zur Transposon-Mutagenese mit Hilfe eines "Suicide"-Vektors geeignet ist. Da die Transposition ein Vorgang ist, dessen Wahrscheinlichkeit normalerweise im Bereich von ungefähr 10^{-7} bis 10^{-4} liegt, sind die bisher in *Cmm* erreichten Transformationsraten von ca. 10^3 cfu/ μ g DNA bei der Elektroporation eines replizierenden Plasmids viel zu gering, um sinnvoll eine Transposonmutagenese durchführen zu können.

Die Stabilität der von dem endogenen Plasmid pCM2 abstammenden Vektoren pHN205 und pHN216 (NAKHEI, 1993; LAINE *et al.*, 1996) sollte überprüft werden, ebenso ob und in wie starkem Maße Inkompatibilität zwischen pCM1 und den daraus konstruierten Vektoren pDM302 und pDM306 (MELETZUS *et al.*, 1993) unter unselektiven Bedingungen auftritt. Auch die Suche nach weiteren Plasmiden, die in *Cmm* stabil replizieren, aber keine Derivate der endogenen Plasmide sind, sollte fortgeführt werden. Anhand der Charakterisierung von Mutanten sollte die Transposonmutagenese auf Tauglichkeit und Reproduzierbarkeit überprüft werden.

Zum anderen sollten Mutanten identifiziert werden, die eine veränderte Virulenz aufweisen und es sollte versucht werden, diese näher zu charakterisieren, um Einblicke darin zu bekommen, welche chromosomalen Gene bzw. Genprodukte in der Adhäsion, Invasion, Proliferation und Kolonisation von *Cmm* eine Rolle spielen.

III Material und Methoden

III.A Material

1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp, wichtige Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α MCR	F ⁻ <i>endA1 supE44 thi-1 λ^- recA1 GyrA1 gyrA96 relA1 deoR $\Delta(lacZYA-argF)$-U169 ϕ80<i>lacZ</i>ΔM15 <i>mcrA $\Delta(mrr hsdRMS mcrBC)$</i></i>	GRANT <i>et al.</i> , 1990
JM109	F' <i>traD36 laqI^d</i> , $\Delta(lacZ)$ M15, <i>proAB/recA1, recA1, endA1, gyrA96(Nal^R) thi, hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺), supE44, relA1, $\Delta(lac-proAB)$</i>	YANISCH-PERRON <i>et al.</i> , 1985
SCS110	<i>dam⁻ dcm⁻</i>	JERPSETH und KRETZ, 1993
WA337	F ⁻ , <i>dcm-6, dam-3, metβ1, galK2, galT22, lacY1, tsx-78, supE44</i>	Stammsammlung WACKERNAGEL, Universität Oldenburg
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>		
<i>Cmm</i> NCPPB382	virulent <i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomate), pCM1 und pCM2	NCPPB*
CMM100	Curing-Derivat von <i>Cmm</i> NCPPB382, plasmidfrei	MELETZUS und EICHENLAUB, 1991
CMM101	Curing-Derivat von <i>Cmm</i> NCPPB382, pCM1	MELETZUS und EICHENLAUB, 1991
CMM101 _{Gm}	Gm ^R , pCM1, <i>celA⁻</i>	JAHR, 2000
TM100 β 113-35	Transposon-Mutante von CMM100, Cm ^R , weiße Koloniefarbe	diese Arbeit
TM382 β 324-50	Transposon-Mutante von <i>Cmm</i> NCPPB382, Cm ^R , verringerte Virulenz, nur pCM1	diese Arbeit
TM382 β 330-18	Transposon-Mutante von <i>Cmm</i> NCPPB382, Cm ^R , kolonisationsdefekt, nur pCM1	diese Arbeit
TM382 β 370-45	Transposon-Mutante von <i>Cmm</i> NCPPB382, Cm ^R , verringerte Virulenz, nur pCM1	diese Arbeit
TM382 β 371-23	Transposon-Mutante von <i>Cmm</i> NCPPB382, Cm ^R , sehr schleimige Koloniemorphologie, nur pCM1	diese Arbeit

Stamm	Genotyp, wichtige Eigenschaften	Referenz
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>		
CMM100(pHN205)	Curing-Derivat von <i>Cmm</i> NCPPB382, pHN205	ABT, 2003; diese Arbeit
CMM100(pHN216)	Curing-Derivat von <i>Cmm</i> NCPPB382, pHN206	ABT, 2003; diese Arbeit
CMM101 _{Gm} (pDM302)	Gm ^R , Neo ^R , pCM1, <i>celA</i> ⁻ , pDM302	ABT, 2003; diese Arbeit
TM100β 113-35 (pBA-113-35β)	Transposon-Mutante TM100β 113-35 mit Plasmid zur Komplementation	ABT, 2003; diese Arbeit
TM382β 330-18 (pBA-30-18)	Transposon-Mutante TM382β 330-18 mit Plasmid zur Komplementation	ABT, 2003; diese Arbeit
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>		
<i>Cmi</i> NCPPB1109	virulent <i>Medicago sativa</i> (Luzerne)	NCPPB*
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>		
<i>Cmn</i> NCPPB2579	virulent <i>Zea mays</i> (Mais)	NCPPB*; Vidaver und Mandel, 1974
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>		
<i>Cms</i> Cs4	virulent <i>Solanum tuberosum</i> (Kartoffel)	LAINE <i>et al.</i> , 1996
<i>Cms</i> Cs7		
<i>Rathayibacter</i>		
<i>R. iranicus</i> NCPPB2253	virulent <i>Triticum aestivum</i> (Weizen)	NCPPB*
<i>R. rathayi</i> NCPPB2980	virulent <i>Dactylis glomerata</i> (Knäuelgras)	NCPPB*

*: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, UK.

2 Pflanzenmaterial

<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (Tomate)	
cv. "Moneymaker"	Erfurter Saatgut, N.L. Chrestensen, Erfurter Samen- und Pflanzenzucht GmbH

3 Plasmide und Vektoren

Plasmid	Resistenzen, wichtige Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> -Kloniervektoren		
pUC13	Amp ^R , <i>lacZ</i> α -Komplementationssystem	VIERA und MESSING, 1982; YANISCH-PERRON <i>et al.</i> , 1985
pUC18		
pUC19		
pK18 <i>mob2</i>	Km ^R	<i>lacZ</i> α -Komplementationssystem, RP4 <i>mob</i> - Region zur Mobilisierung in <i>E. coli</i> S17-1
pK19 <i>mob2</i>		
pT19 <i>mob2</i>	Tet ^R	TAUCH <i>et al.</i> , 1998 KIRCHNER und TAUCH, 2003
pK19MECA2	Km ^R	KIRCHNER und TAUCH, 2003 diese Arbeit
pT19MECA2	Tet ^R	
pK18PolyF2	Km ^R , <i>lacZ</i> α -Komplementationssystem, <i>mcs</i> zum Versehen von "blunt-end"-Fragmenten mit "sticky ends", RP4 <i>mob</i> -Region	KIRCHNER, 1999; TAUCH <i>et al.</i> , 2002
Transposon-Mutagenesevektoren		
pKGT452C α	Amp ^R , Cm ^R , pUC13 mit Tn1409C α	GARTEMANN und EICHENLAUB, 2001
pKGT452C β	Amp ^R , Cm ^R , pUC13 mit Tn1409C β	
"broad-host-range"-Vektoren		
pBHK18	Km ^R , pNG2-Derivat	KIRCHNER und TAUCH, 2003
pVLT31	Tet ^R , RSF1010-Derivat	DE LORENZO <i>et al.</i> , 1993
pMMB207	Cm ^R , RSF1010-Derivat	MORALES <i>et al.</i> , 1991
pSUP104	Km ^R , RSF1010-Derivat	PRIEFER <i>et al.</i> , 1985
<i>E. coli</i> - <i>Cmm</i> -Shuttlevektoren		
pDM302	Km ^R , Cm ^R , pCM1-Derivat	MELETZUS <i>et al.</i> , 1993
pDM306	Km ^R , Gm ^R , pCM1-Derivat	
pHN205	Km ^R , Gm ^R , pCM2-Derivat	NAKHEI, 1993;
pHN216		LAINÉ <i>et al.</i> , 1996
Cosmide		
cos2/27	Cosmid mit chromosomaler DNA aus <i>Cmm</i> von der Genregion, die in TM100 β 113-35 unterbrochen ist.	GRÄFEN, 2001; ABT, 2003
cos2/51		
cos3/42		
cos4/55		

Plasmid	Resistenzen, wichtige Eigenschaften		Referenz
Plasmidkonstrukte dieser Arbeit			
pOKPF-CmB	<i>cmx</i> -Gen <i>PmlI/BsaWI</i> aus pKGT452C β in pK18PolyF2 (<i>SmaI</i>) kloniert		diese Arbeit
pOKPF-CmH	<i>cmx</i> -Gen <i>PmlI/BsaWI</i> aus pKGT452C β in pK18PolyF2 (<i>DraI</i>) kloniert		diese Arbeit
pOKPF-CmX	<i>cmx</i> -Gen <i>PmlI/BsaWI</i> aus pKGT452C β in pK18PolyF2 (<i>EcoRV</i>) kloniert		diese Arbeit
pOKU9-CmB α	<i>cmx</i> -Gen <i>BamHI</i> aus pOKPF-CmB in pUC19(<i>BamHI</i>) kloniert		diese Arbeit
pOKU9-CmB ΔE	PCR-Fragment <i>EcoAD SpeI/AscI</i> in pOKU9-CmB α (<i>SpeI/AscI</i>) kloniert		diese Arbeit
pOKU9-CmB $\Delta E\Delta P$	PCR-Fragment <i>PstAD RsrII/EcoRI</i> in pOKU9-CmB $\alpha\Delta E$ (<i>RsrII/EcoRI</i>) kloniert		diese Arbeit
pOKU9-CmBf	PCR-Fragment <i>SacAD AscI/RsrII</i> in pOKU9-CmB $\alpha\Delta E\Delta P$ (<i>AscI/RsrII</i>) kloniert		diese Arbeit
pOKU9-CmHcf	Per PCR mit <i>HincII</i> -Schnittstellen versehenes <i>cmx</i> -Gen in pUC19 (<i>HincII</i>) kloniert		diese Arbeit
pOKU9-113-35 α	α -Orientierung	5915 bp <i>BglIII</i> -Fragment aus cos2/27 in pUC19 (<i>BamHI</i>) kloniert, enthält Carotionoid-Biosynthese-Operon von <i>Cmm</i>	diese Arbeit
pOKU9-113-35 β	β -Orientierung		
pBA-113-35 α	<i>EcoRI/HindIII</i> -Fragment aus pOKU9-113-35 β in pDM302 (<i>EcoRI/HindIII</i>) kloniert, Plasmid zur Komplementation von TM100 β 113-35		ABT, 2003, diese Arbeit
pOKK9-113-35E α	2369 bp <i>Eco47III</i> -Fragment aus pOKU9-113-35 α in pK19mob2 (<i>SmaI</i>) kloniert. Enthält Ende des <i>crtE</i> - und Anfang des <i>crtBI</i> -Gens.		diese Arbeit
pOKK9-113-35 Δ NCm α	α -Orientierung	In <i>NruI</i> -Deletion von pOKK9-113-35E α kloniertes <i>cmx</i> -Gen (<i>HincII</i>) aus pOKU9-CmHcf	diese Arbeit
pOKK9-113-35 Δ NCm β	β -Orientierung		
pT19MECA2::30-18 α	4334 bp <i>KpnI/NotI</i> -Fragment aus cos3/42 in pT19MECA2 (<i>KpnI/NotI</i>) kloniert, enthält GTP-Pyrophosphokinase-Gen		ABT, 2003, diese Arbeit
pBA-30-18 α	4334 bp <i>EcoRI/MfeI</i> -Fragment aus pT19MECA::30-18 α in pDM302 (<i>EcoRI/MfeI</i>) kloniert, Plasmid zur Komplementation von TM382 β 330-18		ABT, 2003, diese Arbeit

4 Nährmedien

Die Angaben der einzuwiegenden Substanzen beziehen sich auf 1000 ml H₂O deionisiert. Abweichungen sind gesondert angegeben.

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

5 Medienzusätze

Festmedium: 16 g Agar pro 1000 ml Medium

Antibiotikum	Abk.	Selektion in <i>E. coli</i>	Selektion in <i>Cmm</i>	Lösungsmittel	Lager- temperatur	Bezugsquelle
Ampicillin	Amp	150 µg/ml	–	H ₂ O	4 °C	Roth
Chloramphenicol	Cm	10 µg/ml ¹	10 µg/ml	70 % EtOH	4 °C	Sigma
Gentamicin	Gm	40 µg/ml	10 µg/ml	H ₂ O	4 °C	Sigma
Kanamycin	Kan	50 µg/ml	–	H ₂ O	4 °C	Sigma
Neomycin	Neo	–	50 µg/ml	H ₂ O	4 °C	Sigma
Tetrazyklin	Tet	5 µg/ml	n.g. ²	50 % EtOH	4 °C	Serva
X-Gal ³	–	30 µg/ml	–	DMF ⁴	-20 °C	Roth

6 Puffer und Lösungen

6.1 Puffer zur Resuspension/Lagerung von Bakterien

Die Angaben der einzuwiegenden Substanzen beziehen sich auf 1000 ml H₂O deionisiert. Abweichungen sind gesondert angegeben.

PS-Puffer

7 g	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O
5 g	NaCl
3 g	K ₂ HPO ₄
	pH 7,0

TES-Puffer

7 g	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O
5 g	NaCl
3 g	K ₂ HPO ₄
	pH 8,0

¹: Bei Selektion auf die vom *cmx*-Gen (TAUCH, *et al.*, 1998) vermittelte Resistenz.

²: nicht getestet

³: X-Gal: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid für *lacZ*-α-ω-Komplementation.

⁴: DMF: Dimethylformamid

6.2 Lösungen und Puffer für Gelelektrophorese

Die Angaben der einzuwiegenden Substanzen beziehen sich auf 1000 ml H₂O deionisiert. Abweichungen sind gesondert angegeben.

Agarose-Lösung	0,8 - 2 % [w/v]	Agarose in TA-/TBE-Gelpuffer aufkochen
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml	in H ₂ O
Gel-Lade-Puffer	0,03 % [w/v]	Bromphenolblau
	40 % [w/v]	Glyzerin
	117 mM	EDTA
TBE-Gelpuffer (10x)	108 g	Tris-Base
	9,3 g	EDTA
	55 g	Borsäure
TA-Gelpuffer (50x)	40 mM	Tris-HCl
	10 mM	Na-Acetat
	1 mM	EDTA
		pH8,5

6.3 Lösungen und Puffer für DNA-Isolierung (Eckhardt-Lyse, alkalische Lyse)

Die Angaben der einzuwiegenden Substanzen beziehen sich auf 1000 ml H₂O deionisiert. Abweichungen sind gesondert angegeben.

DNase/RNase-Lösung	1 mg/ml	DNase I
	1 mg/ml	RNase A
	150 mM	NaCl
	44 % [v/v]	Glyzerin
		in H ₂ O bidest. Portionsweise bei -20 °C lagern
EIF-Puffer	1 mM	EDTA
	20 % [w/v]	Saccharose
	7 % [w/v]	Ficoll 400
		pH 8,4 autoklavieren
vor jeder Lyse frisch hinzugeben:	10 µg/ml	RNase A (DNase-frei)
	20 mg/ml	Lysozym

AK I	6,7 % [w/v]	Saccharose
	50 mM	Tris-HCl
	1 mM	EDTA
		pH 8,0
AK III	250 mM	EDTA
	50 mM	Tris-HCl
AK IV	20 % [w/v]	SDS
	50 mM	Tris-HCl
	20 mM	EDTA
		pH 8,0
HB1-Lösung	50 mM	Glukose
	25 mM	Tris-HCl
	10 mM	CDTA
		pH 8,0
HB2-Lösung	0,4 N	NaOH
	2 % [w/v]	SDS
HB3-Lösung	3 M	Na-Acetat
		pH 4,8
P1	50 mM	Tris-HCl
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
		pH 8,0
P2	200 mM	NaOH
	1 % [w/v]	SDS
P3	3 M	K-Acetat
		pH 5,5
Phenol (Kirby-Mix)	Phenol bei 68 °C schmelzen. 0,1 % Hydroxychinolin hinzufügen. Je eine Extraktion mit 1 M, 100 mM, und 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) bis der pH-Wert der wässrigen Phase über 7,5 liegt.	
Phenol/Chloroform	Phenol (Kirby-Mix) mit Chloroform im Verhältnis 1:1 mischen.	

6.4 Lösungen zur Behandlung von Agarosegelen für Southern-Hybridisierungen

Die Angaben der einzuwiegenden Substanzen beziehen sich auf 1000 ml H₂O deionisiert. Abweichungen sind gesondert angegeben.

Depurinierungslösung (Blot I)	0,25 M	HCl
Denaturierungslösung (Blot II)	1,5 M	NaCl
	0,5 M	NaOH
Neutralisierungslösung (Blot III)	1,5 M	NaCl
	0,5 M	Tris-HCl pH 7,5

6.5 Puffer und Lösungen für Hybridisierungen

Die Angaben der einzuwiegenden Substanzen beziehen sich auf 1000 ml H₂O deionisiert. Abweichungen sind gesondert angegeben.

DIG-Blocking-Stammlösung	10 % [w/v]	DIG-Blocking-Reagenz in DIG-Puffer 1
DIG-Färbelösung	45 µl	NBT
	35 µl	BCIP
		zu 10 ml DIG-Puffer 3 hinzufügen
DIG-Hybridisierungslösung		DIG-Prähybridisierungslösung mit DIG-markierter DNA-Probe
DIG-Prähybridisierungslösung	5 x	SSC
	0,5 % [v/v]	Blocking-Stammlösung
	0,1 % [w/v]	N-Laurylsarkosyl
	0,02 % [w/v]	SDS
DIG-Puffer 1	0,1 M	Maleinsäure
	0,15 M	NaCl
		pH 7,5
DIG-Puffer 2	2 %	DIG-Blocking-Stammlösung in DIG-Puffer 1

DIG-Puffer 3	100 mM	Tris-HCl
	100 mM	NaCl
	50 mM	MgCl ₂
		pH 9,5
DIG-Waschpuffer		DIG-Puffer 1 mit 0,3 % (v/v) Tween 20
20x SSC	3,0 M	NaCl
	0,3 M	Na-Citrat
		pH 7
Waschpuffer I	2 x	SSC
	0,1 % [w/v]	SDS
Waschpuffer II	0,1 x	SSC
	0,1 % [w/v]	SDS

7 Enzyme, Chemikalien und Kits

7.1 Enzyme

Bezugsquelle	Enzym
Roche	Alkalische Phosphatase, Klenow-Polymerase
New England Biolabs	Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase
Serva	RNase A
Sigma	Lysozym

7.2 Chemikalien und Kits

Bezugsquelle	Chemikalien / Material
Amersham	Hybond N-Filter
Biozym	Agarose Seakem LE
Eurogentec, Equibio	Elektroporations-Küvetten (2 mm Elektrodenabstand)
GibcoBRL	Select Agar, Select Pepton 140, Select Hefe Extrakt
Qiagen	QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, Taq PCR Core Kit, QIAquick PCR-Purification Kit
Roche	DIG DNA Labelling and Detection Kit, Nitrobluetetrazolium (NBT), 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylypyrophosphat (BCIP), Blocking Reagenz
Roth	Glasperlen, Glycerin, Glycin, Natriumchlorid, Tween 80
Schleicher und Schuell	Nylon-Membran
Serva	Bromphenolblau, N-Laurylsarkosyl, Silikonisierungslösung
Sigma	Dimethylformamid, EDTA, EGTA, Mineralöl, Natriumhydroxid, Sorbitol, Tris-HCl, Triton-X-100
Merck	alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien
Whatman	3 MM Papier

8 Geräte

Tischzentrifuge, Centrifuge 5415 D, Firma Eppendorf

Kühlzentrifuge, Hermle Centrikon H-401, Firma Kontron

Elektroporationsgerät, Gene Pulser mit Pulse Controller, Firma BioRAD

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

RoboCycler Gradient 96, Firma Stratagene

9 Oligonukleotid-Primer für PCR und Standardsequenzierungen

Primer	bp	Nukleotidsequenz 5' → 3'
S113-35#1	19	CTG GAA GGG CAC CAT CCT C
S113-35#2	19	CAT GGA GCT GCT CTC CTT C
S71-23#1	21	CTA TTC CTA CAA GCG TCT AAG
S71-23#2	19	GAA ATA GGC AGG TGG TAG C
S30-18#1	19	CGA AGC CTT ATT CGC AAG G
S30-18#2	20	TGT GAA AGC GAA TCT AGA GC
S24-50_XF0531#1	20	CAT GAA TGG CCT ATA TGA GC
S24-50_XF0531#2	21	CAT AGT AAA CCC ATA CTA TCC
S24-50_XF1434#1	21	CTT CAT TGA TGA CAT GTG CAG
S24-50_XF1434#2	18	GCT GCT GCT GCT CGG TAG
Neo pDM1	18	GCT TTC TTG CCG CCA AGG
Neo pDM2	19	GAA CTC CAG CAT GAG ATC C
EcoA	22	CCT TGA ACC ACT AGT TAC GAC G
EcoB	21	CGA GCA TGA ACT CTG AAG TGC
EcoC	21	GCA CTT CAG AGT TCA TGC TCG
EcoD	20	CGA ACA CGA GAA GGC AAA CG
PstA	20	CGA CTA TCA GAT CAA CGA CC
PstB	20	CCG CAG CAG CTC CGA TAT TC
PstC	17	GAG CTG CTG CGG GGC CC
PstD	21	CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC
SacA	21	CAT TCG CAG TCG GTA TGG TCG
SacB	21	CAA CTG GCT GAG CTG GAC ACG
SacC	21	CGT GTC CAG CTC AGC CAG TTG
SacD	21	GAT CCA GCC TGT CAG CAA TAG
ISN2	22	CAT GCA GTT GCG CCC ACT ACA C
ISC2	22	GGA ACC TCA CCA ACT ACA TAG C
IRL (ISN, cmx)-203	21	GTT GGT GTT CTC GTT GGT TGG
IRR (ISC, tnpA)-211	23	CAT CCA AGG AAA GAA GCT CAT GC

III.B Methoden

1 Bakterienanzucht/-lagerung

1.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Kulturausstriche von *E. coli* werden auf TBY-Agar über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Flüssigkulturen werden durch Beimpfen von 5 ml TBY-Medium mit einer Einzelkolonie und anschließender Inkubation über Nacht bei 37 °C im Roller angezogen. Größere Volumina werden im Erlenmeyer-Kolben bei 37 °C und 200 U/min im Luftschüttler inkubiert.

1.2 Anzucht von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Kulturausstriche von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) werden auf TBY- oder C-Medium-Agar über 2 - 4 Tage bei 25 - 28 °C im Brutschrank inkubiert. Flüssigkulturen werden durch Beimpfen von 50 ml TBY-Medium im Erlenmeyerkolben und anschließender Inkubation über 2 - 4 Tage bei 25 - 28 °C und 200 U/min im Luftschüttler angezogen.

1.3 Konservierung von Bakterienkulturen (Gefrier-/Glycerinkultur)

- Bakterien einer gut gewachsenen Kultur (von Festmedium oder aus Flüssigkultur) in ein Eppendorfgefäß überführen.
- 400 µl PS-Puffer hinzufügen und sehr gut resuspendieren.
- 600 µl 87 % Glycerin hinzufügen, mischen.
- Lagerung bei –80 °C

Bakterien aus diesen Kulturen sind über mehrere Jahre lebensfähig.

1.4 Titerbestimmung von Bakterien in Flüssigkultur

Das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur kann durch Messung der optischen Dichte (o.D. = Extinktion) bei einer Wellenlänge von 580 nm mittels Photometer verfolgt werden. Als Referenz dient das sterile Medium, in dem die Bakterien angezogen wurden. Eine o.D.₅₈₀ von 0,1 entspricht bei *E. coli* einem Lebendtiter von ca. $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml, bei *Cmm* entspricht sie einem Lebendtiter von ca. $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml.

2 DNA-Isolierung

2.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (nach HOPWOOD *et al.*, 1985, modifiziert)

- Bakterien von der Agar-Platte in ein Eppendorfgefäß überführen.
- Zellen in 500 µl AKI-Lösung (mit 10 mg/ml Lysozym) resuspendieren.
- 45 - 60 min bei 37 °C inkubieren (gelegentlich invertieren).
- 200 µl 5 % SDS hinzufügen, invertieren.
- 10 min bei 70 °C inkubieren.
- Langsam auf RT abkühlen lassen.
- 200 µl Phenol/Chloroform 1:1 (neutral) hinzufügen, mischen.
- 20 min bei 13.000 U/min zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf).
- Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen.
- 1 Vol. Isopropanol und 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 8,0) hinzugeben.
- Invertieren, bis die DNA ausfällt.
- Ausgefällene DNA in 1 Vol. 70 % Ethanol überführen. (Entweder auf eine Pasteurpipette aufwickeln oder mit einer gelben Spitze "fischen".)
- Diesen Waschschrift je nach Verunreinigung eventuell wiederholen.
- DNA in neues Eppendorfgefäß überführen.
- 200 µl H₂O bidest. hinzugeben.
- DNA 30 min bei 37 °C oder ü/N bei RT lösen.
- Lagerung der DNA bei 4 °C

2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

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

- 1,5 ml ü/N-Flüssigkultur 5 min bei 13.000 U/min zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf).
- Überstand entfernen.
- Zellpellet in 200 µl P1-Puffer resuspendieren (alternativ können Zellen von einer Stocherplatte abgenommen und resuspendiert werden).
- 200 µl P2-Puffer hinzufügen, 4 - 6 x invertieren, max. 5 min bei RT inkubieren.
- 200 µl 4 °C kalten P3-Puffer hinzugeben, sofort 4 - 6x invertieren.
- 20 min bei 13.000 U/min zentrifugieren.
- Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen.
- 600 µl Isopropanol hinzugeben, mischen.

- 30 min bei 13.000 U/min zentrifugieren.
- Überstand entfernen.
- Pellet mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol waschen, Überstand vollständig abziehen.
- 5 min bei 13.000 U/min zentrifugieren.
- DNA-Pellet trocknen und in 50 µl H₂O bidest. oder 50 µl TE-Puffer (pH 8,0) resuspendieren.

2.2.2 Plasmidisolierung aus *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (nach ANDERSON und MCKAY, 1983, modifiziert)

- 4 x 125 ml *Cmm*-Kultur bis zur Log-Phase im Erlenmeyerkolben anziehen.
- 15 min bei 8.000 U/min in der Kühlzentrifuge (Rotor A6.9) bei 4° C abzentrifugieren.
- Pellet in 2,5 ml AK I resuspendieren.
- 10 ml AK I mit 12,5 mg/ml Lysozym hinzugeben, mischen.
- 60 min bei 37 °C inkubieren
- 1,25 ml AK III zugeben.
- 0,8 ml AK IV zugeben, kurz mischen.
- 15 min bei 37 °C inkubieren.
- 30 s kräftig vortexen.
- 0,8 ml 3 M NaOH zugeben, 10 min mischen durch invertieren.
- 1,25 ml 2 M Tris-HCl (pH 7,0) zugeben und 3 min mischen durch invertieren.
- 1,8 ml 5 M NaCl zugeben, kurz mischen.
- 10 ml Kirby-Mix zugeben, kräftig mischen.
- 20 min bei 12.000 U/min in der Kühlzentrifuge (Rotor A8.24) bei 4° C abzentrifugieren.
- Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen und 1 Vol. Isoamylalkohol/Chloroform (1:24) zugeben, mischen.
- 10 min bei 12.000 U/min in der Kühlzentrifuge (Rotor A8.24) bei 4° C abzentrifugieren.
- Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen und 1 Vol. Isopropanol zugeben, mischen.
- DNA 60 min bei -70 °C fällen.
- DNA 30 min bei 12.000 U/min in der Kühlzentrifuge (Rotor A8.24) bei 4° C pelletieren.

Zur effizienten Plasmidisolierung aus *Cmm* wird 1 l Kultur aufgearbeitet.

- Überstand vollständig abziehen. DNA trocknen.
- Alle vier Pellets zusammen in 4,7 ml TE-Puffer resuspendieren.
- CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation

3 DNA-Reinigung (und -Konzentration)

3.1 CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation

- 4,7 ml DNA in TE-Puffer.
- 4,7 g CsCl zugeben.
- 0,4 ml EtBr-Lösung hinzugeben.
- 60 min bei 20.000 U/min in der Kühlzentrifuge (Rotor A8.24) bei 15° C abzentrifugieren. ("clearing spin")
- Lösung überführen in "Quickseal"-Röhrchen.
- Röhrchen luftblasenfrei verschließen.
- ü/N bei 50.000 U/min in der Ultrazentrifuge (Rotor VTI 65) bei 15° C abzentrifugieren.
- Unter UV-Bestrahlung ($\lambda = 254$ nm) werden im Dichtegradienten zwei Banden sichtbar. Die untere ccc-Plasmid-Bande wird mit einer 1 ml Spritze abgezogen und in ein Eppendorfgesäß überführt.
- Extraktion des EtBr: 1 Vol. CsCl-gesättigtes Isopropanol hinzugeben, mischen. (3 - 4 x wiederholen, bis die Lösung farblos bleibt.)
- Dialyse: 2 x 4 h gegen 2 l TE-Puffer.

3.2 Alkoholfällung

3.2.1 Ethanolfällung

- 1 Vol. DNA-Lösung
- 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 8,0) hinzufügen.
- 2 Vol. Ethanol hinzufügen, invertieren.
- 30 min bei 13.000 U/min zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf).
- Überstand entfernen.
- Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol waschen.
- 15 min bei 13.000 U/min zentrifugieren.
- Pellet trocknen und in H₂O bidest. oder TE-Puffer (pH 8,0) resuspendieren.

3.2.2 Isopropanolfällung

- 1 Vol. DNA-Lösung.
- 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 8,0) hinzufügen.
- 1 Vol. Isopropanol hinzufügen, invertieren.

- 30 min bei 13.000 U/min zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf).
- Überstand entfernen.
- Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol waschen.
- 15 min bei 13.000 U/min zentrifugieren.
- Pellet trocknen und in H₂O bidest. oder TE-Puffer (pH 8,0) resuspendieren.

3.3 Phenolisierung (SAMBROOK *et al.*, 1989)

- 1 Vol. DNA-Lösung.
- ½ Vol. Phenol/Chloroform 1:1 (neutral) zugeben, mischen.
- 10 min bei 13.000 U/min zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf).
- Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen.
- Anschließend Isopropanolfällung des Überstandes.

3.4 Sephadex-Behandlung (nach SAMBROOK *et al.*, 1989)

Durch Sephadex-Säulenchromatographie (bestehend aus dem hochmolekularen Glukose-Polymer Dextran) können Substanzen anhand ihres unterschiedlichen Elutionsvolumens getrennt werden. Dieses ist weitgehend proportional zum Molekulargewicht der Substanzen. Das Ausschlussvolumen der Dextran-Matrix erlaubt kleineren Molekülen (wie Verunreinigungen durch Salze, Nukleotide, Phenol usw.) das Eindringen in das Material, nicht jedoch DNA-Makromolekülen. Die Verunreinigungen werden so zurückgehalten, die DNA befindet sich im salzfreien Eluat.

- Sephadex G50 Pulver in H₂O bidest. quellen lassen, autoklavieren.
- Silikonisiertes Glaskügelchen (Ø ca. 2,5 mm) in blaue Pipettenspitze geben.
- Silikonisierung: Glaskügelchen in Silikonisierungslösung für 1 h bei 100 °C backen.
- Pipettenspitze in Weichagar-Röhrchen stellen.
- 800 µl Sephadex G50-Lösung in die Pipettenspitze füllen.
- Röhrchen 15 min bei 3.000 U/min zentrifugieren.
- Spitze in ein neues Weichagar-Röhrchen stellen.
- DNA (mind. 30 µl, sonst mit H₂O-bidest. auffüllen) auf das Sephadex G50 in der Pipettenspitze auftragen.
- 15 min bei 3.000 U/min zentrifugieren.
- Gereinigtes DNA-Eluat weiterverwenden.

3.5 Bestimmung der DNA-Konzentration (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Die DNA- (und RNA-) Konzentration kann durch die Messung der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt werden. Die Reinheit der Probe bestimmt der Quotient $\text{o.D.}_{260}/\text{o.D.}_{280}$. Eine o.D._{260} von 1 entspricht 50 μg doppelsträngiger bzw. 33 μg einzelsträngiger DNA pro ml. Reine DNA liefert einen $\text{o.D.}_{260}/\text{o.D.}_{280}$ -Quotienten von 1,65-1,85.

4 Techniken zur Charakterisierung von DNA-Molekülen

4.1 Eckhardt-Lyse von *Escherichia coli* (nach ECKHARDT, 1978)

Rasche Methode zur Darstellung und Längenbestimmung von Plasmiden mittels Lyse der Zellen im Agarose-Gel durch SDS-Behandlung.

Gelvorbereitung

- 1% Agaroselösung in TA-Gelpuffer aufkochen.
- SDS mit einer Endkonzentration von 0,2 % hinzufügen.

Lyse der Zellen/Elektrophorese

- Pro Lyse 5 μl TES-Puffer in eine Mikrotiterplatte pipettieren.
- *E. coli*-Kolonie mit einem Zahnstocher von der Platte abnehmen und in den TES-Puffer einreiben.
- Zellsuspension mit 15 μl EIF-Puffer vermischen und sofort in die Geltaschen füllen.
- Gel-Vorlauf ~ 15 min bei 20 V, bis die Geltaschen aufklaren.
- Gel-Ladepuffer als Marker in 2 Geltaschen auftragen.
- Gel bei 50 - 100 V laufen lassen.

4.2 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

4.2.1 Hydrolyse von Plasmid-DNA

20 μl Ansatz:

- 0,2 - 1,0 μg DNA (1 - 10 μl) in TE-Puffer (pH 8,0) oder H_2O bidest.
- 2 μl 10 x Reaktionspuffer hinzufügen (1/10 Vol. des Gesamtvolumens).
- 0,5 - 1 μl Restriktionsendonuklease zugeben.
- Mit H_2O bidest. bis zum Gesamtvolumen von 20 μl auffüllen.
- 1 - 2 h oder ∞ bei Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms inkubieren.
- 20 min bei 65 °C bzw. 80 °C inaktivieren, wenn Hitzeinaktivierung des Enzyms möglich ist, sonst phenolisieren.

4.2.2 Hydrolyse von Gesamt-DNA

100 µl Ansatz:

- 1 - 5 µl Gesamt-DNA
- 10 µl 10x Reaktionspuffer hinzufügen (1/10 Vol. des Gesamtvolumens).
- 1 - 2 µl Restriktionsendonuklease zugeben.
- Mit H₂O bidest. auf 100 µl auffüllen.
- ü/N bei Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms inkubieren.
- 20 min bei 65 °C bzw. 80 °C inaktivieren, wenn Hitzeinaktivierung des Enzyms möglich ist, sonst phenolisieren.

4.3 Agarose-Gelelektrophorese (nach OGDEN und ADAMS, 1987)

Elektrisch geladene Makromoleküle können durch elektrophoretische Methoden nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Eine Standardmethode zur Trennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten oder Plasmiden ist die Agarose-Gelelektrophorese. Hier wirkt das Netzwerk der Agarose-Moleküle als Hindernis gegenüber der Kraft, die durch das elektrische Feld auf die Moleküle ausgeübt wird. Kleine, kompakte Moleküle wandern schneller durch das Netzwerk als lange, gestreckte. Die Wanderungsgeschwindigkeit von DNA-Molekülen im elektrischen Feld hängt von folgenden Parametern ab:

Größe der DNA-Moleküle

Lineare, doppelsträngige DNA-Moleküle wandern mit einer Geschwindigkeit durch die Gelmatrix, die annähernd umgekehrt proportional dem Logarithmus ihres Molekulargewichts ist.

DNA-Konformation

ccc- (sog. „supercoiled“ DNA, ringförmig geschlossen), oc- („open circle“, relaxierte) und lineare DNA zeigen bei gleichem Molekulargewicht unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten. ccc-DNA ist kompakter als oc- und lineare DNA und wandert deshalb schneller. Die relative Mobilität der drei Formen wird u. a. durch die Agarose-Konzentration des Geles, der Ionenkonzentration des Puffers und das Ausmaß der Spiralisierung der DNA beeinflusst.

Agarose-Konzentration

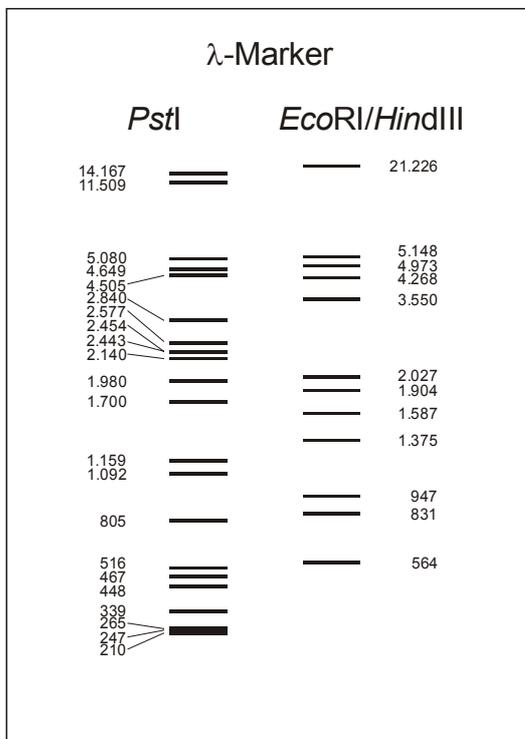
Eine effektive Auftrennung von DNA-Molekülen in einem Größenbereich von 0,4 bis 7 kb wird bei einer Konzentration von 0,8 % bis 1,2 % gewährleistet.

Für die Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese werden Horizontal- und Minigelkammern verwendet. Als Elektrophorese-Puffer dient TA- oder TBE-Gelpuffer. Die Agarose-Konzentrationen liegen je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente zwischen 0,5 % und 2 %. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 50 V - 100 V; die DNA wird mit einem Gel-Ladepuffer vermischt, der als Marker für die Laufstrecke dient. Nach Abschluss des Gellaufs wird die DNA mittels Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) sichtbar gemacht/fotografiert.

Agarose-Konzentration [%]	Fragmentgrößen [kb]
0,7	0,8 - 10
0,9	0,5 - 7
1,2	0,4 - 6
1,5	0,2 - 3

- Agarose in TBE- oder TA-Gelpuffer unter Rühren aufkochen.
- Auf ca. 60 °C abkühlen lassen.
- In den Gelträger gießen und den Kamm einsetzen.
- Nach der Auspolymerisation des Gels (ca. 20 min) in die mit TBE/TA gefüllte Gelelektrophoresekammer einsetzen und den Kamm entfernen.
- DNA-Proben mit 2 µl Gel-Lade-Puffer versetzen.
- Geltaschen mit Proben beladen.
- Auftrennung erfolgt bei 90 bis 120 Volt.
- Gel nach Ende der Elektrophorese 5 - 15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung anfärben.
- Gel wässern und unter UV-Licht fotografieren.
- Bei zu starker Färbung das Gel in TBE-/TA-Gelpuffer entfärben

4.4 Bestimmung des Molekulargewichts von DNA



Die Mobilität von linearen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten in der Gelelektrophorese ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Durch den Vergleich mit Mobilitäten bekannter Größenstandards können die unbekanntenen Größen der DNA-Fragmente ermittelt werden. Als Größenstandard dienen in dieser Arbeit die λ -Marker (*EcoRI/HindIII*- oder *PstI*-gespalten, Abb. III.1) oder der Marker X der Firma Roche (Fragmentgrößen: 75, 134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 517, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126, 8144, 9162, 10180, 11198, 12216 bp). Bei Hybridisierungsgelen wurden Digoxigenin-11-dUTP markierte *EcoRI/HindIII*-Restriktionsfragmente des Phagen λ als Längen-Marker eingesetzt (Abb. III.1).

Abb. III.1: Bandenmuster und Größe der Banden von *EcoRI/HindIII*- und *PstI*-gespaltenem λ -Marker.

5 Klonierung von DNA-Fragmenten

5.1 5'-Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase

- 98 µl linearisierter Vektor (Spaltungsansatz).
- 12 µl 10x Phosphatase-Puffer zugeben.
- 3 µl alkalische Phosphatase (12 U) zugeben.
- 7 µl H₂O bidest. zugeben.
- 30 min bei 37 °C inkubieren.
- 6 µl 100 mM EGTA (pH 7,0) zugeben.
- 10 min bei 70 °C inaktivieren.
- Phenolextraktion.
- Ethanolfällung.
- DNA in H₂O bidest. aufnehmen.

5.2 Erzeugung von "blunt ends" durch Behandlung mit Klenow-Polymerase

Zur Ligation unterschiedlicher "sticky ends" (klebrige Enden) müssen diese in "blunt ends" (glatte Enden) umgewandelt werden. Das große Fragment der DNA-Polymerase I ("Klenow-Fragment") besitzt neben der 5'-3'-Polymeraseaktivität noch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität ("Proofreading"-Aktivität). Die beiden Aktivitäten befähigen die Klenow-Polymerase dazu, sowohl überhängende 5'-Enden in Anwesenheit von Nukleotiden aufzufüllen, als auch überhängende 3'-Enden in Abwesenheit von Nukleotiden abzubauen, sodass die DNA-Fragmente letztlich mit "blunt ends" versehen werden.

- ca. 20 µl gespaltene DNA (Restriktionsenzyme durch Hitze/Phenolisierung inaktivieren.)
- Verdoppeln des Ansatzes durch Zugabe von 2 µl TA-Spaltungspuffer und 13 µl H₂O bidest.
- 1 µl Klenow-Polymerase hinzufügen.
- Für das Auffüllen zusätzlich jeweils 1/10 Volumen aller vier dNTPs (10 mM) hinzufügen.
- 30 min inkubieren bei 37 °C.
- Enzyminaktivierung durch 20 min Inkubation bei 65 °C.
- Abtrennung freier Nukleotide durch Sephadex- oder Glasmilch-Behandlung.

5.3 Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten (nach MANIATIS *et al.*, 1982, mod.)

Die Ligation von DNA wird ATP-abhängig katalysiert durch die Aktivität der T4-DNA-Ligase. Es können "sticky ends" mit kompatiblen Überhängen oder beliebige "blunt ends" ligiert werden. Die Insert-DNA wird meistens im Überschuss zum Reaktionsansatz gegeben. Ein günstiges Verhältnis von Vektor-DNA zu Insert-DNA beträgt 1:2 - 1:4. Die Klonierung eines Restriktionsfragmentes erfolgt nach der Restriktion des Vektors und der Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen.

Zur Ligation wird die DNA in dem mitgelieferten Ligations-Puffer aufgenommen/verdünnt und die Reaktion durch Zugabe der T4-Ligase gestartet. Die Inkubation erfolgt bei 16 - 20 °C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 1,5 - 3 Stunden. Anschließend kann das Reaktionsgemisch nach Inaktivierung der Ligase bei 65 °C zur Transformation, oder nach Sephadex-Behandlung zur Elektroporation eingesetzt werden.

40 µl Ansatz:

- Vektor-DNA/Insert-DNA-Gemisch (1:2 bis 1:4)
- 4 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer (1/10 Vol.) zugeben.
- 1 µl T4-DNA-Ligase zugeben.
- Mit H₂O bidest. auf 40 µl auffüllen.
- 1,5 - 3 h bei RT oder ü/N bei 16 °C inkubieren

5.4 "Shotgun"-Klonierung

Bei dieser ungezielten Klonierung erfolgt die Ligation direkt nach der Restriktion von Vektor-DNA und Insert-DNA. Nach der Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen werden Vektor- und Insert-DNA im geeigneten Verhältnis gemischt (1:3 - 1:5).

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

Durch α - ω -Komplementation ist es möglich, den Erfolg einer Klonierung in *E. coli* schnell und effizient zu überprüfen. Bei den Kloniervektoren liegt die "mcs" (multiple cloning site) innerhalb des α -Fragments des *lacZ*-Gens, das für die β -Galactosidase codiert. In Zellen, die dieses Enzym besitzen, spaltet es das farblose Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid), sodass das tiefblaue 5-Brom-4-chlor-indigo entsteht. Durch die Klonierung des Inserts in die "mcs" des Vektors wird das *lacZ* α -Fragment zerstört, das im Medium vorhandene X-Gal kann nicht gespalten werden und die entstehenden Kolonien bleiben weiß. Die blauen Kolonien enthalten den Vektor ohne Insert.

6 DNA-Transfer

6.1 Elektroporation von *Escherichia coli* (nach "Gene Pulser"-Manual)

Vorbereitung der *E. coli*-Zellen

- *Escherichia coli*-Vorkultur 1:100 in TBY-Medium überimpfen.
- Bei 37 °C bis zu einer o.D.₅₈₀ von 0,5 - 0,75 schütteln lassen.
- Zellen 15 min in Eiswasser abkühlen.
- Alle weiteren Schritte bei 0 °C ausführen. Lösungen auf 0 °C vorkühlen.
- 250 ml Kultur 15 min bei 6.000 x g abzentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor A6.9, Firma Kontron).
- Überstand abgießen, Rücklauf vollständig abziehen.
- Becher zweimal mit ca. 20 ml H₂O bidest. vorsichtig ausschütteln, ohne das Pellet zu lösen.
- Pellet vorsichtig in 5 ml H₂O bidest. lösen, danach 250 ml H₂O bidest. zugeben, mischen.
- Zellen 15 min bei 6.000 x g pelletieren (Centrikon H-401, Rotor A6.9, Firma Kontron).
- Überstand sofort abgießen. Zellpellet im Rücklauf resuspendieren.
- Suspension auf zwei 40 ml Zentrifugenbecher aufteilen und jeweils 25 ml 15 % Glycerin zugeben, mischen.
- Zellen 15 min bei 6.000 x g Rotor abzentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor A8.24, Firma Kontron).
- Überstand abziehen.
- Pellet in 0,5 - 1 ml 15 % Glycerin resuspendieren.
- Kompetente Zellen portionsweise (~60 - 100µl) bei -80°C schockgefrieren; bei -80°C lagern.

Elektroporation der kompetenten *E. coli*-Zellen

- Zellen auf Eis auftauen. DNA und Küvetten auf Eis stellen.
- Puls-Bedingungen: 25 µF Kapazität, 400 Ω Parallelwiderstand, 12,5 kV Spannung (2,5 kV bei 0,2 cm Küvetten).
- 60 - 100 µl kompetente Zellen mit bis zu 1/10 Vol. entsalzter DNA vermischen.
- 30 - 60 s auf Eis inkubieren.
- Suspension ganz nach unten in die Elektroporationsküvette geben.
- Küvette sehr gut abtrocknen, in die Apparatur stellen und Puls auslösen. (Die Zeitkonstante sollte zw. 7 und 9 ms bei 400 Ω liegen.)
- Nach dem Puls sofort 1 ml SOC-Medium hinzugeben.
- Zellen in ein Eppi überführen und 60 min bei 37 °C regenerieren lassen.
- Zellen auf TBY-Selektionsmedium ausplattieren.

7 DNA-DNA-Hybridisierung (nach Southern, 1975, modifiziert)

7.1 Markierung der Hybridisierungssonde

(DIG-DNA Labelling-Kit der Firma Roche Diagnostics, Mannheim)

- 5 µl DNA mit 10 µl H₂O bidest. verdünnen.
- 10 min bei 100 °C inkubieren (Denaturierung).
- Sofort im Eiswasser abkühlen lassen.
- Auf Eis dazugeben: 2 µl Hexanukleotid Mix (10x konz.).
2 µl dNTP Labeling Mixture.
1 µl Klenow-Polymerase.
- Mischen und mind. 1 h, besser ü/N bei 37 °C inkubieren.
- Reaktion durch 20 min Inkubation bei 65 °C stoppen.

7.2 Überprüfung der Markierungsreaktion (Dot Blot)

- 1 µl markierte Proben-DNA sowie markierte und nicht-markierte Kontroll-DNA (DIG-DNA Labelling Kit) auf eine Nylonmembran auftragen.
- Bei RT trocknen, anschließend 3 - 5 min unter UV-Licht quervernetzen ($\lambda = 302 \text{ nm}$).
- 1 min in DIG-Puffer 1 waschen.
- 30 min in DIG-Puffer 2 inkubieren (Schüttler).
- 30 min in DIG-Puffer 2 mit Antikörperkonjugat (2 µl/20 ml) inkubieren (auf einem Schüttler).
- Zweimal 15 min mit DIG-Waschpuffer waschen (Schüttler).
- 2 min mit DIG-Puffer 3 äquilibrieren.
- Nylonmembran in DIG-Färbelösung im Dunkeln färben.
- Färbereaktion mit H₂O stoppen.

7.3 DNA-Transfer auf eine Membran

7.3.1 Transfer der DNA durch Passiv-Blot

- Restringierte DNA-Proben durch Agarose-Gelelektrophorese auftrennen.
- DNA mit Ethidiumbromid-Lösung anfärben, unter UV-Licht fotografieren, Gel entfärben.
- Das Agarosegel 5 min in Depurinierungslösung (Blot I) inkubieren, Lösung abgießen.
- Zweimal 15 min in Denaturierungslösung (Blot II) inkubieren, Lösung abgießen.
- Zweimal 15 min in Neutralisierungslösung (Blot III) inkubieren, Lösung abgießen.

Blot-Aufbau:

- Frischhaltefolie mit Klebeband faltenfrei auf der Unterlage befestigen.
- Zuerst das Agarosegel dann die Nylonmembran blasenfrei darauf legen.
- 4 - 5 Lagen Whatmanpapier (mit Blot III angefeuchtet) darauf legen.
- Darauf einen ca. 10 cm dicken Stapel Einmal-Papierhandtücher legen
- Den Blot-Aufbau von oben mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschweren.
- Transfer der DNA ü/N.
- DNA auf der Nylonmembran 3 - 5 min im UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) quervernetzen.
- Membran zur Hybridisierung einsetzen.

7.3.2 Transfer der Cosmid-DNA für Koloniehybridisierung

- Cosmidhaltige Kolonien auf geeignete Selektions-Medien stochern und ü/N bei 37 °C inkubieren.
- Nylonmembran (Hybond N-Filter, Amersham) auf die Kolonien legen und 1 - 2 h bei 37 °C inkubieren.
- Nylonmembran mit der DNA-Seite nach oben auf 5 Lagen 3MM Whatmanpapier legen, das jeweils in die folgenden Lösungen getränkt ist:
 - 2 - 3 min 0,5 M NaOH
 - 4 - 5 min 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
 - 7 min 1 M Tris-HCl, pH 7,5
 - 7 min 1 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,5
 - 5 min 1 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,5
- Zweimal 10 min in 2x SSC inkubieren.
- Verbleibende Kolonien vorsichtig ablösen.
- Nylonmembran 3 - 5 min im UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) quervernetzen.
- Filter zur Hybridisierung einsetzen.

Die über Koloniehybridisierung identifizierten Cosmide wurden in dieser Arbeit folgendermaßen nach Cosmidplatte und Cosmid-Nr. benannt: Cosmidklon 27 von Cosmidplatte 2 wird als cos2/27 bezeichnet.

7.4 Prähybridisierung und Hybridisierung unter stringenten Bedingungen

- Nylonmembran mit der DNA-Seite nach innen in einen Hybridisierungszylinder überführen.
- 20 ml DIG-Prähybridisierungslösung hinzugeben.
- Mind. 2 h bei 68 °C im Hybridisierungsofen inkubieren (Rollvorrichtung).
- Digoxigenin-11-dUTP-markierte DNA-Probe (Sonde) zu 6 ml DIG-Prähybridisierungslösung geben und 10 min bei 100 °C denaturieren.
- Prähybridisierungslösung abgießen und Hybridisierungssonde zugeben.
- ü/N bei 68 °C im Hybridisierungsofen inkubieren (Rollvorrichtung).

7.5 Immunologische Nachweisreaktion unter stringenten Bedingungen

- Hybridisierungssonde abgießen und für eine Wiederverwendung bei -20 °C lagern.
- Membran zweimal 5 min mit jeweils 100 ml Waschpuffer I bei RT waschen (Rollvorrichtung), Lösung abgießen.
- Membran zweimal 15 min mit jeweils 100 ml Waschpuffer II bei 68 °C waschen (Rollvorrichtung), Lösung abgießen.
- Membran in eine Hybridisierungsschale überführen. (Während der Inkubation mit den folgenden Lösungen wird die Hybridisierungsschale auf einen Schüttler gestellt.)
- 1 min in 50 ml DIG-Puffer 1 bei RT inkubieren, Lösung abgießen.
- 30 min in 100 ml DIG-Puffer 2 bei RT inkubieren, Lösung abgießen.
- 1 min in 50 ml DIG-Puffer 1 bei RT inkubieren, Lösung abgießen.
- 30 min mit Antikörper-Konjugat (Verdünnung 1:10.000; 25 ml DIG-Puffer 2 + 2,5 µl Antikörperkonjugat) bei RT inkubieren, Lösung abgießen.
- Zweimal 15 min mit jeweils 100 ml DIG-Waschpuffer bei RT inkubieren, Lösung abgießen.
- Membran 2 min in 50 ml DIG-Puffer 3 inkubieren, Lösung abgießen.
- DIG-Färbelösung hinzugeben.
- Im Dunkeln inkubieren bis Farbreaktion auftritt.
- Reaktion durch Zugabe von H₂O stoppen.
- Membran trocknen und im Dunkeln aufbewahren.

8 Polymerasekettenreaktion (PCR) (nach MULLIS *et al.*, 1986)

8.1 PCR mit Gesamt-DNA als Template

Die PCR-Technik ist eine Technik zur *in vitro* Amplifikation von bestimmten DNA-Abschnitten. Die PCR benutzt das Prinzip der Primer-Extension mit zwei gegenläufigen Primern, die jeweils komplementär zum gegenüberliegenden Strang einer DNA-Region (Matrize, Template) sind.

Denaturiert man die DNA durch Erhitzen, können sich nach Abkühlen auf eine Temperatur um 50°C die Primer an die DNA-Matrize spezifisch anlagern. Die Orientierung der Primer ist so gewählt, dass die neue DNA in Richtung des anderen Primers synthetisiert wird. Durch zwanzig bis vierzig Wiederholungen dieses Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung und Primer-Extension erreicht man eine Vermehrung des DNA-Fragments zwischen den Primerbindungsstellen um den Faktor 10³ bis 10⁴.

Für die PCR werden Desoxyribonukleotide, eine hitzestabile DNA-Polymerase (z. B. *Taq*-Polymerase), die DNA-Matrize und ein Puffer mit Mg²⁺-Ionen benötigt. Die Nukleotide und die Primer müssen in großem Überschuss hinzugegeben werden, da sie in die Reaktionsprodukte eingebaut werden. Die PCR wurde in dieser Arbeit im RoboCycler Gradient 96 von Stratagene durchgeführt.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (50 µl Volumen)

- PCR-Puffer 5 µl
- dNTPs 1 µl
- Primer 1 1 µl
- Primer 2 1 µl
- *Taq*-Polymerase 1 µl
- H₂O bidest. 40 µl
- Gesamt-DNA (1:20 verd.) 1 µl
- Der Reaktionsansatz wird mit 1 - 2 Tropfen PCR-Öl überbeschichtet, um ein Verdampfen des Reaktionsansatzes zu verhindern.
- Reaktionsansatz wird in den RoboCycler Gradient 96 (Stratagene) gestellt.
- Die Amplifikation der DNA erfolgte nach folgendem Standard-Programm:

Zyklen	Dauer	Temperatur
1	5 min	94 °C
30	1,5 min	94 °C
	1,5 min	Annealing-Temperatur
	1,5 min	72 °C
1	10 min	72 °C

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

Der Temperaturgradient und die Annealing-Temperatur der in dieser Arbeit durchgeführten PCRs sind im Ergebnisteil aufgeführt.

8.2 PCR mit ganzen Zellen als Template

Präparation der Template-DNA

- Zellen mit einer gelben Pipettenspitze von der Agar-Platte abnehmen und in ein Eppendorfgefäß überführen.
- 500 µl H₂O bidest. hinzufügen, gründlich resuspendieren.
- 5 min bei 13.000 U/min zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf).
- Überstand entfernen.
- Zellen im Rücklauf resuspendieren.

Pro Reaktionsansatz wurde 1 µl der Zellsuspension als Template eingesetzt (Reaktionsansatz siehe 8.1). Der erste Denaturierungsschritt des PCR-Programms (siehe 8.1) wurde von 5 min auf 10 min verlängert, damit die Zellen lysieren und die DNA für die PCR zugänglich wird.

9 Untersuchungen zur Stabilität von Plasmiden

9.1 Untersuchung der Plasmidstabilität in Flüssigkultur

Die Anzucht der Zellen erfolgte in 20 ml TBY ohne Zusatz eines Antibiotikums in 100 ml Erlenmeyerkolben, die bei 25 °C und 200 U/min im Luftschüttler inkubiert wurden. Alle 3 - 4 Tage wurden 100 µl der auf eine o.D.₅₈₀ von 0,3 verdünnten Bakteriensuspension in 20 ml frisches Medium überimpft. Der Test lief über 2 bis 3 Wochen. Vor jedem Überimpfen wurde eine Verdünnungsreihe der Bakteriensuspension angelegt, und die Verdünnungsstufen 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} wurden auf Festmedium mit und ohne Antibiotikum ausplattiert. Durch Vergleich der Anzahl der Kolonien, die auf Medium mit Selektionsdruck und auf Medium ohne Antibiotikum gewachsen sind, konnte das Verhältnis zwischen plasmidtragenden und plasmidfreien Zellen ermittelt werden und eine Aussage über die Stabilität eines Plasmids gemacht werden.

9.2 Untersuchung der Plasmidstabilität *in planta*

Ob ein Plasmid auch über mehrere Generationen in der Pflanze stabil vorliegt, kann durch einen Pflanzentest bestimmt werden. Über Wurzelinfektion wurden einige Pflanzen mit dem entsprechenden plasmidtragenden Bakterium infiziert. Nach 28 Tagen wurden die Pflanzen mit einer sterilen Schere 1 cm über der Erde im Topf abgeschnitten, der austretende Xylemsaft mit einer Pipette abgezogen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Verdünnungsstufen 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} des Xylemsafts wurden auf Festmedien mit und ohne Antibiotikum ausplattiert. Durch Vergleich der Kolonienanzahl auf Medium mit und ohne Antibiotikum ließ sich die Stabilität des Plasmids bestimmen.

9.3 Berechnung des gewichteten Mittelwerts

Um den Bakterientiter einer Bakteriensuspension zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe der Suspension angelegt. Einige Verdünnungsstufen wurden auf Festmedien ausplattiert. Nach Bebrütung der Bakterien wurde die Kolonienanzahl bestimmt. Die Ergebnisse der verschiedenen Verdünnungsstufen wurden nicht zum arithmetischen Mittel sondern zu einem gewichteten Mittel zusammengefasst. Man kann davon ausgehen, dass bei dem Erstellen einer Verdünnungsreihe der Fehler, der z. B. aus Pipettier-Ungenauigkeiten resultiert, immer größer wird. Am geringsten ist dieser Fehler also bei der niedrigsten Verdünnungsstufe, die sich noch problemlos auszählen lässt. Deshalb wird diese zu 100 %, die folgenden Verdünnungsstufen nur noch zu 10 %, 1 % und 0,1 % gewertet. Mathematisch wird dies dadurch realisiert, dass die ausgezählten Koloniezahlen der einzelnen Verdünnungsstufen addiert werden und diese Zahl je nach Anzahl der Verdünnungsstufen durch 1,1 (2 Verdünnungsstufen), durch 1,11 (3 Verdünnungsstufen), 1,111 (4 Verdünnungsstufen) dividiert wird.

10 Methoden zur Analyse des Pathogenitätsverhaltens von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Die Virulenz von *Cmm* kann nur direkt mit der Wirtspflanze Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) getestet werden. Zur Anwendung kommt hier die Sorte "Moneymaker" der Erfurter Samen- und Pflanzenzucht GmbH, die sich als relativ empfindlich für *Cmm* erwiesen hat. Es gibt zwei Varianten der Methode zur Infektion der Pflanzen mit *Cmm*, die Petiolusinfektion und die Wurzelinfektion.

10.1 Petiolusinfektion

- Aussaat und Anzucht der Tomatenpflanzen in autoklavierter Erde.
- Nach dem Auskeimen (im 2-Blatt-Stadium ca. zwei Wochen nach der Aussaat) die Pflanzen entnehmen und in Blumentöpfe der Größe 8 x 8 cm vereinzeln.
- Bis zu einer Größe von ca. 5 - 7 cm heranziehen (3-Blatt-Stadium).
- Das erste Fiederblatt mit einem scharfen, sterilisierten Skalpell direkt am Spross abschneiden und auf die entstandene Wunde *Cmm* mit einer gelben Spitze aufgetragen.
- Anzucht der Pflanzen im Pflanzenraum bei 50 % relativer Luftfeuchtigkeit im Tag-Nacht-Rhythmus bei 25 °C/19 °C (Tag 16 h bei 12.000 Lux, Nacht 8 h im Dunkeln).
- Welkesymptome täglich protokollieren.

10.2 Wurzelinfektion

- Aussaat und Anzucht der Tomatenpflanzen in autoklavierter Erde.
- Pflanzen im 2-Blatt-Stadium (ca. zwei Wochen nach der Aussaat) entnehmen und anhaftende Erde vorsichtig entfernen.
- Bakterien in 0,5 - 1 ml autoklaviertem Leitungswasser/PS-Puffer in einem Eppendorfgefäß resuspendieren (o.D.₅₈₀: 5 - 10).
- Pflanzen 30 min in *Cmm*-Bakteriensuspension inkubieren (vier Pflanzen pro Eppendorfgefäß).
- Anzucht der Pflanzen im Pflanzenraum bei 50 % relativer Luftfeuchtigkeit im Tag-Nacht-Rhythmus bei 25 °C/19 °C (Tag 16 h bei 12.000 Lux, Nacht 8 h im Dunkeln).

10.3 Ermittlung des Welkeindex und Welkeverlaufs

Der Welkeindex des jeweiligen Stammes ist der Zeitraum, nach dem 50 % der infizierten Pflanzen Welkesymptome aufweisen (MELETZUS *et al.*, 1993). In der vorliegenden Arbeit wurden mit einer Ausnahme pro Bakterienstamm 32 Pflanzen (n = 32) infiziert. Der Tag nach Infektion der Pflanzen, an dem 16 Pflanzen Welkesymptome zeigen, gibt also den Welkeindex an.

Der genaue Welkeverlauf wurde ermittelt, indem die Pflanzen täglich auf ihre Welkesymptome hin untersucht und in fünf Klassen eingeteilt wurden: nicht welkend ("–", keinerlei Welkesymptome), beginnende Welke ("(")", beginnendes Aufbiegen eines Fiederblatts oder erstes Nachlassen der Turgeszenz eines Fiederblatts), deutlich ausgeprägte Welke ("+", eindeutig identifizierbare Welkesymptome an mind. einem Fiederblatt), stark ausgeprägte Welke ("++", an mind. zwei Drittel der Fiederblätter zeigen sich deutliche Welkesymptome), sowie abgestorbene Pflanze ("tot", die Pflanze besitzt keine grünen Blätter mehr, die zur Photosynthese fähig wären). Die Keimblätter wurden zur Beurteilung der Welkesymptome nicht berücksichtigt, da sie sich auch ohne Infektion mit *Cmm* oft von alleine einrollen und danach abfallen.

10.4 Gewichtsbestimmung der Pflanzen

28 Tage nach Infektion wurden die Tomatenpflanzen mit einer sterilen Schere direkt oberhalb der Erde abgeschnitten und zur Frischgewichtsbestimmung gewogen.

10.5 Größenbestimmung der Pflanzen

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

10.6 Kolonisationstest

10.6.1 Reisolation von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* aus Xylemsaft

- Tomatenpflanzen gut wässern.
- Tomatenpflanzen 1 cm oberhalb der Erde im Topf mit einer sterilen Schere abschneiden.
- Den austretenden Xylemsaft mit einer Pipette abnehmen und eine Verdünnungsreihe anlegen.
- Je 100 µl der entsprechenden Verdünnungsstufen auf C-Medium-Platten ausplattieren.
- 3 - 5 Tage bei 25 - 28 °C inkubieren.

10.6.2 Reisolation von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* aus Pflanzenhomogenat

- Mörser und Pistill mit 70 % Ethanol desinfizieren.
- Pflanze mit einer sterilen Schere direkt oberhalb der Erde abschneiden, wiegen, in möglichst kleine Stücke zerschneiden und in den Mörser geben.
- So viel flüssigen Stickstoff in den Mörser geben, dass alle Pflanzenteile bedeckt sind. Mit dem Pistill sorgfältig zu einem feinkörnigen Granulat zerstoßen. (Schutzbrille tragen!)
- Dem Gewicht der Pflanze entsprechenden Menge an PS-Puffer hinzugeben (1 ml PS-Puffer/1 g Frischgewicht).
- Mörsern, bis eine homogene Suspension entstanden ist.
- Verdünnungsreihe anlegen und 100 µl der ausgewählten Verdünnungsstufen auf C-Medium-Platten ausplattieren.
- 3 - 5 Tage bei 25 - 28 °C inkubieren.
- Die Zahl der Einzelkolonien ermitteln und daraus den Bakterientiter auf 1 g des ursprünglichen Pflanzengewichts bezogen errechnen.

IV Ergebnisse

IV.A Etablierung von genetischen Methoden für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

1 Elektrotransformation/Elektroporation

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Etablierung der Transposon-Mutagenese zur Identifizierung von chromosomalen Genen, die an der Bakterien-Pflanzen-Interaktion von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) und der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) beteiligt sind. Hierbei wird das Transposon mit Hilfe eines "Suicide"-Plasmids in die Zelle eingebracht. Da der Vorgang der Transposition ein statistisch sehr seltener Vorgang ist, muss die Transformationseffizienz sehr hoch sein. Mit den bisherigen Elektroporationsprotokollen (MELETZUS und EICHENLAUB, 1991; NAKHEI, 1993 und MELETZUS *et al.*, 2000) wurde die notwendige hohe Transformationseffizienz nicht erreicht und es wurden bei jedem Versuch nur wenige oder gar keine Transposon-Mutanten erhalten.

1.1 Optimierung der Elektrotransformation von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Auf die Effizienz der Elektrotransformation haben eine Reihe von Parametern einen mehr oder weniger starken Einfluss. Inwieweit bestimmte Bedingungen bei der Gewinnung und Vorbehandlung der Zellen sowie dem eigentlichen Elektroporationsvorgang die Transformationsraten bzw. -effizienz beeinflussen, kann nur empirisch ermittelt werden, da die optimalen Bedingungen von Art zu Art, tlw. von Stamm zu Stamm, unterschiedlich sein können. Als Modellplasmide in den Versuchen zur Ermittlung der Auswirkungen dieser Parameter wurden pDM302 (MELETZUS und EICHENLAUB, 1991; Abb. VII.4 im Anhang auf Seite 162) und pEC-K18*mob2* (TAUCH *et al.*, 2002; KIRCHNER und TAUCH, 2003; Abb. VII.14 im Anhang auf Seite 167) eingesetzt.

Bei pDM302 handelt es sich um einen ~13.500 bp großen *E. coli*-*Cmm*-Shuttle-Vektor. Der *Cmm*-Anteil besteht aus dem Replikon von pCM1, der *E. coli*-Anteil aus dem Replikon von pBR322. Weiterhin trägt das Plasmid Antibiotika-Resistenzgene, die sowohl in *E. coli* als auch in *Cmm* Resistenz gegen Chloramphenicol bzw. Kanamycin/Neomycin

verleihen. Hierbei handelt es sich einerseits um das *cmx*-Gen, welches für einen Chloramphenicol-Exporter (TAUCH *et al.*, 1998) kodiert, andererseits um das *aph(3')-IIa*-Gen, welches für eine Aminoglycosid-Phosphotransferase kodiert.

Zusätzlich wurde der 5694 bp große Vektor pEC-K18*mob2* verwendet, der ursprünglich als *E. coli*-*Corynebacterium*-Shuttle-Vektor konstruiert worden war. Der *E. coli*-Anteil besteht aus pK18*mob2* (TAUCH *et al.*, 1998; KIRCHNER und TAUCH, 2003), in den das Minimalreplikon von pGA2 (SONNEN *et al.*, 1991; NEŠVERA *et al.*, 1997) kloniert wurde. Das Replikon von pGA1 ist funktional in *C. glutamicum*, *C. diphtheriae* und *C. striatum* und, wie sich herausstellte, auch in *Cmm*, wobei das Plasmid in letzterem nur unter selektiven Bedingungen über mehrere Generationen erhalten bleibt (siehe auch Ergebnisse Kapitel IV A 2.3.1, Seite 74), was allerdings für die Ermittlung der Transformationseffizienz nicht relevant ist.

Es gab zu Beginn dieser Arbeit zwei Elektrottransformations-Vorschriften für *Cmm*: die ursprüngliche von MELETZUS und EICHENLAUB (1991) beschriebene Methode, sowie eine modifizierte nach NAKHEI (1993) bzw. MELETZUS *et al.* (2000), die eine zusätzliche Lysozym-Behandlung beinhaltet, welche die Zellwand von *Cmm* auflockert. Die damit erreichbare Transformationseffizienz lag unter 10^4 Transformanten pro μg homologer DNA und war für die Elektroporation zur Transposon-Mutagenese bzw. Integrationsmutagenese nicht ausreichend. In den Elektroporations-Versuchen wurde immer 1 μg Plasmid DNA eingesetzt, außer bei denen zur Bestimmung des Einflusses der DNA-Menge auf die Anzahl der Transformanten. Korrekterweise sollte bei der Anzahl von Transformanten bzw. bei der Ermittlung des Lebendtiters bei *Cmm* durch Ausplattieren generell von koloniebildenden Einheiten (cfu: "colony forming units") gesprochen werden, da *Cmm*, besonders in der logarithmischen Wachstumsphase, dazu neigt, Aggregate zu bilden. Eine Einzelkolonie kann also auch aus einem Aggregat von Zellen entstanden sein.

Im Folgenden werden die näher untersuchten Parameter und ihr Einfluss auf die Elektroporation von *Cmm* dargestellt. Bei der Optimierung der Elektroporation und der Etablierung eines Transposon-Mutagenese-Systems für *Cmm* (siehe Ergebnisse Kapitel IV A 1.3, Seite 61) handelte es sich um zwei parallel laufende Versuchsreihen, die meist ineinander verzahnt abliefen und deren Ergebnisse einander bedingten. Bei der Darstellung lassen sich folglich gewisse Vorausgriffe und Verweise nicht vermeiden.

1.1.1 Hitzeschock-Behandlung

Bei der Elektrotransformation von *C. glutamicum* (KIRCHNER, 1999; VAN DER REST *et al.*, 1999) und *C. diphtheriae* (TAUCH *et al.*, 2002; KIRCHNER und TAUCH, 2003) hatte sich ein Hitzeschock von 46 °C für 6 Minuten direkt nach der dem Elektroporations-Puls und vor der Regeneration der Zellen als sehr wirksame Methode zur Erhöhung der Transformationseffizienz herausgestellt. Hierbei handelt es sich nicht um eine Hitzeinaktivierung des Restriktionssystems, wie von SCHÄFER *et al.* (1990, 1994) angenommen, da der Effekt in gleicher Stärke auch in dem restriktionsnegativen Stamm *C. glutamicum* RES167 auftritt (KIRCHNER, 1999; TAUCH *et al.*, 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden elektrokompetente Zellen von *Cmm* nach der bisher üblichen Methode von NAKHEI/MELETZUS *et al.* (1993/2000) hergestellt, mit pDM302 elektroporiert und direkt anschließend für 6 Minuten in einem Wasserbad verschiedenen Temperaturen ausgesetzt, und zwar dem normalen Temperaturoptimum für *Cmm* von 25 °C, sowie 33 °C, 36 °C, 39 °C und 42 °C. Danach wurden die Zellen für zwei Stunden bei 25°C regeneriert. Der Überlebensfaktor wurde durch Ausplattieren entsprechender Verdünnungsstufen auf SB-Medium ohne Antibiotikum ermittelt, während die Anzahl der Transformanten auf SB-Medium bzw. TBY-Medium mit 50 µg/ml Neomycin bestimmt wurde, um gleichzeitig zu überprüfen, inwieweit das Regenerationsmedium einen Einfluss auf die Anzahl der Transformanten hat. Die Ergebnisse sind in Abb. IV.1 und Abb. IV.2 dargestellt. Interessanterweise scheint der Hitzeschock keine signifikanten Auswirkungen auf die Überlebensrate von *Cmm* zu haben, jedoch verringert sich die Anzahl der Transformanten mit steigender Temperatur kontinuierlich. Außerdem zeigte sich, dass das SB-Medium deutlich besser zur Regeneration der durch die Elektroporation stark gestressten Zellen von *Cmm* geeignet ist, als TBY. Da ein Hitzeschock der Zellen nach dem Abernten und vor der Aufarbeitung für die Elektroporation, wie von SCHÄFER *et al.* (1990, 1994) für *C. glutamicum* beschrieben, ebenfalls keinen positiven Effekt hatte (D. MELETZUS, persönliche Mitteilung), erschien es nicht wahrscheinlich, dass weitere Experimente mit Hitzeschockbehandlungen zu einer Erhöhung der Transformationseffizienz führen würden.

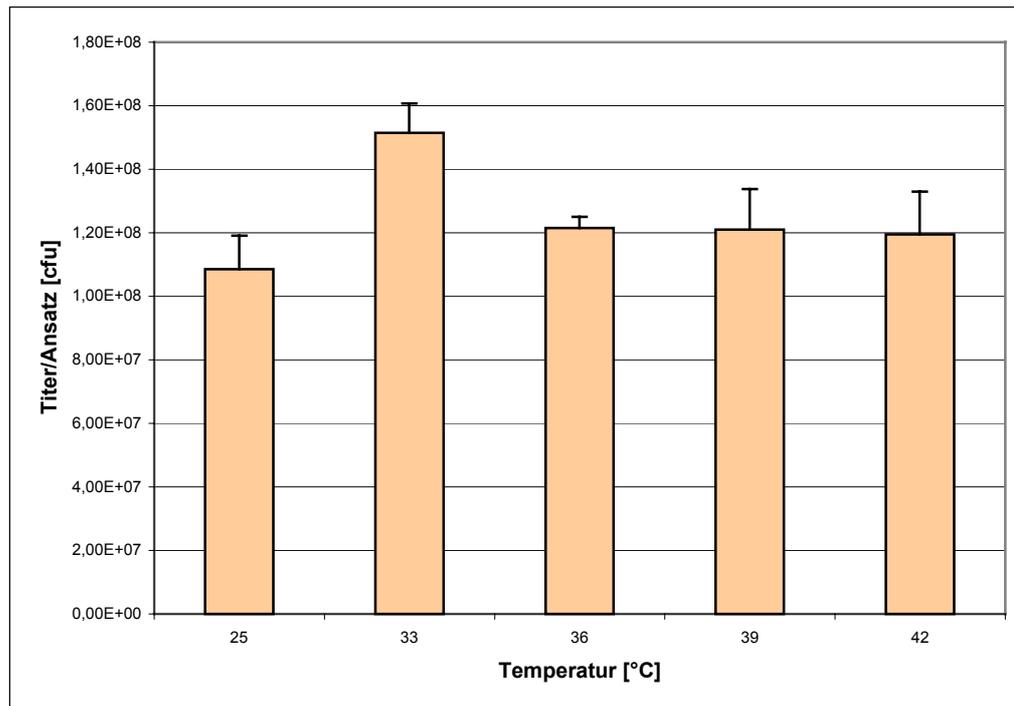


Abb. IV.1: Titer der überlebenden Zellen von *Cmm* nach der Elektroporation in Abhängigkeit von einem direkt nach der Elektroporation folgenden Hitzeschock mit unterschiedlichen Temperaturen (33, 36, 39, und 42 °C, sowie der normalen Regenerationstemperatur von 25 °C).

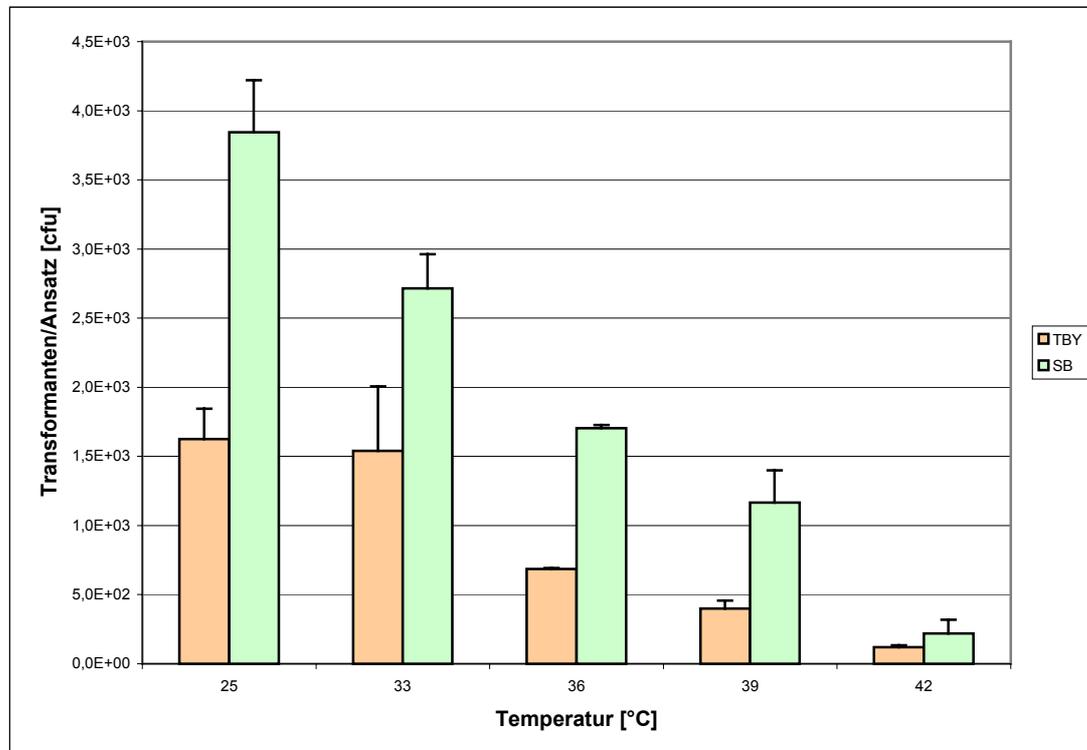


Abb. IV.2: Titer der transformierten überlebenden Zellen von *Cmm* (pro Ansatz) nach der Elektroporation mit pDM302 in Abhängigkeit von einem direkt nach der Elektroporation folgenden Hitzeschock mit unterschiedlichen Temperaturen (33, 36, 39, 42 °C und der normalen Regenerationstemperatur von 25 °C), sowie auf den beiden Regenerationsmedien TBY und SB.

1.1.2 Verwendung von Glycin, einer zellwandschädigenden Substanz, bei der Anzucht der Zellen

In der Literatur sind mehrere Methoden zur Auflockerung der Zellwand beschrieben worden, die bei Gram-positiven Bakterien die Transformationseffizienz deutlich verbessern. Zu diesen Methoden gehören die Behandlung der Zellen nach der Anzucht mit Lysozym, das den Mureinsacculus partiell hydrolysiert (LAINE *et al.*, 1996; MELETZUS *et al.*, 2000). Weiterhin konnte z. B. für *C. glutamicum* gezeigt werden, dass der Zusatz von Penicillin G während der Anzucht die Transformationseffizienz ebenfalls steigern kann (KURUSU *et al.*, 1989).

Aufgrund der Probleme bei der Reproduzierbarkeit der Lysozymbehandlung des bisher verwendeten Protokolls (LAINE *et al.*, 1996; MELETZUS *et al.*, 2000) und des nicht unerheblichen Kontaminationsrisikos durch das nicht autoklavierbare Lysozym wurde nach anderen Methoden zur Auflockerung der Zellwand gesucht. Es ist schon lange bekannt, dass die Aminosäure Glycin in unphysiologisch hoher Konzentration (0,5 - 5 % [w/v]) den korrekten Aufbau der Zellwand bei vielen, insbesondere Gram-positiven Bakterienarten verhindert. Bereits 1973 wurden von HAMMERS *et al.* Untersuchungen zur Veränderung der Zellwand von Gram-positiven Bakterien veröffentlicht, in denen beschrieben wird, dass Glycin auf vielfältigen Wegen die Quervernetzung des Mureinsacculus verhindert, z. B. durch den Einbau von Glycin anstatt von D-Alanin. Dieses Erkenntnis wurde für *C. glutamicum* von HAYNES und BRITZ (1989, 1990) in ein verbessertes Elektroporationsprotokoll für dieses Bakterium umgesetzt, in Kombination mit der Verwendung von Isonikotinsäure-Hydrazid bzw. Tween 80, welche die Zusammensetzung bzw. Länge der Mykolsäuren bei *Corynebacterium* verändern (CHEVALIER *et al.*, 1988). Da *Cmm* jedoch keine Mykolsäuren in der Zellmembran besitzt, wurden diese Substanzen nicht getestet.

Zellen von *Cmm* aus einer über Nacht in TBY angezogenen Vorkultur wurden auf eine o.D.₅₈₀ von 0,3 verdünnt und bei 28 °C bis zu einer o.D.₅₈₀ von 0,6 unter Schütteln inkubiert. Danach wurden sie für zwei Stunden mit verschiedenen Glycinkonzentrationen (0,625; 1,25; 2,5 und 5 % Glycin [w/v] Endkonzentration) bei 28 °C inkubiert und dann gewaschen, um sie von Glycin und Salzen zu befreien (genaue Auflistung der Waschschritte siehe endgültiges Protokoll, Ergebnisse Kapitel IV A 1.2.1, Seite 59). Nach der Elektroporation mit 1 µg Plasmid DNA wurden die Zellen sofort in 400 µl SB-Medium resuspendiert und für zwei Stunden bei 25 °C inkubiert, um eine Etablierung des eingebrachten Plasmides und die Expression der Resistenzgene zu ermöglichen. Vorherige Tests

hatten gezeigt, dass eine Verlängerung der Regenerationszeit auf bis zu vier Stunden keine Auswirkung auf die Transformationsrate/Überlebensrate hat (Daten nicht aufgeführt), wie auch schon von LAINE *et al.* (1996) für *Cms* beschrieben. Die Zellen wurden dann in entsprechenden Verdünnungsstufen auf SB-Medium mit 50 µg/ml Neomycin ausplattiert und für 4 - 6 Tage bei 28 °C bebrütet.

Die Ergebnisse sind in Abb. IV.3 für Versuche mit dem Plasmid pEC-K18*mob2* zusammengefasst. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich bis zu einer Glycinkonzentration von 2,5 % die Transformationseffizienz erhöht und danach gleich. Der höchste zu beobachtende Wert ist mit ca. $1,5 \cdot 10^6$ cfu/µg DNA (2,5 % Glycin [w/v], 600 Ω) um mehr als den Faktor 100 höher als alle bisher erreichten Transformationsraten für *Cmm*. Überraschenderweise wirkt sich die Glycinbehandlung nicht negativ auf die Überlebensrate bei der Elektroporation aus. Etwa 88 % der $5 \cdot 10^9$ pro Elektroporationsexperiment eingesetzten Zellen (im endgültigen Protokoll, 2,5 % Glycin [w/v], 600 Ω) überleben den elektrischen Puls und wachsen auf SB-Medium wieder an. Mit der Glycinbehandlung ist ein essentiell wichtiger Parameter für die effektive Elektrotransformation in *Cmm* gefunden. Folglich wird in dem endgültigen Protokoll eine Glycinkonzentration von 2,5 % [w/v] verwendet.

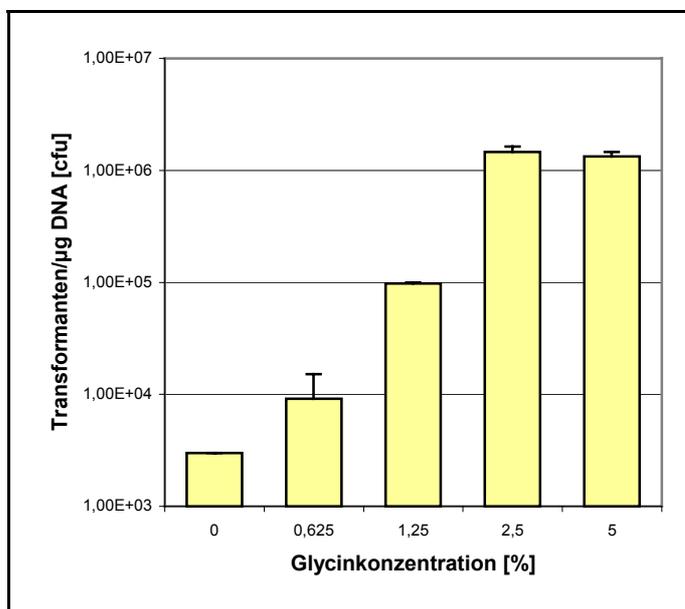


Abb. IV.3: Titer der transformierten Zellen von *Cmm* (pro µg DNA) nach der Elektroporation mit pEC-K18*mob2* (Elektroporationsbedingungen siehe Text) in Abhängigkeit von der Glycinkonzentration (0; 0,625; 1,25; 2,5 und 5 % [w/v]) während der Aufarbeitung. Ordinate in logarithmischer Skalierung.

1.1.3 Elektrische Parameter

Bei den Versuchen zur Elektrotransformation wurde der "Gene Pulser" mit "Pulse Controller" von der Fa. Biorad verwendet. Bei diesem Gerät lassen sich Kapazität des Kondensators und die Feldstärke der Entladung direkt einstellen, sowie die Dauer des Impulses indirekt durch die Wahl des Parallelwiderstandes. Letzterer bestimmt, welcher Anteil des Pulses über einen Parallelwiderstand an der Küvette vorbeigeführt wird. Nach dem Ohm'schen Gesetz ergibt sich damit ein geringerer Gesamtwiderstand. Bei dem "Pulse Controller" von Biorad lassen sich die Werte 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 Ω und ∞ einstellen.

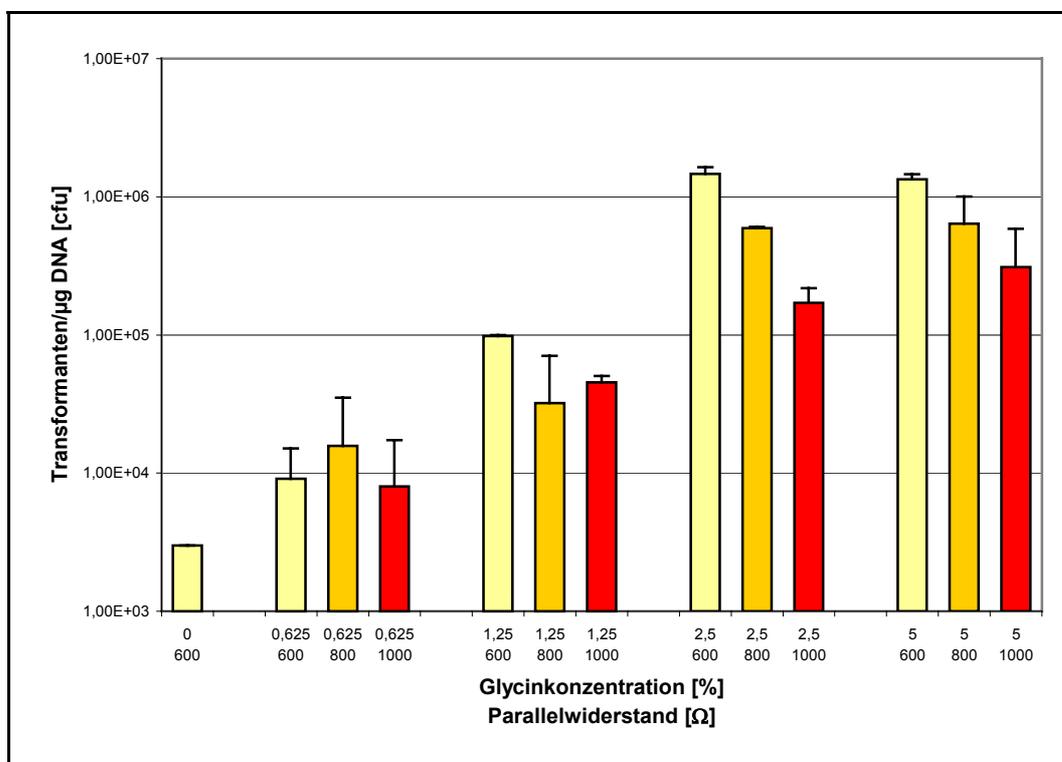


Abb. IV.4: Titer der transformierten Zellen von *Cmm* (pro μ g DNA) nach der Elektroporation von pEC-K18*mob2* (Elektroporationsbedingungen siehe Text) in Abhängigkeit von der Glycinkonzentration (0; 0,625; 1,25; 2,5 und 5 % [w/v]) während der Aufarbeitung und dem Parallelwiderstand (600, 800 und 1000 Ω) während des Pulses. Ordinate in logarithmischer Skalierung.

Für *Cmm* und coryneforme Bakterien hatte sich früher bereits gezeigt, dass mit dem größten vom Gerät verwendbaren Kondensator (25 μ F) und der maximalen Spannung (12,5 kV/cm) die besten Ergebnisse erzielt werden konnten (MELETZUS und EICHENLAUB, 1991). Bei *Cmm* hatten sich generell hohe Parallelwiderstände, die mehr Energie durch die Küvette leiten, als positiv herausgestellt, sodass die Einstellungen 600, 800 und 1000 Ω gewählt wurden. Mit 600 Ω sind die höchsten Transformationsraten zu erreichen, wie in

Abb. IV.4 zu erkennen ist. Die Zeitkonstanten lagen generell bei > 13 ms. Unter optimalen Bedingungen sollten sie zwischen 15 und 18 ms liegen. Der Einfluss des Parallelwiderstands ist zwar nicht ganz so groß, wie der der Glycin-Konzentration, doch nicht unerheblich (vergl. Abb. IV.4). Folglich wurde für das endgültige Protokoll ein Parallelwiderstand von 600Ω gewählt.

1.1.4 Methylierung der eingesetzten DNA

Jede Bakterienart versieht ihre DNA mit einem bestimmten Methylierungsmuster. Dies dient zum einen zur Unterscheidung zwischen Original- und Tochterstrang bei der DNA-Replikation und -Reparatur, sowie der Erkennung von Fremd-DNA. DNA mit einem anderen Methylierungsmuster wird durch zelleigene Restriktionsenzyme abgebaut, sodass das Einbringen von Fremd-DNA in eine Spezies mit starkem Restriktionssystem oft sehr ineffektiv oder praktisch ganz unmöglich ist (vergl. z. B. VERTES *et al.*, 1993). Für *E. coli* sind sowohl Restriktionsendonukleasen bekannt, die nur unmethylierte DNA spalten (die von den *hsdRMS*-Genen kodierte *EcoKI*-Restriktionsendonuklease) (BICKLE, 1993) als auch solche, die nur auf eine bestimmte Art methylierte DNA spalten. Hierzu gehören die McrA-, McrBC-, und Mrr-Systeme (RALEIGH und WILSON, 1986; HEITMANN *et al.*, 1987; KELLEHER und RALEIGH, 1991; WAITE-REES *et al.*, 1991; RALEIGH, 1992; SUTHERLAND *et al.*, 1992).

Es existieren bisher keine restriktionsnegativen Stämme von *Cmm* und über das eigene Methylierungsmuster sowie die eventuell als fremd erkannten Methylierungsmuster ist nichts bekannt. Man behilft sich in solchen Fällen oft damit, dass nicht methylierte DNA oder *in vitro* per PCR amplifizierte DNA eingebracht wird (ANKRI *et al.*, 1996). Diese enthält zwar ebenfalls nicht das passende Methylierungsmuster, aber auch kein fremdes, welches von dem Restriktionssystem erkannt wird. Zur Ermittlung, ob mit nicht methylierter DNA die Transformationseffizienz noch zu steigern ist, wurde die Plasmid-DNA sowohl aus *E. coli* DH5 α MCR (*dam*⁺/*dcm*⁺) als auch aus *E. coli* WA337 (*dam*⁻/*dcm*⁻) isoliert und nach *Cmm* mit dem optimierten Protokoll elektroporiert. *E. coli* WA337 führt weder eine Dam- ($\text{GA}^{\text{CH}_3}\text{TC}$) noch eine Dcm-Methylierung ($\text{CC}^{\text{CH}_3}\text{AGG}$ und $\text{CC}^{\text{CH}_3}\text{TGG}$) durch, die durch die *EcoKI*-Methylase (*hsdRMS*) katalysierte Methylierung ($\text{AAC}^{\text{CH}_3}\text{GTGC}$ und $\text{GCAC}^{\text{CH}_3}\text{GTT}$) fehlt beiden Stämmen. Mit Hilfe von nicht methylierter DNA lässt sich die Transformationseffizienz noch einmal etwa um den Faktor vier steigern, wie in Abb. IV.5

gut zu erkennen, sodass bei der Elektroporation von *Cmm* möglichst nicht methylierte DNA verwendet werden sollte.

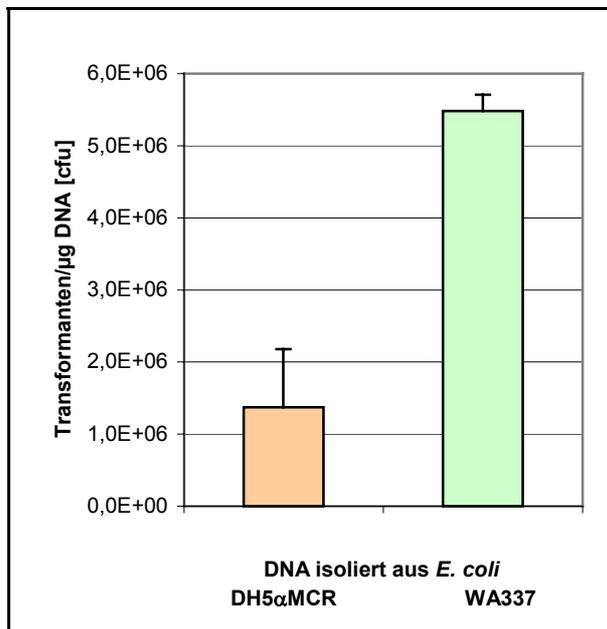


Abb. IV.5: Einfluss der Methylierung auf die Transformationseffizienz. Titer der transformierten Zellen von *Cmm* (pro µg DNA) nach der Elektroporation von pEC-K18*mob2* (Elektroporationsbedingungen siehe Text) mit DNA isoliert aus den beiden *E. coli*-Stämmen DH5αMCR (*dam*⁺/*dcm*⁺) und WA337 (*dam*⁻/*dcm*⁻).

1.1.5 Eingesetzte DNA-Menge

Generell ist bei der Elektrotransformation mit steigender Menge an DNA eine Sättigung der Anzahl der Transformanten zu beobachten. Dies wurde schon bereits mehrfach von diversen Autoren für die verwandte Art *C. glutamicum* beschrieben (z. B. DUNICAN und SHIVNAN, 1989; WOLF *et al.*, 1989; KURUSU *et al.*, 1990; SATOH *et al.*, 1990; HAYNES und BRITZ, 1990), ebenso wie für *Cmm* (MELETZUS und EICHENLAUB, 1991) und *Cms* (LAINE *et al.*, 1996). Die Angaben zur optimalen DNA-Menge variieren aber relativ stark, deshalb wurde mit dem neu etablierten Protokoll erneut überprüft, welche DNA-Menge die optimale zur Elektrotransformation von *Cmm* ist. Wie zu erwarten, steigt die Anzahl der Transformanten pro Elektroporationsexperiment mit zunehmender DNA-Menge an, jedoch nicht linear, über 1 µg eingesetzter DNA sinkt sie sogar wieder leicht (Abb. IV.6). Die Transformationsrate pro µg DNA steigt demgegenüber bis 0,1 µg an, danach sinkt sie wieder (Abb. IV.7). Da die Anzahl der Transformanten allerdings wichtiger ist als die Transformationsrate und die verfügbare Menge an DNA normalerweise nicht limitierend ist, wurde immer 1 µg DNA zur Elektroporation eingesetzt.

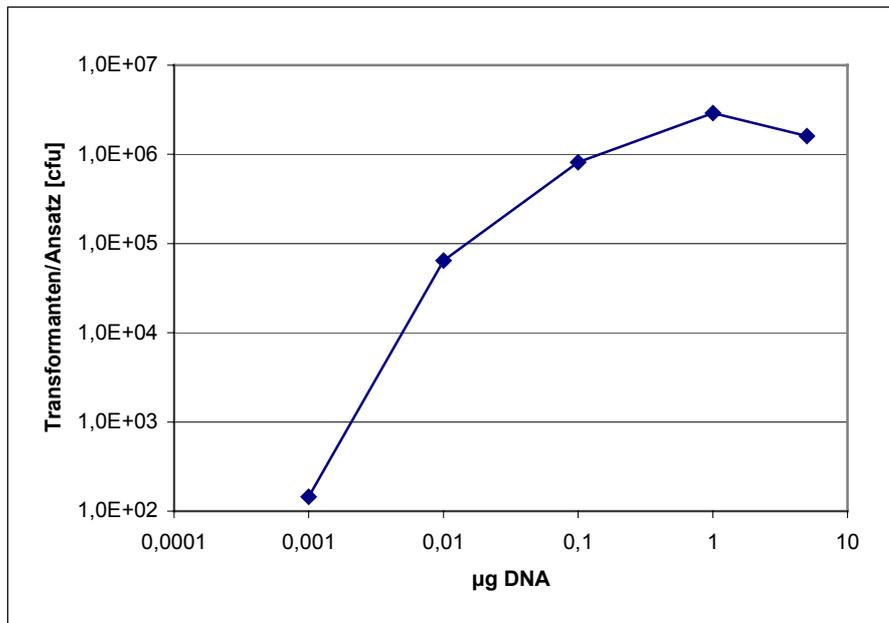


Abb. IV.6: Titer der transformierten Zellen von *Cmm* (pro Ansatz) nach der Elektroporation von pEC-K18*mob2* (Elektroporationsbedingungen siehe Text) in Abhängigkeit der pro Ansatz eingesetzten DNA-Menge. Abszisse und Ordinate in logarithmischer Teilung.

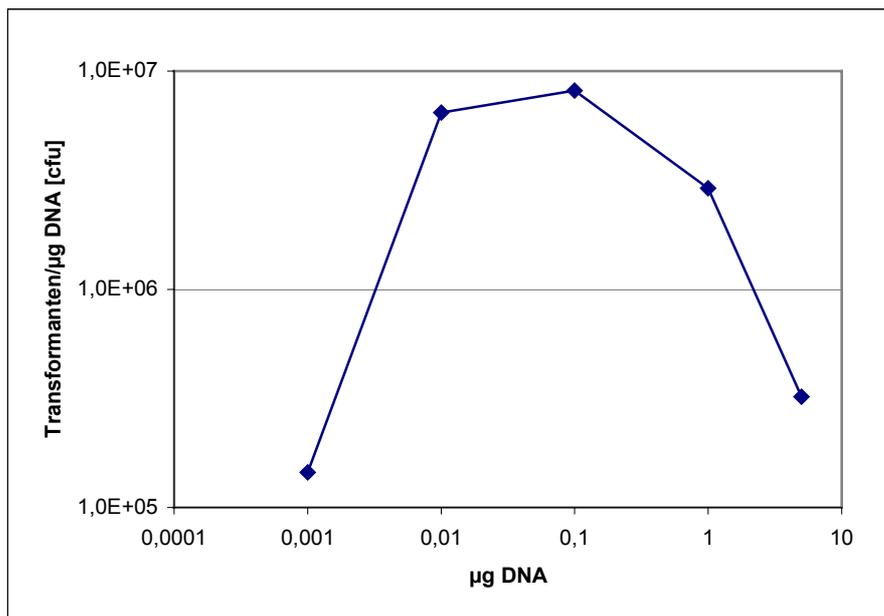


Abb. IV.7: Titer der transformierten Zellen von *Cmm* (pro µg DNA) nach der Elektroporation von pEC-K18*mob2* (Elektroporationsbedingungen siehe Text) in Abhängigkeit der pro Ansatz eingesetzten DNA-Menge. Abszisse und Ordinate in logarithmischer Teilung.

1.1.6 Einfluss der Lagerung von elektrokompetenten Zellen

Ein sehr entscheidender Faktor für eine effiziente Elektrottransformation von *Cmm* ist die Verwendung frisch hergestellter elektrokompetenter Zellen. Nach der Aufarbeitung der Zellen sollten sie möglichst bald verwendet, bis dahin auf Eis gelagert, aber nicht eingefroren werden. Aufgrund der langen Zeit für die Anzucht/Aufarbeitung und die ebenfalls lange Prozedur der Regeneration nach der Elektroporation ist die Durchführung aller Schritte an einem Tag wenig praktikabel. Ohne eine Reduktion der Transformationseffizienz können die Zellen in einer verschließbaren Styroporbox im Kühlraum/Kühlschrank über Nacht auf Eis gelagert und am nächsten Tag elektroporiert werden. Die Zellen können auch bei -80 °C eingefroren werden, wenn sie z. B. nur dafür verwendet werden sollen, ein replizierendes Plasmid zu elektroporieren. Die Effizienz sinkt dabei aber auf 20 - 10 % des mit frischen Zellen erreichbaren Wertes und ist für die Transposon-Mutagenese oder "gene-disruption"- bzw. "gene-replacement"-Experimente dann zu gering. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich darauf, dass die Zellsuspension bei -80 °C (auch bereits bei -20 °C) komplett durchfriert und die sich bildenden Eiskristalle einen großen Teil der Zellen zerstören. In deutlich schwächerer Ausprägung ist dieser Effekt z. B. auch bei *C. glutamicum* zu beobachten (KIRCHNER, 1999). Eine Zugabe einer größeren Glycerinmenge, die das Durchfrieren verhindern könnte, wirkt sich aber wieder negativ auf die Elektroporation aus, da sich der Widerstand der eingesetzten Suspension deutlich erhöht und dadurch die Effizienz durch eine stärkere Erhitzung sinkt.

1.2 Optimiertes Elektroporationsprotokoll für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Unter Einbeziehung aller untersuchten Parameter konnte ein neues, optimiertes Elektroporationsprotokoll für *Cmm* entwickelt werden. Die genaue Versuchsvorschrift ist unter 1.2.1 aufgeführt. Der mit Abstand wichtigste Faktor ist die Auflockerung des Mureinsacculus durch eine zweistündige Behandlung mit 2,5 % [w/v] Glycin. Wichtig sind weiterhin das Abernten der Zellen in der frühen bis mittleren logarithmischen Wachstumsphase, eine möglichst hohe Zelldichte im Ansatz, die elektrischen Parameter und die Nutzung nicht methylierter DNA. Die Transformationsrate konnte etwa um den Faktor 1000 auf ca.

$5 \cdot 10^6$ Transformanten/ μg Plasmid-DNA gegenüber dem Protokoll von NAKHEI/MELETZUS *et al.* (1993/2000) gesteigert werden.

An dieser Stelle ist noch zu erwähnen, dass bei der Elektroporation von *Cmm* das große endogene Plasmid (pCM2) in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle verloren geht, wie später im Verlauf der Charakterisierung von Transposon-Mutanten, die eine veränderte Virulenz besitzen, entdeckt wurde. Es ist nicht ganz klar, bei welchem Schritt im Laufe der Aufarbeitung/Regeneration oder dem eigentlichen elektrischen Puls das Plasmid verloren geht, jedoch ist in der Literatur z. B. für *E. coli* beschrieben worden, dass ein Plasmidcuring durch Elektroporation möglich ist (HEERY *et al.*, 1989).

1.2.1 Versuchsvorschrift für die Elektroporation von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Elektroporation nach *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

(KIRCHNER *et al.*, 2001)

Vorbereitung der *Cmm*-Zellen

Zum Animpfen der Vorkultur sollte eine frisch bebrütete und gut bewachsene Platte von *Cmm* genutzt werden. Ein Animpfen direkt aus einer Glycerinkultur ist prinzipiell möglich, dann muss aber mit mind. zwei Tagen zum Anwachsen gerechnet werden.

Vorkultur:

benötigte Materialien:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ frisch bebrütete Platte mit <i>Cmm</i> ▪ 500 ml TBV-Medium ▪ 2 sterile 1000 ml Erlenmeyerkolben
------------------------	---

- *Cmm*-Vorkultur dick in 2 x je 250 ml TBV-Medium animpfen (2 x 1000 ml Kolben) und über Nacht bei 25 - 28 °C im Schüttler (140 U/min) inkubieren.

Hauptkultur/Herstellung der kompetenten Zellen:

(In Abhängigkeit der benötigten Menge an kompetenten Zellen kann auch ein doppelter oder dreifacher Ansatz bearbeitet werden)

benötigte Materialien:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 500 ml frisches TBV-Medium ▪ 50 ml 20 %ige [w/v] Glycin-Lösung ▪ 250 ml Millipore-H₂O ▪ 250 ml 10 %iges [v/v] Glyzerin in Millipore-H₂O ▪ 150 ml 15 %iges [v/v] Glyzerin ▪ 2 sterile 1000 ml Erlenmeyerkolben ▪ Rotor A6.9 (für Centrikon H-401 Kühlzentrifuge der Fa. Kontron) ▪ Rotor A8.24 (für Centrikon H-401 Kühlzentrifuge der Fa. Kontron) ▪ 2 sterile 500 ml Zentrifugenbecher, 2 sterile 40 ml Zentrifugenbecher ▪ 15 sterile Eppendorfgefäße
------------------------	--

- o.D.₅₈₀ der Vorkultur messen (sollte zw. 1,0 und 2,0 liegen).
- Auf eine o.D.₅₈₀ von 0,3 mit frischem TBY verdünnen.
- 2 x 218,5 ml der Bakteriensuspension in je einen 1000 ml Kolben überführen und bei 25 - 28 °C im Schüttler (140 U/min) bis zu einer O.D.₅₈₀ von 0,6 inkubieren (ca. 2 Stunden).
- Zu jedem Kolben 31,5 ml 20 % Glycin hinzugeben (ergibt eine Endkonzentration von 2,5 % [w/v]) und bei 25 - 28 °C im Schüttler (140 U/min) 2 Stunden inkubieren.

Alle folgenden Schritte werden bei 0 °C durchgeführt. Die Zentrifugationsschritte in der Kühlzentrifuge bei 4 °C. Die Lösungen müssen vorgekühlt sein!

- Die Kultur von den Kolben in jeweils einen sterilen, vorgekühlten 500 ml Zentrifugenbecher überführen.
- Mit 8500 x g für 15 min im Rotor A6.9 bei 4 °C abzentrifugieren. Überstand restlos abziehen.
- Pellet in je 5 ml eiskaltem Millipore-H₂O resuspendieren und in sterile, vorgekühlte 40 ml Zentrifugenbecher überführen; 25 ml eiskaltes Millipore-H₂O hinzufügen, gründlich mischen.
- Mit 7500 x g im Rotor A8.24 bei 4 °C für 10 min abzentrifugieren. Überstand restlos abziehen.
- Folgende Schritte zweimal durchführen:
 - Pellet in 2 ml eiskaltem Millipore-H₂O resuspendieren.*
 - 25 ml eiskaltes Millipore-H₂O hinzufügen, gründlich mischen.*
 - Mit 7500 x g im Rotor A8.24 bei 4 °C für 10 min abzentrifugieren. Überstand restlos abziehen.
- Folgende Schritte zweimal durchführen:
 - Pellet in 2 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin resuspendieren.*
 - 25 ml eiskaltes 10 %iges Glycerin hinzufügen, gründlich mischen.*
 - Mit 7500 x g im Rotor A8.24 bei 4 °C für 10 min abzentrifugieren. Überstand restlos abziehen.
- Pellet in jedem der beiden Zentrifugenröhrchen in 0,5 ml eiskaltem 15 %igem Glycerin resuspendieren, Aliquots von 100 µl in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführen (ergibt ca. 10 - 15 Aliquots). Kompetente Zellen auf Eis stellen oder bei -80°C einfrieren.

*: Bei der direkten Zugabe der gesamten Flüssigkeitsmenge löst sich das Pellet nur extrem langsam.

Elektroporation der *Cmm*-Zellen

benötigte Materialien pro Ansatz:	<ul style="list-style-type: none"> ■ Elektroporationsküvette (0,2 cm Elektrodenabstand) ■ Eppendorfgefäß mit kompetenten Zellen ■ DNA ■ 400 µl SB-Medium ■ SB-Platten zur Selektion
-----------------------------------	--

- Ein Eppendorfgefäß mit 400 µl SB-Medium befüllen.
- Kompetente Zellen auf Eis auftauen.
- 0,1 - 10 µg DNA hinzufügen.
- Suspension 2 - 3 mal auf- und abpipettieren, ganz nach unten in eine 0,2 cm Elektroporationsküvette geben.
- 150 µl SB-Medium in einer gelben Spitze aufnehmen.
- Küvette sehr gut abtrocknen, in die Halterung stecken und einen Puls mit **12,5 kV/cm** (= 2,5 kV bei 0,2 cm Küvette), **25 µF** und **600 Ω** auslösen. (Die Zeitkonstante sollte zwischen 12 und 16 ms liegen.)
- Nach dem Puls sofort die 150 µl SB-Medium in die Küvette geben, 2 - 3 mal auf- und abpipettieren und den Elektroporationsansatz in die restlichen 250 µl SB-Medium im Eppendorfgefäß überführen, mischen.
- Für 3 Stunden bei 25 - 28 °C im Brutschrank regenerieren.
- Auf mind. 3 Platten mit SB-Selektionsmedium ausplattieren. 4 - 6 Tage bei 25 - 28 °C im Brutschrank bebrüten.

1.3 Etablierung der Transposon-Mutagenese für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

1.3.1 Voraussetzungen/Vorarbeiten

Eine Grundvoraussetzung für eine effiziente Transposon-Mutagenese konnte mit der Etablierung eines verbesserten Elektroporationsprotokolls gelegt werden. Transposons werden meist auf so genannten „Suicide“-Plasmiden eingebracht, die in der Rezipientenzelle nicht replizieren können. Folglich können die auf dem Transposon kodierten Resistenzgene nur dann an die Tochterzellen weitergegeben werden, wenn das Transposon in das Genom des Rezipienten transponiert und mit ihm repliziert wird. Die Frequenz, mit der ein Transposon das Genom des Wirts integriert, ist je nach IS-Element/Transposon sehr unterschiedlich, liegt aber oft im Bereich zwischen 10^{-4} und 10^{-7} . Dementsprechend hoch muss die Zahl der in den Rezipienten z. B. per Elektroporation eingebrachten "Suicide"-Plasmide sein, damit eine ausreichende Anzahl an Transformanten erreicht werden kann. Die Transposons Tn1409C α und Tn1409C β (GARTEMANN und EICHENLAUB, 2001) sollten in *Cmm* getestet werden. Für die Versuche zur Transposon-Mutagenese von *Clavibacter* wurden die Plasmide pKGT452C α und pKGT452C β verwendet (Karten siehe Abb. VII.9, Seite 164 im Anhang). Hierbei handelt es sich um den Vektor pUC13, in den Tn1409C kloniert wurde. Das *cmx*-Gen, welches Resistenz gegen Chloramphenicol verleiht, liegt in Tn1409C α und Tn1409C β relativ zum *tnpA*-Gen in beiden möglichen Orientierungen vor (α in gleicher Orientierung, β in entgegengesetzter Orientierung) (vergl. Abb. II.7 in der Einleitung, Seite 15). Die Transpositionsfrequenz von IS1409 (siehe Abb. II.6 in der Einleitung, Seite 15) bzw. den von ihm abstammenden artifiziiellen Transposons Tn1409C (Abb. II.7 in der Einleitung, Seite 15) ist nicht bekannt. Bei der Elektroporation von *Arthrobacter* wurden pro eingesetztem 1 μ g DNA ca. 10^3 Transformanten erhalten.

1.3.2 Transposon-Mutagenese von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Vortests mittels Southern-Hybridisierung von K.-H. GARTEMANN (1999) hatten gezeigt, dass in *Cmm* und den anderen *Clavibacter michiganensis*-Subspezies keine zu IS1409 homologen IS-Elemente vorhanden sind, Tn1409 also generell für eine Anwendung in *Cmm* geeignet sein könnte. Mit dem neuen Elektroporationsprotokoll und der Verwendung

von 1 µg nicht methylierter DNA des Transposon-Mutageneseplasmids pKGT452Cβ konnten in *Cmm* 500 - 1000 chloramphenicolresistente Kolonien pro µg DNA erhalten werden. Bei der Verwendung von pKGT452Cα wurden etwa 1/40 der Menge an resistenten Kolonien erhalten, was darauf schließen lässt, dass der *cmx*-Promotor in der α-Orientierung zu einer Verstärkung der Transposase-Expression führt und so die Transpositionsfrequenz erhöht, wie von GARTEMANN und EICHENLAUB (2001) bereits in schwächerer Ausprägung für *Arthrobacter* beschrieben wurde. Bei allen diesen Experimenten zur Transposition lagen die erreichbaren Werte mit methylierter heterologer DNA ebenfalls etwa um den Faktor vier niedriger als mit nicht methylierter DNA.

Mittels Southern-Hybridisierung von Gesamt-DNA der erhaltenen chloramphenicolresistenten Zellen sollte geprüft werden, ob sie durch Transposition von Tn1409Cβ entstanden waren oder durch andere Ereignisse. Dazu wurde von 75 zufällig ausgesuchten chloramphenicolresistenten Klonen Gesamt-DNA isoliert und mit *Bam*HI sowie mit *Nco*I gespalten. Als Sonde für das *cmx*-Gen diente das Digoxigenin-11-dUTP-markierte 2035 bp große *Bgl*III/*Sph*I-Fragment aus pKGT452Cβ, das das *cmx*-Gen vollständig überspannt, ohne einen Vektoranteil von pUC13 zu besitzen (siehe Abb. IV.8 A). Die Sonde gegen das *tnpA*-Gen bestand aus den beiden Digoxigenin-11-dUTP-markierten 864 bp und 869 bp großen *Bam*HI-Fragmenten aus pKGT452Cβ (siehe Abb. IV.8 B).

Mit *Bam*HI gespaltene Gesamt-DNA der 75 potentiellen Transposon-Mutanten wurde nun gegen die *cmx*-Sonde, die mit *Nco*I gespaltene Gesamt-DNA gegen die *tnpA*-Sonde hybridisiert. Zur Kontrolle wurden alle Klone gegen eine pUC13-Sonde hybridisiert. Bei Transformanten, die über Transposition entstanden sind, sollte pUC13 nicht nachweisbar sein. Dies war bis auf zwei Ausnahmen der Fall (Daten nicht gezeigt). Das resultierende Bandenmuster für 25 der 75 getesteten Klone gegen die *cmx*-Sonde ist in Abb. IV.9 exemplarisch gezeigt. Bei einer korrekt verlaufenen Transposition wird mit der *cmx*-Sonde genau ein hybridisierendes Fragment erwartet, welches 1988 bp groß oder größer ist. Dies trifft auf alle Klone zu, bis auf den in Spur 23, welcher zwei hybridisierende Fragmente zeigt. Da hier eine 4664 bp große Bande mit der pUC13-Sonde auftritt (Daten nicht gezeigt), handelt es sich wahrscheinlich um ein nicht aufgelöstes Cointegrat. Unter den 75 getesteten Klonen trat ein weiteres Cointegrat auf, sowie zwei Klone mit zwei Banden mit der *cmx*-Sonde, aber keiner mit der pUC13-Sonde, sodass man hier eine doppelte Transposition annehmen kann. Da alle auftretenden hybridisierenden Banden eine unterschiedliche Größe besitzen, scheint Tn1409 in zufällige Bereiche im Chromosom von *Cmm* zu inserieren.

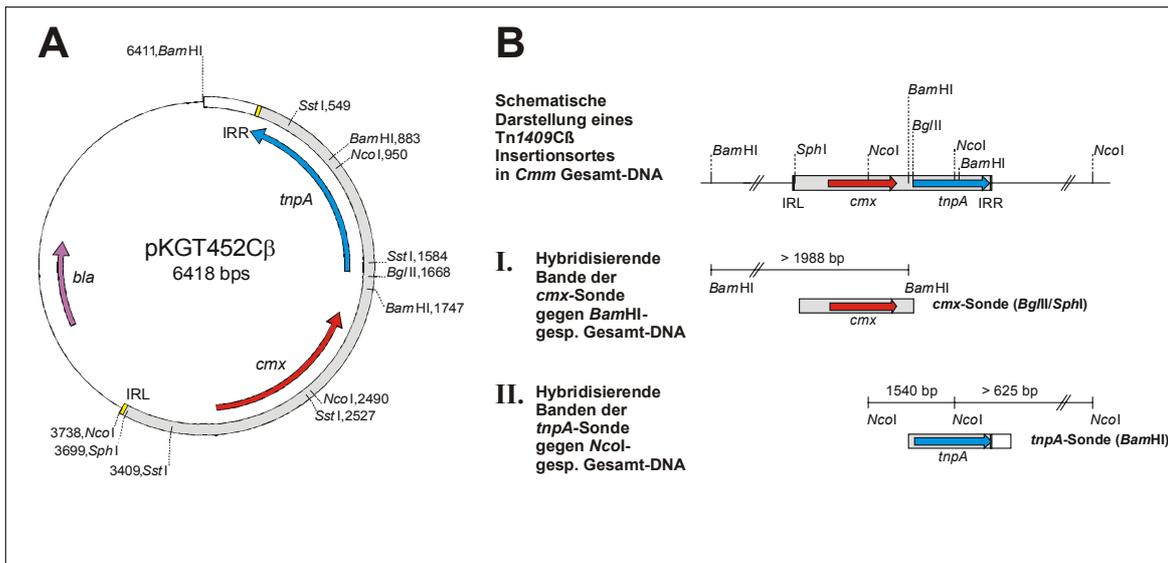


Abb. IV.8: A: Physikalische Karte des Transposon-Mutagenesevektors pKGT452Cβ. Gene sind als Pfeile dargestellt. *tnpA*: Transposase-Gen von IS1409/Tn1409, *cmx*: Chloramphenicol-Exporter-Gen von Plasmid pTP10 aus *Corynebacterium striatum* M82B (TAUCH *et al.*, 1998), *bla*: β-Lactamase-Gen von pUC13, IRL/IRR: linker bzw. rechter "inverted repeat" von IS1409/Tn1409.

B: Schematische Darstellung eines Insertionsortes von Tn1409Cβ in GesamtdNA von *Cmm*, sowie die Darstellung von hybridisierenden Banden, die mit der *cmx*-Sonde gegen *Bam*HI-gespaltene GesamtdNA von *Cmm* auftreten (I.), und die mit der *tnpA*-Sonde gegen *Nco*I-gespaltene GesamtdNA auftreten (II.). Das Transposon ist als graues Rechteck, mit den beiden enthaltenen Genen und flankiert von beiden "inverted repeats", auf der waagerechten Linie dargestellt, die die GesamtdNA von *Cmm* symbolisiert. In I. und II. sind unterhalb der hybridisierenden Restriktionsfragmente der GesamtdNA (waagerechte Linien) die beiden Sonden als graue Rechtecke mit den darauf lokalisierten Genen (Pfeile) dargestellt.

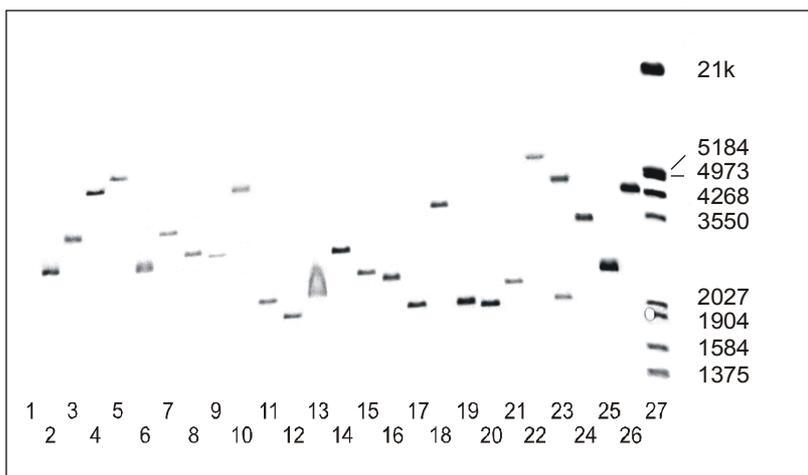


Abb. IV.9: Southern-Hybridisierung von *Bam*HI-gespaltener GesamtdNA von 25 zufällig ausgewählten *Cmm* Transposon-Mutanten gegen die *cmx*-Sonde. Bei einer korrekten Transposoninsertion sollte eine hybridisierende Bande mit einer Größe von 1988 bp oder mehr auftreten, was bei allen Mutanten der Fall ist, bis auf die in Spur 23 mit zwei Banden. Spur 1: *Cmm* als negative Kontrolle, Spur 2 - 26: zufällig ausgewählte Transposon-Mutanten von *Cmm*, Spur 27: Digoxigenin-11-dUTP-markierter λ *Eco*RI/*Hind*III-gespaltener Marker. Bandengröße in bp.

Um zu überprüfen, ob auch das für die Transposase kodierende Gen vorhanden ist, wurde *NcoI* gespaltene Gesamt-DNA gegen die *tnpA*-Sonde hybridisiert. Bei einer korrekten Transposoninsertion sollten zwei Banden auftreten, die eine Größe von 1540 bp besitzen und eine Größe von mehr als 625 bp (siehe Abb. IV.8). Wie in Abb. IV.10 zu sehen ist, zeigen alle Klone die 1540 bp große Bande und mindestens eine hybridisierende Bande von mehr als 625 bp, der Klon in Spur 23 zeigt - wie schon mit der *cmx*-Sonde - zwei Banden, sodass die Annahme einer Cointegrat-Bildung gestärkt wird.

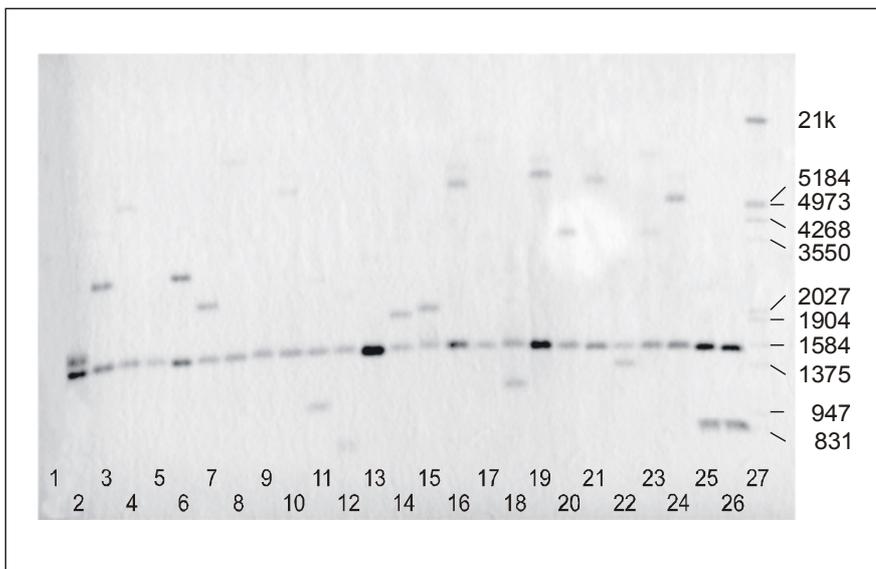


Abb. IV.10: Southern-Hybridisierung von *NcoI*-gespaltener Gesamt-DNA von 25 zufällig ausgewählten *Cmm* Transposon-Mutanten gegen die *tnpA*-Sonde. Bei einer korrekten Transposoninsertion sollten zwei hybridisierende Banden mit einer Größe von 1540 bp und mit 625 bp oder mehr auftreten, was bei allen Mutanten der Fall ist, bis auf die in Spur 23 mit drei Banden. Spur 1: *Cmm* als negative Kontrolle, Spur 2 - 26: zufällig ausgewählte Transposon-Mutanten von *Cmm*, Spur 27: Digoxigenin-11-dUTP-markierter λ *EcoRI/HindIII*-gespaltener Marker. Bandengröße in bp.

Um die Stabilität der Transposon-Mutanten unter unselektiven Bedingungen zu ermitteln, wurden zwei Mutanten (C7 und TM100 β 92-6) für ein halbes Jahr auf TBY-Platten ohne Antibiotikum angezogen und etwa alle 1 - 2 Wochen auf eine neue Platte überimpft (K.-H. GARTEMANN, persönliche Mitteilung). Anschließend wurde Gesamt-DNA von zehn Einzelkolonien isoliert. Es ließ sich keine Veränderung des Bandenmusters bei der Hybridisierung von Gesamt-DNA der Einzelkolonien gegen die *cmx*-Sonde beobachten. Man kann also davon ausgehen, dass das Transposon, wenn es einmal in das Genom von *Cmm* integriert ist, dort auch unter unselektiven Bedingungen relativ stabil verbleibt.

1.3.3 Integrationsorte von Tn1409C β in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*/Zielspezifität

Zur Untersuchung der von Tn1409C β unterbrochenen Gene und der Zielsequenz für die Transposition wurden die entsprechenden DNA-Regionen von 11 zufällig ausgewählten Transposon-Mutanten kloniert und ansequenziert. Dazu wurde Gesamt-DNA mit *SphI* gespalten, um die an den rechten "inverted repeat" (IRR) angrenzende DNA-Region zu erhalten, sowie mit *BgIII*, um den hinter dem linken "inverted repeat" (IRL) gelegenen Bereich zu klonieren. Die Fragmente wurden in *SphI*- bzw. *BamHI*-gespaltenen pUC18 ligiert, auf Amp₁₅₀/Cm₁₀ selektioniert und per Restriktionsanalyse überprüft. Die erhaltenen Klone wurden mit Hilfe der IRL- bzw. IRR-Sequenzierprimer (Sequenz in Material und Methoden, Seite 28) ansequenziert. Die Homologien zu Genen in der BLAST-Datenbank (ALTSCHUL *et al.*, 1997) sind in Tab. IV.1 aufgeführt.

Tab. IV.1: Homologien in der BLAST-Datenbank von 11 zufällig klonierten und ansequenzierten Transposon-Mutanten, sowie deren Zielduplikation und GC-Gehalt

Mutante	8 bp Zielduplikation	pot. Funktion bzw. Orf	GC-Gehalt ^a	Identität/Ähnlichkeit	Acc.Nr. ^b
23-39	GGTTTCAG	? ^d	61 %	-	-
34-41	GGTTGTAG	Oxidoreduktase	72 %	44 % / 63 %	NP_104615
75-11	CCGAATCG	ABC-Transporter, ATP-bindendes Protein	74 %	45 % / 59 %	AAF12012
94-17	GGTAATCA	? ^d	57 %	-	-
116-27	ACTTTACC	β -Xylo-Glucosidase	65 %	45 % / 61 %	CAA91219
119-38	ACAAAATG	? ^d	74 %	-	-
137-40	CGTCAACC	Phosphat ABC-Transporter, ATP-bindendes Protein	53 %	69 % / 87 %	CAB88472
303-3 ^c	AATTTAGT	? ^d	56 %	-	-
C4 ^c	AGTTTAGA	? ^d	57 %	-	-
C6 ^c	AGTAAACC	hyp. Protease (<i>Xylella fastidiosa</i>)	56 %	50 % / 68 %	AAF83341
C7 ^c	GGTAAAGG	Tomatinase (<i>Fusarium oxysporum</i>)	65%	55% / 68 %	BAB88658

^a: GC-Gehalt des unterbrochenen Gens bzw. der DNA-Region, ^b: Acc.Nr. der besten Homologie in der BLAST-Datenbank, ^c: Nur eine Seite sequenziert, ^d: keine signifikanten Homologien

Bei allen untersuchten Klonen konnte die für IS1409/Tn1409 charakteristische 8 bp Duplikation festgestellt werden. Im Rahmen der weiteren Experimente wurden noch weitere Transposon-Mutanten ansequenziert, sodass Informationen über die 8 bp Duplikationen

von 19 Transposon-Mutanten gesammelt werden konnten, die in Abb. IV.11 und IV.12 zusammengefasst sind.

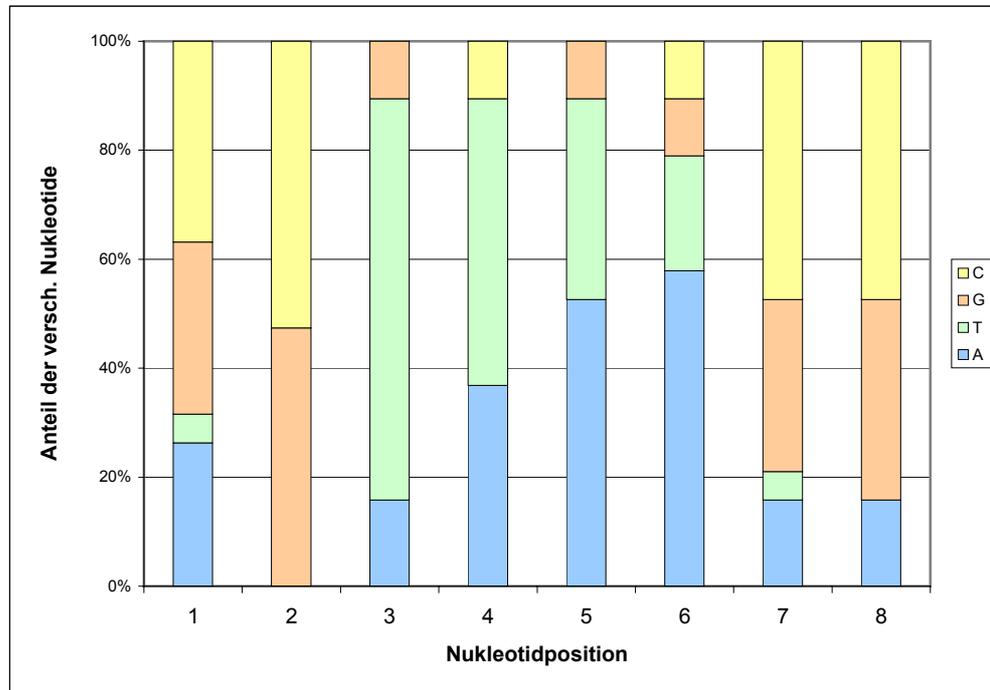


Abb. IV.11: Verteilung der Nucleotide in 19 Ziolduplikationen von *Cmm* Transposon-Mutanten [n=19].

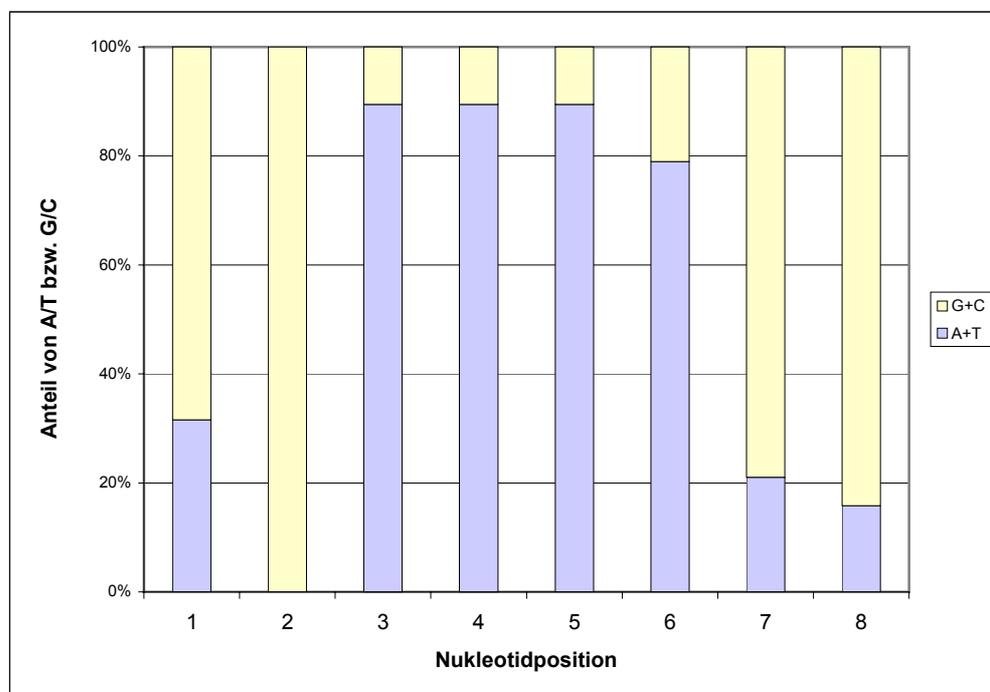


Abb. IV.12: Verteilung der Nucleotide in 19 Ziolduplikationen von *Cmm* Transposon-Mutanten [n=19].

Es ist zu erkennen, dass an den äußeren Positionen 1, 2, 7 und 8 eine deutliche Präferenz für Guanin oder Cytosin und an den inneren Positionen 3, 4, 5 und 6 eine Präferenz für Adenin oder Thymin vorhanden ist. An der zweiten Position ist sogar bei allen untersuchten Transposon-Mutanten ein G oder C vorhanden. Eine deutliche Zielspezifität lässt sich folglich nicht erkennen, auch wenn sich u.U. eine leichte Präferenz für AT-reiche Promotorsequenzen in dem hoch-GC Organismus *Cmm* postulieren lässt, wobei allerdings bisher noch nicht bekannt ist, wie ein charakteristischer Promotor in *Cmm* aussieht.

1.3.4 Transposon-Mutagenese in zu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* nah verwandten Stämmen

Es wurde ebenfalls überprüft, ob das Transposon Tn1409C in zu *Cmm* nah verwandten Stämmen funktional ist. In folgenden Stämmen wurde unter den gleichen Bedingungen wie für *Cmm* versucht, per Elektroporation Transposon-Mutanten zu erzeugen: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) Stamm Cs4 und Cs7 (LAINE *et al.*, 1996), *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (*Cmi*), *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (*Cmn*), *Rathayibacter rathayi* und *Rathayibacter iranicus*. Bei allen *Clavibacter*-Spezies konnten chloramphenicolresistente Klone erhalten werden, allerdings mit sehr viel niedrigerer Effizienz als bei *Cmm* (1 - 10 Transposon-Mutanten/ μ g DNA). Dies ist aber nicht weiter verwunderlich, da die Elektroporation in den allermeisten Fällen empirisch an jede einzelne Spezies angepasst werden muss, sodass nur in den wenigsten Fällen mit dem gleichen Protokoll mehrere Spezies effizient transformiert werden können. Bei den beiden *Rathayibacter*-Stämmen wurden keine Mutanten mit Tn1409C β erhalten, was allerdings auch auf eine schlechte Transformationseffizienz zurückgeführt werden kann. Es ist auch möglich, dass das *cmx*-Gen in diesen Spezies nicht funktional ist. Die in *Cms*, *Cmi* und *Cmn* erhaltenen Klone wurden per Southern-Hybridisierung daraufhin untersucht, ob es sich um korrekte Transpositionereignisse gehandelt hat oder um andere Phänomene. Mit *Nco*I gespaltene Gesamt-DNA wurde dazu gegen die *tnpA*-Sonde hybridisiert. Für eine korrekte Transposoninsertion würden genau zwei Banden erwartet, eine mit der fixen Größe von 1540 bp und eine mit einer variablen Größe von mehr als 625 bp (siehe Abb. IV.8, Seite 63). Wie in Abb. IV.13 zu sehen ist, zeigen alle Klone die 1540 bp große Bande und mindestens eine hybridisierende Bande von mehr als 625 bp, der Klon in Spur 5 zeigt zwei variable Banden. Hier kann ein doppeltes Transpositionereignis vorliegen. Demnach

ist das Transposon auch in den nah verwandten Stämmen *Cmi*, *Cmn* und *Cms* funktional und könnte dort ebenfalls effizient zur Mutagenese eingesetzt werden, nachdem die Elektrottransformation dort optimiert worden ist.

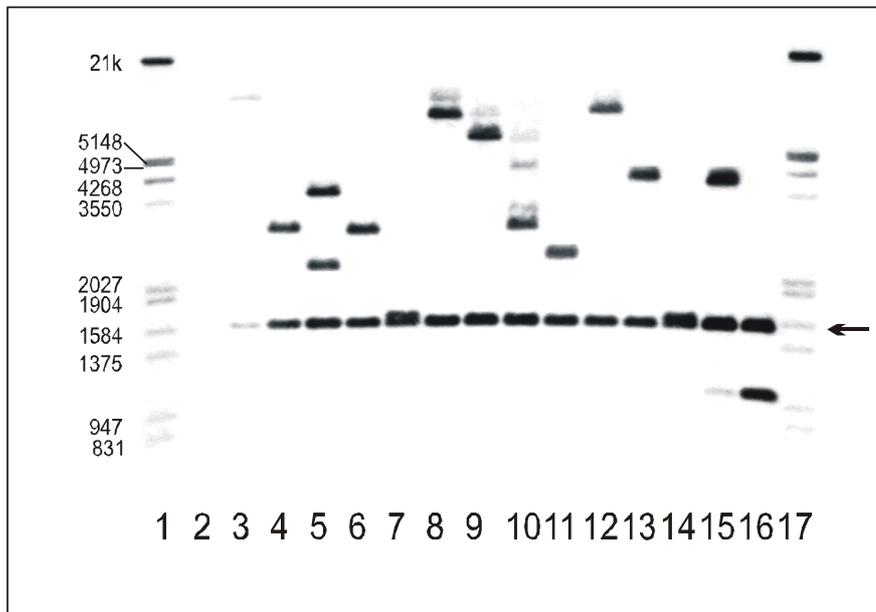


Abb. IV.13: Southern-Hybridisierung von *NcoI*-gespaltener Gesamt-DNA von Transposon-Mutanten verschiedener *Clavibacter*-Spezies gegen die *tnpA*-Sonde. Bei einer korrekten Transposoninsertion sollten zwei hybridisierende Banden mit einer Größe von 1540 bp und mit 625 bp oder mehr auftreten, was bei allen Mutanten der Fall ist, bis auf die in Spur 5 mit drei Banden. Spur 2: *Cmm* als negative Kontrolle, Spuren 3 - 6: *Cmi*, Spuren 7 - 10: *Cmn*, Spuren 11 - 14: *Cms* Cs7, Spuren 15 - 16: *Cms* Cs4, Spuren 1 und 17: Digoxigenin-11-dUTP-markierter λ *EcoRI/HindIII*-gespaltener Marker. Bandengröße in bp.

2 Weitere genetische Werkzeuge (Vektoren/Resistenzgene)

2.1 Der Kloniervektor pT19MECA2

Zur Klonierung von Fragmenten aus der *Cmm* Cosmid-Genbank auch mit unüblichen Restriktionsendonukleasen bei gleichzeitigem Wechsel der Resistenz für die Selektionierung wurde ein *E. coli*-Kloniervektor mit der MECA-"mcs" (THOMSON und PARROTT, 1998) und dem Tetrazyklinresistenzgen *tetA(Z)* (TAUCH *et al.*, 2000) konstruiert. Der für die Konstruktion der Cosmid-Genbank (GRÄFEN, 2001) von *Cmm* genutzte Vektor "SuperCos2" (Stratagene) besitzt sowohl ein Ampicillin- als auch ein Kanamycin-Resistenzgen. Die Klonierung gerade großer Fragmente aus Cosmiden, wie sie z. B. für Komplementationsexperimente benötigt werden, ist erfahrungsgemäß relativ schwierig und

ineffizient, da zum einen die kleineren Fragmente statistisch deutlich häufiger in den Ligationsprodukten anzutreffen sind und zum anderen die Aufreinigung dieser Fragmente aus dem Gel mit zunehmender Größe immer ineffizienter wird. Bei einer "shotgun"-Klonierung von nicht gröbenselektionierten Fragmenten in Vektoren der pUC- und der pK-Serien ergibt sich das Problem, dass diese ebenfalls über ein Ampicillin- bzw. Kanamycin-Resistenzgen verfügen und so der ursprüngliche Cosmid-Vektor als Religationsprodukt überproportional häufig unter den Ligationsprodukten auftaucht. Die gleichen Probleme treten bei der Verwendung von pMECA (THOMSON und PARROTT, 1998) bzw. pK19MECA2 (KIRCHNER und TAUCH, 2003) auf, welche eine "mcs" mit vielen eher ungebräuchlichen Schnittstellen besitzen (Abb. VII.13 im Anhang, Seite 166). Mit den üblichen Restriktionsenzymen ist die Klonierung unter Selektionswechsel z. B. in die bereits vorliegenden Vektoren pT19mob2 und pS19mob2 (KIRCHNER, 1999; KIRCHNER und TAUCH, 2003) möglich.

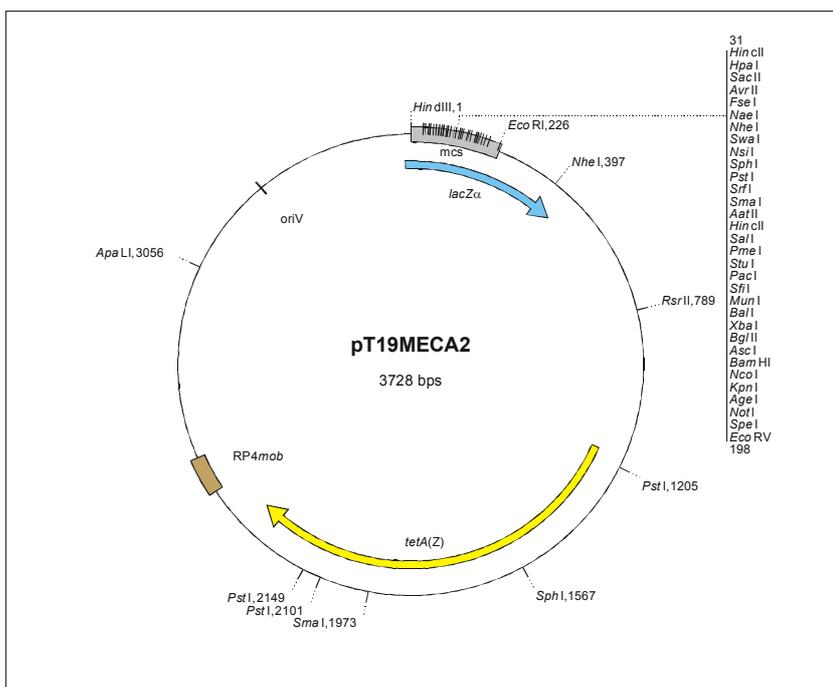


Abb. IV.14: Physikalische Karte des Kloniervektors pT19MECA2. Gene sind als Pfeile dargestellt, DNA-Abschnitte mit besonderer Funktion als Rechtecke. *tetA(Z)*: Tetrazyklin-Exporter-Gen von dem Plasmid pTP10 aus *Corynebacterium striatum* M82B (TAUCH *et al.*, 2000); *lacZα*: α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation; mcs: "multiple cloning site"; oriV: "origin of replication", Replikationsursprung in *E. coli*; RP4mob: *mob*-Region des Plasmids RP4. Kann *in trans* in dem *E. coli*-Stamm S17-1 (Simon *et al.*, 1983) zur Mobilisierung von pT19MECA2 über Konjugation genutzt werden.

Um auch die seltenen Restriktionsschnittstellen nutzen zu können, wurde die "mcs" von pK19MECA2 mit *EcoRI/HindIII* herausgeschnitten und in den ebenfalls mit *EcoRI/HindIII* geschnittenen pT19mob2 kloniert, um pT19MECA2 (Abb. IV.14) zu erhalten. Dieser Vektor hat sich bei der Klonierung von Cosmid-Fragmenten als sehr hilfreich erwiesen.

2.2 Entfernung der *EcoRI*-, *PstI*- und *SacI*-Schnittstelle aus dem *cmx*-Gen mittels "gene SOEing"

Das *cmx*-Gen des Multiresistenzplasmids pTP10 aus *Corynebacterium striatum* M82B (TAUCH *et al.*, 1998), das für einen Chloramphenicol-Exporter kodiert, hat sich als ein für das genetische Arbeiten mit *Cmm* sehr wirksames und zuverlässiges Resistenzgen herausgestellt. Bisher wurden nie spontan chloramphenicolresistente Zellen von *Cmm* gefunden und *Cmm* wird bereits durch geringe Mengen an Chloramphenicol (5 - 7 µg/ml) am Wachstum gehindert. Zur Ausbildung der Resistenz genügt sowohl in *E. coli* als auch *Cmm* eine einzige Kopie des Gens. Leider besitzt es in der natürlich vorkommenden Form jeweils eine Schnittstelle für die Restriktionsendonukleasen *EcoRI*, *PstI* und *SacI*, was bei der Konstruktion/Verwendung von Vektoren bzw. Resistenzkassetten hinderlich ist, da es sich um Restriktionsenzyme handelt, die in der "mcs" der meisten Vektoren liegen und oft zur Klonierung verwendet werden. Diese Schnittstellen sollten mit der Technik des "gene SOEing" (gene splicing by overlap extension) (HORTON, 1995) entfernt werden. Dabei wird die Basensequenz der DNA in einer zweistufigen PCR so verändert, dass die Restriktionsschnittstellen entfernt werden, nach Möglichkeit ohne einen Aminosäureaustausch zu erzeugen. Es werden zwei Primerpaare generiert, von denen zwei (der 3'-Primer des ersten Paares und der 5'-Primer des zweiten Paares) überlappen, jedoch mit einem Basenaustausch innerhalb der Restriktionsschnittstelle. Bei jeweils einer PCR mit dem ersten und dem zweiten Primerpaar entstehen zwei Fragmente, die an ihrem 3'- bzw. 5'-Ende überlappen und als "Megaprimer" in einer dritten PCR zusammen mit den beiden äußeren Primern eingesetzt werden können. Als Endprodukt entsteht ein Fragment, welches sich (im Idealfall) von dem Originalfragment nur in dem einen Basenaustausch an der Restriktionsschnittstelle unterscheidet. Dieses Fragment kann nun bei entsprechender Wahl der äußeren Primer durch eine normale Spaltung/Klonierung im zu verändernden *cmx*-Gen ausgetauscht werden. Die Vorgehensweise ist in Abb. IV.15 zusammengefasst.

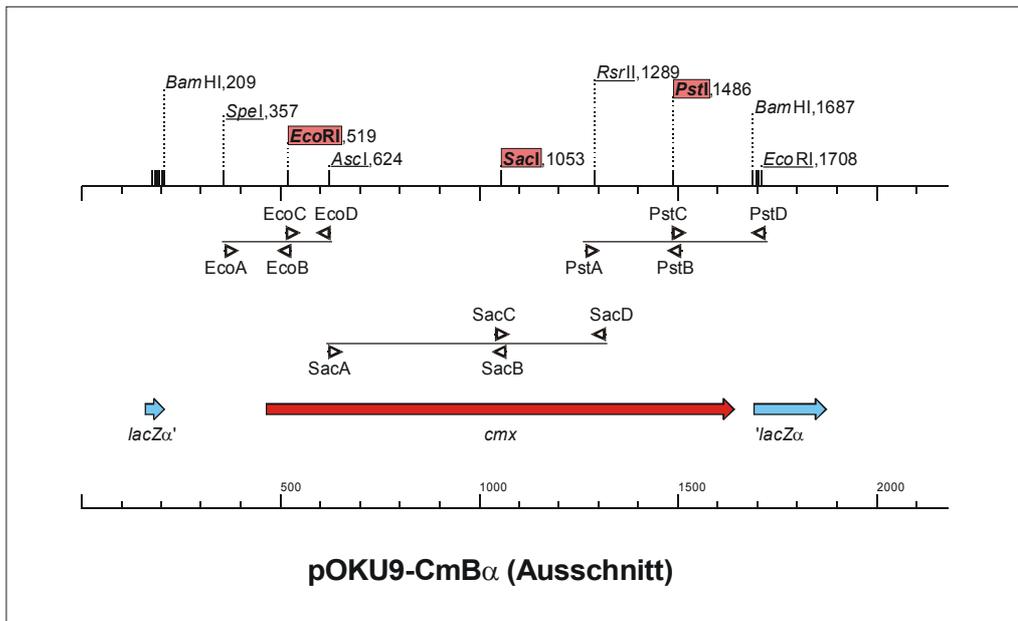


Abb. IV.15: Ausschnitt aus der physikalischen Karte von pOKU9-CmB α (oberste Linie), in den das *cmx*-Gen kloniert wurde, um die dort lokalisierte *EcoRI*-, *PstI*- und *SacI*-Schnittstelle mittels "gene SOEing" zu entfernen. Diese Schnittstellen sind hellrot unterlegt. Die zur Klonierung der PCR-Fragmente verwendeten Schnittstellen sind unterstrichen dargestellt. Darunter eine schematische Darstellung der PCR-Produkte und der verwendeten Primer (kleine Dreiecke mit den Primernamen). Weiter unten die Position des *cmx*-Gens als Pfeil dargestellt, sowie das durch die Klonierung unterbrochene *lacZ α* -Fragment.

Tab. IV.2: Zur Entfernung der *EcoRI*-, *PstI*- und *SacI*-Schnittstelle aus dem *cmx*-Gen mittels "gene SOEing" verwendete Primer. Die Erkennungssequenz der Schnittstelle ist jeweils fett unterlegt und das veränderte Nukleotid in Kleinschrift hervorgehoben. Über der Primersequenz ist zusätzlich die kodierte Aminosäuresequenz angegeben.

Primernamen	Primersequenz (5'→3')	Basenaustausch
EcoA	CCTTGAACCACTAGTTACGACG	
EcoB	CGAGCAT GAA c TCT GGAAGTGC	
EcoC	SerGluPheMet GCACTTCA GAg TTC ATGCTCG	GAA: Glu → GAG:Glu
EcoD	CGAACACGAGAAGGCAAACG	
PstA	CGACTATCAGATCAACGACC	
PstB	CCG Ca GCAG CTCCGATATTC	
PstC	AlaAlaAla GAG CTGct g CGGGGCCC	GCA: Ala → GCT: Ala
PstD	CAGGGTTTTCCAGTCACGAC	
SacA	CATTTCGAGTCGGTATGGTCG	
SacB	CAACTGGCT GAGCT g GACACG	
SacC	ValGluLeuSer CGTGTC cAGCTC AGCCAGTTG	GAG: Glu → CAG: Gln
SacD	GATCCAGCCTGTCAGCAATAG	

In den zur Entfernung der Restriktionsschnittstellen durchgeführten Temperaturgradienten-PCRs wurden die in Tab. IV.2 aufgeführten Primer verwendet. Zu den PCR-Bedingungen siehe Material und Methoden Kapitel 8.1, Seite 43 (Temperaturgradient: 55 °C - 65 °C in 2 °C Schritten).

Zur Vorbereitung der PCR und um eine *cmx*-Kassette zu erhalten, wurde das *cmx*-Gen mit *PmlI/BsaWI* aus pKGT452C β herausgeschnitten und mittels Klenow-Behandlung an der *BsaWI*-Schnittstelle mit "blunt ends" versehen - *PmlI* erzeugt bereits "blunt ends". Dieses Fragment wurde nun in pK18PolyF2 (KIRCHNER, 1999; TAUCH *et al.*, 2002) kloniert. Das Plasmid pK18PolyF2 kann dazu genutzt werden, "blunt end" Fragmente mit einer Reihe von definierten "sticky ends" zu versehen. pK18PolyF2 (Abb. VII.12 im Anhang auf Seite 166) besitzt dazu fünf singuläre "blunt end" Restriktionsschnittstellen, die von jeweils zwei "sticky end" Restriktionsschnittstellen flankiert werden (*DraI* \rightarrow *HindIII*, *EcoRV* \rightarrow *XbaI*, *SmaI* \rightarrow *BamHI*, *Eco47III* \rightarrow *PstI*, *HincII* \rightarrow *EcoRI*), über die das Fragment mit den entsprechenden Schnittstellen versehen wieder herauskloniert werden kann. Dies ist z. B. besonders dann sinnvoll, wenn Fragmente zu groß sind, um sie per PCR mit den Schnittstellen zu versehen. Das DNA-Fragment mit dem *cmx*-Gen wurde in die *DraI*-, *EcoRV*- und *SmaI*-Schnittstelle ligiert und liegt so als *HindIII*- (pOKPF-CmH), *XbaI*- (pOKPF-CmX) und *BamHI*-Kassette (pOKPF-CmB) vor. Für die PCR wurde die *BamHI*-Kassette nochmals in *BamHI* gespaltenen pUC19 umkloniert (pOKU9-CmB α). Dieses Plasmid diente auch als Matrize für die PCR.

Zuerst wurde die *EcoRI*-Schnittstelle über eine *SpeI/AscI*-Klonierung des PCR-Fragments EcoAD ersetzt (pOKU9-CmB Δ E), danach die *PstI*-Schnittstelle durch eine *RsrII/EcoRI*-Klonierung des PCR-Fragments PstAD (pOKU9-CmB Δ E Δ P) und schließlich die *SacI*-Schnittstelle durch eine *AscI/RsrII*-Klonierung des PCR-Fragments SacAD (pOKU9-CmBf) (vergl. Abb. IV.15).

Auf eine Sequenzierung jedes einzelnen klonierten PCR-Fragments wurde verzichtet, da bei jedem Klonierungsschritt auf das Vorhandensein der Resistenz selektioniert wurde. Das fertige Endprodukt wurde dann aber sequenziert. Es zeigte sich, dass im Laufe der PCRs drei Fehler aufgetreten waren: ein Basenaustausch T \rightarrow C 71 bp vor dem Startcodon des *cmx*-Gens, ein stiller Basenaustausch innerhalb des *cmx*-Gens GCA(Ala) \rightarrow GCG(Ala) 17 bp vor der (ehemaligen) *PstI*-Schnittstelle, sowie ein T \rightarrow C Austausch 19 bp hinter dem Stopcodon des *cmx*-Gens.

Ob mit dem modifizierten *cmx*-Gen ein gleichstarke Resistenz erreicht wird, wie mit dem ursprünglichen Gen, wurde anschließend in *E. coli* in Flüssigkultur getestet. Dazu wurde eine 1:100 Verdünnung einer stationären Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α MCR (o.D.₅₈₀ = 4) im Reagenzglas mit 5 ml TBY mit verschiedenen Chloramphenicolkonzentrationen angelegt (0; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 20; 25; 30 und 40 $\mu\text{g/ml}$) und für 16 Stunden bei 37 °C im Roller inkubiert. Danach wurde die o.D.₅₈₀ für jede Probe bestimmt und in Zellzahlen umgerechnet. Wie in Abb. IV.16 dargestellt, lässt sich kein signifikanter Unterschied in der Resistenz zwischen den beiden *cmx*-Genvarianten feststellen.

Das veränderte *cmx*-Gen - ohne die drei Schnittstellen - wurde bereits für die Konstruktion eines Promotorprobevektors verwendet (LUDEWIG, 2002).

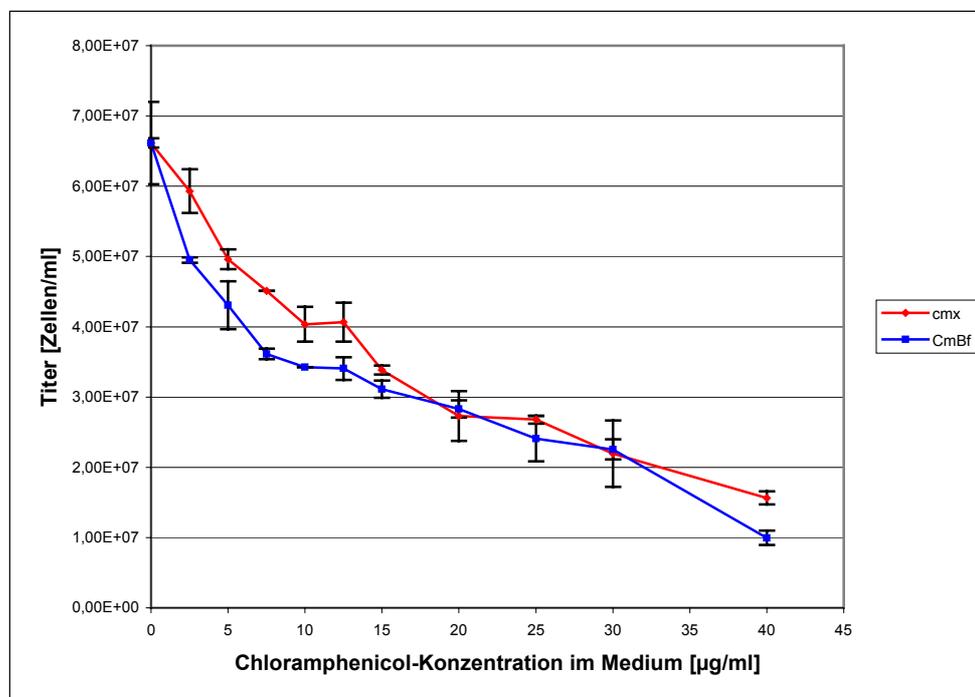


Abb. IV.16: Vergleich der Resistenz zwischen dem ursprünglichen (*cmx*) und dem durch die Entfernung der *EcoRI*-, *PstI*- und *SacI*-Schnittstelle veränderten *cmx*-Gen (CmBf) in Flüssigkultur. pOKU9-CmBf in *E. coli* DH5 α MCR.

2.3 Stabilität und Nutzbarkeit von Shuttle-Vektoren in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Aufgrund der Tatsache, dass für *Cmm* bisher nur Shuttle-Vektoren zur Verfügung stehen, die ausgehend von endogenen Plasmiden konstruiert wurden, ergeben sich einige mögliche Probleme bei der Einbringung dieser Vektoren in Zellen, die noch die beiden parentalen Plasmide pCM1 und pCM2 enthalten. Wenn zwei Plasmide mit dem gleichen Replikon in einer Zelle vorliegen, so können sie sich gegenseitig bei der Replikation und der Verteilung auf die Tochterzellen bei der Zellteilung behindern. Diese Inkompatibilität ist für viele Plasmide beschrieben (z. B. NORDSTRÖM und AUSTIN, 1989; AUSTIN und NORDSTRÖM, 1990; WILLIAMS und THOMAS, 1992; DEL SOLAR *et al.*, 1998). Deshalb sollte zum einen überprüft werden, ob es andere Shuttle-Vektoren gibt, die sowohl in *E. coli* als auch in *Cmm* stabil replizieren und erhalten bleiben und zum anderen, ob die von pCM1 und pCM2 abstammenden Derivate pDM302/pDM306 bzw. pHN205/pHN216 Inkompatibilität zu den parentalen Plasmiden aufweisen.

2.3.1 Vektoren auf Basis von pGA1, pNG2 und RSF1010

Da die *E. coli*-*C. glutamicum*-Shuttle-Vektoren (pEC-Serie, KIRCHNER, 1999; KIRCHNER und TAUCH, 2003) - die von pGA1 (SONNEN *et al.*, 1991; NEŠVERA *et al.*, 1997) aus *C. glutamicum* abgeleitet sind - in diversen Corynebakterien (*C. glutamicum*, *C. diphtheriae*, *C. striatum*, *C. jeikeium*) stabil replizieren, erschien es vielversprechend, diese auch im taxonomisch nicht weit entfernten *Cmm* zu testen. Ebenso wurden die "broad-host-range"-Vektoren (pBH-Serie) (KIRCHNER, 1999; KIRCHNER und TAUCH, 2003) - die von dem Plasmid pNG2 aus *C. diphtheriae* (SERWOLD-DAVIS *et al.*, 1987, 1990) abstammen - getestet. Zusätzlich noch die Vektoren pSUP104 (PRIEFER *et al.*, 1985), pMMB207 (MORALES *et al.*, 1991), pVLT31 (DE LORENZO *et al.*, 1993), die von dem "broad-host-range"-Plasmid RSF1010 (SCHOLZ *et al.*, 1985, 1989; FREY und BAGDASARIAN, 1989; HARING und SCHERZINGER, 1989) abstammen, das sowohl in Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien repliziert.

Als Testvektor der pEC-Serie wurde pEC-K18*mob2* (Abb. VII.14 im Anhang, Seite 167) verwendet, welcher sich mit hoher Ausbeute an Transformanten nach *Cmm* elektroporieren ließ. Auch der Vektor pBHK18 (Abb. VII.15 im Anhang, Seite 167), als Testvektor für die

pBH-Serie, ließ sich nach *Cmm* elektroporieren, jedoch mit geringerer Effizienz. Die Elektroporation der RSF1010-Derivate führte nicht zu resistenten Transformanten in *Cmm*. Die Stabilität von pEC-K18*mob2* wurde in *Cmm* unter unselektiven Bedingungen in Flüssigkultur überprüft. Dazu wurde *Cmm*(pEC-K18*mob2*) von einer frisch bebrüteten Agarplatte in TBY resuspendiert, auf eine o.D.₅₈₀ von 0,3 verdünnt und 20 ml davon für 3 - 4 Tage im Erlenmyerkolben bei 25 °C unter Schütteln bis zu einer o.D.₅₈₀ von 3 - 4 inkubiert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe auf TBY-Platten angelegt und einige hundert Einzelkolonien auf TBY-Platten mit und ohne Neo₇₅ parallel ausplattiert. Bereits nach einer solchen ersten Passage war der Anteil der neomycinresistenten Zellen auf unter 10 % abgesunken. Folglich bleibt pEC-K18*mob2* nur unter selektiven Bedingungen in *Cmm* stabil erhalten, was die Verwendbarkeit dieser Shuttle-Vektoren auf Experimente begrenzt, bei denen unter Selektionsdruck gearbeitet werden kann.

2.3.2 Vektoren auf Basis von pCM1 und pCM2

Die Überprüfung der Stabilität der Vektoren pDM302 (pDM306 ist bis auf den Austausch des Chloramphenicol-Resistenzgens gegen ein Gentamicin-Resistenzgen (*aacCI*, WOHLLEBEN *et al.*, 1989) identisch) und pHN205/pHN216 wurde von B. ABT als Teil ihrer Diplomarbeit durchgeführt (ABT, 2003). pDM302 (MELETZUS *et al.*, 1993) (Abb. VII.4, Seite 162) ist wie pDM306 (Abb. VII.5, Seite 162) ein Abkömmling des kleineren endogenen Plasmids pCM1. pHN205 und pHN216 (NAKHEI, 1993; LAINE *et al.*, 1996) (Abb. VII.6/7 im Anhang, Seite 163) sind Derivate des größeren endogenen Plasmids pCM2.

Bei beiden Vektorfamilien ist es bisher leider nicht gelungen, das Replikon bzw. die Replikations- und Stabilitätsregion deutlich zu verkleinern und somit weitere Schnittstellen als Klonierstellen nutzbar zu machen. Diese Vektoren sind mit etwa 14 kb relativ groß.

Für die pCM1-Vektorfamilie wurde die Stabilität über 30 Generationen in dem plasmidfreien Derivat CMM100 bereits nachgewiesen (MELETZUS *et al.*, 1993; NAKHEI, 1993). Da die bisherigen Versuche, andere auch unter unselektiven Bedingungen nutzbare Shuttle-Vektoren für *Cmm* zu finden, nicht erfolgreich verlaufen sind, bleiben sie bis dato die einzig verwendbaren Vektoren für das genetische Arbeiten mit *Cmm*. Um so wichtiger wäre der Nachweis, dass sich diese Vektoren auch stabil in dem Wildtypstamm NCPPB382 von *Cmm*, der beide parentalen Plasmide enthält, nutzen lassen und nicht nur

in dem plasmidfreien Derivat CMM100. Für die pCM2-Vektorfamilie wurde die Stabilität bisher nur in *Cms* nachgewiesen (LAINE *et al.*, 1996), sodass dies in *Cmm* ebenfalls getestet werden sollte.

2.3.2.1 Stabilität von pHN205/pHN216 unter unselektiven Bedingungen in CMM100

Als erstes wurde die Stabilität von pHN205 und pHN216 parallel in Flüssigkultur und *in planta* getestet. Zu diesem Zweck wurden Tomatenpflanzen mit CMM100(pHN205) bzw. CMM100(pHN216) infiziert, und nach 28 Tagen Wachstum in der Klimakammer wurde aus ihnen Xylemsaft gewonnen, von dem entsprechende Verdünnungsreihen angefertigt wurden. Diese wurden auf C-Medium Platten ausplattiert und bei 25 °C bebrütet. Durch paralleles Plattieren der erhaltenen Einzelkolonien auf C-Medium und C-Medium Neo₇₅ konnte sowohl der Gesamtzelltiter als auch der Titer von plasmidhaltigen Zellen sowie deren Verhältnis ermittelt werden. Es zeigte sich, dass 80 - 82 % der *Cmm*-Zellen in den getesteten Tomatenpflanzen das Plasmid pHN205 enthielten, sowie 65 - 100 % der Zellen pHN216.

Die Anzucht in Flüssigkultur lief im Wesentlichen wie zuvor schon für pEC-K18*mob2* beschrieben ab. CMM100(pHN205) bzw. CMM100(pHN216) wurden aus Glycerinkulturen direkt in 20 ml TBY im Erlenmeyerkolben angeimpft, unter Schütteln bei 25 °C bebrütet und nach Erreichen einer o.D.₅₈₀ von 0,3 wurden 100 µl in 20 ml frisches TBY überimpft. Danach wurden die Zellen jeweils bis zu einer o.D.₅₈₀ von etwa 3,0 angezogen (3 - 4 Tage). Etwas Zellsuspension wurde abgenommen, auf eine o.D.₅₈₀ von 0,3 verdünnt und davon wurden wieder 100 µl in 20 ml frisches Medium angeimpft. Insgesamt wurden fünf Passagen durchgeführt, was ca. 56 Generationen entspricht. Von jeder Passage wurden entsprechende Verdünnungsreihen angelegt und Gesamtzelltiter, Titer der plasmidhaltigen Zellen und deren Verhältnis ermittelt. Der Verlauf des Anteils der plasmidhaltigen Zellen über die Zeit ist in Abb. IV.17 dargestellt. Die ermittelten Werte sind natürlich gewissen Schwankungen unterworfen, aber es kam nicht darauf an, die Werte durch eine große Anzahl von Parallelversuchen auf wenige Prozent genau zu bestimmen. Deutlich ist jedoch zu erkennen, dass beide Plasmide bis über die 20. Generation hinaus zu praktisch 100 % in allen Zellen stabil vorhanden bleiben. Danach sinkt der Anteil leicht ab, bei pHN205 auf etwa 80 % und bei pHN216 auf etwa 75 %. Dies ist leicht erklärbar, da sobald eine Tochterzelle kein Plasmid bei der Teilung erhält, alle ihre Nachkommen kein Plasmid

mehr besitzen und bei der Anzucht im Schüttelkolben wahrscheinlich kein Plasmidretransfer durch Konjugation stattfinden kann.

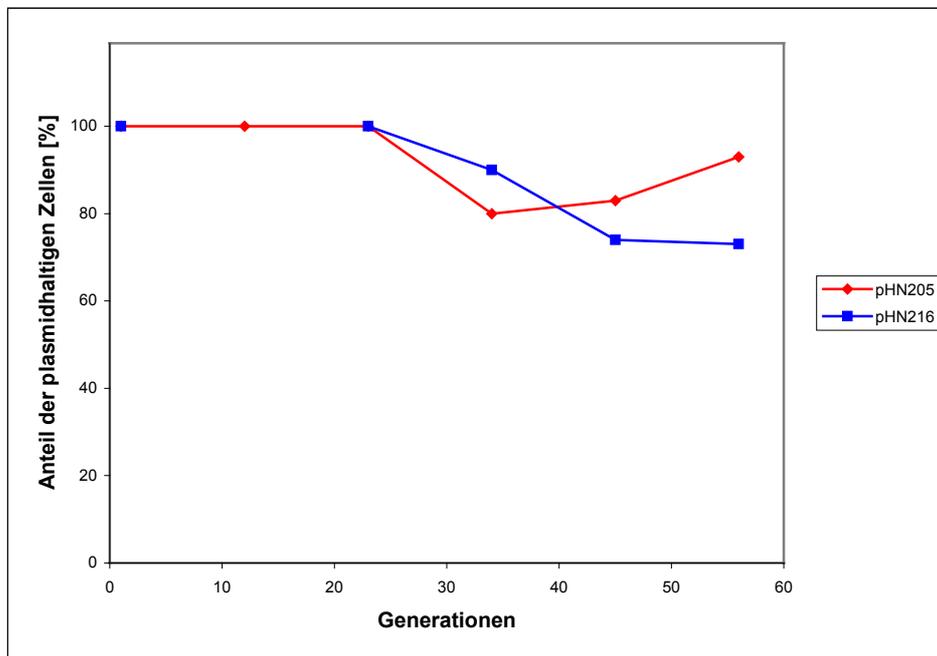


Abb. IV.17: Stabilität von pHN205 und pHN216 in CMM100 unter unselektiven Bedingungen in Flüssigkultur über 56 Generationen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der plasmidtragenden Zellen über die Zahl der Generationen.

Als Fazit ist zu nennen, dass beide Plasmide auch unter unselektiven Bedingungen, sowohl *in planta* als auch in Flüssigkultur, stabil in CMM100 enthalten bleiben und somit für Komplementationsexperimente nutzbar sein sollten. Die Koexistenz von pCM2 mit den beiden von ihm abstammenden Vektoren pHN205 und pHN216 wurde nicht überprüft.

2.3.2.2 Test auf Inkompatibilität von pDM302 und pCM1

Eine Komplementation von inaktivierten Genen, die im Zusammenhang mit der Ausprägung der Welke stehen, muss in Mutanten des plasmidhaltigen Wildtypstammes *Cmm* NCPPB382 oder dem Curingderivat CMM101 (pCM1) erfolgen, da die Pathogenitätsdeterminanten plasmidkodiert sind. Deshalb sollte überprüft werden, ob sich pDM302 und pCM1, die beide das gleiche Replikon besitzen, parallel in ein und derselben Zelle stabil etablieren und erhalten lassen. Es gibt nur ein Gen auf dem Plasmid pCM1, dessen Genprodukt sich mit einem Test nachweisen lässt, und zwar die Zellulase CelA. Dieser CMC-Test (mit Carboxymethylzellulose) ist jedoch relativ aufwendig und für den Mas-

sentest von Hunderten Klonen sehr unpraktikabel. Deshalb wurde der Stamm CMM101_{Gm} (CMM100(*celA::aacCI*), H. JAHR, persönliche Mitteilung) genutzt. Hierbei handelt es sich um den Stamm CMM101, bei dem das *celA*-Gen durch die Insertion einer *aacCI*-Gentamicin-Resistenzkassette unterbrochen ist und somit die Möglichkeit besteht, über einen einfachen Plattentest auf den Plasmidgehalt zu testen. In diesen Stamm wurde pDM302 elektroporiert und ein Pflanzentest, wie bei den Vektoren der pHN-Serie beschrieben, durchgeführt. Über das Ausplattieren von Verdünnungsreihen des nach 31 Tagen gewonnenen Xylemsafts auf C-Medium und dem anschließenden parallelen Ausplattieren auf C-Medium Gm₄₀, Neo₇₅ und Gm₄₀/Neo₇₅ sowie C-Medium ohne Antibiotikum, konnte die Anzahl der Zellen mit pCM1 (Gm^R), pDM302 (Neo^R), pCM1 und pDM302 (Gm^R/Neo^R) sowie ohne Plasmid bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in Tab. IV.3 für die aus zwei Pflanzen isolierten Bakterien zusammengefasst. Die Gesamtzahl der Zellen (auf C-Medium ohne Antibiotikum) wurde gleich 100 % gesetzt.

Tab. IV.3: Stabilität von pDM302 in Koexistenz mit pCM1_{Gm} *in planta* über 31 Tage. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der plasmidtragenden Zellen nach Isolierung aus dem Xylemsaft von zwei Testpflanzen.

Medium	Pflanze 1 relativer Anteil	Pflanze 2 relativer Anteil	arithm. Mittelwert
C	100 %	100 %	-
C Gm ₄₀	94 %	98 %	96,0 %
C Neo ₇₅	100 %	97 %	98,5 %
C Gm ₄₀ /Neo ₇₅	92 %	89 %	90,5 %

Betrachtet man die beiden Plasmide einzeln, so ist jedes von ihnen in über 95 % der getesteten Zellen enthalten. Die Stabilität beider Plasmide in *Cmm* ist also sehr hoch. Erstaunlicherweise können im Durchschnitt in den untersuchten Bakterien in mehr als 90 % der Fälle beide Plasmide nachgewiesen werden. Normalerweise sollte man erwarten, dass sich die beiden Plasmide - von den gleichen Proteinen repliziert und verteilt - gegenseitig behindern und somit eines der beiden mit der Zeit verdrängt wird. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein. Eine naheliegende Erklärung wäre, dass die Plasmide ein Cointegrat gebildet haben. Dies wurde jedoch nicht getestet. Die Vektoren der pDM-Reihe sollten sich für Komplementationsexperimente verwenden lassen. Da die Vektoren der pDM-Reihe geringfügig mehr Schnittstellen für die Klonierung besitzen und mit ihnen deutlich mehr Erfahrungen im Laboralltag vorliegen, wurden sie in den folgenden Experimenten den Vektoren der pHN-Familie vorgezogen.

IV.B Analyse und Charakterisierung von Mutanten von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Eine Bank von Transposon-Mutanten in CMM100 mit ca. 8000 Klonen wurde erstellt, von denen ca. 3000 eingelagert wurden. Unter diesen Mutanten fielen einige bereits durch ihre veränderte Morphologie auf. Bei etwa 20 (0,25 %) handelte es sich um Farbmутanten mit farblosen bis rosanen Kolonien. Das Spektrum reichte von fahlgelb über weißgelb bis farblos, sowie von kräftig pink bis weißrosa. Weiterhin wurden Mutanten erhalten, deren Kolonien, verglichen mit dem Wildtyp, eine verringerte Schleimigkeit ("trocken") oder eine erhöhte Schleimigkeit ("extra schleimig") aufwiesen, was bei längerer Anzucht auf C-Medium Platten tlw. dazu führte, dass die Kolonien ineinander flossen.

Die gesamte Bank der Transposon-Mutanten wurde auf Auxotrophien durch dreimaliges Überimpfen auf Minimalmediumplatten getestet. Es wurden nur fünf Mutanten gefunden, die nicht mehr auf Minimalmedium wuchsen. Diese wurden von O. KAUP im Rahmen eines Laborpraktikums näher untersucht. Keine der Mutanten war jedoch durch Zugabe einer Aminosäure komplementierbar. Bei einer von ihnen könnte es sich um eine Vitamin B12-Mangelmutante handeln. Eigentlich sollte man erwarten, dass sich unter den 8000 Transposon-Mutanten auch solche mit Aminosäureauxotrophien befinden. Hierauf wird in der Diskussion näher eingegangen.

Weiterhin wurden etwa 1500 Mutanten vom Wildtyp von *Cmm* im Pflanzentest auf eventuelle Veränderungen der Virulenz getestet. Eine Reduktion der Virulenz kann zwei verschiedene Ursachen haben. Entweder das Transposon hat unmittelbar ein Gen, welches für die Welkeauslösung verantwortlich ist, also *celA* (pCM1) oder *pat-1* (pCM2), inaktiviert, oder es hat ein noch nicht bekanntes chromosomales Gen, das für die Kolonisationsfähigkeit von *Cmm* verantwortlich ist, inaktiviert. Die Mutanten wurden in einem dreistufigen Screening in Tomatenpflanzen auf ihre Virulenz getestet (siehe Abschnitt "Test der Virulenz von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-Mutanten *in planta*", Seite 81).

Die generelle Strategie sah wie folgt aus:

- 1) Identifizierung der Mutanten entweder direkt über ihre Morphologie, Physiologie oder im Pflanzentest.
- 2) Hybridisierung der Mutanten gegen die *cmx*-, *tnpA*- und pUC-Sonde, um zu klären, ob es sich um eine Transposon-Mutante oder eine durch einen anderen Vorgang entstandene Mutante handelt.
- 3) Klonierung des links vom IRL liegenden DNA-Abschnitts durch *Bgl*II-Spaltung von Gesamt-DNA von *Cmm* und anschließender Ligation in *Bam*HI-gespaltenen pUC13 bzw. pUC18 (Abb. VII.8 im Anhang, Seite 164); des rechts vom IRR liegenden DNA-Abschnitts durch *Sph*I-Spaltung in entsprechend gespaltenen pUC18. Bei Vorliegen eines Cointegrats *Eco*RV/*Stu*I-Spaltung (jeweils keine Schnittstelle innerhalb von pKGT452C β) der Gesamt-DNA und Religation. Bei normal verlaufener Transposition Klonierung in *Sma*I-gespaltenen Vektor. Anschließende Elektroporation nach *E. coli* DH5 α MCR oder JM109.
- 4) Ansequenzierung der klonierten Fragmente mittels IRL-, IRR-, uni- und rev-Primer (Sequenzen siehe Material und Methoden, Seite 28) und anschließendes "primer-walking" entlang des klonierten DNA-Fragments. In späterer Phase Abgleich mit den seit Mitte 2002 eintreffenden Daten aus dem *Cmm*-Genomprojekt.
- 5) Identifizierung des unterbrochenen Gens/der Genregion durch BLAST-Datenbankabfrage (ALTSCHUL *et al.*, 1997).
- 6) Synthese einer oder mehrerer Sonden anhand der Sequenzdaten mittels PCR für die Hybridisierung.
- 7) Suche eines den Bereich abdeckenden Cosmids in der Cosmidbank mittels Koloniehybridisierung.
- 8) Kontrolle der durch Koloniehybridisierung gefundenen Cosmide durch Spaltung/Southern-Hybridisierung gespaltenen Cosmid-DNA im Vergleich zu gespaltenen Gesamt-DNA.
- 9) Klonierung der DNA-Fragmente, die zur Komplementation der Mutanten verwendet werden sollen, in *E. coli*-Kloniervektoren, evtl. Subklonierungen.
- 10) Umklonierung der DNA-Fragmente in den *E. coli*-*Cmm*-Shuttle-Vektor pDM302, Elektroporation nach *Cmm*.
- 11) Test auf erfolgreiche Komplementation.

Im Folgenden soll auf die Charakterisierung einiger Mutanten eingegangen werden. Zuvor jedoch eine Beschreibung des Screenings der Mutanten mit Hilfe des Pflanzentests:

1 Test der Virulenz von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-Mutanten *in planta*

Es gibt zwei Varianten der Methode zur Infektion der Pflanzen mit *Cmm*, die Petiolusinfektion und die Wurzelinfektion (siehe Material und Methoden, Kapitel 10). Die Wurzelinfektion hat den Vorteil, dass der sehr limitierte Stellraum in der Klimakammer zur Pflanzenanzucht aufgrund der kleineren Töpfe deutlich besser ausgenutzt werden kann und die Pflanzen schneller Welkesymptome entwickeln, da sie in einem früheren Stadium infiziert worden sind. Da zum Test von Mutanten *in planta* sehr große Mengen an Pflanzen benötigt wurden, wurde diese Infektionsart im Screening eingesetzt.

Als Kontrolle dienten bei den einzelnen Pflanzentests der Wildtypstamm *Cmm* NCPPB382 sowie die Derivate CMM101 (nur das kleine endogene Plasmid pCM1 ist vorhanden, wie in den Transposon-Mutanten, etwas verzögerte und schwächere Welke) und CMM100 (kein Plasmid vorhanden, keine Welke). Es zeigte sich schnell, dass dieser biologische Test mit lebenden Organismen, die miteinander interagieren und konkurrieren, sehr großen Schwankungsbreiten unterworfen ist. Dies kann zwar theoretisch dadurch aufgefangen werden, dass sehr viele Pflanzen getestet werden und versucht wird, die Parameter, wie Größe der infizierten Pflanzen, verwendete Komponenten usw., möglichst konstant zu halten, stößt allerdings relativ schnell an logistische und Kapazitätsgrenzen, zumal der Test sich auch als relativ empfindlich gegen äußere Faktoren, wie Qualität der Pflanzerde, Schwankungen in der Beleuchtungsintensität, Jahreszeit usw. herausstellte. Ein derartiger biologischer Test lässt sich letztendlich nicht vollkommen standardisieren. Ein anderer Test - z. B. mit pflanzlichen Zellkulturen - ließ sich bisher nicht etablieren und würde andere Probleme aufwerfen, da es sich um ein artifizielles System handelt.

Es zeigte sich außerdem, dass der bisher als Kenngröße für die Virulenz von *Cmm* eingeführte "Welkeindex" (WI) (MELETZUS *et al.*, 1993) - das ist die Anzahl der Tage, die eine getestete Population von Pflanzen benötigt, bis 50 % von ihnen welken - viel zu grob und nicht aussagekräftig für die Untersuchung von kleinen, graduellen Unterschieden in der Ausprägung der Virulenz ist und bei weniger als 50 % welkenden Pflanzen gänzlich unanwendbar ist. Da es schwer möglich ist, das Welkeverhalten in einer einzigen Kenn-

größe zusammenzufassen, wurde hier eine grafische Darstellung in einem Diagramm gewählt. Die Pflanzen wurden täglich auf ihre Welkesymptome hin untersucht und in fünf Klassen eingeteilt: nicht welkend ("–", keinerlei Welkesymptome), beginnende Welke ("(")", beginnendes Aufbiegen eines Teil-Fiederblatts oder erstes Nachlassen der Turgeszenz eines Teil-Fiederblatts), deutlich ausgeprägte Welke ("+", eindeutig identifizierbare Welkesymptome), stark ausgeprägte Welke ("++", zwei Drittel der Fiederblätter zeigen deutliche Welkesymptome), sowie abgestorbene Pflanze ("tot", die Pflanze besitzt keine grünen Blätter mehr, die zur Photosynthese fähig wären). Die Keimblätter wurden zur Beurteilung der Welkesymptome nicht berücksichtigt, da sie sich auch ohne Infektion mit *Cmm* oft von alleine einrollen und danach abfallen.

Die im Laufe der Arbeit für *Cmm* NCPPB382 und das Derivat CMM101 gesammelten Kontrolldaten sind in Abb. IV.18 und IV.19 zusammengefasst, zusätzlich sind in Abb. IV.20 die Welkesymptome an infizierten und nichtinfizierten Pflanzen exemplarisch anhand von Fotos dargestellt.

Das Screening der Transposon-Mutanten geschah in drei Teilschritten. Im ersten Screening wurde jeweils eine Pflanze mit einer Transposon-Mutante infiziert, also 32 verschiedene Mutanten pro Pflanzschale auf ihre Virulenz getestet. Die nicht oder nur schwächer/verzögert welkeauslösenden Mutanten wurden in einem zweiten Screening, bei dem jeweils fünf Pflanzen mit einer Mutante infiziert wurden, erneut untersucht. Verhielten sie sich weiterhin auffällig, so wurde eine ganze Pflanzschale (32 Pflanzen) mit dieser Mutante infiziert und diese Daten sind in Diagrammform im Folgenden dargestellt. Dieser Test wurde mindestens einmal, meist mehrfach, wiederholt. Die Werte aller Tests sind in einem Diagramm zusammengefasst und entsprechend gekennzeichnet. Ein nicht näher quantifizierbarer, jedoch wahrscheinlich nicht unerheblicher Anteil der getesteten Mutanten ist durch dieses Screening sicherlich als falsch negativ durch das Raster gefallen, aber dies ist die einzige Möglichkeit, mit vertretbarem Aufwand eine große Anzahl von Mutanten zu testen. Auf eine Darstellung der Ergebnisse der beiden ersten Screenings wurde verzichtet, da ihre Aussagekraft aufgrund des sehr kleinen Stichprobenumfangs letztendlich sehr eingeschränkt ist. Von den ca. 1500 getesteten Mutanten zeigten etwa 30 Mutanten auch im letzten Screening noch eine deutlich veränderte Virulenz.

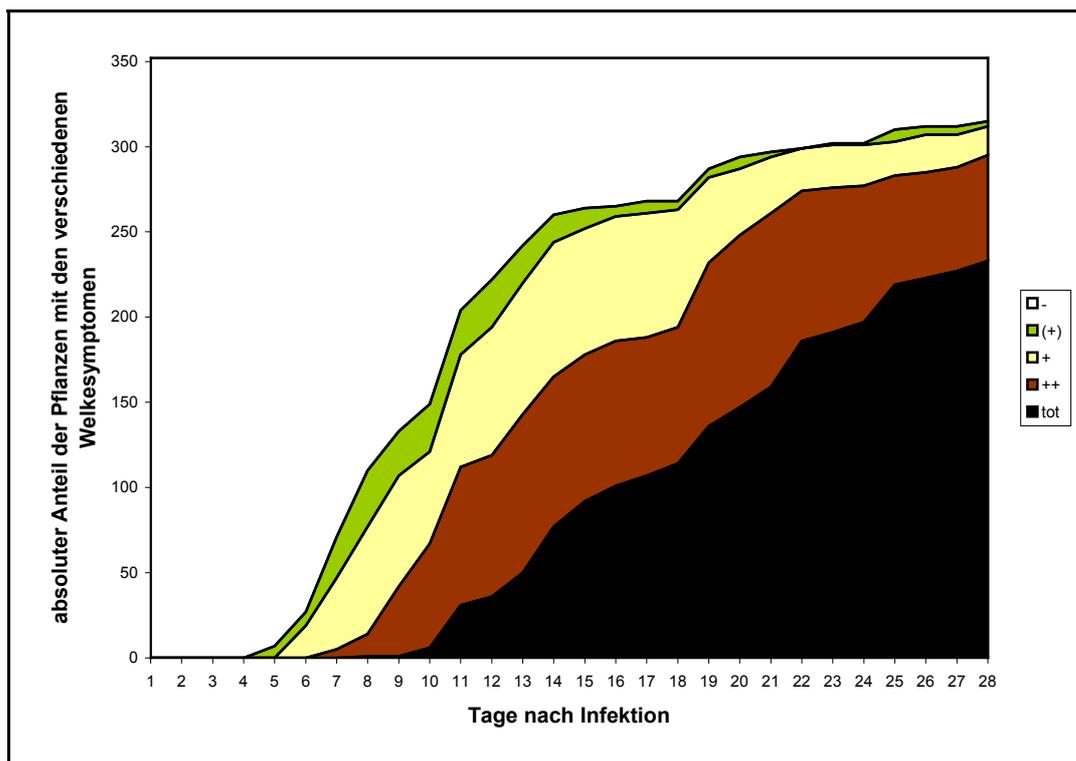


Abb. IV.18: Entwicklung und Verteilung der Welkesymptome über 28 Tage von 352 Testpflanzen, die mit *Cmm* NCPPB382 per Wurzelinfektion infiziert worden sind (Test 1 bis 11) [n=352]. WI: 11 d.

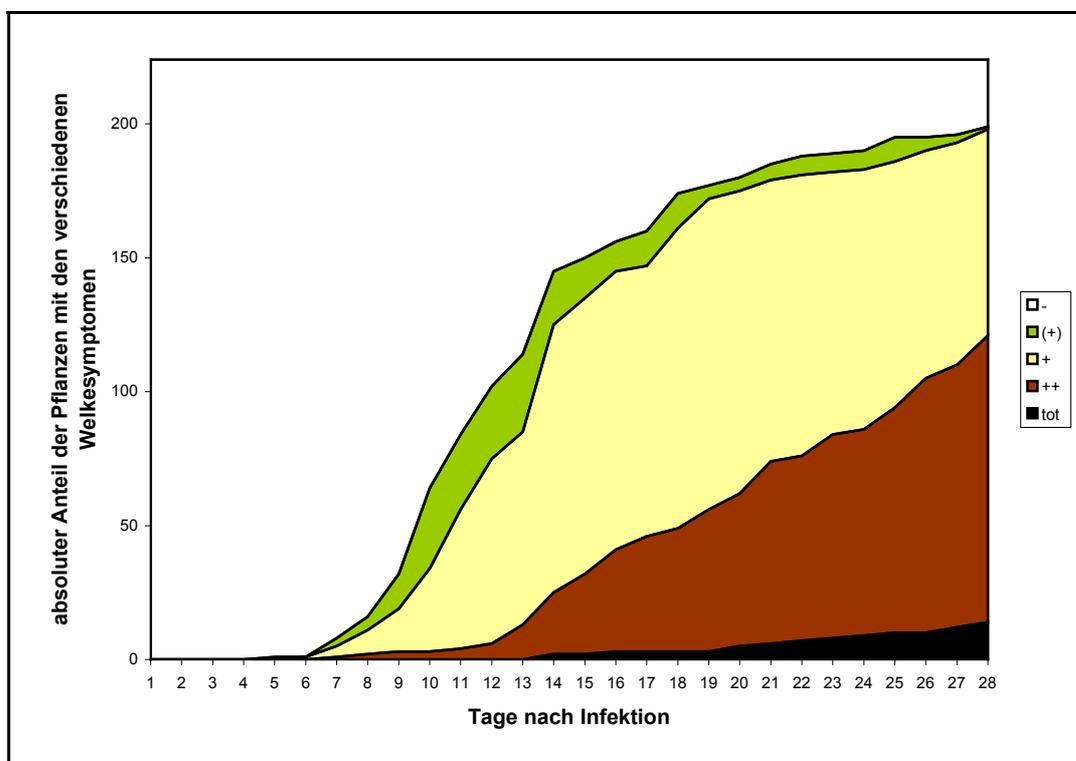


Abb. IV.19: Entwicklung und Verteilung der Welkesymptome über 28 Tage von 224 Testpflanzen, die mit *CMM*101 per Wurzelinfektion infiziert worden sind (Test 1 bis 7) [n=224]. WI: 13,7 d.



A



B



C



D

Abb. IV.20: Fotos der Welkesymptome von 32 Pflanzen 28 Tage nach der Wurzelinfektion mit *Cmm* NCPPB382 (A), CMM101 (B), CMM100 (C) und uninfiziert (D).

2 Titerung von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in planta

Um den Titer der im Xylemsaft der infizierten Tomatenpflanzen vorhandenen Bakterien zu bestimmen, wurden die Pflanzen entweder nach 28 Tagen oder dem jeweils angegebenen Zeitraum mit einer sterilisierten Schere auf Erdhöhe abgeschnitten, gewogen, grob zerkleinert in einen ebenfalls desinfizierten Porzellan-Mörser gegeben und nach der Zugabe von etwas flüssigem Stickstoff zu einem feinkörnigen Granulat zerstoßen. Anschließend wurden das Granulat mit der dem Gewicht der Pflanze entsprechenden Menge (1 g = 1 ml) an PS-Puffer versetzt und bis zu einer homogenen Suspension gemörsert. Von dem Homogenat wurden entsprechende Verdünnungsreihen angelegt und auf C-Medium Platten - beim Wildtyp, CMM100 und CMM101 ohne Antibiotikumzugabe, bei den Derivaten bzw. Mutanten mit dem entsprechenden Antibiotikum - ausplattiert. Die Zahl der Einzelkolonien wurde ermittelt und daraus der Bakterientiter auf 1 g des ursprünglichen Pflanzengewichts bezogen errechnet. Die Ergebnisse sind bei den einzelnen Mutanten angegeben.

3 Transposon-Mutanten

3.1 Transposon-Mutanten mit veränderter Morphologie/Physiologie

3.1.1 Die Transposon-Mutante TM382 β 371-23 - eine schleimigere Mutante mit reduzierter Virulenz

Die Transposon-Mutante TM382 β 371-23 zeichnet sich durch eine besonders glänzende und schleimige Koloniemorphologie auf Platte aus. Dieser Phänotyp trat bei weniger als etwa 0,1 % der erhaltenen Transposon-Mutanten auf. Im Pflanzentest zeigte sich bei dieser Mutante außerdem ein verzögertes Welkeverhalten (Abb. IV.21).

Die Vermutung lag nahe, dass es sich um eine Mutation handelte, die evtl. die Produktion oder Zusammensetzung der Exopolysaccharide (EPS) verändert. Für Exopolysaccharide ist bei Gram-negativen phytopathogenen (z. B. *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Ralstonia* etc.) und symbiotischen (z. B. *Rhizobium*, *Sinorhizobium* etc.) Bakterien ein sehr vielfältiger und entscheidender Einfluss auf die Virulenz vielfach in der Literatur beschrieben (FETT und DUNN, 1989; COPLIN und COOK, 1990; DENNY und BAEK, 1991; COOK und SEQUEIRA, 1991; LEIGH und COPLIN, 1992; NIEHAUS *et al.*, 1993; BECKER und NIEHAUS, 1998; SCHELL, 2000; FRAYSSE *et al.*, 2003).

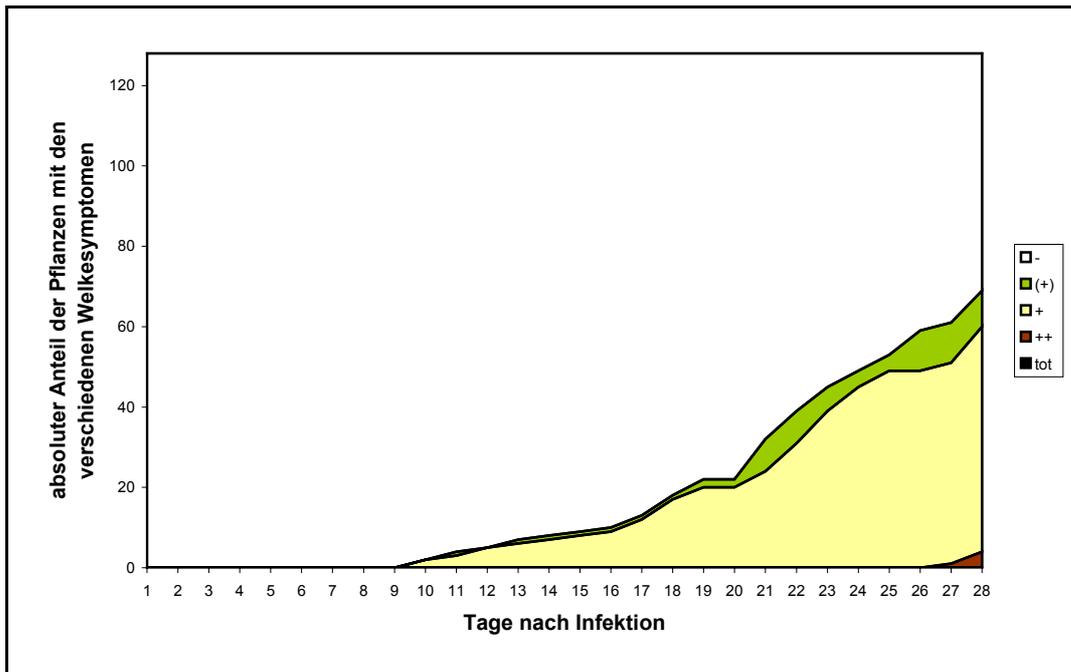


Abb. IV.21: Entwicklung und Verteilung der Welkesymptome über 28 Tage von 128 Testpflanzen, die mit der *Cmm*-Transposon-Mutante TM382 β 371-23 per Wurzelinfektion infiziert worden sind (Test 1 bis 4) [n=128]. WI: > 28 d.

Die Zusammensetzung der von *Cmm* gebildeten Exopolysaccharide wurde von VAN DEN BULK *et al.* (1991) und von BERMPOHL *et al.* (1993, 1996) aufgeklärt. Sie bestehen aus L-Fucose, D-Galaktose und D-Glukose im Gesamtmassenverhältnis von 2:1:1, dekoriert mit Acetat- und Pyruvat-Seitengruppen. Eine abgeschwächte Virulenz von *Cmm*-Mutanten, die nur noch ca. 10 % der ursprünglichen EPS-Menge produzieren, wurde bisher nicht beobachtet (BERMPOHL *et al.*, 1996). EPS an sich scheint bei *Cmm* keine Pathogenitätsdeterminante zu sein, da der plasmidfreie Stamm CMM100, der EPS bildet und die Pflanze ganz normal besiedelt, keinerlei Welkesymptome hervorruft. Es konnte jedoch eine schwache Reduktion der Biomasse beobachtet werden. Die EPS-Zusammensetzung hat demgegenüber Auswirkungen auf die Kolonisationsfähigkeit von verschiedenen natürlichen Isolaten von *Cmm*, wie BERMPOHL *et al.* (1996) zeigen konnten. Es gibt Isolate, die nur sehr wenig EPS produzieren und weder in der Lage sind, die Pflanze effektiv zu kolonisieren, noch Welke auszulösen. Vor diesem Hintergrund schien es vielversprechend, den Mutationsort von TM382 β 371-23 näher zu charakterisieren.

Bei der Charakterisierung der Mutante TM382 β 371-23 durch Southern-Hybridisierung von *Bgl*II-gespaltener Gesamt-DNA gegen die Standard-Sonden (*cmx*, *tnpA*, *celA*, *pat-1*, siehe Abb. VII.1 A - D im Anhang, Seite 160) zeigte es sich, dass es sich um eine

"normale" Transposoninsertion handelt. Bei Verwendung der *cmx*-Sonde tritt ein hybridisierendes Fragment größer als 2071 bp und mit der *tnpA*-Sonde eines größer als 1214 bp auf. Mit der *celA*-Sonde zeigte sich die typische Bande von 3190 bp, d. h. pCM1 ist wahrscheinlich vorhanden. Wie bei allen daraufhin getesteten Transposon-Mutanten wurde pCM2 verloren, da die 3,75 kb große hybridisierende Bande von *pat-1* fehlt und nur die ca. 11 kb große Bande der chromosomalen Homologie *chpA* nachweisbar ist. Die das Transposon flankierenden Bereiche wurden mit der üblichen Methode (siehe generelle Strategie) kloniert und ansequenziert.

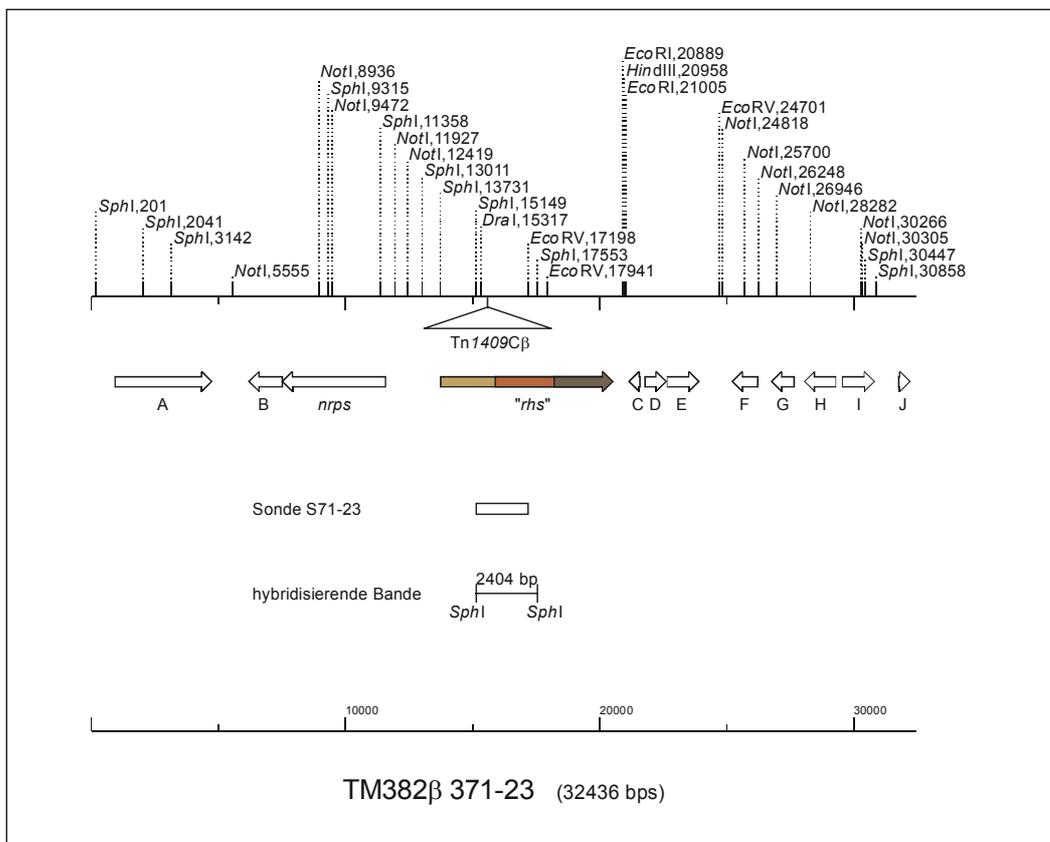


Abb. IV.22: Physikalische Karte des den Insertionsort von Tn1409Cβ umgebenden DNA-Bereichs im Chromosom von TM382β 371-23 (oberste Linie). Darunter die Gene/ORFs als Pfeile (Bezeichnungen/Homologien in Tab. IV.6). Das unterbrochene Gen ("*rhs*") ist in braun dargestellt, die verschiedenen Bereiche (siehe Text) in unterschiedlichen Brauntönen. Eine Zeile darunter schematisch die Lage der Sonde, die zur Suche von Cosmiden per Koloniehybridisierung in der Genbank verwendet wurde, sowie in der nächsten Zeile die bei der Southern-Hybridisierung mit *SphI*-gespaltener Gesamt-DNA auftretende hybridisierende Bande.

Das Transposon ist in einen potentiellen ORF (in Abb. IV.22 "*rhs*" genannt) inseriert, der 6774 bp lang ist und für ein Protein von 2258 Aminosäuren kodieren könnte, was für ein bakterielles Protein sehr groß ist. Teile des von diesem ORF kodierten Proteins zeigen bei

einer BLAST-Abfrage (ALTSCHUL *et al.*, 1997) Ähnlichkeiten zu einer Reihe von sehr großen Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen: zu zellwandassoziierten Proteinen, zu einer Zellulosebindedomäne, zu Glukosidasen und zu Rhs-Proteinen (vergl. Tab. IV.6). Eine direkte Verbindung zu dem Phänotyp, der eine veränderte EPS-Menge oder -Struktur aufweisen könnte, ist erst einmal nicht zu erkennen, da die o. g. Proteine in der Literatur nicht in Verbindung mit der EPS-Biosynthese gebracht werden. Sekundäreffekte können natürlich nicht ausgeschlossen werden.

Tab. IV.6: Gene/ORFs im den Insertionsort von TnJ409C β umgebenden DNA-Bereich im Chromosom von TM382 β 371-23 (Abb. IV.22) mit ausgewählten Homologien aus der BLAST-Datenbankabfrage .

ORF	Protein	Organismus	Acc.Nr.	e-W	I/Ä	Ü
"rhs"	hypothetisches Protein	<i>M. degradans</i> 2-40	ZP_00066765	6e-20	37/60	~300
	ähnlich zu zellwandassoz. Protein- vorläufer WapA von <i>B. subtilis</i>	<i>L. innocua</i>	NP_469798	7e-19	28/45	~500
	Zellulosebindedomäne 6	<i>B. anthracis</i> A2012	NP_655005	3e-16	25/46	~730
	Glukan 1,4-beta-Glukosidase	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306	NP_644530	4e-13	28/43	~430
	RhsA	<i>S. clavuligerus</i>	AAC32486	7e-06	26/40	~400
<i>nrps</i>	nichtribosomale Peptidsynthetase	<i>S. avermitilis</i>	BAB69370	0.0	57/69	921
	nichtribosomale Peptidsynthetase	<i>C. efficiens</i> YS-314	NP_739167	0.0	51/66	882
A	Prolin Dehydrogenase 1-Pyrrolin-5-carboxylat Deh.	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	NP_599351	0.0	50/65	1193
		<i>C. efficiens</i> YS-314	NP_736711	0.0	49/65	1191
B	Metallopeptidase Metallopeptidase	<i>S. avermitilis</i>	BAB69371	9e-99	48/60	442
		<i>C. efficiens</i> YS-314	NP_736963	8e-92	43/56	458
C	hypothetisches Protein regulator. Prot. der AsnC-Familie	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	NP_216840	9e-30	48/69	142
		<i>S. coelicolor</i> A3 (2)	NP_625510	3e-29	49/68	142
D	hypothetisches Protein Prot. der Amidinotransferase-Fam. Bleomycin-Res. verstärkend. Prot.	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	NP_216839	4e-72	53/65	266
		<i>C. elegans</i>	NP_508952	3e-39	36/53	269
		<i>S. verticillus</i>	2104260F	7e-14	30/44	211
E	Ornithin-Aminotransferase Ornithin-Aminotransferase	<i>S. coelicolor</i> A3 (2)	NP_625512	e-135	68/77	391
		<i>B. subtilis</i>	NP_391914	e-119	54/69	385
F	hypothetisches Protein Permease der DMT-Superfamilie	<i>V. cholerae</i>	NP_230955	9e-25	32/54	272
		<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	BAB97998	2e-23	31/54	276
G	UDP-Galactose-4-Epimerase UDP-Galactose-4-Epimerase	<i>M. loti</i>	NP_103218	1e-32	32/50	299
		<i>A. tumefaciens</i>	NP_354938	1e-24	31/46	300
H	Membran-Transportprotein Benzoat-Transportprotein	<i>S. meliloti</i>	NP_386459	2e-56	46/64	372
		<i>A. tumefaciens</i> str. C58	NP_532938	4e-53	43/61	372
I	Metallopeptidase hypothetisches Protein	<i>X. fastidiosa</i> Temecula1	NP_778381	6e-24	44/59	122
		<i>X. fastidiosa</i> 9a5c	NP_297460	7e-24	44/59	122
J	hyp. Prot. in der MEL C2-RNHH intergenischen Region hypothetisches Protein	<i>S. lincolnensis</i>	CAA65001	4e-39	54/69	149
		<i>S. coelicolor</i> A3 (2)	NP_631266	2e-35	48/65	150

e-W: e-Wert; I/Ä: Identität und Ähnlichkeit auf Aminosäure-Ebene in %; Ü: überlappender Bereich.

Mit Hilfe der Daten aus dem *Cmm*-Genomprojekt konnte die DNA-Region auf die in Abb. IV.22 gezeigte Größe erweitert werden. Die Homologien der potentiellen ORFs zu

bekannten Genen sind in Tab. IV.6 aufgeführt. Die angrenzenden ORFs ergeben im BLAST-Vergleich leider ein sehr uneinheitliches Bild. Von vielen homologen Proteinen ist die Funktion nicht bekannt oder nur wieder aufgrund von Homologien postuliert.

Sucht man per PSI-BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) nur nach bakteriellen Genprodukten, zu denen das vom ORF "rhs" kodierte Protein Ähnlichkeiten zeigt, so treten ab der 2. Iteration die Rhs- und Rhs-verwandten Proteine deutlicher hervor (Anhang, Seite 184). Aufgrund der Größe des Proteins können Ähnlichkeiten zu anderen extrem großen Proteinen natürlich nur vorgetäuscht sein, bei den meisten der homologen Proteine scheint es sich aber um zellwandgebundene oder -assoziierte Proteine zu handeln.

Man kann das potentielle Rhs-Protein aufgrund der Homologien grob in drei Teilbereiche unterteilen (siehe auch Abb. IV.22/IV.23). Der erste Bereich (AS 1 - 400) zeigt schwache Homologien zu zellwandassoziierten Proteinen, der zweite Bereich (AS 714 - 1488) zu großen, multifunktionalen, sekretierten Proteinen und zu Glukosidasen und der dritte Bereich (AS 1489 - 2258) zu Rhs- bzw. Rhs-ähnlichen Proteinen.

Bei den Rhs-Proteinen (ZHAO und HILL, 1995; WANG *et al.*, 1998; HILL, 1999), die zuerst in *E. coli* beschrieben wurden, handelt es sich um Proteine, deren Funktion unbekannt ist. Das Kürzel "rhs" steht für "recombination hot spot" und beschreibt die größte Auffälligkeit bei diesen Proteinen bzw. der DNA-Region, in der sie zu finden sind, nämlich ein Ort zu sein, in dem häufig eine bestimmte Art von Rekombinationen stattfinden. Eine typische Rhs-Region in *E. coli* besteht aus einer so genannten Kernregion ("core", ca. 3,8 kb), die von einem einzigen ORF überspannt wird. Am N-Terminus des kodierten Proteins ist meist ein Signalpeptid lokalisiert. Die Kernregion des Gens ist in *E. coli* durch einen erhöhten GC-Gehalt (> 60 %) der DNA charakterisiert. Für das Protein ist das vielfach wiederholte, konservierte Motiv YDxxGRL(I/T) (HILL, 1999) typisch, zwischen denen sich ein Glycin an relativ konservierten Positionen befindet.

An die Kernregion schließt sich die so genannte Kernverlängerung ("core extension", 400 - 600 bp) an, deren Charakteristikum darin besteht, dass diese Region zwischen verschiedenen Rhs-Elementen ausgetauscht werden kann und keine Homologien zwischen diesen "core extensions" vorliegen. Der GC-Gehalt liegt bei < 45 %. Der für das Kernprotein kodierende ORF wird am 3'-Ende der "core extension" oft von dem sog. dsORF ("downstream ORF") gefolgt bzw. überlappt, der einen ebenso niedrigen GC-Gehalt hat und in den einzelnen Rhs-Elementen nicht konserviert ist. Rhs-Elemente sind in weiteren Gram-negativen Arten beschrieben worden (*Salmonella typhi*, *S. typhimurium*, *S. paratyphi*,

Yersinia pestis, *Pseudomonas aeruginosa* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) (HILL, 1999).

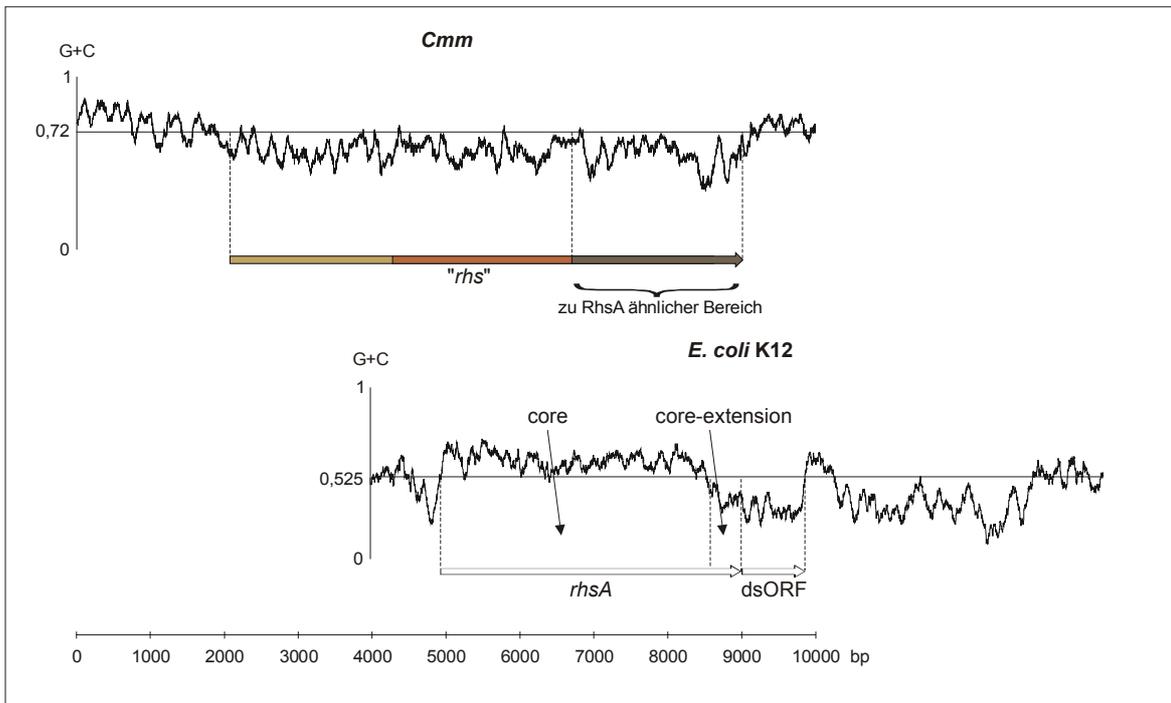


Abb. IV.23: Grafische Darstellung des Verlaufs des GC-Gehalts der DNA im Bereich eines typischen Rhs-Elements von *E. coli* (unten) und im Bereich der in TM382 β 371-23 unterbrochenen DNA-Region. Bei *E. coli* ist der erhöhte GC-Gehalt der DNA in der "core"-Region und der erniedrigte GC-Gehalt in der "core-extension" und im "dsORF" gut zu erkennen. Bei *Cmm* ist ein leicht verringerter GC-Gehalt in dieser Region zu beobachten. Die waagerechte Linie bei 0,72 bzw. 0,525 gibt den durchschnittlichen GC-Gehalt des gesamten Chromosoms von *Cmm* bzw. *E. coli* an. Die GC-Kurve ist auf dem Mittelwert von 100 bp-Bereichen mit dem Programm "GeneQuest" aus dem "LaserGene/DNAStar"-Paket errechnet.

Das in *Cmm* identifizierte Gen lässt bis auf die Sequenzhomologie des kodierten potentiellen Proteins keine der sonst für Rhs-Elemente typischen Merkmale erkennen, wie die Aufteilung in höher konservierte Kernregion und nicht konservierte Kernerweiterung oder ein repetitives Motiv im kodierten Protein. Einzig der durchschnittliche GC-Gehalt der DNA im kodierenden Bereich liegt mit ca. 60 % signifikant niedriger als die für *Cmm* üblichen ca. 72 % (siehe auch Abb. IV.23). Bereits über Sequenzhomologien zugeordnete Rhs-Proteine bzw. Rhs-ähnliche Proteine aus *Streptomyces coelicolor* weisen eine deutlich höhere Ähnlichkeit zu denen aus *E. coli* auf, als das hier in *Cmm* inaktivierte Gen. Deshalb ist es noch fraglich, ob es sich tatsächlich um ein Rhs-ähnliches Protein handelt. Über die Funktion von Rhs-Elementen ist praktisch nichts bekannt, auch wenn ihnen eine wichtige Rolle in der Evolution und Anpassung von *E. coli* zugeschrieben wird (WANG *et al.*, 1998;

HILL, 1999). Insofern kann ein Zusammenhang mit dem Phänotyp dieser Mutante, die eine veränderte Schleimigkeit aufweist, direkt nicht hergestellt werden. Rhs-Elemente scheinen auf jeden Fall in *E. coli* nicht essentiell zu sein, da es auch *E. coli*-Stämme gibt, die keine Rhs-Elemente aufweisen (HILL, 1999). Auch ein Verweis auf mögliche Sekundäreffekte bzgl. der EPS-Biosynthese bleibt Spekulation.

Die in der Umgebung lokalisierten Gene geben ebenfalls keinen Aufschluss über die mögliche Funktion des inaktivierten Proteins und dessen Auswirkungen auf die schleimige Koloniemorphologie. Eine Operonstruktur ist augenscheinlich nicht vorhanden. Interessant ist das Vorhandensein eines potentiellen UDP-Galaktose-4-Epimerase-Gens (ORF G) in der Nähe. Das Genprodukt (in der Literatur oft mit Gale bezeichnet) katalysiert die Epimerisierung von UDP-Galaktose zu UDP-Glukose bzw. umgekehrt. Diese Reaktion wird als Teil der bakteriellen EPS-Biosynthese vielfach in der Literatur beschrieben (z. B. LAWS *et al.*, 2001). Da das EPS von *Cmm* aus L-Fucose, D-Glukose und D-Galaktose aufgebaut ist, könnte es sich um die UDP-Galaktose-4-Epimerase handeln, die die entsprechenden Zuckerbausteine je nach Vorhandensein ineinander umwandelt, bevor sie in das EPS eingebaut werden. In *Erwinia amylovora* führt die Deletion des *gale*-Gens zu einer verringerten Virulenz (METZGER *et al.*, 1994). Im Genom von *Erwinia amylovora* liegt das *gale*-Gen, wie das *galT*- (Galaktose-1-Phosphat-Uridylyltransferase) und *galK*-Gen (Galaktokinase), im Gegensatz z. B. zum Genom von *E. coli*, nicht in einem Galaktoseoperon, sondern über das Genom verteilt und getrennt vom eigentlichen EPS-Biosynthesecluster. Insofern muss es sich hier in *Cmm* nicht zwangsläufig um eine Region handeln, die insgesamt mit der EPS-Biosynthese von *Cmm* in Zusammenhang steht. Für zukünftige Experimente wäre es interessant zu sehen, wie sich eine Deletion/Unterbrechung des *gale*-Gens auf die Zusammensetzung der EPS von *Cmm* auswirkt. Ebenfalls interessant für weitere Untersuchungen könnte die direkt "downstream" gelegene potentielle nichtribosomale Peptid-synthetase sein, auch wenn dies nicht in Zusammenhang mit der EPS-Biosynthese steht. Die von dieser Klasse von Enzymen synthetisierten Peptide spielen jedoch eine vielfältige Rolle auch in der Bakterien-Pflanzen-Interaktion.

Zur Komplementation des Phänotyps wurden in der *Cmm* Cosmid-Genbank (GRÄFEN, 2001) per Koloniehybridisierung Cosmide identifiziert, die den gesuchten Bereich abdecken (ABT, 2003). Dazu wurde per PCR mit Gesamt-DNA von *Cmm* und den Primern S71-23#1 und S71-23#2 (siehe Material und Methoden, Seite 28) ein Teil des "*rhs*"-Gens amplifiziert und anschließend Digoxigenin-11-dUTP-markiert. Die Lage der Sonde S71-

23 ist in Abb. IV.22 skizziert. Es konnten bei der Koloniehybridisierung sieben Cosmide identifiziert werden, die positive Signale erzeugten. Die identifizierten Cosmide wurden durch eine Restriktionsanalyse weiter charakterisiert. Nur eines von ihnen (cos2/32) enthielt den gesuchten Bereich (Daten nicht gezeigt). Die Daten aus dem Genomprojekt ließen zu diesem Zeitpunkt noch keine geeigneten Schnittstellen für eine Klonierung des gesamten das potentielle *rhs*-Gen überspannenden DNA-Bereichs erkennen. Erst neueste Daten, die eine Verlängerung des Contigs auf die in Abb. IV.22 gezeigte Größe ermöglichten, zeigen, dass eine Klonierung mit *NotI*-, *NotI/EcoRI*- oder *NotI/HindIII* möglich ist. Eine Komplementation der *Rhs*-Mutante ist daher in Zukunft möglich.

3.1.2 Die Transposon-Mutante TM100β 113-35 - eine pigmentfreie Mutante

Wie in der Einleitung zum Abschnitt B des Ergebnisteils bereits erwähnt, treten unter den Transposon-Mutanten regelmäßig Farbmутanten auf. Unter insgesamt ca. 35.000 Mutanten von *Cmm* und 8.000 Mutanten von CMM100 konnten etwa 240 Mutanten (~ 0,6 %) mit veränderter Koloniefarbe - von blassgelb über farblos bis rosa - identifiziert werden. Die ersten von ihnen (CMM100) wurden im Rahmen eines Laborpraktikums von J.F. LUDEWIG mittels Southern-Hybridisierung charakterisiert. Es fiel auf, dass diese Mutanten ein Hybridisierungsmuster aufwiesen, was nicht einer "normalen" Transposoninsertion entsprach, sondern entweder auf eine Cointegratbildung oder eine (evtl. illegitime) Rekombination hindeutete, da bei allen auch mit der pUC-Sonde eine oder mehrere hybridisierende Banden zu erkennen waren. Es wurde trotzdem mit den verschiedenen Standardstrategien (siehe Einleitung zu Kapitel B im Ergebnisteil, *BglI*-, *SphI*- bzw. *EcoRV/StuI*-Klonierung und anschließende Ansequenzierung) versucht, die Mutationsorte bei 11 Mutanten zu charakterisieren. Nur bei einer von ihnen - TM100β 113-35 - führten Klonierung und Ansequenzierung zu verwertbaren Ergebnissen. Southern-Hybridisierungen und Restriktionsanalysen des klonierten DNA-Bereiches, in den das Transposon inseriert ist, deuteten drauf hin, dass es sich bei der Insertion um ein nicht korrekt aufgelöstes Cointegrat oder um eine (illegitime) Rekombination handeln könnte (Daten nicht gezeigt).

Das durch die Mutation in TM100β 113-35 unterbrochene Gen konnte in BLAST-Datenbankabfragen (ALTSCHUL *et al.*, 1997) als *crtB*-Gen identifiziert werden, welches für die Phytoen-Synthase, ein Enzym der Carotinoid-Biosynthese, kodiert (vergl. Abb. IV.24 und Tab. IV.7). Die Insertion liegt 442 bp hinter dem möglichen ATG Startcodon und teilt das

kodierte Protein etwa in der Mitte. Auffällig ist, dass das *crtB*-Gen ohne Stopcodon im gleichen Leseraster direkt in das folgende *crtI*-Gen (Phytoen-Desaturase) übergeht, welches ebenfalls für ein Enzym der bakteriellen Carotinoid-Biosynthese kodiert. Das *crtI*-Gen besitzt jedoch weiterhin ein eigenes potentiellles ATG Start-Codon 1047 bp stromabwärts des Start-Codons von *crtB*. Bei dem von den beiden Genen kodierten Protein handelt es sich offensichtlich um ein echtes Fusionsprotein aus den beiden Proteinen CrtB (Phytoen-Synthase) und CrtI (Phytoen-Desaturase), die durch einen etwa 33 Aminosäure großen Linker verbunden sind. Das kodierende Gen wurde deshalb *crtBI* genannt. Weitere Sequenzierung über "primer-walking" zeigte, dass in diesem DNA-Abschnitt eine Operonstruktur vorliegt, die das komplette Carotinoid-Biosynthese-Operon umfasst.

Durch die später hinzu gekommenen Sequenzinformationen aus dem Genomprojekt konnten die gesamte Region und die Insertionsstelle identifiziert werden. Sie ist in Abb. IV.24 schematisch dargestellt, die Gene/ORFs in Tab. IV.7. Das ebenfalls in Abb. IV.24 dargestellte GC-Verhältnis der DNA in diesem Bereich zeigt keine signifikanten Abweichungen von dem durchschnittlichen GC-Gehalt von ca. 72 %, wie es für sog. "house-keeping"-Gene zu erwarten ist.

Da es sich um eine Mutante handelt, die nicht durch eine "normale" Transposoninsertion hervorgerufen wurde, sondern die Hybridisierungen und Spaltungen der Gesamt-DNA bzw. des klonierten Fragments aus der Mutante auf ein nicht korrekt aufgelöstes Cointegrat oder eine nicht korrekt verlaufene Transposition mit anschließender Integration des Mutagenese-Vektors über homologe Rekombination hindeuteten, sollte als erstes ein Cosmid zur Komplementation gefunden werden. Per Temperatur-Gradienten-PCR wurde die Sonde S113-35 mit den beiden Primern S113-35#1 und S113-35#2 (Sequenz siehe Material und Methoden, Seite 28) und Gesamt-DNA von *Cmm* als Template amplifiziert. Das aus dem Gel eluierte und anschließend Digoxigenin-11-dUTP-markierte PCR-Produkt von 1950 bp Größe wurde als Sonde für die Koloniehybridisierung und die Hybridisierung von gespaltener Cosmid-DNA eingesetzt. Ein Cosmid (cos2/27) konnte identifiziert werden, das das komplette Carotinoid-Biosynthese-Operon von *Cmm* trägt (ABT, 2003).

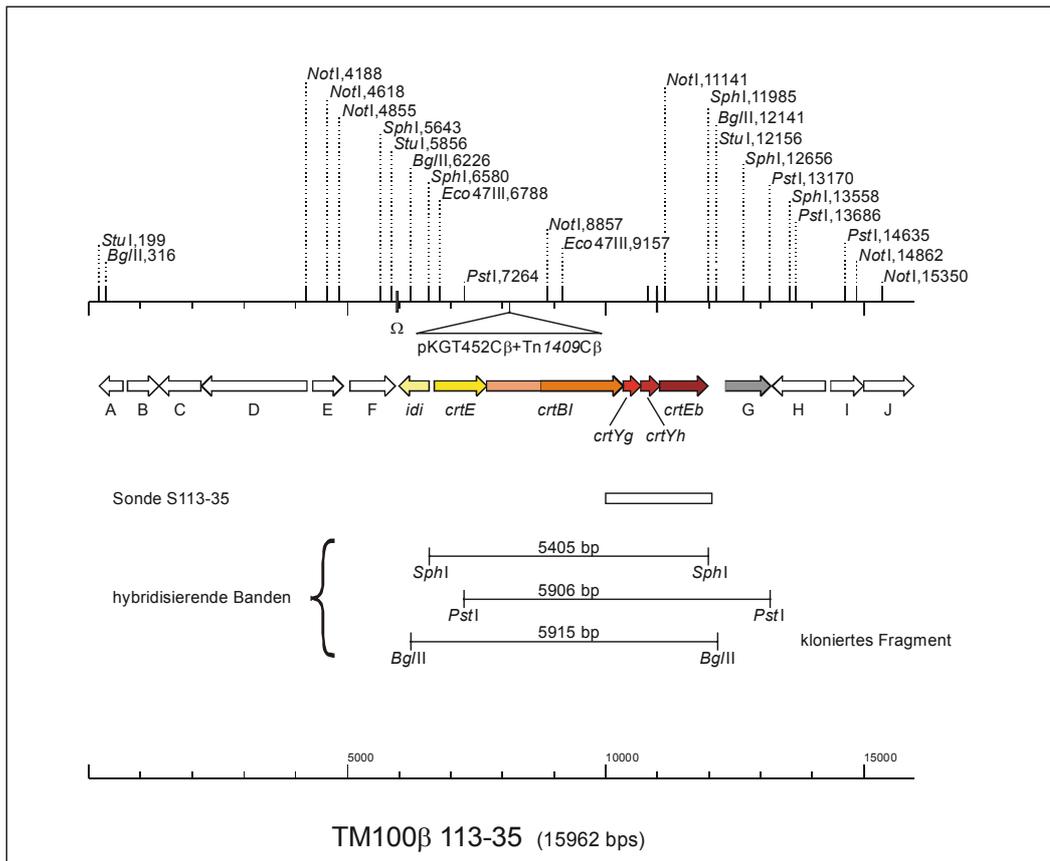


Abb. IV.24: Physikalische Karte des den Insertionsort von Tn1409Cβ umgebenden DNA-Bereichs im Chromosom von TM100β 113-35 (oberste Linie). Darunter die Gene/ORFs als Pfeile (Bezeichnungen/Homologien in Tab. IV.7). Ω: pot. Terminator. Das unterbrochene Carotinoid-Biosynthese-Cluster ist in gelb bis rot dargestellt. Eine Zeile darunter schematisch die Lage der Sonde, die zur Suche von Cosmiden per Koloniehybridisierung in der Cosmidbank verwendet wurde, sowie in den nächsten Zeilen die bei der Southern-Hybridisierung mit *SphI*-, *PstI*- und *BglII*-gespaltener Gesamt-DNA von *Cmm* auftretenden hybridisierenden Banden. Das *BglII*-Fragment aus dem Cosmid cos2/27 wurde letztendlich zur Komplementation kloniert. Unten: GC-Verhältnis im dargestellten DNA-Bereich. Die waagerechte Linie bei 0,72 symbolisiert den durchschnittlichen GC-Gehalt des gesamten Chromosoms von *Cmm*. Die GC-Kurve ist auf dem Mittelwert von 100 bp-Bereichen mit dem Programm "GeneQuest" aus dem "LaserGene/ DNASStar"-Paket errechnet.

Tab.IV.7: Gene/ORFs im den Insertionsort von Tn1409C β umgebenden DNA-Bereich im Chromosom von TM100 β 113-35 (siehe Abb. IV.24) mit ausgewählten Homologien aus der BLAST-Datenbankabfrage.

ORF	Protein	Organismus	Acc.Nr.	e-W	I/Ä	Ü
<i>idi</i>	Isopentylpyrophosphat-Isomerase	<i>A. mediolanus</i>	AAM94361	7e-53	68/77	166
	Isopentylidiphosphat- δ -Isomerase	<i>B. linens</i>	AAF65591	2e-46	55/65	178
	Isopentenylidiphosphat-Isomerase	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	NP_601504	5e-46	54/70	173
<i>crtE</i>	GGPP Synthetase	<i>B. linens</i>	AAF65590	8e-55	38/55	329
	Geranylgeranylpyrophosphat-Synth.	<i>A. mediolanus</i>	AAM94362	2e-47	44/58	313
	GGPP Synthetase	<i>B. flavum</i>	AAK64296	7e-44	35/52	311
<i>crtBI</i>	Fusionsprotein aus:					
	Phytoen-Synthase	<i>A. mediolanus</i>	AAM94363	5e-75	57/66	303
	Phytoen-Synthetase	<i>B. flavum</i>	AAK64298	1e-60	44/60	279
	Phytoen-/Squalensynthetase	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	NP_599859	2e-59	43/59	296
	Phytoen-Synthase und	<i>B. linens</i>	AAF65581	1e-51	45/56	282
	Phytoen-Desaturase	<i>A. mediolanus</i>	AAM94364	e-156	60/72	515
	Phytoen-Desaturase	<i>B. flavum</i>	AAK64299	e-145	52/65	524
	Phytoen-Dehydrogenase	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	NP_599858	e-144	52/65	524
Phytoen-Desaturase	<i>B. linens</i>	AAF65582	e-136	54/68	517	
<i>crtYg</i>	C ₅₀ -Carotinoid- ϵ -Zyklase	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	NP_599857	3e-18	49/68	97
	C ₅₀ -Carotinoid- ϵ -Zyklase	<i>B. flavum</i>	AAK64300	5e-18	47/66	95
	Lycopin- ϵ -Zyklase-Isoprenoid- Transferase A	<i>A. mediolanus</i>	AAM94365	2e-17	46/62	107
	C ₅₀ -Carotinoid- ϵ -Zyklase	<i>C. efficiens</i> YS-314	NP_737249	1e-16	50/69	100
<i>crtYc</i>	C ₅₀ -Carotinoid- ϵ -Zyklase	<i>C. efficiens</i> YS-314	NP_737248	4e-07	33/55	106
	Lycopin- ϵ -Zyklase-Isoprenoid- Transferase B	<i>A. mediolanus</i>	AAM94366	5e-06	37/56	111
	C ₅₀ -Carotinoid- ϵ -Zyklase	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	NP_599856	6e-06	39/66	63
	C ₅₀ -Carotinoid- ϵ -Zyklase	<i>B. flavum</i>	AAK64301	2e-05	39/66	63
<i>crtEb</i>	Lycopin- ϵ -Zyklase-Isoprenoid- Transferase C	<i>A. mediolanus</i>	AAM94367	2e-77	59/72	298
	4-Hydroxybenzoat-Polyprenyltransf.	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	NP_599855	2e-70	54/69	281
	Lycopin-Elongase	<i>B. flavum</i>	AAK64302	4e-70	54/69	281
A	unbekannt	<i>P. multocida</i>	NP_245758	3e-18	42/46	151
	Septicolysin	<i>C. septicum</i>	CAD62161	2e-08	26/50	151
B	unbekannt	<i>R. erythropolis</i>	AAC77476	5e-11	29/45	181
	Transkriptions-Regulator	<i>S. coelicolor</i> A3 (2)	NP_624661	6e-11	36/52	156
	Transkriptions-Reg., TetR-Fam.	<i>M. tuberculosis</i>	NP_215205	4e-10	35/51	135
C	Dehydrogenase-homolog	<i>L. monocytogenes</i>	NP_465699	7e-43	44/60	250
	3-Oxoacyl-(Acyl Carrier Protein)- Reduktase	<i>O. iheyensis</i> HTE831	NP_691913	2e-35	42/58	246
D	Antibiotikum-Transporter	<i>S. globisporus</i>	AAL06682	e-107	40/60	669
	Antibiotikum-Transport assoziiertes Protein actII-3	<i>S. coelicolor</i> A3 (2)	NP_629234	e-107	43/59	636
E	Transkr.-Reg. der MarR-Familie	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	NP_599862	6e-07	31/52	139
	hypothetisches Protein	<i>B. linens</i>	AAF65593	6e-07	30/48	141
F	hypothetisches Protein	<i>S. coelicolor</i> A3 (2)	NP_629464	4e-37	40/56	287
	pot. Transmembran-Lipoprotein	<i>R. solonacearum</i>	NP_519299	8e-09	29/41	259
	hypothetisches Protein	<i>X. fastidiosa</i> 9a5c	NP_297359	1e-06	30/43	218
G	hypothetisches Protein	<i>M. loti</i>	NP_104793	0.28	23/39	217
H	pot. Regulatorprotein	<i>S. coelicolor</i> A3 (2)	NP_625415	2e-33	41/58	229
	pot. Transkr.-Reg. der LysR-Fam.	<i>S. coelicolor</i> A3 (2)	NP_625268	3e-24	36/48	268
I	hypothetisches Protein	<i>S. coelicolor</i> A3 (2)	NP_625416	2e-27	62/70	129
J	hypothetisches Protein*	<i>P. abyssi</i>	NP_126249	4e-10	24/43	335
	hypothetisches Protein*	<i>P. furiosus</i> DSM 3638	NP_579346	7e-09	23/43	326

*: vorausgesagtes Membranprotein; e-W: e-Wert; I/Ä: Identität und Ähnlichkeit auf Aminosäure-Ebene in %; Ü: überlappender Bereich.

Das 5915 bp große *Bg*/II-Fragment (vergl. Abb. IV.24) von *cos2/27*, welches das gesamte Carotinoid-Biosynthese-Operon von *Cmm* enthält, wurde in *Bam*HI-gespaltene pT19MECA2 (Abb. IV.14, Seite 69) ligiert und nach *E. coli* DH5 α MCR elektroporiert. Überraschenderweise waren etwa 50 % der erhaltenen Klone mit Insert nicht farblos, wie bei einer Unterbrechung des *lacZ* α -Fragments des Vektors durch ein inseriertes Fragment zu erwarten, sondern kräftig gelb gefärbt. Restriktionsanalysen ergaben, dass nur die Fragmente, die in α -Orientierung (also in gleicher Richtung, wie das *lacZ* α -Fragment) ligiert worden waren (pOKU9-113-35 α , Abb. VII.17, Seite 168), zu gelben Kolonien führten, nicht jedoch die β -Orientierung (pOKU9-113-35 β). Dies deutet darauf hin, dass das Carotinoid-Biosynthese-Operon von *Cmm* in *E. coli* zwar generell funktional ist, der eigene Promotor aus *Cmm* in *E. coli* aber keine oder nur eine sehr schwache Expression erlaubt und folglich Expression nur bei Transkription vom *lac*-Promotor erfolgt. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, dass die *E. coli*-Zellen, die das Cosmid *cos2/27* mit dem gesamten Carotinoid-Biosynthese-Operon von *Cmm* tragen, keine gelbe Färbung aufweisen.

Auf dem klonierten Fragment liegt zwar nur ein Teil des *idi*-Gens (kodiert für die Isopentenylpyrophosphat-Isomerase, die Dimethylallyl-Pyrophosphat (DMAPP) in Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) isomerisiert bzw. umgekehrt), dieses Gen ist jedoch auch in *E. coli* vorhanden. Die Produkte IPP/DMAPP der vom *idi*-Genprodukt katalysierten Reaktion werden z. B. auch für die Menachinon-/Ubichinon-Biosynthese benötigt. Zur Umklonierung in pDM302 wurde pOKU9-113-35 β verwendet, um das mit *Eco*RI/*Hind*III herausgespaltene Fragment so in *Eco*RI/*Hind*III-gespaltene pDM302 zu ligieren, dass das Operon auch vom noch vorhandenen *cmx*-Promotor aus transkribiert werden könnte, auch wenn der eigene Promotor des Operons in *Cmm* funktional sein muss. Die in *E. coli* erhaltenen Klone blieben interessanterweise farblos, was allerdings daran liegen kann, dass der Vektor pDM302 in *E. coli* im Vergleich zu pUC-Derivaten eine sehr geringe Kopienzahl aufweist. pBA-113-35 α wurde zur Steigerung der Effizienz der Elektroporation nach *Cmm* in *E. coli* WA337 elektroporiert. Dieser Stamm führt keine *dam/dcm*-Methylierung mehr durch (siehe auch Ergebnisse, Abschnitt A 1.1.4, Seite 55). Die Klonierung des Cosmid-Fragments wurde von S. SCHOTT als Teil ihres Laborpraktikums durchgeführt. pBA-113-35 α wurde per Elektroporation in die Mutante TM100 β 113-35 eingebracht. Der größte Teil der transformierten Zellen zeigte wieder eine gelbe Färbung. Der Phänotyp "farblos" der Transposon-Mutante TM100 β 113-35 konnte also durch die Einbringung des Carotinoid-Biosynthese-Operons auf dem Plasmid pBA-113-35 α komplementiert werden.

Dabei war auffallend, dass die Intensität der Gelbfärbung der Kolonien unter den Transformanten z. T. deutlich variierte. Die Mehrzahl der 240 Transformanten zeigte eine mittlere Gelbintensität, 29 Transformanten (ca. 12 %) fielen durch eine stärkere Gelbfärbung auf und 6 (ca. 2,5 %) Transformanten waren farblos. Zur Klärung der Frage, ob diese Intensitätsunterschiede auch über mehrere Zellgenerationen Bestand haben, wurden die Kolonien über mehrere Tage hinweg immer wieder auf frische Agar-Platten überimpft. Schon nach wenigen Tagen verloren die 29 ursprünglich durch ihre intensive Gelbfärbung aufgefallenen Kolonien diese Färbung, bis auf eine Ausnahme, und nahmen die Färbung der Mehrheit der ursprünglichen, mittelgelben Kolonien an. Die farblosen Kolonien veränderten sich nicht. Der Grund für die ursprüngliche, stärkere Gelbfärbung ist nicht klar.

Die Gene bzw. Genprodukte des Carotinoid-Biosynthese-Operons konnten auf der Basis von BLAST-Datenbankabfragen zugeordnet werden. Die potentiellen C₅₀-Carotinoid-ε-Zyklasen sind in Anlehnung der Nomenklatur in *Brevibacterium linens* und *Brevibacterium flavum* *crtYg* und *crtYh* genannt worden. Bei dem von *crtBI* kodierten Protein handelt es sich um ein Fusionsprotein aus der Phyoten-Synthase CrtB und der Phytoen-Desaturase CrtI. Multiple Alignments der von den Genen *crtE*, *crtB+crtI*, *crtYg*, *crtYh* und *crtEb* kodierten Proteine sind im Anhang auf S. 169 aufgelistet.

Vergleicht man die Sequenzdaten von *Cmm* und *Cms* (Sanger Center; GISH, 1996-2002), so fällt auf, dass die DNA-Sequenz auf 7198 bp, das entspricht in *Cms* dem Bereich zwischen den beiden das Operon flankierenden IS Elementen (vergl. Abb. V.2 in der Diskussion, Seite 132), zu 93,6 % identisch ist. Auf Aminosäureebene sind die Proteine von *Cmm* und *Cms* im Durchschnitt zu 96,1 % identisch (Idi: 94,8 %, CrtE: 98,3 %, CrtBI: 95,9 %, CrtYg: 95,6 %, CrtYh: 96,7 %, CrtEb: 97,3 %, hypothetisches Protein direkt im Anschluss an das crt-Operon (ORF G): 93,1 %). Alle Proteine sollten von ihrer Sequenz auch in *Cms* prinzipiell funktional sein, trotzdem bildet *Cms* aus einem noch nicht bekannten Grund kein (funktionales) Pigment.

Es zeigt sich, dass *Cmm* wie auch *B. flavum* (identisch mit *Corynebacterium glutamicum*) und *Agromyces mediolanus* wahrscheinlich ein C₅₀-Carotinoid synthetisiert. Leider ließ sich das Carotinoid bisher nicht isolieren, da es relativ stark hydrophil zu sein scheint. Die zur Isolierung übliche Methode - Lyse von Zellen mit heißem Methanol (KRUBASIK, 2000) - funktioniert zwar auch bei *Cmm*, jedoch führte ein Ausschütteln in Ether/Petrolether nicht zum Übergang des Carotinoids in die lipophile Phase. Das über pT19MECA2::113-35α in *E. coli* synthetisierte Carotinoid ist demgegenüber hydrophob und lässt sich durch die o. g. Methode isolieren. In *Cmm* scheint das Carotinoid also noch

weiter modifiziert zu werden, z. B. durch eine oder mehrere Hydroxylierungen oder Glykosylierungen.

3.1.2.1 Gerichtete Integrationsmutagenese ("gene-disruption"/"gene-replacement") zur Herstellung einer pigmentfreien Mutante

Zur gezielten Inaktivierung eines bekannten Gens wird die gerichtete Kassettenmutagenese verwendet. Zu diesem Zweck wird das Gen oder ein Teil von ihm in einen *E. coli*-Klonierungsvektor inseriert. Etwa in der Mitte wird nun eine Antibiotikum-Resistenzkassette eingefügt, oft verbunden mit einer kleinen Deletion. Dieses Fragment wird dann auf dem Vektor, der in *Cmm* nicht replizieren kann und somit einen "Suicide"-Vektor darstellt, in die zu mutagenisierenden Zellen elektroporiert. In der Zelle kann nun ein "single-crossover" ("gene-disruption") über homologe Rekombination einer der beiden flankierenden homologen Bereiche zwischen kloniertem Fragment und dem Chromosom stattfinden, das das auf dem Chromosom liegende Gen inaktiviert. Die hierbei auftretende Struktur wird Cointegrat genannt. Kommt es zu einem weiteren "crossover" in diesem Bereich, so spricht man von einem "double-crossover". Durch dieses zweite "crossover" kann entweder der Ursprungszustand wieder hergestellt werden (intaktes Gen im Chromosom und kassetteninaktiviertes Gen auf dem "Suicide"-Plasmid) oder der intakte Teil des Gens rekombiniert mit dem Vektoranteil heraus, sodass das durch die Antibiotikumkassette inaktivierte Gen im Chromosom zurückbleibt ("gene-replacement"). Da die einfache und besonders die doppelte homologe Rekombination normalerweise seltene Vorgänge sind, muss das Mutageneseplasmid mit hoher Effizienz in die Zellen eingebracht werden können. Diese Voraussetzungen sollten mit dem effizienten Elektroporationsprotokoll bestehen.

Im Rahmen der Charakterisierung der Mutante TM100C β 113-35, die das für *Cmm* farbgebende Carotinoid nicht mehr bilden kann, sollte eine gerichtete Integrationsmutagenese im *crtE/crtBI*-Gen durchgeführt werden. Dazu wurde ein entsprechendes Mutageneseplasmid konstruiert. Das Carotinoid-Biosynthese-Operon lag in pUC19 kloniert vor (pOKU9-113-35 α , siehe Ergebnisse Kapitel B 3.1.2). Das 2369 bp große *Eco47III*-Teilfragment, das das Ende des *crtE*- und den Anfang des *crtBI*-Gens trägt, wurde in den *SmaI*-gespaltenen "Suicide"-Vektor pK19*mob2* (pOKK9-113-35E α , Abb. IV.25 A) umkloniert, da das *bla*-Gen in *Cmm* nicht funktional ist. Danach wurde in eine 315 bp große *NruI*-Deletion innerhalb des *crtBI*-Gens, von Position 1277 bis 1592, eingeführt und hier

hinein die mit *HincII* aus pOKU9-CmHcf gespaltene *cmx*-Kassette "blunt end" ligiert. Die beiden resultierenden Mutageneseplasmide pOKK9-113-35 Δ NCm α (Abb. IV.25 B) und pOKK9-113-35 Δ NCm β (mit dem *cmx*-Gen in beiden Orientierungen) wurden mittels Elektroporation in CMM100 eingebracht und die Transformanten auf SB Cm₁₀ ausplattiert.

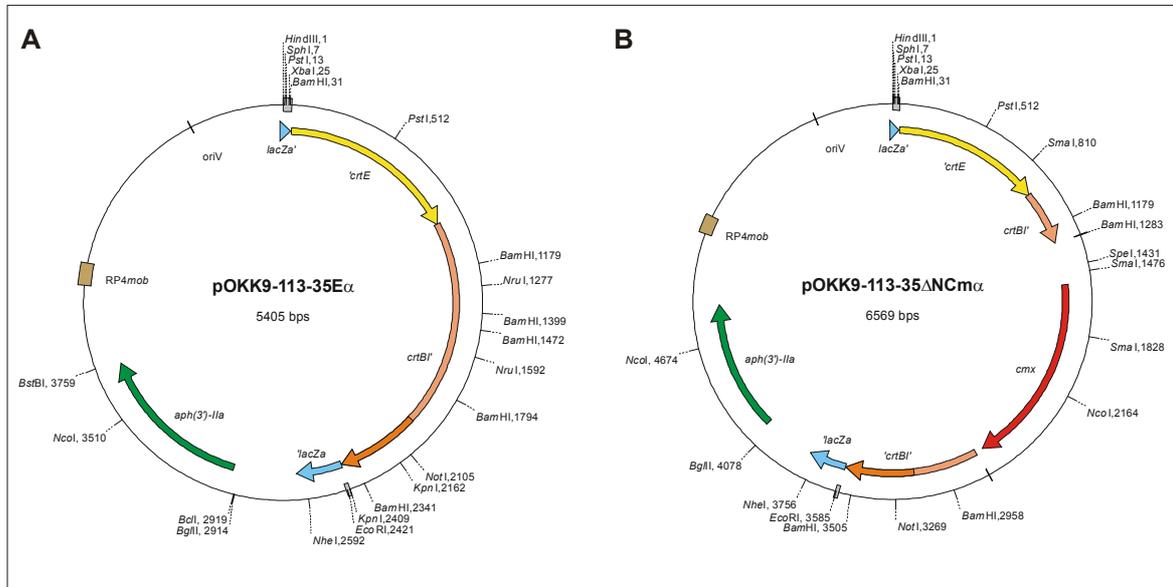


Abb. IV.25: Physikalische Karten von pOKK9-113-35 α (A) und pOKK9-113-35 Δ NCm α (B) (Konstruktion siehe Text). *aph(3')-IIa*: Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gen; *cmx*: Chloramphenicol-Exporter-Gen; *lacZ* α : unterbrochenes α -Fragment des *lacZ*-Gens; oriV: Replikationsursprung; RP4*mob*: *mob*-Region des Plasmids RP4; *idi*: Isopentylpyrophosphat-Isomerase-Gen; *crtE*: GGPP-Synthase-Gen; *crtBI*: Phytoen-Synthase/Phytoen-Desaturase-Gen.

Erstaunlicherweise waren etwa 98 % der erhaltenen Kolonien gelb gefärbt. Die genaue Aufteilung ist in Tab. IV.4 aufgeführt.

Tab. IV.4: Anzahl und Anteil gelber bzw. farbloser/rosafarbener Kolonien von CMM100 im Mutagenese-Experiment.

Mutagenese-Plasmid	Anzahl der Kolonien mit der Farbe		Anteil der farblosen Kolonien [%]
	gelb	farblos/rosa	
pOKK9-113-35 Δ NCm α	1169	26	2,2
pOKK9-113-35 Δ NCm β	742	13	1,7

Da das *aph(3')-IIa*-Gen auch in *Cmm* gegen Neomycin und Kanamycin Resistenz verleiht, konnten potentielle "double-crossover" durch paralleles Plattieren auf Cm₁₀ und Cm₁₀/Neo₇₅ relativ leicht ermittelt werden. Überraschenderweise hatten etwa 50 % der 200 getesteten Klone mit gelber Koloniefarbe die Neomycin-Resistenz verloren. Dies deutet

entweder darauf hin, dass in diesen Zellen ein illegitimes "double-crossover" stattgefunden hat, bei dem die Neomycin-Resistenz verloren gegangen ist, oder ein "single-crossover" mittels illegitimer Rekombination innerhalb des *aph(3')-IIa*-Gens aufgetreten ist, welches dieses inaktiviert hat. Ein homologer DNA-Bereich im Chromosom, in den der zur Mutagenese verwendete Vektor bevorzugt integrieren könnte, ist in den derzeit vorhandenen Sequenzdaten nicht zu erkennen.

Von den erhaltenen Klonen mit farblosen Kolonien wurden 12 mittels Southern-Hybridisierung von *Bgl*II-gespaltener Gesamt-DNA gegen eine Carotinioid-Biosynthese-Operon-spezifische Sonde hybridisiert. Diese wurde durch Digoxigenin-11-dUTP-Markierung des *Eco*RI/*Hind*III-Fragments aus pOKK9-113-35 α erstellt. Zusammen mit den Resultaten der Hybridisierungen gegen die *cmx*- und pUC-Sonde (Daten nicht gezeigt) ist zu schließen, dass es sich nur bei zwei der 12 getesteten Mutanten höchstwahrscheinlich um ein "single-crossover" handelt, während die restlichen 10 Mutanten ein Bandenmuster zeigen, das nicht erklärlich ist. In *Cmm* scheint also eine extrem hohe Rate an Rekombination durch illegitime "crossover" stattzufinden. Ähnliches ist zwar auch in einigen *Mycobacterium*-Stämmen beschrieben (KALPANA *et al.*, 1991; NORMAN *et al.*, 1995; MCFADDEN, 1996; PELICIC *et al.*, 1997; HINDS *et al.*, 1999), war bisher für *Cmm* aber nicht bekannt.

Um der Vermutung nachzugehen, dass vielleicht die Behandlung der elektrokompenten Zellen mit Glycin einen übermäßigen Stress ausübt, dadurch verschiedene stressinduzierte Gene angeschaltet werden und so die Regulation, die illegitime Rekombination sonst verhindert, abschaltet, wurde das Mutagenese-Experiment auch mit Zellen durchgeführt, die nur mit der halben Glycinmenge (1,25 % [w/v]) behandelt wurden. Die Ergebnisse sind in Tab. IV.5 zusammengefasst.

Tab. IV.5: Anzahl und Anteil gelber bzw. farbloser/rosafarbener Kolonien von CMM100 im Mutagenese-Experiment.

Mutagenese-Plasmid	Anzahl der Kolonien mit der Farbe		Anteil der farblosen Kolonien [%]
	gelb	farblos/rosa	
pOKK9-113-35 Δ NCm α	714	22	1,7
pOKK9-113-35 Δ NCm β	936	23	2,4

Da sich der Prozentsatz der antibiotikaresistenten Kolonien mit gelber Färbung nicht signifikant verändert hat, ist es unwahrscheinlich, dass die Glycinbehandlung einen deutlichen Einfluss darauf hat. Der ungewöhnlich hohe Anteil dieser nicht durch homologe Rekombination entstandenen Klone bei der Erzeugung von gerichteten Mutanten wurde auch von

anderen Mitarbeitern am Lehrstuhl bei *Cmm* beobachtet, ist also kein Phänomen, was spezifisch bei der Inaktivierung dieses Gens/Operons auftritt.

Da derzeit keine handfesten Anhaltspunkte vorhanden sind, an denen festgemacht werden könnte, welche Faktoren für dieses ungewöhnliche Phänomen die Ursache bilden (ob es z. B. mit einer generell höheren Rekombinationshäufigkeit in *Cmm* zu tun hat), wurde dem im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter nachgegangen.

3.2 Transposon-Mutanten mit veränderter Virulenz

Eine Reihe von Transposon-Mutanten zeigten im Pflanzentest veränderte Virulenz. Viele Mutanten, die keine oder schwache Welke auslösen, wurden nicht näher untersucht, da sie, wie die Southern-Hybridisierung zeigte, nicht Resultat einer Transposon-Integration, sondern durch andere rekombinative Vorgänge entstanden waren.

3.2.1 Die Transposon-Mutanten TM382 β 324-50 und TM382 β 370-45 - zwei Mutanten mit reduzierter und verzögerter Virulenz

Zwei Mutanten mit verändertem Welkeverhalten sollen gemeinsam dargestellt werden, da das Transposon, wie sich später herausstellte, im Abstand von nur ca. 3,5 kb in die gleiche DNA-Region inseriert war. Die Welkeverläufe der beiden Transposon-Mutanten sind in Abb. IV.26 und IV.27 dargestellt, der Habitus von jeweils 32 infizierten Pflanzen in einer Pflanzschale ist in Abb. IV.28 gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Mutante TM382 β 324-50 so stark verzögert und schwach welkt, dass kein klassischer Welkeindex (WI) angegeben werden kann. TM383 β 370-45 zeigt demgegenüber eine kaum verzögerte Welke im Vergleich mit dem Kontrollstamm CMM101, die jedoch eine deutlich geringere Intensität besitzt. Es treten praktisch keine Pflanzen mit starken Welkesymptomen ("++") und überhaupt keine abgestorbenen Pflanzen auf. Der Großteil der Pflanzen zeigt nur schwache Welkesymptome.

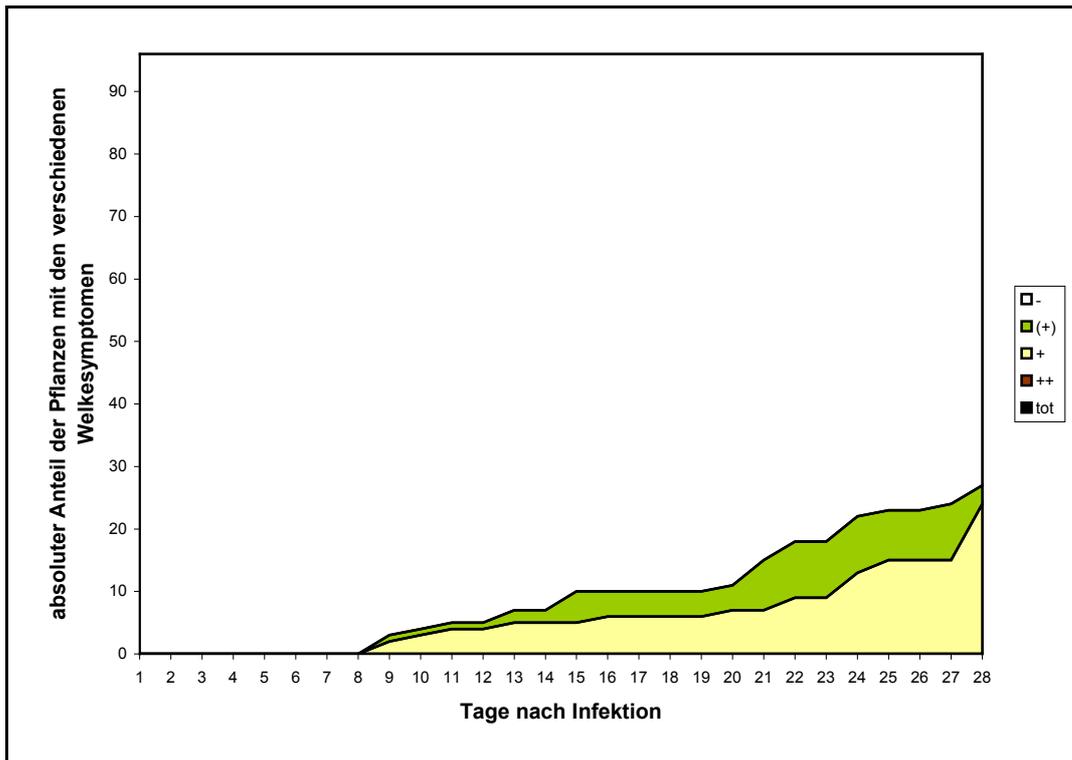


Abb. IV.26: Entwicklung und Verteilung der Welkesymptome über 28 Tage von 96 Testpflanzen, die mit der *Cmm*-Transposon-Mutante TM382β 324-50 per Wurzelinfektion infiziert worden sind (Test 1 bis 3) [n=96]. WI: > 28 d.

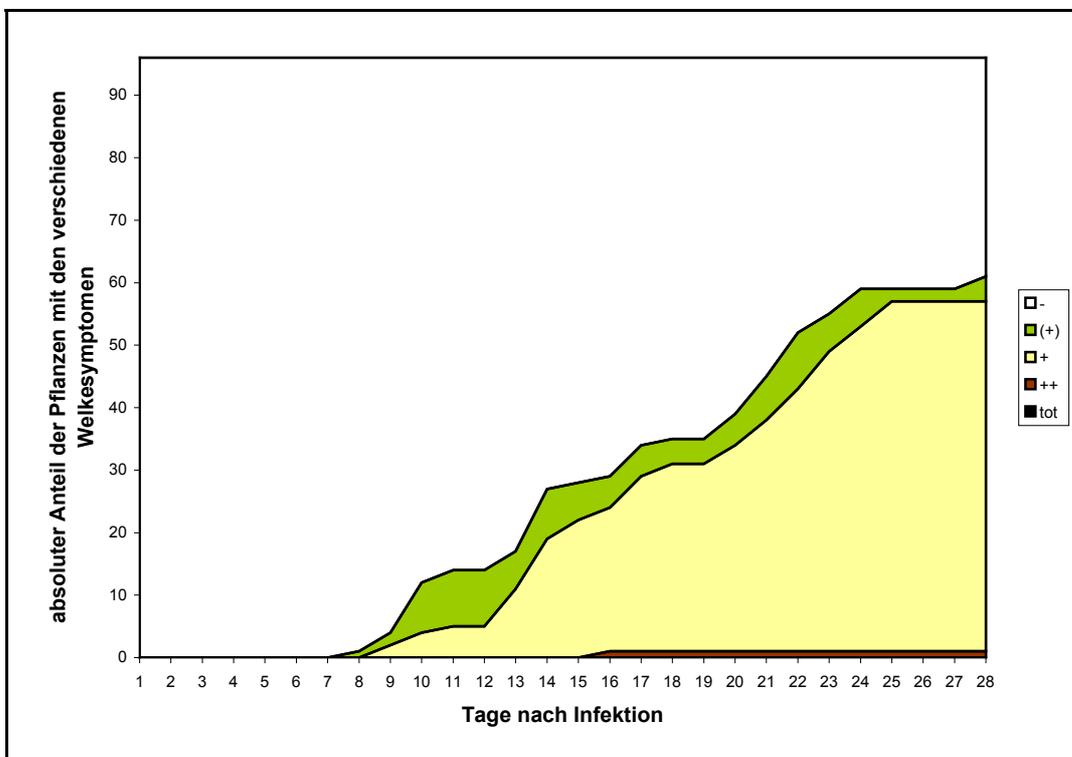


Abb. IV.27: Entwicklung und Verteilung der Welkesymptome über 28 Tage von 96 Testpflanzen, die mit der *Cmm*-Transposon-Mutante TM382β 370-45 per Wurzelinfektion infiziert worden sind (Test 1 bis 3) [n=96]. WI: 22,8 d.

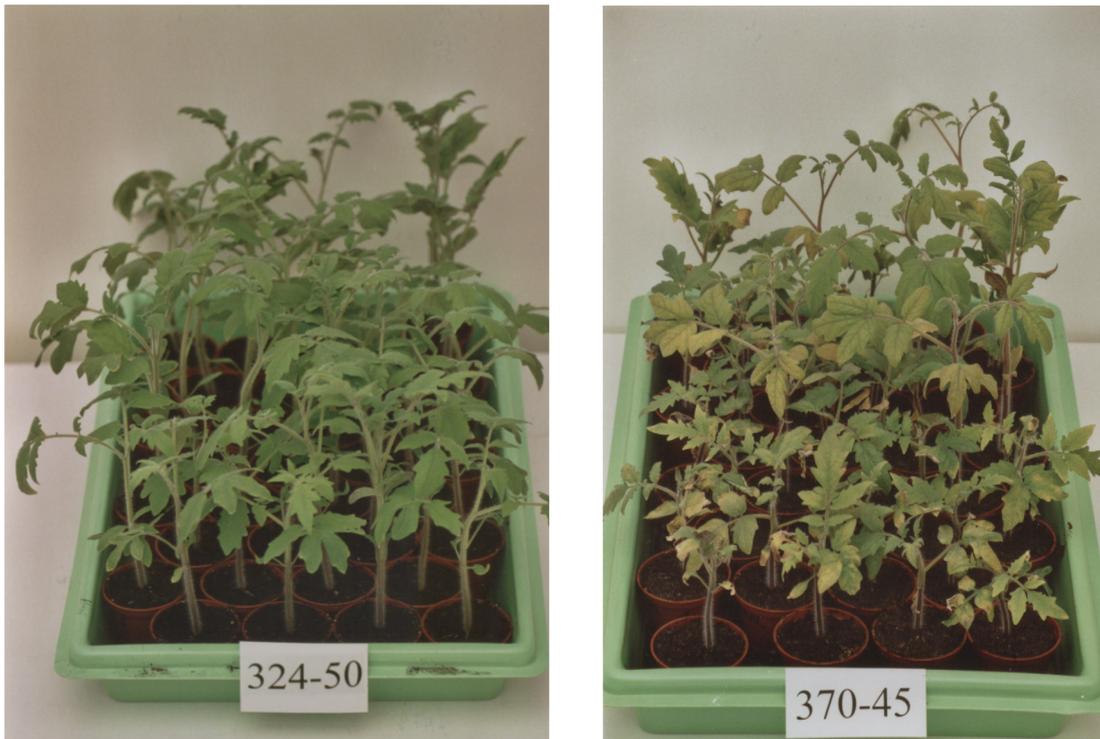
**A****B**

Abb. IV.28: Fotos der Welkesymptome von 32 Pflanzen 28 Tage nach der Wurzelinfektion mit der Transposon-Mutante TM382C β 324-50 (A) und TM382C β 370-45 (B).

Die Southern-Hybridisierungen gegen die transposonspezifischen Standard-Sonden *cmx* und *tnpA* (siehe Abb. VII.1 C und D im Anhang auf Seite 160) zeigen an, dass es sich in beiden Fällen um eine korrekte Transposoninsertion handelt: jeweils eine hybridisierende Bande von > 1214 bp gegen die *tnpA*-Sonde und > 2071 bp gegen die *cmx*-Sonde. *celA* ist vorhanden, *pat-1* nicht, aber die chromosomale Homologie *chpA* (Abb. VII.1 A und B). Die an die beiden Transposoninsertionsstellen angrenzenden DNA-Bereiche wurden entsprechend der generellen Strategie kloniert und ansequenziert und der sequenzierte Bereich durch "primer-walking" auf die in Abb. IV.29 gezeigte Größe erweitert. Die Transposons sind gegenläufig zueinander in den beiden Mutanten orientiert, wie die Sequenzierung zeigte.

Das Transposon ist in der Mutante TM382 β 324-50 an das Ende des ORF A inseriert, sodass das kodierte Protein 18 Aminosäuren vor dem C-Terminus unterbrochen wurde. In der Mutante TM382 β 370-45 liegt die Insertionsstelle 18 bp vor dem potentiellen Startcodon des ORF C, hat also wahrscheinlich dessen Promotor von dem codierenden Bereich abgetrennt. Vergleicht man beide Genprodukte der ORFs A und C, sowie eines dritten ORF B, der zwischen ORF A und C liegt (vergl. Abb IV.29), mit der BLAST-Datenbank (ALTSCHUL *et al.*, 1997), dann zeigt deren bester BLAST-Treffer starke Ähnlichkeiten zu

ein und demselben Protein unbekannter Funktion von *Xylella fastidiosa*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Thermobifida fusca* und *Oceanobacillus iheyensis* (siehe Tab. IV.6). Bei *X. fastidiosa* und *X. axonopodis* handelt es sich um Gram-negative, pflanzenpathogene Bakterien, bei *T. fusca* (HENNSEN, 1957; ZHANG *et al.*, 1998) um ein Gram-positives, thermophiles Bodenbakterium, welches verrottende Pflanzenreste z. B. in Misthaufen/Komposthaufen degradiert und bei *O. iheyensis* um ein extrem salz- und alkalitolerantes marines Bakterium aus der Tiefsee vor Japan (LU *et al.*, 2001; TAKAMI *et al.*, 2002), welches eine Vielzahl von Enzymen sekretiert, die z. B. als Waschmittelzusätze eine Verwendung in der Biotechnologie finden könnten. Die drei erstgenannten Bakterien gehören alle zu solchen, die mit Pflanzen bzw. Pflanzenmaterial interagieren. Zwischen ORF A und ORF B konnte weiterhin ein Gen (*pelA*) für eine potentielle Pektatlyase anhand von Ähnlichkeiten identifiziert werden, dessen Genprodukt Pektin degradiert, das z. B. in der pflanzlichen Zellwand vorkommt. Es handelt sich ebenfalls um ein Enzym, das in der Interaktion mit Pflanzen bei vielen Bakterien eine Rolle spielt.

Tab. IV.6: Gene/ORFs im den Insertionsort von TnI409C β umgebenden DNA-Bereich im Chromosom von TM382 β 324-50 bzw. TM382 β 370-45 (siehe Abb. IV.29) mit ausgewählten Homologien aus der BLAST-Datenbankabfrage.

ORF	Protein	Organismus	Acc.Nr.	e-W	I/Ä	Ü
<i>chpA</i>	chromosom. Homologie zu <i>pat-1</i> (defektes Protein)	<i>Cmm</i>	AAD09893	e-101 [†]	77/83 [†]	266 [†]
<i>chpE</i>	chromosom. Homologie zu <i>pat-1</i>	<i>Cmm</i>	AAD09893	2e-25	36/48	247
<i>pelA</i>	pot. sekretierte Lyase Pectat-Lyase Pectat-Lyase Pectat-Lyase	<i>S. coelicolor</i> A3 (2)	NP_625403	2e-35	37/55	264
		<i>F. solani</i>	S68364	1e-26	41/59	170
		<i>F. oxosporum</i> . f. sp. <i>lycopersici</i>	EAA30333	1e-25	35/54	170
		<i>Bacillus</i> sp.	CAB40884	4e-22	45/55	161
A*	hyp. Protein XF0531 hyp. Protein hyp. Protein hyp. Protein	<i>X. fastidiosa</i> 9a5c	NP_297821	6e-45	39/50	284
		<i>T. fusca</i>	ZP_00059013	4e-14	27/43	284
		<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306	NP_642686	5e-10	24/41	299
		<i>O. iheyensis</i> HTE831	NP_693914	4e-09	24/38	282
B	hyp. Protein hyp. Protein hyp. Protein XF0531 hyp. Protein	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306	NP_642686	1e-85	53/70	330
		<i>O. iheyensis</i> HTE831	NP_693914	9e-09	25/40	243
		<i>X. fastidiosa</i> 9a5c	NP_297821	2e-05	29/45	136
		<i>S. avermitilis</i> MA-4680	NP_825262	2e-04	29/41	207
C [#]	hyp. Protein XF0531 hyp. Protein hyp. Protein hyp. Protein	<i>X. fastidiosa</i> 9a5c	NP_297821	3e-79	50/67	288
		<i>T. fusca</i>	ZP_00059013	9e-18	31/44	232
		<i>O. iheyensis</i> HTE831	NP_693914	4e-07	24/42	240
		<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306	NP_642686	9e-11	25/39	326

*: ORF, in den das Transposon in TM382 β 324-50 inseriert ist; #: ORF, in den das Transposon in TM382 β 370-45 inseriert ist; †: Diese Werte beziehen sich auf das theoretische Protein, welches gebildet würde, wenn die Stopp-Codons und "frameshifts" nicht vorhanden wären; e-W: e-Wert; I/Ä: Identität und Ähnlichkeit auf Aminosäure-Ebene in %; Ü: überlappender Bereich.

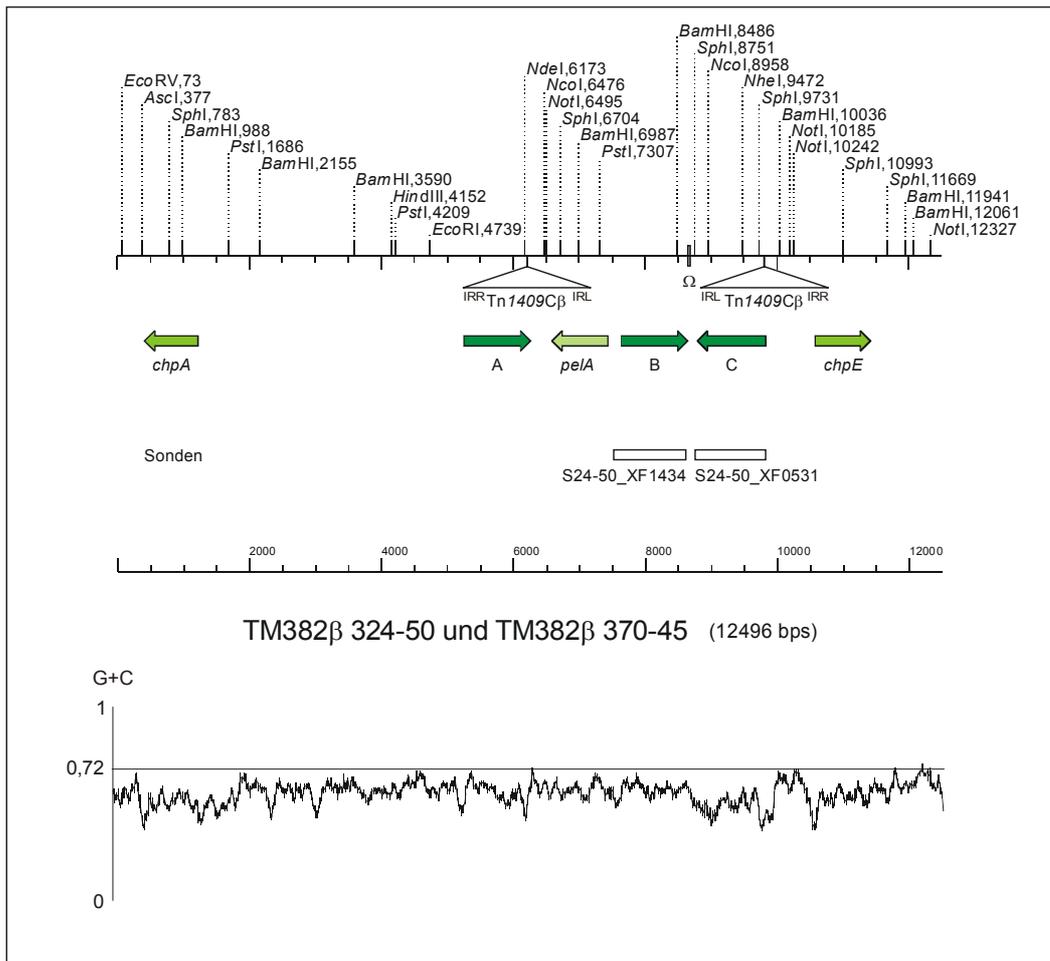


Abb. IV.29: Physikalische Karte des die Insertionsorte von Tn1409Cβ umgebenden DNA-Bereichs im Chromosom von TM382β 324-50 bzw. TM382β 370-45 (oberste Linie). Darunter die Gene/ORFs als Pfeile (Bezeichnungen/Homologien in Tab. IV.6). Ω: pot. Terminator. IRL/IRR: linker bzw. rechter "inverted repeat" von Tn1409Cβ. Eine Zeile darunter schematisch die Lage der Sonden, die zur Suche von Cosmiden per Koloniehybridisierung in der Genbank verwendet wurden. Unten: GC-Verhältnis im dargestellten DNA-Bereich. Die waagerechte Linie bei 0,72 symbolisiert den durchschnittlichen GC-Gehalt des gesamten Chromosoms von *Cmm*. Die GC-Kurve ist auf dem Mittelwert von 100 bp-Bereichen mit dem Programm "GeneQuest" aus dem "LaserGene/DNAStar"-Paket errechnet.

Es fällt auf, dass auf dem sequenzierten DNA-Stück etwa 4 kb vor der Insertionsstelle in TM383β 324-50 die chromosomale Homologie zu *pat-1* (*chpA*) lokalisiert ist. Dieses zu *pat-1* homologe Gen kodiert allerdings nicht für ein funktionsfähiges Protein, da es von zwei Stopcodons und zwei "frameshifts" unterbrochen ist (vergl. das Alignment im Anhang, Seite 179). Zudem konnte erstmals eine weitere Homologie zur Pathogenitätsdeterminante *pat-1* identifiziert werden, die auf der anderen Seite dieser Insertionsstelle ebenfalls ca. 4 kb entfernt liegt. Das Gen wurde *chpE* genannt. Das kodierte Protein zeigt eine relativ hohe Ähnlichkeit zu Pat-1 (vergl. Tab. IV.6), allerdings ist auf DNA-Ebene keine Homologie zu erkennen. Betrachtet man die vorhandenen ORFs auf diesem ~12 kb

überdeckenden DNA-Bereich, so könnte es sich um eine Region handeln, die in die Bakterien-Pflanzen-Interaktion involviert ist.

Es gibt noch weitere Auffälligkeiten dieser Region: Außer den fünf genannten Genen und dem Pseudogen *chpA* (welche etwa die Hälfte der 12 kb einnehmen) lassen sich in diesem Bereich keinerlei Gene identifizieren, die Ähnlichkeiten zu in der BLAST-Datenbank vorhandenen Genen haben. Es ist sogar nicht möglich, weitere ORFs zu postulieren, da die von ihnen kodierten hypothetischen Proteine keine sinnvoll erscheinenden Aminosäuresequenzen enthalten und zudem sehr kurz sind. Die Region erscheint also etwa zur Hälfte frei von genetischer Information zu sein, was ungewöhnlich für ein bakterielles Genom und auch für das Genom von *Cmm* ist. Soweit die Sequenzinformationen des Genomprojekts von *Cmm* ausgewertet vorliegen, scheinen solche nicht kodierenden Bereiche eine Ausnahme zu sein. Als dritte Auffälligkeit ist der mit durchschnittlich etwa 64 % signifikant geringere GC-Gehalt der DNA in diesem Bereich zu nennen (siehe Abb. IV.29), im Gegensatz zu den ca. 72 %, die für *Cmm* üblich sind (ENGEMANN, 2001). Die von den Genen *chpE*, *pelA* und ORF A kodierten Proteine besitzen mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Signalpeptid, könnten also sekretiert werden, das trifft mit geringerer Wahrscheinlichkeit auch auf ORF B zu. Das von ORF C kodierte Protein lässt keine sicheren Schlüsse bzgl. dieser Frage zu.

Zur geplanten Komplementation der beiden Mutanten wurden Cosmide in der Cosmid-Bank von *Cmm* (GRÄFEN, 2001) mittels Koloniehybridisierung identifiziert. Dazu wurden zwei Sonden (S24-50_XF0532 und S24-50_XF1434, siehe Abb. IV.29) mittels PCR von *Cmm* Gesamt-DNA amplifiziert (Sequenz der Primer siehe Material und Methoden, Seite 28), aufgereinigt und Digoxigenin-11-dUTP-markiert. Die Koloniehybridisierung erbrachte positive Signale mit beiden Sonden. Die beiden Cosmide *cos4/55* und *cos4/56* enthalten den zur Komplementation gesuchten DNA-Abschnitt (ABT, 2003). Eine Komplementation beider Mutanten ist somit in Zukunft möglich.

3.2.2 Die Transposon-Mutante TM382 β 330-18 - eine Mutante mit stark reduzierter Kolonisationsfähigkeit

Bei der Suche nach Mutanten mit einer deutlich reduzierten Virulenz in dem dreistufigen Screening *in planta*, fielen immer wieder Mutanten auf, die in der Tomate praktisch keine Welke mehr induzieren konnten. Bei der ersten Charakterisierung durch Southern-Hybridisierung zeigte sich jedoch immer wieder, dass die Bandenmuster nicht mit einer "normalen" Transposoninsertion zu erklären waren und eine weitere Charakterisierung so wenig Aussicht auf Erfolg versprach. Da es sich bei der Bakterien-Pflanzen-Interaktion zwischen *Cmm* und der Tomate sicherlich um ein sehr komplexes multifaktorielles Wechselspiel von pflanzlichen und bakteriellen Genen und deren Genprodukten handelt, ist es nicht sehr wahrscheinlich, dass das Ausschalten nur eines Gens sehr große Auswirkungen auf die Virulenz des Bakteriums hat, es sei denn, wenn es sich um einen zentralen Regulator handelt. Die beiden Gene, bei denen das der Fall ist, sind die bekannten Pathogenitätsgene *celA* und *pat-1*. Insofern dürfte man bei dieser Art der "optischen Selektion" häufig auf Mutanten treffen, bei denen zusätzlich oder unabhängig von der Transposition Rearrangements oder Deletionen im Chromosom von *Cmm* aufgetreten sind.

**A****B**

Abb. IV.30: Fotos der Welkesymptome von 32 Pflanzen 28 Tage nach der Wurzelinfektion mit der Transposon-Mutante TM382C β 330-18 (A) und als Vergleich uninferzierte Pflanzen (B).

Bei der hier vorgestellten Mutante, die keinerlei Welkesymptome in der Pflanze induziert (Abb. IV.30 A) zeigten die Southern-Hybridisierungen gegen die transposonspezifischen Sonden jedoch keine Auffälligkeiten (siehe Abb. VII.1 C und D im Anhang auf Seite 160). Das *celA*-Gen - und damit höchstwahrscheinlich auch pCM1 - ist vorhanden (siehe Abb. VII.1 B im Anhang auf Seite 160), was für die Induktion von Welkesymptomen ausreicht. Die Mutante zeigt auf Vollmedium-Platten (TBY, C-Medium) kein verändertes Wachstumsverhalten.

Das durch die Transposoninsertion unterbrochene Gen und die angrenzende DNA-Region wurden über die Standardklonierungen (siehe Ergebnisse B, "generelle Strategie", Seite 80), anschließende Ansequenzierung und nachfolgendes "primer-walking" charakterisiert. Zusammen mit den Sequenzdaten aus dem Genomprojekt konnte die in Abb. IV.31 dargestellte physikalische Karte erstellt werden. Die dort aufgeführten Gene/ORFs sind mit den Homologien/Ähnlichkeiten in Tab. IV.7 aufgelistet.

Tab. IV.7: Gene/ORFs im den Insertionsort von Tn1409C β umgebenden DNA-Bereich im Chromosom von TM382 β 330-18 (siehe Abb. IV.31) mit ausgewählten Homologien aus der BLAST-Datenbankabfrage.

ORF	Protein	Organismus	Acc.Nr.	e-W	I/Ä	Ü
A	Transkr.-Reg. der MarR-Familie pot. Transkr.-Reg	<i>O. iheyensis</i> HTE831	NP_691366	4e-07	31/56	95
		<i>V. parahaemolyticus</i>	NP_800796	7e-07	33/61	75
B	hyp. Protein Prot. der MutT/Nudix-Familie	<i>T. erythraeum</i> IMS101	ZP_00074096	5e-11	43/55	85
		<i>S. agalactiae</i> 2603V/R	NP_688961	5e-10	53/69	49
C	Trifolitoxin Immunitäts-Protein Cholin/Ethanolamin-Kinase	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	NP_830915	3e-32	38/54	224
		<i>B. anthracis</i>	NP_655042	3e-32	38/54	224
D	Permease der MF-Superfamilie pot. Membranprotein	<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	NP_601814	4e-88	44/63	458
		<i>M. leprae</i>	NP_301400	3e-59	44/58	440
E	keine Homologien					
F	schw. ähnl. GTP-Pyrophosphokin. GTP-Pyrophosphokinase GTP-Pyrophosphokinase	<i>L. monocytogenes</i>	NP_464329	2e-11	31/49	171
		<i>B. cereus</i> ATCC 14579	NP_83405	1e-10	32/51	121
		<i>O. iheyensis</i> HTE381	NP_692141	4e-07	30/50	166
G	pot. Monooxygenase Zeaxanthin Epoxidase Zeaxanthin Epoxidase pot. 3-Hydroxybenzoat-6-Hydrox.	<i>B. japonicum</i>	NP_771617	6e-21	29/41	362
		<i>C. unshiu</i>	BAB78733	9e-20	30/43	378
		<i>L. esculentum</i>	CAB06084	2e-19	31/44	335
		<i>P. alcaligenes</i>	AAG39455	8e-18	28/43	362
H	hyp. Protein pot. Pyrrolidon-Carboxylat-Peptid. 5-Oxopropyl-Peptidase	<i>R. metallidurans</i>	AAM94363	2e-50	52/63	217
		<i>Y. pestis</i>	AAK64298	6e-49	47/62	214
		<i>R. solanacearum</i>	NP_599859	7e-49	50/65	215
I	hyp. Protein	<i>C. hutchinsonii</i>	ZP_00116833	0.061	23/36	354
J	pot. sekretiertes Protein* pot. Lipoprotein*	<i>S. coelicolor</i> A3 (2)	NP_631498	4e-22	38/51	202
		<i>S. avermitilis</i> MA-4680	NP_821266	5e-17	38/50	212
K	hyp. Protein	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	NP_826042	3.9	26/41	179
L	pot. RNA-Polymerase Sigmafaktor RNA-Polymerase Sigma-70-Faktor, ECF-Unterfamilie	<i>S. coelicolor</i> A3 (2)	NP_627178	1e-19	35/56	179
		<i>M. tuberculosis</i>	NP_215249	5e-14	35/53	160
M	pot. 4'-Phosphopantetheinyl-Transf. Phosphopantetheinyl-Transferase	<i>S. antibioticus</i>	AAL15597	9e-20	42/51	198
		<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	NP_601186	3e-19	37/49	187
N	pot. Polyketid-Synthetase fadD9 pot. Acyl-CoA-Synthetase	<i>M. tuberculosis</i>	NP_465699	0.0	45/58	1156
		<i>M. leprae</i>	NP_301424	0.0	43/59	1116

*: Sortase-Domäne; e-W: e-Wert; I/Ä: Identität und Ähnlichkeit auf Aminosäure-Ebene in %; Ü: überlappender Bereich.

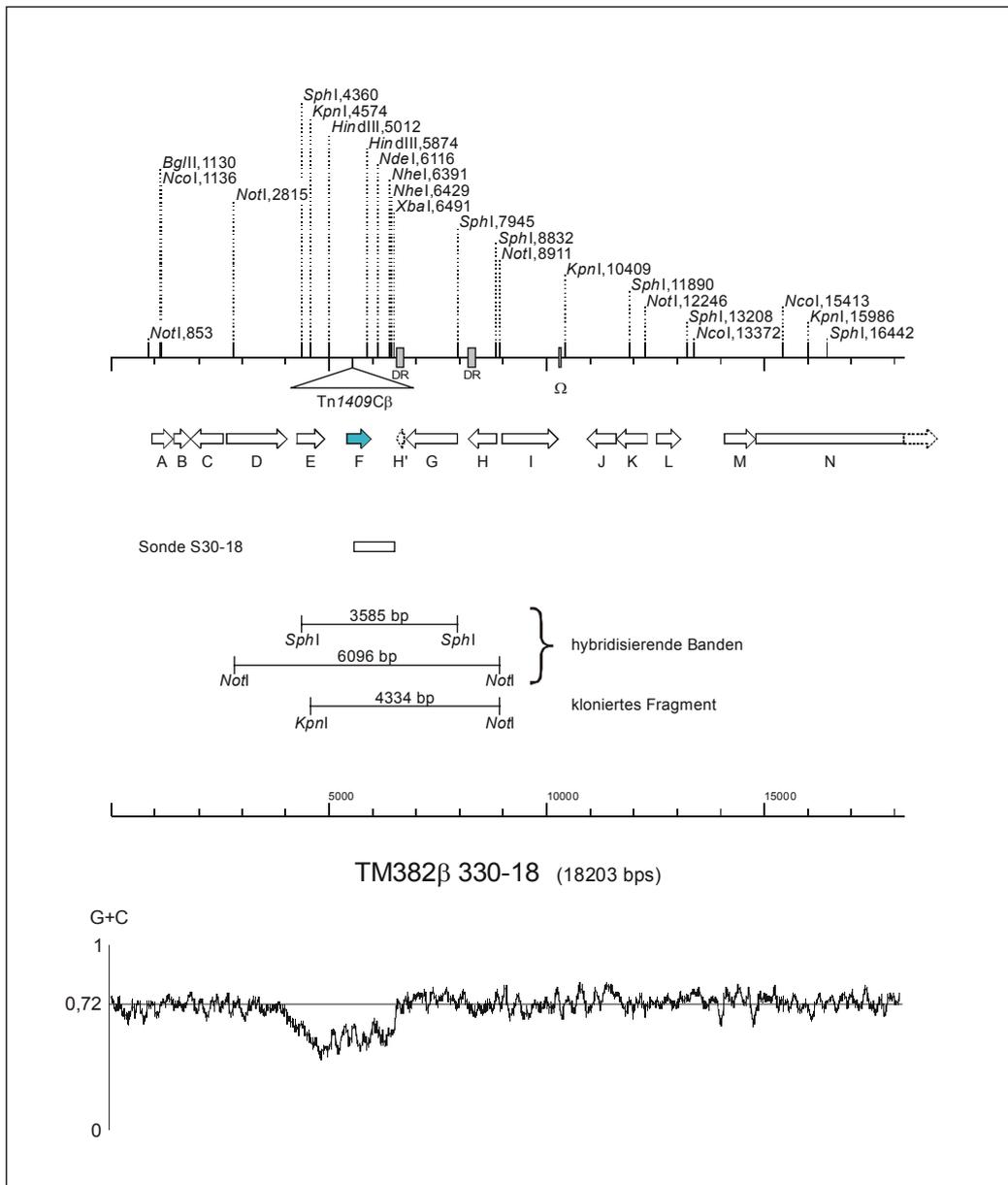


Abb. IV.31: Physikalische Karte des den Insertionsort von Tn1409C β umgebenden DNA-Bereichs im Chromosom von TM382 β 330-18 (oberste Linie). Darunter die Gene/ORFs als Pfeile (Bezeichnungen/ Homologien in Tab. IV.7). Ω : pot. Terminator. DR: direkte Sequenzwiederholung von 158 bp mit 92 % Identität (H'). Das unterbrochene GTP-Pyrophosphokinase-Gen (ORF F) ist in türkis dargestellt. Eine Zeile darunter schematisch die Lage der Sonde, die zur Suche von Cosmiden per Koloniehybridisierung in der Cosmidbank verwendet wurde, sowie in den nächsten Zeilen die bei der Southern-Hybridisierung mit *SphI*- und *NotI*-gespaltener Gesamt-DNA von *Cmm* auftretenden hybridisierenden Banden. Das *KpnI/NotI*-Fragment aus dem Cosmid cos3/42 wurde letztendlich zur Komplementation kloniert. Unten: GC-Verhältnis im dargestellten DNA-Bereich. Die waagerechte Linie bei 0,72 symbolisiert den durchschnittlichen GC-Gehalt des gesamten Chromosoms von *Cmm*. Die GC-Kurve ist auf dem Mittelwert von 100 bp-Bereichen mit dem Programm "GeneQuest" aus dem "LaserGene/ DNASTar"-Paket errechnet.

Das von dem Transposon unterbrochene Gen (in Abb. IV.31 mit ORF F bezeichnet) kodiert möglicherweise eine GTP-Pyrophosphokinase. Es handelt sich jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um das *relA*-Gen, dessen Genprodukt zu den zentralen Regulatoren in der "stringenten Kontrolle" gehört, da es mehrere ORFs im Genom von *Cmm* gibt, die hoch homolog zu *relA*-Genen z. B. aus *Streptomyces coelicolor* und *Corynebacterium glutamicum* sind. Es scheint sich um ein singulär angeordnetes Gen zu handeln, welches keiner Operonstruktur angehört. Inwieweit dieses Gen mit der veränderten Virulenz der Mutante TM382 β 330-18 in Zusammenhang steht, ist noch unklar.

Die in der Umgebung lokalisierten Gene geben auch hier keinen Aufschluss darüber, welche Funktion das von ORF F kodierte Protein haben könnte. Auffällig sind aber zwei Dinge: Das Transposon scheint auch hier in einen Bereich inseriert zu sein, welcher einen deutlich niedrigeren GC-Gehalt besitzt, jedoch nur in einem relativ kleinen Bereich von etwa 2.500 bp (vergl. Abb. IV.31). Die Umgebung besitzt dagegen den für *Cmm* typischen GC-Gehalt von ca. 72 %. Weiterhin befindet sich etwa 500 bp stromabwärts von dem unterbrochenen ORF F eine 92 %ige Sequenzwiederholung von etwa 158 bp ("DR" in Abb. IV.31), welche eine Duplikation des 3'-Endes des gegenläufig orientierten ORF H darstellt (H). Hier scheint also ein Rearrangement in der chromosomalen DNA von *Cmm* bereits vor der Transposition stattgefunden zu haben.

Es konnten über Koloniehybridisierung mit der Sonde S30-18 gegen die *Cmm* Cosmid-Bank (GRÄFEN, 2001) und anschließende Charakterisierung mittels Southern-Hybridisierung ein Cosmid identifiziert werden (cos3/42), das die in TM383 β 330-18 unterbrochene DNA-Region überspannt. Die entsprechende DNA-Region wurde in pDM302 kloniert und das Plasmid zur Komplementation der Mutante eingesetzt (ABT, 2003).

Dazu wurden jeweils 32 Pflanzen mit TM382C β 330-18 und TM382C β 330-18(pBA-30-18) sowie zur Kontrolle mit *Cmm* NCPPB382, CMM100 und CMM101 infiziert und 32 Pflanzen unbehandelt belassen. Die Welkesymptome wurden über 28 Tage verfolgt. Auch die komplementierte Mutante zeigte keinerlei Welkesymptome, während bei *Cmm* NCPPB382 und CMM101 die normalen Welkesymptome zu beobachten waren (Daten nicht gezeigt). Die durchschnittliche Größe und das durchschnittliche Frischgewicht der jeweils 32 mit TM382C β 330-18, TM382C β 330-18(pBA-30-18) infizierten und der uninfizierten Pflanzen unterschieden sich kaum (Tab. IV.8). Ein Unterschied von max. 17 % ist in Pflanzentests mit je 32 Pflanzen als nicht signifikant einzustufen.

Tab. IV.8: Durchschnittliche Größe und Gewicht der mit TM382C β 330-18, TM382C β 330-18(pBA-30-18) infizierten und uninfizierten Pflanzen.

Pflanzen infiziert mit	Größe der Pflanzen [cm] (arithm. Mittel)	rGr	Frischgewicht der Pfl. [g] (arithm. Mittel)	rGw
- (H ₂ O)	22,5 ± 3,3	1	4,2 ± 0,6	1
TM382 β 330-18	20,8 ± 3,2	0,92	4,1 ± 0,7	0,98
TM382 β 330-18(pBA-30-18 α)	18,6 ± 2,6	0,83	3,7 ± 0,5	0,88

rGr: relative Größe (uninfiziert = 1); rGw: relatives Gewicht (uninfiziert = 1)

Des Weiteren wurde 9, 15 und 23 Tage nach Wurzelinfektion von jeweils drei mit TM382C β 330-18, TM382C β 330-18(pBA-30-18), CMM100 und CMM101 infizierten Pflanzen der Titer *in planta* bestimmt. Die durchschnittlichen Werte sind in Abb. IV.32 zusammengefasst:

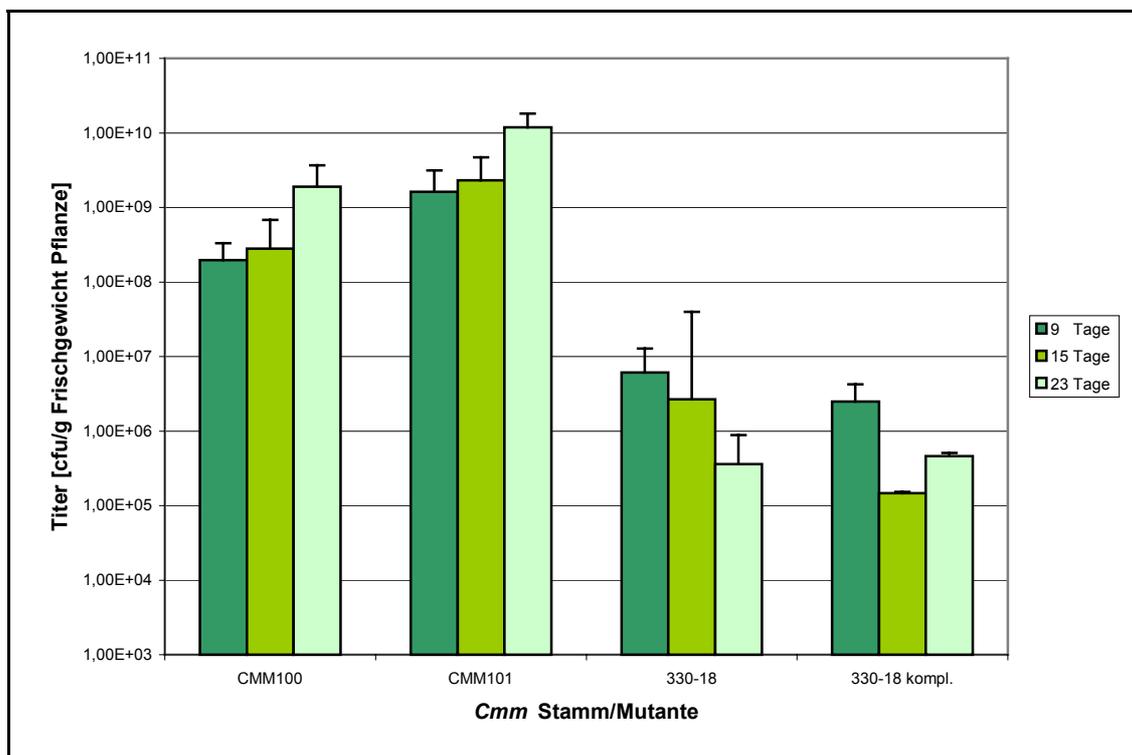


Abb. IV.32: Vergleich der Entwicklung des Bakterientiters von mit TM382C β 330-18, TM382C β 330-18(pBA-30-18) und den Kontrollstämmen CMM100, CMM101 infizierten Pflanzen 9, 15 und 23 Tage nach der Infektion. Ordinate in logarithmischer Skalierung.

Die Titer in den mit den Kontrollstämmen CMM 100 (nicht virulent) und CMM 101 (virulent) infizierten Pflanzen weichen mit den max. erreichten $\sim 2 \cdot 10^9$ bzw. $\sim 1 \cdot 10^{10}$ cfu/g Frischgewicht nicht deutlich voneinander und von den Literaturwerten ab. Der Titer steigt während dieser Phase kontinuierlich an. Im Gegensatz dazu sinkt der Bakterientiter in den

mit TM382C β 330-18 und TM382C β 330-18(pBA-30-18) infizierten Pflanzen von etwa $6 \cdot 10^6$ bzw. $3 \cdot 10^6$ auf etwa $4 \cdot 10^5$ cfu/g Frischgewicht ab. Der Titer der Mutante bzw. der komplementierten Mutante liegt also um ca. vier bis fünf Größenordnungen niedriger als der der Kontrollstämme. Folglich ist die Mutante TM382C β 330-18 praktisch nicht in der Lage, die Tomatenpflanze zu besiedeln. Diese Ergebnisse konnten auch von B. ABT (2003) verifiziert werden, dort konnten in einigen mit TM382C β 330-18 bzw. TM382C β 330-18(pBA-30-18) infizierten Pflanzen sogar überhaupt keine Bakterien mehr nachgewiesen werden oder mit geringerem Titer als $4 \cdot 10^5$ cfu/g Frischgewicht.

Die Insertion des Transposons in den ORF F mit schwachen Ähnlichkeiten zu GTP-Pyrophosphokinasen ist also nicht die Ursache für den Phänotyp der Kolonisationsunfähigkeit. Normalerweise wäre eine weitere Charakterisierung dieser Mutante nun nicht mehr möglich. Bei der Hybridisierung gegen die *pat-1*-Sonde (siehe Abb. IV.33) fiel jedoch auf, dass das erwartete Hybridisierungssignal zu der chromosomalen Homologie von *pat-1* (*chpA*) nicht vorhanden war.

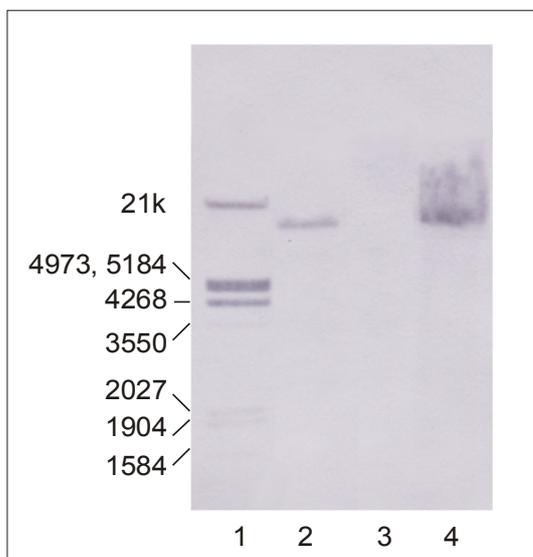


Abb. IV.33: Southern-Hybridisierung von *Bgl*III-gespaltener Gesamt-DNA verschiedener *Cmm*-Transposonmutanten gegen die *pat-1*-Sonde.

Spur	1	2	3	4
DNA	λ	TM382 β	TM382 β	TM382 β
Spaltung	E/H	324-50 <i>Bgl</i> III	330-18 <i>Bgl</i> III	370-45 <i>Bgl</i> III

Ursprünglich war dies nicht weiter beachtet worden, da diese meist sehr schwach ausgeprägte Bande je nach Qualität und Konzentration der eingesetzten Gesamt-DNA sowie der Qualität der Southern-Hybridisierung des Öfteren gar nicht zu sehen ist. Bei wiederholten Hybridisierungen konnte aber gezeigt werden, dass dieses Fragment tatsächlich nicht vorhanden ist. Folglich liegt hier eine zusätzlich zur Transposition aufgetretene Deletion unbekannter Größe vor, die die stark reduzierte Kolonisationsfähigkeit verursacht.

V Diskussion

Die vorliegende Arbeit verfolgte zwei Ziele: Erstens die Etablierung und Optimierung von Techniken für das molekulargenetische Arbeiten mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), die die Grundlage für den zweiten Bereich bildeten, die Identifikation und Charakterisierung von chromosomal kodierten Genen, die an der Interaktion zwischen *Cmm* und der Wirtspflanze Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) auf Seiten des Bakteriums beteiligt sind.

1 Etablierung genetischer Methoden für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Ein klassischer genetischer Ansatz zur Identifikation von Genen, die in einem bestimmten Zusammenhang relevant sind, besteht in der Erzeugung einer großen Anzahl von möglichst zufällig im Chromosom verteilten Mutanten. Hierzu stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung: Erstens die Mutagenese durch UV-, Röntgen- oder ionisierende Strahlung. Dabei wird die DNA durch Interaktion mit der Strahlung geschädigt, z. B. entstehen durch UV-Bestrahlung Thymin-Dimere. Zweitens die chemische Mutagenese z. B. mit NTG (N-Methyl-N-Nitro-N'-Nitrosoguanidin), EMS (Ethylmethansulfonat), Hydroxylamin oder Ethidiumbromid, bei der die mutagenen Substanzen entweder direkt mit der DNA reagieren und so Nukleotide ineinander umwandeln (Hydroxylamin) bzw. in Derivate von Nukleotiden umwandeln, die dann falsch paaren (EMS), die die beiden DNA-Stränge vernetzen (NTG) oder sich in die Doppelhelix einlagern (Ethidiumbromid). Drittens die Transposon-Mutagenese.

Die ersten beiden Methoden haben den großen Nachteil, dass nicht sicher ist, ob der Phänotyp einer Mutante nur auf einer einzigen oder auf mehreren Mutationen beruht und der Mutationsort außerdem nicht markiert ist. Weiterhin geht von den verwendeten Substanzen ein nicht unerhebliches Gefährdungspotential aus, da sie aufgrund ihrer mutagenen Eigenschaften auch beim Menschen potentiell kanzerogen sind. Bisher wurden Mutanten von *Cmm* ausschließlich durch chemische Mutagenese erzeugt (BERMPOHL, 1993; BERMPOHL *et al.*, 1996; LAINE *et al.*, 2000).

Demgegenüber handelt es sich bei der Transposon-Mutagenese um eine molekulargenetische Methode, bei der die zufällige Insertion eines mobilen genetischen Elements, eines

Transposons, in das Chromosom zu einer Inaktivierung des dort lokalisierten Gens führt. Der große Vorteil dieser Methode ist zum einen die Markierung des Mutationsortes durch das Transposon und zum anderen die Tatsache, dass in den meisten Fällen nur eine einzige Transposoninsertion und damit Mutation vorliegt. Nachteilig ist, dass nur für wenige Bakterien ein funktionales Transposon-Mutagenesensystem zur Verfügung steht und die entsprechenden molekulargenetischen Techniken wie z. B. die effektive Transformation vorhanden sein müssen.

Grundvoraussetzung für eine Sättigungsmutagenese mit Hilfe eines Transposons ist, neben dem Vorhandensein eines funktionalen und selektionierbaren Transposons (in diesem Fall Tn1409C α und β), die hocheffiziente Einbringung von DNA in die Zelle, da zum einen meist ein "Suicide"-Plasmid verwendet wird, welches das Transposon trägt. Nur wenn das Transposon von dem Plasmid, das in *Cmm* nicht replizieren kann, in das Chromosom (oder ein endogenes Plasmid) integriert, kann der selektionierbare Marker - hier die vom *cmx*-Gen (TAUCH *et al.*, 1998) vermittelte Chloramphenicolresistenz des Transposons Tn1409C (GARTEMANN, 1999; GARTEMANN und EICHENLAUB, 2000) - an die Tochterzellen weitergegeben werden und es können resistente Kolonien heranwachsen. Zum anderen ist der Vorgang der Transposition normalerweise strikt reguliert, sodass keine Schädigung der Wirtszelle durch zu häufige Transpositionen auftritt (GALAS und CHANDLER, 1989). Sie findet nur in seltenen Fällen statt, was ebenfalls eine effiziente Einbringung des Mutagenesensplasmids in die Zelle notwendig macht.

Ein weiteres Hindernis ist das in *Cmm* stark ausgeprägte Restriktionssystem, welches eingebrachte DNA heterologen Ursprungs mit einer anderen Methylierung, also z. B. aus *E. coli* isolierte DNA, degradiert (MELETZUS *et al.*, 1993, 2000). Über die Art, wie *Cmm* seine DNA methyliert, ist nichts bekannt und systematische Untersuchungen zur Anfälligkeit von Fremd-DNA bzgl. ihres Methylierungsmusters sind ebenfalls nicht beschrieben. Für *E. coli* sind z. B. die MrcA- McrBC- und Mrr-Systeme beschrieben, die bestimmte einfache Methylierungsmuster der DNA erkennen und sie dann hydrolysieren (RALEIGH und WILSON, 1986; HEITMANN *et al.*, 1987; KELLEHER und RALEIGH, 1991; WAITE-REES *et al.*, 1991; RALEIGH, 1992; SUTHERLAND *et al.*, 1992). Es konnte gezeigt werden, dass *Corynebacterium glutamicum* ATCC1302 die DNA so methyliert, dass sie vom McrBC-System in *Escherichia coli* erkannt und degradiert wird (TAUCH *et al.*, 1994). Es gibt außerdem keine restriktionsnegativen Stämme von *Cmm*, wie z. B. für das nah verwandte Bakterium *C. glutamicum* (TAUCH *et al.*, 2002).

1.1 Elektroporation/Elektrotransformation

Da die für eine Sättigungsmutagenese mittels Transposon notwendige Transformations-effizienz mit dem zu Beginn dieser Arbeit vorhandenen Elektroporationsprotokoll (NAKHEI, 1993; MELETZUS *et al.*, 2000) nicht gegeben war, musste eine Optimierung vorgenommen werden. Die Bedingungen für die Elektroporation - oft wird auch der Begriff Elektrotransformation verwendet, da bisher nicht nachgewiesen werden konnte, dass wirklich Löcher in der Zellmembran auftreten, wie für eukaryontische Zellen beschrieben (CHANG und REESE, 1990; HO und MITTAL, 1997) - müssen für jeden Organismus erneut empirisch ermittelt werden. Als Testplasmide wurden der *E. coli*-*Cmm*-Shuttle-Vektor pDM302 (MELETZUS *et al.*, 1993) und der *E. coli*-*Corynebacterium*-Shuttle-Vektor pEC-K18*mob2* (KIRCHNER, 1999; TAUCH *et al.*, 2002) verwendet, beide tragen das *aph(3')*-*Ila*-Gen, welches sowohl in *E. coli* als auch in *Cmm* Resistenz gegen Kanamycin/Neomycin verleiht. Von letzterem Plasmid konnte so nachgewiesen werden, dass es in *Cmm* repliziert, jedoch ohne Selektionsdruck segregiert.

Es wurden eine Vielzahl von Parametern, für die in der Literatur ein fördernder Effekt, meist für nah verwandte coryneforme Bakterien, beschrieben worden ist, in *Cmm* getestet: u. a. die Wachstumsphase der Zellen zum Zeitpunkt der Abernte für die Aufarbeitung zur Elektroporation (BONAMY *et al.*, 1989; DUNICAN und SHIVNAN, 1989; HAYNES und BRITZ, 1989, 1990; LIEBL *et al.*, 1989; SATOH *et al.*, 1990), die Zelldichte (BONAMY *et al.*, 1989; DUNICAN und SHIVNAN, 1989; WOLF *et al.*, 1989; BONNASSIE *et al.*, 1990), verschiedene Hitzeschockbehandlungen vor (SCHÄFER *et al.*, 1990 und 1994) sowie nach dem elektrischen Puls (KIRCHNER, 1999; VAN DER REST *et al.*, 1999; TAUCH *et al.*, 2002; KIRCHNER und TAUCH, 2003), die verschiedenen möglichen elektrischen Parameter, die die Elektroporationsapparatur der Fa. Biorad ("Gene Pulser" mit "Pulse Controller") zulässt, die eingesetzte DNA-Menge und die Vorbehandlung der Zellen mit zellwandschädigenden Agenzien wie Lysozym (NAKHEI, 1993; MELETZUS *et al.*, 2000), Penicillin G (KURUSU *et al.*, 1990) und Glycin (HAYNES und BRITZ, 1989, 1990). Letztendlich ließ sich mit der Behandlung der in der früh-/mittellogarithmischen Phase abgeernteten Zellen mit 2,5 % [w/v] Glycin eine Verbesserung der Transformationsrate im Vergleich zu dem bisher verwendeten Protokoll (NAKHEI, 1993; MELETZUS *et al.*, 2000) etwa um den Faktor 250 erreichen.

Die höchste Transformationsrate, die für *Cmm* in der Literatur beschrieben ist, wurde mit homologer, also aus *Cmm* isolierter, DNA erhalten (MELETZUS und EICHENLAUB, 1991;

NAKHEI, 1993; MELETZUS *et al.*, 1993, 2000), und ist für die Transposon-Mutagenese nicht maßgebend, da hier immer heterologe DNA verwendet werden muss. Folglich war es sinnvoll, DNA mit unterschiedlichen Methylierungen aus verschiedenen *E. coli*-Stämmen auf ihre Elektroporationseffizienz hin zu testen. In Stämmen von *C. glutamicum*, die ein besonders starkes Restriktionssystem besitzen und als nahezu nicht transformierbar gelten, konnten mit der Verwendung nicht methylierter DNA oder *in vitro* per PCR amplifizierter DNA gute Ergebnisse erzielt werden (ANKRI *et al.*, 1996). Die Verwendung von DNA, die aus einem *E. coli*-Stamm isoliert wurde, der keine *dam/dcm*-Methylierung mehr durchführt (*E. coli* WA337 oder SCS110), führte zu einer Erhöhung der Transformationseffizienz um den Faktor von etwa vier, sodass sich eine Gesamtverbesserung der Transformationseffizienz um etwa den Faktor 1.000 erreichen ließ.

Mit dem optimierten Elektroporationsprotokoll können nun Transformationsraten für die Elektroporation eines replizierenden Plasmids (pEC-K18*mob2* bzw. pDM302) von $\sim 5 \cdot 10^6$ Transformanten/ μg heterologer DNA erreicht werden, was durchaus in die Nähe der Transformationsraten kommt, die für *C. glutamicum* (KIRCHNER, 1999) oder *E. coli* (TAUCH *et al.*, 1994) beschrieben sind. Diese Rate reicht aus, um z. B. eine effektive Transposon-Mutagenese mittels "Suicide"-Plasmiden durchzuführen. Hierbei wurden bis zu 3.000 Transposanten/ μg DNA erhalten. Erstmals wird prinzipiell auch eine gerichtete Integrationsmutagenese ("gene-disruption"/"gene-replacement") über "Suicide"-Plasmide in *Cmm* möglich, um Gene gezielt zu unterbrechen oder zu deletieren. Eine schädigende Wirkung der Glycinbehandlung auf die Vitalität der Zellen konnte nicht beobachtet werden, da die Überlebensrate bei der Elektroporation über 80 % liegt. Trotzdem dürfte ein Stress für die Zellen vorhanden sein, da der Mureinsacculus nicht unerheblich geschädigt ist.

Erwähnenswert ist noch die Tatsache, dass bei der Elektroporation des Wildtyps (*Cmm* NCPPB382) das größere der beiden endogenen Plasmide - pCM2 - häufig verloren geht. Ob das Plasmid bereits bei der Aufarbeitung der Zellen, bei der Glycin-Behandlung, bei dem elektrischen Puls oder bei der Regeneration verschwindet, ist nicht klar. Ein Plasmid-Curing durch Elektroporation wurde jedoch z. B. für *E. coli* bereits in der Literatur beschrieben (HEERY *et al.*, 1989). Um die Möglichkeit zu testen, ob dies evtl. zu verhindern ist, könnten die in Frage kommenden Schritte in Zukunft diesbzgl. überprüft werden. Zu bedenken ist außerdem, dass pCM2 auch bei längerer Anzucht von *Cmm* außerhalb der Pflanze unter Laborbedingungen relativ leicht verloren geht, was mit den schon sehr früh gemachten Beobachtungen einhergeht, dass *Cmm* seine Pathogenität bei Anzucht auf

Agarplatten innerhalb einiger Jahre verlieren kann (STAPP *et al.*, 1956). Innerhalb der Pflanze kann pCM2 durch konjugativen Plasmidtransfer immer wieder neu erworben werden (PIEPER, 2001), ob dies auf Festmedien/Filtern ebenfalls geschieht, ist bisher nicht untersucht worden.

1.2 Transposon-Mutagenese

Mit der Etablierung eines effektiven Elektroporationsprotokolls für *Cmm* war eine Voraussetzung für die Entwicklung eines Transposon-Mutagenesesystems in *Cmm* erfüllt. Für die Transposons Tn1409C α und Tn1409C β , welche Derivate des aus der nah verwandten Spezies *Arthrobacter* isolierten IS-Elements IS1409 sind (GARTEMANN, 1999; GARTEMANN und EICHENLAUB, 2000), konnte die Funktionalität in *Cmm* nachgewiesen werden. Sowohl in *Cmm* als auch den anderen *Clavibacter michiganensis*-Subspezies existieren keine natürlichen Kopien dieses IS-Elements, welches zu der ISL3-Familie gehört (GALLAS und CHANDLER, 1989; MAHILLON und CHANDLER, 1998). Dies ist eine weitere wichtige Voraussetzung für die Möglichkeit der Etablierung eines Transposon-Mutagenesesystems auf der Basis von Tn1409C.

Southern-Hybridisierungen der Gesamt-DNA der erhaltenen Klone zeigten eine offensichtlich zufällige Integration des Transposons in das Chromosom von *Cmm*, obwohl die 8 bp Zielsequenz von IS1409/Tn1409 mit einem durchschnittlichen GC-Gehalt von ca. 50 % eine Transposition eher in Bereiche mit etwas geringerem GC-Gehalt, als dem für *Cmm* durchschnittlichen GC-Gehalt von ca. 72 % (ENGEMANN, 2001), vermuten lässt. Dies ist jedoch typisch für die Mitglieder der ISL3-Familie. Trotzdem konnten keine "hot-spots" für die Transposoninsertion gefunden werden, was auch mit den Erfahrungen der Transposon-Mutagenese in *Arthrobacter* (GARTEMANN, 1999; GARTEMANN und EICHENLAUB, 2000) übereinstimmt. Das Transposon weist folglich keine offensichtliche Sequenzspezifität auf. Dies ist auch für die zu IS1409 homologen IS-Elemente IS1096 und IS31831 aus verwandten Aktinomyzeten beschrieben. IS1096 wurde aus *Mycobacterium smegmatis* isoliert (CIRILLO *et al.*, 1991), IS31831 aus *C. glutamicum* (VERTÈS *et al.*, 1994a) und von beiden wurden ebenfalls Transposon-Mutagenesesysteme (MCADAM *et al.*, 1995; VERTÈS *et al.*, 1994b) konstruiert.

Das Transposon Tn1409C scheint in den meisten Fällen nicht mehrfach zu transponieren, wie durch Southern-Hybridisierung gezeigt werden konnte. Weiterhin verbleibt es offen-

sichtlich auch unter unselektiven Bedingungen für viele Generationen stabil an seinem Insertionsort (K.-H. GARTEMANN, unveröffentlichte Daten). Bei zufällig ausgewählten Transposon-Mutanten wurde nur selten ein Cointegrat oder eine doppelte Transposoninsertion festgestellt. Die Ansequenzierung von 11 zufällig ausgewählten Transposon-Mutanten ergab keine Auffälligkeiten, auch wenn die DNA-Region, in die das Transposon inseriert war, in knapp zwei Drittel der untersuchten Fälle einen niedrigeren GC-Gehalt aufwies (53 % - 65 %) als in *Cmm* üblich. Der Stichprobenumfang ist jedoch zu gering, um definitive Aussagen über die Signifikanz der Verteilung von Insertionsorten von Tn1409C im Chromosom von *Cmm* bzgl. des GC-Gehalts dieser DNA-Region zu machen.

In den *Clavibacter michiganensis*-Subspezies *insidiosus* (*Cmi*), *nebraskensis* (*Cmn*) und *sepedonicus* (*Cms*) konnten ebenfalls erfolgreich Transposon-Mutanten erzeugt werden, wenn auch mit deutlich niedrigerer Effizienz, was mit einer Optimierung der Elektroporationsrate für diese Stämme wahrscheinlich zu beheben ist. Auch bei diesen Subspezies scheint eine zufällige Insertion ins Chromosom vorzuliegen, wie Southern-Hybridisierungen zeigten. Bei der geringen Anzahl von erhaltenen und getesteten Mutanten ist hier allerdings noch keine sichere Aussage möglich. Keine Transpositionereignisse konnten bisher für die nah verwandte Spezies *Rathayibacter* beobachtet werden, wobei nicht bekannt ist, ob die hier verwendete Chloramphenicolresistenz von Tn1409C in dieser Gattung funktional ist.

Die Voraussetzungen für eine Sättigungsmutagenese sind damit gegeben und eine Bank mit ca. 3000 Mutanten des Stammes CMM100 (ohne die beiden endogenen Plasmide) wurde angelegt. Bei dem Screening der Mutanten aus der CMM100-Bank fiel im weiteren Verlauf auf, dass praktisch keine Aminosäureauxotrophien identifiziert werden konnten, jedoch vereinzelt Auxotrophien anderer Art, wie z. B. Defekte in Vitamin-Biosynthesen. Bei der Charakterisierung der im Laufe dieser Arbeit untersuchten Mutanten mit veränderter Virulenz zeigte sich, dass das Transposon häufiger in DNA-Bereiche mit niedrigerem GC-Gehalt inseriert war. Tn1409C zeigt in *Cmm* offensichtlich keine Zielspezifität bzgl. der 8 bp Erkennungssequenz. Trotzdem dürfte die Verteilung einer Erkennungssequenz, die im Durchschnitt zu 50 % aus AT-Nukleotiden besteht, im Chromosom von *Cmm*, mit einem durchschnittlichen GC-Gehalt von etwa 72 % (ENGEMANN, 2001), statistisch eher in Bereichen liegen, die - lokal - einen durchschnittlich niedrigeren GC-Gehalt haben.

Dies könnte vielleicht auch eine Erklärung dafür sein, dass so wenig Auxotrophien gefunden werden konnten. Es gibt Indizien dafür, dass *Cmm* ein lineares Chromosom besitzt (K.-H. GARTEMANN, unveröffentlichte Daten). Eventuell ist das Chromosom bzgl. des GC-Gehalts ähnlich aufgebaut wie das Chromosom von *Streptomyces coelicolor*, bei dem im Kernbereich des ebenfalls linearen Chromosoms ein höherer GC-Gehalt zu verzeichnen ist, der zu den Enden hin deutlich abnimmt. Im Kernbereich mit dem hohen GC-Gehalt liegen hauptsächlich die sog. "housekeeping"-Gene und in den Randbereichen die weniger essentiellen Gene aus dem Sekundärmetabolismus. Auch wenn es noch eine Hypothese ist, könnte dies eine sinnvolle Erklärung für die Verteilung der bisher charakterisierten Transposoninsertionsorte sein. Sobald die Genomsequenz vollständig bekannt ist, sollte sich dies leicht klären lassen. Eine weitere Konsequenz der Zielsequenz von Tn1409C mit 50 % AT-Nukleotiden könnte auch darin liegen, dass das Transposon statistisch häufiger in Promotorregionen inseriert, aufgrund der Tatsache, dass die "-10"-Region eines Promotors immer AT-reich sein muss, da hier das Aufschmelzen der DNA zur Transkription stattfindet.

Bei der Transposon-Mutagenese mit Hilfe von Tn1409C handelt es sich also nicht um ein ideales System für *Cmm*, dennoch sollte Tn1409 ein wertvolles genetisches Hilfsmittel für *Cmm* darstellen, zumal es bisher auch keine Alternativen gibt. Erstmals ist die effiziente Erzeugung von Transposon-Mutanten in *Cmm* überhaupt möglich und damit die Voraussetzung für die Identifizierung und Charakterisierung chromosomaler Gene vorhanden, die z. B. in der Bakterien-Pflanzen-Interaktion eine wichtige Rolle spielen.

1.3 Gerichtete Mutagenese durch "gene-disruption"/"gene-replacement"

Durch die hohen Transformationsraten des neuen Elektroporationsprotokolls ist erstmals auch eine gerichtete Mutagenese von Genen mittels "gene-disruption"/"gene-replacement" effizient möglich. Auch bei dieser Technik wird ein "Suicide"-Plasmid eingesetzt und sie setzt, wie die Transposon-Mutagenese, eine hohe Transformationseffizienz voraus. Die gerichtete Mutagenese beruht auf dem Vorgang der homologen Rekombination. Nach der Transformation mit einem "Suicide"-Plasmid, das das mit einer Antibiotikumkassette inaktivierte Gen trägt, kann es durch homologe Rekombination zwischen dem chromosomalen und dem auf dem Plasmid lokalisierten Gen zu einem "single-crossover" kommen ("gene-disruption"). Durch ein weiteres "crossover" über homologe Rekombination kann

nun entweder der Vektor mit dem unterbrochenen Gen wieder heraus rekombinieren (Ausgangszustand) oder zusammen mit dem intakten Gen ausgeschnitten werden und das durch die Antibiotikumkassette inaktivierte Gen im Chromosom zurücklassen ("gene-replacement"). Die homologe Rekombination ist normalerweise ein seltener Vorgang, weswegen auch hier eine hohe Transformationseffizienz notwendig ist.

Das in dieser Arbeit identifizierte Carotinoid-Biosynthese-Operon von *Cmm* bot sich zur exemplarischen Überprüfung der Funktionalität der gerichteten Integrationsmutagenese in *Cmm* an. Zum einen, weil die Mutanten leicht an ihrer Koloniefarbe erkennbar sein sollten. Zum anderen, weil das Carotinoid-Biosynthese-Operon in der Transposon-Mutante TM100 β 113-35 nicht durch eine korrekte Transposition entstanden war und auf diesem Wege eine durch einen eindeutig nachvollziehbaren Vorgang entstandene Mutante erzeugt werden sollte. Bei der gezielten Erzeugung der Farbstoffmutante von *Cmm* über gerichtete Mutagenese traten jedoch unerwartet große Probleme auf. Zur Mutagenese wurde das in *Cmm* nicht replizierende Plasmid pK19mob2 (Abb. VII.11 im Anhang, Seite 165) (KIRCHNER und TAUCH, 2003) genutzt. Teile des *crtBI*- und *crtE*-Gens des Carotinoid-Biosynthese-Operons von *Cmm* wurden kloniert, mit einer *NruI*-Deletion versehen, die das Ende des *crtBI*- und den Anfang des *crtE*-Gens umfasste, und in diese Deletion wurde die *cmx*-Kassette (TAUCH *et al.*, 1998) inseriert. Bei der gerichteten Mutagenese sollte so das Carotinoid-Biosynthese-Operon unterbrochen werden und dadurch die Synthese des für *Cmm* typischen, gelb-orangen Pigments verhindert werden.

Anhand des auf pK19mob2 vorhandenen Kanamycin-/Neomycin-Resistenzgens (*aph(3')*-*Ila*) und der *cmx*-Kassette konnte leicht auf "single-" (Cm^R/Neo^R) bzw. "double-crossover" (Neo^R) getestet werden, außerdem sollte die Mutation zu einer farblosen, anstelle einer gelben Koloniefarbe führen. Auf den beiden das *cmx*-Gen flankierenden DNA-Bereichen waren ca. 1.250 bzw. 800 bp homolog zum Chromosom, was im Allgemeinen als ausreichende Länge für ein "crossover" in Aktinomyceten angesehen wird (G. MUTH, Universität Tübingen, persönliche Mitteilung).

Überraschenderweise waren etwa 98 % der erhaltenen chloramphenicolresistenten Kolonien gelb gefärbt, obwohl etwa die Hälfte von ihnen die Neomycinresistenz und somit wahrscheinlich den Vektor verloren hatte. Auch unter den farblosen Kolonien hatten etwa die Hälfte die Neomycinresistenz verloren. Durch Southern-Hybridisierung der GesamtdNA von 12 farblosen Mutanten konnte gezeigt werden, dass nur zwei von ihnen ein für ein "single-crossover" passendes Bandenmuster aufwiesen, kein "double-crossover" statt-

gefunden hatte und der Rest ein Muster an hybridisierenden Fragmenten aufwies, das mit einer homologen Rekombination nicht erklärlich war. Diese Klone und die 98 % mit gelber Koloniefarbe sollten also durch illegitime Rekombinationsereignisse entstanden sein oder durch homologe Rekombination über das *aph(3')-IIa*-Gen. Weiterhin wäre auch eine Rekombination durch einen anderen Teil des Vektors denkbar, der dann in einem weiteren Schritt heraus rekombiniert wäre. Die beiden letzten Hypothesen sind jedoch sehr unwahrscheinlich, da in den bisherigen Sequenzdaten von *Cmm* keinerlei homologe Regionen zu dem Neomycin-Resistenzgen oder anderen Vektoranteilen zu finden sind. Der hohe Anteil an nicht durch homologe, sondern durch illegitime Rekombination entstandenen Mutanten bei der gerichteten Mutagenese konnte auch bei Experimenten anderer Mitglieder am Lehrstuhl bestätigt werden, ist also kein Phänomen, welches nur die Carotinoid-Biosynthese-Region betrifft. Erwähnenswert ist jedoch, dass der GC-Gehalt im Bereich des Carotinoid-Biosynthese-Clusters und der anderen per gerichteten Mutagenese inaktivierten Gene die für *Cmm* typischen ca. 72 % aufweist.

Eine derart hohe Rate von illegitimer Rekombination ist sehr ungewöhnlich. In *S. coelicolor* (OH und CHATER, 1997) und Mycobakterien ist jedoch ein ähnliches Verhalten beschrieben (KALPANA *et al.*, 1991; NORMAN *et al.*, 1995; MCFADDEN, 1996; PELICIC *et al.*, 1997; HINDS *et al.*, 1999, PARISH *et al.*, 1999). Das Auftreten erwünschter homologer Rekombinationsereignisse in Form von "double-crossover" konnte in *S. coelicolor* durch die Verwendung von linearer oder zirkulärer DNA deutlich verbessert werden, die mit Alkali- oder Hitzebehandlung denaturiert wurde (OH und CHANDLER, 1997). Demgegenüber konnte in *M. smegmatis* und *M. tuberculosis* mit hitzedenaturierter DNA keine Verbesserung erreicht werden, mit Alkali- und UV-Behandlung konnten jedoch ebenfalls Experimente zur gerichteten Mutagenese erfolgreich durchgeführt werden, die ohne diese Vorbehandlung der DNA nicht möglich waren (HINDS *et al.*, 1999; PARISH *et al.*, 1999). Eine eindeutige Korrelation zwischen der Länge der homologen Bereiche und der Anzahl der erhaltenen Mutanten mit "double-crossover" konnte nicht ermittelt werden, dies war von Gen zu Gen unterschiedlich. Eine ungefähr gleiche Größe der homologen Bereiche auf beiden Seiten des selektierbaren Markers erhöht jedoch offensichtlich das Auftreten von "double-crossover" gegenüber "single-crossover" (PARISH *et al.*, 1999). Was bisher in der Literatur zu illegitimer Rekombination und Problemen bei der gerichteten Mutagenese in Aktinomyceten beschrieben wurde, ist, was Angaben und Erklärungsversuche zu diesem Phänomen betrifft, sehr vage und Techniken zur Erhöhung des Anteils von Mutanten, die

durch homologe Rekombination entstanden sind, haben eine rein empirische Grundlage. Methoden, die zur Inaktivierung eines Gens sehr gut funktionieren, versagen bei anderen Genen völlig, ohne dass ein Zusammenhang ersichtlich ist. Auf diesem Gebiet ist das Wissen und Verständnis um die Mechanismen in allen Aktinomyceten noch sehr lückenhaft. Eine gezielte Entwicklung von Methoden, um illegitime Rekombinationen zu umgehen oder zumindest zu verringern, fehlt noch komplett.

Um zu überprüfen, ob in *Cmm* ebenfalls das Auftreten illegitimer Rekombinationsereignisse zugunsten homologer Rekombination zu verbessern ist, sollten in Zukunft Versuche mit auf unterschiedliche Weise denaturierter DNA, Einzelstrang-DNA usw. durchgeführt werden. Erste Versuche sind zwar bereits durchgeführt worden (KAUP, 2002), jedoch konnten keine konsistenten Daten ermittelt werden und eine systematische Untersuchung dieses Phänomens in *Cmm* fehlt bisher.

Eine weitere Erklärung für die hohe Rate an illegitimen Rekombinationen könnte auch sein, dass die Glycin-Behandlung einen so starken Stress darstellt, dass eine SOS-Antwort ausgelöst wird und die Mechanismen der illegitimen Rekombination aktiviert werden. Allerdings hat eine Reduzierung der Glycin-Konzentration auf die Hälfte keinen Einfluss auf den Anteil der durch illegitime Rekombination entstandenen Mutanten. Eine weitere Reduzierung der Glycin-Konzentration hätte zur Folge, dass die Transformationseffizienz drastisch einbräche und die Glycin-Behandlung sinnlos würde.

1.4 Weitere genetische Werkzeuge (Vektoren, Resistenzgene)

Auch wenn für *Cmm E. coli-Cmm*-Shuttle-Vektoren zur Verfügung stehen, so sind diese Vektoren in vielerlei Hinsicht nicht ideal. Im Wesentlichen gibt es vier Vektoren aus zwei Familien, die nutzbar sind: pDM302 bzw. pDM306 (MELETZUS *et al.*, 1993) als Abkömmlinge von pCM1 und pHN205 bzw. pHN216 (NAKHEI, 1993) als Abkömmlinge von pCM2. All diese Vektoren haben den Nachteil, dass sie mit rund 14 kb relativ groß sind und über nur sehr wenige Schnittstellen für die Klonierung von DNA-Fragmenten verfügen. Nur die pDM-Vektoren sind vollständig sequenziert, die pHN-Vektoren noch nicht. Zudem stammen sie beide von endogenen Plasmiden ab, was zu Problemen bei der Replikation und Segregation führen kann, wenn sie zusammen mit den beiden parentalen Plasmiden in ein und derselben Zelle vorliegen (NORDSTRÖM und AUSTIN, 1989; AUSTIN und NORDSTRÖM, 1990; WILLIAMS und THOMAS, 1992; DEL SOLAR *et al.*, 1998). Da die

beiden Pathogenitätsgene auf den endogenen Plasmiden lokalisiert sind, *celA* auf pCM1 (JAHR *et al.*, 2000) und *pat-1* auf pCM2 (DREIER *et al.*, 1997), müssen beide oder zumindest eines dieser Plasmide in *Cmm* vorhanden sein, wenn Transposon-Mutanten oder Mutanten durch gerichtete Mutagenese bzgl. ihrer Virulenz *in planta* getestet werden sollen. Insbesondere bei der Komplementation dieser Mutanten kann das gleichzeitige Vorhandensein des endogenen Plasmids und der davon abstammenden Vektoren zu Problemen führen. Die Stabilität der pHN-Vektoren wurde außerdem bisher nicht ausreichend getestet.

Deshalb wurde zum einen die Stabilität von pHN205 und pHN216 über 56 Generationen in Flüssigkultur unter unselektiven Bedingungen und *in planta* über vier Wochen ermittelt (ABT, 2003). Dabei zeigte sich, dass die Plasmide bis zur 22. Generation in praktisch allen Zellen vorhanden waren und der Anteil der plasmidtragenden Zellen langsam auf ca. 80 % (pHN205) bzw. 75 % (pHN216) in der 56. Generation sank. *In planta* waren nach vier Wochen noch etwa 80 % der Zellen plasmidtragend. Die Vektoren der pHN-Serie weisen eine für die Praxis ausreichende Stabilität auch unter unselektiven Bedingungen auf.

Zum anderen wurde auf Inkompatibilität zwischen pDM302 und gentamicinmarkiertem pCM1 über vier Wochen *in planta* getestet (ABT, 2003). In etwa 90 % der Fälle blieben beide Plasmide in den Zellen erhalten, was die Nutzbarkeit dieses Vektors z. B. für Komplementationsexperimente zeigt. Dass beide Plasmide in ein und derselben Zelle über viele Generationen parallel existieren können, überrascht etwas. Eine Erklärung könnte die Bildung eines Cointegrats zwischen pDM302 und pCM1 sein. Bei der unselektiven Anzucht innerhalb der Pflanze sollten sich die Cointegrate jedoch mit der Zeit wieder auflösen. Dies wurde jedoch nicht getestet. Die Koexistenz von pHN205/pHN216 mit pCM2 wurde nicht untersucht, da den Vektoren der pDM-Familie der Vorzug gegeben wurde, weil mit ihnen mehr Erfahrungen im Laboralltag vorliegen, ihre Sequenz bekannt ist und sie geringfügig mehr Schnittstellen zur Klonierung besitzen.

Aus den eben genannten Gründen der möglichen Inkompatibilität zwischen endogenen Plasmiden und den von ihnen abstammenden Vektoren wurde nach weiteren Vektoren gesucht, die in *Cmm* stabil replizieren, die aber nicht von endogenen Plasmiden abstammen. Versuche, Plasmide nach *Cmm* zu elektroporieren, die auf der Basis von RSF1010 beruhen, einem "broad-host-range"-Plasmid, welches sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Bakterien repliziert (SCHOLZ *et al.*, 1985, 1989; FREY und BAGDASARIAN, 1989; HARING und SCHERZINGER, 1989; GORMLEY und DAVIES, 1991; HERMANS *et al.*,

1991; NEŠVERA, *et al.*, 1994), waren nicht erfolgreich. Auch hier wären intensivere Studien notwendig, um die Ursachen zu klären.

Plasmide auf der Basis von pGA1 (SONNEN *et al.*, 1991; NEŠVERA *et al.*, 1997), einem Plasmid aus *C. glutamicum*, ließen sich ohne Probleme erfolgreich nach *Cmm* elektroporieren. Als Testplasmid für die von pGA1 abstammende pEC-Serie diente hier pEC-K18*mob2* (KIRCHNER, 1999; TAUCH *et al.*, 2002), welches das *aph(3')-IIa*-Gen trägt, das in *E. coli* wie *Cmm* Resistenz gegen Neomycin/Kanamycin vermittelt. Leider sind Plasmide mit diesem Replikon in *Cmm* nur unter selektiven Bedingungen stabil. Dies kann eine Reihe von Ursachen haben. Die Partitioning-Funktion zur kontrollierten Aufteilung der Plasmide bei der Zellteilung könnte in *Cmm* nicht oder nicht ausreichend funktional sein. Das Plasmid pGA1 besitzt ein *per*-Gen ("positive effector of replication"), welches, wenn es an den Promotor des Replikations-Gens bindet, eine Verstärkung der Expression dieses Gens und damit eine Erhöhung der Kopienzahl von pGA1 in *C. glutamicum* bewirkt (NEŠVERA *et al.*, 1997). Die Expression des *per*-Gens wird wiederum durch ein oder mehrere noch unbekannte Genprodukte reguliert, die auf pGA1 kodiert sind. Evtl. wird dieses *per*-Gen in *Cmm* nicht stark genug exprimiert, entweder durch eine stärkere Expression der reprimierenden Gene von pGA1 in *Cmm* oder durch zelleigene Regulatoren, was zu einer Unterreplikation führen könnte. Die Anwendung der von pGA1 abstammenden Vektoren ist im Pflanzentest somit nicht möglich, jedoch ist damit erstmals eine Alternative zu den von den endogenen Plasmiden abstammenden Vektoren in Experimenten gegeben, bei denen mit Selektionsdruck gearbeitet werden kann.

Das Gleiche trifft für die "broad-host-range"-Vektoren auf der Basis von pNG2 (SERWOLD-DAVIS *et al.*, 1987, 1990) aus *C. diphtheriae* zu, die hier in Form von pBHK18 aus der pBH-Serie (KIRCHNER, 1999; KIRCHNER und TAUCH, 2003) getestet wurden. pBHK18 trägt ebenfalls das *aph(3')-IIa*-Gen als selektionierbaren Marker. Die Segregation der Vektoren auf pNG2-Basis wurde auch in *C. glutamicum* bereits beobachtet (KIRCHNER, 1999). Die Plasmide aus der pEC- und pBH-Serie geben die Möglichkeit, in weiteren Untersuchungen relativ einfach neue Resistenzgene für *Cmm* zu testen, da sie auch mit Spectinomycin- (*aad9*) und Tetrazyklin-Resistenzkassetten (*tetA(Z)*) vorliegen (KIRCHNER, 1999; KIRCHNER und TAUCH, 2003). Mit dem *cat*-Gen, welches für eine Chloramphenicol-Acetyltransferase kodiert, konnten bei *Cmm* bisher keine resistenten Klone erhalten werden.

Die Suche nach weiteren in *Cmm* verwendbaren Resistenzgenen stellt für die Zukunft eine dringende Aufgabe dar, da derzeit nur drei in *Cmm* funktionale Resistenzkassetten verfüg-

bar sind (*cmx*, Cm^R; *aacCI*, Gm^R und *aph(3')-IIa*, Neo^R/Km^R). Ein Resistenzmarker wird für die Erzeugung von Mutanten, ob nun Transposon- oder gerichtete Mutante, benötigt. Dies ist meist das *cmx*-Gen. Zur Komplementation oder zur Erzeugung einer Doppelmutante wird ein zweites Resistenzgen benötigt, in diesem Fall das *aph(3')-IIa*-Gen der pDM- bzw. pHN-Vektoren. Die auf den Vektoren liegenden Gene *aacCI* bzw. *cmx* können nicht genutzt werden, da sie die selektionierbaren Marker sind, in die die DNA-Inserts kloniert werden, und nach erfolgreicher Klonierung folglich defekt sind. So betrachtet stehen derzeit nur das *cmx*- und das *aph(3')-IIa*-Gen als nutzbare Marker zur Verfügung, was das genetische Arbeiten mit *Cmm* sehr erschwert.

Um das in *Cmm* sehr gut funktionierende *cmx*-Gen von für Klonierungen wichtigen Restriktionsschnittstellen zu befreien, wurden per "Gene SOEing" (Horton, 1995) die *EcoRI*-, *PstI*- und *SacI*-Schnittstelle entfernt, ohne das Resistenzlevel zu beeinträchtigen. Es liegen außerdem *BamHI*-, *HincII*-, *HindIII*- und *XbaI*-Kassetten des *cmx*-Gens kloniert vor, die z. B. für die gerichtete Integrationsmutagenese verwendet werden können. Die Entfernung der Restriktionsschnittstellen diente u. a. als Vorbereitung für die Konstruktion eines Promotorprobe-Vektors für *Cmm* (LUDEWIG, 2002), bei dem die Promotorstärke über das Chloramphenicol-Resistenzlevel in Flüssigkultur bestimmt werden kann. Die in anderen Bakterien etablierten Reportergene wie z. B. das GFP-Gen ("green fluorescent protein") (SHIMOMURA *et al.*, 1962; TSIEN, 1998), welches die Promotorstärke durch die Stärke der auftretenden Fluoreszenz anzeigt, sind in *Cmm* leider nicht oder nur sehr unzureichend funktional (M. PIEPER, unveröffentlichte Daten), was wahrscheinlich auch daran liegt, dass diese Gene meist entweder für *E. coli* oder eukaryontische Systeme mit ihrem niedrigen GC-Gehalt und der entsprechenden Codon-Usage optimiert sind (CORMACK *et al.*, 1996) und deren Expression in *Cmm* mit einem GC-Gehalt von ca. 72 % (ENGEMANN, 2001) wahrscheinlich zu Problemen führt. Dies ist auch für *S. coelicolor* beschrieben (SUN *et al.*, 1999), dessen durchschnittlicher GC-Gehalt der DNA bei ca. 74 % liegt. Das in *S. coelicolor* gut funktionierende EGFP-Gen (SUN *et al.*, 1999) sollte in Zukunft auch in *Cmm* getestet werden.

Für die Klonierungen von Fragmenten aus der Cosmid-Bank von *Cmm* (GRÄFEN, 2001) wurde der neue *E. coli*-Klonierungsvektor pT19MECA2 konstruiert. Für die Komplementation von Transposon-Mutanten ist es oft notwendig, große DNA-Fragmente mit relativ unüblichen Schnittstellen in Vektoren umzuklonieren, damit diese Fragmente dann in die mit nur sehr wenig Restriktionsschnittstellen versehenen *E. coli*-*Cmm*-Shuttle-Vektoren

pDM302/306 bzw. pHN205/216 inseriert werden können. Da ein Resistenzwechsel hierbei sehr von Vorteil ist und der Cosmid-Vektor SuperCos2 von Stratagene bereits ein Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzgen trägt, sind die Vektoren pMECA (Amp^R) (THOMSON und PARROT, 1998) und pK19MECA2 (Km^R) (KIRCHNER, 1999; KIRCHNER und TAUCH 2003) nur schlecht nutzbar. Um einen Resistenzwechsel beim Klonieren trotzdem zu ermöglichen, wurde die MECA-mcs mit 44 singulären Schnittstellen auch für wenig gebräuchliche Restriktionsendonukleasen aus pMECA in pT18*mob2* (KIRCHNER, 1999; KIRCHNER und TAUCH, 2003) kloniert, welcher das Tetrazyklin-Resistenzgen *tetA(Z)* trägt (TAUCH *et al.*, 2000). Dieser Vektor hat sich bei der Klonierung von Cosmid-Fragmenten als sehr nützlich erwiesen.

2 Charakterisierung von Mutanten

2.1 EPS-Mutanten

Unter den Transposon-Mutanten von *Cmm* fielen immer wieder solche auf, die eine veränderte EPS-Bildung aufwiesen. *Cmm* bildet auf Agarplatten die typisch mukoiden gelben Kolonien, auf C-Medium etwas stärker ausgeprägt als auf TBY-Medium. Die Ursache dafür sind Exopolysaccharide (EPS). Auch auf Platten, die als Nährstoffquelle ausschließlich homogenisierte Tomatenpflanzen enthalten, bildet *Cmm* ebenfalls sehr schleimige Kolonien. Unter den Transposon-Mutanten waren sowohl Mutanten, die eine trockenere, als auch solche, die eine noch schleimigere Oberfläche aufwiesen. Die Struktur und Funktion der EPS geriet in den 1970er Jahren mehr in den Blickpunkt (SUTHERLAND, 1977). EPS sind Bestandteil der Zellwand und erfüllen dort höchstwahrscheinlich bei allen Eubakterien wichtige und sehr vielfältige Funktionen. Sie bilden eine wassergefüllte Matrix, die die Zelle vor Austrocknung schützt (SUTHERLAND, 1977). EPS können die Aufgaben eines Ionentauschers erfüllen, sind bei der Adhäsion auf biologischen wie abiotischen Oberflächen beteiligt und bei der Ausbildung von Biofilmen (DONLAN, 2002, DONLAN und COSTERTON, 2002). In der Interaktion zwischen phytopathogenen und symbiontischen Bakterien mit ihren Wirtspflanzen und bei der Verhinderung der Erkennung durch den Wirt, können die EPS eine wichtige Rolle spielen. Ein Beispiel für die symbiontische Interaktion ist die Knöllchenbildung von *Rhizobium meliloti* in *Medicago sativa* (Luzerne). In dieser Interaktion ist die Ausbildung von EPS seitens des Bakteriums essen-

tielle Voraussetzung für die Besiedlung der Wurzelhärchen und Ausbildung der Knöllchen, in denen die Stickstoff-Fixierung stattfindet. Mutanten von *R. meliloti*, die kein EPS produzieren, sind nicht in der Lage, diese Knöllchen auszubilden (NIEHAUS *et al.*, 1993). Im Gegenteil scheint die Pflanze sogar eine Abwehr zu starten. Für die phytopathogenen Bakterien *Erwinia stewartii*, *E. amylovora*, *Xanthomonas campestris* und *Pseudomonas solanacearum* ist beschrieben, dass Mutanten, die kein EPS oder eine geringere EPS-Menge produzieren, deutlich in ihrer Virulenz reduziert sind (COPLIN und COOK, 1990). EPS können weiterhin einen sehr wirksamen Elizitor in der inkompatiblen Reaktion zwischen der Nichtwirtspflanze und dem Bakterium darstellen.

Über die Gene, die für Biosynthese der EPS von *Cmm* verantwortlich sind, ist bisher nichts bekannt. Leider erbrachte die Charakterisierung der untersuchten EPS-Mutante TM382β 370-23 keine Anhaltspunkte, inwieweit das unterbrochene Gen an der EPS-Biosynthese beteiligt ist. Das unterbrochene Gen kodiert für ein sehr großes Protein von 2258 Aminosäuren, das in der N-terminalen Region Ähnlichkeiten zu Rhs-Proteinen aufweist. Der Rest des Proteins zeigt Ähnlichkeiten zu zellwandassoziierten Proteinen, Glukosidasen bzw. Zellulosebindedomänen. Keine dieser Homologien wird in direktem Zusammenhang mit der EPS-Biosynthese in der Literatur genannt, sodass die Funktion weiter unklar bleibt. Die insbesondere mittelbar an der EPS-Biosynthese beteiligten Gene sind allerdings allgemein noch nicht vollständig identifiziert worden. Zum Beispiel ist für *Sinorhizobium meliloti*, ein Stickstoff-fixierendes Knöllchenbakterium, beschrieben, dass die EPS-Biosynthese einer sehr komplexen Kontrolle unterliegt, u. a. auch der Regulation durch den phosphatabhängigen Regulator PhoB und den Proteinen ExpG und MucR (RÜBERG *et al.*, 1999).

Versuche zur Komplementation der Mutante sollten in Zukunft durchgeführt werden, ein passendes Cosmid, welches die entsprechende DNA-Region trägt, wurde bereits identifiziert (ABT, 2003). Es existieren noch weitere Transposon-Mutanten mit ähnlichem Phänotyp, die ein anderes Hybridisierungsmuster mit transposonspezifischen Sonden aufweisen (K.-H. GARTEMANN, persönliche Mitteilung) und die sich für weitere Untersuchungen in der Zukunft anbieten.

2.2 Pigment-Mutanten

Cmm bildet, wie viele Bakterien, ein oder mehrere Pigmente, die den Kolonien auf Festmedien die typisch gelb-orange Farbe geben. Bei diesen Pigmenten handelt es sich um Carotinoide. Etwa 0,6 % der bei der Transposon-Mutagenese erhaltenen Klone wiesen eine veränderte Färbung auf. Das Spektrum reichte von hellgelb über farblos und hellrosa bis rosa, statt der normalen gelb-orangen Koloniefarbe.

Carotinoide gehören zu der Stoffgruppe der Terpene. Der Grundbaustein ist die Isopren-Einheit - ein C₅-Körper. Man unterscheidet Carotinoide ohne Sauerstoff - sog. Carotine - und solche mit Sauerstoff - sog. Xanthophylle. Eines der bekanntesten Carotinoide ist wohl das β -Carotin, welches zusammen mit α -Carotin in hoher Konzentration in der Karotte (*Daucus carota*) vorkommt. Charakteristisch ist ihre gelbe bis rote Farbe. Es gibt eine Vielzahl von in der Natur vorkommenden Carotinoiden mit unterschiedlichen Funktionen. In Pflanzen spielen sie als akzessorische Pigmente im Lichtsammelkomplex der Photosynthese eine essentielle Rolle. In Bakterien dienen sie als integrale Membranverstärker und Mediatoren der Fluidität der Cytoplasmamembran, sowie als oxidativer Schutz der Lipide. Eine Rolle, die in den Eukaryonten von Sterolen wie dem Cholesterol übernommen wird. Besonders geeignet sind hier Carotinoide mit polaren Endgruppen, hydroxylierte und glykosylierte Carotinoide sowie deren Fettsäureester (HARA *et al.*, 1999). Außerdem dienen sie als UV-Schutz und als Fänger von reaktiven Sauerstoffspezies.

Bei der Untersuchung der Phyllosphäre (das ist der Lebensraum der Blattoberfläche) von Erdnuss-Pflanzen (*Arachis hypogaea* L.) konnte gezeigt werden, dass *Clavibacter michiganensis* neben *Curtobacterium* zu den UV-tolerantesten Besiedlern dieses Habitats gehört (SUNDIN und JACOBS, 1999; JACOBS und SUNDIN, 2001). Die pigmentierten Bakterien waren deutlich unempfindlicher gegenüber UV-A- (320 - 400 nm), UV-B- (280 - 320 nm) und UV-C-Strahlung (< 280 nm) als die unpigmentierten Besiedler der Phyllosphäre. Eine Schutzwirkung von bestimmten Carotinoiden gegenüber UV-B-Strahlung konnte auch von SANDMANN *et al.* (1998) in mit Genen der Carotinoid-Biosynthese transformierten *E. coli*-Zellen sowie von RAJAGOPAL *et al.* (1997) in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gezeigt werden. Erste Tests zur UV-Sensitivität der pigmentlosen Mutante TM100 β 113-35 ergaben zwar eine leichte Erhöhung der UV-Empfindlichkeit gegenüber dem pigmentierten Wild-

typ, dieser Effekt war jedoch sehr schwach ausgeprägt und evtl. nicht signifikant. Weitere Experimente zu dieser Fragestellung sind geplant.

Die Biosynthese von Carotinoiden ist in Pflanzen und einigen Bakterien bereits weitgehend aufgeklärt. Eine schematische Übersicht der dazu notwendigen typischen bakteriellen Carotinoid-Biosynthese-Gene, der codierten Enzyme und der von ihnen katalysierten Reaktionen ist in Abb. V.1 dargestellt.

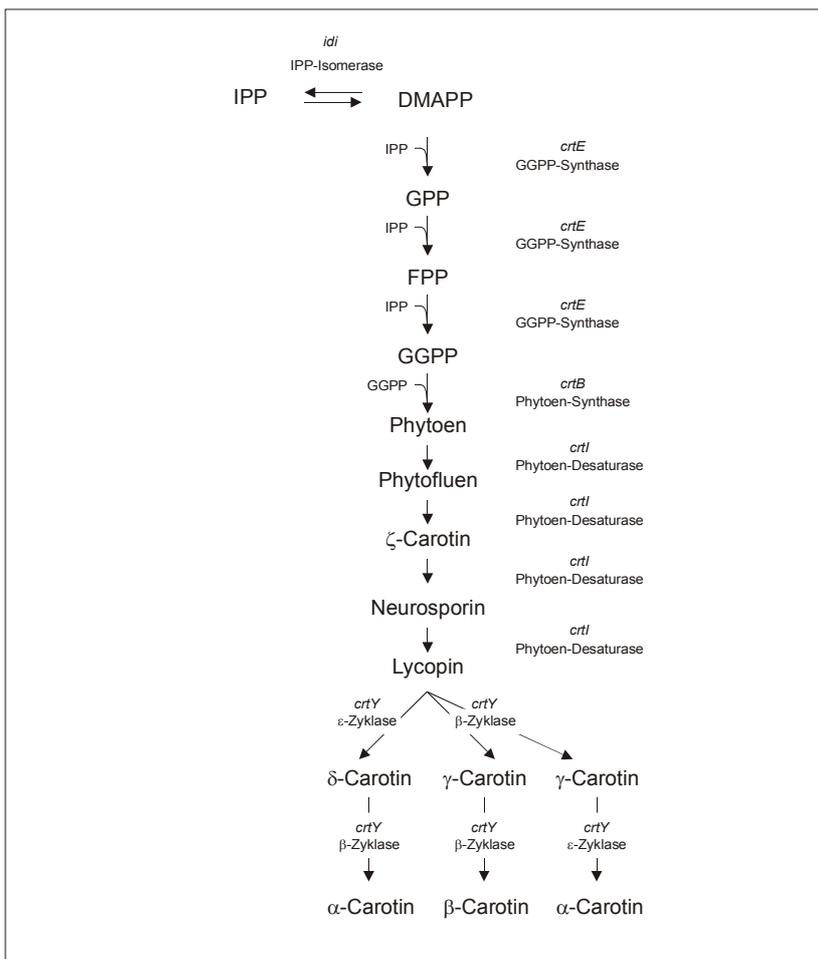


Abb. V.1: Schematische Übersicht über die von typischen bakteriellen Carotinoid-Biosynthese-Genen codierten Proteine und den von ihnen katalysierten Reaktionen. IPP: Isopentenyl-Pyrophosphat, DMAPP: Dimethylallyl-Pyrophosphat, GPP: Geranyl-Pyrophosphat, FPP: Farnesyl-Pyrophosphat, GGPP: Geranylgeranyl-Pyrophosphat.

Die Ausgangssubstanz für die Biosynthese der Carotinoide, das Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) - ein C₅-Körper, kann über zwei unabhängige Biosynthesewege hergestellt werden: den "klassischen" Mevalonat-Weg (QURESHI und PORTER, 1981), sowie dem Deoxyxylose-5-Phosphat-Weg (ROHMER *et al.*, 1996). Ersterer ist im Cytoplasma von Pflanzen und

Pilzen nachgewiesen worden, letzterer in pflanzlichen Plastiden, Grünalgen (LICHENTHALER, 1998) und vielen Eubakterien (PUTRA *et al.*, 1998). IPP kann durch das *idi*-Genprodukt (IPP-Isomerase) in Dimethylallyl-Pyrophosphat (DMAPP) isomerisiert werden. Ein Molekül IPP (C₅) reagiert mit einem Molekül DMAPP (C₅) in einer Kopf-Schwanz-Reaktion zu Geranyl-Pyrophosphat (GPP, C₁₀). Durch die sequentielle Addition von je einem Molekül IPP entsteht zuerst Farnesyl-Pyrophosphat (FPP, C₁₅) und schließlich Geranylgeranyl-Pyrophosphat (GGPP, C₂₀). Alle vorgenannten Reaktionen werden in den meisten Bakterien durch das *crtE*-Genprodukt (GGPP-Synthase) katalysiert. Das *crtB*-Genprodukt (Phytoen-Synthase) katalysiert nun die Kopf-Kopf-Addition von zwei GGPP-Molekülen zu Phytoen (C₄₀). Alle bisher bekannten Phytoen-Synthasen sind zueinander homolog. Durch das *crtI*-Genprodukt (Phytoen-Desaturase) werden zu den drei vorhandenen konjugierten Doppelbindungen im (farblosen) Phytoen bis zu vier weitere eingefügt. Durch die zunehmende Anzahl von chromophoren Gruppen verändert sich die Lichtabsorption der entstehenden Zwischenprodukte, die folgenden Produkte sind für viele Bakterien typisch: Phytofluen (farblos), ζ-Caortin (zitronengelb), Neurosporin (gelb) und schließlich Lycopin (rot). Es gibt zwei verschiedene Phytoen-Desaturase-Familien, die der Pflanzen und *Cyanophyceae* sowie die der Bakterien. Mitglieder innerhalb einer Familie sind zueinander homolog, die beiden Familien unterscheiden untereinander in Aminosäuresequenz, Funktion und Cofaktoren.

Das Lycopin kann auf unterschiedliche Weise an einem oder beiden Enden durch das *crtY*-Genprodukt (Lycopin-Zyklase) zyklisiert werden. Wird an beiden Enden durch eine β-Zyklase ein β-Iononring gebildet, so entsteht β-Carotin. Bei jeweils einem ε-Iononring (durch eine ε-Zyklase katalysiert) und einem β-Iononring (durch eine β-Zyklase katalysiert) entsteht α-Carotin, mit nur einem einzigen ε-Iononring δ-Carotin, mit nur einem einzigen β-Iononring γ-Carotin (vergl. Abb. V.1). In Bakterien überwiegt meist β-Carotin, in Pflanzen meist α-Carotin. Auch hier unterscheiden sich die Enzyme der Pflanzen und *Cyanophyceae* von denen der Eubakterien. Alle bisher genannten Substanzen sind Carotine. Abhängig von der Bakterienspezies können nun vielfältige Modifikationen durch Hydroxylierungen, Glykosylierungen und Veresterungen vorgenommen werden. Zusätzlich zu den bisher genannten C₄₀-Carotinoiden sind sowohl verkürzte Carotinoide - C₃₀, z. B. in *Heliobacterium* (TAKAICHI *et al.*, 1997) und in *Staphylococcus* (MARSHALL und WILMOTH, 1981) -, als auch verlängerte - C₄₅ und C₅₀ z. B. in *Flavobacterium* (LIAAEN-JENSEN und WEEKS, 1966) und *Sarcina* (FÉRÉZOU, 1992) - in Bakterien beschrieben worden.

Bei der ersten Charakterisierung der Pigment-Mutanten von *Cmm* durch Southern-Hybridisierung zeigte sich, dass bei den meisten Mutanten auch eine hybridisierende Bande mit der pUC-Sonde auftrat, was auf ein Cointegrat oder (illegitime) Rekombination hinweist. Vielleicht stellt der in diesem Bereich hohe GC-Gehalt der DNA erneut ein Problem für eine korrekte Transposition dar. Trotzdem gelang es, den unterbrochenen Bereich der Pigment-Mutante TM100β 113-35 zu klonieren und anzusequenzieren. Die Funktionen der Gene wurden aufgrund von Homologievergleichen abgeleitet. Das unterbrochene Gen kodiert für ein Fusionsprotein aus Phytoen-Synthase und Phytoen-Desaturase, welches *crtBI* genannt wurde. Es ist Teil eines Operons aus fünf Genen: *crtE* (Geranylgeranyl-Pyrophosphat-Synthase), *crtBI* (Phytoen-Synthase/Phytoen-Desaturase), *crtYg* und *crtYh* (C₅₀-Carotinoid-ε-Zyklasten) sowie *crtEb* (Lycopin-Elongase) (vergl. Abb. V.2), wie anhand von Vergleichen mit Genprodukten z. B. aus den verwandten Aktinomyceten *Brevibacterium linens*, *B. flavum* und *Agromyces mediolanus* geschlossen werden kann (KRUBASIK, 2000; KRUBASIK und SANDMANN, 2000; KRUBASIK *et al.*, 2001a/b). Das Carotinoid-Biosynthese-Operon von *Cmm* ist in Abb. V.2 im Vergleich mit Biosynthese-Operons nah verwandter Aktinomyceten dargestellt. *Cms* besitzt ein praktisch identisches Carotinoid-Biosynthese-Operon (Identität: DNA: 93,6 %, Proteine: durchschnittlich 96,1 %). Trotzdem wird aus noch unbekannter Ursache in *Cms* kein Pigment gebildet, die Kolonien sind auf Festmedien farblos. Das Operon in *A. mediolanus* ist ebenfalls gleich strukturiert, wie auch in *B. flavum*, wobei hier ein zusätzliches Gen (ORF R) unbekannter Funktion zwischen dem *crtE*- und *crtB*-Gen im Operon vorhanden ist. Demgegenüber liegen die Gene in *B. linens* zwar alle in ein und derselben DNA-Region, doch auf mehrere kleine Operons verteilt, vor.

Alle Enzyme der Carotinoid-Biosynthese bis zum potentiellen C₅₀-Carotin sind in *Cmm* in Form dieses Operons kodiert. Zudem kodiert das gegenläufig transkribierte *idi*-Gen für die Isopentyl-Pyrophosphat-Isomerase, dessen Genprodukt die beiden C₅-Ausgangskörper Isopentyl-Pyrophosphat (IPP) und Dimethylallyl-Pyrophosphat (DMAPP) ineinander umwandeln kann. Das Endprodukt dieser Enzymkette dürfte ein C₅₀-Carotin bisher noch unbekannter Struktur sein. In der verwandten Art *B. flavum* konnten KRUBASIK *et al.* (2000, 2001a/b) ein neues C₅₀-Carotinoid (Decaprenoxanthin) und dessen Carotin-Vorstufe Sarcinen nachweisen.

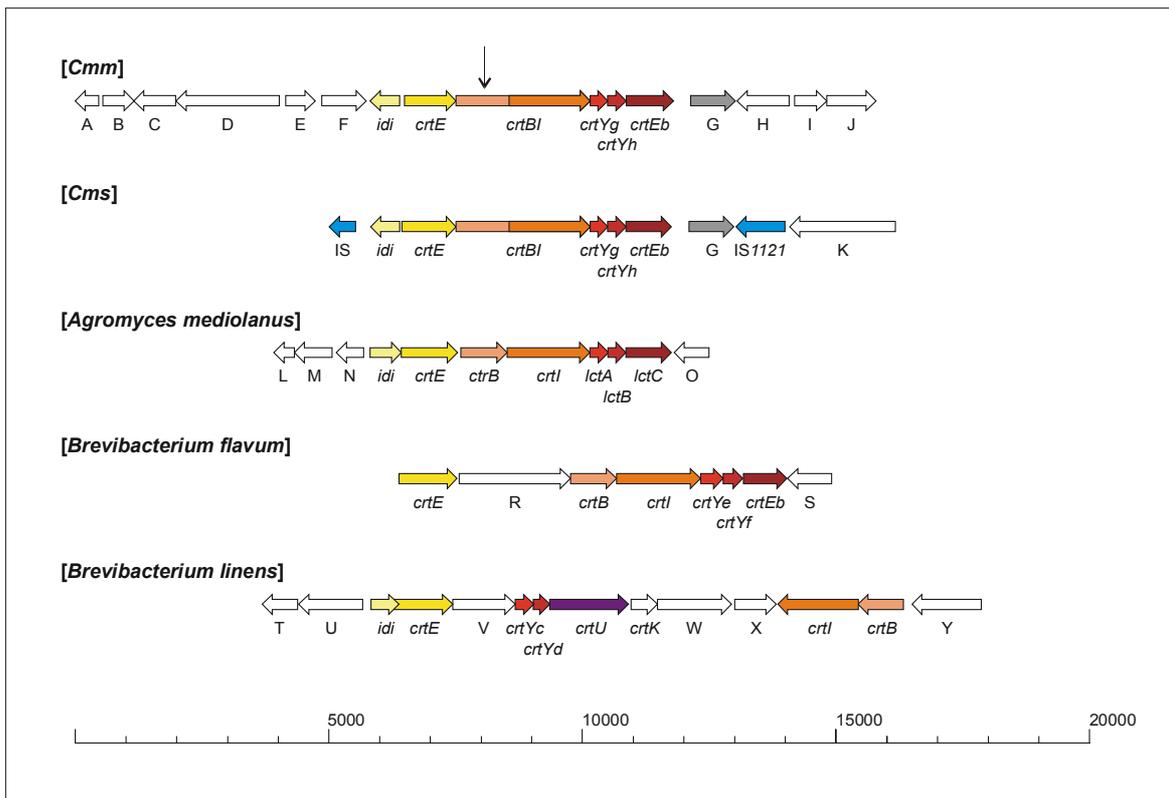


Abb. V.2: Schematische Darstellung des Aufbaus der Carotinoid-Biosynthese-Cluster (gelb bis lila) und der umgebenden DNA-Regionen in *Cmm*, *Cms* und nah verwandten Arten. Gene sind als Pfeile dargestellt, Gene mit gleicher/ähnlicher Funktion in gleicher Farbe. Die beiden das Cluster flankierenden IS-Elemente in *Cms* sind blau hervorgehoben. ORFs, die wahrscheinlich nicht zur Carotinoid-Biosynthese gehören, sind von A bis Y chronologisch von links oben nach rechts unten durchnummeriert. Der Insertionsort von *TnI409Cβ* in der Mutante TM100β 113-35 ist durch einen senkrechten Pfeil gekennzeichnet. Skalierung in Basenpaaren.

Die unterschiedlichen Farben der Pigment-Mutanten lassen sich möglicherweise auf die verschiedenen Zwischenprodukte der eben beschriebenen Carotinoid-Biosynthese zurückführen: Alle Zwischenprodukte der bakteriellen Carotinoid-Biosynthese bis zum Phytofluoren sind farblos, ζ -Carotin ist zitronengelb, Neurosporin gelb und Lycopin rot. In Abhängigkeit von der in den Mutanten gebildeten Mengen/Mengenverhältnisse der Intermediate der von *Cmm* gebildeten Carotinoide ergeben sich Farben von farblos bis rosa bzw. gelb. Eventuelle Modifikationen z. B. durch Hydroxyl- oder Glykosylreste könnten die Farbe noch weiter variieren.

Das aus der Cosmid-Genbank von *Cmm* (GRÄFEN, 2001) klonierte Carotinoid-Biosynthese-Operon führt auch in *E. coli* zu einer Gelbfärbung der Kolonien, wenn es unter der Kontrolle des *lac*-Promotors steht. Der eigene Promotor des Operons wird in *E. coli* dagegen nicht oder nur sehr schwach exprimiert. Der erfolgreichen heterologen Expression des Operons in *E. coli* folgte die erfolgreiche Komplementation der *Cmm*-Mutante

TM100 β 113-35, auch sie zeigte dadurch wieder die typische gelbe Koloniefarbe (ABT, 2003).

Die Isolierung des oder der Carotinoide, die von *Cmm* gebildet werden, gelang bisher nicht. Problematisch ist, dass sie hydrophil zu sein scheinen und somit nach einer zur Isolierung von Carotinoiden aus Bakterien üblichen Lyse der Zellen mit heißem Methanol bei der Extraktion mit Ether/Petrolether nicht in die lipophile Phase übergehen. Das durch das klonierte Fragment in *E. coli* gebildete Carotinoid ist demgegenüber hydrophob. Dies lässt vermuten, dass das von den Enzymen des Operons synthetisierte Grund-Carotinoid in *Cmm* noch weiter modifiziert wird. Hier kämen Hydroxylierungs-, Glykosylierungs- und Epoxidierungs-Reaktionen in Frage. In der Nähe des Insertionsortes des Transposons in der kolonisationsdefekten Mutante TM382 β 330-18 liegt ein ORF G, der Ähnlichkeiten zu einem Zeaxanthin-Epoxidase-Gen zeigt. Zeaxanthin entsteht, wenn β -Carotin an den Positionen 3 und 3' hydroxyliert wird. Dieser Reaktionsschritt wird in Bakterien vom *crtZ*-Genprodukt katalysiert (MISAWA *et al.*, 1990). Es sind auch pflanzliche β -Carotinoid-Hydroxylasen (SUN *et al.*, 1996) beschrieben, sowie entsprechende Gene bei den *Cyanophyceae* (*crtR*, MASAMOTO *et al.*, 1998). Das Zeaxanthin könnte von der potentiellen Zeaxanthin-Epoxidase weiter modifiziert werden und das von diesem ORF kodierte Protein könnte somit eines derjenigen Enzyme sein, die das Grund-Carotinoid von *Cmm* so verändern, dass es hydrophile Eigenschaften erhält.

Die Mutation, die zur Farblosigkeit führt, ermöglicht eine Stamm-Markierung, da sie einen leicht zu verfolgenden phänotypischen Marker darstellt. Diese Eigenschaft wurde bereits beim Nachweis der Transferierbarkeit der beiden endogenen Plasmide pCM1 und pCM2 in *Cmm* erfolgreich genutzt (PIEPER, 2001). Die unterschiedlich gefärbten Mutanten von *Cmm* könnten sich auch in Experimenten als nützlich erweisen, in denen Bakterienpopulationen mit unterschiedlichen Phänotypen bzgl. der Kolonisationsfähigkeit *in planta* getestet und deren Mengenverhältnisse zueinander ermittelt werden sollen. Ebenfalls könnte im Rahmen von Untersuchungen zur Biokontrolle von nicht virulenten *Cmm*-Stämmen/-Mutanten deren Wirksamkeit mit Hilfe von Farbstoff-Biosynthese-Mutanten überprüft werden.

2.3 Mutanten mit verzögerter Virulenz

Um Mutanten mit veränderter Virulenz zu identifizieren, wurden etwa 1500 Transposon-Mutanten des Wildtyps *Cmm* NCPPB382 in einem dreistufigen Screening *in planta* untersucht (vergl. Ergebnisse Kapitel IV.B 1, Seite 81). Wie bereits erwähnt, verlieren die meisten Zellen bei der Elektroporation das große endogene Plasmid pCM2. Als Kontrolle für die Tests *in planta* diente folglich das entsprechende Derivat CMM101. Zum Vergleich wurde trotzdem auch der Wildtyp *Cmm* NCPPB382 immer mit getestet. Mit dieser mehrstufigen Strategie konnten einerseits sehr viele Mutanten getestet werden, andererseits interessante Mutanten einem intensiveren Test unterzogen werden. Trotzdem sind sicherlich viele Mutanten auf diese Art und Weise fälschlicherweise als nicht in ihrer Virulenz verändert eingruppiert worden, insbesondere beim ersten Screening.

Es zeigte sich schnell, dass der Pflanzentest sehr empfindlich auf äußere Bedingungen, wie die Pflanz Erde, die Beleuchtungsverhältnisse in der Klimakammer (Alterung der speziellen Leuchtstoffröhren), Jahreszeit usw. reagierte. Auch handelt es sich bei dem Kultivar "Moneymaker" der Kulturtomate um keine isogene Sorte, die Pflanzen sind also genetisch nicht identisch, sondern unterliegen einer größeren Schwankungsbreite. Dieses Kultivar wurde am Beginn der genetischen Arbeiten mit *Cmm* ursprünglich aufgrund seiner besonderen Suszeptibilität gegenüber *Cmm* ausgewählt. Da es sich um eine biologische Interaktion zwischen zwei Organismen handelt, reagiert jede Pflanze ein wenig anders, was sich selbstverständlich ungünstig auf die Schwankungsbreite der Ergebnisse auswirkt. Ein kleiner Prozentsatz der Pflanzen blieb auch bei Infektion mit dem Wildtyp *Cmm* NCPPB382 immer komplett resistent gegenüber der Ausbildung von Welkesymptomen. Auch bei größtmöglicher Sorgfalt lassen sich keine wirklich 100 %ig identischen Bedingungen für jeden Test *in planta* schaffen, sodass die einzelnen Tests letztendlich nur sehr eingeschränkt vergleichbar sein können. Durch eine möglichst hohe Anzahl von Testpflanzen kann dies zwar bedingt aufgefangen werden, jedoch sind dem schnell personelle, Kapazitäts- und logistische Grenzen gesetzt.

Um auch kleinere Änderungen in der Virulenz zu identifizieren und darzustellen, wurde eine neue Art der Auswertung eingeführt, da der bisher genutzte Welke-Index (WI) (MELETZUS *et al.*, 1993), der angibt, nach wie vielen Tagen die Hälfte der infizierten Pflanzen Welkesymptome zeigen, ein zu grobes Maß darstellte. Deshalb wurde der Verlauf der Welkesymptome über den Zeitraum von 28 Tagen in verschiedene Stufen eingruppiert und graphisch aufgetragen (vergl. Ergebnisse Kapitel IV.B 1, Seite 83). Das daraus resultie-

rende Diagramm lässt deutlicher auch kleinere Unterschiede zu Tage treten. Allerdings sind nur dann halbwegs gesicherte Aussagen möglich, wenn der Stichprobenumfang entsprechend groß ist.

Ein weiteres Problem ist, dass eine deutliche Änderung der Virulenz von *Cmm* mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit durch das Ausschalten nur eines einzigen Gens oder Operons erreicht wird. Dass es zwei Gene gibt, die allein zur Welkeauslösung ausreichen (die beiden plasmidkodierten Pathogenitätsdeterminanten *pat-1* und *celA*), ist bereits ungewöhnlich. Folglich waren die meisten in der Virulenz veränderten Mutanten durch größere Deletionen oder Rearrangements entstanden, die in seltenen Fällen durchaus bei der Transposition üblich sind oder auch unabhängig davon auftreten können. Von den etwa 20 deutlich in der Virulenz veränderten Transposon-Mutanten blieben so nur drei übrig, die näher charakterisiert werden konnten.

Zur weiteren Aufklärung der Interaktion zwischen *Cmm* und der Tomate müssten in Zukunft viele Mutanten charakterisiert werden, die (sehr) kleine Virulenzveränderungen aufweisen. Um diese kleinen Änderungen in der Virulenz überhaupt identifizieren zu können, müssten sehr große Pflanzenpopulationen mit je einer Transposon- oder gerichteten Mutante überprüft werden. Nur dann wäre eine einigermaßen gesicherte Aussage über die Signifikanz der Abweichung im Phänotyp vom Vergleichsstamm CMM101 möglich. Dies stellt jedoch, bei relativ geringer Erfolgsaussicht pro Mutante, einen großen materiellen wie personellen Aufwand dar. Ein einfacheres und reproduzierbareres Testsystem wäre wünschenswert, welches nicht die Nachteile artifizierlicher Systeme mit sich bringt. Jedoch ist ein derartiges System derzeit nicht verfügbar und müsste erst entwickelt werden, was ein sehr aufwendiges Unterfangen ist, und dessen Brauchbarkeit bzgl. der Aussagekraft zur Virulenz von *Cmm* keineswegs sicher ist. Es könnten u. U. Verbesserungen am derzeit verwendeten Testsystem vorgenommen werden, so z. B. die Verwendung eines isogenen Kultivars der Tomate. Dies hätte allerdings zur Folge, dass zukünftige Versuchsergebnisse mit den bisherigen nicht mehr vergleichbar wären.

Die Insertionsorte von Tn1409C β liegen in den beiden Transposon-Mutanten TM382 β 324-50 und TM382 β 370-45 nur etwa 3,5 kb voneinander entfernt (Abb. V.3). Beide Mutanten zeigen eine Reduzierung in der Virulenz, TM382 β 324-50 eine deutliche, TM382 β 370-45 eine leichte. Das Transposon ist jeweils in einen ORF inseriert (ORF A und ORF C in Abb. V.3), der wie auch ORF B Ähnlichkeiten zu hypothetischen Proteinen aus *Xylella fastidiosa*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* und *Thermobifida fusca* zeigt.

Bei den beiden erstgenannten Bakterien handelt es sich um Gram-negative phytopathogene Bakterien. *X. fastidiosa* 9a5c ist der Erreger der "citrus variegated chlorosis" (CVC) bei Zitrusfrüchten, *X. fastidiosa* Temecula1 der Erreger der Rebstock-Krankheit "Pierce Disease" bei Wein. Der Erreger der Krankheit CVC wurde erst 1993 identifiziert. *X. fastidiosa* besiedelt wie *Cmm* das Xylem der Wirtspflanze. Als Überträger von Pflanze zu Pflanze fungieren Insekten (Zikaden der Familien *Cercopidae* und *Cicadidae*), die sich vom Xylemsaft ernähren und beim Anstechen der Gefäße die Pflanze oder sich mit *X. fastidiosa* infizieren. Befallene Orangenbäume oder Rebstöcke zeigen gelb verfärbte Blätter und produzieren nur noch kleine harte Früchte, die wirtschaftlich wertlos sind. Auch andere Obstsorten, Kaffee und Nüsse fallen dem Bakterium zum Opfer. Um den Erreger zu bekämpfen, müssen die Bauern bisher die Anlagen abbrennen und neue Plantagen oder Weinberge anlegen. *X. axonopodis* pv. *citri* ist der Erreger des Zitruskrebs ("citrus canker") bei Zitrusfrüchten. Sowohl die beiden genannten *X. fastidiosa*-Stämme als auch *X. axonopodis* pv. *citri* sind vollständig sequenziert (VAN SLUYS *et al.*, 2002).

T. fusca gehört zu den Aktinomyzenten und ist weitläufig verwandt mit *Cmm*. Es handelt sich um ein Gram-positives thermophiles Bodenbakterium, welches Reste abgestorbener Pflanzen in Kompost- oder Misthaufen degradiert und über eine große Anzahl von pflanzenmaterialdegradierenden Exo-Enzymen verfügt. Alle diese Bakterien sind in die Interaktion mit Pflanzen involviert.

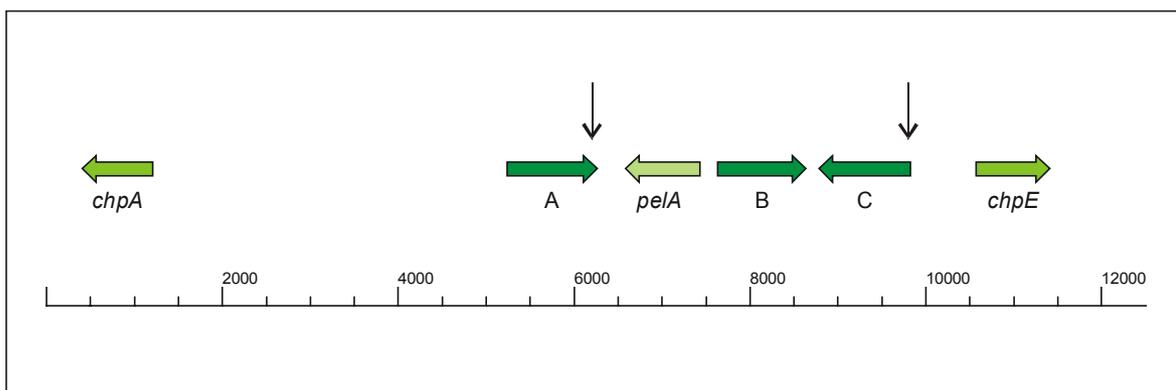


Abb. V.3: Schematische Darstellung der ORFs/Gene (waagrechte grüne Pfeile) im Bereich der Insertionsorte (senkrechte Pfeile) von Tn/409Cβ in den Mutanten TM382β 324-50 (linker Pfeil) und TM382β 370-45 (rechter Pfeil). Skalierung in Basenpaaren.

Die höchste Homologie in BLAST-Abfragen (ALTSCHUL *et al.*, 1997) für die ORFs A, B und C zeigte jeweils ein und dasselbe Protein, welches schwache Ähnlichkeiten zu Serin-Proteasen zeigt. Die ebenfalls in dieser Region lokalisierten homologen Gene zu dem Pathogenitätsgen *pat-1* von pCM2 (*chpA* und *chpE*) gehören auch zu der Familie der

Serin-Proteasen. Zwischen dem ORF A und dem ORF B liegt ein potentiell Pektatlyase-Gen (*peIA*), dessen Genprodukt die Spaltung von Pektin, einem Bestandteil der pflanzlichen Zellwand, katalysiert. Es gibt in *Cmm* mindestens noch ein weiteres Pektatlyase-Gen (I. GRÄFEN, unveröffentlichte Daten). Pektindegradierende Enzyme spielen sowohl in nekrotrophen als auch opportunistischen pflanzenpathogenen Bakterien eine wichtige, teilweise essentielle Rolle (ALFANO und COLLMER, 1996). Gut untersucht sind die pektinolytischen Enzyme in *Erwinia carotovora*, *E. chrysanthemi* und *Pseudomonas viridiflava*. *P. viridiflava* produziert nur eine Pektatlyase, die allerdings essentiell für die opportunistische Pathogenität z. B. in Gemüse ist (LIAO *et al.*, 1988). Im Gegensatz zu *Cmm* und *Xylella* handelt es sich bei *Erwinia* allerdings nicht um einen Xylembewohner, sondern um ein Pathogen, das über Wunden in den Apoplasten und in Hohlräume z. B. in den Blättern eindringt. *E. carotovora* und *E. chrysanthemi* sekretieren eine ganze Reihe von Pektatlyasen über das Typ II-Sekretionssystem (BARRAS *et al.*, 1987, 1994). Mutanten, die diesen Weg nicht mehr besitzen, sind nicht mehr virulent. Die verschiedenen Isoenzyme der Pektatlyase von *E. chrysanthemi* tragen in unterschiedlichem Maße zur Virulenz und zur Ausprägung der Gewebemazeration bei, auch abhängig von der befallenen Pflanze. (BEAULIEU *et al.*, 1993). Ihre Expression wird durch mindestens drei Regulatorproteine reguliert (HUGOUVIEUX-COTTE-PATTE *et al.*, 1996). Obwohl viele Aspekte pektinolytischer Enzyme und ihrer Regulation noch unverstanden sind, so scheinen sie eine wichtige Rolle bei der Invasion und Proliferation von phytopathogenen Bakterien in ihrer Wirtspflanze zu spielen. Allerdings konnte in der Genomsequenz von *X. fastidiosa* kein potentiell Pektatlyase-Gen gefunden werden (VAN SLUYS *et al.*, 2002).

Die Rolle der zu Serin-Proteasen homologen Genprodukte in der DNA-Region der Insertionsorte der Mutanten TM382 β 324-50 und TM382 β 370-45 ist bisher noch unklar. Eine Komplementation der Mutanten steht noch aus, den Bereich überdeckende Cosmide liegen aber bereits vor (ABT, 2003).

Die Mutante TM382 β 330-18 ist nicht mehr in der Lage, die Wirtspflanze erfolgreich zu kolonisieren und somit auch keine Welke auszulösen. Sie erreicht nur einen Titer von maximal etwa $5 \cdot 10^5$ bis $5 \cdot 10^6$ cfu/g Frischgewicht, im Gegensatz zu etwa 10^9 bis 10^{10} cfu beim Wildtyp und dem Curing-Derivat CMM100 bzw. CMM101. Das durch das Transposon inaktivierte Gen zeigt Ähnlichkeiten zu GTP-Pyrophosphokinasen. Die bekannteste GTP-Pyrophosphokinase ist die vom *relA*-Gen kodierte (p)ppGpp-Synthase, eines der Schlüsselenzyme der "stringenten Kontrolle", die z. B. bei Aminosäuremangel

den Stoffwechsel der Zelle grundlegend umprogrammiert (COZZONE, 1980, 1981; CONDON *et al.*, 1995). Bei dem inaktivierten Gen handelt es sich aber mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um das *relA*-Gen, da es in den Genom-Sequenzdaten von *Cmm* Gene gibt, die deutlich größere Ähnlichkeiten zu *relA*-Genen z. B. aus *S. coelicolor* aufweisen.

In dieser Transposon-Mutante ist das Transposon erneut in einen Bereich mit niedrigerem GC-Gehalt als in *Cmm* üblich inseriert, was auch bei den Mutanten TM382β 324-50 und TM382β 370-45 der Fall ist. Dies bestätigt die Vermutung, dass Tn1409C wahrscheinlich bevorzugt in Bereiche des Chromosoms von *Cmm* inseriert, die einen etwas niedrigeren GC-Gehalt besitzen. Die Komplementation des unterbrochenen Gens erbrachte keine Veränderung des Phänotyps der Mutante, also keine Wiederherstellung der Kolonisationsfähigkeit (ABT, 2003).

Es konnte über Southern-Hybridisierung mit der *pat-1*-Sonde gezeigt werden, dass die chromosomale Homologie zu *pat-1* (*chpA*) in TM382β 330-18 deletiert ist. Diese Deletion unbekannter Größe scheint für den Phänotyp der Mutante verantwortlich zu sein, da die Komplementation des inaktivierten potentiellen GTP-Pyrophosphokinase-Gens die Kolonisationsfähigkeit der Mutante nicht wiederherstellen konnte. Wie aus Abb. V.3 ersichtlich, liegen die beiden in den Transposon-Mutanten TM382β 324-50 und TM382β 370-45 inaktivierten ORFs etwa 3,5 kb entfernt von *chpA*. Durch Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und Southern-Hybridisierung (K.-H. GARTEMANN, unveröffentlichte Daten) konnte gezeigt werden, dass die in Abb. V.3 gezeigte DNA-Region wahrscheinlich Teil eines etwa 130 kb großen *VspI*-Fragments ist, welches zumindest zum Teil in der Mutante TM382β 330-18 deletiert ist. Die deletierte DNA-Region wurde "*chp*-Genregion" genannt (vergl. Abb. V.4), weil sie neben *chpA* und *chpE* noch fünf weitere Homologien zu *pat-1* enthält, *chpB*, *chpC*, *chpD*, *chpF* und *chpG*, wie die Sequenzdaten des Genoms zeigen (I. GRÄFEN, unveröffentlichte Daten). Alle diese Gene haben Ähnlichkeiten mit Serin-Proteasen vom Trypsin-Subtyp, einige von ihnen scheinen Pseudogene zu sein, da sie "frameshifts" und Stopcodons enthalten (*chpA*, *chpB*, *chpD*), die anderen scheinen funktional zu sein. Fast alle von ihnen kodierten Proteine besitzen wahrscheinlich auch ein Signalpeptid.

Die *chp*-Genregion weist noch weitere Besonderheiten auf: In dieser DNA-Region gibt es große Bereiche, die scheinbar frei von genetischer Information sind, was ungewöhnlich für *Cmm* und für bakterielle Genome ist. Außerdem gibt es viele defekte Gene und Anzeichen für Rearrangements. IS-Elemente oder Transposons, die die Ursache für diese Rearrange-

ments sein könnten, wurden in der DNA-Region bisher nicht identifiziert. Der GC-Gehalt liegt tlw. deutlich unter dem in *Cmm* sonst üblichen.

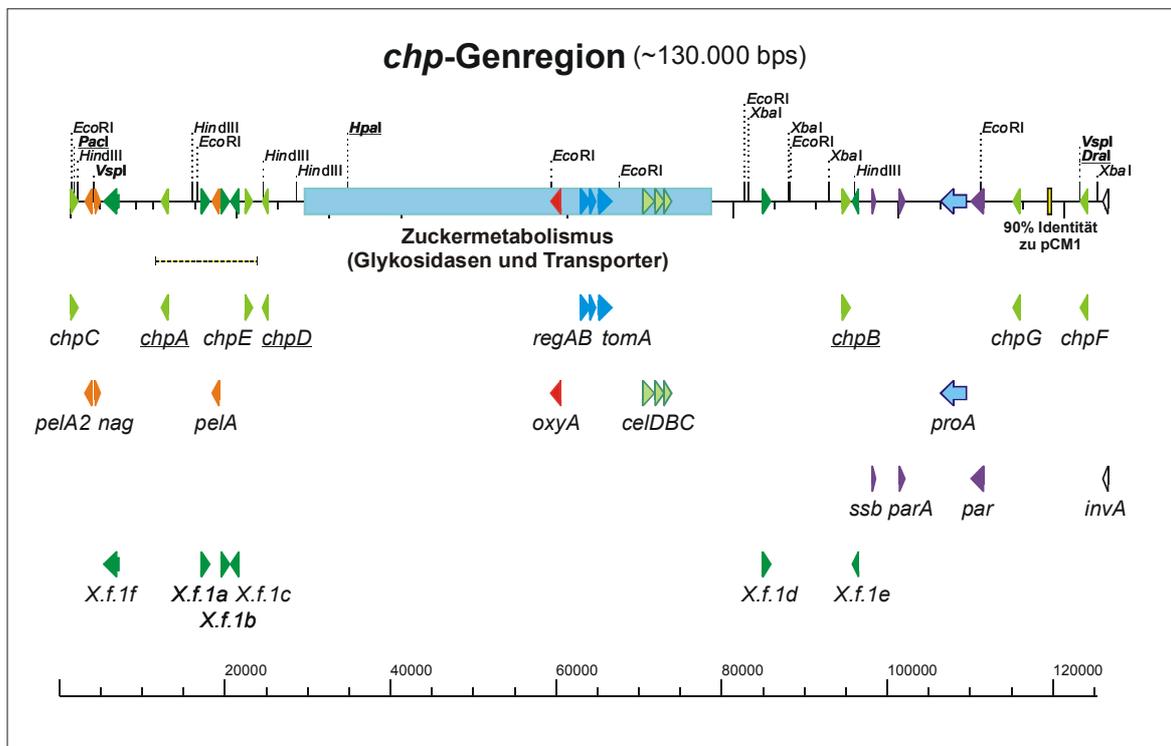


Abb. V.4: Schematische Darstellung der so genannten "chp-Genregion". Sie ist ausgehend von den o. g. in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen, von I. GRÄFEN ermittelten Sequenzen (pers. Mitteilung) und den im Genomprojekt vorhandenen Sequenzinformationen aus einzelnen Contigs zusammengesetzt (K.-H. GARTEMANN, unveröffentlicht). Es handelt sich um vorläufige Daten. Die relative Lage der drei Bereiche "Zuckermetabolismus" und den links und rechts angrenzenden Regionen zueinander ist noch unklar.

Gene sind als Pfeile bzw. Dreiecke dargestellt. In der oberen Zeile ein Überblick über Gene in der Region, die verschiedenen Gene in den Zeilen darunter, zur besseren Erkennbarkeit entzerrt in Gruppen ähnlicher Funktion (farblich ähnlich), dargestellt. *chpA-G*: chromosomale Homologien zu *pat-1*, (Pseudogene unterstrichen); *pela*: Pektatlyase-Gen; *nag*: N-Acetyl-Glukosaminidase-Gen; *X.F.1a-f*: Genprodukte homolog zu Proteinen unbekannter Funktion aus *Xylella fastidiosa/Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; *toma*: Tomatinase-Gen; *regAB*: Zweikomponenten-Regulator-Gene evtl. für *toma*; *celDBC*: Zellobiose-Transporter-Gene; *oxyA*: Cytochrom P₄₅₀-Oxygenase-Gen; *proA*: Gen für extrazelluläre Serinprotease; *ssb*: Einzelstrang-Bindeprotein-Gen; *par/parA*: Partitioning-Gene; *invA*: Invertase-Gen. Alle Genfunktionen hypothetisch auf BLAST-Datenbankabfragen (ALTSCHUL *et al.*, 1997) beruhend. Singuläre Restriktionsschnittstellen fett und unterstrichen hervorgehoben. Die schwarz-gelb gestrichelte Linie markiert die DNA-Region, in die das Transposon in den Mutanten TM382β 324-50 und TM382β 370-45 inseriert ist.

Weiterhin liegt in dieser Region ein Gen (*toma*), welches für eine putative Tomatinase kodiert (K.-H. GARTEMANN, pers. Mitteilung). Dies ist ein Enzym, das das pilz- und wahrscheinlich auch bakterienabtötende Alkaloid Tomatin, welches von der Tomate konstitutiv

produziert wird, detoxifiziert. Eine der ersten Transposon-Mutanten wies eine Transposon-insertion in dem *tomA*-Gen auf, wie sich später herausstellte. Im Rahmen der Charakterisierung von Isolaten von Tomatenplantagen in Israel hat K.-H. GARTEMANN über PFGE und Southern-Hybridisierung Stämme identifiziert, die einen Teil der *chp*-Gene verloren haben, also ebenfalls Deletionen in diesem Bereich besitzen (K.-H. GARTEMANN, unveröffentlichte Daten). Diese Stämme können die Wirtspflanze z. T. nicht mehr effektiv kolonisieren und können trotz Vorhandensein des *celA*-Gens und tlw. des *pat-1*-Gens keine Welke mehr hervorrufen (I. GRÄFEN, unveröffentlichte Daten), sind in ihrer Virulenz also deutlich reduziert.

Alle bisher gesammelten Informationen deuten darauf hin, dass diese DNA-Region (bzw. Teile von ihr) möglicherweise eine wichtige Rolle für die Fähigkeit von *Cmm*, die Pflanze zu besiedeln - die Voraussetzung für die Ausprägung der Krankheitssymptome -, spielt. Manche Eigenschaften der Region lassen den Vergleich mit Pathogenitätsinseln bei Gram-negativen Bakterien sinnvoll erscheinen. Welche Rolle dieses Cluster von Serin-Proteasen dabei spielt, ist noch unklar, aber es gibt nun erstmals begründete Hinweise, in welcher Region und an welchen Genen des Chromosoms zukünftig experimentell geforscht werden muss, um die Mechanismen der Virulenz von *Cmm* besser zu verstehen.

3 Fazit/Ausblick

Die Elektroporationseffizienz konnte für *Cmm* um etwa drei Größenordnungen auf $5 \cdot 10^6$ Transformanten/ μg DNA verbessert werden und somit die Voraussetzung für Techniken geschaffen werden, die auf eine hohe Elektroporationseffizienz angewiesen sind, an erster Stelle die Transposon-Mutagenese und die gerichtete Mutagenese durch Kassetteninsertion. Die Transposon-Mutagenese konnte erfolgreich für *Cmm* etabliert und ihre prinzipielle Funktionalität auch für andere *Clavibacter michiganensis*-Subspezies gezeigt werden. Das Transposon Tn1409C β ist ein wertvolles genetisches Hilfsmittel zur Identifizierung von Genen, über deren Funktion noch nichts bekannt ist und die somit in den Datenbanken anhand von Ähnlichkeiten nicht gefunden werden können. Über 1500 Mutanten konnten bzgl. ihrer Virulenz *in planta* getestet und unter ihnen drei identifiziert und charakterisiert werden, die eine Reduktion in der Virulenz bzw. Kolonisationsfähigkeit aufweisen. Erstmals konnten zwei chromosomale Gene identifiziert werden, die wahrscheinlich eine Rolle in der Ausbildung der Krankheitssymptome bei der Wirtspflanze

Tomate spielen. Diese Gene, die Ähnlichkeiten zu Genen unbekannter Funktion in *Xylella fastidiosa*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* und *Thermobifida fusca* und schwache Ähnlichkeiten zu Serin-Proteasen zeigen, wären ohne die Transposon-Mutagenese wahrscheinlich nicht gefunden worden, da ihre Funktion noch vollkommen unklar ist. Die Komplementation dieser beiden Mutanten soll in naher Zukunft durchgeführt werden, um den letzten Nachweis zu erbringen, dass nur die Transposon-Insertion zu diesem Phänotyp führt. Die durch die Transposon-Mutanten gewonnenen Erkenntnisse führten zusammen mit dem Genomprojekt und Daten von Freilandisolaten von *Cmm* aus Israel zu einer DNA-Region (der sog. "chp-Genregion"), auf der Homologe der *chp*-Gene und der zu *Xylella* ähnlichen Gene lokalisiert sind, sowie zusätzlich Gene, die für pflanzenmaterialdegradierende Enzyme (Pektatlyasen), für eine potentielle Tomatinase und eine Reihe von Genen des Zuckerstoffwechsels und der Zuckeraufnahme kodieren. Die Aufklärung der Funktion der Gene in dieser DNA-Region wird in Zukunft eine wichtige Aufgabe sein.

Weitere Plasmide, die in *Cmm* stabil replizieren, und Resistenzgene, die in *Cmm* funktional sind, werden für die funktionelle Charakterisierung von Genen in Zukunft ebenfalls benötigt werden. Dem häufigen Auftreten der illegitimen Rekombinationen sollte ferner auf den Grund gegangen werden, um evtl. Methoden zu entwickeln, die die Kassetten-Mutagenese effizienter machen. Eine Alternative zum bisherigen Pflanzentest wäre ebenfalls wünschenswert. Auch die in dieser Arbeit neu eingeführte Methode zur Darstellung und Charakterisierung der Ausprägung der Virulenz von *Cmm* ändert nichts an der Tatsache, dass gerade zur Detektion kleiner Unterschiede der Virulenz von *Cmm*, und hier wird in Zukunft der Schwerpunkt liegen müssen, notwendige Massentests einen enormen zeitlichen, materiellen und personellen Aufwand darstellen.

Trotz alledem sind mit dieser Arbeit neue Techniken etabliert worden, die es erstmals ermöglichen, effektiv chromosomale Gene sowohl in zufälliger als auch in gezielter Weise auszuschalten, und somit sind in Kombination mit den Daten des *Cmm*-Genomprojekts die Grundlagen einer funktionellen Genomanalyse geschaffen worden. Zudem sind erste wichtige Hinweise auf chromosomale Gene erbracht worden, die in der Interaktion zwischen *Cmm* und der Wirtspflanze eine wichtige Rolle spielen könnten.

VI Literaturverzeichnis

Abt, B. (2003): Etablierung eines Systems zur Komplementation von Transposonmutanten von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.

Alfano, J.R. and Collmer, A. (1996): Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell* **8**:1683-1698.

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. *Nucl. Acid Res.* **25**:3389-3402.

Anderson, D.G. and McKay, L.L. (1983): Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *App. Env. Microbiol.* **46**:549-552.

Andersen, P.C., Brodbeck, B.V., and Mizell, R.F. (1995): Water stress- and nutrient solution-mediated changes in water relations and amino acids, organic acids, and sugars in xylem fluid of *Prunus salicina* and *Lagerstroemia indica*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **120**:36-42.

Ankri, S. Reyes, O., and Leblon, G. (1996): Electrotransformation of highly DNA-restrictive corynebacteria with synthetic DNA. *Plasmid* **35**:62-66.

Austin, S. and Nordström, K. (1990): Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids. *Cell* **60**:351-354.

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, New York, Berlin.

Barras, F., Thurn, K.K., and Chatterjee, A.K. (1987): Resolution of four pectate lyase structural genes of *Erwinia chrysanthemi* (EC16) and characterization of the enzymes produced in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **209**:319-325.

Barras, F., van Gijsegem, F., and Chatterjee, A.K. (1994): Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**:201-234.

Bates, G.R. (1963): Botany, plant pathology and seed services. Rept. Ministry Agr. Rhodesia Nyasaland 1962, pp. 46-55.

Beaulieu, C., Boccara, M., and van Gijsegem, F. (1993): Pathogenic behavior of pectinase-defective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**:197-202.

Becker, A. and Niehaus, K. (1998): The role of microbial surface polysaccharides in the *Rhizobium*-Legume interaction. *Subcell. Biochem.* **29**:73 -.

- Bergey, D.H., Harrison, F.C., Breed, R.S., Hammer, B.W., and Huntoon, F.M. (1923): Bergey's manual of determinative bacteriology. 1st ed. William and Wilkins Co., Baltimore. U.S.A.
- Bermpohl, A. (1993): Untersuchung der pathogenen Wechselwirkung zwischen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und der Tomate: Bedeutung der bakteriellen Exopolysaccharid- und Auxin-Biosynthese. Dissertation, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Bermpohl, 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.
- Bickle, T. (1993) In: Nucleases. Linn, S.M., Lloyd, R.S. and Roberts, R.J. (Eds.). CSH, New York, U.S.A., pp. 89-109.
- Biles, C.L. and Abeles, F.B. (1991): Xylem sap proteins. Plant Physiol. **96**:597-601.
- Bonamy, C., Guyonvarch, A., Reyes, O., David, F., and Leblon, G. (1989): Interspecies electro-transformation in Corynebacteria. FEMS Microbiol. Lett. **66**:263-270.
- Bonnassie, S., Burini, J.-F., Oreglia, J., Trautwetter, A., Patte, J.-C., and Sicard, A. M. (1990): Transfer of plasmid DNA to *Brevibacterium lactofermentum* by electrotransformation. J. Gen. Microbiol. **136**:2107-2112.
- Bradshaw-Rouse, J.J., Whatley, M.H., Coplin, D.L., Woods, A., Sequeira, L., and Kelman, A. (1981): Agglutination of *Erwinia stuartii* strain with a corn agglutinin: correlation with extracellular polysaccharide production and pathogenicity. Appl. Environ. Microbiol. **42**:344-350.
- Bryan, M. (1930): Studies on bacterial canker of tomato. J. Agric. Res. **41**:825-851.
- Carlson, R.R. and Vidaver, A.K. (1982): Taxonomy of *Corynebacterium* plant pathogens, including a new pathogen of wheat, based on polyacrylamide gel electrophoresis of cellular proteins. Int. J. Syst. Bacteriol. **32**:315-326.
- Chang, D.C. and Reese, T.S. (1990): Changes in membrane-structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron-microscopy. Biophys. J. **58**:1-12.
- Chang, R.J., Ries, S.M., and Pataky, J.K. (1991): Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practises used to produce tomato plants. Phytopathology **81**:1276-1281.
- Chevalier, J., Pommier, M., Cremieux, A., and Michel, G. (1988): Influence of Tween 80 on the mycolic acid composition of three cutaneous corynebacteria. J. Gen. Microbiol. **134**:2457-2461.
- Cirillo, J.F., Barletta, R.G., Bloom, B.R., Jacobs, W.R. Jr. (1991): A novel transposon trap for mycobacteria: isolation and characterization of IS1096. Nucl. Acids Res. **19**:2792.

- Collins, M.D. and Jones, D. (1983): Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens* comb. nov. J. Gen. Microbiol. **129**:3545-3548.
- Condon, C., Squires, C., and Squires, C.L. (1995): Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. **54**:623-645.
- Cook, D. and Sequeira, L. (1991): Genetic and biochemical characterization of a *Pseudomonas solanacearum* gene cluster for extra cellular polysaccharide production and for virulence. J. Bacteriol. **173**:1654-1662.
- Coplin, D.L. and Cook, D. (1990): Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. Mol. Plant-Microbe Interact. **3**:271-279
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S. (1996): FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). Gene **173**:33-38.
- Cozzone, A.J. (1980): Stringent control and protein-synthesis in bacteria. Biochimie **62**:647-664.
- Cozzone, A.J. (1981): How do bacteria synthesize proteins during amino-acid starvation? Trends Biochem. Sci. **6**:108-110.
- Dambrine, E., Martin, F., Carisey, N., Grainer, A., Hallgren, J.-E., and Bishop, K. (1995): Xylem sap composition: a tool for investigating mineral uptake and cycling in adult spruce. Plant Soil **168/169**:233-241.
- 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. Bact. **34**:107-117.
- Davis, M.J. (1986): Taxonomy of plant pathogenetic corynebacteria. Annu. Rev. Phytopathol. **24**:115-140.
- de Bruyne, E., Swings, J., and Kersters, K. (1992): Enzymatic relatedness amongst phytopathogenic coryneform bacteria and its potential use for their identification. System. Appl. Microbiol. **15**:393-401.
- de Lorenzo, V., Eltis, L., Kessler, B., and Timmis, K.N. (1993): Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacI^Δ/Ptrp-lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. Gene **123**:17-24.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M.J., Espinosa, M., and Díaz-Orejas, R. (1998): Replication and control of circular bacterial plasmids. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**:434-464.
- Denny, T.P. and Baek, S.-R. (1991): Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor of *Pseudomonas solanacearum*. Mol. Plant-Microbe Interact. **4**:198-206.

- Denny, T.P. (1995): Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**:173-197.
- Donlan, R.M. (2002): Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**:881-890.
- Donlan, R.M. and Costerton, J.W. (2002): Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:167-193.
- Dreier, J. (1995): Molekulargenetische Analyse der *pat-1* Region des Plasmides pCM2 von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Entwicklung diagnostischer Nachweisverfahren. Dissertation, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Dreier, J., Bermpohl, A., and Eichenlaub, R. (1995): Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* **85**:462-468.
- Dreier, J., Meletzus, D., and Eichenlaub, R. (1997): Characterization of the plasmid encoded virulence region *pat-1* of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**:195-206.
- Dunican, L.K. and Shivnan, E. (1989): High frequency transformation of whole cells of amino acid producing coryneform bacteria using high voltage electroporation. *Bio/Technol.* **7**:1067-1070.
- Eckhardt, T. (1978): A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**: 584-588.
- Else, M.A., Davies, W.J., Whitford, P.N., Hall, K.C., and Jackson, M.B. (1994): Concentrations of abscisic acid and other solutes in xylem sap from root systems of tomato and castor-oil plants are distorted by wounding and variable sap flow rates. *J. Exp. Bot.* **45**:317-232.
- Engels, C. and Marschner, H. (1993): Influence of the form of nitrogen supply on root uptake and translocation of cations in the xylem exudate of maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Botany* **44**:1695-1701.
- 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 21 Feb 1995 to the European Community Plant Health Directive (77/93/EEC). *Official Journal of the European Communities* **L41**:56-60.
- Férézou, J.P. (1992): C₅₀ bicyclic carotenoids: Sarcinaxanthin synthesis. In: *Methods in Enzymology*. Packer, L. (Ed.), Vol. 213, Academic Press Inc., pp 75-86.
- Fett, W.F. and Dunn, M.F. (1989): Exopolysaccharides produced by phytopathogenic *Pseudomonas syringae* pathovars in infected leaves of susceptible hosts. *Plant Physiol.* **89**:5-9.

- Frayse, N., Couderc, F., and Poisot, V. (2003): Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* **270**:1365-1380.
- Frey, J. and Bagdasarian, M. (1989): The molecular biology of IncQ Plasmids. In: Thomas, C. and Franklin, F.C.H. (Eds.), *Promiscuous Plasmids of Gram Negative Bacteria*. Academic Press, London, U.K., pp. 79-94.
- Fulkerson, J.G. (1960): Pathogenicity and stability of strains of *Corynebacterium insidiosum*. *Phytopathology* **50**:377-380.
- Galas, D.J. and Chandler, M. (1989): Bacterial insertion sequences. In: *Mobile DNA*. Berg, D.E. and Howe, M.M. (Eds.). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 109-162.
- Gartemann, K.-H. (1999): Genetische Charakterisierung der 4-Chlorbenzoat-Dehalogenasen verschiedener *Arthrobacter* Spezies und Entwicklung eines Transposonmutagenesesystems. Dissertation, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Gartemann, K.-H. and Eichenlaub, R. (2001): Isolation and characterization of IS1409, an insertion element of 4-chlorobenzoate-degrading *Arthrobacter* sp. TM1 and development of a system for transposon mutagenesis. *J. Bacteriol.* **183**:3729-3736.
- Gerdes, K., Møller-Jensen, J., and Jensen, R.B. (2000): Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol. Microbiol.* **37**:455-466.
- Gish, W. (1996-2002): *C. michiganensis* BLAST-Server, <http://blast.wustl.edu>.
- Gormley, E.P. and Davies, J. (1991): Transfer of plasmid RSF1010 by conjugation from *Escherichia coli* to *Streptomyces lividans* and *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **173**:6705-6708.
- Gräfen, I. (2001): Herstellung einer Cosmid-Genbank von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Analyse der *chp-1*-Genregion. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R., and Hanahan, D. (1990): Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 4645-4649.
- Hammers, W., Schleifer, K.N., and Kandler, O. (1973): Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan. *J. Bacteriol.* **116**:1029-1059.
- Hara, M., Yuan, H., Yang, Q., Hoshino, T., Yokoyama, A., and Miyake, J. (1999): Stabilization of liposomal membranes by thermozeaxanthins: carotenoid-glucoside esters. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**:147-154.
- Haring, V. and Scherzinger, E. (1989): The replication proteins of IncQ plasmid RSF1010. In: Thomas, C., Franklin, F.C.H. (Eds.), *Promiscuous Plasmids of Gram Negative Bacteria*. Academic Press, London, U.K., pp. 95-124.

- Haynes, J.A. and Britz, M.L. (1989): Electrotransformation of *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*: growth in tween 80 increases transformation frequencies. FEMS Microbiol. Lett. **61**:329-334.
- Haynes, J.A. and Britz, M.L. (1990): The effect of growth conditions of *Corynebacterium glutamicum* on the transformation frequency obtained by electroporation. J. Gen. Microbiol. **136**:255-263.
- Heery, D.M., Powell, R., Gannon, F., and Dunican, L.K. (1989): Curing of a plasmid from *E.coli* using high-voltage electroporation. Nucl. Acids. Res. **23**:10131.
- Heitman, J. and Model, P. (1987): Site-specific methylases induce the SOS DNA-repair response in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **169**:3243-3250.
- Henssen, A. (1957): Beiträge zur Morphologie und Systematik der thermophilen Actinomyceten. Arch. Mikrobiol. **26**:373-414.
- Hermans, J., Martin, C., Huijberts, G.N.M., Goosen, T., and de Bont, J.A.M. (1991): Transformation of *Mycobacterium aurum* and *Mycobacterium smegmatis* with the broad-host-range Gram-negative cosmid vector pJRD215. Mol. Microbiol. **5**:1561-1566.
- Hill, C.W. (1999): Large genomic sequence repetitions in bacteria: lessons from rRNA operons and *Rhs* elements. Res. Microbiol. **150**: 665-674.
- Hinds, J., Mahenthalingam, E., Kempell, K.E., Duncan, K., Stokes, R.W., Parish, T., and Stoker, N.G. (1999): Enhanced gene replacement in mycobacteria. Microbiology **145**:519-527.
- Ho, S.Y. and Mittal, G.S. (1996): Electroporation of cell membranes: A review. Crit. Rev. Biotechnol. **16**:349-362.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Charter, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., 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, U.K.
- Horton, R.M. (1995): PCR-mediated recombination and mutagenesis. Mol. Biotechnol. **3**:93-99.
- Hugouvieux-Cotte-Patte, N., Condemine, G., Nasser, W., and Reverchon, S. (1996): Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. Annu. Rev. Microbiol. **50**:213-257.
- Jacobs, J.L. and Sundin, G.W. (2001): Effect of solar UV-B radiation on phyllosphere bacterial community. Appl. Environ. Microbiol. **67**:5488-5496.
- 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-Microbe Interact.* **13**:703-14.
- Jensen, H.J. (1934): Studies on saprophytic mycobacteria and corynebacteria. *Proc. Linn. Soc. N.S.W.* **59**: 19-61.
- Jerpseth, B. and Kretz, P.L. (1993): SCS110: Dam⁻, Dcm⁻, EndA⁻ Epicurian coli competent cells. *Strategies* **6**:22.
- Kalpana, G.V., Bloom, B.R., and Jacobs, W.R. (1991): Insertional mutagenesis and illegitimate recombination in mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**:5433-5437.
- Kaup, O. (2002): Erzeugung von Insertionsmutanten in den Genen *tomA* und *regB* von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Kelleher, J. and Raleigh, E.A. (1991): A novel activity in *Escherichia coli* K-12 that directs restriction of DNA modified at CG dinucleotides. *J. Bacteriol.* **173**:5220-5223.
- Kiraly, Z., El-Zahaby, H.M., and Klement, Z. (1997): Role of extracellular polysaccharides (EPS) slime of plant pathogenic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. *J. Phytopathol.* **145**:59-68.
- Kirchner, O. (1999): Hocheffizienter Elektrotransfer von Plasmiden nach *Corynebacterium glutamicum* und Entwicklung von Vektorsystemen zur funktionellen Genomanalyse. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld.
- Kirchner, O., Gartemann, K.-H., Zellermann, E.-M., Eichenlaub, R., and Burger, A. (2001): A highly efficient transposon mutagenesis system for the tomato pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**:1312-1318.
- Kirchner, O. and Tauch, A. (2003): Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.*, in press.
- Krämer, R. and Leistner, H.-U. (1986): Physiological and cytological aspects of the action of the toxin from *Corynebacterium michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith Jensen) on the host plant. *Zentralbl. Mikrobiol.* **141**:437-454.
- Krasil'nikov, N.A. (1945): (The classification of the ray-fungi, Actinomycetales) *Microbiology* **14**:164-171 [Russian, English summary].
- Krubasik, P. (2000): Gene der Carotinoid Biosynthese aus den coryneformen Bakterien *Brevibacterium linens* und *Brevibacterium flavum*. Dissertation, angefertigt im Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

- Krubasik, P. and Sandmann, G. (2000): Molecular evolution of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups. *Biochem. Soc. Transact.* **28**:806-810.
- Krubasik, P., Kobayashi, M., and Sandmann, G. (2001a): Expression and functional analysis of a gene cluster involved in the synthesis of decaprenoxanthin reveals the mechanisms for C₅₀ carotenoid formation. *Eur. J. Biochem.* **268**:3702-3708.
- Krubasik, P., Takaichi, S., Maoka, T., Kobayashi, M., Masamoto, K., and Sandmann, G. (2001b): Detailed biosynthetic pathway to decaprenoxanthin diglucoside in *Corynebacterium glutamicum* and identification of novel intermediates. *Arch. Microbiol.* **176**:217-223.
- Kurusu, Y., Kainuma, M., Inui, M., Satoh, Y., and Yukawa, H. (1990): Electroporation-transformation system for coryneform bacteria by auxotrophic complementation. *Agric. Biol. Chem.* **54**:443-447.
- Laws, A., Gu, Y., and Marshall, V. (2001): Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnol. Adv.* **19**:597-625.
- 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.
- Laine, M.J., Haapalainen, M., Wahlroos, T., Kankare, K., Nissinen, R., Kassuwi, S., and Metzler, M.C. (2000): The cellulase encoded by the native plasmid of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* plays a role in virulence and contains an expansin-like domain. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **57**: 221-233.
- Laws, A., Gu, Y., and Marshall, V. (2001): Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnol. Adv.* **19**:597-625.
- Leach, J.G., Lilly, V.G., Wilson, H.A., and Purvis, M.R. Jr. (1957): Bacterial polysaccharides: the nature and function of the exudates produced by *Xanthomonas phaseoli*. *Phytopathology* **47**:113-120.
- Lee, I.-M., Bartoszyk, I.M., Gundersen-Rindal, D.E., and Davie, R.E. (1997): Phylogeny and classification of bacteria in the genera *Clavibacter* and *Rathayibacter* on the basis of 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**:307-346.
- Leigh, J.A. and Coplin, D.L. (1992): Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**:307-346.
- Liaaen-Jensen, S. and Weeks, O.B. (1966): Norwegian J. Chem. Mining, Metall. **N26**:130.
- Liao, C.-H., Hung, H.Y., and Chatterjee, A.K. (1988): An extracellular pectate lyase is the pathogenicity factor of the soft-rotting bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**:199-206.
- Liebl, A., Bayerl, A., Schein, B., Stillner, U., and Schleifer, K. H. (1989): High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**:299-304.

- Lichtenthaler, H.K. (1998): The plants' 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway for biosynthesis of isoprenoids. *Lipids* **100**:128-138.
- Lu, J., Nogi, Y., and Takami, H. (2001): *Oceanobacillus iheyensis* gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1050 m on the Iheya Ridge. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**:291-297.
- Ludewig, J.F. (2002): Konstruktion eines Promotorprobevektors zur Analyse von Promotoren aus *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Mahillon, J. and Chandler, M. (1998): Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:725-774.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982): *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A..
- Manzer, F. and Genereux, H. (1981): Ring rot. In: Hooker, W. J. (Ed.), *Compendium of potato diseases*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn., U.S.A., pp. 31-33.
- Marshall, J.H. and Wilmoth, G.J. (1981): Pigments of *Staphylococcus aureus*, a series of triterpenoid carotenoids. *J. Bacteriol.* **147**:900-913.
- Masamoto, K., Misawa, N., Kaneko, T., Kikuno, R., and Toh, H. (1998): β -Carotene hydroxylase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol.* **39**:560-564.
- McAdam, R.A., Weisbrod, T.R., Martin, J., Scuderi, J.D., Brown, A.M., Cirillo, J.D., Bloom, B.R., and Jacobs, W.R. Jr. (1995): *In vivo* growth characteristics of leucine and methionine auxotrophic mutants of *Mycobacterium bovis* BCG generated by transposon mutagenesis. *Infect. Imm.* **63**:1004-1012.
- McCulloch, L. (1925): *Aplanobacter insidiosum* n. sp., the cause of an alfalfa disease. *Phytopathology* **15**:496-497.
- McFadden, J. (1996): Recombination in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **21**:205-211.
- Meletzus, D. and Eichenlaub, R. (1991): Transformation of the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* by electroporation and development of a cloning vector. *J. Bacteriol.* **173**:184-90.
- Meletzus, D., Bermpohl, A., Dreier, J., Eichenlaub, R. (1993): Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *J. Bacteriol.* **175**:2131-2136.
- Meletzus, D., Jahr, H., and Eichenlaub, R. (2000): *Clavibacter michiganensis* - Transformation of a phytopathogenic Gram-positive bacterium. In Eynard, N. and Tessie, J. (Eds.) *Electrotransformation of bacteria* (Springer Lab Manuals), Springer Berlin Heidelberg New York Tokyo, pp. 219-226.

- Melkonyan, H. (1993): Klonierung und Charakterisierung des chromosomalen *pat1*-Locus. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Metzger, M., Bellemann, P., Bugert, P., and Geider, K. (1994): Genetics of galactose metabolism of *Erwinia amylovora* and its influence on polysaccharide synthesis and virulence of the fire blight pathogen. *J. Bacteriol.* **176**:450-459.
- 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.
- Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., and Hirashima, K. (1990): Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:6704-6712.
- Mogen, B.D., Oleson, A.E., Sparks, R.B., Gudmestad, N.C., and Secor, G.A. (1988): Distribution and partial characterization of pCS1, a highly conserved plasmid present in *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum*. *Phytopathology* **78**:1381-1386.
- Morales, V.M., Bäckman, A., and Bagdasarian, M. (1991): A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. *Gene* **97**:39-47.
- Motosugi, H., Nishijima, T., Hiehata, N., Koshioka, M., and Sugiura, A. (1996): Endogenous gibberellins in the xylem exudates from apple trees. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**:1500-1502.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **51**: 263.
- 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.
- Nattras, R.M. and Ciccarone, A. (1946): Bacterial canker of tomatoes in Kenya. *East African Agr. J.* **12**:26-29.
- Nešvera, J., Hochmannová, J., Pátek, M., Šroglová, A., and Bečvářová, V. (1994): Transfer of the broad-host-range IncQ plasmid RSF1010 and other plasmid vectors to the Gram-positive methylotroph *Brevibacterium methylicum* by electrotransformation. *App. Microbiol. Biotechnol.* **40**:864-866.
- Nešvera, J., Pátek, M., Hochmannová, J., Abrhánová, Z., Bečvářová, V., Jelínková, M., and Vohradský, J. (1997): Plasmid pGA1 from *Corynebacterium glutamicum* codes for a gene product that positively influences plasmid copy number. *J. Bacteriol.* **179**:1525-1532.
- Niehaus, K., Kapp, D., and Pühler, A. (1993): Plant defense and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. *Planta* **190**:415-425.

- Nordström, K. and Austin, S. (1989): Mechanisms that contribute to the stable segregation of plasmids. *Annu. Rev. Genet.* **23**:37-69.
- Norman, E., Dellagostin, O.A., McFadden, J., and Dale, J.W. (1995): Gene replacement by homologous recombination in *Mycobacterium bovis* BCG. *Mol. Microbiol.* **16**:755-760.
- Ogden, R.C. and Adams, D.A. (1987): Electrophoresis in agarose and acrylamid gels. *Meth. Enzymol.*, **152**:61-87.
- Oh, S.-H. and Chater, K.F. (1997): Denaturation of circular or linear DNA facilitates targeted integrative transformation of *Streptomyces coelicolor* A3(2): possible relevance to other organisms. *J. Bacteriol.* **179**:122-127.
- Parish, T., Gordhan, B.G., McAdam, R.A., Duncan, K., Mizrahi, V., and Stoker, N.G. (1999): Production of mutants in amino acid biosynthesis genes of *Mycobacterium tuberculosis* by homologous recombination. *Microbiology* **145**:3497-3503.
- Patino-Mendez, G. (1964): Studies on pathogenicity of *Corynebacterium michiganense* and its transmission in tomato seed. Ph.D. thesis, Univ. Calif., U.S.A., pp 1-53.
- Pelicic, V., Jackson, M., Reyrat, J.M., Jacobs, W.R., Gicquel, B., and Guilhot, C. (1997): Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:10955-10960.
- 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.
- Priefer, U.B., Simon, R., and Pühler, A. (1985): Extension of the host range of *Escherichia coli* vectors by incorporation of RSF1010 replication and mobilization functions. *J. Bacteriol.* **163**:324-330.
- Purcell, A.H. and Hopkins, D.L. (1996): Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**:131-151.
- Putra, S.R., Disch, A., Bravo, J., and Rohmer, M. (1998): Distribution of mevalonate and glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate routes for isoprenoid biosynthesis in some gramnegative bacteria and mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**:169-175.
- Qureshi, N. and Porter, J.W. (1981): Conversion of acetyl-coenzyme A to isopentenyl pyrophosphate. In: Biosynthesis of isoprenoid compounds. Porter and Spurgeon (Eds.) Vol. 1, pp. 47-93.
- Rai, P.V. and Strobel, G.A. (1968): Phytotoxic glycopeptides produced by *Corynebacterium michiganense*. II. Biological properties. *Phytopathology* **59**:53-57.
- Rajagopal, L., Sundari, C.S., Balasubramanian, D., and Sonti, R.V. (1997): The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. *FEBS Lett.* **415**:125-128.

- Raleigh, E.A. and Wilson, G. (1986): *Escherichia coli* K-12 restricts DNA containing 5-methylcytosine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **83**:9070-9074.
- Raleigh, E.A. (1992): Organization and function of the *mcrBC* genes of *Escherichia coli* K-12. Mol. Microbiol. **6**:1079-1086.
- Reinhold-Hurek, B. and Hurek, T. (1998): Life in grasses: diazotrophic endophytes. Trends Microbiol. **6**:139-144.
- Richardson, P.T. and Baker, D.A. (1982): The chemical composition of cucurbit vascular exudates. J. Exp. Botany **33**:1239-1247.
- Rohmer, M., Seemann, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S., and Sahm, H. (1996): Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. J. Am. Chem. Soc. **118**:2564-2566.
- Romeiro, R., Karr, A., and Goodman, R. (1981): Isolation of a factor from apple that agglutinates *Erwinia amylovora*. Plant Physiol. **68**:772-777.
- Rothwell, A. (1968): Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense* (Smith) Jensen. Rhodesia Agric. J. **1871**:75-78.
- Saile, E., McGarvey, J.A., Schell, M.A., and Denny, T.P. (1997): Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. Phytopathology **87**:1264-1271.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989): Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbour, U.S.A.
- Sandmann, G., Kuhn, S., and Böger, P. (1998): Evaluation of structurally different carotenoids in *Escherichia coli* transformants as protectants against UV-B radiation. Appl. Environ. Microbiol. **64**:1972-1974.
- Santos, M.S., Cruz, L., Norskov, P., and Rasmussen, O.F. (1997): A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. Seed Sci. Technol. **25**:581-584.
- 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.
- Satoh, Y., Hatakeyama, K., Kohama, K., Kobayashi, M., Kurusu, Y., and Yukawa, H. (1990): Electrotransformation of intact cells of *Brevibacterium flavum* MJ-233. J. Industr. Microbiol. **5**:159-166.
- Schäfer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A.-H., and Pühler, A. (1990): High-frequency conjugal plasmid transfer from *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. J. Bacteriol. **172**:1663-1666.

- Schäfer, A., Kalinowski, J., and Pühler, A. (1994): Increased fertility of *Corynebacterium glutamicum* recipients in intergeneric matings with *Escherichia coli* after stress exposure. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:756-759.
- Schell, M.A. (2000): Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu. Rev. Phytopathol.* **38**:263-292.
- Schneider, A., Kreuzwieser, J., Schupp, R., Sauter, J.J., and Rennenberg, H. (1994): Thiol and amino acid composition of the xylem sap of poplar trees (*Populus canadensis robusta*). *Can. J. Bot.* **72**:347-351.
- Scholz, P., Haring, V., Scherzinger, E., Lurz, R., Bagdasarian, M., Schuster, H., and Bagdasarian, M. (1985): Replication determinants of the broad host-range plasmid RSF1010. In: Helsinki, D.R., Cohen, S.N., Clewell, D.B., Jackson, D.A. and Hollaender, A. (Eds.), *Plasmids in Bacteria*. Plenum, New York, U.S.A., pp. 243-259.
- Scholz, P., Haring, V., Wittmann-Liebold, B., Ashman, K., Bagdasarian, M. and Scherzinger, E. (1989): Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range Plasmid RSF1010. *Gene* **75**:271-288.
- Schuster, M.L. (1975): Leaf freckles and wilt of corn incited by *Corynebacterium nebraskense*. Schuster, Hoff, Mandel, Lazar (1972). *Research Bulletin 270*, The Agricultural Experiment Station, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska.
- Serwold-Davis, T.M., Groman, N., and Rabin, M. (1987): Transformation of *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli* with the *C. diphtheriae* plasmid pNG2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**:4464-4968.
- Serwold-Davis, T.M., Groman, N., and Kao, C.C. (1990): Localization of an origin of replication in *Corynebacterium diphtheriae* broad host range plasmid pNG2 that also functions in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **66**:119-124.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y. (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Compar. Physl.* **59**:223-239.
- Shirakawa, T., Sasaki, T., and Ozaki, K. (1991): Ecology and control of tomato bacterial canker and detection methods of this pathogen. *Jpn. Agric. Res. Quart.* **25**:27-32.
- Smith, E.F. (1910): A new tomato disease of economic importance. *Science (N.S.)* **31**:794-796.
- Smith, E.F. (1914): The Grand Rapids tomato disease. In: *Smith's bacteria in relation to plant diseases*. Carnegie Institute. Washington. U.S.A. **3**:161-165.
- Smith, P.H., Mair, N.S., Sharpe, M.E., and Holt, J.G. (Eds.) (1986): *Bergey's manual of systematic bacteriology 2*. Williams & Williams, U.S.A..

- Sonnen, H., Thierbach, G., Kautz, S., Kalinowski, J., Schneider, J., Pühler, A., and Kutzner, H.J. (1991): Characterization of pGA1, a new plasmid from *Corynebacterium glutamicum* LP-6. *Gene* **107**:69-74.
- Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-515.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., and Ward-Rainey N.L. (1997): Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:479-491.
- Stapp, C., Appel, O., and Richter, H. (1956): Bakterielle Krankheiten - Bakteriosen einschließlich Streptomykosen. In: Sorauer, P., Appel, O., Blunck, H., and Richter, H., *Handbuch der Pflanzenkrankheiten in sechs Bänden, Band II: Die Virus- und bakteriellen Krankheiten*, 1956. Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg.
- Stevens, N.E. (1913): *The fungi which cause plant disease*. The Macmillan C., New York, U.S.A.
- Strider, D.L. (1969): Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. A literature review and bibliography. North Carolina Agricultural Experiment Station, Tech. Bull. no. 193.
- Sun, Z., Gantt, E., and Cunningham, F.X. (1996): Cloning and functional analysis of the β -Carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **271**:24349-24352.
- Sun, J., Kelemen, G.H., Fernández-Abalos, J.M., and Bibb, M.J. (1999): Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **145**:2221-2227.
- Sundin, G.W. and Jacobs, J.L. (1999): Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Microb. Ecol.* **38**:27-38.
- Sutherland, I. (1977): *Surface carbohydrates of the prokaryotic cell*. Academic Press. New York. U.S.A.
- Sutherland, E., Coe, L., and Raleigh, E.A. (1992): McrBC - a multisubunit GTP-dependent restriction endonuclease. *J. Mol. Biol.* **225**:327-348.
- Takaichi, S., Inoue, K., Akaike, M., Kobayashi, M., Ohoka, H., and Madigan, M.T. (1997): The major carotenoid in all known species of heliobacteria is the C-30 carotenoid 4,4'-diaponeurosporene, not neurosporene. *Arch. Microbiol.* **168**:277-281.
- Takami, H., Takaki, Y., and Uchiyama, I. (2002): Genome sequence of *Oceanobacillus iheyensis* isolated from the Iheya Ridge and its unexpected adaptive capabilities to extreme environments. *Nucleic Acids Res.* **30**:3927-3935.

- Tauch, A., Kirchner, O., Wehmeier, L., Kalinowski, J., and Pühler, A., (1994): *Corynebacterium glutamicum* DNA is subjected to methylation-restriction in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **123**:343-348.
- 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.
- Tauch, A., Pühler, A., Kalinowski, J., and Thierbach, G. (2000): TetZ, a new tetracycline resistance determinant discovered in Gram-positive bacteria, shows highly homology to Gram-negative regulated efflux systems. Plasmid **44**:285-291.
- Tauch, A., Kirchner, O., Löffler, B., Götker, S., Pühler, A., and Kalinowski, J. (2002): Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. Curr. Microbiol. **45**:362-367.
- Tharaud, M., Menggad, M., Paulin, J.P., and Laurent, J. (1994): Virulence, growth and surface characterization of *Erwinia amylovora* mutants with altered pathogenicity. Microbiology **140**:659-669.
- Thomson, J.M. and Parrott, W.A., (1998): pMECA: a cloning plasmid with 44 unique restriction sites that allows selection of recombinants based on colony size. BioTechniques **24**:922-924.
- Tsien, R.Y. (1998): The green fluorescent protein. Annu. Rev. Biochem. **67**:509-544.
- 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**:501-505.
- van den Bulk, R.W., Löffler, H.J.M., and Dons, J.J.M. (1989): Effect of phytotoxic compounds produced by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Neth. J. Plant Pathol. **95**:107-117.
- van den Bulk, R.W., Löffler, H.J.M., and Dons, J.J.M. (1990): Inhibition of callus development from protoplasts of *Lycopersicon peruvianum* by extracellular polysaccharides of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Plant Science **71**:105-112.
- van den Bulk, R.W., Zevenhuizen, L.P.T.M., Cordewener, J.H.G., and Dons, J.J.M. (1991): Characterization of the extracellular polysaccharide produced by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology **81**:619-623.
- van der Rest, M.E., Lange, C., and Molenaar, D. (1999): A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. Appl. Microbiol. Biotechnol. **52**:541-545.
- van Sluys, M.A., Monteiro-Vitorello, C.B., Camargo, L.E.A., Menck, C.F.M., da Silva, A.C.R., Ferro, J.A., Oliveira, M.C., Setubal, J.C., Kitajima, J.P., and Simpson, A.J. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. **40**:169-189.

- Vertès, A.A., Hatakeyama, K., Inui, M., Kobayashi, M., Kurusu, Y., and Yukawa, H. (1993): Replacement recombination in coryneform bacteria: high efficiency integration requirement for non-methylated plasmid DNA. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**:2036-2038.
- Vertès, A.A., Inui, M., Kobayashi, M., Kurusu, Y., and Yukawa, H. (1994a): Isolation and characterization of IS31831, a transposable element from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **11**:739-746.
- Vertès, A.A., Asai, Y., Inui, M., Kobayashi, M., Kurusu, Y., and Yukawa, H. (1994b): Transposon mutagenesis of coryneform bacteria. *Mol. Gen. Genet.* **245**:397-405.
- Vidaver, A.K. and Mandel, M. (1974): *Corynebacterium nebraskense*, a new, orange-pigmented phytopathogenic species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24**:482-485.
- Vidaver, A.K. (1982): The plant pathogenic corynebacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:495-517.
- 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.
- Waite-Rees, P.A., Keating, C.J., Moran, L.S., Slatko, B.E., Hornstra, L.J., Benner, J.S. (1991): Characterization and expression of the *Escherichia coli* Mrr restriction system. *J. Bacteriol.* **173**:5207-5219.
- Wallis, F.M. (1977): Ultrastructural histopathology of tomato plants infected with *Corynebacterium michiganense*. *Physiol. Plant Pathol.* **13**:307-317.
- Wang, Y.-D., Zhao, S., and Hill, C.W. (1998): *Rhs* elements comprise three subfamilies which diverged prior to acquisition by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**:4102-4110.
- Williams, D.R. and Thomas, C.M. (1992): Active partitioning of bacterial plasmids. *J. Gen. Microbiol.* **138**:1-16.
- Wohlleben, W., Arnold, W., Bissonnette, L., Pelletier, A., Tanguay, A., Roy, P.H., Gamboa, G.C., Barry, G.F., Aubert, E., Davies, J., and Kagan, S.A. (1989): On the evolution of Tn21-like multi-resistance transposons: sequence analysis of the gene (*aacCI*) for gentamicin acetyltransferase-3-I (AAC(3)-I), another member of the Tn21-based expression cassette. *Mol. Gen. Genet.* **217**: 202-208.
- Wolf, H., Pühler, A., and Neumann, E. (1989): Electrotransformation of intact and osmotically sensitive cell of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**:283-289.
- Yanisch-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.
- Young, D.H. and Sequeira, L. (1986): Binding of *Pseudomonas solanacearum* fimbriae to tobacco leaf cell walls and its inhibition by bacterial extracellular polysaccharides. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **28**:393-402.

Zhang, Z., Wang, Y., and Ruan, J. (1998): Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. Int. J. Syst. Bacteriol. **48**:411-422.

Zhao, S. and Hill, C.W. (1995): Reshuffling of *Rhs* components to create a new element. J. Bacteriol. **177**:1393-1398.

Zimmermann, U., Zhu, J.J., Meinzer, F.C., Goldstein, G., Schneider, H., Zimmermann, G., Benkert, R., Thuermer, F., Melcher, P., Webb, D., and Haase, A. (1994): High molecular weight organic compounds in the xylem sap of mangroves: Implications for long-distance water transport. Bot. Acta **107**:218-229.

VII Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

% (w/v), % (v/v)	Gewichtsprozent, Volumenprozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Amp, Amp ^R	Ampicillin, ampicillinresistent
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylpyrophosphat
bidest.	doppelt destilliert
bp, bps	Basenpaare
ccc	supercoiled
Cm, Cm ^R	Chloramphenicol, chloramphenicolresistent
<i>Cmm</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
<i>Cmi</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>
<i>Cmn</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>
<i>Cms</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>
cv.	cultivar
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-Aminoethylether)-tetraacetat
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
Gm, Gm ^R	Gentamicin, gentamicinresistent
h	Stunde
Km, Km ^R	Kanamycin, kanamycinresistent
kb, kbp	Kilobase(n)
M	Mol, molar
mcs	multiple cloning site
min	Minuten
mM	Millimol, millimolar
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
NCPPB	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, U.K.
Neo, Neo ^R	Neomycin, neomycinresistent
oc	open circle
o.D.	optische Dichte
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pv.	pathovar
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
ss	einzelsträngig
SSC	Sodium-Saline-Citrat
subsp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
Tet, Tet ^R	Tetrazyklin, tetrazyklinresistent
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)Aminoethan
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
ü/N	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
Vol.	Volumen
WI	Welkeindex
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid

2 Southern-Hybridisierung von Transposon-Mutanten gegen die Standard-Sonden

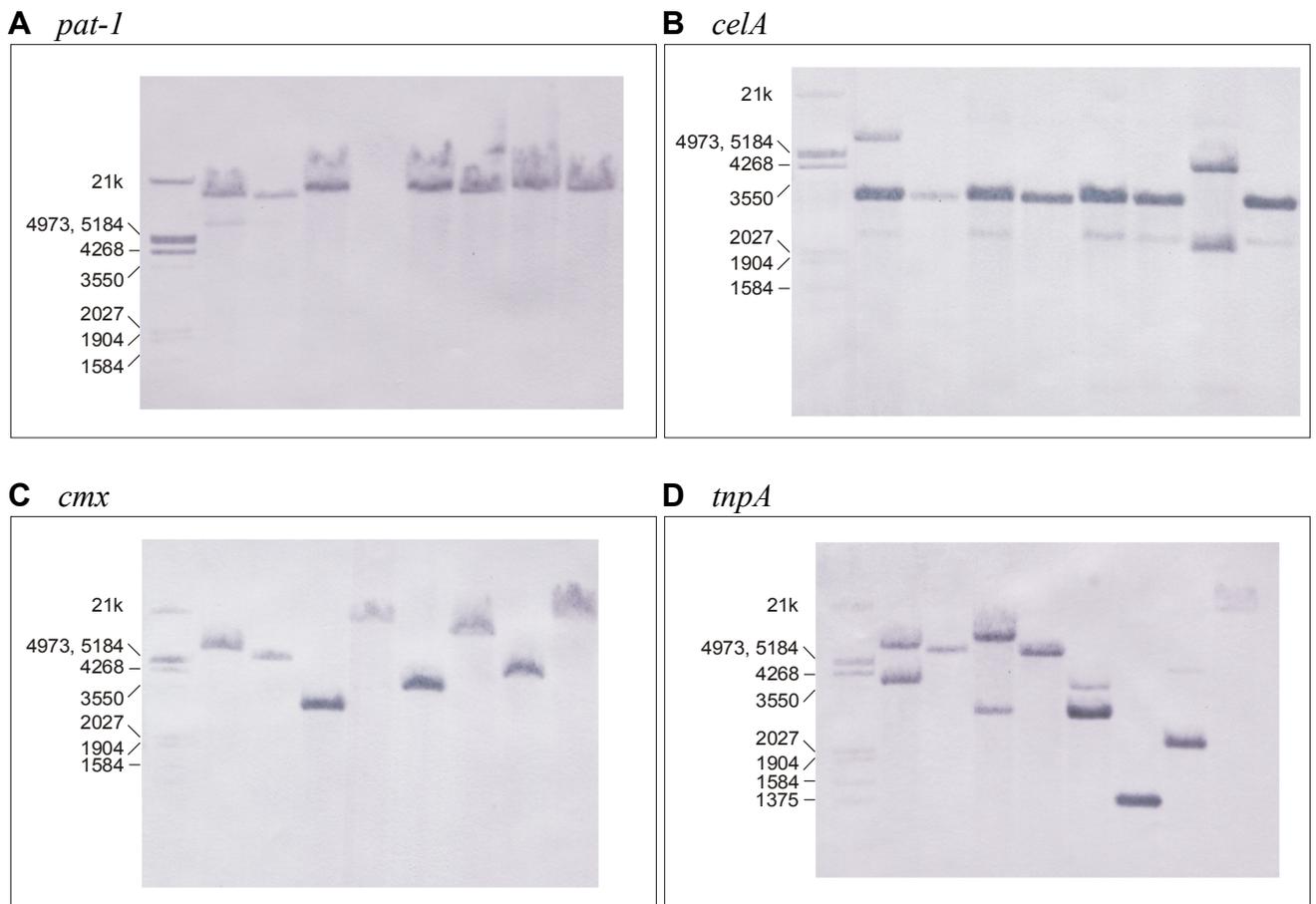


Abb. VII.1: Southern-Hybridisierung von *Bgl*III-gespaltener Gesamt-DNA verschiedener *Cmm*-Transposonmutanten gegen die *pat-1*- (A), *celA*- (B), *cmx*- (C) und *tnpA*-Sonde. (D)

Spur	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DNA	λ	TM382β	TM382β	TM382β	TM382β	TM382β	TM382β	TM382β	TM382β
Spaltu ng	E/H	314-46 <i>Bgl</i> III	324-50 <i>Bgl</i> III	330-17 <i>Bgl</i> III	330-18 <i>Bgl</i> III	356-47 <i>Bgl</i> III	370-45 <i>Bgl</i> III	371-6 <i>Bgl</i> III	371-23 <i>Bgl</i> III

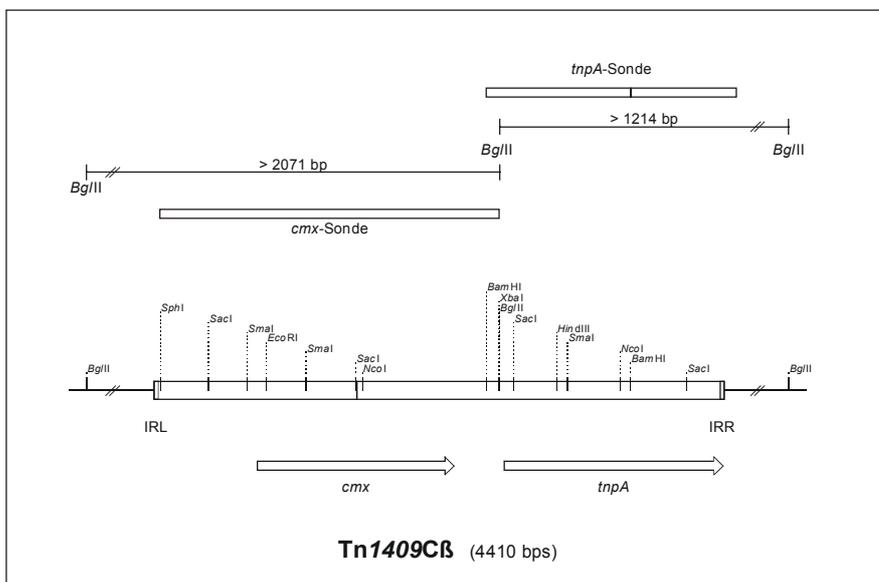
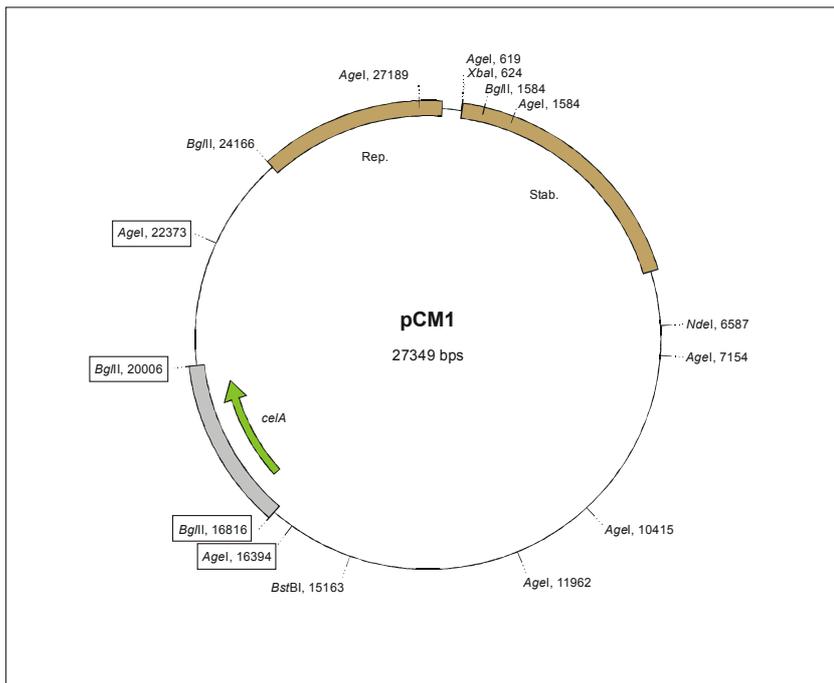


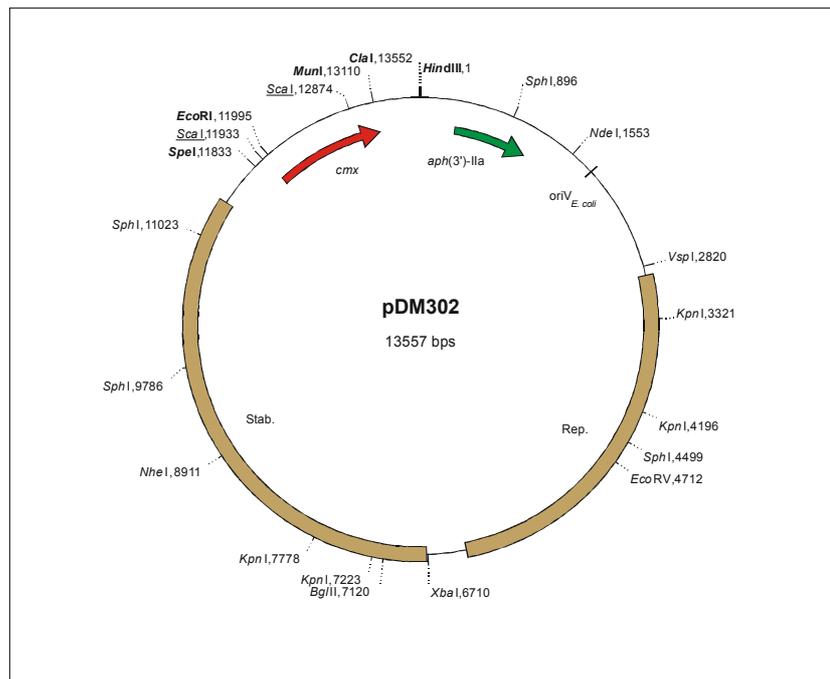
Abb.VII.2: Schematische Darstellung einer Insertion von *Tn1409CB* in das Chromosom von *Cmm* (unten). Erwartete Größe der hybridisierenden Banden von *Bgl*III-gespaltener Gesamt-DNA gegen die *cmx*- bzw. *tnpA*-Sonde (oben).

3 Plasmidkarten



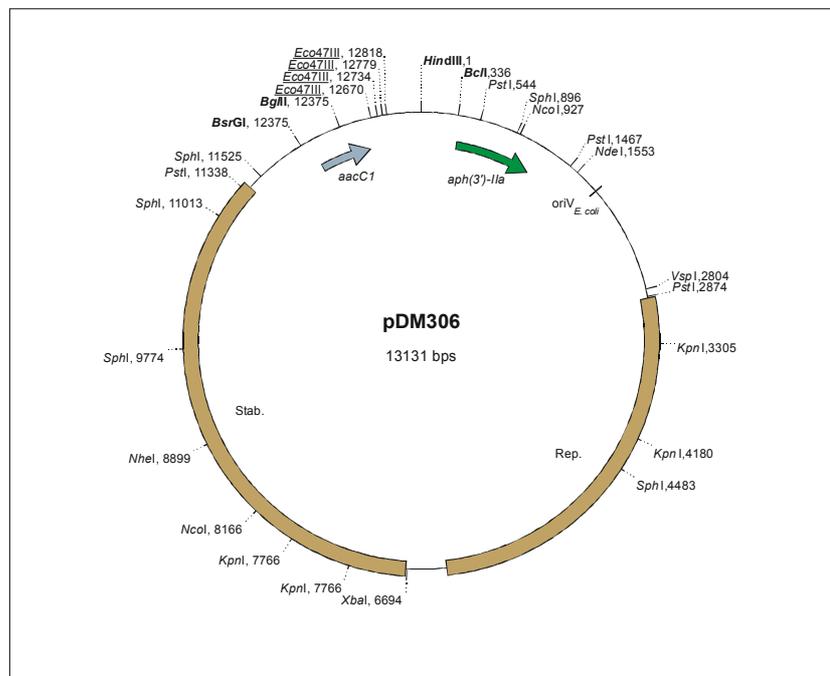
pCM1

Abb. VII.3: Physikalische Karte des endogenen Plasmids pCM1 von *Cmm*. Rep.: Replikationsregion; Stab.: Stabilitätsregion; *celA*: Zellulase-Gen.



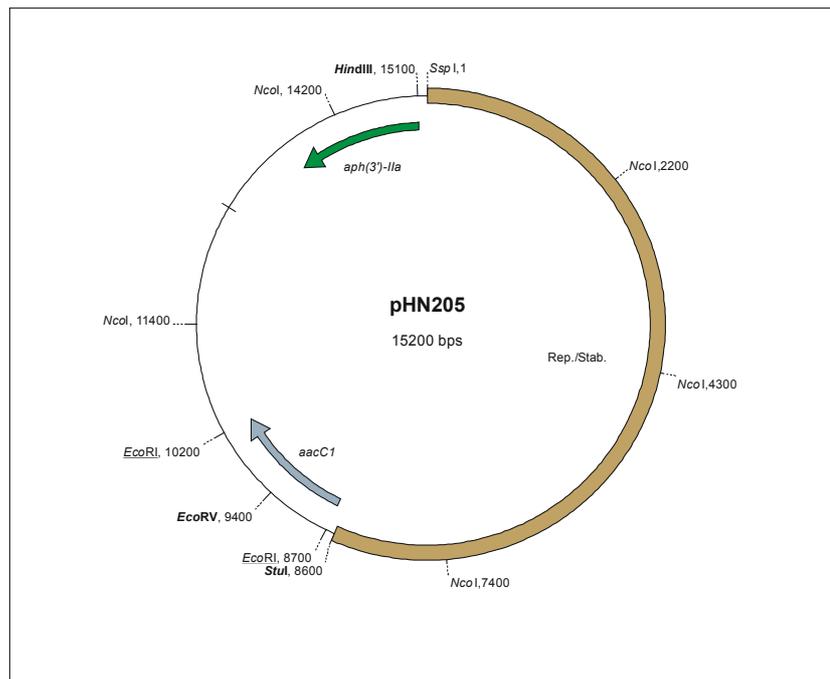
pDM302

Abb. VII.4: Physikalische Karte des *E. coli*-*Cmm*-Shuttle-Vektors pDM302 (MELETZUS *et al.*, 1993). Singuläre, zur Klonierung prinzipiell nutzbare Schnittstellen sind fett dargestellt, die doppelt vorkommende und ebenfalls nutzbare *ScaI*-Schnittstelle ist unterstrichen. Rep.: Replikationsregion; Stab.: Stabilitätsregion; *cmx*: Chloramphenicolexporter-Gen; *aph(3')-IIa*: Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gen; *oriV_{E. coli}*: Replikationsursprung in *E. coli*.



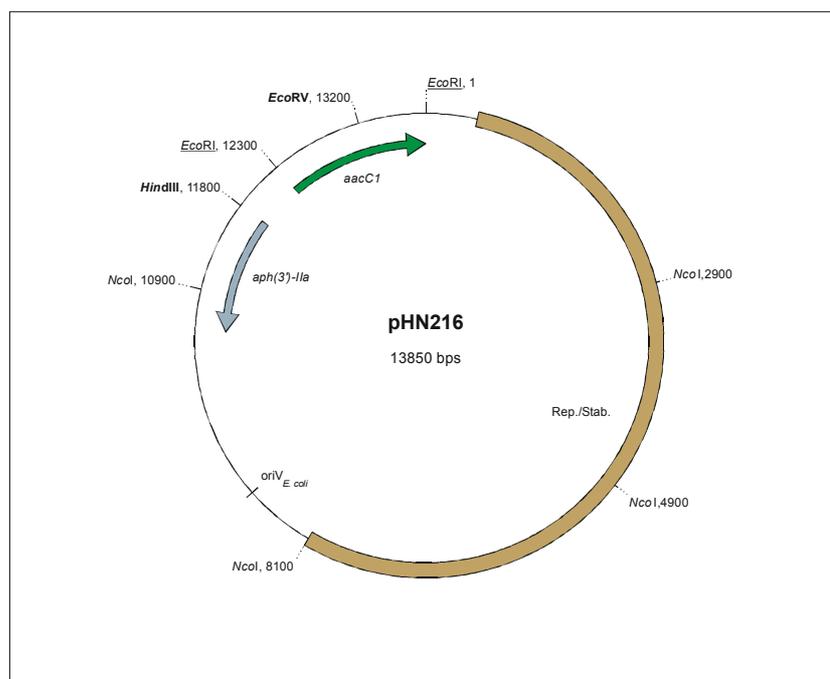
pDM306

Abb. VII.5: Physikalische Karte des *E. coli*-*Cmm*-Shuttle-Vektors pDM306 (MELETZUS *et al.*, 1993). Singuläre, zur Klonierung prinzipiell nutzbare Schnittstellen, sind fett dargestellt, die vierfach vorkommende und ebenfalls nutzbare *Eco47III*-Schnittstelle ist unterstrichen. Rep.: Replikationsregion; Stab.: Stabilitätsregion; *aacC1*: Gentamicin-Acetyltransferase-Gen; *aph(3')-IIa*: Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gen; *oriV_{E. coli}*: Replikationsursprung in *E. coli*.



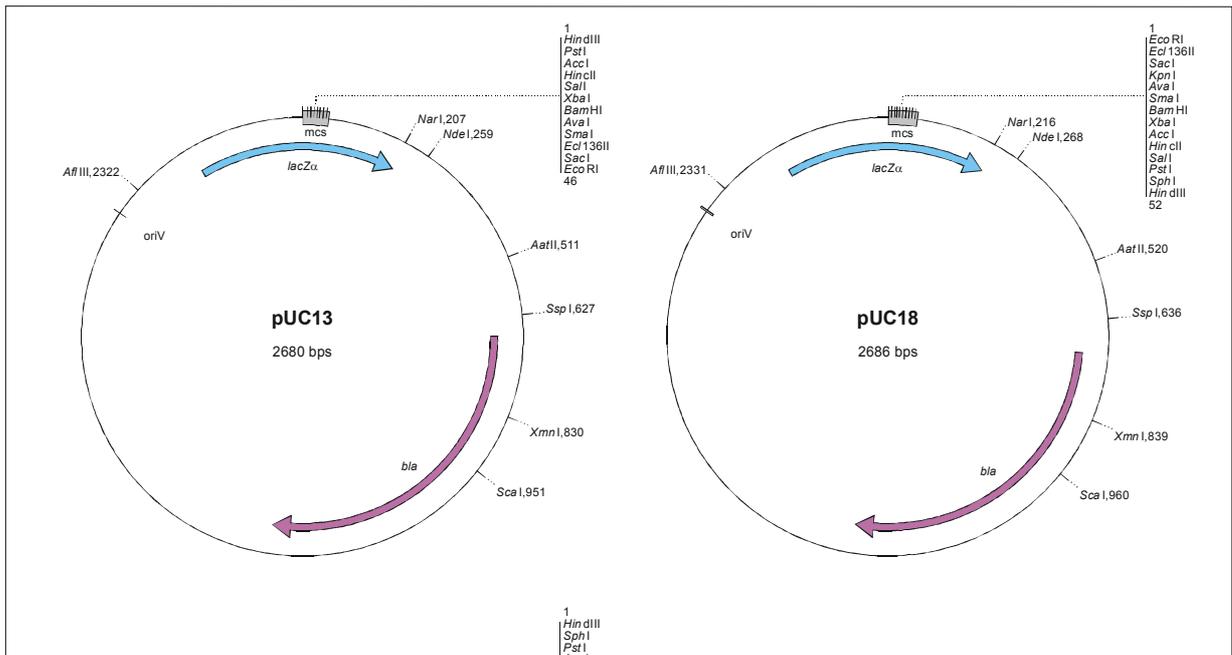
pHN205

Abb. VII.6: Physikalische Karte des *E. coli*-Cmm-Shuttle-Vektors pHN205 (NAKHEI, 1993). Singuläre, zur Klonierung prinzipiell nutzbare Schnittstellen sind fett dargestellt, die doppelt vorkommende und ebenfalls nutzbare *EcoRI*-Schnittstelle ist unterstrichen. Rep./Stab.: Replikationsregion/Stabilitätsregion; *aacC1*: Gentamicin-Acetyltransferase-Gen; *aph(3')-IIa*: Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gen; *oriV_{E. coli}*: Replikationsursprung in *E. coli*. Der Vektor ist bisher nicht sequenziert, alle Größen-/Positionsangaben geschätzt.



pHN216

Abb. VII.7: Physikalische Karte des *E. coli*-Cmm-Shuttle-Vektors pHN216 (NAKHEI, 1993). Singuläre, zur Klonierung prinzipiell nutzbare Schnittstellen sind fett dargestellt, die doppelt vorkommende und ebenfalls nutzbare *EcoRI*-Schnittstelle ist unterstrichen. Rep./Stab.: Replikations-/Stabilitätsregion; *aacC1*: Gentamicin-Acetyltransferase-Gen; *aph(3')-IIa*: Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gen; *oriV_{E. coli}*: Replikationsursprung in *E. coli*. Der Vektor ist bisher nicht sequenziert, alle Größen-/Positionsangaben geschätzt.



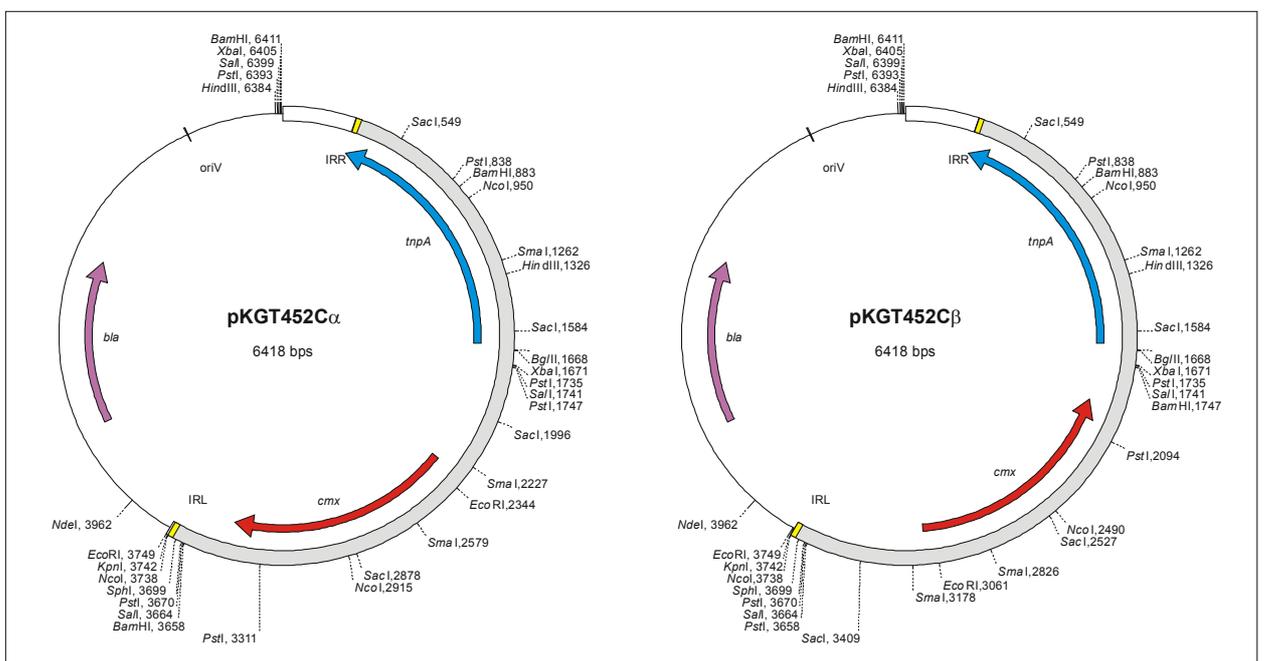
pUC13, pUC18, pUC19

Abb. VII.8 (oben): Physikalische Karten der *E. coli*-Kloniervektoren pUC13, pUC18 und pUC19.

pKGT452C α , pKGT452C β

Abb. VII.9 (unten): Physikalische Karten der Transposon-Mutagenesevektoren pKGT452C α und β (GARTEMANN und EICHENLAUB, 2000).

bla: β -Lactamase-Gen; *lacZ α* : α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation; *mcs*: "multiple cloning site"; *oriV*: Replikationsursprung, *cmx*: Chloramphenicol-Exporter-Gen, *tnpA*: pot. Transposase-Gen, IRL/IRR: linker bzw. rechter "inverted repeat"



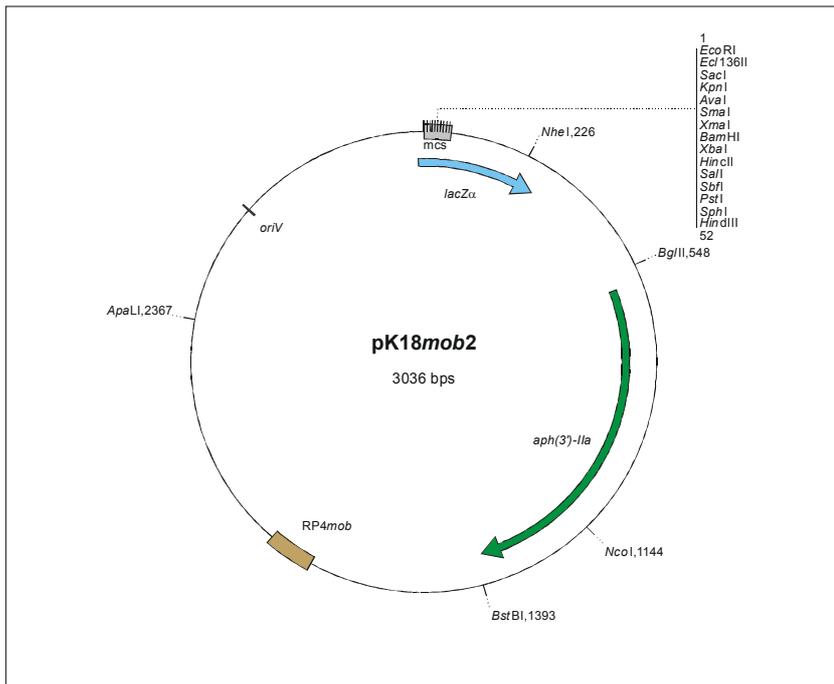


Abb. VII.10: Physikalische Karte des *E. coli*-Kloniervektors pK18mob2 (TAUCH *et al.*, 1998). *aph(3')-IIa*: Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gen; *lacZα*: α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation; mcs: "multiple cloning site"; oriV: Replikationsursprung; RP4mob: *mob*-Region des Plasmids RP4. Kann *in trans* in dem *E. coli*-Stamm S17-1 (SIMON *et al.*, 1983) zur Mobilisierung von pK18mob2 über Konjugation genutzt werden.

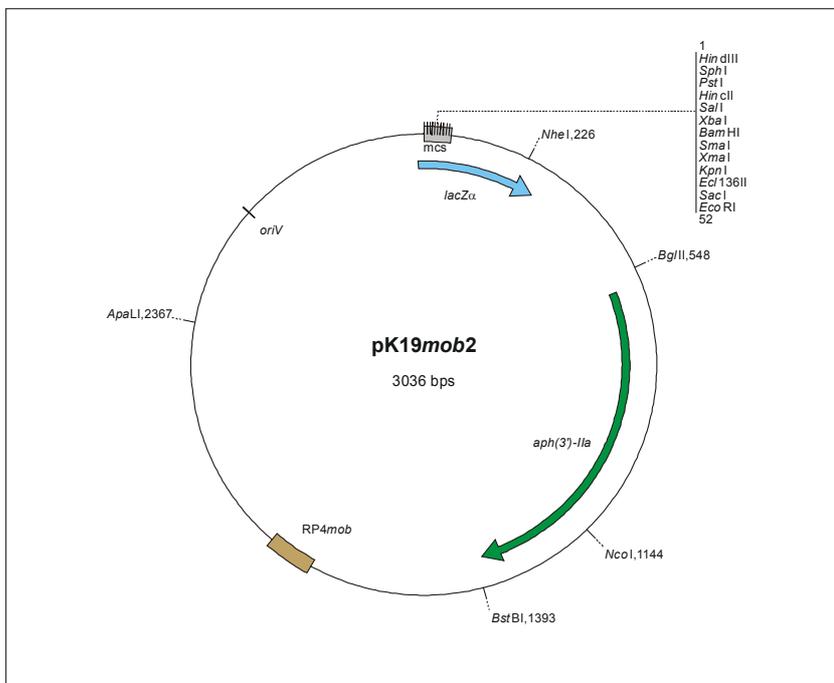
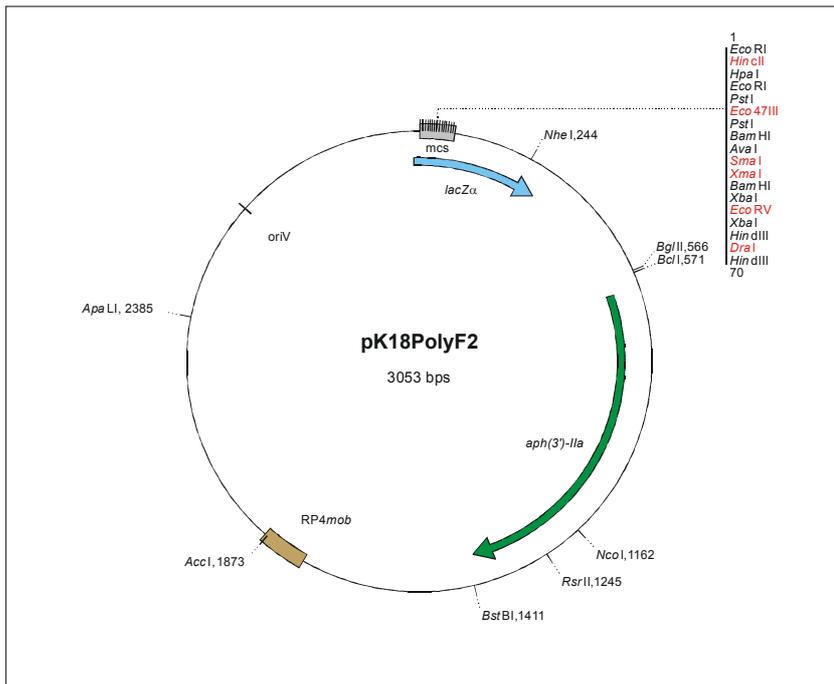
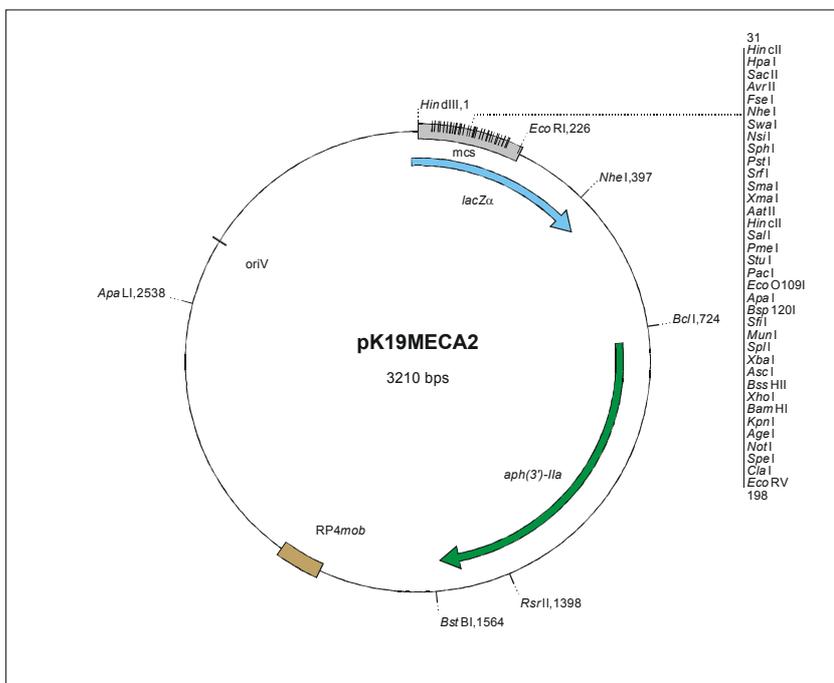


Abb. VII.11: Physikalische Karte des *E. coli*-Kloniervektors pK19mob2 (KIRCHNER und TAUCH, 2003). *aph(3')-IIa*: Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gen; *lacZα*: α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation; mcs: "multiple cloning site"; oriV: Replikationsursprung; RP4mob: *mob*-Region des Plasmids RP4. Kann *in trans* in dem *E. coli*-Stamm S17-1 (SIMON *et al.*, 1983) zur Mobilisierung von pK19mob2 über Konjugation genutzt werden.



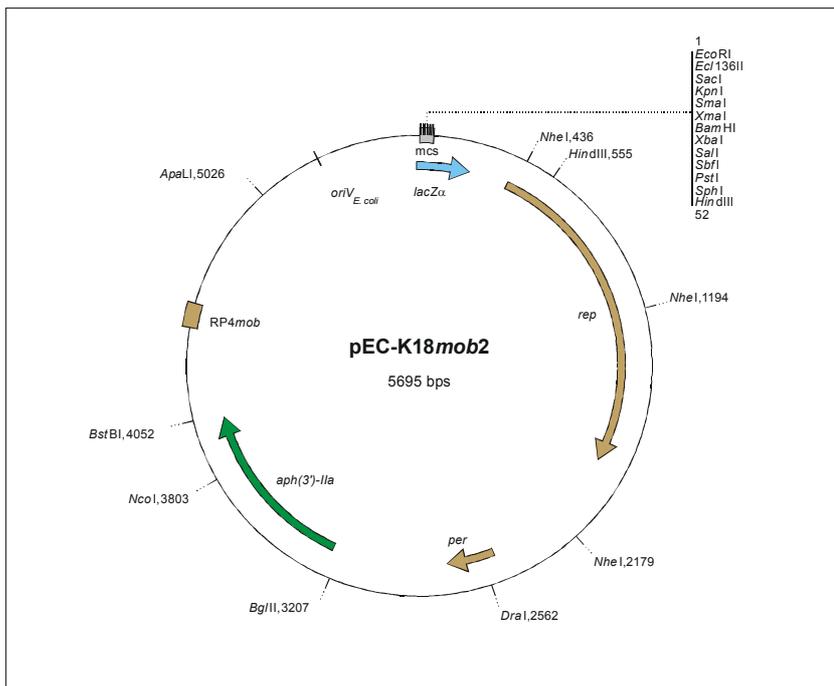
pK18PolyF2

Abb. VII.12: Physikalische Karte des *E. coli*-Kloniervektors pK18PolyF2 (KIRCHNER, 1999; TAUCH *et al.*, 2002). Die "blunt-end" Schnittstellen zum Einklonieren von Fragmenten, die mit "sticky-ends" versehen werden sollen, sind rot dargestellt. *aph(3')-IIa*: Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gen; *lacZα*: α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation; mcs: "multiple cloning site"; oriV: Replikationsursprung; RP4mob: mob-Region des Plasmids RP4.



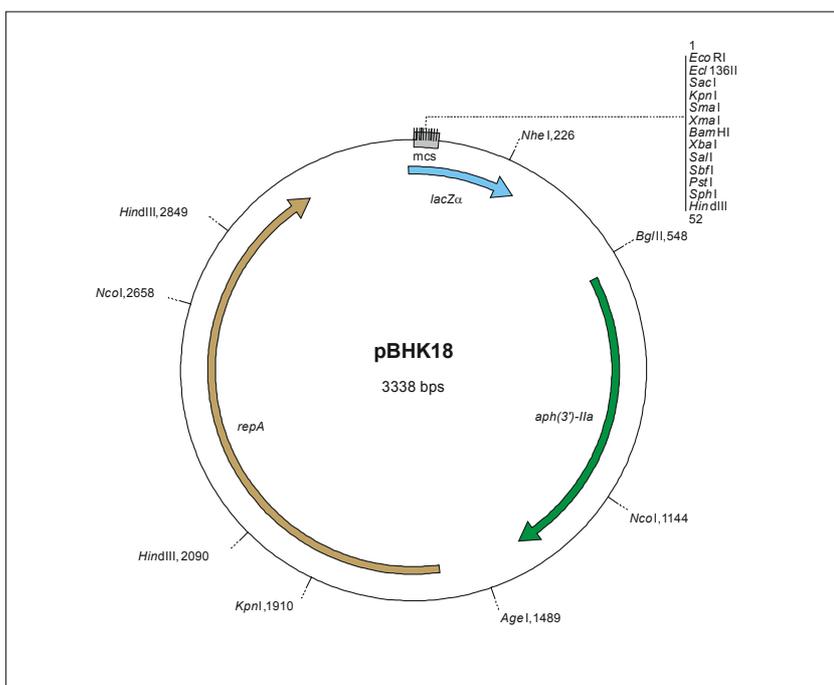
pK19MECA2

Abb. VII.13: Physikalische Karte des *E. coli*-Kloniervektors pK19MECA2 (KIRCHNER und TAUCH, 2003). *aph(3')-IIa*: Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gen; *lacZα*: α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation; mcs: "multiple cloning site"; oriV: Replikationsursprung; RP4mob: mob-Region des Plasmids RP4.



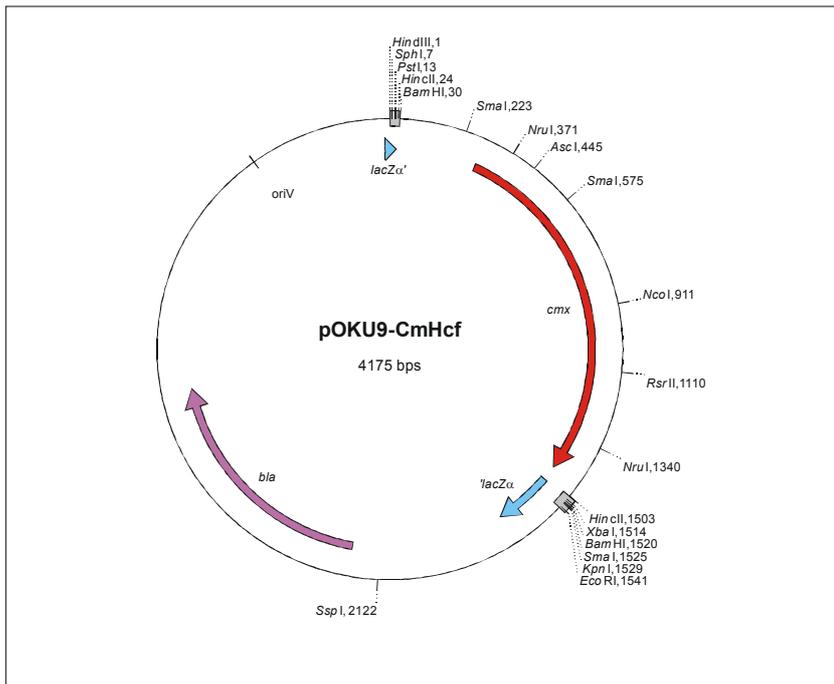
pEC-K18mob2

Abb VII.14: Physikalische Karte des *E. coli*-*Corynebacterium*-Shuttle-Vektors pEC-K18mob2 (KIRCHNER, 1999; TAUCH *et al.*, 2002). *aph(3')-IIa*: Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gen; *rep*: Replikations-Gen in *Corynebacterium*; *per*: "positive effector of replication"; *lacZα*: α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation; *mcs*: "multiple cloning site"; *oriV_{E. coli}*: Replikationsursprung in *E. coli*. *RP4mob*: *mob*-Region des Plasmids RP4.



pBHK18

Abb VII.15: Physikalische Karte des "broad-host-range"-Vektors pBHK18 (KIRCHNER und TAUCH, 2003). *aph(3')-IIa*: Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gen; *repA*: Replikations-Gen; *lacZα*: α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation; *mcs*: "multiple cloning site".



pOKU9-CmHcf

Abb. VII.16: Physikalische Karte der *HincII* *cmx*-Kassette in pUC19. *bla*: β -Lactamase-Gen; *cmx*: Chloramphenicol-Exporter-Gen; *lacZ α '*: unterbrochenes α -Fragment des *lacZ*-Gens; oriV: Replikationsursprung.

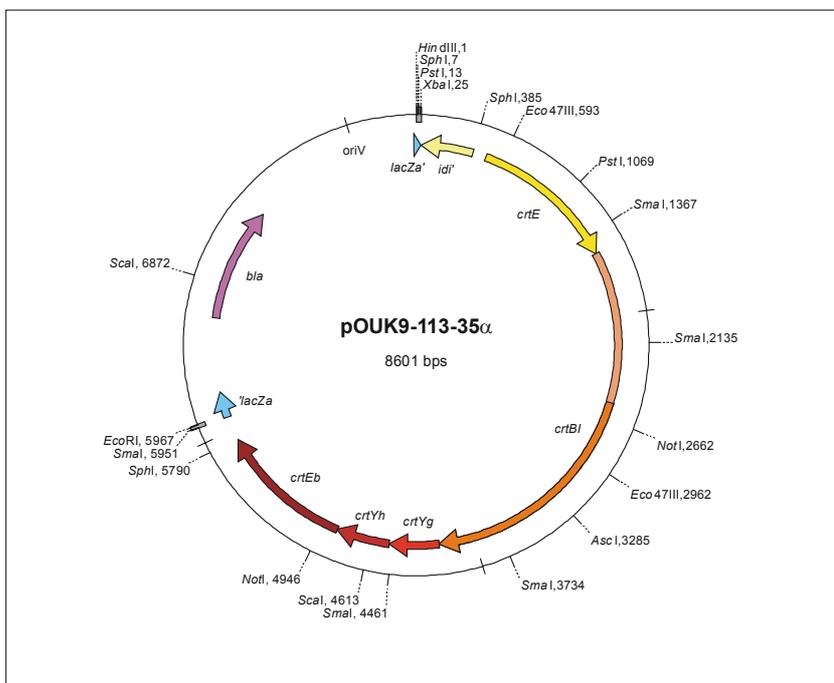
pOKU9-113-35 α

Abb. VII.17: Physikalische Karte von pOKU9-113-35 α . pUC19 (*Bam*HI) mit 5,9 kb *Bg*II-Insert von *cos2/27*. *bla*: β -Lactamase-Gen; *lacZ α '*: unterbrochenes α -Fragment des *lacZ*-Gens; oriV: Replikationsursprung. *idi'*: Isopentylpyrophosphat-Isomerase-Gen; *crtE*: GGPP-Synthase-Gen; *crtBI*: Phytoen-Synthase/Phytoen-Desaturase-Gen; *crtYg*, *crtYh*: C₅₀-Carotinoid- ϵ -Zyklase-Gene; *crtEb*: Lycopin-Elongase-Gen.

CrtB:

```

          *           20           *           40           *           60           *
C_michig Q MTRRLPGRRPAAPEAPTGLKDYDRVAQETASVVIIRRYSTSFGLASRLIGADVROHIENVYALVVRVADELIV Q 70
A_mediol Q MSTRTTQRTTAPPAPSTGLALYDRTAAEGSARVIRAYSTSFGLASRLCSPAVREHLAEVYALVRIADELIV Q 70
B_flavum Q -----MTHQNSPLFLKSALRLYNRASFKASHKVIEEYSTSFSLSTWLLSPRIRNDIRNLYAVVRIADEIV Q 65
C_effici Q -MTQHQLTNRSVSFLNSALGLYNRVAVKASHQVIKRYSTSFSMATLMLSPQIRRDIRNLYSVVRIADEIV Q 69
B_linens Q -----MSSSPAYDVFSRTAQQAAKAVISNYSTSFGLATRLIGESHRRHRIIRNIYALVRIADEIV Q 58
          l y R a           VI YSTSF la ll p R i n Ya VRIADEiV

          80           *           100           *           120           *           140
C_michig Q DGAAAGAGVDPFAHVEELLDALDAQETEDAMLRGYSTNLVVHFAITARRAGFGAELTAPFFASMRMDLRR- Q 139
A_mediol Q DGPAEEEAQLPCERRRELLDALEADTEAAEFESGYSANLVVHAFARAARRSGFGQELTRPFFASMRDLLEP- Q 139
B_flavum Q DGTAAHAACSTAKIEEILDAYEIAVLAAPQQRFNLDLVLOAYGETARRCDFEQEHVIAFFASMRKDLKA- Q 134
C_effici Q DGTALAAGYTPAELGTLDDYEAAVLAAPAQHFTDLALQAYGDTARRCDFEQEHVIAFFASMRDLTA- Q 138
B_linens Q DGLAADAGLDTSEQHEMLNENFVAATRALGRHGVSNDLIIHSFAQTANATGITGDLIEPFFASMRADLETQ Q 128
          DG A AG e Ld e aa L a tArr f e FFASMR DL

          *           160           *           180           *           200           *
C_michig Q -----MEHTPAS-FTEYVYGSAAEVVGLMCLRAFLVGHATTRPERIRFEEGAKRLGAAAFQKVNFLRDLAA Q 202
A_mediol Q -----IAPTEERELDEYVYGSAAEVVGLMCLRGFAIGLAPDAERDARWERGARALGSAFQKVNFLRDLGE Q 203
B_flavum Q -----NTHDPDSFTTYVYGSAAEVIGLLCLSVFNQGRRTISKRRLEIMQNGARSLGAAAFQKVNFLRDLAE Q 197
C_effici Q -----SEHDPGSFEAYVYGSAAEVIGLLCLSVFNQGRPVSEARQORMREGARALGAAAFQKVNFLRDLAE Q 201
B_linens Q SEFPAPVRGFDQDEHRAVYVYGSAAEVVGLMCLKVFELCGQSRTPAQIEELEYGARQLGAAAFQKVNFLRDLAD Q 198
          YVYGSAAEV GL CL F G Gar LGAAAFQ NFLRDLA

          220           *           240           *           260           *           280
C_michig Q DHGALGRSYFFGVVDVATFSEADKERILDDIDHDIRMSGAVIPDIPASSRRAVALAQGLFAELAVFLRDITP Q 272
A_mediol Q DASLRGRRYFFGVDPVSFSEAQQRLRLDGLDAELDEAAAVIPELIPRGCRVAVAAAHGLFGELSAFLRRITP Q 273
B_flavum Q DQQNLGRYFFFKTSQGTLTKEQKEDLIADIRQDLAIAHDAFPEIPVQARIGVLSAYLLFQKLTDRIEATP Q 267
C_effici Q DQQELGRYFFGTTAGALTEPQKQQLIADIRVDLSTAERTYEPALPVQARIGVIAAALLFEGLTDRIEQTP Q 271
B_linens Q DSLRLGRSYLT--AETRLTQTEKSAWVTTIRQCLTNADDTLALLPKDARAARVSAALFTALNDKIADIP Q 266
          D lGR Yfp k I L a p lP R V A LF L r tP

          *           300           *           320           *           340           *
C_michig Q ASELVTRVRFVDPVKARIALAAAGAEPGVDGRLVRRSRAPRVHAARPAPSSHGVAVRPAPTQPAPSD Q 342
A_mediol Q AAELVTRVRFVDPAPRKLAVTRVVARGRP----- Q 303
B_flavum Q TADLLRREIRVPLHIKLSLARATMKGLSMSIYRKNS----- Q 304
C_effici Q AVKLEERISIPITTKLMLLGRATVKGLSMSIYRKKQ----- Q 308
B_linens Q VDRLYRERVRITENALKAQLTAKALLATAKENRA----- Q 299
          L R r P K a

C_michig Q PEQQESA Q 349
A_mediol Q ----- Q -
B_flavum Q ----- Q -
C_effici Q ----- Q -
B_linens Q ----- Q -

```


CrtYg:

```

          *           20           *           40           *           60           *
C_michig Q -----MGLVYLVLLGALCMMMLIDRRWRLFFWRDRTAAGTLLIGVAFLLWLDIAGI Q 53
B_flavum Q MIPIIDISQNEQSDSIFMAETIYLGTLVLVLCMALCDHRWKLAEFRHPLRALISVGAAYIGFLLWLDIFGI Q 70
A_mediol Q -----MTEHLHLGLLLASTACIALVDARYRLFFWRAPLRAITVVVALGVAMLLVWDLWGI Q 53
C_effici Q -----MTDFLMSFTIYLGSLIVFIGMVLCDHRWKLGEFRNAPRALAIGVTTYVGFLLWLDVLCI Q 58
B_linens Q -----MSAEYIYLLMGACLLITLPLELLFSARVYRRPKLLIGSLIPIILVLSLWLDIIAI Q 54
          m f yL l c l d r l f R a fllWD gI

          80           *           100           *           120           *           140
C_michig Q SQGIFFRGETSFMTGILVGEELPLEEVFFLALCYLTMNLVNGFSRLADHHVARARERANR----- Q 114
B_flavum Q ITCTFYRGDSAFMSGINLAPHMPIEELFFLFFLCYITLNLTSAAALWKAPLPKPKGKKSPLTPQRDTFQ Q 140
A_mediol Q SLGIFFREPNAYSTGLLIAPHLPPIEEPVFLAFLCQLAMVGYTGLLRLLAHRSAQPATGPAADSTAEGARR Q 123
C_effici Q VTCTFYRGDSPYMTGIDLAPHMPIEELFFLFFLCYLTLLNTSAVSLVLTPLPEQRGATQPANTGATTG Q 128
B_linens Q DRDHWTYN-QQFVTCIHIG-NLPLEELVFFIVIPICALLSYEA VGTVLKFFVAKKSGTRAGRKSGNRKDGQ Q 122
          g f r tGi p P EE Fl lc l

          *
C_michig Q ----- Q -
B_flavum Q PTTTPEVEP- Q 149
A_mediol Q ----- Q -
C_effici Q EAQP----- Q 132
B_linens Q DVA----- Q 125

```

CrtYh:

```

          *           20           *           40           *           60           *
C_michig Q MSYLVLDLLEFLIPVAIVG-FLFRRLLLREANA VPYGSSRFDYPEYYWYRRMPVVI LLVMTLIFDNIIMIKV Q 69
C_effici Q MTYVLMSTPFLVVFALVAFVLKRANGTRQITWVTLTLTI-----LFVLTILFDNIMVWA Q 54
A_mediol Q MSYAVLCLPFLAVSAVLAATAWRRAPAGHAAAALALTAGG-----LVLLTAVFDSLMIAA Q 54
B_flavum Q MTYILISIPFLAIALVLFALKLQAGTPKLLPITAVSALT-----LCSLTILFDNLMVWA Q 54
M_xanthu Q MTYARFLGLEVVVPILFLAWRYRRTFTARSLAPMGLLLIV-----VYAAISPWDNLAVKW Q 55
          M Y Fl l T fDn m

          80           *           100           *           120           *           140
C_michig Q GLVGYDDDKLVGLILCYAPTEDFAYAYIAALVLLPAAVWYLLR-----RRFRVSGI Q 118
C_effici Q DFFGYGDTQHLGIWGLIPIEDLIFYPLFAALLIPAIWLPGLWRR-----NTTTADTS Q 107
A_mediol Q GLFDYADAPLLCPRLGLAPTEDFAYPIAALLLCSTVWTLGRADA-----SAARDRPARAP Q 110
B_flavum Q DLFGYGDTPQHLGIWGLIPIEDLIFYPLFAVLLIPALWLPGNMFKRRKRPHHSLPTIDNRSITTRSTTTQ Q 124
M_xanthu Q GLWGFDPERIWGIKLCYLPLEEYLFALQTLVGLVGLWVLAQARLARALAPDAQASRP---AAETGERREGAL Q 121
          l gy d G lG P Ed y a ll W r

          *
C_michig Q EAHE--- Q 122
C_effici Q SDAERA- Q 113
A_mediol Q RGAER-- Q 115
B_flavum Q SAPEKP- Q 130
M_xanthu Q TAREVAP Q 128
          E

```

CrtEb:

```

          *           20           *           40           *           60           *
C_michig Q MSDVRRARPGAAEMLRTIALSSRPLSWVNTAIPFAAAAYLTVTRFLDLTALIGTLYFLIPYNTLAMYGINDVF Q 70
A_mediol Q MSAVGAEASGQRLLPALFTASRPLSWVNTAIPFAAAAYLTVREVDVALVVGTLFFLVPYNTLAMYGINDVF Q 70
B_flavum Q -----MMEKIRLILSSRPLSWVNTAIPFGLAYLNLAGEIDWLFWLGIVFFLIPYNTLAMYGINDVF Q 61
C_effici Q -----MMDTIRVVFSSSRPLSWVNTAIPFGLAYLNLGGGMDWLFVWGVIEFFLIPYNTLAMYGINDVF Q 61
          r      sSRP SWVNTAIPf  AYLl  e D      G  fFLiPYN  AMYGINDVF

          80           *           100           *           120           *           140
C_michig Q DYESDMRNPRKGGVEGAVLARAMHRPVLVAVLVTVNPFLVYLVAVGSAAASVAVLAVSVFAVLAAYSLKGLR Q 140
A_mediol Q DFESDARNRPRKGGVEGALLPARHRAVLIAAVALTVPFVWVLLGGPWSWANLALSLFAVVAAYSAAPGLR Q 140
B_flavum Q DYESDIRNPRKGGVEGAVLKSSHSTLLWASAISTIPFLVILFIFGTWMSLWLTISVLAVLAYSAPKLR Q 131
C_effici Q DYESDIRNPRKGGVEGAVLVEKRYHPTLLWASSITITIPFLVILVYVAGTWMSTLWLTISVFAVLAAYSAAGLR Q 131
          DyESD RNRPRKGGVEGAvlp  H  L  A  t  PFlV  L  G  S  wL  SvFAViAYSa gLR

          *           160           *           180           *           200           *
C_michig Q FKERPILDSTSSSTHFISPAVYGVIVLAGGAFTPALWAILAAFFLWGVASHAFGAVQDIVADREGCITSSIA Q 210
A_mediol Q FKEIPGPDSTSSSTHFVSPACYGLALAGATVTEQLVLLLAFFVWGVASHAFGAVQDVVPDREACIGSIA Q 210
B_flavum Q FKERPFDALSTSSSTHFISPALIGATITGTSPSAAMWIALGSFFLWGMASQILGAVQDVNADREANLSSIA Q 201
C_effici Q FKERPILDATSSSTHFISPALVGAITITCADISTAMWLAGSFFLWGMASQILGAVQDVADREACLSSIA Q 201
          FKErP  D lTSSSTHFtSPA  G  G  a  w  L  FFlWG  AS  GAVQDv  aDREag  sSIA

          220           *           240           *           260           *           280
C_michig Q TVLGGAVTVRIAVLAVAAAGVAMLFTGLPGITAAVLVIPYILSTAPFWSIRDEDAEQANRGWRRFLGLNF Q 280
A_mediol Q TALGARTRRLAIGLWLAGVLMGTSPGPLAAVLAVPYLVAAWPYRSVSDAESARANGGWRVFLAINY Q 280
B_flavum Q TVIGARGAIRSVVLYLAAVIVTTLPNPAWIIIGIAILTVEFDAARFVNTIDASCEQANRSWKVFLWLNQ Q 271
C_effici Q TAMGARGAARLATMLYLAAAALVFLLPSPAWIVGTAALTYVLNSGRFVNTIDDTCESANRGWVKVFLWLNQ Q 271
          T  Gar  Rla  lyl  A  vl  P  i  Y  fw  i  D  e  ANrgW  FL  lNy

          *
C_michig Q LSGFVVTMLLITAYWLTNA Q 298
A_mediol Q GVGFAATMLLIWYALLTA Q 298
B_flavum Q FVGAVITILLIAIHQI-- Q 287
C_effici Q LVGAVVSLTLISVYLIV-- Q 287
          vG v tmlLI  l

```

Abkürzungen der Bakterienamen:

Alignment der Proteine der Carotinoid-Biosynthese (TM100β 113-35)

A_mediol: *Agromyces mediolanus*
B_flavum: *Brevibacterium flavum* (= *Corynebacterium glutamicum*)
B_linens: *Brevibacterium linens*
C_effici: *Corynebacterium efficiens*
C_glutam: *Corynebacterium glutamicum*
C_michig: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*
E_coli : *Escherichia coli*
M_tuberc: *Mycobacterium tuberculosis*
R_rhizog: *Rhizobium rhizogenes*
S_flexne: *Shigella flexneri*
S_typhim: *Salmonella typhimurium*

Alignment der Proteine unbekannter Funktion von *Xylella fastidiosa* (TM382β 324-50 und TM382β 370-45)

B_ubtil : *Bacillus subtilis*
C_michig : *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*
O_iheyen : *Oceanobacillus iheyensis*
S_avermi : *Streptomyces avermitilis*
T_fusca : *Thermobifida fusca*
X_axonop : *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*
X_fast_053: *Xylella fastidiosa* 9a5c ORF0531
X_fast_143: *Xylella fastidiosa* 9a5c ORF1434
X_fast_Dix: *Xylella fastidiosa* Dixon

Vergleich zwischen den Proteinen der Carotinoid-Biosynthese von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) und subsp. *sepedonicus* (*Cms*):

Idi:

```

      *      20      *      40      *      60      *
Cmm Q MPQHTELVLLDDDDGETIGTAPKATVHTRDTALHLAFSCHVFDAQGRILVTRRAIGKLTWPGVWTNSFCG Q 70
Cms Q MPQHTELVLLDDDDGETIGTAPKATVHTRDTALHLAFSCHVFDAEGRILVTRRAIGKLTWPGVWTNSFCG Q 70
      MPQHTELVLLDDDDGETIGTAPKATVHTRDTALHLAFSCHVFDA GRILVTRRAIGKLTWPGVWTNSFCG

      80      *      100      *      120      *      140
Cmm Q HPAPDEDMREAVHRRAEQELGLLELESVELVLPDFRYRATDAAGVENEICPVFRAVAASPVDP RPPEEVGE Q 140
Cms Q HPAPDEDMLEAVHRRAEQELGLTLESVELVLPDFRYRATDAAGVENEICPVFRAVAASPVDPRPEEVGE Q 140
      HPAPDEDM EAVHRRAEQELGL LESVELVLPDFRYRATDAAGVENEICPVFRAVA A PVDP RPPEEVGE

      *      160      *      180      *
Cmm Q YQWVDPEQLIPAVAHTPWAFSPWLTQLPLLYPEHAHSLGLAETAAA AAAVPAA Q 194
Cms Q YQWVDPEQLIPAVAHTPWAFSPWLTQLPLLYPEHAHAGLAD--- AAAVPAA Q 190
      YQWVDPEQLIPAVAHTPWAFSPWLTQLPLLYPEHAH GLA AAAVPAA

```

CrtE:

```

      *      20      *      40      *      60      *
Cmm Q MDATNLA AVSTSRQAHVNGVLD AFFARSLVRAEVMGDEYVKLWR TLESNTAGGKRFRPRMVMAAYDGLGG Q 70
Cms Q MDATNLA AVSTSRQVHVNGVLD AFFARSLVRAEVMGDEYVKLWR TLESNTAGGKRFRPRMVMAAYDGLGG Q 70
      MDATNLA AVSTSRQ HVNGVLD AFFARSLVRAEVMGDEYVKLWR TLESNTAGGKRFRPRMVMAAYDGLGG

      80      *      100      *      120      *      140
Cmm Q QDVQAAAHVGA AFEMLHTALIVHDDVIDRDFTRRGPNVSGAYRDIATTQGLPQPLAEHRGMSAAVIAGD Q 140
Cms Q QDVQAAAHVGA AFEMLHTALIVHDDVIDRDFTRRGPNVSGAYRDIATTQGLPQPLAEHRGMSAAVIAGD Q 140
      QDVQAAAHVGA AFEMLHTALIVHDDVIDRDFTRRGPNVSGAYRDIATTQGLPQPLAEHRGMSAAVIAGD

      *      160      *      180      *      200      *
Cmm Q LALVNAYRLIDASGVRDLTRSHLMEILDDAVFASAAGELIDVEFSLTADVPSVDEILRMERLKTAVYSFE Q 210
Cms Q LALVNAYRLIDASGVRDLTRSHLMEILDDAVFASAAGELIDVEFSLTADVPSVDEILRMERLKTAVYSFE Q 210
      LALVNAYRLIDASGVRDLTRSHLMEILDDAVFASAAGELIDVEFSLTADVPSVDEILRMERLKTAVYSFE

      220      *      240      *      260      *      280
Cmm Q APLQAGAVLAGASPAIVSALGDFGRDIGIAYQVVDV LGVFGDEQETGKTNLGD LREGKRTVLI AHAVRS Q 280
Cms Q APLQAGAVLAGARPEVVAALGDFDRDIGIAYQVVDV LGVFGDEQETGKTNLGD LREGKRTVLI AHAVRS Q 280
      APLQAGAVLAGA P V ALGDF RDIGIAYQVVDV LGVFGDEQETGKTNLGD LREGKRTVLI AHAVRS

      *      300      *      320      *      340      *
Cmm Q SEWGEISALVGKDDL SRGEAALVRSVLESSGARAYAEGVARDLAVAAVARLDDPVVPEALRRELAPVAES Q 350
Cms Q SEWGEISALVGKDDL SRGEAALVRSVLESSGARAYAEGVARDLAVAAVARLDDPVVPEALRRELAPVAES Q 350
      SEWGEISALVGKDDL SRGEAALVRSVLESSGARAYAEGVARDLAVAAVARLDDPVVPEALRRELAPVAES

Cmm Q VLGRIR Q 356
Cms Q VLGRIR Q 356
      VLGRIR

```

CrtBI:

Cmm	Q	MTRRLPGRPPAAP	*	20	*	40	*	60	*	DVRQHIENVYALV	Q	70
Cms	Q	MTRRLPGRPPAAP	*	20	*	40	*	60	*	DVRQHIENVYALV	Q	70
		MTRRLPGRPPAAP								DVRQHIENVYALV		
Cmm	Q	DGAAAGAGVDP	*	80	*	100	*	120	*	140	Q	140
Cms	Q	DGAAAGAGVDP	*	80	*	100	*	120	*	140	Q	140
		DGAAAGAGVDP										
Cmm	Q	EHTPASFT	*	160	*	180	*	200	*	Q	210	
Cms	Q	EHTPASFT	*	160	*	180	*	200	*	Q	210	
		EHTPASFT										
Cmm	Q	YFPGVDVAT	*	220	*	240	*	260	*	280	Q	280
Cms	Q	YFPGVDVAT	*	220	*	240	*	260	*	280	Q	280
		YFPGVDVAT										
Cmm	Q	VRVPDPVK	*	300	*	320	*	340	*	Q	350	
Cms	Q	VRVPDPVK	*	300	*	320	*	340	*	Q	350	
		VRVPDPVK										
Cmm	Q	TAPT	*	360	*	380	*	400	*	420	Q	420
Cms	Q	TAPT	*	360	*	380	*	400	*	420	Q	420
		TAPT										
Cmm	Q	LGTSAAEQ	*	440	*	460	*	480	*	Q	490	
Cms	Q	LGTSAAEQ	*	440	*	460	*	480	*	Q	490	
		LGTSAAEQ										
Cmm	Q	LYTTF	*	500	*	520	*	540	*	560	Q	560
Cms	Q	LYTTF	*	500	*	520	*	540	*	560	Q	560
		LYTTF										
Cmm	Q	HLDLEDG	*	580	*	600	*	620	*	Q	630	
Cms	Q	HLDLEDG	*	580	*	600	*	620	*	Q	630	
		HLDLEDG										
Cmm	Q	DVVVSTAD	*	640	*	660	*	680	*	700	Q	700
Cms	Q	DVVVSTAD	*	640	*	660	*	680	*	700	Q	700
		DVVVSTAD										
Cmm	Q	FPPKGG	*	720	*	740	*	760	*	Q	770	
Cms	Q	FPPKGG	*	720	*	740	*	760	*	Q	770	
		FPPKGG										
Cmm	Q	QISDWAG	*	780	*	800	*	820	*	840	Q	840
Cms	Q	QISDWAG	*	780	*	800	*	820	*	840	Q	840
		QISDWAG										
Cmm	Q	PGIGLPM	*	860	*	880				Q	881	
Cms	Q	PGIGLPM	*	860	*	880				Q	881	
		PGIGLPM										

CrtYg:

```

      *           20           *           40           *           60           *
Cmm Q MGLVYLVLVLLGALGCMMLIDRRWRLFWRDRATAAGTLLIGVAFFLLWDIAGISQGIFFRGETSFMTGIL Q 70
Cms Q MRLVYLVLVLLGALGCMMLVDRRWRLFWRDRATAAGTLLIGVAFFLLWDIAGISQGIFFRGETPFMTGIL Q 70
      M LVYLVLVLLGALGCMML DRRWRLFWRDRATAAGTLLIGVAFFLLWDIAGISQGIFFRGET FMTGIL

      80           *           100           *
Cmm Q VGPELPLEEVFFL LLLCYLTMNLVNGFSRLADHHV RARERANR Q 114
Cms Q VGPELPLEEVFFL LLLCYLTMNLVNGFSRLADHHV RARERANR Q 114
      VGPELPLEEVFFL LLLCYLTMNLVNGFSRLADHHV RARERANR

```

CrtYh:

```

      *           20           *           40           *           60           *
Cmm Q MSYLVLDLLFLIPVAIVGFLFRRLLEREANAVPYGSSRFDYPEYWRMPV ILLVMTLIFDNIMIKVG Q 70
Cms Q MSYLVLDLLFLIPVAIVGFLFRRLLEREANAVPYGSSRFDYPEYWRMPV ILLVMTLIFDNIMIKVG Q 70
      MSYLVLDLLFLIPVA VGFLFRRLLEREANAVPYGSSRFDYPEYWRMPV ILLVMTLIFDNIMIKVG

      80           *           100           *           120
Cmm Q LVGYDDDKLVGLLILGYAPIEDFAYATAALVLLPAVWYLLRRRVS VSGIEAHE Q 122
Cms Q LVGYDEDKLVGLLILGYAPIEDFAYATAALVLLPAVWYLLRRRVS VSGIEAHE Q 122
      LVGYD DKLVGLLILGYAPIEDFAYATAALVLLPAVWYLLRRRVS VSGIEAHE

```

CrtEb:

```

      *           20           *           40           *           60           *
Cmm Q MSDVRARPGAAEMLRTIALSSRPLSWVNTAFPFAAYLTVTRELDLTA I LGTLYFLIPYNLAMYGINDVF Q 70
Cms Q MSDVRARPGAAEMLRTIALSSRPLSWVNTAFPFAAYLTVTRELDLTA I LGTLYFLIPYNLAMYGINDVF Q 70
      MSDVRARPGAAEMLRT IALSSRPLSWVNTAFPFAAYLTVTRELDLTA I LGTLYFLIPYNLAMYGINDVF

      80           *           100           *           120           *           140
Cmm Q DYESDMRNPRKGGVEGAVLARAMHRPVLAVLV TNVPFLVYLVA VGSAA S IAVLAVSVFAVIAYS LKGLR Q 140
Cms Q DYESDMRNPRKGGVEGAVLARAMHRPVLAVLV TNVPFLVYLVA VGSAA S IAVLAVSVFAVIAYS LKGLR Q 140
      DYESDMRNPRKGGVEGAVLARAMHRPVL AVLV TNVPFLVYLVA VGSAA S IAVLAVSVFAVIAYS LKGLR

      *           160           *           180           *           200           *
Cmm Q FKERP I LDSLTSSTHFTSPAVYGI VLAGGAFTPALWAILA AFFLWGVASHAFGAVQDIVADREGGISSIA Q 210
Cms Q FKERP I LDSLTSSTHFTSPAVYGI VLAGGAFTPALWAILA AFFLWGVASHAFGAVQDIVADREGGISSIA Q 210
      FKERP I LDSLTSSTHFTSPAVYGI VLAGGAFTPALWAILA AFFLWGVASHAFGAVQDIVADREGGISSIA

      220           *           240           *           260           *           280
Cmm Q TVLGGAVTVRIA VLA YAAAGVAMLF TGLPGI IAAVLVIPYILSTAPFWSIRDEDA EQ ANRGWRRFLGLNF Q 280
Cms Q TVLGGAVTVRIA VLA YAAAGVAMLF TGLPGI IAAVLVIPYILSTAPFWSIRDEDA EQ ANRGWRRFLGLNF Q 280
      TVLGGAVTVRIA VLA YAAAGVAMLF TGLPGI IAAVLVIPYILSTAPFWSIRDEDA EQ ANRGWRRFLGLNF

      *
Cmm Q LSGFVVTMLLLIAYWLTNA Q 298
Cms Q LSGFVVTMLLLIAYWLTNA Q 298
      LSGFVVTMLLLIAYWLTNA

```

OrfG:

```

      *           20           *           40           *           60           *
Cmm Q MLQVVGRGREHPAVLVDDDRLCVRHGGGRSLVCARSAHDGRTPRDPQEPMSPPIRLLHQTVRPFVAAGLR Q 70
Cms Q MLQVITGRGREHPAVLVDDDRLCVRHGGARRGSGARSAHHGRTPLDPQEPMSPPIRLLHQTVRPFVAAGLR Q 70
      MLQV GRGREHPAVLVDDDRLCVRHGG R ARSAH GRTP DPQEPMSPPIRLLHQTVRPFVAAGLR

      80           *           100           *           120           *           140
Cmm Q GGLPTPLTAAVPTDAPVGVVPGTDPDRLLALGGIGGSGVGLRTHAEGVAAQSAKALAAITGRGVEWRTVP Q 140
Cms Q GGLPTPLTATVPTDAPVGVVPGTDPDRLLALGGIGGSGVGLRTHAEGVAAQSAKALAAITGRGVEWRTVP Q 140
      GG PTPLTA VPTDAPVGVVPG DPDR LALGGIGGSGVGLRTHAEGVAAQSAKALAAITGRGVEWRTVP

      *           160           *           180           *           200           *
Cmm Q LADQHLTATQEAVHQITELHRYDVVLVMPGVADALELARITPWVHRLEDLLDHLVEQTADNSVVLVSDVP Q 210
Cms Q LADQHLTATQEAVRQITELHRYDVVLVMPGVADALELARLTPWVHRLEDLLDHLVEQTADNSMVLVSDVP Q 210
      LADQH TATQEAV QITELHRYDVVLVMPGVADALELAR TPWVHRLEDLLDHLVEQTADNS VLVSDVP

      220           *           240           *           260           *           280
Cmm Q QVSQYVQAGTFVVRGLFRDHAMYSQRKAEVCARFPQVTSVKLPDAGPVDFEGGEFRYASMYRRWGEHVGR Q 280
Cms Q QVSQYVEAGAFVVRGLFRDHAMYSQRKAEVCARFPQVTSVKLPDAGPVDFEGGEFRYASMYRRWGEHVGR Q 280
      QVSQYV AG FVVRGLFRDHAMYS QRKAEVCARFPQVTSVKLPDAGPVDFEGGEFRYASMYRRWGEHVGR

      *
Cmm Q VIADLQAGRAGA Q 292
Cms Q VIADLQAERGA Q 292
      VIADLQA R GA

```

4.2 Alignments der Proteine unbekannter Funktion von *Xylella fastidiosa* (TM382β 324-50 und TM382β 370-45)

Die Graustufen in den folgenden Protein-Alignments geben die Übereinstimmung in den einzelnen Aminosäuren wieder. Es werden nur identische AS berücksichtigt, keine konservativen Austausche. Übereinstimmung: schwarz: 100%; dunkelgrau: $\geq 80\%$; hellgrau: $\geq 60\%$.

ORF A:

			*	20	*	40	*	60	*		
C_michig	Q	-----								MR	Q 2
X_fast_053	Q	-----									Q -
T_fusca	Q	MARPLRTPPRPRHRRPGPALRQRERRGQHRHGELPRRRPVLAASHGLTADPWTTASLRAGEAVPFPRFV									Q 70
X_fast_Dix	Q	-----									Q -
X_axonop	Q	-----									Q -
O_iheyen	Q	-----									Q -
B_subtil	Q	-----									Q -
X_fast_143	Q	-----									Q -
			80	*	100	*	120	*	140		
C_michig	Q	KLPISRVRPRASSSQGRRSVRVLTMIAAATASVAAGGVIQGGALSAAPALAAATPDVSAVSAASLGS-RA									Q 71
X_fast_053	Q	-----									Q 57
T_fusca	Q	PAQPAKITKRSHLNTESVACFGDMNRSIMYAFSLASLTLVAAGIAPASAVEPSPHPVPLDP-APEVVHQSA									Q 139
X_fast_Dix	Q	-----									Q 39
X_axonop	Q	-----									Q 43
O_iheyen	Q	-----									Q 36
B_subtil	Q	-----									Q 54
X_fast_143	Q	-----									Q 40
			160	*	180	*	200	*			
C_michig	Q	FSDEEMTSTSDYWTVDRLQRAIP-----							DDG		SASVVGASDAGSGVVHS Q 114
X_fast_053	Q	FSDQEEAEARRYWTPERTASAIP-----									LDSEQDSSVEKSAKEYFRENKIN Q 103
T_fusca	Q	TTPEQQRVAAYWTPDRMAAALPLPSALDDL PVS-----									LSSLGRRASDTDTDTDTTSLSDSSVRR Q 203
X_fast_Dix	Q	YSEQQRATLNYWTDERTLEKTLA-----									QNQAQNLGFNDLL--MYEPNRVD Q 83
X_axonop	Q	VPTAQRDESASYWTLGRMQAAVVSALFVDANPVDGDPPELQNSALAHGKNRSGKLLKLVTRSVPTPKTVPSV									Q 113
O_iheyen	Q	TKYQMFDNSEEWTKEMENAI PMDKHFDATE SKS----									LTNSEEANKIQTSEKSYNTEPASPKNYNNALD Q 102
B_subtil	Q	QTSKADQVSAPYEGTGKTSKSLYG-----									GQTELEKNIQTLPSSIIGTDERTRI Q 104
X_fast_143	Q	ISQEEQNAALEYWTPEEMAATQA-----									MQAQAIKMINDDPGDISSEKHS Q 86
			220	*	240	*	260	*	280		
C_michig	Q	VSGSITATAWVGKIAFR--GGLDRLCSASAVHSDSGYLVA									TAGHCLLND--QTATGVTFVFGWDGKNM Q 180
X_fast_053	Q	NQGSYEAVYWGRIYFDA--GGRQYSCIGASIESNSKSI									VATAAHCLYKGG--EWSTRVVFIPAWDGVNK Q 169
T_fusca	Q	WTGGGLVAATTGRVYLT--DGVDYTCIASVINAQNRDT									VLTAGHCLKNKTG-SWAENWIFVEGYADGRA Q 270
X_fast_Dix	Q	PAG-DTEMMSTGWL FYKL--NGHDSFCIANAVKSA									TSVIAAHC SKVPA--TKAGRDFIEHLVLAHF Q 148
X_axonop	Q	PVPGFSPAHLGVVFFRA--NGIDQRCIGNAVVS									DSGNVVAATSCRCVSALAG-KFVSDLVFEAYN-GTA Q 179
O_iheyen	Q	FSPNAVVPSTTGKLFYFNPNDCNNYVCSASAVNN									PNKNLVSTAGHCMHEGSGGDFYTNIVFEAYYEGNA Q 172
B_subtil	Q	SSTTSFPYRATVQLS IKYPNTSSTYGCIGFLVNP									N---TVVTAGHCVVSQDH-GWASTITAAERGRNGSSY Q 170
X_fast_143	Q	TPA-ATEILTAGLLFRV--NGEDSSCLANVVAAT									KSVVAATAGHCVQSPA--NEP-HERIDHLVFLVNY Q 150
			300	*	320	*	340	*			
C_michig	Q	PYGTWIAKFYS---VTPWRVRADDSHIVGFIK									VQPIG----SKSLADTVSALRVNFSLAKPQLHYFS Q 241
X_fast_053	Q	PLLTWGAIIYQ---VPRVWRYEEDRGHDAAFIK									FRPLNDWYGKKEYLADKAGAQTSPFSLGKSGLHYQA Q 235
T_fusca	Q	PYGRYTARDML---VSPKWSRQGDDSYDFGFV									VVLNTDLR---GRHVADRTGAQKVSFS-GRIAPYVHA Q 331
X_fast_Dix	Q	RNGVMAGRFPVRNIFTVAGWDAREEGGDF									FAFLTVAHNE---HGSRVGDVLMESPIRFSPPLLGNFYM Q 214
X_axonop	Q	PYGVWPAATIT---ADDRVVSERAVDYTAFF									QVQAPMTMKLSCATLNTV GASGVREDGQDDNEYRV Q 245
O_iheyen	Q	PYGRNVNWKV---TFRGWTDNNGYDYDAFL									TLVFQND---GRNLNVVGGNGLSNYSQNQSDVRV Q 233
B_subtil	Q	PYGTYSGTMFY---SVKGTWESKDTNYDGA									IKLNGSP----GNTVG--WYGYRTNNSSPVGLSSSV Q 229
X_fast_143	Q	NHCRMDGRFPVRNIYTVNGWSQQGIDGDF									FAFLSVAHNN---YCSRPGDLVIQTPIRFAPPTQGIFSL Q 216
			360	*	380	*	400	*	420		
C_michig	Q	LAYGNIGGGFQAKPLSTCVG---PAYRLHDEQ---									SLAMIGCKAVGCMSSGGFPVYHASTEPRGTQVGI Q 304
X_fast_053	Q	FCYKNLSG-FNNTPLFTQEGGRHFWGISKYP---									ELEIPGCTVPGSSGGFPVYHASEKGPNGTQVGI Q 300
T_fusca	Q	FCYFPSSPP-YSGRHLYCAGATHADRQGTLSG---									GMDCAMTQSSSGGFPWFADFDTTTGTGTITSL Q 393
X_fast_Dix	Q	YGYPGDIQ--GGQVLYKSTDPHLEHPKPPG-PT									LRIGFRCKNFSGCTSGGFPVLQTLDPG--TYQTGNV Q 279
X_axonop	Q	TGYNTDPGANGNTPVSVTSTAEPNPMNKDYA---									IEGLEWDARSVSGSFPVSTDEDPVQDVEIGMT Q 310
O_iheyen	Q	TGYPAADP-YPGDI PYSYGDTSKRFLSNDQ---									ISCGFTGCSGGAWFRMTMSENLGQIFAVT Q 294
B_subtil	Q	TGFP-----CDKTFGTMSDTKPIRSAETYK---									LYTDTDYGCQSGSFPVRYNSDTGQTAIAIHT Q 287
X_fast_143	Q	YGYPNAID--EGEHLVKCS-ERAVFYDPHGGG									PRVRSLPYCRNFSECSGGFPALQNLDPG--TYQTGNV Q 281
			g y								g SGgp

```

C_michig Q GRNVETAYG-DAIAFTP-FGKAELSTYKTVDSFTK- Q 337
X_fast_053 Q TEQRKAKDGTPLLIIFVP-WGSIEYNLYKTVDDFGR- Q 334
T_fusca Q TSFKYTDNA--AVQYGPRLGDEARRVYEAQIL--- Q 424
X_fast_Dix Q KGYIERGNA---VAFTY-WEAAAHGAWDRAQRDQ-- Q 309
X_axonop Q SFAYKQFTH---ASFGPQWTSAIRNLYQTAAASN-- Q 341
O_iheyen Q SRRSDPRGT----LYARPFTSDYRDLFEGMEDR--- Q 323
B_subtil Q NGGSSYNLG-----TRVTNDVFNNIQYWANQ Q 313
X_fast_143 Q EGYVDRVGA---ATFTY-WEAAAHGAWDRAQHDQ-- Q 311
    
```

ORF B:

```

C_michig Q -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*----- Q -
X_axonop Q -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*----- Q -
X_fast_143 Q -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*----- Q -
X_fast_Dix Q -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*----- Q -
S_avermi Q -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*----- Q -
T_fusca Q MARPLRTPPRPRHRRPGPALRQRERRGQHRHGELPRRRPVLAASHGLTADPWTTASLRAGEAVPFPRFV Q 70
O_iheyen Q -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*----- Q -
X_fast_053 Q -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*----- Q -

C_michig Q -----80-----*-----100-----*-----120-----*-----140----- Q 47
X_axonop Q -----80-----*-----100-----*-----120-----*-----140----- Q 47
X_fast_143 Q -----80-----*-----100-----*-----120-----*-----140----- Q 44
X_fast_Dix Q -----80-----*-----100-----*-----120-----*-----140----- Q 43
S_avermi Q -----80-----*-----100-----*-----120-----*-----140----- Q 30
T_fusca Q PAQPAKITKRSHLNTESVACFGDMNRSIMYAFSLASLTLVAAGIAPASAVEPSPHPVPLDPAPEVVHQSAAT Q 140
O_iheyen Q -----80-----*-----100-----*-----120-----*-----140----- Q 44
X_fast_053 Q -----80-----*-----100-----*-----120-----*-----140----- Q 49

C_michig Q E-----*-----160-----*-----180-----*-----200-----*----- Q 100
X_axonop Q E-----*-----160-----*-----180-----*-----200-----*----- Q 104
X_fast_143 Q E-----*-----160-----*-----180-----*-----200-----*----- Q 78
X_fast_Dix Q E-----*-----160-----*-----180-----*-----200-----*----- Q 75
S_avermi Q P-----*-----160-----*-----180-----*-----200-----*----- Q 63
T_fusca Q TPE-----*-----160-----*-----180-----*-----200-----*----- Q 194
O_iheyen Q S-----*-----160-----*-----180-----*-----200-----*----- Q 93
X_fast_053 Q DDVGGGINFSDQEAEEARRYWTPERIASAIPLDSEQDSSVEKSAKEYFR-----*----- Q 98
                                ywt r

C_michig Q ASPHVSETTPVPGFTANDHLGVVFFRSGCID--QRCTGNVVVSDSGNLVATAGRCVSAIKDAF---VTD Q 164
X_axonop Q PTPKTVPSVPVPGFSPAHLGVVFFRANCID--QRCTGNVVVSDSGNVVATSGRCVSALAGKF---VSD Q 168
X_fast_143 Q --ISESKHISTPAATEILTAGLLFFRVNGED--SSCTANVVQAATKSVVATAGHCVQSPANEP-HERIDH Q 143
X_fast_Dix Q --MYEPNRVDPAGDTEMMSTGWLFFYKLNCHD--SFCITANAVKSAKSVIATAAHCSKVPAKAGRDIHIEH Q 141
S_avermi Q -----*-----220-----*-----240-----*-----260-----*-----280----- Q 120
T_fusca Q SLSDSSVRRWTGGGLVAATTGRVYLTLDVCD--YTCTASVINAQNRDTVLTAGHCLKNKTGSW---AEN Q 258
O_iheyen Q SPKYNNALDFSPNAVVPSTTGKLLFFYNPNNGNYYVCSASAVNNPNKNLVSATAGHCMHEGSGGD---FYTN Q 160
X_fast_053 Q ----ENKINNQGSYEAVYWIIGRIYFDAGGRQ--YSCIGASIESNSKSIVATAAHCLYEKGEWS---TR Q 157
                                G f g Ct v v Ta hc

C_michig Q LVFVPEQD-GTAPKGIWPATAVTVQSQWVWTRQVDFDTAFFQVKAPVG-AAAGTTLSSNVGASGVRFDAGQ Q 232
X_axonop Q LVFVPEAN-GTAPYGVWPAATITADDRVVSERAVDYDTAFFQVQAPMTMKLSGATLSNVTGASGVRFDGQ Q 237
X_fast_143 Q LVFLLNIN-HGRWDGRFPVRNIYTVNGWSQQGIDGDFDAFLSVAHNNY----GSRPGDLVIQTPIRFAPAP Q 208
X_fast_Dix Q LVFLAHR-NGVWACRFVVRNIYFTVAGMDAREEGGFDAFLTVAHNEH----GSRVGDLMESPIRESPP Q 206
S_avermi Q --FVPGVRDQAPYGVWQVTKTYVGDAMSGGQDEDSVFAVAVEDLGG----LEVEDLVGNFVVTGQA Q 183
T_fusca Q WIFVPGVADGRAPYCRYTARDMLVSPKMSRQGDSDYDFCFVVLNTDLR----GRHVADRTCAQKVSFSG- Q 323
O_iheyen Q IVFVPEAYEGNAPYGRWNVNWKVTFRGTWTDNGNYDYDQAFELTVFQNDG----RNLVNVVCGNGLSFNYS Q 225
X_fast_053 Q VVFIIPAWDGVNKPLLTWGAIYYQVPRVWRYEEDRGHDAAFIKFRPLNDWYGKKEYLADKCAQTPSESLG Q 227
                                v f p y p g W D a f v vg f
    
```

```

          360          *          380          *          400          *          420
C_michig Q EDDDDYRSTGYA--LDGGHDGTPKISVVESSVEPNPWMN-KDYAIEGIEIETDLRAGISGSPWVNTDDD-SD Q 298
X_axonop Q QDDNEYRVTYGYN--TDPGANGNTPVSVTSTAEPNPWMN-KDYAIEGLEWDARSGVSGSPWVSTDEDVPQD Q 304
X_fast_143 Q PTQGFISLYGYPNAIDEGEHLVKCS-ERAVFYDPDPHGGGPRVRSPLYCRNFSEGASGGPALQNLDP--GT Q 275
X_fast_Dix Q PLLGNFYMYGYPGDIQGGQVLYKCS TDHPLEHPKPPP-PTLRIGFRCKNFSGGTSGGPFVLQTLPD--GT Q 273
S_avermi Q TGATAVTVTYGPKSLDVPITCTNKPTVHSRTQQR-----IECPAFPGGTSGSPWVNGDGAVVGV Q 242
T_fusca Q RIAPYVHAFGYSSPPYSGRHLYYCAGATHADRQGTLG-----SGMDCAMTQSSSGGPFWADFDTTGT Q 387
O_iheyen Q QNQSDVRVTGYPAADPYPGDIPYSCYGDTSKRFLSNDA-----QISCGFTGASGGAWFRMSS--EN Q 286
X_fast_053 Q KSLGHYQAFGYKNLSGFNNTPLFTCQGEGRHFWGISKY---PELEIPGCTVPGSSSGGPFVYHASEKGPNG Q 294
          GY          G SG p
    
```

```

          *          440          *          460
C_michig Q IQRG-MTTFAYHQFTHAAFQPWTATLHATYRAAAAA-- Q 334
X_axonop Q VEVG-MTSFAYKQFTHASFQPWTSAIRNLYQTAASN- Q 341
X_fast_143 Q YQTG-NVEGY-VDRVGAATFT-YWEAAAHGAWDRAQHDQ- Q 311
X_fast_Dix Q YQTG-NVKGY-IERGNAVAFT-YWEAAAHGAWDRAQRDQ- Q 309
S_avermi Q IGGY-EEGGS-TDD---VSYSVVLGDEAAALYRAAAN--- Q 274
T_fusca Q GTITSLTSFK-YTDNAAVQYGPRLGDEARRVYEAQIL-- Q 424
O_iheyen Q LGQIFAVTSR-RSDPRGTLYARPFTSDYRDLFEGMEDR-- Q 323
X_fast_053 Q TQVGVITEQRKAKDGTPLLI FVPPWGSIEYNLYKTVDDFGR Q 334
          a
    
```

ORF C:

```

          *          20          *          40          *          60          *
X_fast_Dix Q -----MAQFQINR--FYFGNAVVFLLV Q 21
X_fast_143 Q -----MSQFQKNR--FYFGNTVVVFLLV Q 21
C_michig Q -----MRVHTHAKPILSVRDLGDQMKKI Q 23
X_fast_053 Q -----MRIKLNK--LSLGLLGIFSMTL Q 21
T_fusca Q MARPLRTPPRPRHRRPGPALRQRERRGQHRHGLPRRRPVLAASHGLTADPWTTASLRAGEAVPFRFV Q 70
O_iheyen Q -----MSRKNLLSVFIAPITFLIITPSV Q 23
X_axonop Q -----MTYMPKITFLRASCALAFVLVITDVP Q 26
B_subtil Q -----MKLVPRFRKQWFAYLTVLCLALAA Q 24
          m
    
```

```

          80          *          100          *          120          *          140
X_fast_Dix Q LLSLGVQATPSD-----EVRVK-----SY Q 40
X_fast_143 Q LLSLGAQAKPSDN-----EVVVQ-----SI Q 41
C_michig Q YPKRRHAASMAALSVGIGLVLCGPHDIGGESARAASSAG-----PASCASDTGMSV Q 76
X_fast_053 Q YPQLSIAKSQEDQ-----VPFKNRM TGSHVLSEDDVG-----SGINF Q 58
T_fusca Q PAQPAKITKRSHLNTESVACFGDMNRSIMYAFSLASLTLVAAGIAPASAVEPSPHPVPLDPAPEVVHQSAAT Q 140
O_iheyen Q MANEAEI ISEQED-----T Q 37
X_axonop Q ASTNSVNLSAGTIVQH-----VV Q 44
B_subtil Q AVSFGVPAKAAENPQTS-----VS Q 43
    
```

```

          *          160          *          180          *          200          *
X_fast_Dix Q SEQEQRATLNYWTDERIEKTLAQN-----QAQNLG----FNDDL--MYEPNRVDP Q 84
X_fast_143 Q SQEEQNAALEYWTPERMAATQAMQ-----AQAIKM----INDDPGDISESKHIST Q 87
C_michig Q SDADAAESENWYTPDKIAA AVPAD-----GVTVTP----QKQSP--SLGASAVTS Q 120
X_fast_053 Q SDQEAEEARRYWTPERIA SAIPLD-----SEQDSS----VEKSAKEYFRENKIN Q 104
T_fusca Q TPEQQRVAAYWTPDRMAAALPLPSALDDL PVSLSLGGR--ASD TD T-----TD TDTLSLSDSSVRRW Q 204
O_iheyen Q KYQMF DNSEYWTKEKMENAI PMDKHF DATESKSLTNSE EANKIQTSEK S----YNTEPASPKYNNALDF Q 103
X_axonop Q PTAQRDESAS YWTLGRMQAAVSALFVDANPVGDPP ELQNSALAHGKNRSGK LKLVTRSVPTPKTVPSVP Q 114
B_subtil Q NTGKEADATKNQTSKADQVSAPYEG-----TGKTSKSLYGGQTELEKNIQTLQPSSIIGT Q 98
          ywT
    
```

```

          220          *          240          *          260          *          280
X_fast_Dix Q -AGDTEMMSTGWL FYK--LNGHDSFCTANAVKSA---TKSVIATAAHCSKVP--ATKAGRDHIEHLVFL Q 145
X_fast_143 Q -PAATEILTACLLFFR--VNGEDSSCTANVVQAA---TKSVVATAGHC VQSP--ANEP-HERIDHLVFL Q 147
C_michig Q --VFEPVYWIGRLYYT--AGGIDYACTASSIKSD---SKLVVATAGHC LYHK--GEFS-----TNLRFI Q 175
X_fast_053 Q QGSYEA VYWIGRIYFD--AGGRQYSC TGASIESN---SKSIVATAAHCLYEK--GEWS-----TRVVF I Q 161
T_fusca Q TGGGLVAATTGRVYLT--LDGVDYCTASVINAQ---NRDVTLTAGHCLKNKT--GSA-----ENWIFV Q 262
O_iheyen Q SPNAVVPSTTCKLFFYNPNDCNNYVCSASAVNNP---NKNLVSTAGHC MHEGSGCDFY----TNIVFV Q 164
X_axonop Q VPGFSPAHLGVVFFR--ANGIDQRCTGN AVVSD---SGNVVATSGRCVSALA-GKFV-----SDLV FV Q 172
B_subtil Q DERTRISSTTSFPYRATVQLS IKYPNLSSTY GCTGFLVNPNTVVTAGHC VVYSQDHGWAS-----TITAA Q 162
          g          g          ct          v TaghC          g          f
    
```



```

Pat Q AHVRVGD-----VQVGSVTESSDADLSIVRIEPLQ--TTRRSC-YPTSAC-IRCTLVNDYEPRA Q 157
ChpA Q AHVCVGD-----VQVGSVTESSPADLSIVRIEPLQ--TTRRSC-YPTSAC-MRCTLVKDDPEPT Q 155
PhpA Q AHVRVGD-----VQVGSVTEAPDIDLIVRIEPLQ--TTRRSC-YPTSAC-IRCTLVNDYEPRA Q 176
PhpB Q QKVRVGN-----TEVGVSVVSTDSDLALIRIEPTT--SRSQYC-YPTSAC-HRCEIVLTYEPRA Q 159
ChpD Q SVVSVGG-----RRVGVSVVDPAADLELVKIDPEI--HGQPIC-APTSSC-FHCSGTQTYEPRA Q 143
ChpB Q ADVYAGD-----TNVGKVLQSPDRDELVEVDPVV--SRSTHC-SGTPSCAPRCSIVQSYAPRA Q 191
ChpF Q APIHVGTE-----SILGDVWVQSAATDIELVRSVPRPDPSPLI-CVAHHPKNPVAVCSPFQTFTPRA Q 165
ChpG Q SPIYFAQ-----QDIGDVVVQSAASDIELVRSVPSRDNMTLH-CAGHS--TPATCSPIQTFTPRA Q 155
ChpC Q GERVFRNELESRHGHVPPIGIVYVRSDDVDLALIKIDPIV--HVSYTC-GSSSHCAPHCLPVTTWTPRA Q 158
ChpE Q TEPIEVR----TANGTDVEVGSVVALADPDDLALVRIEGSP--HGARTC-SATSC-HFICMPSTVVYEQRA Q 151
          G V w          Dl v p          C          g C          pra

```

```

Pat Q SCEVFGARNRSGQESSVQVAGTKVADREIFCTSCAITGILCNVVSAPPP--RGLEIGSH---QVVAETF Q 222
ChpA Q SCEVSAAWNRSQGESAVQVVGTEIRADLEIFCTSCAITGILCYVVSAPPP--RGLEVGS---QVVAETF Q 220
PhpA Q SCEVFGARNRSGQESSVPVAGTKVSEREIFCTSCINTGLMCNWSIPPL--RGTHRGPE---EVEAETF Q 241
PhpB Q VCEVFLGRNRSQGESIPITGTGIFSDREIYCTSCASTGINCSWTQTSPP--AGIHIGPH---QVTSRTS Q 224
ChpD Q VGRILMSTLRYSLQSTPVAGTGAFGDNEIFCTSCKSSGCSCEFTSTPW---LPRFDDQHRG-EVAVRGD Q 209
ChpB Q VKILLNLPFSNFERAVPIAGTGFENSTQSICTSCYVTVGVNCTFKLVTLF--PTEEAQARSRGQKVIKIRSG Q 259
ChpF Q ACQVFMARG--HVARLPVTGSGAADD--RFCTSCWSTGVQCIWHGVSI--PRTPLSYEHLVAGESGQ-- Q 229
ChpG Q NCQVFMAPPSPIVGRRAIAGTGFESATGTFTSCHVTGVIQDFQPTSLP--VGLRAYEHLAGQSAA-- Q 222
ChpC Q LPRVLTASLRMRSIYAQPVIQYDNEGLNEAFATSCSTTGVQVNWRLSVRAWPPGFRDPRSGDQAASSTT Q 228
ChpE Q FNRVFLPGFAPGHEITLPMTRQVFGPRETFTSCAVTRSLCEWSTSTNV---PPAWVQHHVY-AAARSTG Q 217
          g v          g p          fctSG tg c

```

```

Pat Q SAATRQGDSCGPPVSRD-MKIIICVICDGG-LPGSGDD--TYMSVLPISVLFREQPYVILATS- Q 280
ChpA Q SAATRQGDSCGPPVSRD-MKIIICVIGICGG-LPGSGDD--IYMRSLILSMRF----- Q 265
PhpA Q SAGVLPGDSCGPPVSRD-MKIIICIMRKRGNBGTAAE--TYMTYYPIDALFRREPYVVLATS- Q 299
PhpB Q GANTXPGDSCGPPVGTTRS-GTLYGCHSAGGGAINGQFA--DGESYVPIGVLLRERPTFALVTGR Q 284
ChpD Q TLIF-PGDSCGPPVSSPD-ARIYGHAGETSTGFSF-----TIMKYTRIIQEFEDAGTYALAPS- Q 264
ChpB Q SRGSESGDSCGPPVSSSES-GVLFGLHHGSA-DPTRFK---NVSITPISEFFREQPNVAIAPSS Q 317
ChpF Q LLNLDPGDSCGPPVSNYS-AELLGIISSV--LPRT-----TLMLYTPMSQVLSLHDLQLASGD Q 284
ChpG Q VGALRPGDSCGPPVSKD-RRLLGIIISGD--VPNT-----HFLVYTPMAQVLHELSSYKLABAN Q 277
ChpC Q DFLLP-GDSCGPPVFNPDGTMLYGLMTDQ--VPHRLTEQ--STMVYIKLSQFFHEQREYNLVTR- Q 286
ChpE Q ANLLK-GDSCGPPVVSRT-GDFYGLATDSG-LYDSDHSNIDIMGYTDAAARVLSDFRGMHMAPAS Q 277
          GDSGg v          Gi          p          y          y
          GDSGG          LPxTG

```

PaxAVQ put. Schnittstelle am Ende des Leader-Peptids

GDSGGQ konserviertes Motiv in Serinproteasen vom Trypsin-Typ

LPxTGQ put. Membran-/Zellwandanker ("Sortase-Motiv")

XQ "frame-shift"

XQ Stop-Codon

ChpA Q unterstrichene Proteinnamen: Nicht funktionsfähiges Protein. Die dargestellte Proteinsequenz ist künstlich um die Stopp-Codons und "frameshifts" zu Vergleichszwecken bereinigt. Das *in vivo* codierte Protein ist entsprechend kürzer.

4.4 PSI-BLAST-Ergebnisse für Rhs-Protein von TM382 β 371-23

Header of the page

BLASTP 2.2.5 [Nov-16-2002]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: 1043060132-018553-4451

Query= (2258 letters)

Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF 1,317,395 sequences; 421,811,953 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the BLAST FAQs

Results of PSI-Blast iteration 3

Hit list size

Sequences with E-value BETTER than threshold

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(bits)	Value
gi 23029979 gb ZP_00068264.1	hypothetical protein [Microbulbi...	483	e-134
gi 22988447 gb ZP_00033512.1	hypothetical protein [Burkholder...	432	e-119
gi 21399020 ref NP_655005.1	CBD_6, Cellulose binding domain ...	409	e-112
gi 16080974 ref NP_391802.1	cell wall-associated protein pre...	385	e-105
gi 16799530 ref NP_469798.1	similar to cell wall-associated ...	378	e-103
gi 23050831 gb ZP_00077673.1	hypothetical protein [Methanosar...	377	e-102
gi 1175007 sp P42018 WAPA_BACST	WALL-ASSOCIATED PROTEIN PRECURSO...	355	4e-96
gi 22988324 gb ZP_00033391.1	hypothetical protein [Burkholder...	347	1e-93
gi 23128179 gb ZP_00110033.1	hypothetical protein [Nostoc pun...	337	2e-90
gi 567056 gb AAA56755.1 	Rhs core protein with extension	331	7e-89
gi 15804134 ref NP_290173.1	rhsA protein in rhs element [Esc...	331	9e-89
gi 15834118 ref NP_312891.1	RhsH core protein with extension...	331	1e-88
gi 2920637 gb AAC32473.1	core protein [Escherichia coli]	330	1e-88
gi 16128676 ref NP_415229.1	rhsC protein in rhs element [Esc...	330	1e-88
gi 16759281 ref NP_454898.1	Rhs-family protein [Salmonella e...	330	2e-88
gi 16131354 ref NP_417939.1	rhsB protein in rhs element [Esc...	330	2e-88
gi 2822117 sp P16917 RHSB_ECOLI	RhsB protein precursor >gi 46661...	330	2e-88
gi 15800401 ref NP_286413.1	rhsC protein in rhs element, int...	329	3e-88
gi 15833724 ref NP_312497.1	rhsA core protein with extension...	329	4e-88
gi 16763674 ref NP_459289.1	putative RHS-family protein [Sal...	328	6e-88
gi 16131464 ref NP_418050.1	rhsA protein in rhs element [Esc...	328	6e-88
gi 15829983 ref NP_308756.1	RhsC core protein with extension...	327	2e-87
gi 15804530 ref NP_290570.1	Z5488 gene product [Escherichia ...	320	2e-85
gi 15130940 emb CAC48222.1	Rhs1 protein [Salmonella enteric...	319	3e-85
gi 16759284 ref NP_454901.1	Rhs-family protein [Salmonella e...	312	5e-83
gi 26990784 ref NP_746209.1	RHS family protein, putative [Ps...	309	3e-82
gi 23059684 gb ZP_00084633.1	hypothetical protein [Pseudomona...	308	7e-82
gi 21229607 ref NP_635524.1	RhsD protein [Xanthomonas campes...	307	2e-81
gi 15799917 ref NP_285929.1	Z0268 gene product [Escherichia ...	303	2e-80
gi 15829491 ref NP_308264.1	RhsG core protein with extension...	303	2e-80
gi 23053396 gb ZP_00079605.1	hypothetical protein [Geobacter ...	302	4e-80
gi 23062431 gb ZP_00087215.1	hypothetical protein [Pseudomona...	297	2e-78
gi 2920634 gb AAC32471.1	core protein [Escherichia coli]	296	2e-78
gi 21243262 ref NP_642844.1	RhsD protein [Xanthomonas axonop...	295	6e-78
gi 15800234 ref NP_286246.1	Z0651 gene product [Escherichia ...	295	7e-78
gi 15829814 ref NP_308587.1	RhsD core protein with extension...	293	3e-77

gi 16128481 ref NP_415030.1	rhsD protein in rhs element [Esc...	292	5e-77
gi 304941 gb AAA24544.1	core protein [Escherichia coli]	292	5e-77
gi 2920624 gb AAC32464.1	core protein [Escherichia coli]	291	7e-77
gi 2462100 emb CAA71849.1	wall-associated protein precursor...	290	2e-76
gi 15831315 ref NP_310088.1	RhsE core protein with extension...	289	4e-76
gi 23021123 gb ZP_00060809.1	hypothetical protein [Clostridiu...	289	4e-76
gi 17549358 ref NP_522698.1	PUTATIVE RHS-RELATED TRANSMEMBRA...	287	2e-75
gi 2920643 gb AAC32478.1	core protein [Escherichia coli]	287	2e-75
gi 22127307 ref NP_670730.1	rhsD protein [Yersinia pestis KI...	276	3e-72
gi 22978344 gb ZP_00024102.1	hypothetical protein [Ralstonia ...	276	3e-72
gi 3328161 gb AAC32486.1	RhsA [Streptomyces clavuligerus]	276	4e-72
gi 16121077 ref NP_404390.1	conserved hypothetical protein [...	263	2e-68
gi 21243971 ref NP_643553.1	RhsD protein [Xanthomonas axonop...	262	4e-68
gi 23022084 gb ZP_00061716.1	hypothetical protein [Clostridiu...	262	4e-68
gi 17549524 ref NP_522864.1	PUTATIVE RHS-RELATED PROTEIN [Ra...	262	6e-68
gi 21244948 ref NP_644530.1	glucan 1,4-beta-glucosidase [Xan...	260	2e-67
gi 26989827 ref NP_745252.1	rhs-related protein [Pseudomonas...	254	1e-65
gi 10956041 ref NP_052863.1	hypothetical protein [Coxiella b...	253	3e-65
gi 22959619 gb ZP_00007268.1	hypothetical protein [Rhodobacte...	251	1e-64
gi 2950328 emb CAA75841.1	hypothetical protein [Coxiella b...	249	3e-64
gi 23022712 gb ZP_00062244.1	hypothetical protein [Clostridiu...	249	3e-64
gi 17548306 ref NP_521646.1	PUTATIVE RHS-RELATED PROTEIN [Ra...	248	7e-64
gi 17548317 ref NP_521657.1	PUTATIVE RHS-RELATED PROTEIN [Ra...	246	2e-63
gi 15801684 ref NP_287702.1	unknown protein associated with ...	246	2e-63
gi 22990210 gb ZP_00035128.1	hypothetical protein [Burkholder...	245	8e-63
gi 17548307 ref NP_521647.1	PUTATIVE RHS-RELATED PROTEIN [Ra...	244	1e-62
gi 21233528 ref NP_639445.1	glucan 1,4-beta-glucosidase [Xan...	240	2e-61
gi 21223079 ref NP_628858.1	putative Rhs protein [Streptomyc...	239	6e-61
gi 23021913 gb ZP_00061559.1	hypothetical protein [Clostridiu...	236	4e-60
gi 20090892 ref NP_616967.1	hypothetical protein (multi-doma...	236	4e-60
gi 17548698 ref NP_522038.1	PUTATIVE RHS-RELATED TRANSMEMBRA...	235	5e-60
gi 23472801 gb ZP_00128123.1	hypothetical protein [Pseudomona...	230	2e-58
gi 17548697 ref NP_522037.1	PUTATIVE RHS-RELATED TRANSMEMBRA...	224	9e-57
gi 17547189 ref NP_520591.1	PROBABLE RHS-RELATED PROTEIN [Ra...	224	2e-56
gi 27497168 gb AAN64198.1	Rhs [Photorhabdus luminescens]	223	2e-56
gi 23471623 gb ZP_00126952.1	hypothetical protein [Pseudomona...	221	8e-56
gi 17548679 ref NP_522019.1	PROBABLE RHS-RELATED PROTEIN [Ra...	219	5e-55
gi 15597654 ref NP_251148.1	hypothetical protein [Pseudomona...	218	7e-55
gi 17549804 ref NP_523144.1	PUTATIVE RHS-RELATED TRANSMEMBRA...	216	3e-54
gi 15597880 ref NP_251374.1	conserved hypothetical protein [...	214	1e-53
gi 17548680 ref NP_522020.1	PUTATIVE RHS-RELATED PROTEIN [Ra...	212	5e-53
gi 23472764 gb ZP_00128086.1	hypothetical protein [Pseudomona...	211	8e-53
gi 23107707 gb ZP_00093972.1	hypothetical protein [Novosphing...	210	2e-52
gi 27366862 ref NP_762389.1	Predicted nucleotidyltransferase...	210	2e-52
gi 23022085 gb ZP_00061717.1	hypothetical protein [Clostridiu...	209	5e-52
gi 24216032 ref NP_713513.1	conserved hypothetical protein [...	209	6e-52
gi 22124175 ref NP_667598.1	Rhs-like core protein [Yersinia ...	208	7e-52
gi 16123757 ref NP_407070.1	putative membrane protein [Yersi...	208	9e-52
gi 15800280 ref NP_286292.1	Z0705 gene product [Escherichia ...	207	2e-51
gi 23021914 gb ZP_00061560.1	hypothetical protein [Clostridiu...	204	1e-50
gi 21231092 ref NP_637009.1	RhsD protein precursor [Xanthomo...	202	4e-50
gi 22971463 gb ZP_00018419.1	hypothetical protein [Chloroflex...	201	1e-49
gi 23062660 gb ZP_00087432.1	hypothetical protein [Pseudomona...	201	2e-49
gi 21243803 ref NP_643385.1	glucan 1,4-beta-glucosidase [Xan...	199	4e-49
gi 23022061 gb ZP_00061695.1	hypothetical protein [Clostridiu...	197	2e-48
gi 23021222 gb ZP_00060906.1	hypothetical protein [Clostridiu...	196	3e-48
gi 15829859 ref NP_308632.1	Rhs core protein with extension ...	191	2e-46
gi 24111710 ref NP_706220.1	Rhs-family protein [Shigella fle...	190	2e-46
gi 21232323 ref NP_638240.1	glucan 1,4-beta-glucosidase [Xan...	189	3e-46
gi 15837447 ref NP_298135.1	family 3 glycoside hydrolase [Xy...	187	2e-45
gi 16123750 ref NP_407063.1	putative exported protein [Yersi...	184	2e-44
gi 22124186 ref NP_667609.1	Rhs-like protein [Yersinia pesti...	184	2e-44
gi 1070029 emb CAA63679.1	orf 589 [Coxiella burnetii]	180	2e-43
gi 17548372 ref NP_521712.1	PUTATIVE RHS-RELATED PROTEIN [Ra...	180	2e-43
gi 23028360 gb ZP_00066765.1	hypothetical protein [Microbulbi...	102	5e-20
gi 16799530 ref NP_469798.1	similar to cell wall-associated ...	99	7e-19
gi 21399020 ref NP_655005.1	CBD_6, Cellulose binding domain ...	91	3e-16
gi 23021222 gb ZP_00060906.1	hypothetical protein [Clostridiu...	88	1e-15
gi 16080974 ref NP_391802.1	cell wall-associated protein pre...	86	1e-14

5 In den Tabellen der BLAST-Ergebnisse verwendete Abkürzungen der Organismennamen

<i>A. mediolanus</i>	<i>Agromyces mediolanus</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>B. anthracis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>B. flavum</i>	<i>Brevibacterium flavum</i>
<i>B. linens</i>	<i>Brevibacterium linens</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<i>C. hutchinsonii</i>	<i>Cytophaga hutchinsonii</i>
<i>C. septicum</i>	<i>Clostridium septicum</i>
<i>C. unshiu</i>	<i>Citrus unshiu</i>
<i>F. solani</i>	<i>Fusarium solani</i>
<i>F. oxosporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	<i>Fusarium oxosporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
<i>L. esculentum</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>L. innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>M. degradans</i>	<i>Microbulbifer degradans</i>
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. loti</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>O. iheyensis</i>	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>
<i>P. abyssi</i>	<i>Pyrococcus abyssi</i>
<i>P. alcaligenes</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
<i>P. furiosus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>P. multivida</i>	<i>Pasteurella multivida</i>
<i>R. metallidurans</i>	<i>Ralstonia metallidurans</i>
<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. antibioticus</i>	<i>Streptomyces antibioticus</i>
<i>S. avermitilis</i>	<i>Streptomyces avermitilis</i>
<i>S. clavuligerus</i>	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
<i>S. coelicolor</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>S. globisporus</i>	<i>Streptomyces globisporus</i>
<i>S. lincolnensis</i>	<i>Streptomyces lincolnensis</i>
<i>T. erythraeum</i>	<i>Trichodesmium erythraeum</i>
<i>T. fusca</i>	<i>Thermobifida fusca</i>
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
<i>X. fastidiosa</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>
<i>Y. pestis</i>	<i>Yersinia pestis</i>

6 Betreute Laborpraktika/Diplomarbeiten

Während dieser Arbeit betreute Laborpraktika und Diplomarbeiten, deren Ergebnisse in die Arbeit einfließen:

Laborpraktika

Melanie Mailänder (2001)

Birte Abt (2001)

Sandra Schott (2002)

Diplomarbeiten

Ines Gräfen (2000/2001)

Herstellung einer Cosmid-Genbank von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Analyse der *chp-1*-Genregion.

Julia F. Ludewig (2002) (in Kooperation mit Annette Burger):

Konstruktion eines Promotorprobevektors zur Analyse von Promotoren aus *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Birte Abt (2002/2003):

Etablierung eines Systems zur Komplementation von Transposonmutanten von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Danksagung

Mein Dank gebührt den Mitgliedern des Lehrstuhls für Gentechnologie/Mikrobiologie an der Universität Bielefeld für die freundliche Aufnahme und Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Für die Bereitstellung des Themas und das stete Interesse an meiner Arbeit möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Rudolf Eichenlaub bedanken.

Mein ganz spezieller Dank gilt Dr. Annette Burger und Dr. Karl-Heinz Gartemann für die kritischen und konstruktiven Anmerkungen zu dieser Arbeit, die Bereitschaft, wissenschaftliche Fragen und Probleme jederzeit engagiert erörtern zu können und ihre hilfreichen Tipps, Anregungen und Impulse im Laboralltag.

Mein Dank gilt ferner der Arbeitsgruppe "*Clavibacter*" für die angenehme Arbeitsatmosphäre, hier insbesondere Birte Abt, Jutta Engemann und Ines Gräfen, die lange Zeit das Labor mit mir geteilt haben, und nicht zuletzt Eva-Maria Zellermann für die vielen Klonierungen und Hybridisierungen sowie kleineren und größeren Gefallen bei den täglichen Experimenten.

Schließlich bin ich meiner Familie zu ganz besonderem Dank verpflichtet, die mich während meines Studiums und meiner Doktorarbeit immer unterstützt hat und auf deren Rückhalt ich mich stets verlassen konnte.

Erklärung

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

Bielefeld, im Juni 2003

.....
Oliver Kirchner

Lebenslauf

Persönliche Daten: Oliver Kirchner
Seidenstickerstr. 12
33609 Bielefeld
Tel.: 0521 - 89 47 82
oliver.kirchner@gmxpro.de

geboren am 03.01.1970 in Worms
ledig



Schulausbildung:

1976-1980 Besuch der Stephanus-Grundschule in Paderborn
1980-1989 Besuch des Pelizaeus-Gymnasiums in Paderborn
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

07/1989-09/1990 Ableistung des Zivildienstes beim Studentenwerk Paderborn AöR

Hochschulausbildung:

10/1990-09/1995 Studium der Biologie an der Universität Bielefeld
01/1998-05/1998 Diplomprüfungen
06/1998-06/1999 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik (Prof. Dr. A. Pühler) der Universität Bielefeld
Thema: „Hocheffizienter Elektrotransfer von Plasmiden nach *Corynebacterium glutamicum* und Entwicklung von Vektorsystemen zur funktionellen Genomanalyse“
Abschluss: Diplom, Note: „sehr gut“

09/1999-07/2003 Promotion am Lehrstuhl für Gentechnologie/Mikrobiologie (Prof. Dr. R. Eichenlaub) der Universität Bielefeld
Thema: „Etablierung genetischer Methoden für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Charakterisierung von Mutanten mit veränderter Morphologie, Physiologie und Virulenz“
Abschluss: Dr. rer. nat., Note „magna cum laude“