

Die extrazellulären Serinproteasen von
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* - Versuche zur
Reinigung, Aktivität und ihrer Funktion

Dissertation

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

vorgelegt von
Kerstin Mayer

März 2012

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:
Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft,
etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt
hat, wieder wegzuwerfen.

Albert Einstein, 14.03.1879-18.04.1955
Deutscher Physiker und Nobelpreisträger

•••• für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Einleitung	3
1. Das Tomatenpathogen <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	3
Cela und Pat-1- die bekannten Virulenzdeterminanten von <i>Cmm382</i>	6
Die chromosomale Pathogenitätsregion <i>chp/tomA</i> -Region	7
2. Proteasen – Klassifizierung und Funktion	9
3. Peptidasen von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	14
4. Funktionen von Peptidasen in der Pathogenese.....	17
5. Pathogen induzierte Pflanzenabwehr	20
Die inkompatible Interaktion	21
Die kompatible Interaktion	25
Zielsetzung	28
Material und Methoden	29
I Material	29
1. Bakterienstämme	29
2. Plasmide und Vektoren	30
3. Enzyme und Chemikalien	31
3.1 Enzyme	31
3.2 Restriktionsendonukleasen und dazugehörige Puffer	31
3.3 Chemikalien und Kits	32
3.4 Oligonukleotidprimer für PCR	33
3.4.1 Oligonukleotidprimer für <i>celA/pat-1</i> PCR	34
4. Nährmedien.....	35
4.1 Zusätze zu Nährmedien	36
4.1.1 Antibiotika	36
4.1.2 Zusätze zu Nährmedien	36
5. Puffer und Lösungen	37
5.1 Puffer und Lösungen zur DNA -Isolierung	37
5.2 Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese	37
5.3 Lösungen zur Behandlung von Agarosegelen für Southern Blot.....	38
5.4 Puffer und Lösungen für Southern Hybridisierungen	38
5.5 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden.....	39
5.5.1 Kompartimenttest	39

5.5.2	Reinigung Polyhistidin-getaggtter Proteine.....	39
5.5.3	Phenolextraktion	40
5.5.4	Dialyse des <i>E. coli</i> - und <i>Cmm382</i> -Kulturüberstandes und gereinigter rekombinanter Proteine	40
5.5.5	Dot-Blot-Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	41
5.5.6	Kopplung von Antikörpern an CnBr-aktivierte Sepharose	41
5.5.7	Immunpräzipitation.....	42
5.5.8	Puffer zum Ansetzen chromogener Substrate	42
5.6	Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	42
5.6.1	Puffer und Lösungen für MALDI kompatible-Silberfärbung von Acrylamidgelen	43
5.7	Lösungen für die 2-D-Gelelektrophorese	43
5.8	Lösungen für Westernblot.....	44
5.9	Lösung zur Konservierung von Zellen.....	45
6.	Geräte.....	45
7.	Pflanzensamen	45
8.	Software	45
II	Methoden.....	46
1.	Kultivierung von Bakterienstämmen.....	46
1.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	46
1.2	Kultivierung von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	46
1.3	Konservierung von Bakterienkulturen (Glycerinkultur)	46
1.4	Titerbestimmung von Bakterien in Flüssigkultur	47
2.	DNA -Isolierung.....	47
2.1	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	47
2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	47
2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit.....	47
2.2.2	HB-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA (Klonanalyse).....	48
3.	DNA -Reinigung und -Denaturierung.....	48
3.1	Sephadex-Behandlung.....	48
3.2	Reinigung von PCR-Produkten mit dem NucleoSpin Extract II Kit	49
3.3	Alkalische Denaturierung von Plasmid-DNA	49
4.	Techniken zur Charakterisierung von DNA-Molekülen	49
4.1	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	49
4.1.1	Hydrolyse von Plasmid-DNA.....	50
4.1.2	Hydrolyse von Gesamt-DNA	50

4.2	Agarosegelelektrophorese	50
4.3	Bestimmung des Molekulargewichts von DNA	51
4.4	Konzentrationsbestimmung von DNA mittels Nanodrop.....	52
5.	Klonierung von DNA-Fragmenten	53
5.1	DNA-Restriktionsfragmentisolierung aus Agarosegelen mit dem NucleoSpin Extrakt II Kit	53
5.2	5'-Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase	53
5.3	Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten.....	53
5.4	Shotgun-Klonierung.....	54
6.	DNA-Transfer	54
6.1	Transformation von <i>E. coli</i> nach der CaCl ₂ -Methode	54
6.1.1	Präparation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	54
6.1.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA.....	54
6.2	Elektroporation von <i>Escherichia coli</i>	55
6.2.1	Präparation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	55
6.2.2	Elektroporation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	55
6.3.	Elektroporation von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	56
6.3.1	Herstellung kompetenter <i>Cmm</i> -Zellen.....	56
6.3.2	Elektroporation kompetenter <i>Cmm</i> -Zellen mit Plasmid-DNA.....	56
7.	DNA-DNA-Hybridisierung	57
7.1	Markierung der Hybridisierungssonde.....	57
7.2	Überprüfung der Markierungsreaktion (Dot Blot).....	57
7.3	Transfer auf eine Membran.....	57
7.3.1	Transfer der DNA durch Passiv Blot	57
7.4	Prähybridisierung und Hybridisierung unter stringenten Bedingungen	58
7.5	Immunologische Nachweisreaktion unter stringenten Bedingungen.....	58
8.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	59
8.1	PCR mit Gesamt-DNA oder Plasmid-DNA als Template	59
8.2	PCR mit ganzen Zellen als Template-DNA	60
8.2.1	<i>celA/pat-1</i> -PCR zur Überprüfung des Plasmidstatus.....	61
8.2.2	Nachweis des <i>chpG</i> -Gens in der Komplementante	61
9.	Proteinbiochemische Methoden.....	62
9.1	Gewinnung von intrazellulären Proteinen mit der French Press	62
9.2	Methoden zur Gewinnung und Reinigung intrazellulärer rekombinanter Proteine	62
9.2.1	Anzucht und Induktion	62

9.2.2	Zellschnellaufschluss für SDS-PAGE.....	63
9.2.3	Ammoniumsulfat-Präzipitation von <i>E. coli</i> -Kulturüberständen	63
9.2.4	Kompartimenttest	64
9.2.5	Reinigung Polyhistidin-getaggtter Proteine mittels Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie	64
9.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	65
9.3.1	Silber-Färbung kompatibel mit PMF-Analysen.....	66
9.4	Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen.....	66
9.5	Westernblot.....	67
9.6	Ponceaufärbung und Immunologischer Nachweis.....	67
9.7	Proteinisolierung aus dem Kulturüberstand von <i>Cmm382</i>	68
9.7.1	Kultivierung von Bakterien	68
9.7.2	Konzentrierung des Überstandes (für Westernblot- Analysen).....	68
9.7.3	Konzentrierung des Überstandes (für Immunpräzipitation).....	69
9.7.4	Konzentrierung des Überstandes (für Enzymtests).....	69
9.7.5	Protein-Konzentrationsbestimmung.....	69
9.8	Enzymtest mit Azoprotein-Substraten (Azocasein/Azoalbumin).....	70
9.9	Enzymtest mit S2288	71
9.10	Berechnung der Enzymaktivität	71
9.11	Xylemsaftgewinnung aus Tomatenpflanzen (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	72
9.11.1	Proteingewinnung aus Xylemsaft für die 2-D Gelelektrophorese.....	73
9.11.2	Enzymtest des <i>Cmm</i> -Sekretom und dem Xylemsaft der Tomate als Substrat.....	73
9.12	2-D-Gelelektrophorese.....	73
9.13	Tryptischer Verdau	75
9.13.1	Tryptischer Verdau der Serinpeptidase ChpG	75
9.14	Proteinidentifizierung über MALDI-TOF-MS und MASCOT	76
10.	Herstellung polyklonaler Antikörper gegen ChpC, ChpG, Pat-1 und PpaC.....	76
10.1	Antigengewinnung und Erzeugung des polyklonalen Antikörpers	76
10.2	Analytische Dot-blot-Affinitätsreinigung von Antikörpern	77
10.3	Kopplung von Antikörpern an CNBr-aktivierte Sepharose 4B.....	77
10.4	Immunpräzipitation.....	77
11.	Analyse des Pathogenitätsverhaltens von <i>Cmm</i>	78
11.1	Wurzelinfektion	78
11.2	Ermittlung des Welkeindex und des Welkeverlaufs.....	78
11.3	Gewichts- und Größenbestimmung der Pflanzen	78
11.4	Kolonisationstest	79

11.5 Test zur Auslösung der hypersensitiven Reaktion (HR) bei <i>Mirabilis jalapa</i> (gelbblühend) und <i>Nicotiana benthamiana</i>	79
Kapitel I. Aktivitätsnachweis der extrazellulären Proteasen von Cmm382	81
Enzymaktivität der Proteasen aus verschiedenen Cmm-Kulturüberständen	83
Das Proteasesubstrat S2288.....	87
Diskussion.....	90
Kapitel II. Die putativen Serinproteasen ChpC, ChpG, Pat-1 und PpaC	93
Überexpression und Reinigung der Serinproteasen	93
Amplifizierung und Klonierung.....	94
Expressionsstamm und Genexpression.....	98
Konzentrierung der <i>E. coli</i> -Kulturüberstände zum Nachweis sekretierter Proteine.....	100
Intrazelluläre Expression der Serinpeptidasen in <i>E. coli</i>	101
Kompartimenttest	102
Reinigung durch Affinitätschromatographie.....	103
Expression und Reinigung der Serinpeptidasen.....	103
Expression unter osmotischen Stress.....	108
Reinigung der Serinpeptidasen unter denaturierenden Bedingungen	111
Expression der Serinpeptidasen im <i>E. coli</i> -Expressionsstamm <i>ArcticExpress</i>	113
Identifizierung der His-getaggten Proteine über Westernblot	117
Diskussion.....	118
Kapitel III. Aktivitätstests mit den rekombinanten Proteine ChpC, ChpG, Pat-1 und PpaC	120
Enzymassays mit Azocasein als chromogenem Substrat	120
Enzymassay mit Azoalbumin als chromogenem Substrat.....	123
Enzymassay mit dem chromogenen Substrat S2288	127
Diskussion.....	127
Kapitel IV. Immunpräzipitation der Serinpeptidasen aus dem Cmm-Kulturüberstand	131
Herstellung und Gewinnung der Antikörper	132
Funktionalität der Antikörper (Westernblot).....	133
Reinigung der Proteasen aus Cmm382-Kulturüberstand.....	134
Diskussion.....	138
Kapitel V. Das ChpG-Protein von Cmm NCPPB382	140
Komplementation der Mutante CMM101 <i>chpG</i> β.....	140
Untersuchung der hypersensitiven Reaktion auf der Nicht-Wirtspflanze <i>Mirabilis jalapa</i>	142
Auslösung der hypersensitiven Reaktion auf der Solanacee <i>Nicotiana benthamiana</i>	144
Diskussion.....	146

Kapitel VI. Die Subtilasen von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	149
Erzeugung von Mutanten durch Insertionsmutagenese im Chromosom von <i>Cmm382</i>	150
Konstruktion von Mutageneseplasmiden zur Inaktivierung der Gene <i>sbtA</i> , <i>sbtB</i> und <i>sbtC</i> von <i>Cmm382</i>	151
Die Inaktivierung des Gens <i>sbtA</i> durch Insertionsmutagenese.....	153
Inaktivierung des Gens <i>sbtB</i> durch Insertionsmutagenese.....	156
Inaktivierung des <i>sbtC</i> -Gens durch Insertionsmutagenese.....	157
Überprüfung des Plasmidstatus der Mutanten durch PCR.....	159
Phänotypische Analyse der Subtilase-Mutanten von <i>Cmm</i> im Pflanzentest.....	161
Die kompatible Interaktion mit <i>Solanum lycopersicum</i>	161
Phänotypische Analyse von CMM101 <i>sbtA</i>	162
Phänotypische Analyse von CMM101 <i>sbtB</i>	164
Die inkompatible Interaktion- die hypersensitive Reaktion (HR) bei <i>Mirabilis jalapa</i>	168
Diskussion.....	169
Fazit und Ausblick	173
Anhang	175
Abkürzungsverzeichnis.....	175
Plasmidkarten.....	177
Eichgeraden.....	186
Daten zur Enzymaktivität.....	189
Immunpräzipitation.....	199
Daten zum Pflanzentest mit den Subtilasen-Mutanten.....	199
Auslösung der HR auf <i>Mirabilis jalapa</i>	201
Auslösung der HR auf <i>Nicotiana benthamiana</i>	203
Proteinalignments.....	204
Literaturverzeichnis	215

Zusammenfassung

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* NCPPB382 verursacht bei der Wirtspflanze *Solanum lycopersicum* (Tomate) die bakterielle Welkekrankheit. Entscheidend für die Ausprägung der Welkesymptome ist neben den beiden plasmidkodierten Pathogenitätsfaktoren CelA (Cellulase; pCM1) und Pat-1 (Serinprotease; pCM2) die chromosomale *chp/tomA*- (*chromosomal homology of pat-1*) Region. Diese Region zeichnet sich durch das Vorkommen zahlreicher, wahrscheinlich extrazellulärer Proteasen aus, die aufgrund der konservierten Aminosäuren des katalytischen Zentrums den Serinpeptidasen zugeordnet werden. Sie werden aufgrund ihrer Sequenzverwandtschaft in die Chp-, die Ppa- und die Subtilase-Familie unterteilt. Über Sekretom-Analysen ist bereits gezeigt, dass es sich bei diesen Serinproteasen um extrazelluläre Proteine handelt. Da in Plattentests z. B. mit Casein keine proteolytische Aktivität von *Cmm* NCPPB382 gezeigt werden konnte, sollten die Peptidasen keine reine Ernährungsfunktion besitzen. Das Substrat für diese Proteasen, das wahrscheinlich im Xylem der Tomate vorkommt, war unbekannt.

In dieser Arbeit konnte im Sekretom von *Cmm* NCPPB382, mit Hilfe des chromogenen Substrats Azocasein, erstmals eine proteolytische Aktivität, die ein pH-Optimum von 6,0 aufwies, nachgewiesen werden. Die Deletionsmutante CMM101 β 30-18, die eine Deletion der *chp/tomA*-Region aufweist, zeigte eine um 74,63 % reduzierte Proteaseaktivität. Der Hauptanteil der proteolytischen Aktivität von NCPPB382 konnte somit den Serinproteasen, die von den Genen dieser Region kodiert werden, zugeordnet werden. Durch Anwendung eines für Serinproteasen spezifischen Substrates (S2288) konnte zusätzlich eine Arginin-spezifische Enzymaktivität identifiziert werden.

Zur Überprüfung, welche Serinproteasen der *chp*-Region für die proteolytische Aktivität zuständig sind, wurden einige in einem *E. coli*-Expressionssystem überexprimiert und biochemisch charakterisiert. Ausgewählt wurden, neben dem auf pCM2 lokalisierten *pat-1*, die Gene *chpC*, *chpG* und *ppaC*, da eine Beteiligung dieser Gene an der Bakterien-Pflanzen-Interaktion bereits gezeigt war. Für alle in dieser Arbeit untersuchten Serinproteasen konnte eine Proteaseaktivität nachgewiesen werden, die sich allerdings von den nativen Serinproteasen des *Cmm*-Sekretoms in Bezug auf Substratspezifität und des pH-Optimums

unterschieden. Dies kann vermutlich auf die heterologe Expression in einem *E. coli*-System, in dem die Proteine nicht sekretiert wurden und somit auf die fehlende Prozessierung und Ausbildung von Disulfidbrücken der cysteinreichen Serinproteasen zurückgeführt werden.

Bei der Nicht-Wirtspflanze *Mirabilis jalapa* löst *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* eine hypersensitive Reaktion (HR) aus, eine Abwehrreaktion der Pflanze, die die Ausbreitung eines Pathogens verhindert. Eine *chpG-Knock out*-Mutante führte dagegen nicht zu einer HR. Durch Infiltration des löslichen rekombinanten ChpG-Proteins in die Blätter der Nicht-Wirtspflanze konnte nachgewiesen werden, dass diese Serinprotease als alleiniger Elicitor der HR ausreicht. Im Gegensatz dazu wurde *Nicotiana benthamiana*, die ebenso wie die Tomate zur Familie der *Solanaceae* gehört, bei Infiltration aller heterolog exprimierter Serinproteasen (ChpC, ChpG, Pat-1 und PpaC) die Auslösung der Abwehrreaktion weiterhin beobachtet. Damit konnten mehrere Serinproteasen als Elicitor der HR identifiziert werden.

Die dritte Gruppe der extrazellulären Serinproteasen von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* bilden die Subtilasen SbtA, SbtB und SbtC. Die Inaktivierung der kodierenden Gene hatte keinen Einfluss auf die HR-Auslösung bei *Mirabilis jalapa* und *Nicotiana benthamiana*. Im Pflanzentest mit *Solanum lycopersicum* (Tomate) zeigten die *sbtA*- und *sbtB*-Mutanten jeweils eine leicht verminderte Virulenz. Allerdings fehlen für eine statistisch abgesicherte Auswertung weitere Datensätze, sodass zum jetzigen Zeitpunkt eine Beteiligung an der kompatiblen Interaktion nicht ausgeschlossen werden kann.

Einleitung

1. Das Tomatenpathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Die Gattung *Clavibacter* umfasst Gram-positive, aerobe, nicht sporenbildende Bakterien (Davis *et al.*, 1984). Aufgrund von 16SrRNA-Analysen und des Zellwandaufbaus wird *Clavibacter* der Familie der *Microbacteriaceae* (Ordnung *Actinomycetales*) zugeordnet (Stackebrandt *et al.*, 1997). Es gehört zu der kleinen Gruppe phytopathogener Aktinomyeten.

Der Gattung *Clavibacter* enthält nur eine Art, der bislang fünf *Clavibacter michiganensis*-Subspezies zugeordnet werden, die alle phytopathogen sind (Tab. 1). Alle Subspezies haben gemein, dass sie systemische Infektionen auslösen und das vaskuläre System ihrer jeweiligen Wirtspflanze besiedeln (Vidaver, 1982). Die folgende Tabelle bietet einen Überblick der verschiedenen Subspezies, ihrer Wirtspflanzen, und der charakteristischen Krankheitssymptome, die sie auslösen (Shirakawa *et al.*, 1991).

Cm-Subspezies	Wirtspflanze	Krankheitsbild	Quelle
<i>C. m. subsp. insidiosus</i>	Luzerne (versch. Leguminosen)	bakterielle Welke	McCulloch, 1925
<i>C. m. subsp. michiganensis</i>	Tomate, Paprika (versch. Solanaceen)	bakterielle Welke	Smith, 1910; Strider, 1969
<i>C. m. subsp. nebraskensis</i>	Mais	Blatt- und Stängelfäule	Vidaver & Mandel 1974; Schuster, 1975
<i>C. m. subsp. sepedonicus</i>	Kartoffel; Aubergine	Bakterienringfäule	Manzer & Genereux, 1981
<i>C. m. subsp. tessellarius</i>	Weizen	Blattfleckung	Carlson & Vidaver, 1982

Tabelle 1: Wirtspflanzen und charakteristische Krankheitssymptome nach Befall mit den verschiedenen *Clavibacter michiganensis*-Unterarten.

Die Unterart *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) verursacht die bakterielle Welke der Tomatenpflanze (*Solanum lycopersicum*) (Davis *et al.*, 1984). Sowohl über kontaminiertes Saatgut als auch über äußere Verletzungen im Wurzel- und

Sprossbereich der Pflanze kann eine Infektion erfolgen. Eine (späte) Infektion der Tomatenpflanze durch *Cmm* kann zu einer latenten Infektion führen, bei der *Cmm* in den Samen eindringt und somit an die nächste Generation weitergegeben wird. Kontaminiertes Saatgut ist somit wohl einer der Hauptgründe für Ausbrüche, der von *Cmm* verursachten Welkekrankheit in der Landwirtschaft (Tsiantos, 1987). Gelangt das Bakterium ins Erdreich, kann es dort über mehrere Jahre persistieren, aber nur wenn es mit abgestorbenem Pflanzenmaterial assoziiert ist (Fatmi et al., 2002). Durch *Cmm* werden enorme Ernteverluste im kommerziellen Tomatenanbau verursacht.

Nach erfolgreicher Infektion breitet sich *Cmm* als Endophyt der Tomate innerhalb des pflanzlichen Gefäßsystems, dem Xylem, systemisch über die gesamte Pflanze aus (Strider, 1969; Abb. 1).

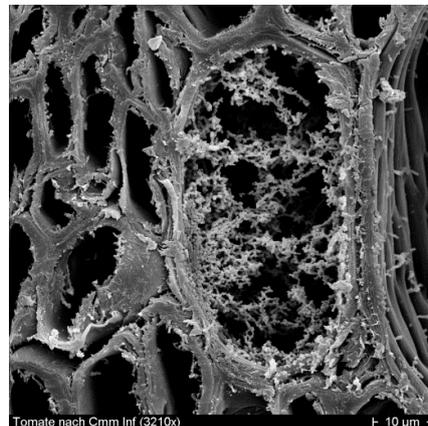


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Xylemgefäßes der Tomate, das von *Cmm* besiedelt ist, im Querschnitt (Aufnahme: Tom Trapphoff, Universität Bielefeld).

Die Kolonisation der Tomatenpflanze geht einher mit der Erschließung von Nährstoffquellen aus dem sauren (pH 5,0-5,5), relativ nährstoffarmen Xylemsaft. Der Xylemsaft der Tomate enthält nur geringe Zuckerkonzentrationen, hat jedoch einen relativ hohen Gehalt an Carbonsäuren wie zum Beispiel Malat, Citrat, Fumarat und Succinat (Bialczyk et al., 2004). Nach der erfolgreichen Besiedlung der Wirtspflanze erfolgt das Stadium der Krankheitsausprägung. Die Infektion führt zunächst zu einer Wachstumsretardierung, gefolgt von einer unifacialen Blattwelke (Abb. 2A). Die unifaciale Blattwelke ist ein typisches Symptom der Erkrankung und ist durch ein tütenförmiges Einrollen und Verwelken der Fiederblätter auf einer Seite des Blattes charakterisiert, während auf der gegenüberliegenden Seite die Fiederblätter zunächst noch voll turgeszent sind (Strider,

1969). Im weiteren Krankheitsverlauf nimmt die Intensität der Welke zu und es kommt einseitig zum Aufreißen des Sprosses. Diese charakteristische Ausbildung von Sprossläsionen (*cankers*, Abb. 2B) kann die Standfestigkeit der Pflanze so stark beeinträchtigen, dass es zum Abknicken und somit zum Absterben der Pflanze führt (Wallis, 1977).

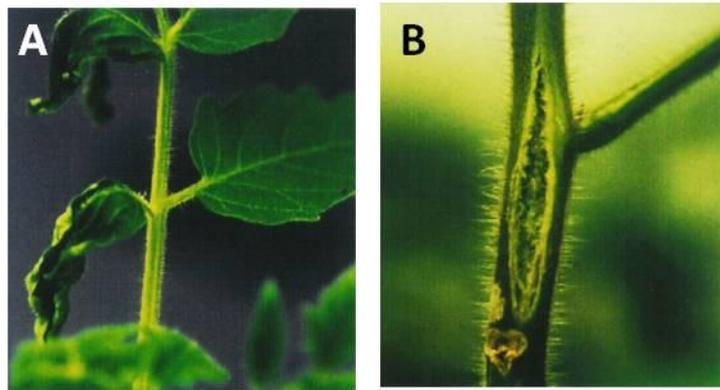


Abbildung 2: Durch *Cmm382* hervorgerufene Krankheits Symptome der Tomate vier Wochen nach Infektion. **A:** unifaciale Fiederblattwelke, **B:** Sprossläsion (Aufnahme: Holger Jahr, Universität Bielefeld).

Im Spätstadium der Infektion können in der Pflanze Bakterientiter von bis zu 1×10^9 Bakterien pro Gramm Frischgewicht erreicht werden (Bermppohl, 1990).

Das Genom von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 besteht aus dem 3,3 Mb großen zirkulären Chromosom, das einen hohen GC-Gehalt von 72,6 % besitzt (Gartemann et al., 2008). Zusätzlich enthält der Wildtyp *Cmm*NCPPB382 die beiden nativen Plasmide pCM1 und pCM2 (Meletzus et al., 1993), auf denen zwei essentielle Virulenzdeterminanten, *celA* (pCM1) und *pat-1* (pCM2), lokalisiert sind. Die beiden Plasmide bleiben bei der Kultivierung von *Cmm* bei einer Temperatur von 26-28° C in der Zelle stabil erhalten, können aber bei Temperaturerhöhung auf 32° C verloren gehen. So wurden (teilweise) Plasmid-freie Curingderivate des Wildtyps NCPPB382 erzeugt (Meletzus et al., 1993). Das Curing-Derivat CMM100 zeichnet sich dadurch aus, dass es die Tomatenpflanze noch effektiv kolonisieren kann, aber keine Welkesymptome hervorruft, also avirulent ist. Die Curing-Derivate CMM101 und CMM102 besitzen nur das Plasmid pCM1 bzw. pCM2 und zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine abgeschwächte Virulenz. Die Auslösung der Welkesymptome verzögert sich nach Infektion mit einem dieser beiden Stämme um 4-6

Tage (Meletzus et al., 1993). Die für die Virulenz benötigten Gene sind also plasmidkodiert, während die Gene, die für die Kolonisation der Pflanze notwendig sind, auf der chromosomalen DNA liegen.

CelA und Pat-1- die bekannten Virulenzdeterminanten von *Cmm382*

Auf dem 27,4 kb großen Plasmid pCM1 befindet sich das Gen *celA*, das eine 78 kDa große β -1,4-Endoglucanase (Cellulase) kodiert (Jahr et al., 2000). Dieses Protein besteht aus 746 Aminosäuren, besitzt ein Signalpeptid, und setzt sich aus drei Domänen zusammen: der N-terminalen katalytischen Hydrolase-Domäne, einer Cellulose-bindenden Domäne und einer C-terminalen Domäne, die Homologie zu pflanzlichen α -Expansinen besitzt. Fehlt CelA die α -Expansin-ähnliche Domäne, geht die katalytische Aktivität für den Abbau hochmolekularer kristalliner Cellulose verloren, allerdings ist die Degradierung löslicher Cellulose weiterhin möglich (Jahr et al., 2000). Expansine bewirken vermutlich durch die Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Polysacchariden der Zellwand eine Auflockerung des Cellulosepolymers und ermöglichen damit das Wachstum der Pflanzenzelle (Shcherban et al., 1995; Cosgrove, 1998). Dies könnte den Angriff der Cellulose auf die native Cellulose der pflanzlichen Zellwand erleichtern.

Das 69,9 kb große Plasmid pCM2 trägt das Gen *pat-1* (Dreier et al., 1997). Dieses Gen kodiert ein 29,7 kDa großes Protein, das aus 280 Aminosäuren besteht und aufgrund eines N-terminalen Signalpeptids wahrscheinlich sekretiert wird (Dreier et al., 1997). Es ist eine Serinpeptidase, deren typische Serin- und Histidinmotive identifiziert wurden (Dreier, 1995; Burger et al., 2005). Innerhalb der Serinpeptidasen gehört Pat-1 in die Unterfamilie S1A, der z. B. auch Chymotrypsin angehört.

Sequenzvergleiche zeigten, dass das Pat-1-Protein Mitglied einer ganzen Familie von Serinpeptidasen ist, die in *Cmm* (10 Proteine) und *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*, 11 Proteine) vorkommen. Die Familie wurde Chp-Familie (**chromosomal homology of *pat-1***) genannt. Der Austausch von Aminosäuren des aktiven Zentrums in Pat-1 führte zum Verlust der Virulenz (Niermann, 1997; Burger et al., 2005), so dass eine funktionell aktive Serinpeptidase angenommen werden kann. Eine proteolytische Aktivität von Pat-1 konnte bislang nicht gezeigt werden. Wird aber das Serin-Kodon aus der potentiellen katalytischen Triade von *pat-1* gegen ein Threonin-Kodon ausgetauscht, sind die

resultierenden *Cmm*-Stämme (pCM1) avirulent. Folglich ist die über Sequenzanalyse identifizierte katalytische Domäne essentiell für die Aktivität von Pat-1 und damit auch essentiell für die Virulenz (Niermann, 1997; Burger et al., 2005). Eine Infektionsphasen-abhängige Expression von *pat-1* wurde von Chalupowicz et al. (2010) gezeigt. 24 Stunden nach Infektion der Tomatenpflanze wurde das höchste Transkriptionslevel (Expression um das 170-fache erhöht) verzeichnet.

Die genaue Funktion dieses Proteins, vor allem in der Pathogenese, ist aber bislang unbekannt.

Die chromosomale Pathogenitätsregion *chp/tomA*-Region

Über das gesamte Chromosom verteilt besitzt *Cmm382* ungefähr zwanzig Regionen, deren GC-Gehalt deutlich niedriger ist, als der des restlichen Genoms (72,6 %). Diese Regionen sind spezifisch für *Cmm382* und treten in *Cms* nicht auf (Gartemann et al., 2008). Die größte dieser Regionen (etwa 129 kb; Position 38000 bis 167000) ist die sogenannte *chp/tomA*-Region. Diese Region kann unterteilt werden in die *chp*-Subregion (79 kb; GC-Gehalt: 64,8 %) (Abb. 3) und die *tomA*-Subregion (50 kb; GC-Gehalt: 66,8 %). Die *chp*-Region enthält neben den sieben *chp*-Genen (*chromosomal homology of pat-1*) (*chpA-chpG*) (s. Kapitel 3, Einleitung) Gene für weitere extrazelluläre Enzyme, die möglicherweise an der Pathogenität beteiligt sind. Dazu gehören weitere Proteasen: sechs Mitglieder der Ppa-Familie (*protease pathogenicity*) (*ppaA-ppaE*) und eine Subtilase (SbtA). Weitere Exoenzyme aus der *chp*-Region sind die Pektat-Lyase PelA1 und PelA2. Diese Proteine sind Zellwand-degradierende Enzyme, die bei manchen Bakterien essentiell für die Pflanzeninfektion sind (Hayashi et al., 1997). Pektin ist Hauptbestandteil der pflanzlichen Mittellamelle, die benachbarte Zellen in der Zellwand voneinander trennt (Collmer et al., 1988). Pektinasen (Pektat- und Pektin-Lyase) degradieren die Pektinfraktion und erleichtern somit einem Pathogen die Penetration und Kolonisation in der Wirtspflanze. Diese Enzyme können Mazeration des Pflanzengewebes hervorrufen und die Zellwandstruktur modifizieren (Collmer et al., 1988).

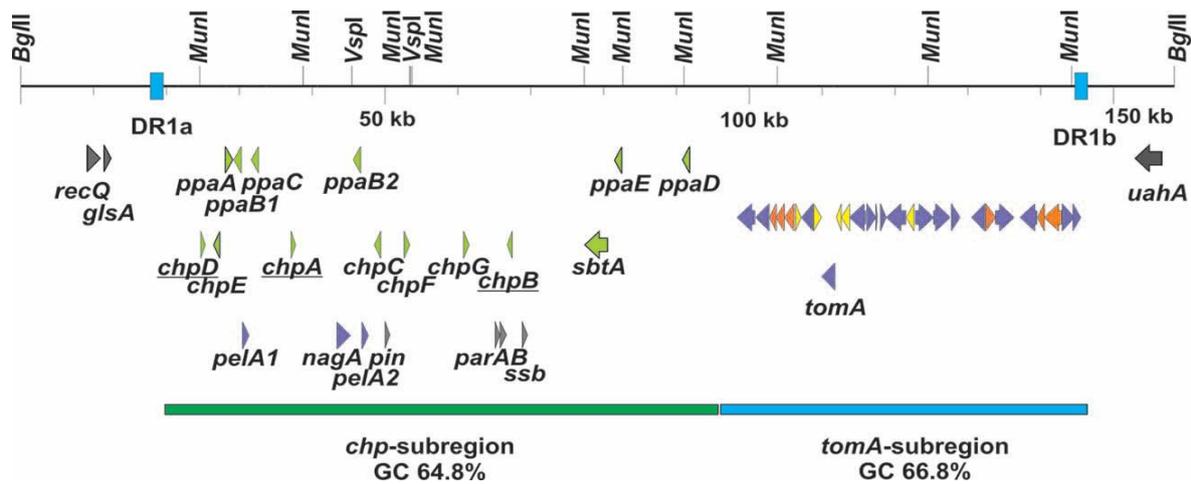


Abbildung 3: Physikalische Karte der *chp/tomA*-Genregion. Die 1,9 kb großen *direct repeats*, die die Region flankieren, sind als blaue Boxen dargestellt. Grün: Gene, die für Serinproteasen kodieren, Orange: Gene, die für Transporter kodieren, Violett: Gene, die für Glykosidasen kodieren. Pseudogene sind unterstrichen.

Die *tomA*-Subregion kodiert u.a. zwölf Glykosidasen, ein Cytochrom P450 und eine Tomatinase, die das α -Tomatin, ein Wachstum-inhibierendes Alkaloid der Tomatenpflanze, entgiftet (Kaup et al., 2005). Darüber hinaus sind in der Region Gene lokalisiert, deren Produkte vermutlich im Kohlenhydrat-Metabolismus involviert sind oder Zuckertransporter und Regulatoren sind.

Dass diese Region eine Rolle in der Pathogenität spielt, zeigt eine Deletionsmutante (CMM101 β 30-18), die trotz des Vorhandenseins der Pathogenitätsdeterminante *ceIA*, keine Welkesymptome ausbildet und die Tomatenpflanze nicht effektiv kolonisieren kann (Titer: $2,8 \times 10^4$ Bakterien/g Pflanzenhomogenat) (Kirchner, 2003). In CMM101 β 30-18 ist das zur Mutagenese verwendete Transposon Tn1409 β (Gartemann & Eichenlaub, 2001) in den offenen Leserahmen CMM_0135 inseriert. Die Komplementation der Mutante durch Einbringen eines intakten Gens durch den Shuttlevektor pDM302 führte nicht zur Wiederherstellung des Phänotyps von CMM101. Dieses Ergebnis machte deutlich, dass der beobachtete Effekt auf einer weiteren Mutation beruhen musste (Abt, 2003). Durch Pulsfeldgelelektrophorese wurde nachgewiesen, dass die Mutante eine Deletion von ca. 130 kb enthält, die fast die komplette *chp/tomA*-Region umfasst. Vermutlich ist die Deletion durch homologe Rekombination zwischen den 1,9 kb großen *direct repeats* (DR1a/DR1b) erfolgt, die die *chp/tomA*-Region eingrenzen (Schott, 2004). Eine Entsprechung zur

chp/tomA-Region findet sich in dem ebenfalls sequenzierten Kartoffelpathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*)-Stamm nicht (Bentley et al., 2008).

Aufgrund des Phänotyps der Deletionsmutante CMM101β30-18 konnte der *chp/tomA*-Region eine entscheidende Bedeutung für die effektive Kolonisation der Wirtspflanze und für die Ausbildung von Krankheitssymptomen zugewiesen werden. TomA scheint dabei keine wesentliche Bedeutung an der Interaktion mit Kulturtomaten zu besitzen, da die entsprechende Mutante ebenso virulent war wie der Kontrollstamm (Kaup, 2005). In avirulenten *Cmm*-Isolaten von infizierten Tomatenpflanzen aus Israel und den Niederlanden fehlten die *chp*-Gene. Diese avirulenten Stämme erreichten einen deutlich geringeren Titer als NCPPB382 (1×10^6 bis 5×10^7 /g Pflanzenhomogenat), obwohl die Gene *celA* und *pat-1* vorhanden waren. Durch Southern Hybridisierung und/oder PCR-Analysen konnten in diesen Stämmen nur maximal ein *chp*-Gen nachgewiesen werden, während in virulenten Stämmen, alle sieben *chp*-Gene detektiert wurden (Steingröver, 2003; Gräfen, 2005; Kleitman et al., 2008).

Die gezielte Inaktivierung einzelner Gene (*chpC*, *ppaA* und *ppaC*) führte zu einer verringerten Kolonisationsrate der jeweiligen Mutanten, während die *chpG*-Mutante nicht mehr zur Auslösung der HR auf *Mirabilis jalapa* befähigt war (Stork et al., 2008; Schott, 2004). Auch hier ist die genaue Funktion und vor allem das Substrat der Serinpeptidasen in der Pathogenese bisher unbekannt.

2. Proteasen – Klassifizierung und Funktion

Eine umfangreiche Enzymklasse stellen die proteolytischen Enzyme dar. Proteasen sind Enzyme, die Proteine und Peptide durch Hydrolyse der Peptidbindungen spalten. Aufgrund des eigentlichen Substrats (der Peptidbindung) wurde der Begriff der Peptidasen eingeführt (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34/>). Aufgrund ihrer funktionellen Diversität und der Tatsache, dass etwa 2 % aller Genprodukte Peptidasen sind (Barret et al., 1998) machen sie eine der größten Enzymgruppen aus.

Peptidasen werden nach ihrem Wirkungsort in der Polypeptidkette in zwei Gruppen unterteilt, die Exopeptidasen und die Endopeptidasen. Desweiteren werden die Peptidasen hinsichtlich der Aminosäuren des aktiven Zentrums unterschieden (aufgelistet in der MEROPS- Datenbank (<http://merops.sanger.ac.uk/>; Rawlings et al., 2006).

Exopeptidasen hydrolysieren Peptidbindungen am Amino- oder am Carboxyl-Terminus des Proteins. Sie spalten Peptidbindungen nicht weiter als 3 Aminosäurereste vom entsprechenden Terminus entfernt. Diese werden weiter unterteilt in Aminopeptidasen (EC3.4.11), Di- bzw. Tripeptidyl-Peptidasen (EC3.4.14), Carboxypeptidasen, Peptidyl-Dipeptidasen (EC3.4.15) und Dipeptidasen (EC3.4.13). Eine Ausnahme stellen die Omega-Peptidasen (EC3.4.19) dar, die bestimmte modifizierte terminale Reste freisetzen können. Endopeptidasen spalten enzymatisch Peptidbindungen innerhalb des Proteins, wenigstens 3 Aminosäurereste von den Termini entfernt. Dazu zählen humane Verdauungsproteasen wie Trypsin oder Chymotrypsin. Die Spezifität der Hydrolysestelle wird durch die Aminosäure-Abfolge des Substrates rund um die Hydrolyseposition bestimmt. So hydrolysiert Trypsin Proteine C-Terminal der Aminosäuren Lysin und Arginin (Brown & Wold 1973), während die Spaltungsspezifität von Peptidbindungen bei Chymotrypsin auf den Carbonylgruppen beruht, die von aromatischen Aminosäuren (Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan) stammen (Hedstrom et al., 1992).

Je nach ihrem Wirkungsort in einem Organismus werden Proteasen als intrazelluläre oder extrazelluläre Peptidase bezeichnet. Intrazelluläre Proteasen regulieren eine Vielzahl von zellulären Abläufen. Sie spielen eine zentrale Rolle in zellulären Prozessen wie Proteinexport und Sekretion und Stressresistenz (Visick & Clarke, 1995; Gottesman, 1996; Gottesman et al., 1997). Eine wichtige Aufgabe der Proteolyse in der Zelle ist die Eliminierung von defekten oder fremdartigen Polypeptiden und Proteinen (Strauch et al., 1989). Spezifische Proteasen sind aber auch in der Lage, Enzyme spezifisch zu inaktivieren oder Präproteine zu prozessieren und somit eine Vielzahl von zellulären Abläufen zu regulieren. Damit sind Proteasen wahrscheinlich direkt oder indirekt an fast allen Prozessen innerhalb einer Zelle beteiligt (Callis, 1995; Schaller, 2004).

Extrazelluläre Proteasen üben nach Sekretion ihre katalytische Aktivität außerhalb der Zelle aus. Die Sekretion geschieht dabei unter Mitwirkung N-terminaler Signalsequenzen. Die durchschnittliche Länge der Signalpeptide bei Exportproteinen Gram-negativer Bakterien beträgt 24 Aminosäuren und ist somit deutlich geringer als die der Signalpeptide von Proteinen aus Gram-positiven Bakterien, welche im Durchschnitt 30 Aminosäuren beträgt. Bei der Translokation erfolgt deren Abspaltung durch Signalpeptidasen, wobei die Proteasen dann oft noch als inaktive Vorstufen (Zymogene) vorliegen. Erst durch Abspaltung der Prosequenz, die einerseits als Chaperon während der Faltung (Eder & Fersht, 1995),

andererseits als Inhibitor (Kessler & Safrin, 1994; O'Donohue & Beaumont, 1996; Wiederanders et al., 2003) wirken kann, erhalten die Proteasen ihre enzymatisch aktive Form. Die proteolytische Spaltung kann dabei autoproteolytisch (z. B. bei Trypsin und Plasmin) oder durch andere Proteasen (z. B. bei Chymotrypsin) erfolgen. Trypsin und Chymotrypsin sind die beiden Hauptproteasen des Pankreas (Northrop et al., 1939). Diese Proteine werden vom Pankreas in Form der inaktiven Zymogene Trypsinogen und Chymotrypsinogen ins Duodenum sekretiert. Die Enteropeptidase des Dünndarmepithels aktiviert einen Teil der Enzymmenge durch Spaltung des Trypsinogens zu Trypsin. Das entstehende Trypsin kann sich autokatalytisch die vollständig sekretierte Menge des Enzyms aktivieren (positive Rückkopplung). Das enzymatisch aktive Trypsin ist in der Lage das Proenzym Chymotrypsinogen (inaktive Vorstufe von Chymotrypsin), durch hydrolytische Spaltung zwischen Arg15 und Ile16, zu π Chymotrypsin zu aktivieren. Dies ist zwar voll aktiv, jedoch instabil. Durch autoproteolytische Abspaltung der Dipeptide Ser14 und Arg15 sowie Thr147 und Asp148 entsteht die stabile Form, das α -Chymotrypsin (Rehner, 2010).

Nach der Sekretion von Peptidasen in den periplasmatischen Raum oder ins Medium können diese als extrazelluläre Enzyme unterschiedliche Proteine hydrolysieren. Bei vielen Bakterien sind neben Amylasen (Boyer & Ingle, 1972) und Pektinasen (Jauneau et al., 1986) auch extrazelluläre Proteasen an der unspezifischen Zerlegung von Proteinen in ihre Grundbausteine beteiligt, deren freigesetzten Aminosäuren für die Energiegewinnung und für das Wachstum zur Verfügung stehen. Durch Proteasen, die α -Casein hydrolysieren, wie die Serinproteasen PrtH von *Lactobacillus helveticus* (Pederson et al., 1999) und PrtS von *Streptococcus thermophilus* (Fernandez-Espla et al., 2000) werden wichtige essentielle Aminosäuren gewonnen, die von den Bakterien nicht selbst synthetisiert werden können. In Bezug auf die Substratspezifität sind diese Proteasen eher als unspezifisch zu bezeichnen, da diese im Rahmen der Nährstoffversorgung verschiedenste Proteine abbauen. Extrazelluläre Proteasen aus pathogenen Organismen sind von besonderem Interesse, da diese für den Abbau des Bindegewebes des Wirtes (Borg von Zepelin et al., 1999; Carlile et al., 2000) und der Deregulation von Proteinkaskaden oder Inhibitorsystemen notwendig sein können (Hotson et al., 2003; Block et al., 2011; López-Solanilla et al., 2004) und damit entscheidende Virulenzfaktoren darstellen können. Diese Proteasen sind hochspezifisch, da zur Überwindung der physiologischen Barrieren und Unterdrückung der Immunantwort durch Einwirken in Signaltransduktionswegen nur ein spezifisches wirtseigenes Substrat

hydrolysiert wird. Extrazelluläre Proteasen können aber auch in basalen metabolischen Funktionen involviert sein (Di Pietro et al., 2001).

Entscheidend für die katalytische Aktivität von Proteasen ist die Aminosäuresequenz des aktiven Zentrums. Anhand der chemischen Beschaffenheit des aktiven Zentrums werden Proteasen in der MEROPS-Datenbank (<http://merops.sanger.ac.uk>) in fünf Hauptgruppen klassifiziert (Tab. 2).

funktionelle Gruppe bzw. aktives Zentrum	Peptidasen	Beispiel
Aspartat	Aspartylpeptidasen	Pepsin, Cathepsine D, E
Cystein	Cysteinpeptidasen	Cathepsine B, H, L, Caspasen
meistens Zn²⁺	Metallopeptidasen	Thermolysin, Collagenase
Serin	Serinpeptidasen	Chymotrypsin, Trypsin, Plasmin
Threonin	Threoninpeptidasen	Proteasom

Tabelle 2: Klassifizierung der Peptidasen anhand der MEROPS-Datenbank.

Die Serinpeptidasen werden aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in etwa 50 Familien differenziert. Unterschiede in der Tertiärstruktur und der Reihenfolge der Aminosäure-Reste im katalytischen Zentrum ermöglichen eine Unterteilung dieser Familien in neun Clans (Rawlings & Barrett; 1994; Barrett & Rawlings, 1995).

Alle proteolytischen Enzyme aus dem Subclan PA(S) sind Endopeptidasen mit einer katalytischen Triade bestehend aus den Aminosäuren Histidin, Asparaginsäure und Serin (HDS). Die Tertiärstruktur dieser Proteine hat eine Zwei-Domänen-Struktur aus zwei β -Faltblättern (parallel und antiparallel) und einer α -Helix. Die größte Familie des Subclans ist die Familie S1, die weiter in fünf Subfamilien unterteilt wird (S1A bis S1E). Zur Subfamilie S1A gehören u.a. Chymotrypsin und Trypsin, die Hauptproteasen des Pankreas (Northrop et al., 1939). α - und β -Chymotrypsin bestehen aus drei Polypeptidketten, die durch limitierte Proteolyse aus Chymotrypsinogen entstehen, und über Disulfidbrücken verknüpft sind. Chymotrypsin dient seit vielen Jahren als Modellsystem zur Untersuchung enzymatischer Aspekte wie der Substrat-spezifischen Katalyse (Perona & Craik, 1995).

Der Clan SB beinhaltet u.a. die Serinpeptidasefamilie S8, die auch als Subtilase-Familie bezeichnet wird. Sie hat ihren Namen von Subtilisin, einer relativ unspezifischen, alkalischen

extrazellulären Protease aus *Bacillus subtilis*. Die katalytische Triade unterscheidet sich durch die Anordnung der Aminosäuren Asparaginsäure, Histidin und Serin von der der Familie S1. Die Familie S8 enthält neben einer Exopeptidase, der Tripeptidyl-Peptidase II, ausschließlich Endopeptidasen. Bei allen untersuchten Subtilasen erfolgt die Aktivierung dieser Enzyme durch Autoproteolyse. Lange Zeit wurde angenommen, dass Subtilasen nur in Prokaryoten vorzufinden sind, aber mit der Entdeckung der Subtilisin-ähnlichen Kex2p-Protease (Kexin) der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte erstmals die Identifizierung von Subtilasen in Eukaryoten, die mittlerweile in nahezu allen Organismen entdeckt wurden (Julius et al., 1984; Thorner, 1985). Basierend auf Sequenzvergleichen werden die Subtilasen in sechs Familien unterteilt: Subtilisin, Thermitase, Kexin, Pyrolysin, Proteinase K und Lantibiotische Peptidasen (Siezen & Leunissen, 1997). Die Subfamilie S8A beinhaltet die Subtilisin-ähnlichen Serinpeptidasen, die sowohl in Bakterien, Pilzen und höheren Eukaryonten auftreten (Siezen et al., 1991). Die erste tierische Subtilase, das Furin, konnte aufgrund hoher Sequenzähnlichkeit zum katalytischen Zentrum des Kexins identifiziert werden (Fuller et al., 1989). Weitere tierische Subtilasen sind die dem Kexin homologen Proprotein-Konvertasen (PC). Die PC-Familie wird in drei Gruppen untergliedert: (i) die Membran-gebundenen Konvertasen, (ii) die sekretorischen Konvertasen und die (iii) die regulatorischen Konvertasen, die in Säugern für die Reifung von Peptidhormonen, Neuropeptiden, Wachstumsfaktoren und Rezeptorproteinen verantwortlich sind (Barr, 1991; Seidah et al., 2003). In vielen Eukaryonten, aber auch Bakterien, sind die Subtilasen hochspezifische extrazelluläre Proteine, die in Abwehrprozessen involviert, am Zellwachstum beteiligt sind oder auch direkt als Virulenzfaktor fungieren. Auf der Seite der prokaryotischen Subtilasen ist besonders die Subtilase Cytotoxin AB₅ (SubAB) zu erwähnen, die von bestimmten Toxin-bildenden *E. coli*-Stämmen produziert wird und ein hoch wirksames Zellgift darstellt (Paton et al., 2004). In Pflanzen weisen die Subtilasen eine Multidomänen-Struktur auf (die Prä-, Pro-, katalytische und Protease-assoziierte (PA)-Domäne) und werden durch Proteolyse zur aktiven Protease prozessiert (Beers et al., 2004), wo sie dann spezifische Aufgaben in physiologischen Abläufen übernehmen. Die SDD1-Subtilase (*stomatal density and distribution 1*) von *Arabidopsis* wird vermutlich in den Apoplasten der Zellen sekretiert, wo sie an der Prozessierung der für die Kontrolle der Stomatadichte verantwortlichen Proteine beteiligt sein könnte (von Groll et al., 2002). Die Subtilisin-ähnliche Serinprotease ALE1

(*abnormal leaf shape 1*) ist während der Embryonalentwicklung von *Arabidopsis thaliana* erforderlich bei der Differenzierung der Epidermis (Tanaka et al., 2001).

In der Tomate (*Solanum lycopersicum*) sind bisher 15 Subtilasen aus fünf Subfamilien identifiziert (je ein Gen der Subfamilien SBT1, SBT2 und *tmp*, fünf Gene der SBT3/4 und sechs Gene der P69-Subfamilie) (Meichtry et al., 1999). Die Tomatensubtilasen weisen eine Multidomänen-Struktur mit einem N-terminalen Signalpeptid auf, das für die Ausschleusung des Proteins über das Sekretionssystem notwendig ist. Das Signalpeptid wird gefolgt von einem Propeptid, das bei der Faltung des Proteins hilft und/oder als intramolekularer Inhibitor der Enzymaktivität wirkt (Ujwal & Masayori, 1996; Siezen et al., 1995). Die genaue Funktion fast aller Subtilasen der Tomate ist noch unbekannt. P69A und P69D spielen vermutlich eine Rolle in der Pflanzenentwicklung, da das Expressionsprofil gewebespezifisch und entwicklungsabhängig ist (Jordá et al., 1999). Die Funktion von P69E und P69F ist unbekannt, ihre Expression erfolgt nur in Wurzeln bzw. Hydathoden (Jordá et al., 2000). Demgegenüber scheinen P69B und P69C in der Wund- und Pathogen-Abwehr involviert zu sein. Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene zeigten eine Induzierbarkeit durch Pathogenbefall bzw. nach Behandlung mit Salicylsäure oder dem Pilztoxin Fusicoccin, wodurch sie in der Pathogenantwort involviert sein könnten (Jordá et al., 1999; Jordá & Vera, 2000; Schaller et al., 2000).

3. Peptidasen von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Im Genom von *Cmm* sind wie bereits erwähnt eine Vielzahl von Genen annotiert worden, die für extrazelluläre Peptidasen codieren. Insgesamt gibt es 28 Serinpeptidasen, die drei verschiedenen Familien zugeordnet werden können (Gartemann et al., 2008). Neben dem Pathogenitätsfaktor Pat-1 werden neun weitere Peptidasen zur Chp-Familie (**chromosomal homology of *pat-1***) zusammengefasst. Die Mitglieder der Familie sind etwa 280 AS groß (ungefähr 30 kDa). Alle Mitglieder besitzen eine katalytische Triade aus den Aminosäuren Histidin, Asparaginsäure und Serin und gehören zur Serinprotease-Familie S1A. Charakteristisch für die Peptidasegene ist der niedrige GC-Gehalt (zwischen 52 und 65%). Drei der zehn *chp*-Gene befinden sich auf dem Plasmid pCM2 (*pat-1*, *phpA* und *phpB*), während die restlichen sieben Serinproteasegene (*chpA* bis *chpG*) in der chromosomalen *chp*-Region liegen. Drei der sieben chromosomalen *chp*-Genen sind Pseudogene (*chpA*, *chpB*

und *chpD*), da sie innerhalb der ORFs Leserasterschübe und/ oder *in-frame* Stopcodons enthalten. In *Cms* treten 11 Mitglieder der Chp-Familie auf (Bentley et al., 2008). Homologe Gene fehlen in der die Monokotyle Mais befallenden Subspezies *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (*Cmn*) (Eichenlaub & Gartemann, 2011). Damit könnten diese Gene spezifisch für Wirtspflanzen der Familie *Solanaceae* oder für dikotyle Pflanzen sein. Außer für *pat-1* in *Cmm* ist auch für das *chp7*-Gen aus *Cms* eine Beteiligung an der Virulenz (bakteriellen Ringfäule der Kartoffel) gezeigt (Nissinen et al., 2009). Chp-7 spielt zusätzlich auch eine Rolle in der Auslösung der HR bei der Nicht-Wirtspflanze *Nicotiana tabacum* cv. Samsun (Tabak). In *Cmm* übernimmt ChpG eine derartige Funktion in der HR-Auslösung (Stork et al., 2008). Dagegen ist für ChpC und ChpE eine Beteiligung an der Kolonisierung der Tomate gezeigt, entsprechende Mutanten weisen einen reduzierten bakteriellen *in planta*-Titer auf (Stork et al., 2008; Barash, pers. Mitteilung). Die Inaktivierung von *chpF* durch Insertion einer Antibiotika-Resistenzkassette hatte allerdings keinen Effekt auf die Kolonisation. Lediglich die Fähigkeit zur Ausbildung von Sprossläsionen bei infizierten Tomaten war in der *chpF*-Mutante vermindert. Durch Komplementation der Mutante durch das Wildtyp-Allel konnte die volle Virulenz wiederhergestellt werden (Barash, pers. Mitteilung). Homologe sind auch in *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* und pflanzenpathogenen Proteobakterien (*Xanthomonas*-Arten) zu finden (Nissinen et al., 2009).

Für alle Mitglieder der Chp-Familie sind Signalpeptide vorhergesagt, sie sollten also sekretiert werden. In Exoproteomstudien sind bisher ChpC, ChpE, ChpF, ChpG und Pat-1 im Xylemsaft *Cmm382*-infizierter Tomaten nachgewiesen worden (Savidor et al., 2012; Tews, 2012). Auf RNA-Ebene ist die Induktion der *chp*-Gene *in planta* 10 Tage nach Infektion reprimiert. Die Repression dieser Gene war auch *in vitro* 13 Stunden nach Supplementierung des M9-Minimalmediums mit Tomatenblatthomogenat nicht-infizierter Pflanzen zu beobachten (Flügel et al., 2012).

Für alle bisher untersuchten Mitglieder der Chp-Familie ist nur mit genetischen Methoden eine Beteiligung an der Pflanzeninteraktion gezeigt, allerdings sind die entsprechenden Proteine bisher nicht gereinigt und dementsprechend keine Untersuchungen zur genauen Funktion der Chp-Serinproteasen oder ihren Substraten durchgeführt worden.

Die zweite Familie der Chymotrypsin-ähnlichen Serinpeptidasen stellt die *ppa*-Genfamilie (**protease pathogenicity**) dar, die in *Cmm* 11 Mitglieder beinhaltet. Diese Proteine umfassen in etwa 330 AS (ungefähr 35 kDa). Während das Gen *ppaJ* auf dem Plasmid pCM1 lokalisiert

ist, sind vier weitere Gene (*ppaF*, *G*, *H* und *ppaI*) auf dem Chromosom, außerhalb der *chp*-Region, zu finden. Die restlichen sechs Gene (*ppaA* bis *ppaE*) sind in der *chp*-Genregion lokalisiert. Alle Peptidasen besitzen ein Signalpeptid und die für Serinpeptidasen spezifische katalytische Triade (HDS). Mit Hilfe der MEROPS-Datenbank wurden die Peptidasen aus der Ppa-Familie den Serinpeptidasen der Subfamilie S1X zugeordnet. Für zwei Gene, *ppaA* und *ppaC*, ist über Konstruktion von *knock out*-Mutanten eine Beteiligung an der Bakterien-Pflanzen-Interaktion gezeigt, die Inaktivierung hatte eine leichte Reduzierung der Welkesymptome und des Titors *in planta* zur Folge (Eichenlaub, unveröffentlicht). Homologe wurden in *Cms* (8 Mitglieder), *Cmn* (1 Mitglied) und verschiedenen pflanzenpathogenen Proteobakterien wie *Xylella fastidiosa*, *Acidovorax* und *Xanthomonas* gefunden. In Sekretomanalysen von *Cmm382* konnten alle Mitglieder der Ppa-Familie identifiziert werden (Tews, 2012). Alle *ppa*-Gene waren auf RNA-Ebene sowohl *in planta* (10 Tage nach Infektion) als auch *in vitro* (13 Stunden nach Zugabe des Tomatenblatthomogenats zum M9-Medium) reprimiert (Flügel et al., 2012).

Auch in diesen Fall ist keines der Proteine genauer untersucht und die Funktion/das Substrat der Proteasen bekannt.

Die *Cmm382*-Gene *sbtA*, *sbtB* und *sbtC* gehören der dritten Familie extrazellulärer Serinpeptidasen, der Subtilase-Familie (S8), an, die Größen von 1000-1200 AS aufweisen. Peptidasen dieser Gruppe zeichnen sich durch eine katalytische Triade aus Aspartat, Histidin und Serin (DHS) aus. Die Gene *sbtB* und *sbtC* (CMM_2536 und CMM_2535) befinden sich, im Gegensatz zum *sbtA*-Gen, nicht in der *chp*-Subregion, sondern in einem anderen Bereich im Genom, wo sie in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander liegen. Das Alignment der *Clavibacter*-Subtilasen zeigt neben dem Propeptid und der katalytischen Domäne eine zusätzliche am C-Terminus folgende 200-300 AS große Domäne, deren Funktion unbekannt ist, und die in homologen pflanzlichen Subtilasen (*Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis thaliana*) nicht vorkommt (s. Alignment, Seite 211). mRNA-Analysen der *sbt*-Gene zeigten 10 Tage nach Infektion der Pflanzen eine Reprimierung für *sbtA* und *sbtB*, während die Induktion von *sbtC* um das 1,7-fache erhöht war (Flügel et al., 2012).

Es handelt sich um extrazelluläre Subtilasen: Signalpeptide sind vorhergesagt, und SbtA, SbtB und SbtC sind im Sekretom von *Cmm* nachgewiesen (Savidor et al., 2012; Tews, 2012). Von besonderem Interesse sind diese Gene durch ihre hohe Ähnlichkeit zu den Subtilasen der Tomate SBT1, SBT2 und vor allem den P69-Proteinen (s. Kapitel 5, Einleitung). Bisher liegen

für diese Gene keine Mutanten vor, daher ist auch nichts vom Phänotyp den diese Gene erzeugen bekannt.

4. Funktionen von Peptidasen in der Pathogenese

Peptidasen, die von Organismen synthetisiert werden, können über Gewebsmazeration oder durch Interaktion mit dem Abwehrsystem des Wirts als Virulenzfaktoren fungieren und somit für die Pathogenität essentiell sein. Sie werden im Normalfall über verschiedene Sekretionssysteme ausgeschleust, wobei die bedeutendsten die Signalpeptid-abhängige Sekretion über das Sec- (Pugsley, 1993) bzw. Tat-System (*twin-arginine translocation*; Berks et al., 2005) und die Sekretion von Effektoren über das TypIII-Sekretionssystem (T3SS) der Proteobakterien sind (Bonas et al., 1993).

Sowohl Human- als auch pflanzenpathogene Pilze produzieren eine Vielzahl von Peptidasen, die für die Krankheitsausprägung verantwortlich sind. So konnte eine Serinprotease als Virulenzfaktor des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* identifiziert werden (Kolattukudy et al., 1993). Peptidasen könnten an der Degradation von Wirtsstrukturen beteiligt sein, so wie es für die Aspartylprotease des humanpathogenen Pilz *Candida albicans* (Erreger der Candidose) beschrieben wurde. Hier erleichtert die Protease den Angriff auf den Wirt, indem sie am Abbau des Cytoskeletts beteiligt ist (Borg von Zepelin et al., 1999). Die Expression einer Subtilisin-ähnlichen Protease (Mp1) von *Magnaporthe poae*, einem Pilzpathogen der Rasensorte Kentucky Bluegrass, erfolgt in infizierten Wurzeln und korreliert mit der Schwere der Krankheitssymptome (Sreedhar et al., 1999). *Stagonospora nodorum*, der Erreger der Blatt- und Spelzenbräune beim Weizen, exprimiert eine alkalische Trypsin-ähnliche Protease (SPN1). Die Protease ist an der Freisetzung von Hydroxyprolin (α -Aminosäure) aus der pflanzlichen Zellwand beteiligt und wird *in planta* während der frühen Phase der Interaktion exprimiert. Es wird vermutet, dass SPN1 an der Degradation der Wirtszelle während der Infektion beteiligt ist (Carlile et al., 2000). Eine extrazelluläre Serinprotease von *Colletotrichum coccodes*, die die Anthracnose der Tomate hervorruft, ist für die Pathogenität und Virulenz des Pilzes verantwortlich, denn eine Eliminierung der Proteaseaktivität verwandelt das Pathogen in einen nicht-pathogenen Endophyten (Redman & Rodriguez, 2002). Diese Protease hat somit einen ähnlichen Phänotyp wie die Serinprotease Pat-1 von *Cmm382*.

Peptidasen als Virulenzfaktoren wurden auch bei human- und pflanzenpathogenen Bakterien identifiziert. Das Gram-negative humanpathogene Bakterium *Serratia marcescens* produziert eine Serinprotease, die in der Pathogenität involviert ist (Molia et al., 1986).

Für *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, ein Gram-negatives Bakterium, das verschiedene Fäulniskrankheiten auslöst, ist eine extrazelluläre Metalloprotease identifiziert worden, die *in vitro* in der Lage war, das Kartoffellektin, ein Hydroxyprolin-reiches Glykoprotein, das in der Pathogenabwehr involviert ist, zu degradieren (Heilbronn et al., 1995). Eine weitere sekretierte Protease wird durch das *prtW*-Gen kodiert. Bei *prtW*-Deletions-Mutanten war die Fähigkeit zur Gewebemazeration um 40 % reduziert. Damit ist die Protease zwar nicht essentiell für die Pathogenität, doch sie erhöht die Intensität der Krankheitsentwicklung während des Infektionsprozesses (Marits et al., 1999). In *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Erreger der Adernschwärze bei Kohlgewächsen) sind eine Metalloprotease (PRT2) und eine Serinprotease (PRT1) identifiziert worden. Eine Mutante, der beide Proteaseaktivitäten fehlen, zeigte eine deutlich reduzierte Virulenz, wenn die Inokulation über die Wirtsblätter erfolgte (Dow et al., 1990).

In Proteobakterien wird u.a. ein spezialisiertes System, das TypIII Sekretionssystem (T3SS), das mit Ausnahme von *Xylella fastidiosa* (Simpson et al., 2000) und *Agrobacterium tumefaciens* (Cornelis & Van Gijsegem, 2000) in allen bisher untersuchten phytopathogenen Proteobakterien identifiziert werden konnte, zur Einschleusung von Virulenz-Effektorproteinen direkt in die Wirtszellen genutzt. Das T3SS durchspannt die innere und äußere Membran, und kann über einen Pilus direkten Kontakt zu Wirtszellen aufnehmen, in die dann Effektorproteine transloziert werden. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), das bei Paprika (*Capsicum annuum*) und Tomate (*Solanum lycopersicum*) die bakterielle Fleckenkrankheit auslöst (Bonas et al., 1993), sekretiert über das T3SS Effektorproteine, die in 39 sogenannte Xop-(*Xanthomonas outer protein*) Gruppen unterteilt werden können, und teilweise direkt in die Wirtszellen transloziert werden (White et al., 2009). Darunter befindet sich u.a. XopD, eine Cysteinprotease aus der Effektorprotein-Familie AvrRxv/YopJ, die das SUMO-Protein (*small ubiquitin like modifier*) der Tomate spaltet (Hotson et al., 2003). Bei SUMO handelt es sich um ein cytoplasmatisches Protein, das zur Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine gehört (Hanania et al., 1999). *In vivo* konnte die Hydrolyse SUMO-konjugierter Proteine durch XopD nachgewiesen werden. Vermutlich imitiert XopD die endogene SUMO-Isopeptidase, um in die Regulierung der Wirtsproteine,

während der *Xcv*-Infektion, störend eingreifen zu können (Hotson et al., 2003) und stellt somit einen Virulenzfaktor dar (Chosed et al., 2007). Der Nachweis des proteolytischen Abbaus von Wirtssubstraten durch Cysteinproteasen offenbart eine wichtige Strategie von Pathogenen die Physiologie von Pflanzen zu verändern (Hotson et al., 2003).

Pseudomonas syringae kann durch die Injektion von TypIII-Effektorproteinen in die Wirtspflanze, die Immunantwort der Pflanze unterdrücken (Block et al., 2011). Dies wird durch Interferenz der Effektorproteine mit pflanzlichen Rezeptoren, Blockierung von RNA-Signalübertragungswegen und der Veränderung von Organellfunktionen vermittelt (Block et al., 2011). Eine besondere Stellung nehmen dabei die Cysteinproteasen als Effektorproteine ein. HopPtoN, ist eine YopT-ähnliche Cysteinprotease (Shao et al., 2002), die die hypersensitive Reaktion, eine lokale Resistenzantwort der Pflanze, in der inkompatiblen Reaktion unterdrückt, indem sie in Signaltransduktionswege der Wirtspflanze eingreift (Lopez-Solanilla et al., 2004). Das Avirulenz-Gen *avrRpt2* von *Pseudomonas syringae* kodiert eine Cysteinprotease, die durch das T3SS in die Pflanzenzelle transloziert wird. Innerhalb der Pflanzenzelle erfährt die Protease eine N-terminale Prozessierung und verursacht die Spaltung des RIN4-Proteins von *Arabidopsis* (Axtell et al., 2003), wodurch die RPS2-vermittelte Resistenz moduliert wird (Mackey et al., 2003). Dieser Prozess erfordert dabei eine intakte katalytische Triade der Cysteinprotease (Chisholm et al., 2004).

Eine weitere Familie von *Pseudomonas syringae* TypIII-Effektorproteinen (AvrPphB-Familie) nutzt zur Lokalisierung der Cysteinproteasen in die Plasmamembran der Pflanzenzelle eine Acylierung-abhängige und -unabhängige Strategie, die für die Avirulenzaktivität von AvrPphB erforderlich sind. (Downen et al., 2009).

Neben Cysteinproteasen können auch andere Peptidasen für die Virulenz essentiell sein. *Pseudomonas aeruginosa*, ein humanpathogener Krankenhauskeim, synthetisiert eine Metalloprotease, die durch Spaltung von Elastin, Kollagen und Immunoglobulin IgG an der Virulenz beteiligt zu sein scheint (Neu, 1983). So spielt eine Aspartatprotease, die nicht über das T3SS sekretiert wird, in *Ralstonia solanacearum* eine wichtige Rolle bei der Virulenz in Kartoffel (Jeong et al., 2011).

Auch eine erfolgreiche Besiedlung von bakteriellen Symbionten von Pflanzen ist nur dann möglich, wenn die Abwehrreaktionen der Pflanze unterdrückt werden. Symbiotische Bakterien wie *Rhizobium* verfügen ebenfalls über ein T3SS. *Rhizobium* sp. NGR234 transloziert als Antwort auf Flavonoide (Ausmees et al., 2004) eine Vielzahl von

Effektorproteinen (z. B. NopL, NopP und NopT), die essentiell für die Nodulation sind (Skorpil et al., 2009). NopT ist eine funktionelle Cysteinpeptidase (CA Clan, Familie C58), die über das T3SS ausgeschleust wird, und Homologien zur YopT-AvrPphB Effektorfamilie aufzeigt (Kambara et al., 2009). NopT ist an der Ausbildung der Knöllchen beteiligt, kann aber auch bei der Expression in Tabakpflanzen eine hypersensitive Reaktion auslösen (Dai et al., 2008). In Aktinomyceten wie *Clavibacter* ist kein T3SS vorhanden. Ob sekretierte Proteasen eine ähnliche Funktion übernehmen, wie gerade für Gram-negative Pathogene beschrieben, ist bisher unbekannt.

5. Pathogen induzierte Pflanzenabwehr

Pflanzen sind einer Vielzahl von Schädlingen ausgesetzt. Dazu gehören neben Nematoden und Insekten auch Pilze und Bakterien. Obwohl Pflanzen kein Immunsystem besitzen, sind sie dennoch resistent gegenüber vielen pathogenen Organismen. In den meisten Pflanzen-Pathogen-Interaktionen kommt es zu keiner Krankheitsausbildung, da eine Kolonisierung nicht möglich ist (Heath, 2000). Neben einem passiven Schutz durch dauerhaft ausgebildete Strukturen wie Dornen, Behaarung und einer mehrschichtigen, wachsartigen Cuticula (Sitte & Strasburger, 1999), können z. B. konstitutiv synthetisierte antimikrobielle Verbindungen bzw. deren Vorstufen (Osbourn, 1996; Papadopoulou et al., 1999) freigesetzt werden. Neben diesen Mechanismen haben Pflanzen ein komplexes System entwickelt, um Pathogene über Effektormoleküle (Elicitoren) zu erkennen und dann deren Ausbreitung zu verhindern. Mikrobielle Strukturen, anhand derer die Pflanze die Anwesenheit eines Pathogens erkennt, werden als *pathogen-/microbe-associated molecular patterns* (PAMPs/MAMPs) bezeichnet. Bei den PAMPs/MAMPs handelt es sich zum Beispiel um Bestandteile der bakteriellen Zelle, wie Lipopolysaccharide (Dow et al., 2000; Zeidler et al., 2004), Flagellin (das Hauptprotein der Geißel) (Felix et al., 1999; Gomez-Gomez & Boller 2002), Harpine (He et al., 1993; Wei et al., 1992) oder Kälteschock-Proteine (Felix & Boller, 2003). Dazu zählen aber auch Pflanzenbestandteile, aus denen durch Bakterien Verbindungen freigesetzt werden, die normalerweise in der Pflanze nicht vorzufinden sind (Klarzynski et al., 2000; Yamaguchi et al., 2000). Werden die PAMPs/MAMPs durch Bindung an äußere Rezeptoren des Wirtes (PRRs: *pattern recognition receptors*) erkannt, werden weitere Abwehrmechanismen (PTI: *PAMP-triggered immunity*) induziert (Jones & Dangl,

2006; Bittel & Robatzek, 2007). Zusammen mit den passiven Barrieren werden PAMP-vermittelte Abwehrmechanismen als basale Resistenz bezeichnet (Sanabria et al., 2008; de Wit, 2007). Für viele phytopathogene Proteobakterien ist beschrieben, dass sie Effektormoleküle produzieren, die die Effekte der MAMPs induzierten Abwehrreaktion reduzieren oder unterdrücken (Jones & Dangl, 2006). Ist in diesem Fall das Pathogen in der Lage die basale Abwehrantwort zu überwinden, kommt es zu einer kompatiblen Interaktion. Diese Effektormoleküle werden als Avr-Proteine (**Avirulenz**) bezeichnet und zusammen mit weiteren bakteriellen Proteinen bei fast allen Gram-negativen phytopathogenen Proteobakterien über das TypIII Sekretionssystem (T3SS) in die Wirtszelle eingeschleust (Bonas & Lahaye, 2002). Dort werden sie durch ein bestimmtes korrespondierendes Produkt eines R-Gens (**Resistenz**) der Pflanze erkannt und gebunden (Gen-für-Gen-Hypothese; Flor, 1955 und 1971; Mackey et al., 2002). Durch die Bindung des Effektormoleküls wird ein breites Spektrum an Abwehrmolekülen induziert, die vielseitige Abwehrmechanismen aktivieren, und somit der Pflanze eine Resistenz gegenüber dem Pathogen verleihen (ETI: *effector-triggered immunity*). Rezeptoren, die in der Plasmamembran oder im Cytosol lokalisiert sind (Ebel & Scheel, 1997; Hammond-Kosack & Jones, 1997) können in fünf Proteinklassen unterteilt werden, wobei alle R-Proteine eine konservierte Nukleotid-Bindestelle besitzen. Die beschriebene inkompatible Interaktion beinhaltet neben der lokalen Resistenz (*hypersensitive response*, HR), die systemisch erworbene Resistenz (*systemic acquired response*, SAR) als auch die induzierte systemische Resistenz (*induced systemic resistance*, ISR). Bei entsprechender Kombination von *avr*-Gen und R-Gen wird die inkompatible Interaktion, bei Nichterkennung wird die kompatible Interaktion ausgelöst.

Die inkompatible Interaktion

Die Pathogenerkennung löst Signalprozesse aus, die Abwehrantworten auf lokaler und systemischer Ebene aktivieren. Die erste Reaktion der Pflanze auf einen Elicitor besteht in einer Veränderung der Permeabilität der Plasmamembran und führt zu einem Calcium- und Protoneninflux, während Kalium- und Chloridionen ausströmen (Ebel & Scheel, 1997). Dieser Ionenstrom scheint für eine effiziente Induktion des *oxidative burst* und der Aktivierung von Abwehrgenen notwendig zu sein (Jabs et al., 1997; Pugin et al., 1997). Calcium-permeable Kanäle in Tomatenprotoplasten, aktiviert durch den Art-spezifischen Elicitor von

Cladosporium fulvum, konnten bereits nachgewiesen werden (Gelli et al., 1997). Die Weiterleitung des Elicitorsignals vom Rezeptor zum Calciumkanal erfolgt dabei über GTP-Bindeproteine und Protein-Phosphorylierung/Dephosphorylierung (Legendre et al., 1992; Xing et al., 1997). Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid-Anionen (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikalen ($\bullet OH$) stellen eine zentrale Komponente in der Pathogenabwehr dar (Lamb & Dixon, 1997; Doke, 1997). ROS können dabei direkt toxisch auf Pathogene wirken (Baker & Orlandi, 1995) oder die Verstärkung der physischen Barrieren katalysieren, z.B. Lignifizierung (Tenhaken et al., 1995). Sie sind aber auch an der Signalweiterleitung späterer Abwehrreaktionen beteiligt, wie zum Beispiel der Aktivierung von Abwehrgenen, dem programmierten Zelltod (Jabs et al., 1996; Levine et al., 1996) als auch dem Schutz des gesunden Gewebes gegen ROS-Schädigungen (Levine et al., 1994). Die ROS-Produktion während des *oxidative burst* wird dabei von einer Plasmamembran-lokalisierten NAD(P)H Oxidase katalysiert (Pugin et al., 1997; Xing et al., 1997). Superoxid-Radikale stellen die ersten ROS dar und werden vermutlich durch eine extrazelluläre Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umgewandelt (Jabs et al., 1997; Abb. 4).

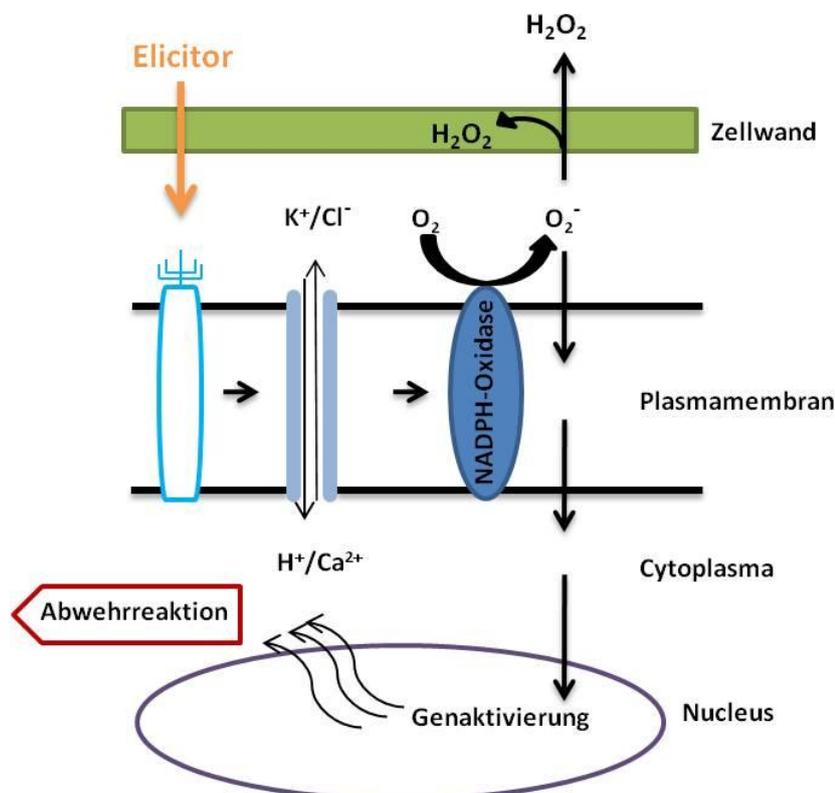


Abbildung 4: Hypothetisches Schema für eine Elicitor-induzierte Auslösung des *oxidative burst* (nach Jabs et al., 1997; modifiziert).

Die Akkumulierung von Wasserstoffperoxid führt zum Absterben von infizierten und benachbarten Zellen um die Infektionsstelle (Abb. 5, Position 2 und 4). Der Zelltod um die Infektionsstelle wird als Hypersensitive Reaktion (HR) bezeichnet. Eine Zellwandverstärkung des nekrotischen Gewebes durch eine vermehrte Lignin-oder Kallosesynthese (Thordal-Christensen et al., 1997) verhindert die Ausbreitung des pathogenen Organismus und dient somit dem Schutz der Pflanze.



Abbildung 5: Induktion der hypersensitiven Reaktion durch Infiltration eines Blattes mit verschiedenen *Cmm*-Stämmen auf *Mirabilis jalapa* (japanische Wunderblume). Position 1: PS-Puffer (Negativkontrolle), Position 2: *Cmm382*; Position 3: PS-Puffer, Position 4: *CMM101* (Aufnahme: Kerstin Mayer, Universität Bielefeld).

Nach einer erfolgten lokalen Resistenzantwort wird innerhalb mehrerer Tage nach Infektion (Ryals et al., 1996) in den benachbarten, aber nicht unmittelbar befallenen Pflanzenbestandteilen die Resistenz erhöht, um somit die Pflanze vor späteren Angriffen zu schützen. Diese systemisch erworbene Resistenz (SAR) ist gegen ein breites Spektrum an Pathogenen wirksam und benötigt hierfür das phenolische Signalmolekül Salicylsäure (Dempsey et al., 1999). Korrelierend mit der Aktivierung der SAR wird eine Vielzahl von *pathogenesis-related* (PR) Proteinen exprimiert, die *in vitro* eine antimikrobielle Wirkung besitzen, zum Beispiel in Form von hydrolytischen Aktivitäten an Zellwänden, Kontakttoxizität (van Loon et al., 2006) oder indem die gesteigerte Expression von PR-Proteinen dem Wirt eine erhöhte Resistenz verleiht (Morrissey & Osbourn, 1999). PR-Proteine werden sowohl durch die Signalmoleküle Salicylsäure als auch durch die Wachstumshormone Jasmonsäure und Ethylen induziert. Alle bisher bekannten PR-Proteine können in 17 Familien (PR-1 bis PR-17) klassifiziert (van Loon et al., 2006) werden (Tab. 3).

Familie	Mitglied	Funktion	Symbol
PR-1	Tabak PR-1a	Antifungale Aktivität	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tabak PR-2	β -1,3-Glucanase	<i>Ypr2</i>
PR-3	Tabak P, Q	Chitinase Typ I, II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3, Chia</i>
PR-4	Tabak R	Chitinase Typ I, II	<i>Ypr4, Chid</i>
PR-5	Tabak S	Thaumatococcus-ähnlich	<i>Ypr5</i>
PR-6	Tomate, Inhibitor I	Proteinase-Inhibitor	<i>Ypr6, Pis</i>
PR-7	Tomate P69	Endoproteinase	<i>Ypr7</i>
PR-8	Gurke, Chitinase	Chitinase Typ III	<i>Ypr8, Chib</i>
PR-9	Tabak, Lignin-bildende Peroxidase	Peroxidase	<i>Ypr9, Prx</i>
PR-10	Petersilie PR-1	Ribonuclease-ähnlich	<i>Ypr10</i>
PR-11	Tabak Klasse V	Chitinase	<i>Ypr11, Chic</i>
PR-12	Rettich Rs-AFP3	Defensin	<i>Ypr12</i>
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	Thionin	<i>Ypr13, Thi</i>
PR-14	Gerste LTP4	Lipid-Transfer Protein	<i>Ypr14</i>
PR-15	Gerste OxOa (Germin)	Oxalat Oxidase	<i>Ypr15</i>
PR-16	Gerste OxOLP	Oxalat Oxidase-ähnlich	<i>Ypr16</i>
PR-17	Tabak PRp27	unbekannt	<i>Ypr17</i>

Tabelle 3: Bekannte Familien von PR-Proteinen. (van Loon et al., 2006; modifiziert; <http://www.bio.uu.nl/~fytopath/PR-families.htm>).

Zu den PR-Proteinen gehören β -1,3-Endoglucanasen (PR-2) und Endochitinasen (PR-3, PR-4, PR-8 und PR-11), die pilzliche Zellwände hydrolysieren können und somit das Wachstum und die Ausbreitung des Pathogens limitieren können (Schröder et al., 1992; Hong et al., 2000; Jung & Hwang, 2000). Die kleinen (ca. 5 kDa) basischen cystein-reichen Defensine (PR-12) und Thionine (PR-13) weisen ein breites Spektrum an antibakteriellen und fungiziden Aktivitäten auf (Lay & Anderson, 2005; Thomma et al., 2001; Bohlmann, 1994; Epple et al., 1997). Die PR-9-Proteine sind ein besonderer Peroxidasen-Typ, die die Lignifizierung zur

Verstärkung der Zellwand katalysieren (Passardi et al., 2004) und somit die Resistenz gegen viele Pathogene erhöhen.

Die auffallendsten PR-Proteine der Tomate sind alkalische Subtilasen, die P69-Proteine (aus der PR-7 Familie), die durch Calcium aktiviert werden (Vera & Conejero, 1988; Tornero et al., 1996). Die Primärstruktur der P69-Proteine besteht aus drei Domänen. Ein 22 -Aminosäuren langes Signalpeptid, das für die Ausschleusung des Proteins zuständig ist, ein 92 - Aminosäuren großes Propeptid und ein 631 -Aminosäuren langes Polypeptid, das als katalytisch aktives Protein fungiert, aber auch aus mehreren Domänen aufgebaut ist (Tornero et al., 1996). Die P69-Familie ist eine Multigen-Familie (Tornero et al., 1997) bestehend aus den Proteinen P69A bis P69F, die in einem Cluster organisiert sind (Jordá et al., 1999, 2000). Die Expression der P69-Gene ist gewebsspezifisch und unterliegt entwicklungs- und umweltbedingten Signalen (Jordá et al., 1999, 2000). Die genaue Funktion der Gene P69A, P69D, P69E und P69F ist unklar, da die Expression konstitutiv und unabhängig eines Pathogenbefalls erfolgt. Die Sekretion und Akkumulierung der Proteinasen P69A und P69D in den extrazellulären Raum (Tornero et al., 1996) lässt vermuten, dass diese Enzyme an der Remodellierung der extrazellulären Matrix während des Zellwachstums beteiligt sind. Dagegen werden die Enzyme P69B und P69C nur systemisch nach einer Infektion z. B. mit dem Pathogen *Pseudomonas syringae* und beim Vorhandensein von Salicylsäure (Jordá et al., 1999) induziert, diese Peptidasen scheinen also eine wesentliche Komponente in der Pathogenabwehr darzustellen. Ein weiteres Indiz für die Wichtigkeit von Pflanzenpeptidasen für eine Abwehrreaktion ist die Inhibierung der P69B-Subtilase durch das Tomatenpathogen *Phytophthora infestans*. Dieser Organismus sekretiert einen Kazal-ähnlichen Proteaseinhibitor, dessen Expression während der Tomateninfektion hochreguliert ist, und der mit der P69B-Peptidase interagiert (Tian et al., 2005).

Die kompatible Interaktion

Sind pflanzenpathogene Organismen wie Bakterien und Pilze in der Lage die basalen Resistenzmechanismen der Pflanze zu überwinden, kolonisieren sie die Wirtspflanze und erzeugen Krankheitssymptome. Diese Interaktion eines virulenten Pathogens mit einer anfälligen (suszeptiblen) Pflanze wird als kompatible Interaktion bezeichnet. Die bakterielle Invasion der Pflanze umfasst verschiedene Interaktionen zwischen dem Pathogen und der

Wirtspflanze. Der bakterielle Angriff wird dabei durch die Adhäsion an die Pflanzenzelloberfläche eingeleitet. Dieser Angriff wird begleitet von der Freisetzung von Substanzen, die die Abwehrreaktion der Pflanze supprimieren und die Zellwand degradieren. Dies dient letztlich der Mikrobenvermehrung und zur Bereitstellung von Nährstoffen (Abramovitsch und Martin, 2004).

Neben Peptidasen, die oft für die Virulenz eines Pathogens verantwortlich sind, bilden Zellwand-hydrolysierende Enzyme wie Cellulasen, Endoglucanasen und Xylanasen eine Gruppe von Enzymen, die an der Pathogenität beteiligt sind und auch in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* vorkommen (Meletzus et al., 1993; Jahr et al., 2000). Außer Cellulose und Hemicellulose ist Pektin eine wichtige Komponente der pflanzlichen Zellwand und der Mittellamelle und ist oft das erste Angriffsziel eines Pathogens. Pektat-Lyasen können zu Gewebsmazerationen führen und stellen somit z. B. für das Pflanzenpathogen *Dickeya chrysanthemi* (PelC und PelE) einen essentiellen Virulenzfaktor dar (Ried und Collmer, 1986; Kita et al., 1996).

Neben der Hydrolyse wirtseigener Substrate, stellt die Unterdrückung der Immunabwehr der Wirtspflanze einen weiteren wichtigen Aspekt in der kompatiblen Interaktion dar. Während der Ausbildung einer kompatiblen Interaktion mit der Wirtspflanze, sekretiert der Pilz *Piriformospora indica* zahlreiche Effektorproteine, mittels deren das Pathogen in der Lage ist, die Abwehrreaktion der Pflanze aktiv zu unterdrücken. Dazu wird in Wurzeln die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und die Aktivierung von Abwehrgenen verhindert (Klute, 2011).

Die genauen molekularen Mechanismen, die bei der suszeptiblen Pflanze nach Pathogen-Infektion ablaufen, sind jedoch bis heute weitestgehend unerforscht.

In der *Clavibacter*-Tomaten-Interaktion scheint die Infektion der Tomate mit einer partiellen Aktivierung der basalen Abwehrreaktion verbunden zu sein (Beimen et al., 1992). Analysen der Genexpression der Tomate 4-8 Tage nach Infektion mit *Cmm* ließen auf eine verstärkte Synthese von PR-Proteinen, Extensinen und Proteinen schließen, die an der Synthese und Neutralisierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) oder an der Biosynthese von Pflanzenhormonen (Ethylen und Jasmonsäure) beteiligt sind (Balaji et al., 2008). Für Ethylen, das die Wirtsantwort reguliert, konnte eine entscheidende Rolle in der Krankheitsausprägung der kompatiblen Interaktion der Tomatenpflanze mit phytopathogenen Gram-negativen Bakterien bereits nachgewiesen werden (Lund et al., 1998). Tomatenmutanten mit einer verminderten Ethylensynthese, zeigten nach einer *Cmm*-

Infektion, eine deutliche Verzögerung in der Ausprägung von Welkesymptomen (Balaji et al., 2008; Balaji & Sessa, 2008). Demnach scheinen in einigen Wirts-Pathogen-Interaktionen Pflanzenhormone an der Ausbildung von Krankheitssymptomen beteiligt zu sein. Die Kolonisierung der Pflanze durch *Cmm* oder die Expression einiger Abwehrgene der Tomate, die nach Infektion des Wildtyps mit *Cmm* induziert werden, schienen durch die Mutation nicht beeinflusst zu werden (Balaji et al., 2008). So bleibt es in Zukunft noch zu klären, anhand welcher Mechanismen *Cmm* es schafft, trotz Aktivierung von Abwehrreaktionen bei der Wirtspflanze, diese erfolgreich zu kolonisieren.

Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte versucht werden, die vier verschiedenen Serinpeptidasen Pat-1, ChpC, ChpG und PpaC, deren Beteiligung an der *Cmm*-/Tomateninteraktion durch genetische Studien bereits gezeigt war, in aktiver Form zu reinigen, um anschließend Hinweise zu deren natürlichem Substrat zu erhalten.

Dazu sollte zunächst anhand des Sekretoms des Wildtypstammes *Cmm382* eine proteolytische Aktivität für Serinpeptidasen nachgewiesen werden. Da die zu untersuchenden Serinpeptidasen in der chromosomalen *chp*-Region lokalisiert sind, wurde vergleichend die Deletionsmutante CMM101 β 30-18, der diese Region fehlt, untersucht.

Anschließend sollten die Serinpeptidasen biochemisch charakterisiert werden. Hierzu sollten die Gene in *E. coli* überexprimiert und die rekombinant hergestellten Proteine verwendet werden, um die enzymatische Aktivität nachzuweisen. Dazu galt es deren enzymatischen Eigenschaften näher zu charakterisieren, und Aussagen über Substratspezifität und pH-Optimum zu erzielen.

Durch Komplementation der *chpG*-Mutante galt es zu überprüfen, ob das Ausbleiben der HR bei *Mirabilis jalapa* allein auf der Mutation in diesem Gen zurückzuführen ist. Dazu sollte die Komplementante erneut auf HR bei Nicht-Wirtspflanze getestet werden. Die Infiltration des nativen rekombinanten Proteins sollte zeigen, ob das ChpG-Protein die Funktion eines Elicitors zur Auslösung der hypersensitiven Reaktion (HR) besitzt.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob die Subtilisin-ähnlichen Serinpeptidasen SbtA, SbtB und SbtC eine Rolle in der Bakterien-Pflanzen-Interaktion spielen. Dazu wurden entsprechende Mutanten erzeugt und im Pflanzentest mit *Solanum lycopersicum* getestet, ob die Inaktivierung zu einem veränderten Phänotyp führt. Außerdem sollte getestet werden, ob Mutanten für die Auslösung der HR bei den Nicht-Wirtspflanzen *Mirabilis jalapa* und *Nicotiana benthamiana* zuständig sind und somit die Funktion eines Elicitors haben oder an der Bildung eines Elicitors beteiligt sind.

Material und Methoden

I Material

1. Bakterienstämme

Escherichia coli

Stamm	Genotyp, wichtige Eigenschaften	Referenz
DH5α MCR	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> λ ⁻ <i>recA1</i> , <i>gyrA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , <i>mcrA</i> , Δ(<i>lacXYA-argF</i>) ⁻ , U169Φ80Δ <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>mrr hsdMs mcrBC</i>)	Grant et al., 1990
WA337	F ⁻ , <i>dcm-6</i> , <i>dam-3</i> , <i>metβ1</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>lacY1</i> , <i>tsx-78</i> , <i>supE44</i>	Stammsammlung Wackernagel, Universität Oldenburg
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3)	Stratagene
BL21- CodonPlus®(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3) The [<i>argU</i> , <i>prol</i> , Cm ^R] [<i>argU ileY</i> , <i>leuW</i> Strep/Spec ^R]	Stratagene
ArcticExpress™(DE3) strain	F ⁻ , Tet ^R , <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>gal</i> (DE3), <i>endA</i> , The [<i>cpn10 cpn60</i> Gent ^R]	Stratagene

Tabelle 4: In der vorliegenden Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Cmm)

Stamm	Genotyp, wichtige Eigenschaften	Referenz
Cmm NCPPB382	virulent <i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate), pCM1 und pCM2	NCPPB382
CMM100	Curing-Derivat von Cmm NCPPB382, avirulent, plasmidfrei	Meletzus und Eichenlaub, 1991
CMM101	Curing-Derivat von Cmm NCPPB382, virulent, pCM1	Meletzus und Eichenlaub, 1991
CMM101 <i>chpCβ</i>	Cm ^R , <i>chpC::cmx</i> , pCM1	Gräfen, 2005
CMM101 <i>chpGβ</i>	Cm ^R , <i>chpG::cmx</i> , pCM1	Gräfen, 2005;
CMM101 <i>ppaCβ</i>	Cm ^R , <i>ppaC::cmx</i> , pCM1	Schott, 2004
CMM101 <i>chpGβ</i> - pHN216	Cm ^R , Kan ^R , <i>chpG::cmx</i> , pCM1, pHN216 <i>chpG</i>	diese Arbeit
CMM101 <i>sbtAα</i>	Cm ^R , <i>sbtA::cmx</i> , pCM1	diese Arbeit
CMM101 <i>sbtBα</i>	Cm ^R , <i>sbtB::cmx</i> , pCM1	diese Arbeit
CMM101 <i>sbtCα</i>	Cm ^R , <i>sbtC::cmx</i> , pCM1	diese Arbeit

Tabelle 5: In der vorliegenden Arbeit verwendete Cmm-Stämme.

2. Plasmide und Vektoren

Plasmid/Vektor	Relevante Eigenschaften	Referenz
pUC 13	Amp ^R , $\alpha\omega$ - <i>lacZ</i> Komplementationssystem	Vieira und Messing, 1982
pHN216	<i>E. coli-Clavibacter</i> -Shuttlevektor, Neo ^R , Gn ^R , Replikon von pCM2	Nakhei, 1993; Laine et al., 1996
pEC 70	Cm ^R , Km ^R , pK18mob mit 3,1 kb <i>HpaI/HindIII</i> -Fragment von pTP10 aus <i>Corynebacterium striatum</i>	Tauch et al., 1998
pJD4412	Gn ^R , Neo ^R , pCM2 <i>NcoI</i> -Fragment aus <i>pat-1</i> :pDM404	Dreier, 1995
pET22b(+)	Amp ^R , T7 lac, optional C-terminal His•Tag [®] , signal sequence for potential periplasmic localization	Novagen
pET23b(+)	Amp ^R , T7, optional C-terminal His•Tag [®] plus an N-terminal T7•Tag [®] , signal sequence for potential periplasmic localization	Novagen
pET22::<i>chpG</i>+<i>pelB</i>	Amp ^R , 840 bp <i>chpG</i> kloniert in pET22b(+)	diese Arbeit
pET22::<i>chpG</i>-<i>pelB</i>	Amp ^R , 837 bp <i>chpG</i> kloniert in pET22b(+)	diese Arbeit
pET22::<i>chpGoS</i>	Amp ^R , 749 bp <i>chpG</i> kloniert in pET22b(+)	diese Arbeit
pET22::<i>pat-1</i>+<i>pelB</i>	Amp ^R , 767 bp <i>pat-1</i> kloniert in pET22b(+)	diese Arbeit
pET22::<i>pat-1</i>-<i>pelB</i>	Amp ^R , 763 bp <i>pat-1</i> kloniert in pET22b(+)	diese Arbeit
pET22::<i>chpC</i>+<i>pelB</i>	Amp ^R , 886 bp <i>chpC</i> kloniert in pET22b(+)	diese Arbeit
pET23::<i>chpC</i>-<i>pelB</i>	Amp ^R , 883 bp <i>chpC</i> kloniert in pET23b(+)	diese Arbeit
pET23::<i>chpCoS</i>	Amp ^R , 787 bp <i>chpC</i> kloniert in pET23b(+)	diese Arbeit
pET22::<i>ppaC</i>+<i>pelB</i>	Amp ^R , 1032 bp <i>ppaC</i> kloniert in pET22b(+)	diese Arbeit
pET23::<i>ppaC</i>-<i>pelB</i>	Amp ^R , 1029 bp <i>ppaC</i> kloniert in pET23b(+)	diese Arbeit
pET23::<i>ppaCoS</i>	Amp ^R , 1025 bp <i>ppaC</i> kloniert in pET23b(+)	diese Arbeit

Tabelle 6: In der vorliegenden Arbeit verwendete Plasmide und Vektoren.

3. Enzyme und Chemikalien

3.1 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Restriktionsenzyme	Biolabs
α -Chymotrypsin	Promega
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
<i>Pwo</i> DNA Polymerase	Peqlab
<i>Taq</i> -Polymerase	(selbst isoliert)

Tabelle 7: In der vorliegenden Arbeit verwendete Enzyme.

3.2 Restriktionsendonukleasen und dazugehörige Puffer

Enzyme	Reaktionspuffer	Erkennungssequenz
<i>BsaA1</i>	NEBuffer3	PyAC/GTPu
<i>BglI</i>	NEBuffer3	GCCNNNN/NGGC
<i>BglII</i>	NEBuffer3	A/GATCT
<i>EcoRV</i>	NEBuffer3	GAT/ATC
<i>HindIII</i>	NEBuffer2	A/AGCTT
<i>NcoI</i>	NEBuffer3	C/CATGG
<i>NotI</i>	NEBuffer3	GC/GGCCGC
<i>NdeI</i>	NEBuffer4	CA/TATG
<i>NheI</i>	NEBuffer2	G/CTAGC
<i>KpnI</i>	NEBuffer1	GGTAC/C
<i>PstI</i>	NEBuffer3	CTGCA/G
<i>SacI</i>	NEBuffer1	GAGCT/C
<i>XhoI</i>	NEBuffer2	C/TCGAG

Tabelle 8: In der vorliegenden Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen, /: gibt die Position der Schnittstelle an, Py: Pyrimidin.

Enzymreaktionspuffer (10x konzentriert):

NEBuffer 1	10 mM Tris-HCl
	10 mM MgCl ₂
	1 mM Dithiothreitol
	pH 7,0

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

3.3 Chemikalien und Kits

Bezugsquelle	Chemikalien und Kits
Biozym	Agarose Seakem LE
Eurogentec, Equibio	Elektroporations-Küvetten (2mm Elektrodenabstand)
GibcoBRL	Select Agar, Select Tryptone 140, Select Yeast Extract
Macherey-Nagel	NucleoSpin Extract II Kit, Protino Potein Purification System
Qiagen	QIAprep Spin Miniprep Kit, Ni-NTA-Matrix
Roche	DIG DNA Labeling and Detection Kit, Nitrobluetetrazolium (NBT), 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylpyrophosphat (BCIP), Blocking Reagenz
Schleicher & Schuell	Nitrocellulose-Membran (Optitran BA-S 85)
Roth	Glucose, Glycerin, Glycin, Natriumchlorid, Tween 80, Acrylamid, Ammoniumperoxidisulfat, Bisacrylamid, Coomassie Brilliant Blue G250, IPTG, Natriumdihydrogenphosphat, Streptomycin, TEMED, Tris, Trypton, Dialyseschläuche

Serva	Bromphenolblau, Dithiothreitol
Sigma-Aldrich	Ampicillin, Chloramphenicol, EDTA, Mineralöl, Sorbitol, Tris-HCl, Betain, Imidazol, Sorbitol, Sodium-Dodecylsulfat, Chloramphenicol, Azocasein, Azoalbumin
Invitrogen	SeeBlue®Pre-Stained Standard
Whatmann	3 MM Papier
Chromogenix	S2288
Abcam	Anti-His Tag IgG (Maus), Anti-Maus IgG Alkaline Phosphatase (Ziege)

Tabelle 9: In der vorliegenden Arbeit verwendete Chemikalien.

3.4 Oligonukleotidprimer für PCR

Primer	Sequenz 5'→3'	Herkunft
<i>chpG +pelB</i> (pET22) fwd- <i>NcoI</i>	CATGCCATGGATTTGCCTGCTCGCCATCACACC	diese Arbeit
<i>chpG +pelB</i> (pET22) rev- <i>NotI</i>	ATAAGAATGCGGCCGCGTTGGCGGGTGCAGAGCTTG	diese Arbeit
<i>chpG-pelB</i> (pET22) fwd- <i>NdeI</i>	AAGTCTACATATGTTGCCTGCTCGCCATCACACC	diese Arbeit
<i>chpG -pelB</i> (pET22) rev- <i>NotI</i>	ATAAGAATGCGGCCGCGTTGGCGGGTGCAGAGCTTG	diese Arbeit
<i>chpG</i> ohne Signal (pET 22) fwd- <i>NdeI</i>	AAGTCTACATATGAACGGACTCAGCAACCCG	diese Arbeit
<i>chpG</i> ohne Signal (pET 22) rev- <i>NotI</i>	ATAAGAATGCGGCCGCGTTGGCGGGTGCAGAGC	diese Arbeit
<i>chpC+pelB</i> (pET22) fwd- <i>NcoI</i>	CATGCCATGGATATGTCAAAAACGCATTTTCGC	diese Arbeit
<i>chpC+pelB</i> (pET22) rev- <i>NotI</i>	ATAAGAATGCGGCCGCACGTGTCACGAGATTGTATTC	diese Arbeit
<i>chpC-pelB</i> (pET23) fwd- <i>NheI</i>	CTAGCTAGCATGTCAAAAACGCATTTTCGC	diese Arbeit
<i>chpC-pelB</i> (pET23) rev- <i>NotI</i>	ATAAGAATGCGGCCGCACGTGTCACGAGATTGTATTC	diese Arbeit
<i>chpC</i> ohne Signal (pET23) fwd- <i>NheI</i>	CTAGCTAGCACCGAGGGCGCCAGGCAG	diese Arbeit
<i>chpC</i> ohne Signal (pET23) rev- <i>NotI</i>	ATAAGAATGCGGCCGCACGTGTCACGAGATTGTATTCTC	diese Arbeit

<i>ppaC +pelB</i> (pET22) fwd- <i>NcoI</i>	CATG CCATGGAT ATGCGCAAGCTCCCTATATC	diese Arbeit
<i>ppaC +pelB</i> (pET22) rev- <i>XhoI</i>	CCG CTCGAG CTTCGTGAACGAGTCCACAG	diese Arbeit
<i>ppaC -pelB</i> (pET23) fwd- <i>NheI</i>	CTA GCTAGC ATGCGCAAGCTCCCTATATC	diese Arbeit
<i>ppaC -pelB</i> (pET23) rev- <i>XhoI</i>	CCG CTCGAG CTTCGTGAACGAGTCCACAG	diese Arbeit
<i>ppaC</i> ohne Signal (pET23) fwd- <i>NheI</i>	CTA GCTAGC GCGACACCTGACGTCTCCG	diese Arbeit
<i>ppaC</i> ohne Signal (pET23) rev- <i>XhoI</i>	CCG CTCGAG CTTCGTGAACGAGTCCACAG	diese Arbeit
<i>pat-1+pelB</i> (pET22) fwd- <i>NdeI</i>	GGAATTC CATATG GTAGACCGTATAGCCCGT	diese Arbeit
<i>pat-1+pelB</i> (pET22) rew- <i>NotI</i>	ATAAGAAT GCGGCCGC GGTCGCTAATATGTAATACG	diese Arbeit
<i>pat-1-pelB</i> (pET22) fwd- <i>BglII</i>	GA AGATCT TGTAGACCGTATAGCCCG	diese Arbeit
<i>pat-1-pelB</i> (pET22) rew- <i>NotI</i>	ATAAGAAT GCGGCCGC GGTCGCTAATATGTAATACG	diese Arbeit

Tabelle 10: Übersicht der konstruierten Oligonukleotidprimer zur Herstellung der Expressionsplasmide. Rot unterlegt: Restriktionserkennungssequenz, über die das PCR-Amplifikat in den *E. coli*-Expressionsvektor kloniert wurde.

3.4.1 Oligonukleotidprimer für *celA/pat-1* PCR

Primer	Gen	Sequenz 5'→3'	Größe des Amplifikats [bp]
PFC1	<i>celA</i>	GTCTGAGCTCTGGTACACAT	502
PRC3		TCGTCTCGAACTTCGTACCG	
P6	<i>pat-1</i>	CGTCAGGAGGTCGCTAATA	851
pat-1 fwd		GCTACTATGCAGTTCATGTC	

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotidprimer zum Nachweis von *celA* und *pat-1* in *Cmm*-Mutanten.

4. Nährmedien

Die Menge der einzuwiegenden Substanzen beziehen sich, wenn nicht anders angegeben auf 1000ml H₂O deionisiert.

TBY	10 g	Trypton
	5 g	Yeast-Extrakt
	5 g	NaCl
		pH 7,5
SB-Medium	10 g	Trypton
	5 g	Yeast-Extrakt
	2 g	NaCl
	16 g	Agar (für Festmedium)
		mit Millipore H ₂ O auffüllen auf 600ml
	91 g	Sorbitol
	20 ml	1M MgCl ₂
	5 ml	5M CaCl ₂
		mit Millipore H ₂ O auffüllen auf 400ml
		getrennt autoklavieren, abkühlen lassen (auf ca.50°C) und vereinigen
C	10 g	Trypton
	5 g	Yeast-Extrakt
	5 g	NaCl
	5 g	Glucose
		pH 7,5
SOC	20 g	Pepton
	5 g	Yeast-Extract
	3,9 g	Glucose
	0,6 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	2,5 g	MgSO ₄ x 7H ₂ O
	2,1 g	MgCl ₂ x 6H ₂ O
		pH 7,0
LB-Medium	10 g	Trypton
	5 g	Yeast-Extrakt
	1 g	NaCl
	2,5 mM	Betain
	1 M	Sorbitol
M9-Medium	6 g	Na ₂ HPO ₄
	3 g	KH ₂ PO ₄
	0,5 g	NaCl

1g	NH ₄ Cl	
Nach Autoklavieren Zugabe folgender Komponenten:		
20 ml	20 % Glucose	autoklaviert
2 ml	1 M MgSO ₄	autoklaviert
100 µl	0,1 M CaCl ₂	autoklaviert
2,5 µl	200 mg/ml Thiamin	sterilfiltriert
50 µl	10 mg/ml Nicotinsäure	sterilfiltriert
100 µl	Spurenelemente	sterilfiltriert
1 ml	30 mM Methionin	sterilfiltriert

4.1 Zusätze zu Nährmedien

4.1.1 Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Konzentration für <i>E. coli</i>	Konzentration für <i>Cmm382</i>
Ampicillin (Amp)	H ₂ O	150 mg/ml	-
Chloramphenicol (Cm)	70% Ethanol	50 mg/ml	30 mg/ml
Gentamicin (Gn)	H ₂ O	20 mg/ml	-
Kanamycin (Km)	H ₂ O	50 mg/ml	-
Neomycin (Neo)	H ₂ O	-	75 mg/ml
Streptomycin (Strep)	H ₂ O	75 mg/ml	-

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

4.1.2 Zusätze zu Nährmedien

Festmedium: 15 g Agar pro 1 L Medium

Spurenelementelösung (100ml)

0,2 g	Fe ₃ x 6H ₂ O
10 mg	CuCl ₂ x 2H ₂ O
10 mg	Na ₂ B ₄ O ₇ x 4H ₂ O
10 mg	(NH ₄) ₆ M ₆ O ₂₄ x 10H ₂ O
40 mg	ZnCl ₂ x 4H ₂ O
10 mg	MnCl ₂ x 4H ₂ O

5. Puffer und Lösungen

5.1 Puffer und Lösungen zur DNA -Isolierung

AKI	6,7 % 50 mM 1 mM	Saccharose Tris-HCl, EDTA	pH 8,0
CIA	Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 mischen		
TE (1x)	10 mM 1 mM	Tris-HCl, EDTA	pH 8,0
P1	50 mM 10 mM	Tris-HCl, EDTA	pH 8,0
P2	0,2 M 1 %	NaOH SDS	
P3	3 M	K-Acetat	pH 5,5
CsCl-gesättigtes Isopropanol	37 g CsCl lösen in 41 ml sterilem Millipore-H ₂ O add. 100 ml Isopropanol		
neutrales Phenol	in TE-Puffer äquilibriertes Phenol (von Roth verwendet)		pH 8,0
saures Phenol	pH 5,0 (von Roth verwendet)		

5.2 Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese

Agarose-Lösung	0,8-2 % Agarose in TBE-Gelpuffer (1x) auflösen		
Ethidiumbromidlösung	10mg/ml in bidest. H ₂ O		
Gel-Ladepuffer	0,03 % (w/v) 40 % 117mM	Bromphenolblau Glycerin EDTA	
TBE (10x)	108 g 9,3 g 55 g	Tris-Base EDTA Borsäure	mit H ₂ O bidest. auf 1l auffüllen

5.3 Lösungen zur Behandlung von Agarosegelen für Southern Blot

Depurinierungslösung (BlotI)	0,25 M	HCl
Denaturierungslösung (BlotII)	1,5 M 0,5 M	NaCl NaOH
Neutralisierungslösung (BlotIII)	1 M 0,02 M	NH ₄ -Acetat NaOH

5.4 Puffer und Lösungen für Southern Hybridisierungen

DIG-Blocking-Stammlösung	10 % (w/v)	DIG-Blocking-Reagenz in DIG 1
DIG-Färbelösung	45 µl 35 µl	NBT BCIP add. 10 ml DIG-Puffer 3
DIG-Hybridisierungslösung		DIG-Prähybridisierungslösung mit DIG-markierter DNA –Probe
DIG-Prähybridisierungslösung	5 x 5 % 0,1 % 0,02 %	SSC Blocking-Reagenz (Stammlösung) N-Laurylsarkosyl SDS
DIG-Puffer 1	0,1 M 0,15 M	Maleinsäure NaCl pH 7,5
DIG-Puffer 2	2 %	DIG-Blocking-Stammlösung in DIG 1
DIG-Puffer 3	100 mM 100 mM 50 mM	Tris-HCl NaCl MgCl ₂ pH 9,5
DIG-Waschpuffer		DIG 1 mit 0,3 % (w/v) Tween80
20x SSC	3,0 M 0,3 M	NaCl Na-Citrat pH 7,0

Waschpuffer I	2 x	SSC
	0,1 %	SDS
Waschpuffer II	0,1 %	SSC
	0,1 %	SDS

5.5 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

5.5.1 Kompartimenttest

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

5.5.2 Reinigung Polyhistidin-getaggtter Proteine

Lysepuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
		pH 8,0
Äquilibriumspuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
<u>Native Reinigung</u>		
Waschpuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	30 mM	Imidazol
		pH 8,0
Elutionspuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	250 mM	Imidazol
		pH 8,0

Denaturierende Reinigung

LEW-Puffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
		pH 8,0
Denaturing Solubilization Puffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	8 M	Urea,
		pH 8,0
Denaturing Elution Puffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	8 M	Urea
		pH 8,0

5.5.3 Phenolextraktion

Extraktionspuffer	700 mM	Saccharose
	500 mM	Tris
	50 mM	EDTA
	100 mM	KCl
Ammoniumacetat gelöst	100 mM	C ₂ H ₇ NO ₂ in Methanol
Aceton	80 %	
Rehydrierungspuffer	8 M	Harnstoff
	2%	CHAPS (w/v)

5.5.4 Dialyse des *E. coli*- und *Cmm382*-Kulturüberstandes und gereinigter rekombinanter Proteine

Phosphatpuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
		pH 8,0
TBS	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	3 g	Tris
		pH 8,0

TBS modifiziert	0,5 M 3 g	NaCl Tris pH 7,2
----------------------------	--------------	------------------------

5.5.5 Dot-Blot-Affinitätsreinigung von Antikörpern

Blockierpuffer	5 % (w/v)	Trockenmilchpulver in TBS	
TBS 2	50 mM 150 mM	Tris-HCl, NaCl	pH 7,5
Elutionspuffer	200 mM 500 mM 1 mg/ml	Glycin-HCl, NaCl BSA	pH 3,0
Neutralisierungspuffer	1 M	Tris-HCl,	pH 8,0

5.5.6 Kopplung von Antikörpern an CnBr-aktivierte Sepharose

Borat-Puffer	0,3 M	KCl	
(für 1,5 l)	0,1 M	Di-Na-Tetraborat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) mit HCl auf pH 8,0 einstellen	
HCl	10 mM	pH 4,0	
Acetatpuffer	0,1 M 0,3 M	Acetat KCl	
Ethanolamin (für 50 ml)	3 ml (konz.)+	47 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{MP}}$ mit HCl auf pH 8,0 einstellen	
CMF-PBS (für 1 l)	8g 0,2 g 1,44 g 0,24 g	NaCl KCl Na_2HPO_4 KH_2PO_4	auf pH 7,3 einstellen
Lagerpuffer	1 M 0,5 M 0,02 %	Tris-Glycin NaCl Natriumazid	pH 8,0

5.5.7 Immunpräzipitation

Equilibrierungs- und Waschpuffer (TBS)	8 g	NaCl	
	0,2 g	KCl	
	3 g	Tris	pH 8,0
Equilibrierungs- und Waschpuffer (TBS, modifiziert)	0,5 M	NaCl	
	3 g	Tris	pH 7,2
Elutionspuffer	0,2 M	Glycin-HCl	
	0,5 M	NaCl	
			pH 3,0
Neutralisierungspuffer	1 M	Tris-HCl,	pH 8,0

5.5.8 Puffer zum Ansetzen chromogener Substrate

PBS (100 mM)	5,84 g	NaCl	
	7,45 g	KCl	
	13,6 g	KH ₂ PO ₄	
	17,79 g	Na ₂ HPO ₄	
			auf gewünschten pH-Wert einstellen mit Millipore auf 1 L auffüllen
Tris	100 mM	Tris-HCl	auf gewünschten pH-Wert einstellen

5.6 Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

RB-Stammlösung (10x)	121 g	Glycin	
	75 g	Tris	
			mit H ₂ O auf 1L auffüllen
RB-Gebrauchslösung	100 ml	RB-Stammlösung	
	10 ml	10 % SDS	
			mit H ₂ O auf 1L auffüllen
Färbelösung	25 %	Isopropanol	
	10 %	Essigsäure	
	1 %	Coomassie Brilliant Blue G 250	

Entfärber	25 %	Isopropanol
	10 %	Eisessig
Probenpuffer	10 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	1 M	β -Mercaptoethanol
	6 %	SDS
	12 %	Glycerin
	0,2 %	Bromphenolblau

5.6.1 Puffer und Lösungen für MALDI kompatible-Silberfärbung von Acrylamidgelen

Fixier-Lösung	50 %	(v/v) Methanol
	5 %	(v/v) Eisessig
Waschpuffer	50 %	Methanol
Sensitivierungs-Lösung	0,02 %	(w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$
Silbernitrat-Lösung	0,1 %	(w/v) AgNO_3
Entwickler-Lösung	0,04 %	(v/v) Formaldehyd
	2 %	(w/v) Na_2CO_3
Stopp-Lösung	5 %	(v/v) Essigsäure
Entfärbungs-Lösung	30 mM	$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
	100 mM	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
Wasch-Lösung	25 mM	Ammoniumbicarbonat

5.7 Lösungen für die 2-D-Gelelektrophorese

Equilibrierungspuffer	8 M	Harnstoff
	30 % (v/v)	Glycerin
	50 mM	Tris, pH 8.8
Zusätze (immer frisch ansetzen):	2 % (w/v)	DTT
	2,5 % (w/v)	IAA

10x SDS-Laufpuffer	1,91 M 1 % (w/v) 250 mM	Glycin SDS Tris, pH 8,8
Sealing-Solution	50 ml 250 mg 0,01 % (w/v)	10x SDS-Laufpuffer Agarose BPB
Fixierlösung	50 % 40 % 10 %	H ₂ O (deionisiert) Methanol Essigsäure
Färbelösung		
Lösung A	2 % 10 %	<i>ortho</i> -Phosphorsäure (85 %) (NH ₄) ₂ SO ₄
Lösung B	5 %	CBB G-250 (1 g in 20 ml H ₂ O lösen und ü/N rühren gekühlt lagern)

5.8 Lösungen für Westernblot

Blot I	300 mM 10 %	Trisbase Methanol
Blot II	30 mM 10 %	Trisbase Methanol
Blot III	40 mM 10 %	Capronsäure Methanol
TBS	50 mM 150 mM	Tris, pH 7,5 NaCl
Blocking Puffer	5 % (w/v)	Trockenmilchpulver in TBS
TBS-Tween Puffer		TBS mit 0,1 % v/v Tween 80
Reaktionspuffer	100 mM 5 mM 100 mM	NaCl MgCl ₂ Tris HCl, pH 8,8

5.9 Lösung zur Konservierung von Zellen

PS-Puffer (1L)	7 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	5 g	NaCl
	3 g	KH ₂ PO ₄
		pH 7,0

6. Geräte

Tischzentrifuge, Centrifuge 5415 D, Firma Eppendorf
 Elektroporationsgerät, Gene Pulser, Firma Bio-RAD
 Kühlzentrifuge, 3-18K, Firma SIGMA
 French Pressure Cell Press, Firma AMINCO
 UV-VIS-Spektrometer, UV-1202, Firma Shimadzu
 Nanodrop[®], ND-1000 Spectrophotometer, Firma NanoDrop Technologies
 Speed Vac Concentrator SVC100H, Firma Savant
 Lyophylle, GE Healthcare
 Hybridisierungsöfen OV2, Firma Biometra
 Transilluminator VL, Firma Vilber Lourmat
 PCR-Gerät, Robocycler Gradient 96, Firma Stratagene

7. Pflanzensamen

Solanum lycopersicum (Mill.) cv. "Moneymaker";
 Herkunft: Erfurter Saatgut, N.L. Chrestensen, Erfurter Samen- und Pflanzenzucht GmbH
Mirabilis jalapa, gelbe Naturform (japanische Wunderblume);
 Herkunft: Botanischer Garten, Universität Halle, Nachzucht 1991
Nicotiana benthamiana, Gärtnerei Bielefeld

8. Software

Bezeichnung	relevante Eigenschaften	Hersteller/Referenz
BlastP	Vergleich von Aminosäuresequenzen mit Proteinsequenzen mit der NCBI Datenbank	Altschul et al., 1997
Clone-Manager 7.11	Erstellung und Bearbeitung von Plasmidkarten und weiteren DNA- aber auch Proteinsequenzen	Scientific and Educational Software
Clustal X	Programm zur Erstellung multipler Alignments von Aminosäuresequenzen	Thompson et al., 1997
GenDB 2.4	Genomdatenbank	Meyer et al., 2003

Graphical codon usage analyser	Online-Programm zum Vergleich der Codonbenutzung verschiedener Organismen	Thomas Schödel
SignalP 3.0 Server	Online-Programm zur Vorhersage von möglichen Signalpeptiden in Proteinen	Technische Universität von Dänemark
Uniprot-Datenbank	bioinformatische Datenbank für Proteine	European Bioinformatics Institute (EBI)
MEROPS	Online-Datenbank zur Analyse von Peptidasen	Rawlings et al., 2006

Tabelle 13: Verwendete Software.

II Methoden

1. Kultivierung von Bakterienstämmen

1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte auf festem oder flüssigem Medium, ggf. unter Zusatz entsprechender Antibiotika. Die Kulturausstriche auf Festmedien wurden über Nacht im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Flüssigmedien wurden im Erlenmeyerkolben über Nacht bei 37°C im Luftschüttler (200 U/min) inkubiert.

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

Cmm wurde auf festem oder flüssigem TBV-Medium oder C-Medium, ggf. unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika bei einer Temperatur von 25-28°C im Brutschrank oder auf dem Schüttler (120 U/min) über 3-4 Tage inkubiert. Nach der Elektroporation von *Cmm382* erfolgte die Anzucht auf SB-Medium. Für die Proteinisolierung aus M9-Medium wurde 1 L Kulturen verwendet und bei 26 °C für 24-48 h bis zu einer OD₅₈₀ von 2,5-3,0 angezogen.

1.3 Konservierung von Bakterienkulturen (Glycerinkultur)

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

1.4 Titerbestimmung von Bakterien in Flüssigkultur

Das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur kann durch photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 580\text{nm}$ überprüft werden. Als Referenz dient das jeweilige sterile Nährmedium, in dem die Bakterien angezogen wurden. Eine OD_{580} von 0,1 entspricht bei *Escherichia coli* einem Lebdtiter von 2×10^7 Zellen/ml, bei *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* entspricht eine OD_{580} von 0,1 einem Lebdtiter von 1×10^8 Zellen/ml.

2. DNA -Isolierung

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

- Bakterien von der Agar-Platte in ein Eppendorfggefäß überführen
- Pellet in 500 μl AKI-Lösung (mit 10 mg Lysozym/ml) resuspendieren
- 60-90 min bei 37°C inkubieren (gelegentlich invertieren)
- add. 250 μl 2 % SDS, 1min auf dem Vortex mischen
- add. 250 μl neutrales Phenol, auf dem Vortex mischen bis die Lösung milchig weiß ist
- 40 min bei 13000 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- wässrigen Überstand in ein neues Eppendorfggefäß überführen
- add. 250 μl CIA (Chloroform/Isoamylalkohol 24:1), mischen
- 20 min bei 13000 rpm zentrifugieren (Eppendorfgzentrifuge)
- Oberphase abnehmen und in ein neues Eppendorfggefäß überführen
- 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 7,5) zugeben, mischen
- vorsichtig mit 600 μl Isopropanol überschichten, nicht mischen
- an der Interphase ausgefallene DNA mit einer sterilen Glaspipette aufwickeln
- aufgewickelte DNA 1 min in 70 % Ethanol waschen
- Pipette dann in 98 % Ethanol überführen
- aufgewickelte DNA nochmals mit 70 % Ethanol waschen
- Pipette mit aufgewickelter DNA an der Luft trocknen lassen
- DNA in 50-200 μl H_2O bidest. lösen
- Lagerung der DNA bei 4°C

2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (nach Qiagen-Handbuch, 2001)

- Bakterien von der Agar-Platte in ein Eppendorfggefäß überführen
- Zellen in 250 μl Puffer P1 resuspendieren
- add. 250 μl Puffer P2, mischen
- add. 350 μl Puffer N3, sofort 4-6x invertieren
- 10 min bei 13000 U/min in der Eppendorfgzentrifuge abzentrifugieren
- QIAprep-Säule in Collection-Tube einsetzen

- Überstand auf die Säule geben
- 60 s bei 13000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- 500 µl Puffer PB auf die Säule geben
- 60 s bei 13000 U/min zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- 750 µl Waschpuffer PE auf die Säule geben
- 60 s bei 13000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- um Waschpuffer vollständig zu entfernen, Zentrifugation wiederholen, Durchlauf verwerfen
- Säule in ein neues Eppendorfgefäß einsetzen
- 50 µl Puffer EB auf die Mitte der Säule geben, 1 min bei RT inkubieren
- 60 s bei 13000 rpm zentrifugieren um DNA zu eluieren
- DNA bei -20°C lagern

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

- 1,5 ml ü/N-Flüssigkultur 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Eppendorf)
- Überstand entfernen
- Zellpellet in 200 µl P1-Puffer resuspendieren (alternativ: Zellen von einer Stocherplatte entnehmen und resuspendieren)
- add. 200 µl P2-Puffer, 4-6x invertieren, max 5min bei RT inkubieren
- 200 µl 4°C kalten P3-Puffer zugeben, sofort 4-6x invertieren
- 20 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- add. 600 µl Isopropanol, mischen
- Zentrifugation 30 min bei 13000 rpm
- Überstand entfernen
- Pellet mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol waschen
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- DNA-Pellet trocknen und in 50 µl H₂O bidest. oder 50µl TE-Puffer (pH 8,0) resuspendieren

3. DNA -Reinigung und -Denaturierung

3.1 Sephadex-Behandlung (zur Reinigung von Plasmid-DNA für die Elektroporation)

- Sephadex G50 Pulver in H₂O bidest. quellen lassen, autoklavieren
- silikonisiertes Glaskügelchen (Ø ca. 2,5 mm) in blaue Pipettenspitze geben
Silikonisierung: Glaskügelchen in Silikonisierungslösung bei 100°C für 1 h backen
- Pipettenspitze in Weichagarröhrchen stellen
- 800 µl Sephadex-G50-Lösung in Pipettenspitze überführen
- Röhrchen 15 min bei 3000 U/min (Megafuge) zentrifugieren
- Spitze in ein neues Weichagarröhrchen stellen
- DNA (mind. 30 µl) auf das Sephadex in der Pipettenspitze auftropfen

- 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- gereinigtes DNA-Eluat zur Elektroporation einsetzen

3.2 Reinigung von PCR-Produkten mit dem NucleoSpin Extract II Kit (nach Macherey-Nagel-Handbuch, 2004)

- add. 2 Vol. NT-Puffer zu 1Vol. PCR-Reaktionsansatz
- Säule in ein Collection-Tube einsetzen
- Probe auf die Säule geben
- 60 s bei 11000 x g zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf), Durchlauf verwerfen
- 600 µl Waschpuffer NT3 auf die Säule geben
- 60 s bei 11000 x g zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- noch mal 2 min bei 11000 x g zentrifugieren, um Waschpuffer vollständig zu entfernen
- Durchlauf verwerfen
- Säule in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- 15-50 µl Puffer EB auf die Mitte der Säule geben, 1min bei RT inkubieren
- 60 s bei 11000 x g zentrifugieren um DNA zu eluieren

3.3 Alkalische Denaturierung von Plasmid-DNA (Gartemann, 1992)

- 18 µl DNA-Lösung
- add. 2 µl 2 M NaOH, 2mM EDTA
- 5 min bei RT inkubieren
- 2 µl 2 M NH₄-Acetat, pH 4,6 ; mischen
- 75 µl 100 % Ethanol zugeben, invertieren
- 20 min bei -70°C
- 20 min bei 13000 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Pellet mit 200 µl 70 % (v/v) Ethanol waschen
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Pellet trocknen
- Pellet in H₂O resuspendieren und auf Eis lagern, schnell weiterverwenden

4. Techniken zur Charakterisierung von DNA-Molekülen

4.1 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltungen der Plasmid- und Gesamt-DNA wurden nach den für jede Restriktionsendonuklease spezifischen und vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Durch Zusatz der entsprechenden Menge an Reaktionspuffer (10fach konzentriert) wurde die optimale Reaktionsbedingung für jedes Enzym geschaffen. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte durch Inkubation bei 70°C für 10 min.

4.1.1 Hydrolyse von Plasmid-DNA

Volumen des Restriktionsansatzes: 20 µl

- 0,2-0,5 µg DNA (1-5 µl) in TE-Puffer (pH 7,5) oder H₂O bidest.
- add. 2 µl 10x Reaktionspuffer (1/10 des Gesamtvolumens)
- add. 0,5-1 µl Restriktionsendonuklease
- add. Millipore H₂O bis zum Gesamtvolumen von 20 µl
- 1-2 h, besser ü/N bei Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms inkubieren
- 20 min bei 70°C inaktivieren, wenn Hitzeinaktivierung möglich ist

4.1.2 Hydrolyse von Gesamt-DNA

Volumen des Restriktionsansatzes: 100 µl

- 10 µl Gesamt-DNA
- add. 10 µl 10x Reaktionspuffer (1/10 Vol. des Gesamtvolumens)
- add. 1 µl Restriktionsendonuklease
- add. 79 µl H₂O bidest.
- ü/N bei Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms inkubieren
- 20 min bei 70°C inaktivieren, wenn Hitzeinaktivierung möglich ist

4.2 Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wird zur Auftrennung und Charakterisierung von DNA-Molekülen nach Isolation, Restriktion oder Amplifikation eingesetzt. Aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste kann die DNA im elektrischen Feld wandern. Bei der Auftrennung im Agarosegel ist die Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von der Größe und Konformation (ss, ds, linear, oc, ccc) der DNA-Moleküle, der Agarosekonzentration und der Stärke des elektrischen Feldes. Die eingesetzte Agarosekonzentration von 0,8-2 % (w/v) richtet sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Moleküle bzw. der Restriktionsfragmente. Generell gilt, dass bei steigender Agarosekonzentration die Wanderungstrecke der DNA-Moleküle verkürzt wird.

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

Tabelle 14: geeignete Agarosekonzentrationen bzgl. der aufzutrennenden Fragmentgrößen. In dieser Arbeit wurde überwiegend 0,8 % Agarose verwendet. Für die Auftrennung der PCR-Produkte wurde 2 % Agarose benutzt.

- Agarose in TBE-Puffer unter Rühren aufkochen
- auf ca. 60°C abkühlen lassen
- in einen Gelträger gießen und Kamm einsetzen
- nach der Erkaltung des Gels (ca. 20 min) in eine mit TBE gefüllte Gelelektrophoresekammer einsetzen und Kamm entfernen
- DNA-Proben mit ca. 1/5 Volumen Gel-Lade-Puffer (5x) versetzen
- Geltaschen mit Proben beladen
- Auftrennung bei einer Spannung von 90-120 Volt für 1,5 bis 2,5 h
- Gel nach Beendigung der Elektrophorese 5-15 min mit Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) anfärben
- Gel wässern und unter UV-Licht ($\lambda = 302\text{nm}$) fotografieren

4.3 Bestimmung des Molekulargewichts von DNA

Die Mobilität von linearen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten ist bei der Gelelektrophorese umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molekulargewichte. Der Vergleich mit den Mobilitäten bekannter Größenstandards erlaubt eine Aussage über die Größen unbekannter DNA-Fragmente gleicher Konformation. Als Größenstandards dienen *PstI*- bzw. *EcoRI/HindIII*-Restriktionsfragmente des Phagen λ als Längen-Marker verwendet.

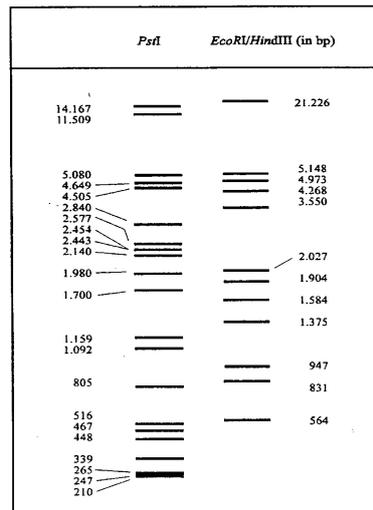


Abbildung 6: Restriktionsfragmente des Phagen λ , hydrolysiert mit *PstI* oder *EcoRI/HindIII* als DNA-Längenmarker.

4.4 Konzentrationsbestimmung von DNA mittels Nanodrop

Das Nanodrop ist eine Apparatur mit der die Konzentration einer wässrigen DNA-Lösung bestimmt werden kann. Vorteil zur herkömmlichen photometrischen Messung ist die geringere DNA-Menge, die zur Messung eingesetzt werden muss. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt über Messung der optischen Dichte bei 260nm gegen H₂O bidest. Die Reinheit der Proben wird durch den Quotient OD_{260/280} bestimmt.

Für doppelsträngige DNA gilt folgender Standardwert:

OD₂₆₀ = 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml.

Zur Bestimmung der Molarität von Nukleinsäuren wurde folgende Gleichung verwendet:

$$c[\mu\text{mol/ml}] = \frac{OD_{260} \cdot V \cdot F}{M_w \cdot L}$$

OD₂₆₀ = optische Dichte bei 260nm Wellenlänge

V = Verdünnungsfaktor (1)

F = Multiplikationsfaktor (50 für doppelsträngige DNA)

L = Länge in kb

M_w = Molekulargewicht je Basenpaar (660 g/mol)

5. Klonierung von DNA-Fragmenten

5.1 DNA-Restriktionsfragmentisolierung aus Agarosegelen mit dem NucleoSpin Extrakt II Kit (aus Macherey-Nagel Handbuch, 2004)

- DNA-Restriktionsfragment aus dem Agarosegel ausschneiden
- add. 200 µl Puffer NT pro 100 µg Gel, mischen
- 10 min bei 50°C inkubieren, alle 3min mischen
- Säule in Collection-Tube einsetzen
- Lösung auf die Säule geben
- 60 s bei 11000 x g zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf), Durchlauf verwerfen
- add. 600 µl Puffer NT3
- 60 s bei 11000 x g zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- nochmal 2 min bei 11000 x g zentrifugieren, um Waschpuffer vollständig zu entfernen
- Säule in ein neues Eppendorfgefäß einsetzen
- 50 µl Puffer NE oder H₂O bidest. in die Mitte der Säule geben, 1 min bei RT inkubieren
- 60 s bei 11000 x g zentrifugieren um DNA zu eluieren
- DNA-Lagerung bei -20°C

5.2 5'-Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (50 µl Volumen)

- 40 µl linearisierte Vektor-DNA (Spaltungsansatz)
- add. 5 µl 10x Phosphatase-Puffer
- add. 2,5 µl alkalische Phosphatase
- add. 2,5 µl H₂O bidest.
- für die Dephosphorylierung von *blunt-ended* DNA-Fragmenten 60 min bei 37°C inkubieren (ansonsten 10 min bei 37°C)
- Inaktivierung 10 min bei 72°C

Die Vektor-DNA kann direkt für die Ligation eingesetzt werden.

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

Vektor-DNA und Insert-DNA werden nach Restriktion mit geeigneten Restriktionsendonukleasen und anschließender Inaktivierung in einem geeigneten Verhältnis gemischt und durch den Einsatz einer Ligase ligiert. Das Verhältnis von Insert-DNA zu Vektor-DNA sollte 3:1 betragen.

Ligationsansatz:

- 20 µl PCR-Produkt
- 5 µl Plasmid-DNA (restringiert mit entsprechenden Enzymen)
- add. 3µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer (1/10 Vol.)
- 2 µl T4-DNA-Ligase
- mit H₂O bidest. auf 35 µl auffüllen
- ü/N bei 16°C ligieren
- 10 min bei 70°C inaktivieren

5.4 Shotgun-Klonierung

Bei dieser ungezielten Klonierung erfolgt die Ligation direkt nach der Restriktion von Vektor-DNA mit einem Gemisch von hydrolysierten DNA-Fragmenten. Nach Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen werden Vektor- und Insert-DNA im geeigneten Verhältnis gemischt.

6. DNA-Transfer

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

6.1.1 Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen (Cohen et al., 1972, modifiziert)

- 0,2 ml ü/N-Flüssigkultur in 40 ml TBY-Medium überimpfen
- Bakterien bei 37°C zu einem Titer von 2×10^8 Zellen (log-Phase) inkubieren
- 5min bei 6500 rpm (Rotor A8.24) und 4°C zentrifugieren, Überstand entfernen
- alle folgende Schritte werden bei 0-4°C durchgeführt, daher alle Lösungen auf Eis vorkühlen
- Pellet in 10 ml 100mM CaCl₂ resuspendieren
- 30 min bei 0°C inkubieren
- 5 min bei 6500 rpm (Rotor A8.24) und 4°C zentrifugieren, Überstand entfernen
- Pellet in 2 ml 100 mM CaCl₂ resuspendieren
- 5 min bei 6500 rpm und 4°C zentrifugieren, Überstand entfernen
- Pellet in 2 ml 100 mM CaCl₂ / 20 % Glycerin vorsichtig resuspendieren
- Zellen zu 100 µl in vorgekühlten Eppendorfgefäßen aliquotieren
- Lagerung bei -80°C

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

- 100 µl kompetente *E. coli*-Zellen auf Eis auftauen
- 25 µl des Ligationsansatzes bzw. 5 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA zugeben, mischen
- 20 min auf Eis inkubieren
- 1,5 min bei 42°C Hitzeschock
- 5 min auf Eis inkubieren
- add. 1 ml TBY-Medium zugeben, invertieren
- 45 min bei 37°C inkubieren
- 150 µl auf eine Nährplatte mit entsprechendem Selektionsmedium ausplattieren
- Restmenge 2,5 min bei 13000 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf), Überstand entfernen
- Pellet im Rücklauf resuspendieren
- Zellen auf einer weiteren Nährbodenplatte mit entsprechendem Selektionsmedium ausplattieren
- Inkubation ü/N bei 37°C

6.2 Elektroporation von *Escherichia coli*

6.2.1 Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen

- 250 ml TBY-Medium mit 2,5ml ü/N-Kultur animpfen
- Inkubation bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD₅₈₀= 0,5-0,75
- Zellsuspension 15 min auf Eis stellen
- alle weiteren Schritte auf Eis durchführen, alle Lösungen auf 0 °C vorkühlen
- 250 ml Kultur 15 min bei 6000x g zentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor A6.9, Firma Kontron)
- Überstand vollständig verwerfen
- Pellet in 5ml H₂O (Millipore) vorsichtig lösen
- add. 250ml H₂O (Millipore), mischen
- 15 min bei 6000 x g zentrifugieren (Rotor A6.9)
- Überstand abgießen, Zellen im Rücklauf resuspendieren
- Zellsuspension auf zwei 40 ml-Zentrifugenröhrchen aufteilen
- 25 ml 15 % eiskaltes Glycerin zugeben, mischen
- Zellen 15 min bei 7000 x g zentrifugieren (Rotor A8.24)
- Überstand abziehen
- Pellet in 1ml 15 % Glycerin resuspendieren
- Kompetente Zellen a 100 µl in vorgekühlte Eppendorfggefäße aliquotieren
- Lagerung bei -80°C

6.2.2 Elektroporation kompetenter *E. coli*-Zellen

Einstellungen des GENE Pulser (Firma Bio-RAD)

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

- kompetente Zellen auf Eis auftauen
- DNA und Elektroporations-Küvette (d= 2 mm) auf Eis vorkühlen
- 100 µl kompetente Zellen mit der zu transformierenden DNA vermischen und in die Elektroporations-Küvette geben
- Küvette sorgfältig abtrocknen, in die Apparatur stellen und Puls auslösen
- Sofort danach 1 ml SOC-Medium in die Küvette geben, mischen
- Suspension in ein Eppendorfggefäß überführen
- Zellen 1 h bei 37°C regenerieren lassen
- 100 µl auf antibiotikahaltigem Selektionsmedium ausplattieren
- Zellen 2 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet im Rücklauf resuspendieren und auf Selektionsmedium ausplattieren
- Inkubation ü/N bei 37°C

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

6.3.1 Herstellung kompetenter *Cmm*-Zellen (Kirchner et al., 2001)

- 250 ml flüssiges TBY mit *Cmm* animpfen
- Inkubation im Schüttler bei 25°C ü/N bis zu einer $OD_{580} = 1-1,2$
- mit TBY auf $OD_{580} = 0,3$ verdünnen
- 218,5 ml dieser Verdünnung in neuen Kolben überführen und bei 25°C bis zu einer $OD_{580} = 0,6$ inkubieren (2-2,5 h)
- add. 31,5 ml 20 % (w/v) Glycin (entspricht einer Glycin-Endkonzentration von 2,5 %) alternativ: add. 15,75 ml 20 % Glycin und 15,75 ml H₂O (entspricht einer Glycin-Endkonzentration von 1,25 %)
- 2 h bei 25°C inkubieren
- Zellsuspension in 500 ml-Zentrifugationsbecher überführen
- 10 min bei 6000 rpm zentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor A6.9, Firma Kontron)
- Überstand vollständig entfernen
- alle folgenden Schritte bei 4°C durchführen, alle Lösungen vorkühlen
- Pellet in 5 ml H₂O resuspendieren
- Suspension in 40 ml-Zentrifugationsbecher überführen
- add. 25 ml H₂O bidest., vortexen
- 10 min bei 8000 rpm zentrifugieren (Rotor A8.24), Überstand entfernen
- Pellet in 1 ml H₂O bidest. resuspendieren
- add. 25 ml H₂O bidest.
- 10 min bei 8000 rpm zentrifugieren (Rotor A8.24)
- Überstand restlos abziehen
- Waschvorgang zweimal mit 10 % eiskaltem Glycerin wiederholen
- Überstand entfernen
- Pellet in 1 ml eiskaltem 15 % Glycerin resuspendieren
- Aliquots von 100 µl in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführen
- kompetente Zellen ü/N auf Eis im Kühlraum (4°C) lagern und am nächsten Tag verwenden oder bei -80°C lagern

6.3.2 Elektroporation kompetenter *Cmm*-Zellen mit Plasmid-DNA

Einstellungen des Gene Pulser (Firma Bio-RAD)

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

- pro Elektroporationsansatz ein Eppendorfgefäß mit 400 µl SB-Medium vorbereiten
- DNA und Elektroporations-Küvetten (d= 2 mm) auf Eis stellen
- 100 µl präparierte *Cmm*-Zellen auf Eis auftauen
- DNA (10 µl) mit den kompetenten Zellen mischen
- Suspension in die Elektroporations-Küvetten geben
- Küvette abtrocknen, in die Apparatur stellen und Puls auslösen

- sofort 150 µl SB-Medium zu den Zellen geben, mischen
- den Inhalt der Küvette in das Eppendorfgefäß mit dem restlichen SB-Medium geben
- 3 h bei 25°C inkubieren (Regeneration)
- Zellen auf SB-Selektionsmedium ausplattieren
- 3-6 Tage bei 25°C inkubieren

7. DNA-DNA-Hybridisierung

7.1 Markierung der Hybridisierungssonde (DIG-DNA Labeling-Kit der Firma Roche Diagnostics, Mannheim)

- 5 µl DNA mit 10 µl H₂O bidest. verdünnen
- 10 min bei 100°C inkubieren (Denaturierung)
- sofort auf Eis stellen
- auf Eis dazu geben:
 - 2 µl Hexanucleotid Mix (10x konz.)
 - 2 µl dNTP Labeling Mixture (je 1 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,65 mM dTTP und 0,35 mM DIG-dUTP)
 - 1 µl Klenow-Polymerase
- mischen und mind. 1h, besser ü/N bei 37°C inkubieren
- Reaktion durch 20 min Inkubation bei 70°C stoppen

7.2 Überprüfung der Markierungsreaktion (Dot Blot)

- 1 µl markierter Proben-DNA sowie markierte und nicht-markierte Kontroll-DNA (DIG-DNA Labeling Kit) auf eine Nylonmembran (Porablot NY) auftragen
- Bei RT trocknen
- 3-5 min im UV-Licht quervernetzen ($\lambda = 302 \text{ nm}$)
- 1min 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 (Schüttler)
- zweimal 15 min mit DIG-Waschpuffer waschen (Schüttler)
- 2 min mit DIG-Puffer 3 äquilibrieren
- Nylonmembran in DIG-Färbelösung (5 ml DIG-Puffer 3 mit 50 µl NBT/BCIP) im Dunkeln entwickeln
- Färbelösung abgießen und die Färbereaktion mit H₂O stoppen
- Membran trocknen und vor Licht geschützt aufbewahren

7.3 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

- Depurinierungslösung (Blot I) auf das Agarosegel geben
 - 5 min inkubieren, abgießen
 - zweimal 15 min in Denaturierungslösung (Blot II) inkubieren, Lösung abgießen
 - zweimal 15 min in Neutralisierungslösung (Blot III) inkubieren, Lösung abgießen
- Blot-Aufbau:
- Frischhaltefolie faltenfrei mit Klebeband auf der Tischoberfläche befestigen
 - Agarosegel blasenfrei mit der Oberseite nach unten auf die Folie legen
 - die Nylonmembran blasenfrei auflegen
 - 4-5 Lagen Whatmanpapier (mit Blot III angefeuchtet) darauf legen
 - auf 5-10 cm zugeschnittene Papierhandtücher auf das Whatmanpapier stapeln
 - den Blot-Aufbau von oben mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschweren
 - Transfer der DNA auf die Membran bei RT über Nacht
 - DNA auf der Nylonmembran 3-5 min im UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) quervernetzen
 - Membran zur Hybridisierung einsetzen

7.4 Prähybridisierung und Hybridisierung unter stringenten Bedingungen

- Hybridisierungszylinder mit H_2O (Millipore) füllen, Nylonmembran mit der DNA-Seite nach innen aufrollen und in Hybridisierungszylinder überführen
- H_2O (Millipore) abgießen
- add. 20 ml DIG-Prähybridisierungslösung
- mind. 2 h bei 68°C im Hybridisierungssofen inkubieren (Rollvorrichtung)
- Digoxigenin-markierte DNA-Probe (Sonde) zu 6 ml DIG-Prähybridisierungslösung geben und 10 min bei 100°C denaturieren
- Prähybridisierungslösung abgießen und sofort gegen Hybridisierungssonde austauschen
- ü/N bei 68°C im Hybridisierungssofen inkubieren (Rollvorrichtung)

7.5 Immunologische Nachweisreaktion unter stringenten Bedingungen

- Hybridisierungssonde abgießen und bei -20°C lagern (mehrmals wiederverwendbar)
- Membran im Hybridisierungszylinder zweimal 5 min bei RT mit 100 ml Wash I waschen (Rollvorrichtung), Lösung abgießen
- Membran im Hybridisierungszylinder zweimal 15 min bei 68°C mit 100 ml Waschpuffer II waschen (Rollvorrichtung), Lösung abgießen
- Membran mit einer Pinzette in eine Hybridisierungsschale überführen

(Während der Inkubation mit den folgenden Lösungen wird die Hybridisierungsschale auf einen Schüttler geschüttelt.)

- 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 + $2,5 \mu\text{l}$ Antikörper-Konjugat) 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
- Färbelösung (30 ml DIG-Puffer 3 mit 100 µl NBT/BCIP) hinzufügen
- im Dunkeln inkubieren bis Farbreaktionen auftreten
- Reaktion durch Zugabe von H₂O stoppen
- Membran trocknen und im Dunkeln aufbewahren

8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

8.1 PCR mit Gesamt-DNA oder Plasmid-DNA als Template

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine etablierte Methode, die es ermöglicht mittels einer DNA-Polymerase und spezifischen Oligonukleotid-Primern beliebige Nukleinsäureabschnitte zu amplifizieren. Als Template wird ungespaltene, ggf. verdünnte Gesamt-DNA oder Plasmid-DNA (Sequenzierklon) eingesetzt. Die PCR wurde zur Konstruktion der Expressionsplasmide für *chpC*, *chpG*, *ppaC* und *pat-1* durchgeführt. Die Zusammensetzung der Primer kann der **Tabelle 3.4** (s. Seite 33) entnommen werden. Für die PCR-Reaktion wird die Pwo-Polymerase Kit der Firma Peqlab verwendet.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (200 µl Volumen):

- | | | |
|---|------------------------------|----------------------------------|
| - | DNA | 5 µl Gesamt-DNA oder Plasmid-DNA |
| - | PCR-Puffer (10x) | 20 µl |
| - | dNTPs | 8 µl |
| - | fwd-Primer | 6 µl |
| - | rev-Primer | 6 µl |
| - | DMSO | 10 µl |
| - | <i>Pwo</i> -Polymerase | 4 µl |
| - | H ₂ O (Millipore) | 141 µl |
- Probe wird auf ein PCR-Stripe aufgeteilt (8 x 25 µl)
 - jeden Ansatz mit 25 µl PCR-Öl überschichten, um ein Verdampfen der Proben zu verhindern
 - die Amplifikation der DNA erfolgte im RoboCycler Gradient 96 (Firma Stratagene) nach folgendem Programm:

Zyklen	Dauer [min]	Temperatur [°C]
1	5	94
1	1	94
35 /40 (für <i>chpG+pelB</i>)	2	Annealingtemperatur
1	1`40	72
1	10	72

Tabelle 15: PCR-Programm zur Synthese von PCR-Produkten.

Die Annealingtemperatur richtet sich nach der Größe und dem GC-Gehalt der Gensequenz. Die ausgewählten Annealingtemperaturen und die Größe der erwarteten PCR-Amplifikate können folgender Tabelle entnommen werden:

<i>Cmm382</i>-Gen	Annealingtemperatur [°C]	Template DNA	Größe der PCR-Amplifikate [bp]
<i>chpG+pelB</i>	50 - 64	cmis2p0456h08	840
<i>chpG-pelB</i>	52 - 66	cmis2p0456h08	837
<i>chpGoS</i>	52 - 66	cmis2p0456h08 (1:10 verdünnt)	749
<i>chpC+pelB</i>	52 - 66	cmis2p0456d03 (1:20 verdünnt)	886
<i>chpC-pelB</i>	52 - 66	cmis2p0456d03 (1:20 verdünnt)	883
<i>chpCoS</i>	52 - 66	cmis2p0456d03 (1:10 verdünnt)	787
<i>ppaC+pelB</i>	52 - 66	Gesamt-DNA <i>Cmm382</i> (1:60 verdünnt)	1032
<i>ppaC-pelB</i>	52 - 66	Gesamt-DNA <i>Cmm382</i> (1:60 verdünnt)	1029
<i>ppaCoS</i>	52 - 66	Gesamt-DNA <i>Cmm382</i> (1:60 verdünnt)	1025
<i>pat-1+pelB</i>	63	Plasmid-DNA pJD4412 (1:10 verdünnt)	767
<i>pat-1-pelB</i>	63	Plasmid-DNA pJD4412 (1:10 verdünnt)	763

Tabelle 16: Optimale Annealingtemperatur und eingesetzte Template-DNA zur Amplifizierung der *Cmm382*-Gene. Zusätzlich angegeben ist die Größe der PCR-Amplifikate.

- Lagerung der PCR-Produkte bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung
- Charakterisierung der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese

8.2 PCR mit ganzen Zellen als Template-DNA

- Zellen mit einer gelben Spitze von der Agar-Platte abnehmen und in ein Eppendorfgefäß überführen
- add. 500 µl H₂O bidest., resuspendieren
- 5 min bei 8000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Zellen im Rücklauf resuspendieren
- 1 µl für PCR verwenden

8.2.1 *celA/pat-1*-PCR zur Überprüfung des Plasmidstatus

Als Template werden ganze Zellen der Subtilase-Mutanten zum Nachweis des Plasmidstatus (*celA/pat-1*) eingesetzt. Die Zusammensetzung der Primer kann der **Tabelle 3.4.1** (s. Seite 34) entnommen werden. Für die PCR-Reaktion wird die *Taq*-Polymerase verwendet.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (200 µl Volumen):

- PCR-Puffer (10x)	22,5 µl
- MgCl ₂ 25mM	27 µl
- DNTP-Mix 10mM	18 µl
- Primer	8,5 µl je Primer
- <i>Taq</i> -Polymerase	4,5 µl
- H ₂ O (Millipore)	96,6 µl
- DMSO	14,4 µl

- Ansatz wird auf ein PCR-Stripe aufgeteilt (je 25 µl)
- zu jedem Tube 1 µl Zellsuspension zugeben
- jeden Ansatz mit 25 µl PCR-Öl überschichten, um ein Verdampfen der Proben zu verhindern
- die Amplifikation der DNA erfolgte im RoboCycler Gradient 96 (Firma Stratagene) nach folgendem Programm:

Zyklen	Dauer [min]	Temperatur [°C]
1	3	94
1	1	94
30	1	Annealingtemperatur 56
1	1`30	72
1	10	72

Tabelle 17: PCR-Programm zur Synthese von PCR-Produkten.

Die Größe der erwarteten PCR-Amplifikate kann **Tabelle 3.4.1** (s. Seite 34) entnommen werden.

8.2.2 Nachweis des *chpG*-Gens in der Komplementante

Als Template werden ganze Zellen der *chpG*-Komplementante und der *chpG*-Mutante und Plasmid-DNA des Sequenzierklons zum Nachweis des *chpG*-Gens eingesetzt. Als Primerpaar wurden der *forward*- und *reverse* Primer, die auch schon zur Herstellung des *chpG*-Expressionsplasmids (*chpG*-pelB) eingesetzt wurden, benutzt. Die Zusammensetzung der Primer kann der **Tabelle 3.4** (s. Seite 31) entnommen werden. Für die PCR-Reaktion wird die *Pwo*-Polymerase Kit der Firma Peqlab verwendet.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (200 µl Volumen):

- PCR-Puffer (10x) 20 µl
 - dNTPs 8 µl
 - fwd-Primer 6 µl
 - rev-Primer 6 µl
 - DMSO 10 µl
 - *Pwo*-Polymerase 4 µl
 - H₂O (Millipore) 146 µl
- Ansatz wird auf ein PCR-Stripe aufgeteilt (je 25 µl)
 - zu jedem Tube 1 µl Template-DNA zugeben
 - jeden Ansatz mit 25 µl PCR-Öl überschichten, um ein Verdampfen der Proben zu verhindern
 - die Amplifikation der DNA erfolgte im RoboCycler Gradient 96 (Firma Stratagene) nach folgendem Programm:

Zyklen	Dauer [min]	Temperatur [°C]
1	5	94
1	1	94
35	2	Annealingtemperatur 52
1	1'40	72
1	10	72

Tabelle 18: PCR-Programm zur Synthese von PCR-Produkten.

Die Größe des erwarteten PCR-Amplifikats kann der **Tabelle 16** (s. Seite 60) entnommen werden.

9. Proteinbiochemische Methoden

9.1 Gewinnung von intrazellulären Proteinen mit der French Press

Bei dieser Apparatur wird durch Druckaufbau in der Kühlzelle das in der Zellsuspension befindliche Gas komprimiert. Die Öffnung der Auslasskapillare führt zu einem Druckabfall, der die Explosion der Gasblasen zur Folge hat und damit die umgebenden *Cmm*-Zellen aufbricht. Der Zellaufschluss erfolgt mit einer French Pressure Cell Press (Firma Aminco).

9.2 Methoden zur Gewinnung und Reinigung intrazellulärer rekombinanter Proteine

9.2.1 Anzucht und Induktion

- TBY- bzw. LB-Medium mit Übernachtskultur (20 ml bei 37 °C) überimpfen
- Kultur auf eine OD₅₈₀ von 0,4 einstellen und bis zu einer OD₅₈₀ von 0,7 bei 37 °C wachsen lassen (bei TBY ca. 3 h bei LB ca. 5-6 h)
- 1 ml der Kultur als nicht-induzierte Kontrolle in einem Eppendorfgefäß sammeln

- Induktion der Kultur mit einer 100 mM IPTG-Stammlösung auf eine beliebige Endkonzentration
- Inkubation der Kultur auf dem Schüttler: bei 37 °C für 3 h (bei BL21-Stämmen) bzw. bei 12 °C (*ArcticExpress*) ü/N
- 1 ml der induzierten Kultur in einem Eppendorfgefäß sammeln
- Bestimmung der optischen Dichte der nicht-induzierten und induzierten Zellen bei OD₅₈₀ (Bakteriendichte) und OD₄₅₀ (Proteinkonzentration)
- restliche Kultur bei 5000 g 15 min bei 4 °C zentrifugieren und das Pellet bei -20 °C bis zum Zellaufschluss mittels French Press lagern
- Zellen mit 2 ml Lysepuffer und 10 mM DTT resuspendieren
- Zellen (~10 ml) in der 3/8-Zelle (vorgekühlt bei 4°C) bei 138 MPa (900 psi) aufschließen
- Aufschluss je nach Viskosität 2 bis 3 mal wiederholen
- Lysat in der Kühlzentrifuge 45 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugieren (Rotor A8.24), um Zelltrümmer zu entfernen
- Überstand (lösliches Proteinextrakt) in ein neues Röhrchen überführen und Zentrifugation 2 mal wiederholen
- lösliche Proteinfraktion kann zur Reinigung der rekombinanten Proteine eingesetzt werden
- wird die lösliche Proteinfraktion direkt für den Enzymassay eingesetzt, wird das Zellpellet in Phosphatpuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0) gelöst

9.2.2 Zellschnellaufschluss für SDS-PAGE

- 1 ml Kontrollkultur (nicht-induzierte und induzierte Zellen) 3 min bei 13000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen
- zum Zellpellet SDS-Probenpuffer zugeben (zur Berechnung des benötigten Probenpuffers wird der gemessene OD₄₅₀-Wert mit 30 multipliziert)
- Proben 10 min bei 98 °C kochen
- 15 min bei 13200 rpm zentrifugieren

Die so behandelten Proben dienen zur Bestimmung einer erfolgreichen Induktion und Expression des rekombinanten Proteins mittels SDS-PAGE.

9.2.3 Ammoniumsulfat-Präzipitation von *E. coli*-Kulturüberständen (nach Green und Hughes, 1955)

- Kultur nach Zugabe von 10mM DTT in der Kühlzentrifuge bei 5000 rpm und 4 °C für 15 min abzentrifugieren
- Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen
- Überstand 30 min bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugieren
- zellfreien Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen und auf Eis stellen
- unter rühren die benötigte Menge an Ammoniumsulfat langsam zum Überstand dazugeben
- für 15 min auf Eis durchmischen
- auf Eis für 30 min inkubieren
- 20 min bei 4 °C bei 13000 g zentrifugieren

- Proteinpellet in möglichst in kleinem Volumen Phosphatpuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0) resuspendieren
- Dialyse gegen den gleichen Puffer bei 4 °C ü/N

Die Probe kann so für die Reinigung der rekombinanten Proteine verwendet werden.

9.2.4 Kompartimenttest

Der Kompartimenttest dient zur Überprüfung der Lokalisierung der rekombinanten Proteine in *E. coli*.

- je 1 ml Probe vor und nach der Induktion entnehmen
- 3 min bei 13200 rpm zentrifugieren
- Kulturüberstand abgießen und für die Kontrolle im SDS-PAGE aufheben
- Pellet in 50 µl Zellysepuffer resuspendieren
- 10 min auf Eis inkubieren
- 1 min bei 13200 rpm zentrifugieren
- Überstand (enthält periplasmatische Proteinfraction) für SDS-PAGE aufheben
- Pellet in 50 µl Waschpuffer resuspendieren
- 2x einfrieren (-18 °C) und auftauen
- 7 min bei 13200 rpm zentrifugieren
- Überstand (enthält lösliche Proteinfraction) für SDS-PAGE aufheben
- Pellet (enthält *inclusion bodies*) für SDS-PAGE aufheben

Je 15 µl der einzelnen Proteinfractionen und des nativen Kulturüberstandes mit 5 µl Laemmli-Puffer mischen und komplett für SDS-PAGE-Analysen einsetzen.

9.2.5 Reinigung Polyhistidin-getaggtter Proteine mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie (nach dem Macherey-Nagel Handbuch, 2003; modifiziert)

Unter nativen Bedingungen

- 250 µl Ni-NTA mit 500 µl Äquilibrierungspuffer waschen
- lösliche Proteinfraction zur Ni-NTA zugeben und 1h bei 4 °C inkubieren (unter schütteln)
- Säule mit 2 ml Puffer äquilibrieren
- Zugabe der Proteinfraction zur Säule und Lösung vollständig durchlaufen lassen
- Durchfluss sammeln
- Säule mehrfach mit 1 ml Waschpuffer (30 mM Imidazol) waschen (Fraktionen sammeln)
- Elution der Proteine mit 3x 250 µl Elutionspuffer (250 mM Imidazol) (Fraktionen sammeln)
- eluierte Proteine werden gegen Phosphatpuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0) ü/N bei 4 °C dialysiert

Unter denaturierenden Bedingungen

- das nach Zellaufschluss und Zentrifugation entstandene Zellpellet (*inclusion bodies*) mit 4 ml LEW-Puffer waschen
- Suspension bei 10000 g und 4 °C für 30 min zentrifugieren
- Pellet mit 2 ml Denaturing Solubilization-Puffer und 10 mM DTT resuspendieren
- *inclusion bodies* 1 h auf Eis rühren

- Suspension bei 10000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugieren
- Überstand mit Ni-NTA-Matrix versetzen und 1 h bei 4 °C schütteln
- Säule mit 2 ml Puffer äquilibrieren
- Überstand zur Säule geben und Lysat vollständig durchlaufen lassen
- Durchfluss sammeln
- Säule 3x mit 1ml Denaturing Solubilization-Puffer waschen (Fraktionen sammeln)
- Elution der Proteine mit 3x 500 µl Denaturing Elution-Puffer (Fraktionen sammeln)

Überprüfung der erfolgreichen Reinigung der His-getaggtten Proteine mittels SDS-PAGE.

9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Mengenangaben für ein Gel:

	17,5 % Trenngel	Sammelgel
30 % Acrylamid	4,38 ml	0,42 ml
1 % Bisacrylamid	0,55 ml	0,33 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,7	1,68 ml	-
1 M Tris-HCl, pH 6,8		1,43 ml
H ₂ O	0,80 ml	1,43 ml
10 % SDS	100 µl	30 µl
10 % APS	50 µl	17 µl
TEMED	10 µl	5 µl

- Glasplatten gut reinigen, mit Ethanol abreiben
- Glasplatten und Spacer zusammensetzen und mit Metallklammern festklemmen, mit 0,8 % Agarose abdichten
- Reagenzien für Trenngel zusammenpipettieren
- sofort nach Zugabe von APS und TEMED das Trenngel in die vorbereitete Glaskammer gießen, bis etwa 1 cm unter den Kamm vorsichtig mit Isopropanol überschichten
- polymerisieren lassen bis Kanten abgerundet sind (ca. 45 min)
- Reagenzien für Sammelgel zusammenpipettieren
- Sammelgel auf das Trenngel gießen, Kamm einsetzen und 1 h polymerisieren lassen
- Metallklammern entfernen (Gel kann mehrere Tage in feuchtem Milieu bei 4°C aufbewahrt werden)
- Kamm entfernen, Gummidichtung bzw. unteren Spacer entfernen
- SDS-PAGE Gel in Elektrophorese-Kammer setzen
- Kammer mit 1x RB-Puffer füllen, eventuell Luftblasen an der Unterkante des Gels entfernen
- Proben (1:1 mit Probenpuffer gemischt) 10 min bei 100°C aufkochen
- Proben anschließend 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren und auftragen
- Elektrophorese: 15 min 20 mA, anschließend 40 mA, bis der Farbmarker das untere Gelende erreicht hat
- Färben: 45 min in Färbelösung (Schüttler)
- Färbelösung abgießen, Gel mit H₂O abspülen und entfärben, der bis Hintergrund nahezu farblos ist (über Nacht)

9.3.1 Silber-Färbung kompatibel mit PMF-Analysen

Färbung

- Nach erfolgreicher Elektrophorese das Gel für 20 min in Fixierlösung fixieren
- Gel für 10 min in 50 % (v/v) Methanol waschen
- Gel für 10 min in H₂O bidest. Waschen
- Inkubation des Gels für 1 min in Sensitivierungs-Lösung
- Zweimaliges Waschen des Gels in H₂O bidest. für jeweils 1 min
- Gel in gekühlter (4 °C) Silbernitrat-Lösung für 20 min bei 4 °C inkubieren
- Silbernitrat-Lösung entfernen und das Gel zweimal für je 1 min mit H₂O bidest. waschen
- Gel in Entwickler-Lösung überführen und unter intensivem Schütteln inkubieren
- (wenn die Lösung gelb wird, muss diese gegen frische ausgetauscht werden)
- Die Entwicklung wird gestoppt, indem die Entwickler-Lösung gegen 5 % (v/v) Essigsäure ausgetauscht wird
- das Gel kann in 1 % Essigsäure bei 4 °C gelagert werden

Entfärben

Die Analyse Silber-gefärbter Proteine kann durch Entfernung von Silberionen vor dem Trypsinverdau hinsichtlich der Sensitivität deutlich verbessert werden (Gharahdaghi et al., 1999).

- Ausgeschnittene Proteinbande in Eppendorfgefäß überführen
- Entfärbungs-Lösung frisch herstellen (durch Mischung von 30 mM K₃[Fe(CN)₆] und 100 mM Na₂S₂O₃ im Verhältnis 1:1)
- 30-50 µl Entfärbungs-Lösung auf das Gelstück geben
- Gelstück unter Schütteln inkubieren, bis die Braunfärbung verschwindet
- Entfärbungs-Lösung entfernen
- Gelstück dreimal mit 25 mM Ammoniumcarbonat für 10 min unter gelegentlichem vortexen waschen

Das entfärbte Gelstück kann für den Trypsin-Verdau eingesetzt werden.

9.4 Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen

Durch SDS bekommen die Proteine eine negative Nettoladung und werden dadurch nur nach ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Nach Auftrennung der Proteine, lassen sich die Molekulargewichte der Proteine durch Vergleich eines mitgeführten Größenmarkers zuordnen.

Protein	Approximate Molecular Weights (kDa)				
	Tris Glycine	Tricine	NuPAGE [®] MES	NuPAGE [®] MOPS	NuPAGE [®] Tris Acetate
Myosin	250	210	188	191	210
Phosphorylase	148	105	98	97	111
BSA	98	78	62	64	71
Glutamic Dehydrogenase	64	55	49	51	55
Alcohol Dehydrogenase	50	45	38	39	41
Carbonic Anhydrase	36	34	28	28	n/a
Myoglobin Red	22	17	17	19	n/a
Lysozyme	16	16	14	14	n/a
Aprotinin	6	7	6	n/a	n/a
Insulin, B Chain	4	4	3	n/a	n/a

NuPAGE[®] Novex Bis-Tris 4-12% Gel
©1999-2002 Invitrogen Corporation. All rights reserved.

Abbildung 7: In dieser Arbeit verwendeter Proteinmarker. **A:** SeeBlue[®] (Invitrogen).

9.5 Westernblot

Semi Dry Fast Blot mit Elektrobloetter

- Whatman 3mm Filterpapier in Größe des Gels ausschneiden (18x)
- Nitrocellulose (FIRMA) in Größe des Gels ausschneiden
- Blotaufbau:
 - 6 Lagen Filterpapier in Blotpuffer I getränkt
 - 3 Lagen Filterpapier in Blotpuffer II getränkt
 - Nitrocellulose in Puffer II getränkt
 - Acrylamidgel
 - 9 Lagen Filterpapier in Blotpuffer III getränkt
- alle Lagen luftblasenfrei auf Blotter schichten
- Deckel schließen und mit Eisgefäß beschweren
- Spannungsgeber anschließen und für ca. 60 min. bei 60 mA blotten

9.6 Ponceaufärbung und Immunologischer Nachweis

- Nitrocellulosemembran nach Beendigung des Semi Dry Fast Blot ein- zweimal in bidest. H₂O waschen

Färbung mit Ponceaurot:

- 5 ml Ponceau-Lösung in 95 ml bidest. H₂O mischen
- Nitrocellulosemembran für ein bis zwei Minuten mit Ponceau anfärben
- danach kurz mit bidest. H₂O waschen
- Proteinbanden sind kräftig bis zart rosa gefärbt

Die Markerbanden können mit einem Bleistift markiert werden. Die Nitrocellulose kann zwischen zwei Folien kopiert oder eingescannt werden.

- zum Entfärben 5 ml Trisbase in 95 ml H₂O mischen
- darin die Membran für 2-5 min entfärben und danach kurz in in bidest. H₂O spülen
- Membran in Schale transferieren

- in 20 ml Blocking Puffer für 2h bei RT auf Schüttler inkubieren
- primären Antikörper (Anti-His-Tag, monospezifisch aus Maus, 1:2000) in Blocking Puffer zugeben
- Inkubation ü/N bei 4°C
- 3 x 5 min. mit TBS-Tween Puffer waschen
- 3 x 5 min. mit TBS Puffer waschen
- Sekundär-AK (Anti-Maus-IgG-AP; 1:10000) in Blocking Puffer verdünnen
- Inkubation für 2h bei RT
- 3 x 5 min. mit TBS-Tween Puffer waschen
- 3 x 5 min. mit TBS Puffer waschen
- Membran in 20 ml Reaktionspuffer transferieren
- 50 µl NBT/BCIP hinzugeben
- inkubieren bis Signale der gewünschten Stärke auftreten
- Reaktion mit H₂O stoppen
- Membran trocknen lassen

9.7 Proteinisolierung aus dem Kulturüberstand von *Cmm382*

9.7.1 Kultivierung von Bakterien

Zum Animpfen von M9-Medien wird zunächst eine Kultur von *Cmm382* in 20 ml TBY über Nacht bei 25 °C auf dem Schüttler (90 rpm) inkubiert. Die Übernachtskultur wird über zwei Waschstapfen gereinigt:

- zentrifugieren bei 5000 rpm für 10 min bei 4 °C
- Überstand verwerfen, Pellet in M9-Medium resuspendieren
- zentrifugieren bei 5000 rpm für 10 min bei 4 °C
- Überstand verwerfen, Pellet in 5 ml M9-Medium resuspendieren

Animpfen der Medien:

- 1 L Medium wird mit der ü/N-Kultur auf eine OD₅₈₀ von 0,05 eingestellt
- der Kolben kommt zum Inkubieren bei 25 °C für 24-48 h auf den Schüttler (120 rpm) bis zu einer OD₅₈₀ von 2,5 bis 3,0

9.7.2 Konzentrierung des Überstandes (für Westernblot- Analysen)

- Kultur in der Kühlzentrifuge bei 5000 rpm und 4 °C für 15 min abzentrifugieren
- Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen
- Überstand 30 min bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugieren
- zellfreien Überstand in Rundkolben überführen und bei -80 °C ü/N einfrieren
- Überstand lyophilisieren (bei 400 ml ca. 7 Tage)
- den trocknen Überstand in Extraktionspuffer lösen (bei M9-Medium in 60 ml)
- 30 min bei RT inkubieren
- Lösung auf 40 ml Zentrifugenröhrchen aufteilen (max. 15 ml)
- Zugabe von je 300 µl β-Mercaptoethanol und 15 ml gesättigtes Phenol

- gut vortexen und 30 min auf den Schüttler geben
- zentrifugieren bei 10000 rpm für 1h und 4 °C
- Phenolextraktion wiederholen bis keine Interphase mehr auftritt
- Phenolphase abnehmen und in ein neues 40 ml Zentrifugenröhrchen überführen
- Phenolphase mit gleichem Vol. Extraktionspuffer versetzen
- Zentrifugieren bei 10000 rpm für 30min bei 4 °C
- Phenolphase abnehmen und in ein neues 40 ml Zentrifugenröhrchen überführen
- Phenolphase mi 4x Vol. -20 °C Ammoniumacetat in Methanol versetzen
- Proteinfällung bei -20 °C (mindestens 4h ; besser ü/N)
- Zentrifugieren bei 13200 rpm bei 4 °C für 10 min
- Pellet 2x mit je 1ml Ammoniumacetat in Methanol waschen
- Pellet 2x mit je 1 ml 80 % Aceton waschen
- Überstand vollständig abnehmen und Pellet unter dem Abzug für 30 min trocknen lassen
- Pellet in 200 µl Rehydrierungspuffer lösen

9.7.3 Konzentrierung des Überstandes (für Immunpräzipitation)

- Kultur in der Kühlzentrifuge bei 5000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugieren
- Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen
- Überstand 30 min bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugieren
- zellfreien Überstand in Rundkolben überführen und bei -80 °C ü/N einfrieren
- Überstand lyophilisieren (bei 400 ml ca. 7 Tage)
- getrockneten Überstand in Millipore-Wasser lösen (ca. 10 ml)
- gelösten Überstand gegen TBS-Puffer ü/N bei 4° C dialysieren
- dialysierten Überstand sterilfiltrieren

Der so bearbeitete Kulturüberstand kann nun mit der Antikörper-Säule inkubiert werden.

9.7.4 Konzentrierung des Überstandes (für Enzymtests)

- Kultur in der Kühlzentrifuge bei 5000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugieren
- Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen
- Überstand 30 min bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugieren
- zellfreien Überstand in Rundkolben überführen und bei -80 °C ü/N einfrieren
- Überstand lyophilisieren (bei 400 ml ca. 7 Tage)
- getrockneten Überstand in Millipore-Wasser lösen (ca. 10 ml)
- gelösten Überstand gegen Phosphatpuffer ü/N bei 4° C dialysieren
- dialysierten Überstand sterilfiltrieren

Der so bearbeitete Kulturüberstand konnte nun für Enzymassays eingesetzt werden.

9.7.5 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration und Reinheit wird mit dem NanoDrop® ND-1000-Spektrometer und der NanoDrop® Software Version 3.1.0 ermittelt. Bei einer Wellenlänge von 280 nm wird die optische

Dichte der Probe gegen eine Referenz als Nullwert gemessen. Um die Reinheit (Kontamination mit DNA) zu überprüfen, wird das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Der Wert A_{260}/A_{280} sollte möglichst im Bereich von 0,6-0,7 liegen.

9.8 Enzymtest mit Azoprotein-Substraten (Azocasein/Azoalbumin) (nach Beynon & Bond, 2001)

- Herstellung einer 2 % Azoprotein-Substratlösung durch Lösen in den Reaktionspuffern PBS bzw. Tris (50 mM bzw. 100 mM)
- Lösung für 10 min bei 12000 x g zentrifugieren
- klaren Überstand abnehmen und in Enzymtests einsetzen
- Substrat- und Enzymlösung bei 26 °C äquilibrieren
- 250 µl des Substrats in ein Eppendorfgefäß überführen
- Assay durch Zugabe von 150 µl Enzymlösung starten
- Reaktionsgemisch bei 26 °C inkubieren (Die Inkubationszeit betrug in den hier durchgeführten Tests 5 bis 48 Stunden)
- als Kontrolle (Reagenz-Blindwert) wird ein Reaktionsgemisch hergestellt, bei dem die Enzymlösung durch den Reaktionspuffer ersetzt wird
- die Reaktion wird durch Zugabe von 1,2 ml einer 10 % Trichloressigsäure-Lösung gestoppt

Um den Einfluss aller eingesetzten Komponenten auf den zum Schluss gemessenen OD-Wert zu bestimmen, ohne dass Substrat durch die Enzymlösung umgesetzt wurde, wird ein zweiter Kontrollansatz (Enzym-Blindwert) pipettiert. Dabei ist die Reihenfolge, in der alle Reagenzien pipettiert werden, zu beachten:

- 150 µl PBS-Puffer
- 150 µl Enzymlösung
- 1,2 ml 10 % Trichloressigsäure
- 250 µl Substrat
- Nach Zugabe der Trichloressigsäure alle Reaktionsansätze 15 min bei RT stehen lassen, um eine vollständige Präzipitation zu gewährleisten
- Zentrifugation 5 min bei 8000 x g
- 1,2 ml des klaren Überstandes in ein Reagenzglas mit 1,4 ml 1 M NaOH überführen
- 1 ml der Lösung für die Bestimmung des Farbstoffgehaltes in eine Küvette überführen
- photometrische Messung des Farbumschlags bei OD_{440nm}
- Referenzwert: Unter Verwendung des *Cmm*-Sekretoms oder gereinigter rekombinanter Proteine wird die Enzymlösung durch den Phosphatpuffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0) ersetzt. Unter Verwendung der löslichen Proteinfraction der heterolog exprimierten Proteine werden die *E. coli* Proteine des Expressionsstammes, der das Expressionsplasmid **ohne** das jeweilige *Cmm*-Gen enthält, gelöst in Phosphatpuffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0) statt der Enzymlösung verwendet.

Als Nachweis eines erfolgreichen Substratumsatzes wird α -Chymotrypsin als Kontrolle mitgeführt. Für die Bestimmung der Enzymaktivitäten sind jeweils mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt worden.

9.9 Enzymtest mit S2288 (nach Chromogenix, 2009)

- Herstellung einer 6 mM/L Substratlösung (S2288) durch Lösen in Millipore-Wasser
- 200 µl Tris-Reaktionspuffer (100 mM) in ein Eppendorfgefäß überführen und für 4 min bei 26° C inkubieren
- Zugabe von 200 µl Enzymlösung
- Inkubation für 4 min bei 26° C
- Zugabe von 100 µl Substratlösung
- als Blankwert (Reagenz-Blindwert) wird ein Reaktionsgemisch hergestellt, bei dem die Enzymlösung durch den Reaktionspuffer ersetzt wird
- Reaktionsgemisch bei 26° C inkubieren (Die Inkubationszeit betrug in den hier durchgeführten Tests 5 bis 48 Stunden)
- Überführung der Proben in eine 1 cm Semi-Mikroküvette
- photometrische Messung des Farbumschlags bei OD_{405nm}
- Referenzwert: Unter Verwendung des *Cmm*-Sekretoms oder gereinigter rekombinanter Proteine wird die Enzymlösung durch den Phosphatpuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0) ersetzt. Unter Verwendung der löslichen Proteinfraction der heterolog exprimierten Proteine werden die *E. coli* Proteine des Expressionsstammes, der das Expressionsplasmid **ohne** das jeweilige *Cmm*-Gen enthält, gelöst in Phosphatpuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0) statt der Enzymlösung verwendet.

Als Nachweis eines erfolgreichen Substratumsatzes wird α-Chymotrypsin als Kontrolle mitgeführt. Für die Bestimmung der Enzymaktivität sind mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt worden.

9.10 Berechnung der Enzymaktivität

Die katalytische Aktivität eines Enzyms wird durch die Einheit „Unit (U)“ angegeben. Eine Unit entspricht der Enzymaktivität, die einen Umsatz von 1 µmol Substrat pro Minute katalysiert. Durch Messung der Absorption der Enzymprobe abzüglich der Absorption des Referenzwertes wird die Steigerung der Extinktion (ΔOD oder ΔE) ermittelt, die die Intensität der Färbung und damit indirekt den Substratumsatz widerspiegelt. Über die gemessenen OD-Werte (ΔE) kann die Stoffmenge an gebildetem Produkt (µmol pNA/ml) und somit letztlich die katalytische Aktivität der Enzymlösung berechnet werden. Die Berechnung der Enzymaktivität, die sogenannte Volumenaktivität (Units/ml Lösung) erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{U/ml Lösung} = \frac{\mu\text{mol Produkt} * \text{Gesamtvolumen}[ml]}{\text{Enzymvolumen}[ml] * \text{Zeit}[min] * \text{Küvettenvolumen}[ml]}$$

In den hier durchgeführten Tests entspricht die Stoffmenge des photometrisch quantifizierten Produkts der Menge an umgesetztem Substrat. Die Produktmenge (*p*-Nitroanilin; pNA) kann mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet werden:

$$OD = \varepsilon * c * d$$

OD: gemessene optische Dichte bei einer Wellenlänge des Absorptionsmaximums des gelösten Stoffes (S2288= Wellenlänge 405nm; Azocasein und Azoalbumin= Wellenlänge 440nm); ϵ : molarer Extinktionskoeffizient; dieser ist von der Wellenlänge abhängig und beträgt für *p*-Nitroanilin ($OD_{405nm} = 10200 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$; $OD_{440nm} = 3500 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$; (Perkampus, 1992); *d*: Schichtdicke der Küvette (1 cm)

Das bedeutet die im Photometer bestimmte optische Dichte (OD) für *p*-Nitroanilin ist direkt proportional zur Konzentration (*c*) von pNA. Da zudem das Substrat im Testansatz im großen Überschuss vorhanden ist, ist die Menge an gebildetem *p*-Nitroanilin ein direktes Maß für die Enzymaktivität.

$$c[\mu\text{mol/ml}] = \frac{\Delta OD}{\epsilon \cdot d}$$

Nach Berechnung der Produktkonzentration [$\mu\text{mol/ml}$] kann dieser Wert in die Formel zur Berechnung der Enzymaktivität eingesetzt werden. Die restlichen Angaben sind abhängig vom jeweiligen Enzymassay.

Für das chromogene Substrat S2288 gilt:

Gesamtvolumen Assay: 0,5 ml

Enzymvolumen: 0,2 ml

Zeit: 300 min bzw. 2880 min

Küvettenvolumen: 0,5 ml

Für die chromogenen Substrate Azocasein und Azoalbumin gilt:

Gesamtvolumen Assay: 2,6 ml

Enzymvolumen: 0,1125 ml (112,5 μl aus 1,2 ml klaren Überstand)

Zeit: 300 min bzw. 2880 min

Küvettenvolumen: 1 ml

Die spezifische Aktivität der Enzyme (Aktivität pro Masseneinheit, U/mg), d. h. das Verhältnis aus Volumenaktivität und Proteinkonzentration kann an dieser Stelle nicht berechnet werden, da die gemessene Proteinkonzentration sich nicht spezifisch auf die untersuchten Serinpeptidasen bezieht.

9.11 Xylemsaftgewinnung aus Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum*)

- Aussaat und Anzucht der Tomatenpflanzen in steriler Erde (Pikiererde)
- Pflanzen im Zwei-Blatt-Stadium (2 Wochen nach der Aussaat) entnehmen und in vorbereitete Pflanztöpfe (Durchmesser: 12 cm) mit steriler Topferde einpflanzen
- Anzucht der Pflanzen für 2 bis 4 Wochen im Pflanzenraum bei 40-50 % relativer Luftfeuchtigkeit im Tag-Nacht-Rhythmus bei 25°C (Tag 16 h bei 12000 Lux, Nacht 8 h im Dunkeln)
- Pflanzen ggf. nach zwei Wochen entnehmen und über Wurzelinfektion infizieren (s. 11.1), dann weiter im Pflanzenraum anziehen

- Pflanzen unterhalb des ersten Fiederblattes mit einem sterilen Skalpell abtrennen
- Schnittfläche mit autoklaviertem H₂O_{MP} abspülen und mit einem Kimwipe trocken tupfen
- Xylemsaft innerhalb der folgenden 1-2 h, je nach Verwendungszweck, von der Schnittfläche pipettieren
- bzw. für größere Proteinkonzentrationen den Xylemsaft über Zentrifugation des Sprosses gewinnen
- entnommenen Xylemsaft (ca. 2 ml aus ca. 30 Pflanzen) entweder auf Eis lagern und zur Proteingewinnung weiterverarbeiten oder bei -20 °C einfrieren

9.11.1 Proteingewinnung aus Xylemsaft für die 2-D Gelelektrophorese

- 750 µl Xylemsaft mit 750 µl gequollenem Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) versetzen (zur Bindung von Phenolen)
- 15 min. inkubieren aus Eis
- anschließend 3 x zentrifugieren für 30 min. bei 13000 rpm (zur Entfernung von PVPP)
- Zugabe des 4 x Volumens von 100 % Aceton
- Proteinfällung ü/N bei -20° C
- Zentrifugation der Proben
- Proteinpellet 3 x waschen mit 80 % Aceton
- lösen des Pellets in Rehydrierungspuffer (200 µl)

9.11.2 Enzymtest des *Cmm*-Sekretom und dem Xylemsaft der Tomate als Substrat

- 10 ml über Lyophilisierung konzentrierten Kulturüberstand ü/N bei 4 °C gegen Phosphatpuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0) dialysieren
- Kulturüberstand sterilfiltrieren
- 5ml sterilfiltrierten und mit PVPP behandeltem Xylemsaft ü/N bei 26 °C mit Kulturüberstand inkubieren (in Rollvorrichtung)
- Proteine über Acetonfällung präzipitieren
- Zugabe des 4 x Volumens von 100 % Aceton
- Proteinfällung ü/N bei -20° C
- Zentrifugation der Proben
- Proteinpellet 3 x waschen mit 80 % Aceton
- Pellet in Rehydrierungspuffer (200 µl) lösen

9.12 2-D-Gelelektrophorese

Isoelektrische Fokussierung

- 350 µl der Proteinprobe mit 5 µl DTT (28 %) versetzen und für 30 min auf dem Schüttler inkubieren
- 3,5 µl IPG-Puffer zugeben und 10 min bei 13200 rpm zentrifugieren

- Probe gleichmäßig auf dem Schlitten verteilen und Gelstreifen mit der Gelseite nach unten auflegen und mit 600 µl *Coverfluid* überschichten
-

IEF-Programm

Rehydration	12h 30 V (Step&Hold)
Fokussierung	1h 500 V (Step&Hold)
	1h 1000 V (Gradient)
	4h 8000 V (Gradient)
	6h 8000 V (Step&Hold)

Die Fokussierung war erfolgreich, wenn mindestens 65000 Vhs erreicht wurden. Nach der Fokussierung wird der Streifen in einer mit Parafilm verschlossenen Petrischale bei -80 °C eingefroren

Äquilibrierung

- den gefrorenen Streifen mit der Gelseite nach oben auf den Schlitten legen
- unter dem Abzug 2,5 ml 2 % DTT in Äquilibrierungspuffer auf den Streifen geben und 15 min auf dem Schüttler inkubieren
- DTT abnehmen
- unter dem Abzug 2,5 ml 2,5 % IAA in Äquilibrierungspuffer auf den Streifen geben und 15 min auf dem Schüttler inkubieren
- IAA abnehmen
- Streifen in 1-fach-SDS-Laufpuffer geben
-

SDS-Gelelektrophorese

- *sealing solution* vor Gebrauch aufkochen
- Streifen mit der Gelseite nach oben zwischen die Glasplatten schieben und mit *sealing solution* fixieren
- Gel läuft 20 min bei 7 W danach bei 15-20 W bis die Bromphenolfront ca. 95 % des Gels durchlaufen hat
- Gel 2h in Fixierlösung inkubieren
-

Färbung des Gels

- 500 ml Färbelösung (98 % Lösung A und 2 % Lösung B) über Nacht auf dem Schüttler inkubieren
- Vor Gebrauch mit 125 ml Methanol auffüllen und kräftig schütteln
- Gele ü/N auf dem Schüttler färben
- Färbelösung abnehmen
- mit Wasser ü/N entfärben

9.13 Tryptischer Verdau

Der tryptische Verdau wurde zur Identifizierung über MALDI-TOF-MS der aus *E. coli* gereinigten Proteine und der aus dem *Cmm*-Kulturüberstand gereinigten Proteine eingesetzt.

Trypsin ist ein Enzym, das die Peptidbindung von Proteinen hinter den Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet, sofern kein Prolin folgt. Die Massen der auf diese Weise erhaltenen Peptidfragmente können mittels MALDI-Analysen massenspektrometrisch bestimmt werden. Da für jedes Protein ein spezifisches Peptidmassenmuster aus bestimmten Peptidfragmenten entsteht, kann dadurch das Protein aus einer bestehenden *E. coli*- oder *Cmm*-Datenbank identifiziert werden. Für den tryptischen Verdau werden mit Trifluoressigsäure (TFA) gewaschene Eppendorfgefäße benötigt. Hierzu werden die Eppendorfgefäße unter dem Abzug mit 500 µl einer Lösung aus 0,1 % TFA und 60 % Acetonitril gewaschen. Diese Lösung wird anschließend vollständig entfernt und man lässt zusätzlich die Eppendorfgefäße über mehrere Tage unter dem Abzug abdampfen um TFA rückstandlos zu entfernen. Lyophilisiertes Trypsin (Promega) mit 200 µl Puffer versetzten und 15 min bei 30 °C aktivieren und anschließend bei -20 °C einfrieren.

- Proteinbande aus dem entfärbten SDS-PAGE Gel mit Skalpell ausschneiden
- Probe in ein mit TFA gewaschenes Eppendorfgefäß überführen, eventuell in kleinere Fragmente zerteilen
- Gelstücke waschen/äquilibrieren
 - 200 µl 30 % (v/v) Acetonitril in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat zugeben
 - 10 min leicht schütteln
 - Überstand abnehmen und werfen
- Gelstücke 30 min in der Speed Vac trocknen
- Gelstücke mit 15 µl Trypsinlösung (1 µl Trypsin + 14 µl 10 mM NH₄HCO₃) rehydratisieren und kurz zentrifugieren
- 30 min bei RT inkubieren
- 15-20 µl 10 mM NH₄HCO₃ zugeben (gegen Eintrocknen)
- ü/N bei 37 °C inkubieren
- Gelstücke 30 min in der Speed Vac trocknen
- 15-20 µl 50 % Acetonitril/ 0,1 % TFA zugeben
- Probe für die MALDI-Messung einsetzen oder bei -20 °C einfrieren

Für die Standardpräparation von Proteinen wird α-Cyano-4-Hydroxymethylsäure als Matrix verwendet. Hierfür wird eine Spatelspitze dieses Reagenz mit 400 µl TA-Lösung (67 % H₂O, 33 % CH₃CN, 0,1 % TFA) vermischt, gevortext und für 30 sec zentrifugiert. Für die Präparation werden 3 µl Probe mit 3 µl Matrix (Überstand) in einer Mikrotiterplatte vermischt.

9.13.1 Tryptischer Verdau der Serinpeptidase ChpG

Für den tryptischen Verdau von ChpG wurden 100 µl Enzymlösung (gereinigt, dialysiert, Proteinkonzentration: 0,23 mg/ml) mit 75 µl Trypsinlösung (5 µl Trypsin + 70 µl NH₄HCO₃) ü/N bei 37

°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in die Blätter der Testpflanze infiltriert. Änderungen des Blattgewebes im Bereich des Spritzenansatzes (Nekrosenbildung) wurde über 2- 3 Tage verfolgt.

9.14 Proteinidentifizierung über MALDI-TOF-MS und MASCOT

Proteine, die einem tryptischen Verdau unterzogen wurden, können mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert werden. Die mittels dieser Methode gewonnenen Massenspektren können anschließend mit dem Computerprogramm MASCOT mit der Datenbank von *Cmm* verglichen werden, so dass eine Zuordnung der zu analysierenden Proteine möglich ist.

10. Herstellung polyklonaler Antikörper gegen ChpC, ChpG, Pat-1 und PpaC

10.1 Antigengewinnung und Erzeugung des polyklonalen Antikörpers

Zur Gewinnung des Antigens für einen polyklonalen Antikörper gegen die rekombinanten Serinproteasen wurden die Proteine ChpC, ChpG, Pat-1 und PpaC in *E. coli* überexprimiert und über Nickel-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Die so gewonnenen Antigene wurden zur Immunisierung von Kaninchen als Auftragsarbeit an die Firma PINEDA Antikörperservice, Berlin übersandt. Nach der Überprüfung der Präimmunseren verschiedener Versuchstiere auf Antikörper gegen *Cmm*-Proteine mittels Western Blot, wurden geeignete Tiere ausgewählt und die Immunreaktion der Kaninchen über die Dauer von vier Monaten durch wiederholte Injektion der Antigene stimuliert.

Die Immunisierung verlief dabei nach folgendem Schema:

1. Tag: Primärimmunisierung, Applikation: intradermal mit „Freund´s complete adjuvant“

20. Tag: 1. Boost, Applikation: subcutan mit „Freund´s incomplete adjuvant“

30. Tag: 2. Boost, Applikation: subcutan mit „Freund´s incomplete adjuvant“

40. Tag: 3. Boost, Applikation: subcutan mit „Freund´s incomplete adjuvant“

61. Tag: 1. Blutentnahme

4. Boost

75. Tag: 5. Boost

90. Tag: Blutentnahme

Jeder weiterer Immunisierungsmonat (nach drei Monaten):

alle 14 Tage: Boost; Applikation: subcutan mit „Freund´s incomplete adjuvant“

alle 30 Tage: Blutentnahme

Die Immunisierung wurde nach 4 Monaten abgeschlossen. Nach Überprüfung einer erfolgreichen Immunisierung mittels Immunoblot-Analysen mit konzentriertem *Cmm382*-Kulturüberstand wurde die gesamte IgG-Fraktion durch die Firma PINEDA gereinigt. Zu diesem Zweck wurde erneut überexprimiertes und gereinigtes und denaturiertes Antigen (ChpC, ChpG, Pat-1 und PpaC) zur Verfügung gestellt. Über diese rekombinanten Proteine konnte eine Immunoaffinitätschromatographie zur Isolierung der monospezifischen IgG-Antikörper verwendet werden.

10.2 Analytische Dot-blot-Affinitätsreinigung von Antikörpern (nach Pineda, 2010; modifiziert)

- Ein oder mehrere Stücke Nitrocellulosemembran (1cm x 1cm) in einem 2 ml Eppendorfgesäß mit Proteinantigen-Lösung 30 min bei RT belegen
- Die Membran 5x 5 min mit Blockierpuffer waschen
- Die Membran ü/N bei 4 °C mit mind. 1 ml 1:10 mit Blockierpuffer verdünntes Antiserum inkubieren
- Nitrocellulosemembran mind. 3 x 5 min mit Blockierpuffer waschen
- zur Antikörper-Elution:
 - die Membran ca. 20 Sekunden in 1 ml Elutionspuffer eintauchen und 1 x vortexen
 - die Membran wieder rausholen
 - die Membran kann in Blockierpuffer bei 4 °C gelagert werden
 - die Antikörper-Lösung sofort mit 100-200 µl 1M Tris-HCl pH 8,0 neutralisieren
 - pH-Wert der Antikörper-Lösung überprüfen

Die gewonnene Antikörper-Lösung kann in der Regel in einer Verdünnung von 1:10 in Western Blot-Analysen eingesetzt werden.

10.3 Kopplung von Antikörpern an CNBr-aktivierte Sepharose 4B

- 0,5 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B mit 150 ml 10mM HCl für 15 min quellen lassen
- 1ml monospezifischen Antikörper in 15 ml 0,1 M Borat-Puffer (pH 8,0) geben
- HCl von Sepharose absaugen und Sepharose zur Proteinlösung geben, zwei Stunden bei RT in einer Säule schütteln
- Sepharose in ca. 150 ml Borat-Puffer waschen, Filtrat aufheben
- Sepharose mit 15 ml Ethanolamin (pH 8,0, 1M) versetzen und für zwei Stunden bei RT schütteln
- Sepharose mit 60 ml Acetat-Puffer und mit 60 ml Borat-Puffer in drei Durchgängen waschen
- abschließend mit 60 ml CMF-PBS waschen
- wird die Säule längere Zeit nicht benutzt wird die Sepharose mit 1M Tris-Glycin-Puffer (pH 8,0), 0,5 M NaCl, 0,02 % Natriumazid versetzt
- Säule senkrecht im Kühlschrank aufbewahren

10.4 Immunpräzipitation

- über CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelte AK mit 10ml TBS-Puffer äquilibrieren
- Inkubation des konzentrierten Kulturüberstandes (ca. 10 ml; s. 9.7.3) mit der AK-Säule ü/N bei 4° C unter leichtem Schütteln
- Waschschrift I: Säule mit 30 ml TBS waschen
- Waschschrift II: Säule mit 30 ml TBS waschen
- Waschschrift III: Säule mit 30 ml TBS waschen

Elution der nativen Proteine mit 4 x 0,5 ml Elutionspuffer (dabei den Puffer schnell mit einer Spritze durch die Säule drücken). Elutionsproben und Säule schnell mit Tris-HCl pH 8,0 (1M) neutralisieren.

Wird die Säule längere Zeit nicht benutzt wird die Sepharose mit 1M Tris-Glycin-Puffer (pH 8,0), 0,5 M NaCl, 0,02 % Natriumazid versetzt. Proben der Durchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktionen mit der SDS-PAGE analysieren.

11. Analyse des Pathogenitätsverhaltens von *Cmm*

11.1 Wurzelinfektion

- Aussaat und Anzucht der Tomatenpflanze mit steriler Erde
- Pflanzen im 1-Blatt-Stadium (ca. 2 Wochen nach der Aussaat) entnehmen und anhaftende Erde entfernen
- *Cmm* in sterilem Leitungswasser in einem Greiner-Röhrchen resuspendieren und eine OD_{580} von 8-9 einstellen
- 1 ml der Suspension in ein Eppendorfgefäß überführen
- Wurzel der Pflanzen verletzen und für 15 min in *Cmm*-Bakteriensuspension inkubieren (Anzahl der Pflanzen pro Eppendorfgefäß abhängig von der Größe der Pflanzen)
- Pflanzen in vorbereitete Pflanztöpfe mit steriler Erde einsetzen
- Anzucht der Pflanzen im Pflanzenraum bei 50-60 % relativer Luftfeuchtigkeit im Tag-Nacht-Rhythmus (Tag: 16 h bei 12000 Lux und 25 °C, Nacht: 8 h im Dunkeln und 19 °C)
- Welkesymptome täglich ermitteln

11.2 Ermittlung des Welkeindex und des Welkeverlaufs

Für die Ermittlung des Welkeindex wird eine Serieninfektion an den Tomatenpflanzen durchgeführt. Der Welkeindex des jeweils untersuchten Stammes beschreibt den Zeitraum, nach dem 50 % der infizierten Tomatenpflanzen Welkesymptome bzw. Sprossläsionen aufweisen. Die infizierten Pflanzen werden täglich auf Welkesymptome untersucht und der Welkeverlauf wird nach einem vierstufigen Schema protokolliert:

- „(+“ leichte/beginnende Welke
- „+“ deutliche Welke (mindestens ein deutlich welkendes Blatt)
- „++“ starke Welke ($\frac{2}{3}$ der Blätter welken)
- „tot“ so starke Welke, dass keine Photosynthese mehr möglich ist

11.3 Gewichts- und Größenbestimmung der Pflanzen

Die Tomatenpflanzen werden 28 Tage nach Infektion direkt über der Erde mit einer sterilen Schere abgeschnitten und zur Frischgewichtsbestimmung gewogen. Die Pflanzengröße wird von der Schnittstelle bis zum höchsten Punkt der Pflanze gemessen.

11.4 Kolonisationstest

Reisolierung von *Cmm* aus Pflanzenhomogenat

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

Berechnung des gewichteten Mittelwerts

Zur Berechnung des Bakterientiters einer Bakteriensuspension, wird eine Verdünnungsreihe der Suspension angelegt. Von geeigneten Verdünnungsstufen werden 100 µl auf den jeweiligen Bakterien entsprechenden Agar-Platten ausplattiert. Die Platten werden bei 25- 28°C (*Clavibacter michiganensis*) bebrütet und die Koloniezahl (*colony forming units*, cfu) wird bestimmt. Verdünnungsreihen sind immer mit Fehlern, die zum größten Teil aus Pipettierungsungenauigkeiten resultieren und sich von Verdünnungsstufe zu Verdünnungsstufe vervielfachen, behaftet. Folglich ist der cfu-Wert der niedrigsten Verdünnungsstufe, die noch ausgezählt werden kann, immer der Genaueste. Aus diesem Grund berechnet man nicht den arithmetischen Mittelwert der einzelnen Verdünnungsstufen sondern das gewichtete Mittel. Das bedeutet, dass die niedrigste ausgezählte Verdünnungsstufe mit 100 %, die nächste mit 10 %, die folgende mit 1 % usw. gewertet wird. Rechnerisch wird dies so umgesetzt, dass die Summe der ausgezählten Kolonien aller Verdünnungsstufen je nach Anzahl der einbezogenen Verdünnungsstufen durch 1,1 (2 Verdünnungsstufen), 1,11 (3 Verdünnungsstufen) oder 1.111 (4 Verdünnungsstufen) dividiert wird.

11.5 Test zur Auslösung der hypersensitiven Reaktion (HR) bei *Mirabilis jalapa* (gelbblühend) und *Nicotiana benthamiana*

- *Mirabilis jalapa* bis zu einer Größe von 30-60 cm anziehen (ca. 4 Wochen)
- *Nicotiana benthamiana* bis zu einer Größe von 30 cm anziehen (ca. 4-5 Wochen)
- Bakterien in sterilem PS-Puffer, pH 7.0 in einem Reagenzglas resuspendieren
- OD₅₈₀ von 8-9 einstellen
- Bakteriensuspension mit einer Spritze aufziehen
- Spritze (Durchmesser der Spritzenöffnung: 3 mm) an der Unterseite eines Blattes ansetzen und mit dem Finger von der Vorderseite des Blattes leicht dagegen drücken (Spritze nicht in unmittelbare Nähe eines Leitbündels ansetzen)

- mit mittlerem Druck die Bakteriensuspension aus der Spritze drücke, so dass die Suspension in das Blattgewebe (Interzellularraum) aufgenommen wird
- Pflanzen 2-3 Tage in einem Pflanzenraum, 50-60 % relative Luftfeuchtigkeit im Tag-Nacht-Rhythmus stellen (Tag: 16 h bei 12000 Lux und 25 °C, Nacht: 8 h im Dunkeln und 19 °C) und in diesem Zeitraum Änderungen des Blattgewebes im Bereich des Spritzenansatzes (Nekrosenbildung) verfolgen

Kapitel I. Aktivitätsnachweis der extrazellulären Proteasen von *Cmm382*

Im Genom von *Cmm* NCPPB382 wurden 24 extrazelluläre Serinproteasen aus drei Familie annotiert, zu denen der bekannte Virulenzfaktor Pat-1 gehört. Über genetische Studien konnte für einige dieser Proteasen (vor allem ChpC und ChpG) eine Beteiligung an der Bakterien-Pflanzen-Interaktion gezeigt werden (Gartemann et al., 2008; Stork et al., 2008). Allerdings ist bisher ist keiner dieser Proteasen biochemisch charakterisiert und ihr natürliches Substrat ist unbekannt. Durch Sekretom-Analysen von *Cmm382* ist mittlerweile gezeigt, dass zahlreiche dieser Proteasen bei Kultivierung in M9-Minimalmedium sekretiert werden (Tews, 2012; Savidor et al., 2012). Eine proteolytische Aktivität dieser Enzyme (auf Casein- oder Magermilch-Platten) konnte bislang nicht nachgewiesen werden (Burger et al., 2005), dementsprechend sollten diese Serinproteasen nicht einfach nur der Nährstoffversorgung dienen.

Daher wurden zum Nachweis der proteolytischen Aktivität der hypothetischen Serinproteasen Überstände einer NCPPB382-Kultur in M9-Medium (48 Stunden bei 26° C inkubiert) mit verschiedenen chromogenen Substraten (Azocasein, Azoalbumin und S2288) inkubiert. Generelle Protease-Modellsubstrate wie Azoalbumin und Azocasein sind viel genutzte Substrate zur Überprüfung einer enzymatischen Aktivität (Chui et al., 1992). α -Chymotrypsin wird der Gruppe der Serinpeptidasen (Clan PA(S)) zugeordnet und gehört ebenso wie Pat-1 und die Proteasen der Chp-Familie zur Subfamilie S1A. Es wurde somit als Kontrollsystem verwendet.

Da bisher keine Informationen darüber vorliegen, welche Proteine von den *Cmm*-Serinpeptidasen hydrolysiert werden, und auch unbekannt ist, nach welcher Aminosäure die Hydrolyse erfolgt, wurden zuerst verschiedene Modellsubstrate (Azocasein, Azoalbumin, und das Peptid S2288) getestet. Als Kontrolle wurde mit α -Chymotrypsin eine nachgewiesenermaßen gegen Azocasein (Sandeman et al., 1990) und Azoalbumin (Chiu et al., 1993) aktive, relativ unspezifische Protease verwendet (Perona & Craik, 1995).

Der Nachweis der proteolytischen Enzymaktivität beruht auf der Hydrolyse der Substrate durch Proteasen, die farbstoffmarkierte, chromogene Peptide freisetzen, wie erstmals von Charney und Tomarelli (1947) beschrieben. Um 1970 begann man mit der Herstellung

synthetischer Substrate zur Messung von Enzymaktivitäten. Diese sollten durch den Nachbau der Aminosäuresequenz eine ähnliche Selektivität wie die natürlichen Substrate eines Enzyms besitzen. In Anlehnung an die natürlichen Strukturvorbilder, durch stufenweise, racemisierungsfreie Synthese gewonnene und über eine Amidbindung mit einer chromogenen Gruppe (chroma (griechisch)= Farbe) versehene Polypeptidketten sind hochempfindliche, selektive Modelle von natürlichen Proteasesubstraten (Svendsen & Stocker, 1977). Von großer Bedeutung für den richtigen Einsatz chromogener Substrate ist die Spezifität und Selektivität bezüglich der verschiedenen Enzyme. Spezifität ist eine Eigenschaft des Enzyms und beschreibt Einschränkungen bei der Spaltung unterschiedlicher Substrate: Ein völlig spezifisches Enzym spaltet demnach nur ein ganz bestimmtes Substrat. In der Regel ist die Spezifität eines proteolytischen Enzyms jedoch nicht sehr hoch. Die meisten dieser Enzyme spalten unterschiedliche Substrate, wenn auch mit unterschiedlicher Geschwindigkeiten. Davon zu unterscheiden ist die Spezifität einer Protease an seiner Hydrolysestelle, z. B. ist Trypsin für Lysin und Arginin, Chymotrypsin für Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan spezifisch.

Am Peptid gebunden ist die chromophore Gruppe farblos, wird aber nach Abspaltung durch das Enzym farbig, z. B. im Falle von *para*-Nitroanilin gelb. Azofarbstoffe enthalten als farbgebende Gruppe ein oder mehrere Azogruppen, die über eine Stickstoff-Doppelbindung kovalent an die aromatischen Aminosäuren des Substrates gekoppelt werden. Die Azofarbstoffe sind im Gegensatz zum unverdauten Azosubstrat nicht durch Säure ausfällbar und färben nach Zentrifugation den Überstand gelblich. Die photometrische Messung des Farbstoffes wird bei der für das jeweilige Substrat optimalen Wellenlänge durchgeführt (Azocasein & Azoalbumin: 440 nm; S2288: 405nm). Dieser Wellenlängenbereich ist besonders geeignet, da das intakte Substrat keine Eigenabsorption aufweist, das Reaktionsprodukt (pNA) jedoch stark absorbiert. Da die Intensität der Farbreaktion und damit die Höhe des Substratumsatzes direkt proportional zur Enzymaktivität ist, bieten künstliche chromogene Substrate zuverlässige Möglichkeiten zur Aktivitätsbestimmung von Proteasen.

Im Falle von Azocasein (A2765, Sigma-Aldrich), das eine chemisch modifizierte Form des natürlich vorkommende Milcheiweißes darstellt, werden die Phenylalanin- bzw. Tryptophanreste der Aminosäurekette des Caseins durch chemische Addition von chromophoren Gruppen diazotiert. Bei Azoalbumin (A2382, Sigma-Aldrich), das aus Rinderalbumin (Fraktion V) hergestellt wird, ist das Substrat durch einen an Tyrosin- und

Histidinresten gekoppelten Farbstoff markiert. Aufgrund dieser chemischen Konfiguration sind diese synthetischen Substrate entwickelt worden, die einer breiten Palette von Endopeptidasen wie Trypsin und α -Chymotrypsin (Chiu et al., 1993) eine hydrophile Angriffsfläche bietet. Das Substrat S2288 (Chromogenix, Stockholm Schweden) ist ein für ein breites Spektrum von Serinproteasen spezifisches Substrat. Proteasen mit einer Arginin-Spezifität der Hydrolysestelle sind in der Lage dieses Substrat leicht umzusetzen (Abb. 8).

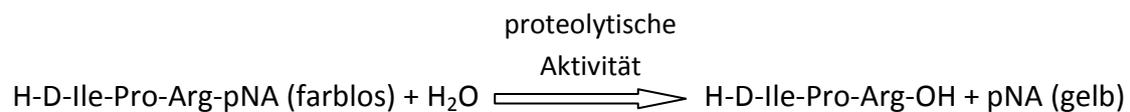


Abbildung 8: Prinzip der Freisetzung des Chromophors *p*-Nitroanilin (pNA) durch enzymatische Hydrolyse des Azofarbstoffes S2288.

Enzymaktivität der Proteasen aus verschiedenen *Cmm*-Kulturüberständen

α -Chymotrypsin (aus Rinderpankreas) spaltet Substrate hinter hydrophoben und aromatischen Aminosäuren (Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan; Northrop et. al., 1939). Gewählt wurde dieses Enzym als Kontrolle, da es zur gleichen Serinprotease-Familie gehört wie die Chp-Proteine von *Cmm382*. Zudem diente α -Chymotrypsin zur Überprüfung, ob das verwendete Testsystem funktioniert. Der Umsatz der drei chromogenen Substrate wurde photometrisch für vier α -Chymotrypsin-Konzentrationen (0,1; 0,25; 0,5; 0,75 mg/ml) bestimmt. Mittels der Eichgeraden (s. Anhang, Seite 186) wurde eine α -Chymotrypsin-Konzentration von 0,1 mg/ml für alle weiteren Versuche in dieser Arbeit ausgewählt, da die Farbintensität bei dieser Enzymkonzentration im linearen Bereich liegt. Um vergleichbare Bedingungen zum *Cmm*-Sekretom zu schaffen, wurde α -Chymotrypsin im gleichen Puffer (Phosphatpuffer, 50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0) gelöst, der auch für die Dialyse der *Cmm*-Proteine verwendet wurde.

Zur Gewinnung der extrazellulären Proteasen aus verschiedenen *Cmm*-Stämmen wurden Bedingungen gewählt, unter denen die Proteasen im Sekretom in großer Menge nachweisbar sind (Tews, 2012). Hierfür wurden die *Cmm*-Stämme einem Liter M9-Medium bis zur spät-logarithmischen Phase (OD_{580} 3,0; 48 h bei 26 °C) inkubiert. Der Kulturüberstand wurde anschließend von den Zellen durch Zentrifugation getrennt und bei -80 °C eingefroren

und durch Lyophilisierung konzentriert. Der getrocknete Überstand wurde in 10 ml Millipore-Wasser unter Zugabe von 10 mM DTT gelöst. Durch Dialyse gegen Phosphatpuffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0) wurden möglicherweise störende Salze entfernt und eine abschließende Sterilfiltration diente zum Entfernen restlicher Bakterienzellen. Die so bearbeiteten Kulturüberstände der verschiedenen Bakterienstämme wurden auf eine Proteinkonzentration von 0,45 mg/ml eingestellt. Dabei gilt es zu beachten, dass die gemessene Konzentration die Gesamtheit aller sekretorischen Proteine umfasst und nur ein kleiner Teil aus den untersuchten Serinproteasen besteht.

Als Inkubationstemperatur für alle Enzymassays wurde 26 °C, das Temperaturoptimum von *Clavibacter*, gewählt.

Durch Messung der Absorption der Enzymprobe abzüglich der Absorption des Referenzwertes (Phosphatpuffer, 50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0) wird die Steigerung der Extinktion (ΔE) ermittelt, die die Intensität der Farbreaktion und damit den Substratumsatz widerspiegelt. Über die gemessenen OD-Werte (ΔE) kann nach Berechnung der Stoffmenge an gebildetem Produkt ($\mu\text{mol pNA/ml}$) die katalytische Aktivität berechnet werden. Die Enzymaktivität wird dabei durch die Einheit „Unit (U)“ angegeben. Eine Unit entspricht der Enzymaktivität, die einen Umsatz von 1 $\mu\text{mol pNA}$ pro Minute katalysiert. Die Formel und die Erklärung zur Berechnung der Enzymaktivität kann dem Material- und Methodenteil (s. Seite 71) entnommen werden.

Da die Enzymaktivität sowohl vom pH-Wert als auch von der Zusammensetzung des Reaktionspuffers beeinflusst werden kann, sollten diese beiden Parameter anhand der chromogenen Substrate Azocasein und Azoalbumin untersucht werden.

Die Bestimmung des Substratumsatzes durch Hydrolyse der chromogenen Substrate Azocasein und Azoalbumin erfolgte in Anlehnung an Beynon & Bond, 2001. Für den Reaktionsansatz wurden Azocasein und Azoalbumin in zwei verschiedenen Puffersystemen (PBS und Tris) mit unterschiedlichen Molaritäten (50 mM und 100 mM) gelöst. Der angegebene pH-Wert des Gesamtreaktionsansatzes (nach Zugabe des Enzyms zum Substrat) wurde dabei zwischen pH 6,0 bis pH 8,0 eingestellt und mittels pH-Papier für jeden einzelnen Ansatz überprüft. Dabei ist pH 8,0 nach Herstellerangaben (Sigma-Aldrich) das pH-Optimum des α -Chymotrypsins. Ein pH-Wert von 6,0 entspricht in etwa dem des Xylemsaftes (pH 5,0-6,0), dem wahrscheinlichen Wirkort der extrazellulären Proteasen von *Cmm*. Die

Freisetzung des Farbstoffes wurde durch Messung der OD_{440nm} überprüft. Die folgende Tabelle (Tab. 19) bietet einen Überblick über die verschiedenen Versuchsansätze.

Substrat	Puffer	Molarität	pH-Wert
Azocasein	PBS	50 mM/100 mM	6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0
Azocasein	Tris	50 mM/100 mM	6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0
Azoalbumin	PBS	50 mM/100 mM	6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0
Azoalbumin	Tris	50 mM/100 mM	6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0

Tabelle 19: Übersicht der getesteten Bedingungen zur Ermittlung der Enzymaktivität.

Dabei zeigte sich, dass die Verlängerung der Inkubationszeit von fünf auf 48 Stunden zu einer Steigerung der Farbstoffbildung durch Hydrolyse der chromogenen Substrate durch α -Chymotrypsin führte. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Experimente eine Inkubationsdauer von 48 Stunden gewählt. Gemäß der hier angewendeten Methode von Beynon & Bond kann die Enzymreaktion dabei verlängert werden. Hier war außerdem eine Sterilfiltration der Enzym-Substrat-Mixtur nötig, um die Hydrolyse durch mikrobielle Verunreinigung zu vermeiden.

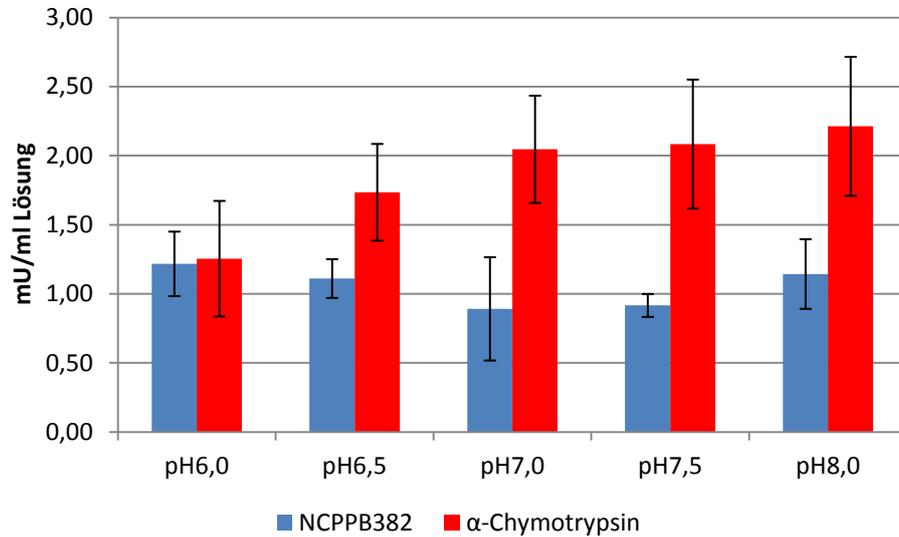
Mit Azoalbumin als Substrat und unter Verwendung von PBS- bzw. Tris-Puffer (sowohl 50 als auch 100 mM) und pH-Werten des Gesamtreaktionsansatzes von 6,0 bis 8,0 konnte für den *Cmm382*-Kulturüberstand keine Farbstoffbildung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Azoalbumin scheint demzufolge, zumindest unter den getesteten Bedingungen, kein Substrat für die *Cmm*-Proteasen des Kulturüberstands zu sein.

Für α -Chymotrypsin konnte für alle geprüften Bedingungen die Bildung des Farbstoffes (pNA) durch Spaltung des Substrats Azoalbumin, dessen Intensität mit steigendem pH-Wert zunimmt und entsprechend der Herstellerangabe im alkalischen Bereich (pH 8,0) sein Optimum erreicht, nachgewiesen werden. Die entsprechenden Daten für die Kontrolle (α -Chymotrypsin) können dem Anhang entnommen werden.

Unter Verwendung von Azocasein als Substrat konnte bei der Inkubation mit den extrazellulären *Cmm*-Proteine für alle getesteten pH- und Pufferbedingungen eine Enzymaktivität nachgewiesen werden, wobei das pH-Optimum der Reaktion stets bei pH 6,0 (Abb. 9 **A** und **B**) lag. Die Enzymaktivität war dabei in Tris-Puffer (1,69 mU/ml Lösung) höher als in PBS-Puffer (1,22 mU/ml Lösung) (Abb. 9), wobei die Molarität des Puffers keinen

Einfluss auf den Substratumsatz hatte (Umsatz bei 100 mM vergleichbar mit 50 mM; Daten nicht gezeigt).

A



B

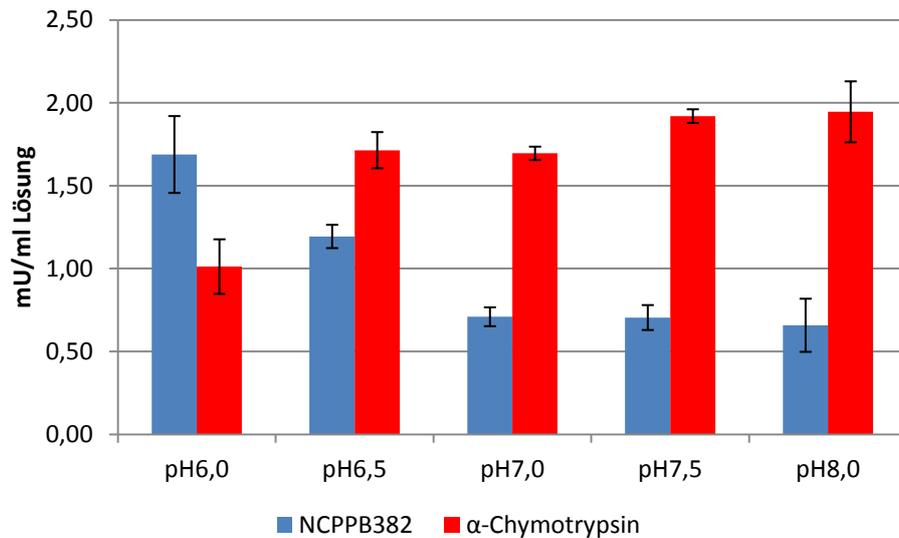


Abbildung 9: Enzymatische Aktivität (units) des *Cmm382*-Sekretoms (0,051 mg Protein/ml) und α -Chymotrypsin (0,011 mg Protein/ml) gegenüber dem chromogenen Substrat Azocasein (Substratkonzentration: 0,38 %) unter verschiedenen Versuchsbedingungen (Puffer; pH-Wert) nach 48 h Inkubation bei 26° C. **A:** chromogenes Substrat gelöst in 50 mM PBS, **B:** chromogenes Substrat gelöst in 50 mM Tris. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung dar. Einzelwerte können dem Anhang (s. Seite 189) entnommen werden. mU: milliunits; 1mU= 1nmol pNA/ml Lösung pro Minute.

Ausgehend vom pH-Optimum (pH 6,0) erreichten die *Clavibacter*-Proteine bei in PBS-Puffer gelöstem Substrat nahezu 100 % der α -Chymotrypsinaktivität. Gegenüber in Tris-Puffer gelöstem Substrat zeigten die extrazellulären Proteine von *Clavibacter* einen etwa 67 %-ig höheren Substratumsatz als die Kontrolle.

Das Proteasesubstrat S2288

Das Substrat S2288 (Chromogenix, Stockholm Schweden) ist ein chromogenes Substrat, das von einem breiten Spektrum Serinproteasen an Serinproteasen hydrolysiert werden kann. α -Chymotrypsin ist in der Lage dieses Substrat umzusetzen, obwohl die Spaltung hinter einem Argininrest erfolgt. Die Bildung von pNA durch Hydrolyse der Peptidspaltung wird photometrisch bei OD_{405nm} verfolgt. Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität erfolgte hierbei nach Anleitung des Herstellers Chromogenix. Der Gesamtreaktionsansatz wies einen gemessenen pH-Wert von 6,0 auf, das dem pH-Optimum der *Clavibacter*-Proteine entspricht.

α -Chymotrypsin zeigte mit S2288 einen relativ schnellen Umsatz. Nach 45 Minuten erreichte der Umsatz bereits den Sättigungsbereich, nach sechs Stunden Reaktionszeit war ein Plateau der Enzymaktivität (0,191 mU/ml Lösung) von α -Chymotrypsin erreicht (Abb. 10). Demgegenüber zeigten Proteine des *Cmm*-Kulturüberstandes zwar einen Umsatz von S2288, aber er erfolgte wesentlich langsamer. Über 48 Stunden blieb die Aktivität im linearen Bereich, es wurden aber nur etwa 47 % des Substratumsatzes von α -Chymotrypsin erreicht (Abb. 10). Die einzelnen Messwerte sind im Anhang (s. Seite 191) dargestellt.

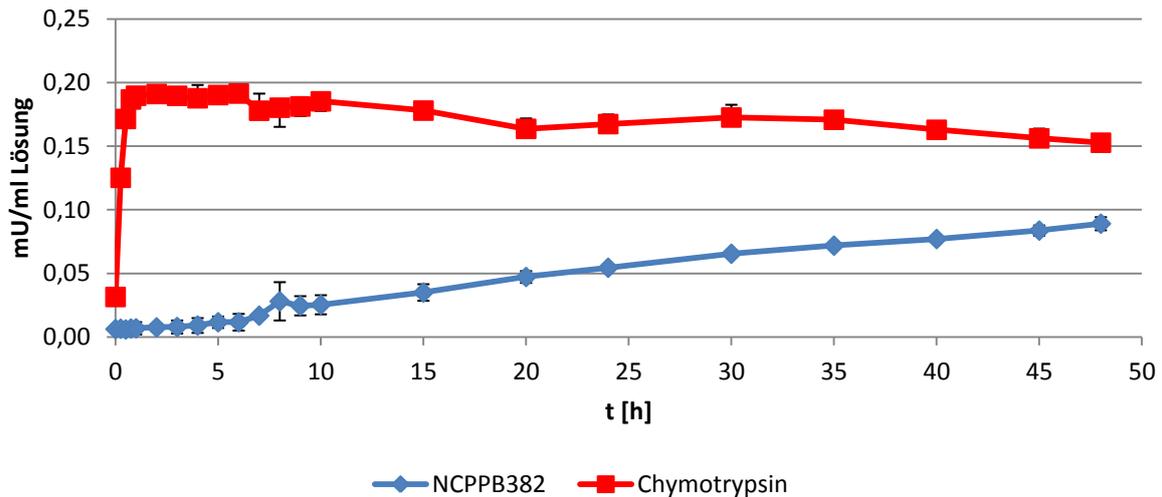


Abbildung 10: Enzymatische Aktivität (units) des *Cmm382*-Sekretoms (0,18 mg Protein/ml) und α -Chymotrypsin (0,04 mg Protein/ml) gegenüber dem des chromogenen Substrat S2288 (Substratkonzentration: 1,2 mM) bei 26 °C über einen Zeitverlauf von 48 h. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung dar. Einzelwerte können dem Anhang (s. Seite 191) entnommen werden. mU: milliunits; 1mU= 1nmol Substrat/ml Lösung pro Minute.

Mit den bisher genannten Tests wurde eine proteolytische Aktivität des *Cmm*-Überstandes nachgewiesen. Unklar blieb, welchen Proteasen diese Aktivität zuzuschreiben ist. Daher wurde im Folgenden das Sekretom unterschiedlicher *Cmm*-Stämme untersucht. Die verwendeten Stämme unterscheiden sich in ihrem Plasmidstatus bzw. weisen unterschiedliche Deletionen oder Inaktivierungen (durch Insertion einer Chloramphenicol-Resistenzkassette in die jeweiligen Gene) einzelner Gene oder der *chp/tomA*-Region auf. Die annotierten sekretierten Protease-Gene wie *chpC*, *chpG* und *ppaC* sind dabei in der *chp/tomA*-Region und das *pat-1*-Gen ist auf dem Plasmid pCM2 lokalisiert. Zur Überprüfung, ob Proteine aus der Pathogenitätsinsel für den gemessenen Substratumsatz verantwortlich sind, wurde der Kulturüberstand der Deletionsmutante CMM101 β 30-18, dem die gesamte *chp/tomA*-Region fehlt, untersucht. Da die Deletionsmutante nur das Plasmid pCM1 enthält, fehlt auch das *pat-1*-Gen. Als Kontrolle wurde das Sekretom des *Cmm*-Derivats CMM101, dem nur *pat-1* fehlt, eingesetzt. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte die Deletionsmutante eine deutlich verringerte (um 74,63%) Enzymaktivität (Abb. 11). Dieser Unterschied kann als signifikant (p -Wert t-Test: 0,0075) eingestuft werden.

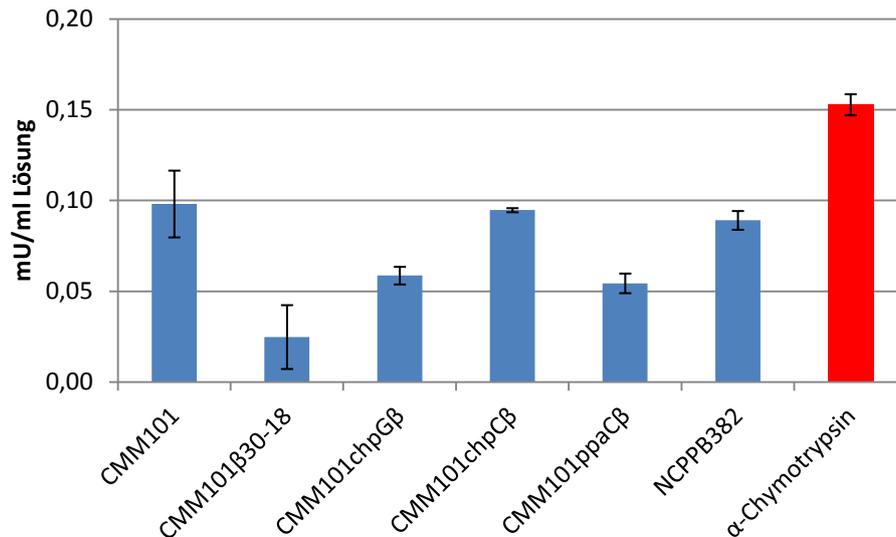


Abbildung 11: Enzymatische Aktivität (units) des Sekretoms verschiedener *Clavibacter*-Stämme (0,18 mg Protein/ml) und α -Chymotrypsin (0,04 mg Protein/ml) gegenüber dem chromogenen Substrat S2288 (Substratkonzentration: 1,2mM) nach 48 h Inkubation bei 26° C. Wildtyp (NCPPB382), Curing-Derivat CMM101, Mutante CMM101 β 30-18 (Deletion der Pathogenitätsinsel) und die Mutanten CMM101chpC β , CMM101chpG β und CMM101ppaC β . Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung dar. Einzelwerte können dem Anhang (s. Seite 194) entnommen werden. mU: milliunits; 1mU= 1nmol Substrat/ml Lösung pro Minute.

Zur spezifischen Analyse, welche der Proteasen aus der Pathogenitätsinsel für die enzymatische Aktivität verantwortlich sind, wurden die Kulturüberstände der Mutanten CMM101chpC β , CMM101chpG β und CMM101ppaC β eingesetzt. Die Überprüfung der Enzymaktivität zeigte nur beim Fehlen der Proteasen ChpG und PpaC im Kulturüberstand eine reduzierte Aktivität (ChpG: -40,17%; PpaC: -45,2%; Abb. 11). Dieser Substratumsatz war dabei weniger stark verringert als beim kompletten Fehlen der Pathogenitätsinsel (Abb. 11).

Da Pflanzenproteine das natürliche Substrat der Proteasen darstellen könnten, wurde anschließend in einem ersten Ansatz Xylemsaft aus 6 Wochen alten nicht infizierten Tomaten mit den konzentrierten Sekretomproteinen von *Cmm382*-Kulturen inkubiert. Der Enzymtest wurde dabei genauso durchgeführt wie oben für die Modellsubstrate beschrieben. Die kompletten Enzymtestansätze wurden in 1D- bzw. 2D-Gelen aufgetrennt und einzelne Proteinspots über MALDI-TOF-MS und MASCOT gegen die *Cmm*- und die Tomatenproteindatenbanken identifiziert. Durch den Vergleich von Proben direkt aus dem

Xylemsaft mit inkubierten Proben sind so Massenveränderungen von Tomaten- bzw. *Clavibacter*-Proteinen nachweisbar, die durch *Clavibacter*-Proteaseaktivität hervorgerufen sein sollten. Allerdings erfolgte vermutlich aufgrund der hohen EPS-Menge des *Cmm382*-Kulturüberstandes weder in 1D- noch 2D-Gelen eine klare Auftrennung der Proteine im Gel. Ein weiteres Problem stellte die niedrige Proteinkonzentration im Xylemsaft dar, die eine eindeutige Identifizierung über MALDI-TOF-MS und MASCOT erschwert. Eine alternative Vorgehensweise kann den Ausführungen im Ausblick (s. Seite 173) entnommen werden.

Diskussion

Unter Anwendung von chromogenen Substraten gelang es erstmals eine extrazelluläre proteolytische Aktivität im Sekretom von NCPPB382 nachzuweisen. Diese Aktivität zeigte nicht nur eine Substratspezifität für Azocasein, sondern auch eine pH-Abhängigkeit mit einem pH-Optimum bei pH 6,0. Generell ist zu erkennen, dass bei Annäherung an den pH-Wert des Xylemsaftes (pH 5,0-6,0) die Aktivität der extrazellulären *Clavibacter*-Proteine zunimmt. Es ist anzunehmen, dass durch eine pH-Wert Einstellung des Gesamtreaktionsansatzes (Enzym + Substrat) weiter in den sauren pH-Bereich (pH 5,0 und 5,5) eine zusätzliche Erhöhung der proteolytischen Aktivität der extrazellulären Proteine möglich ist. Die Wahl des pH-Wertes weiter im sauren Bereich war allerdings durch die Löslichkeitsgrenze der chromogenen Substrate begrenzt. Eine Herabsetzung des pH-Wertes durch HCl- oder Essigsäure-Zugabe führte zur Präzipitation der Proteine.

Neben einer proteolytischen Aktivität gegen das allgemeine synthetische Substrat Azocasein konnte für die postulierten extrazellulären Serinproteasen von NCPPB382 ebenfalls unter Verwendung des für Serinproteasen spezifischen Substrats eine Arginin-spezifische enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Desweiteren gibt es erste Hinweise darauf, dass ein Großteil des Substratumsatzes auf der Enzymaktivität der Proteine ChpG und PpaC, deren Gene in der Pathogenitätsinsel lokalisiert sind, beruht. Wobei die Enzymaktivität dieser *Cmm*-Stämme (*CMM101chpG β* und *CMM101ppaC β*) weniger stark verringert war als bei der Deletionsmutante *CMM101 β 30-18*, was darauf hindeutet, dass weitere Proteine aus

dieser Region aktive Proteasen sind. Aber auch ohne diese Region ist eine Aktivität nachweisbar, die auf die verbleibenden extrazellulären Proteasen im Genom, wie PpaF bis PpaGHI, den Subtilasen SbtB und SbtC und der auf dem Plasmid pCM1 lokalisierten Protease PpaJ, zurückzuführen sein könnte oder auch auf Zellyse freigesetzte intrazelluläre Proteasen. Zusätzlich sind aber auch noch andere extrazellulären Proteasen wie Metallopeptidasen im Genom von *Cmm382* vorzufinden (Annotationsdaten des Genomprojektes). Dass pathogene Organismen über mehr als ein proteolytisches Enzym verfügen, zeigt das Beispiel des pathogenen Pilzes *Stagonosporum nodorum* (Pathogen des Weizens; Blatt- und Spelzenbräune). In diesem Fall konnte trotz Deletion einer extrazellulären Trypsin-ähnlichen Protease (SNP1) weiterhin eine Proteaseaktivität verzeichnet werden, die 50 % des Wildtyps entspricht und wahrscheinlich auf die Aktivität einer Subtilase zurückgeführt werden konnte (Bindschedler et al., 2003).

Das die Enzymaktivität von *Clavibacter* gegenüber dem Substrat S2288, im Vergleich zur Kontrolle, geringer ausfällt, lässt sich unter anderem durch die eingesetzte Proteinkonzentration erklären. Die gemessene Konzentration von 0,45 mg/ml umfasst die Gesamtheit aller extrazellulären Proteine von *Clavibacter* und bezieht sich nicht spezifisch auf die untersuchten Serinproteasen aus der Chp- oder Ppa-Familie. Deren Konzentration im Sekretom kann nicht bestimmt werden, fällt aber wahrscheinlich geringer aus als für die Kontrolle α -Chymotrypsin. Ein weiterer möglicher Grund bezieht sich auf die Spezifität der Hydrolysespaltstellen der extrazellulären Peptidasen, die bei *Clavibacter*-Proteinen unbekannt sind. Dabei lässt sich der höhere Substratumsatz für Azocasein, im Vergleich zu S2288, durch den Aufbau der chromogenen Substrate erklären. Azocasein ist eine chemisch modifizierte Form des globulären Proteins Casein, das damit als allgemeines Substrat den *Clavibacter*-Sekretomproteinen zahlreiche Peptidspaltstellen bietet. Im Gegensatz dazu stellt das chromogene Substrat S2288 ein Kleinmodell (3-5 Aminosäuren) eines natürlichen Substrates dar und besitzt nur eine Hydrolysestelle an einem Argininrest. S2288 kann also je nach der Spezifität einer Protease für ihre Spaltstelle eventuell nicht oder wesentlich schlechter umgesetzt werden.

Im Gegensatz zu Arbeiten von Burger et al. (2005), bei denen über das Ausplattieren von NCPPB382 auf Casein- oder Magermilch-Agarplatten keine proteolytische Aktivität nachgewiesen werden konnte, bietet die Verwendung des Kulturüberstandes die

Möglichkeit die proteolytische Aktivität extrazellulärer Proteine zu untersuchen. Ebenso wie bei *Clavibacter* konnte bei dem ebenfalls phytopathogenen Organismus *Xanthomonas campestris* (Krankheitsbild der Aderschwärze) durch Konzentrierung des Kulturüberstandes 90 % der gesamten proteolytischen Aktivität den sekretierten Proteine zugeordnet werden (Dow et al., 1990). In Zukunft bieten neben der Untersuchung von Deletionsmutanten (CMM101β30-18) der Einsatz spezifischer Serinprotease-Inhibitoren (z. B. PMSF) (Dow et al., 1990) eine weitere Möglichkeit, durch Reduzierung der proteolytischen Aktivität des Sekretoms, die untersuchten Proteasen zu klassifizieren und eventuell einzelnen Proteinen zuzuordnen.

Um zu überprüfen, ob Proteine aus der Pathogenitätsinsel an der proteolytischen Aktivität von NCPPB382 beteiligt sind, galt es nun diese in einem *E. coli*-Expressionssystem zu exprimieren und die rekombinanten Proteine auf ihre Enzymaktivität hin zu untersuchen. Für zahlreiche andere phytopathogene Organismen konnte für extrazelluläre Proteine, die für die Pathogenität essentiell sind, eine proteolytische Aktivität nachgewiesen werden. Bereits zu Beginn dieser Arbeit lagen für die Gene *chpC*, *chpG*, *ppaC* und *pat-1* entsprechende Mutanten vor, deren Inaktivierung bzw. Deletion einen zum Wildtyp veränderten Phänotyp zur Folge hatte. Deshalb fiel die Wahl neben den Genen *chpG* und *ppaC*, denen bereits eine mögliche Beteiligung an der Serinprotease-Aktivität von NCPPB382 nachgewiesen werden konnte, auch auf das *chpC*-Gen. Aufgrund der Tatsache, dass das Serinmotiv der über Sequenzanalyse identifizierten katalytischen Domäne essentiell für die Virulenz ist, wurde ebenfalls das *pat-1*-Gen ebenfalls zur Darstellung rekombinanter Proteine verwendet.

Kapitel II. Die putativen Serinproteasen ChpC, ChpG, Pat-1 und PpaC

Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion der Pathogenitätsinsel (CMM101 β 30-18) eine Reduzierung der Proteaseaktivität des Sekretoms zur Folge hatte (Abb. 11). Die ebenfalls auf etwa 50 % reduzierte Proteaseaktivität der *chpG*-Mutante (CMM101*chpG* β) und der *ppaC*-Mutante (CMM101*ppaC* β) gegenüber CMM101 (Abb. 11) lässt darauf schließen, dass es sich bei diesen beiden Serinproteasen, die von Genen in der Pathogenitätsinsel codiert werden, um funktionelle Peptidasen handelt. Aufgrund dieser verminderten proteolytischen Aktivität der *ppaC*- und *chpG*-Mutanten wurden diese Gene für die heterologe Expression ausgewählt, um somit eine enzymatische Aktivität dieser Proteine nachzuweisen. Von besonderem Interesse war ChpG auch, da eine entsprechende Mutante keine Auslösung der hypersensitiven Reaktion (HR) bei der Nicht-Wirtspflanze *Mirabilis jalapa* mehr hervorruft (Stork et al., 2008). Die Inaktivierung von *chpC* und das Curing-Derivat CMM101, dem das *pat-1*-Gen fehlt, zeigten ebenfalls eine Beteiligung dieser Gene an der Bakterien-Pflanzen-Interaktion (Stork et al., 2008; Meletzus et al., 1993). Aus diesem Grund sollten diese vier putativen Serinproteasen heterolog in *E. coli* exprimiert und ihre enzymatische Aktivität nachgewiesen werden, um später ihr natürliches Substrat zu bestimmen.

Überexpression und Reinigung der Serinproteasen

Zur Darstellung dieser Proteine mussten deren Gene zunächst amplifiziert und in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert werden. Eine Expression der Proteine in einem *Cmm*-System war leider nicht möglich, da kein geeigneter Expressionsvektor für *Cmm* vorliegt. Auch wichtige Grundvoraussetzungen wie Kenntnis über Promotorstrukturen in *Cmm*, Regulierbarkeit von Promotoren und deren Induzierbarkeit fehlen. Aus diesem Grund wurde eine heterologe Expression der *Cmm*-Proteine in *E. coli* versucht, wie sie schon für andere *Cmm*-Proteine in früheren Arbeiten von Kaup (2005) und Engemann (2006) durchgeführt wurde. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die ausgewählten Proteine im natürlichen *Clavibacter*-System vermutlich sekretiert werden.

Amplifizierung und Klonierung

Optimal wäre, wenn die *Cmm*-Proteine im *E. coli*-Expressionssystem ebenfalls sekretiert würden. Aus diesem Grund wurden die pET Vektoren (Novagen) pET22b(+) und pET23b(+) verwendet (Karten siehe Anhang). gewählt. Über eine Besonderheit verfügt der Vektor pET22b(+), der eine *pelB*-Signalsequenz stromabwärts der RBS aufweist, und die Ausschleusung des rekombinanten Proteins aus *E. coli* ermöglichen soll. Zusätzlich erlauben diese Vektoren die Fusion eines C-terminalen His-Tags an das zu exprimierende Protein, der die Aminosäure-Sequenz um sechs Histidine verlängert und somit eine Reinigung der Expressionsprodukte über Nickel-Affinitätschromatographie ermöglicht. Darüber hinaus stellt die Fusion der Histidin-Domäne an den C-Terminus des Proteins, neben MALDI-Analysen, eine weitere Nachweismethode eines vollständig translatierten Proteins da. So kann der His-Tag des rekombinanten Proteins mittels spezifischer Antikörper über Western Blot-Analysen identifiziert werden. Die Expression der heterologen Proteine erfolgt über starke T7-Promotoren, die bei Anwesenheit der T7-RNA-Polymerase das gewünschte Gen transkribieren.

Zur Klonierung wurden für jedes Gen zwei Primer-Kombinationen konstruiert. Das erste Primerpaar sollte eine Sekretion in *E. coli* ermöglichen, um den nativen N-Terminus nach Abspaltung der Signalsequenz durch eine Signalpeptidase zu erhalten. Die Prozessierung des Signalpeptids ist während der Sekretion notwendig, damit das Protein nicht in der Membran hängen bleibt. Da eventuell das *Cmm*-Signalpeptid die Sekretion des rekombinanten Proteins in die *E. coli*-Zellen nicht ermöglicht, wurde der Vektor pET22b(+), der ein N-terminales *E. coli*-Signalpeptid (*pelB*-leader) besitzt, verwendet. Durch das Anhängen einer *E. coli*-Signalsequenz an den N-Terminus des *Clavibacter*-Signalpeptids könnte die Ausschleusung der rekombinanten *Clavibacter*-Proteine in das Periplasma der *E. coli*-Zellen erleichtert werden. Zusätzlich ist bei den drei Mitgliedern der Chp-Familie zu vermuten, dass in den Proteinen Disulfidbrücken ausgebildet werden, was im Normalfall nur extrazellulär erfolgt (Messens & Collet, 2006).

Nur für den Fall, dass eine Sekretion der rekombinanten Proteine im *E. coli*-Expressionssystem ausbleibt, wird für die intrazelluläre Expression das Protein ohne das Signalpeptid benötigt, so dass eine Reinigung aus dem *E. coli*-Cytoplasma durchgeführt werden muss. Allerdings ist zu erwarten, dass weder der native N-Terminus noch potenzielle

Sekundärstrukturen über Disulfidbrücken in den Proteinen vorhanden sind, somit also eventuell nur enzymatisch inaktive Proteinformen generiert werden.

Zur Herstellung der Expressionsplasmide (Karten, s. Anhang) wurden zunächst die *Cmm*-Gene über PCR amplifiziert. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass die PCR-Produkte über entsprechende Restriktionsschnittstellen verfügen, mittels derer eine Klonierung in die *multiple cloning site (mcs)* der Expressionsvektoren möglich war. Hierbei war zu beachten, dass die Restriktionsenzyme nicht in der zu klonierenden DNA vorkommen. Abhängig von der Zusammensetzung der *mcs* und vom Vorhandensein eines *E. coli*-Signalpeptids (*pelB*-leader) wurde für jedes Amplifikat der *Cmm*-Gene zwischen Klonierungen in den pET22b(+)- oder den pET23b(+)- Vektor entschieden (s. Tab. 21, S. 98).

Für jedes Gen wurden drei verschiedene Klonierungen durchgeführt, von denen die ersten beiden die Sekretion in *E. coli* ermöglichen sollten.

Das erste generierte PCR-Produkt enthält das vollständige *Cmm*-Gen einschließlich des Bereichs, der das *Cmm*-Signalpeptid codiert, und wurde über die flankierenden Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor kloniert.

Hiermit wurden zwei Klonierungen durchgeführt. Eine Klonierung wurde so durchgeführt, dass der *E. coli pelB*-leader, den die Vektoren zur Verfügung stellen, nicht vorhanden war. In diesem Fall sollte eine Sekretion erfolgen, wenn das *Clavibacter*-Signalpeptid von *E. coli* erkannt und prozessiert wird. Für die zweite Klonierung wurde das Amplifikat so inseriert, dass der *E. coli pelB*-leader der pET-Vektoren eine Sekretion ermöglichen sollte.

Ein zweites PCR-Produkt wurde ohne den Bereich, der das *Cmm*-Signalpeptid codiert, amplifiziert. Nach Vorhersage des Signalpeptids mittels des SignalP 3.0-Programms wurde der *fwd*-Primer für das zweite PCR-Amplifikat, das keine Sekretion ermöglicht, so gewählt, dass das mittels SignalP vorhergesagte Signalpeptid nicht amplifiziert wurde (Tab. 20).

Protein	hypothetische Prozessierungsstelle zwischen den AS-Positionen	AS-Sequenz	Position der fwd-Primer [Base]
ChpC	32 und 33	AYA - NG	97-115
ChpG	37 und 38	AFA - TE	112-130
PpaC	54 und 55	ALA - AT	175-194

Tabelle 20: Theoretisch Prozessierungsstelle des Signalpeptids der verschiedenen *Cmm*-Proteine und die Position der *forward*-Primer.

Für *pat-1*-Gen wurde kein PCR-Produkt ohne das *Cmm*-Signalpeptid amplifiziert.

Unter Verwendung der entsprechenden Primer wurden für jedes Gen drei verschiedene Expressionsplasmide konstruiert:

- a)** kompletter Kodierungsbereich mit *Cmm*-Signalpeptid und *pelB-leader* (Protein+PelB)
- b)** kompletter Kodierungsbereich mit *Cmm*-Signalpeptid ohne *pelB-leader* (Protein-PelB)
- c)** kompletter Kodierungsbereich ohne *Cmm*-Signalpeptid ohne *pelB-leader* (Protein oS)

Alle rekombinanten Proteine besitzen den His-Tag am C-Terminus. Protein **a)** enthält zwei N-terminale Signalpeptide, das *E. coli*-Signalpeptid (*pelB-leader*) und das jeweilige *Cmm*-Signalpeptid. Protein **b)** besitzt nur das *Cmm*-Signalpeptid und das dritte Protein **c)** enthält weder das *E. coli*- noch das *Cmm*-Signalpeptid (Abb.12).

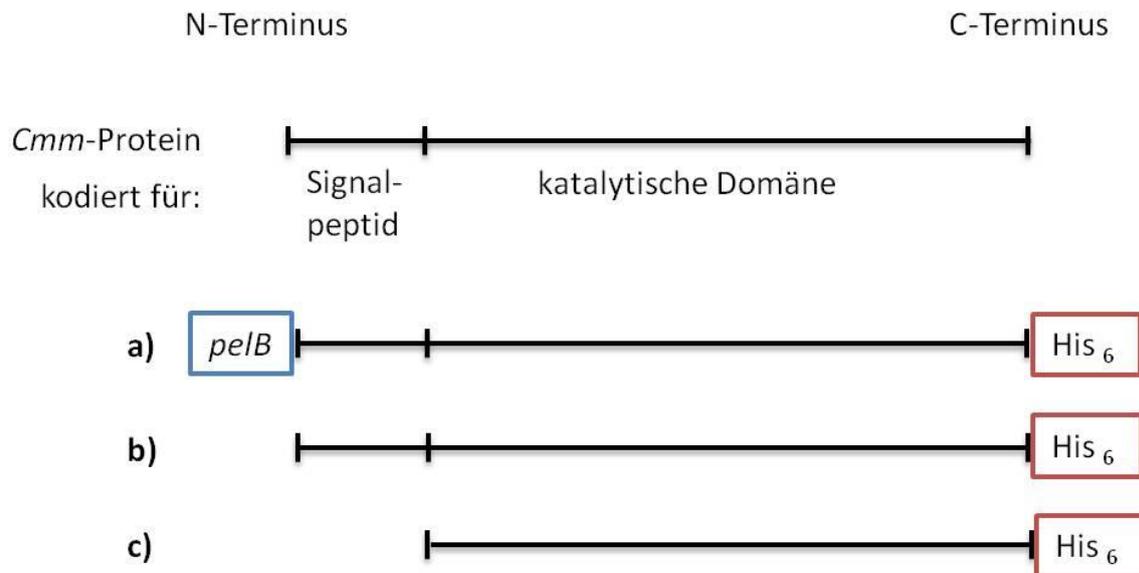


Abbildung 12: Eine schematische Darstellung der unterschiedlichen Amplifikate der Gene wie sie in den verschiedenen Expressionsvektoren vorliegen. *pelB*: *E. coli pelB-leader* am N-Terminus, His₆: 6-facher Histidinrest am C-Terminus.

Sollte für die Ausschleusung des Proteins über das *Cmm*-Signalpeptid (Konstrukt **b**) nicht möglich sein, sollte das rekombinante Protein durch den *E. coli pelB-leader* sekretiert werden (Konstrukt **a**). Erfolgt keine extrazelluläre Proteinexpression und verbleibt das Protein im Cytoplasma, muss das Protein ohne Signalpeptid vorliegen (Konstrukt **c**). Durch Sequenzierung der Inserts aller Expressionsplasmide wurde bestätigt, dass keine Mutationen wie Basenaustausche oder *frame shifts* stattgefunden haben.

Die einzige Ausnahme bildet dabei *pat-1*. Die Konstruktion der entsprechenden Expressionsvektoren wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit durchgeführt. Die Amplifizierung des Gens ohne das *Cmm*-Signalpeptid und die Klonierung in den Expressionsvektor konnte nicht rechtzeitig fertiggestellt werden. Somit standen für die Darstellung von Pat-1 nur die Expressionsplasmide **a** und **b** zur Verfügung.

Somit wurden für die vier untersuchten Gene folgende Expressionsvektoren konstruiert:

Amplifikate der <i>Cmm</i> -Gene	Vektor
chpC+pelB	pET22b(+)
chpC-pelB	pET23b(+)
chpCoS	pET23b(+)
chpG+pelB	pET22b(+)
chpG-pelB	pET22b(+)
chpGoS	pET22b(+)
pat-1+pelB	pET22b(+)
pat-1-pelB	pET22b(+)
ppaC+pelB	pET22b(+)
ppaC-pelB	pET23b(+)
ppaCoS	pET23b(+)

Tabelle 21: Übersicht der in dieser Arbeit konstruierten Expressionsvektoren.

Expressionsstamm und Genexpression

Eine Optimierung der Überexpression der Proteine wurde durch Variationen der IPTG-Induktion, der Inkubationstemperatur, des Kulturmediums und Verwendung zweier unterschiedlicher *E. coli*-Expressionssysteme vorgenommen.

Nach Überprüfung der korrekten Sequenz der Expressionsplasmide wurden diese in die *E. coli*-Expressionsstämme BL21(DE3) bzw. BL21-CodonPlus(DE3) transformiert. Die verwendeten Expressionsstämme sind Lysogene des Bakteriophagen λ DE3 und besitzen ein DNA-Fragment, das den T7lac-Promotor, das *lacI*-Gen und das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lac*-Promotors enthält. Durch Zugabe des künstlichen Induktors IPTG wird die Synthese der T7-RNA-Polymerase induziert und somit die Transkription der klonierten Gene bewirkt, die unter Kontrolle des T7-Promotors stehen (Studier & Moffat, 1986). Durch Verwendung der viralen T7-RNA-Polymerase wird im Gegensatz zur *E. coli* RNA-Polymerase eine ungefähr fünffache höhere Aktivität und eine höhere Expressionsrate gewährleistet (Tabor & Richardson, 1985).

Die Gene *chpC*, *chpG*, *pat-1* und *ppaC* zeichnen sich durch ein häufiges Vorkommen von in *E. coli* seltenen Codons aus (Tab. 22, rot und blau unterlegt), d.h. in *E. coli* K12- ist die Kopiezahl der entsprechenden tRNAs gering und es kann bei der Translation zum Abbruch der Synthese kommen. Seltene Codons in einem Gen können dazu führen, dass die Expressionsstärke verringert wird, da die Effizienz der Translation durch die *codon usage* beeinflusst ist (Kane, 1995).

Gen	Funktion	Lokalisation im Genom	bp	AS	Anzahl seltener Codons
chpC	extrazelluläre Serinprotease	71645 - 70785	861	286	<i>arg</i> AGA: 5, <i>arg</i> AGG: 3, <i>pro</i> CCC: 7, <i>ser</i> TCT: 6, <i>leu</i> CTA: 5, <i>ile</i> ATA: 3, <i>leu</i> CTT: 4, <i>leu</i> CTC: 4
chpG	extrazelluläre Serinprotease	82939 - 83772	834	277	<i>ser</i> AGC: 9, <i>cys</i> TGC: 7, <i>asp</i> GAC: 9, <i>his</i> CAC: 8, <i>ile</i> ATC: 14, <i>leu</i> CTC: 9, <i>lys</i> AAG: 4, <i>phe</i> TTC: 8, <i>leu</i> CTC: 9
pat-1	extrazelluläre Serinprotease	55371 - 56213	843	280	<i>arg</i> AGG: 4, <i>ser</i> TCG: 11, <i>ala</i> GCT:10, <i>arg</i> CGA: 5, <i>gln</i> CAA: 6, <i>glu</i> GAG: 7, <i>gly</i> GGG: 10, <i>ile</i> ATA: 8, <i>leu</i> CTC: 6, <i>pro</i> CCA: 4, <i>val</i> GTC: 14
ppaC	extrazelluläre Serinprotease	54896 - 53883	1014	337	<i>arg</i> AGG:4, <i>pro</i> CCC:9, <i>ser</i> TCC: 13, <i>ser</i> TCG: 14, <i>cys</i> TGC: 4, <i>his</i> CAC: 6, <i>lys</i> AAG: 12, <i>tyr</i> TAC: 9, <i>glu</i> GAG: 7

Tabelle 22: Codons in den *Cmm*-Genen, die in *E. coli* selten vorkommen. Rot unterlegt: seltene Codons, die durch den Expressionsstamm abgedeckt werden, Blau unterlegt: seltene Codons, die nicht durch den Expressionstamm abgedeckt werden.

So korreliert die Häufigkeit der eingesetzten 61 Aminosäure-Codons mit der Anzahl der vorhandenen t-RNAs (Dong et al., 1996). Im Vergleich zu BL21(DE3) enthält der Expressionsstamm BL21-CodonPlus(DE3) zwei zusätzliche Plasmide, die neben zwei Antibiotikaresistenzen Kopien von tRNA-Genen für in *E. coli* selten genutzte Codons besitzen (*argU* AGA, AGG; *ileY* AUA; *proL* CCC, CUA) und somit für die Expression von Genen aus GC-reichen Organismen besser geeignet sind. Damit werden wenigstens bei den Genen *chpC* und *ppaC* einige der für *E. coli* seltenen Codons (Arginin-Codons AGA und AGG, Prolin-Codon CCC, Tab 22 rot unterlegt) abgedeckt. Daher erfolgte die Expression von *chpC*, *pat-1* und *ppaC* in diesem Stamm. Da die seltenen Codons des *chpG*-Gens (Tab. 22 blau unterlegt) nicht durch den Expressionstamm abgedeckt werden können, erfolgte in diesem Fall die Expression in dem BL21(DE3)-Stamm.

Für die sich anschließende Reinigung der Proteine erfolgte die Expression der Gene durch Induktion mit 1mM IPTG und fortgesetzter Inkubation bei 37° C für 3 h.

Konzentrierung der *E. coli*-Kulturüberstände zum Nachweis sekretierter Proteine

Durch das Vorhandensein eines Signalpeptids ist es möglich, dass die überexprimierten Proteine ins Kulturmedium sekretiert werden. Aus diesem Grund wurden nach Zentrifugation einer logarithmisch wachsenden und induzierten Kultur (400 ml TBY-Medium), die sekretierten Proteine des Kulturüberstandes durch Ammoniumsulfat-Fällung präzipitiert. Die konzentrierten Proben wurden mittels SDS-PAGE-Analysen auf die Sekretion der gebildeten rekombinanten Proteine hin untersucht. Die Tabelle 23 zeigt einen Überblick über die theoretisch zu erwartenden Größen der untersuchten Genprodukte.

Konstrukt	Proteingröße [kDa]
ChpC+PelB	35,20
ChpC-PelB	32,74
ChpG+PelB	32,74
ChpG-PelB	30,42
Pat-1+PelB	29,73
Pat-1-PelB	27,5
PpaC+PelB	38,59
PpaC-PelB	36,14

Tabelle 23: Übersicht der theoretisch berechneten Proteingrößen der einzelnen Konstrukte, *pelB*: *E. coli*-Signalpeptid.

Doch auch eine Silberfärbung der SDS-Gele konnte kein rekombinantes Protein im Kulturüberstand aufzeigen, eine Sekretion der Proteasen erfolgte in *E. coli* also nicht, und zwar weder über das *Cmm*- noch über das *E. coli*-Signalpeptid. Daher musste für die folgenden Expressionsversuche auf die intrazellulären Proteine zurückgegriffen werden. Dementsprechend wurde für weitere Reinigungen nur noch das Konstrukt **c** ohne ein Signalpeptid verwendet, um eine potenzielle Behinderung der Faltung der Proteine durch das nicht abgespaltene Signalpeptid auszuschließen.

Intrazelluläre Expression der Serinpeptidasen in *E. coli*

Die Tabelle 24 zeigt einen Überblick über die theoretisch zu erwartenden Größen der untersuchten Genprodukte.

Konstrukt	Proteingröße [kDa]
ChpCoS	29,57
ChpGoS	26,57
Pat-1-PelB	27,5
PpaCoS	31,03

Tabelle 24: Übersicht der theoretisch berechneten Proteingrößen der einzelnen Konstrukte, *pelB*: *E. coli*-Signalpeptid; oS: ohne *Cmm*- und *E. coli*-Signalpeptid.

Die Zunahme der gebildeten Proteine wurde über einen Zeitraum von drei Stunden verfolgt. Der Nachweis der exprimierten Proteine erfolgte anhand des Vergleichs entnommener Kulturproben vor der Induktion (nicht induziert), 1,5 Stunden bzw. 3 Stunden nach Induktion. Die Abbildung 13 zeigt die Zunahme der heterolog exprimierten Proteine in dem nach Zellschnellaufschluss gewonnenen Rohextrakt im zeitlichen Verlauf von drei Stunden.

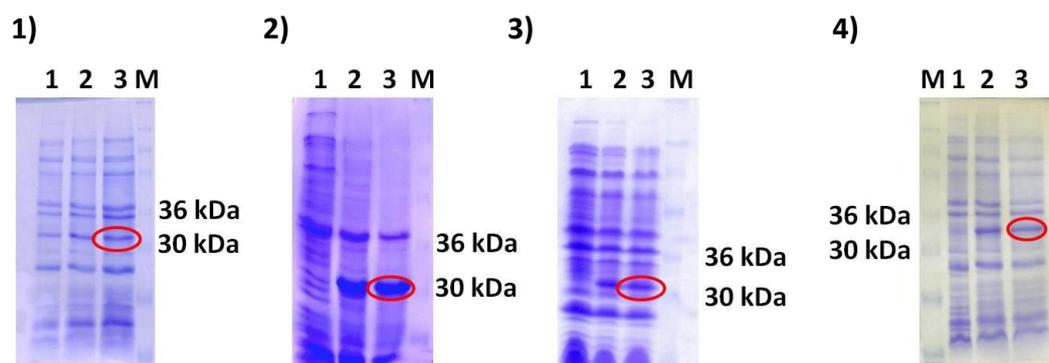


Abbildung 13: Expression bei 37° C induziert mit 1mM IPTG. 17,5 % SDS-PAGE, Coomassiefärbung. Spur 1: nicht induziert; Spur 2: 1,5 h nach Induktion; Spur 3: 3 h nach Induktion; je 25 µl Kulturprobe; M: Proteinmarker SeeBlue (10 µl).

- 1) *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) transformiert mit pET23b(+)**ChpCoS**
- 2) *E. coli* BL21(DE3) transformiert mit pET22b(+)**ChpGoS**
- 3) *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) transformiert mit pET22b(+)**Pat-1-PelB**
- 4) *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) transformiert mit pET23b(+)**PpaCoS**

Bei Induktion aller hergestellten Expressionsplasmide wurden Proteine in der errechneten Größe gebildet (Abb. 13 und Tab. 24). Diese Proteine konnten anhand von MALDI-TOF-MS-Analysen den entsprechenden Genprodukten zugeordnet werden (Tab. 25).

Protein	hypothetische Funktion	MW [kDa]	pI-Value
ChpC	extrazelluläre Serinprotease	31,447	9,3
ChpG	extrazelluläre Serinprotease	28,995	10,3
Pat-1	extrazelluläre Serinprotease	29,638	9,6
PpaC	extrazelluläre Serinprotease	35,052	9,5

Tabelle 25: Übersicht der MALDI-Ergebnisse.

Kompartimenttest

Nachdem eine Sekretion der rekombinanten Proteine nicht stattfand, galt es festzustellen, in welchem Kompartiment von *E. coli* die Proteine quantitativ zu finden sind. Dazu wurde ein Kompartiment-Test durchgeführt. Bei diesem Test wurde das Zellpellet schrittweise gereinigt, so dass man Fraktionen vom Periplasma, Cytoplasma und eventuell vorhandene *inclusion bodies* erhält. Diese Fraktionen können in einer SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert werden. In *inclusion bodies* sind häufig Proteine abgelagert, die nicht korrekt gefaltet wurden. Ein Grund hierfür können stark induzierende Versuchsbedingungen sein. Proteine in den *inclusion bodies* befinden sich grundsätzlich in einem denaturierten Zustand und sind somit katalytisch nicht aktiv. Zur Charakterisierung von Enzymen ist es daher besser, Proteine aus den Kulturüberständen, dem Periplasma oder dem Cytoplasma zu isolieren, weil sie dort in nativer und aktiver Form vorliegen. Die Proteine, die komplett ohne ein Signalpeptid exprimiert wurden (Konstrukte **c**), waren im Cytoplasma vorzufinden, der überwiegende Teil der Proteine lagen in Form von *inclusion bodies* vor (Daten nicht gezeigt). Dies galt auch für die Expression von Pat-1 mittels des Konstruktes **b** (nur *Cmm*-Signalpeptid) (Daten nicht gezeigt). Trotz der geringen Menge wurde versucht das heterolog exprimierte Protein aus der löslichen Proteinfraction zu reinigen.

Reinigung durch Affinitätschromatographie

Die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte über den His-Tag mittels einer Nickel-Affinitätssäule. Der His-Tag besteht aus sechs Histidin-Resten deren aromatische Gruppe aus einem Imidazolring besteht. Diese Imidazolgruppen sind in der Lage zweiwertige Kationen wie Ni^{2+} zu komplexieren. Nickelionen werden dafür an die Gruppen einer NTA (*nitrilotriacetic acid*)-Matrix immobilisiert. Wird diese Matrix mit einer Proteinprobe inkubiert, können die His-getaggten rekombinanten Proteine an die Nickelionen binden und werden somit an der Matrix festgehalten. Imidazol in steigenden Konzentrationen führt zu einer Ablösung der über die Histidinreste gebundenen Proteine.

Expression und Reinigung der Serinpeptidasen

Die Reinigung von Proteinen kann unter nativen oder denaturierenden Bedingungen erfolgen. Eine Reinigung unter nativen Bedingungen ist immer die erste Wahl, da angenommen wird, dass Proteine in der Form katalytisch aktiv sind.

Für die Gewinnung der rekombinanten Proteine wurde eine 400 ml log-Kultur mit 1mM IPTG induziert und für 3 Stunden auf dem Schüttler bei 37° C inkubiert. Nach Aufschluss der Zellen mit der French Press wurden durch Zentrifugation (3 x je 30 min. bei 10.000 rpm bei 4° C) die löslichen Zellproteine von den unlöslichen samt *inclusion bodies* getrennt. Dieser Schritt stellte schon einen ersten Reinigungsschritt dar. Der Rohextrakt, der die lösliche Proteinfraction enthält, wurde mit der Nickel-Matrix inkubiert. Unspezifisch gebundene Proteine sollten unter Verwendung eines Waschpuffers und die rekombinanten Proteine durch Imidazol von der Matrix eluiert werden. Der überwiegende Teil der Reinigungsversuche (90 %) war erfolglos und zeigte kein Protein im Eluat (Daten nicht gezeigt). War es hingegen möglich, rekombinantes Protein mittels MALDI-TOF-MS Analysen im Eluat nachzuweisen, enthielt die Fraktion sehr viele *E. coli*-Proteine als Kontaminationen (Abb. 14 A und B).

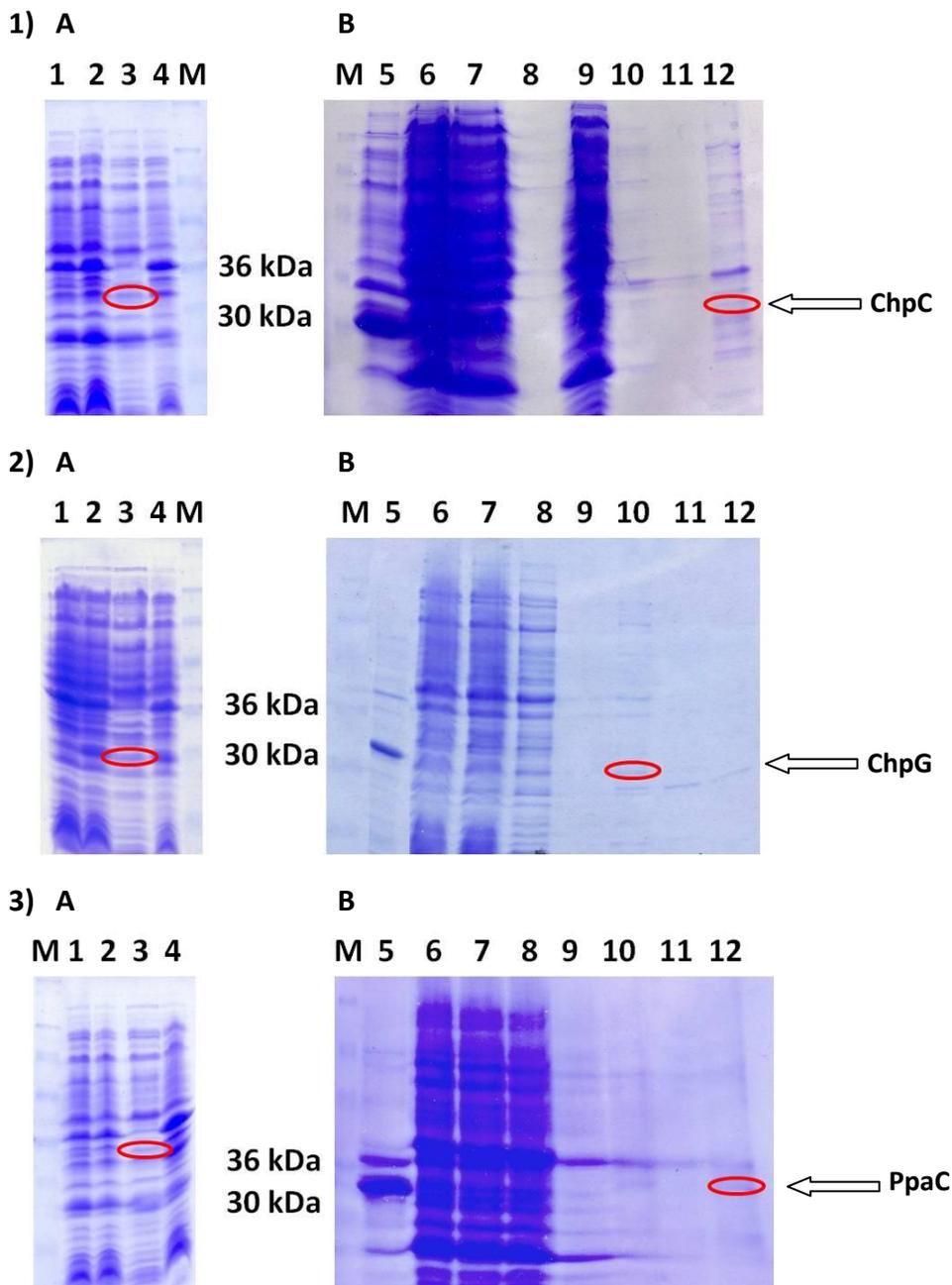


Abbildung 14: A: Expression bei 37° C induziert mit 1mM IPTG. 17,5 % SDS-PAGE, Coomassiefärbung. Spur 1: nicht induziert; Spur 2: 3 h nach Induktion; Spur 3: Rohextrakt; Spur 4: *inclusion bodies*; je 25 µl Probe; M: Proteinmarker SeeBlue (10 µl).

B: Reinigung über Nickel-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen. 17,5 % SDS-PAGE, Coomassiefärbung. Spur 5: *inclusion bodies*; Spur 6: Rohextrakt; Spur 7: Durchfluss; Spur 8: Waschfraktion 1; Spur 9: Waschfraktion 2; Spur 10: Elutionsfraktion 1 mit 300 mM Imidazol; Spur 11: Elutionsfraktion 2 mit 300 mM IPTG; Spur 12: Elutionsfraktion 3 mit 300 mM Imidazol; je 25 µl Probe; M: Proteinmarker SeeBlue (10 µl). Der rote Kreis markiert das unter nativen Bedingungen gereinigte rekombinante Protein.

1) *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) transformiert mit pET23b(+)**ChpCoS**

2) *E. coli* BL21(DE3) transformiert mit pET22b(+)**ChpGoS**

3) *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) transformiert mit pET23b(+)**PpaCoS**

Westernblot-Analysen des Gesamtproteins zeigten, unter Verwendung eines spezifischen Anti-His-Tag Antikörpers (aus Maus, Firma Abcam), Signale an den Stellen der überproduzierten Proteine (Daten nicht gezeigt). Damit konnte die Existenz des C-terminalen His-Tags aufgezeigt werden, so dass die erschwerte Reinigung der überexprimierten Genprodukte nicht auf einen eventuell fehlenden His-Tag zurückgeführt werden konnte. Dementsprechend musste dieses Problem andere Gründe haben. Es war zwar eine erfolgreiche Expression zu verzeichnen, allerdings zeigte der Vergleich des Rohextraktes zum Zellpellet, dass die Proteine hauptsächlich in Form von *inclusion bodies* in den Zellen abgelagert wurden (s. Abb.14 **B**, Spur 5). Damit war die Menge an nativen und löslichen Protein relativ gering (s. Abb.14 **B**, Spur 6). Eine geringe Konzentration des His-getaggten Proteins führte vermutlich dazu, dass vermehrt andere Proteine des Expressionsstammes unspezifisch an die Säule gebunden und somit mögliche Bindungsstellen blockiert hatten. Der relativ hohe Proteinanteil im Durchfluss (s. Abb.14 **B**, Spur 7) und in der ersten Waschfraktion ließen darauf schließen, dass der His-Tag nicht frei zugänglich war und die rekombinanten Proteine somit überhaupt nicht oder nur schwach an das Säulenmaterial binden konnten. Eine Erhöhung des Waschvolumens und eine Imidazolzugabe zum Waschpuffer bei gleichzeitiger Reduzierung des Säulenvolumens konnte die unspezifische Bindung der *E. coli*-Proteine nicht verringern (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurde versucht durch Reduzierung der IPTG-Konzentration und Herabsetzung der Inkubationstemperatur die Expressionsstärke zu verringern, da eine starke Expression bestimmter Proteine aufgrund toxischer Effekte (Bentley et al., 1991) der aktiven Proteine zu einer verstärkten Bildung von *inclusion bodies* führen kann. Eine geringere Expressionsstärke könnte also das Verhältnis von gelöstem Protein zu *inclusion bodies* verändern und in Richtung der gelösten Proteine verschieben.

Eine Reduzierung der IPTG-Konzentration von 1 mM auf 0,08 mM führte allerdings zu keinem nennenswerten Unterschied zu den vorherigen Experimenten. Weder war die Bildung der *inclusion bodies* verringert (Abb.15, Spur 4) noch konnte die Expression des nativen Proteins gesteigert werden (Abb. 15, Spur 3). Auch der Reinigungsgrad der rekombinanten Proteine war mit den bisher erzielten Ergebnissen vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

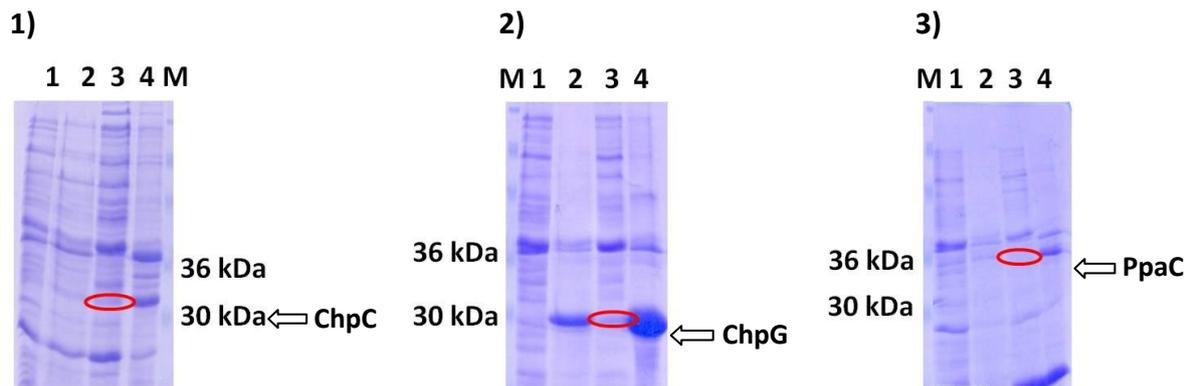


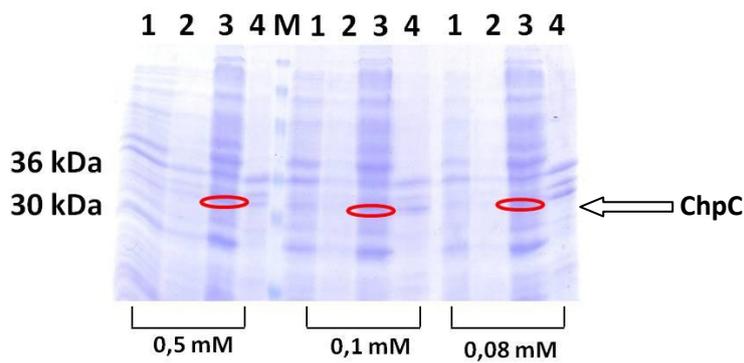
Abbildung 15: Expression bei 37° C induziert mit 0,08 mM IPTG. 17,5 % SDS-PAGE, Coomassiefärbung. Spur 1: nicht induzierte Zellen; Spur 2: 3 h nach Induktion; Spur 3: Rohextrakt; Spur 4: *inclusion bodies*; je 25 µl Probe; M: Proteinmarker SeeBlue (10 µl). Der rote Kreis markiert den löslichen Anteil der rekombinanten Proteine im Rohextrakt.

- 1) *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) transformiert mit pET23b(+)**ChpCoS**
- 2) *E. coli* BL21(DE3) transformiert mit pET22b(+)**ChpGoS**
- 3) *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) transformiert mit pET23b(+)**PpaCoS**

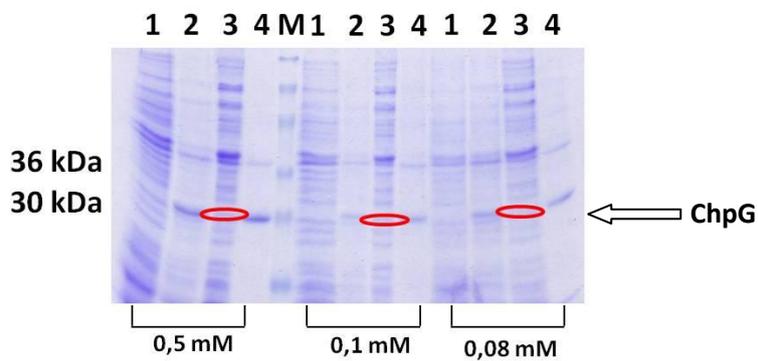
Die Reduzierung allein der IPTG-Konzentration führte also nicht zum gewünschten Ergebnis. In weiteren Versuchen wurde als Inkubationstemperatur das Temperaturoptimum von *Clavibacter* (26° C) gewählt und mit IPTG-Konzentrationen von 0,5, 0,1 und 0,08 mM kombiniert. Nach Induktion der logarithmisch wachsenden Kultur (OD₅₈₀ von 0,7) und dreistündiger Inkubation bei 26° C wurden die Zellen lysiert und die löslichen Proteine aus dem Lysat und durch Zentrifugation von den *inclusion bodies* getrennt.

Ein Vergleich innerhalb des gleichen Expressionsstammes zeigte keinen Unterschied zwischen den verschiedenen eingesetzten IPTG-Konzentrationen (Abb. 16). Eine Verschiebung des Expressionslevels zugunsten des löslichen rekombinanten Proteins im Rohextrakt (Abb. 16, Spur 3) konnte bei keinem Konstrukt verzeichnet werden und zeigte somit keine Verbesserung zu den vorherigen Versuchen.

1)



2)



3)

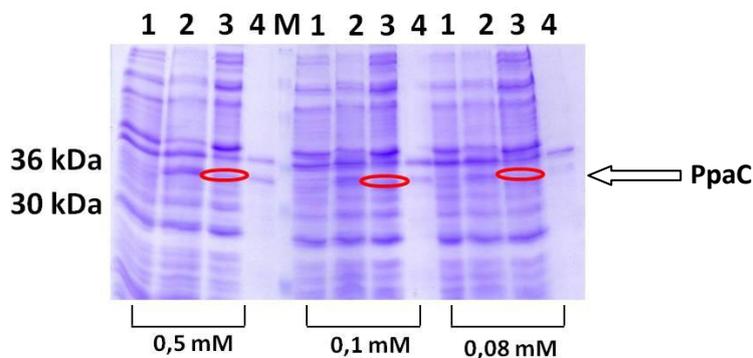


Abbildung 16: Expression bei 26° C und verschiedenen IPTG-Konzentration (0,5; 0,1 und 0,08 mM). 17,5 % SDS-PAGE, Coomassiefärbung. Spur 1: nicht induziert; Spur 2: 3 h nach Induktion; Spur 3: Rohextrakt; Spur 4: *inclusion bodies*; je 25 µl Probe; M: Proteinmarker SeeBlue (10 µl). Der rote Kreis markiert den löslichen Anteil der rekombinanten Proteine im Rohextrakt.

1) *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) transformiert mit pET23b(+) **ChpCoS**

2) *E. coli* BL21(DE3) transformiert mit pET22b(+) **ChpGoS**

3) *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) transformiert mit pET23b(+) **PpaCoS**

Die Expression war insgesamt niedriger als bei der Induktion bei 37 °C mit 1 mM und 0,08 mM IPTG (s. Abb. 14, S. 104 und Abb. 15, S. 106). Auch das Verhältnis zwischen löslichem

und unlöslichem Protein konnte nicht zu Gunsten der löslichen Proteinfraktion verbessert werden. Entsprechende Versuche zur Reinigung der His-getaggtten Proteine blieben trotz Erhöhung des Kulturvolumens von 400 ml auf einen Liter erfolglos (Daten nicht gezeigt). Somit blieb festzustellen, dass die Modifikation der Inkubationstemperatur und der IPTG-Konzentration die Menge der gelösten Proteine nicht erhöht hat und deren Reinigung somit nicht ermöglichte. Neben den beiden Parametern Temperatur und IPTG-Konzentration könnte noch ein weiterer Punkt eine Rolle spielen - das Kulturmedium.

Expression unter osmotischen Stress

Eine übermäßige Produktion von *inclusion bodies* stellt ein generelles Problem bei der Expression rekombinanter Proteinen dar. Arbeiten von Blackwell und Horgan (1991) zeigten eine reduzierte Synthese von *inclusion bodies* durch Zugabe von Sorbitol und Betain ins Kulturmedium. In Anwesenheit von 660 mM Sorbitol (oder einer höheren Konzentration) konnte die Bildung von unlöslichem Protein von 90 % auf weniger als 1 % verringert werden. Bei Verwendung von LB-Medium und gleichzeitiger Herabsetzung der Inkubationstemperatur (von 37° C auf 25° C) wurde die Ausbeute an aktivem Protein um einen Faktor 400 (im Vergleich zu in M9-Medium gewachsenen Kontrollzellen) erhöht. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei Expressionsuntersuchungen einer transmembranen Histidin-Proteinkinase aus *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* erzielt (Stolov et al., 2006). Auch hier konnte durch Einsatz des modifizierten LB-Mediums (1M Sorbitol; 2,5 mM Betain) nach IPTG-Induktion (1 mM; Inkubationstemperatur: 37° C) die Bildung von *inclusion bodies* verringert und der Anteil des nativen Proteins erhöht werden. Durch die hohe Sorbitolkonzentration wird ein osmotischer Stress induziert. Um sich an die osmotischen Bedingungen anzupassen, erfolgt die Produktion oder Aufnahme von niedermolekularen organischen Osmolyten, wie Betain. Die Aufnahme von Osmolyten bewirkt einen stabilen Hydratationszustand und erhöht die Toleranz gegenüber Stressfaktoren. Zudem können Osmolyte intrazelluläre Signalkaskaden, zelluläre Stressantworten und die Proteinstabilität modulieren, sowie als Antioxidanz wirken (Schliess et al., 1999; Wettstein & Häussinger 1997; Lui & Bolen 1995). Zusätzlich zu seiner Aufnahme als Osmolyt übernimmt Betain eine Chaperon-ähnliche Funktion (Ueland et al., 2005) und kann somit die Proteinstruktur unter denaturierenden Bedingungen stabilisieren.

Logarithmisch wachsende *E. coli*-Kulturen in LB-Sorbitol-Betain-Medium wurden mit drei verschiedenen IPTG-Konzentrationen (1,0; 0,5; 0,1 mM) bei 37 °C und 26° C induziert. Nach dreistündiger Inkubation war eine Zunahme des Expressionslevels zu erkennen (Abb. 17 **A** und **B**, jeweils Spuren 1-4). Im Gegensatz zu den Versuchen von Blackwell & Horgan (1991) und Stolov et al. (2006) zeigte die Überexpression im Vergleich zum TBY-Medium (s. Abb. 14-16, S. 104-107) allerdings unter gleichen Versuchsbedingungen eine höhere Bildung von *inclusion bodies* (Abb. 17 **A** und **B**, jeweils Spur 4). Der Anteil an nativem Protein im Rohextrakt erhöhte sich bei 37° C nicht (Abb. 17 **A** und **B**, jeweils Spur 3) und war mit der Expression im TBY-Medium vergleichbar (s. Abb. 14-16, S. 104-107).

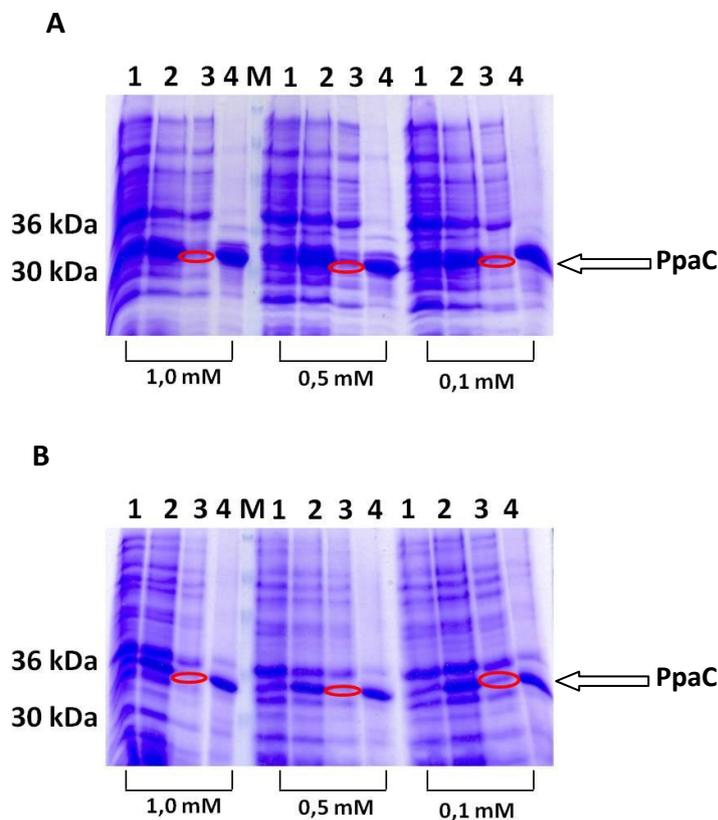


Abbildung 17 A und B: Expression des rekombinanten Proteins **PpaCoS** in LB-Sorbitol-Betain-Medium bei 37° C (**A**) und 26° C (**B**) und verschiedenen IPTG-Konzentrationen (1,0 mM; 0,5 mM; 0,1 mM). 17,5 % SDS-PAGE, Coomassiefärbung. Spur 1: nicht induziert; Spur 2: 3 h nach Inkubation; Spur 3: Rohextrakt; Spur 4: *inclusion bodies*; je 25 µl Kultur; M: Proteinmarker SeeBlue (10 µl). Der rote Kreis markiert den löslichen Anteil der rekombinanten Proteine im Rohextrakt.

Lediglich bei einer Temperatur von 26° C und der niedrigsten IPTG-Konzentration (0,1 mM) war die lösliche Proteinmenge minimal erhöht (s. Abb. 17 B: 0,1 mM IPTG, Spur: 3). Eine Anreicherung des PpaC-Proteins war unter diesen Versuchsbedingungen zwar möglich, allerdings auch nur in geringer Konzentration und das Eluat enthielt noch Nebenbanden (Abb. 18, Spur 11).

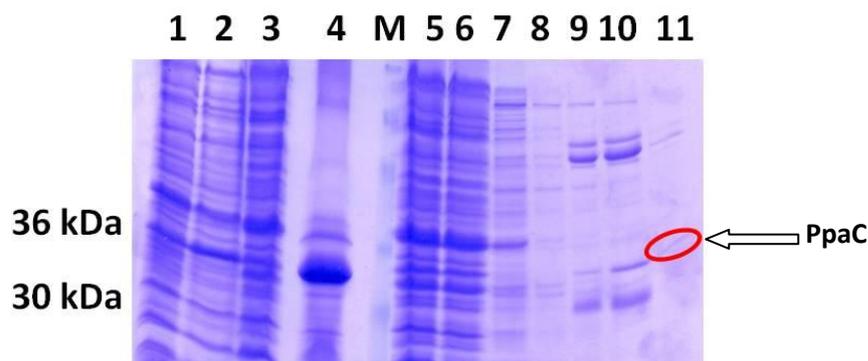


Abbildung 18: Reinigung des **PpaCoS**-Proteins in LB-Sorbitol-Betain-Medium bei 26° C (1 Liter) mit einer IPTG-Induktion von 0,1 mM. 17,5 % SDS-PAGE, Coomassiefärbung. Spur 1: nicht induziert; Spur 2: 3 h nach Induktion; Spur 3: Rohextrakt; Spur 4: *inclusion bodies*; Spur 5: Durchfluss; Spur 6: Waschfraktion 1; Spur 7: Waschfraktion 2; Spur 8: Waschfraktion 3; Spur 9: Elutionsfraktion 1 mit 300 mM Imidazol; Spur 10: Elutionsfraktion 2 mit 300 mM Imidazol; Spur 11: Elutionsfraktion 3 mit 300 mM Imidazol; je 25 µl Probe; M: Proteinmarker SeeBlue (10 µl). Der rote Kreis markiert das unter nativen Bedingungen gereinigte rekombinante Protein.

Zudem zeigten die induzierten *E. coli*-Zellen unter dem Mikroskop nicht nur eine veränderte Zellstruktur (kugelige Zellform), sondern auch bei der photometrischen Messung der Bakteriendichte, im Gegensatz zum Wachstum in TBY-Medium, ein verlangsamtes Zellwachstum. Dies war auf einen starken Wasserverlust der Zellen in Folge des osmotischen Drucks zurückzuführen, da die Cytoplasmamembran keine Diffusionsbarriere für Wasser darstellt. Solche Anzuchtbedingungen stellen für eine Zelle einen enormen Stressfaktor dar, der wiederum zu inkorrekt gefalteten Polypeptidketten führen kann. Dies spiegelte sich auch in dem Expressionsverhalten der Proteine ChpCoS und ChpGoS wieder, die nur in Form von *inclusion bodies* abgelagert wurden (Daten nicht gezeigt). Neben einer schwachen Expression der Proteine in nativer Form, schien auch die Faltung der Proteine ein weiteres Problem darzustellen. Hohe Mengen der Proteine im Durchfluss und in der ersten Waschfraktion (Abb.18, Spur 5 und Spur 6) sprechen möglicherweise dafür, dass unter

nativen Reinigungsbedingungen der C-terminale His-Tag nicht frei zugänglich war und die rekombinanten Proteine nicht fest an das Säulenmaterial binden konnten.

An dieser Stelle waren alle Möglichkeiten ausgeschöpft die Proteine unter Bedingungen zu reinigen, die eine native Konformation erhalten. Nach der Modifikation der IPTG-Konzentration, der Inkubationstemperatur und des Kulturmediums lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die Ausbeute an löslichem Protein sehr niedrig ist. Zudem war zu beobachten, dass die geringen Mengen löslichen Proteins nur zu einem Bruchteil an der Säule binden und eluiert werden konnten. Diese geringsten Mengen an gereinigtem Protein waren somit für die anstehenden Enzymtests nicht ausreichend.

Also blieb daher nur noch der Weg, die Proteine unter denaturierenden Bedingungen zu reinigen und anschließend zu renaturieren. Dazu wurden die *inclusion bodies* verwendet, die in ausreichender Menge zur Verfügung standen. Diese werden unter Benutzung von Harnstoff denaturiert, womit der His-Tag zur Affinitätsreinigung frei vorliegen sollte. Außerdem ist die relative Proteinmenge der überexprimierten Proteine in den *inclusion bodies* wesentlich höher.

Reinigung der Serinpeptidasen unter denaturierenden Bedingungen

Grundsätzlich gibt es neben der Reinigung im nativen Zustand auch die Möglichkeit Proteine unter denaturierenden Bedingungen zu reinigen. Die Denaturierung der *inclusion bodies* erfolgte dabei unter Anwendung eines Phosphatpuffers, der mit 8 M Harnstoff versetzt wurde. Durch die Denaturierung verliert das Protein zwar seine Konformation und somit auch seine katalytische Aktivität, die Bindung an das Säulenmaterial kann allerdings deutlich verbessert werden, da der His-Tag frei zugänglich ist.

Für die Isolierung der Proteine wurden diese aus den *inclusion bodies* gereinigt. In diesen liegen die Proteine in unlöslicher Form vor, können aber im Anschluss an die French Press-Behandlung nach Zentrifugation als Pellet von den übrigen cytosolischen Proteinen, die sich im Überstand befinden, abgetrennt werden. Nach der Reinigung der Proteine über die Ni²⁺-Affinitätssäule liegen die Proteine in denaturierten Zustand vor. Für die Wiederherstellung der Aktivität müssen die Proteine renaturiert werden, das bedeutet die Überführung in ihre aktive Konformation. Dies erfolgte durch Dialyse, mittels derer der

Harnstoff schrittweise aus der Proteinlösung entfernt wird. Die Dialyse erfolgte gegen den Renaturierungspuffer **Roti Fold** der Firma Roth. Durch die langsame Entfernung des Harnstoffes kann das Protein zurückfalten und damit wieder seine aktive Konformation einnehmen.

Aufgrund der bereits durchgeführten Experimente war bekannt, dass sich bei der Induktion mit 1 mM IPTG und einer Inkubation bei 37° C ein hoher Anteil der exprimierten Proteine in den *inclusion bodies* zu finden ist. Daher wurden diese Bedingungen verwendet, um *inclusion bodies* zu isolieren, die dann in 8 M Harnstoff gelöst wurden bevor die Reinigung der Proteine über die Nickel-Affinitätschromatographie erfolgte.

Ab dieser Versuchsreihe wurde der Expressionsvektor für das Protein Pat-1-PelB mitgeführt, der erst zu diesem Zeitpunkt der Arbeit fertiggestellt war.

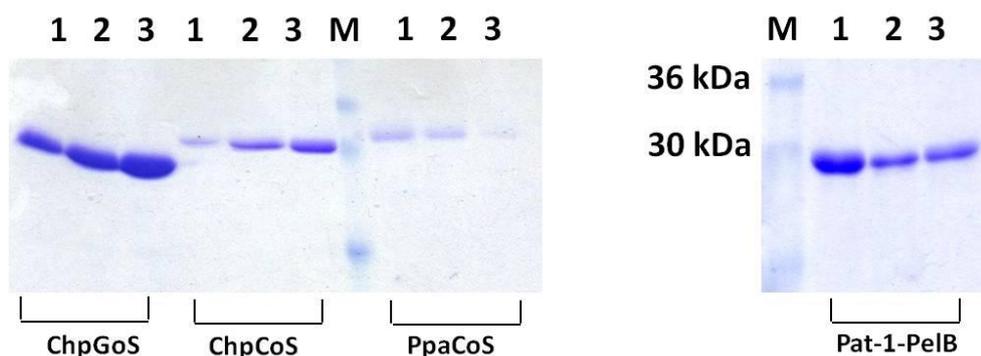


Abbildung 19: Reinigung von *inclusion bodies* durch Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen. 17,5 % SDS-PAGE, Coomassiefärbung. Spur 1: Elutionsfraktion 1 mit 300 mM Imidazol, Spur 2: Elutionsfraktion 2 mit 300 mM Imidazol, Spur 3: Elutionsfraktion 3 mit 300 mM Imidazol.

In Abbildung 19 ist die Reinigung der Proteine unter denaturierenden Versuchsbedingungen dargestellt. Es ist für alle Proteine eine Reinigung möglich, die nur bei Färbung des SDS-Gels mit Silber einige wenige Nebenbanden aufzeigt. Eine ausreichende Konzentration der rekombinanten Proteine im Eluat konnte ebenfalls erreicht werden. Allerdings war es im Anschluss nicht möglich die Proteine erfolgreich zu renaturieren, da diese während der Dialyse präzipitierten. Auch eine Dialyse vor Harnstoffzugabe, wie sie für Proteine mit hohem isoelektrischem Punkt empfohlen wird (Roth), führte zum gleichen Ergebnis. Für die

korrekte Rückfaltung mancher rekombinanter Proteine müssen stärker chaotrope Agenzien als Harnstoff eingesetzt werden (Roth). Doch auch bei der Verwendung von 6 M Guanidinium-HCl kam es während der Renaturierung erneut zur Präzipitation. Der Prozess der Renaturierung ist recht aufwendig (Rudolph & Lilie, 1996; Vallejo & Rinas, 2004) und garantiert auch kein aktives Protein. Zudem ist die Aufarbeitung mit einem hohen Verlust (bis zu 75 %) des überexprimierten Proteins verbunden (Datar et al., 1993). Somit war es auch über diesen Weg nicht möglich native Proteine für Enzymtests zu gewinnen.

Unlösliche Proteinfractionen können aber zur Herstellung polyklonaler Antikörper verwendet werden (Shirley & Chapple, 2003) und wurden auch in der vorliegenden Arbeit als Antigen zur Generierung polyklonaler Antikörper (s. Kapitel IV, Ergebnisse) genutzt, um sie zur Anreicherung der *Clavibacter*-Proteasen aus dem Sekretom einzusetzen.

Expression der Serinpeptidasen im *E. coli*-Expressionsstamm *ArcticExpress*

Generell können Chaperone hilfreich bei der korrekten Faltung einer Polypeptidkette sein. Eine gewisse Verbesserung der Expressionsrate des nativen PpaCoS-Proteins konnte mit Hilfe von Betain beobachtet werden. Auch ist eine Kultivierung bei niedrigen Temperaturen eine mögliche Strategie für die Erhöhung von löslichem Protein (Schein, 1989). Der *E. coli*-Expressionstamm *ArcticExpress* (Stratagene) beinhaltet das Plasmid pACYC (etwa 5,5 kb, kompatibel mit den pET-Vektoren), das neben einer Gentamicinresistenzgenkassette, auch zwei konstitutiv exprimierte Gene, die für die Chaperone *Cpn 10* (10 kDa) und *Cpn 60* (57 kDa) codieren, trägt. Diese Chaperone stammen aus dem psychrophilen Bakterium *Oleispira antarctica*, besitzen ihre höchste Proteinfaltungsaktivität bei einer Temperatur zwischen 4° C und 12° C und können somit für die Expression bei niedrigen Temperaturen genutzt werden (Ferrer et al., 2003).

Nach der Transformation der *ArcticExpress*-Zellen mit den konstruierten Expressionsplasmiden fand eine Sekretion der rekombinanten Proteine auch in diesem System nicht statt (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend wurde nur mit den Expressionsplasmiden ohne Signalpeptid weitergearbeitet. Für die Konstrukte ChpCoS, ChpGoS, PpaCoS und Pat-1-PelB wurde die Expression mit 1 mM IPTG induziert und die Zellen 24 Stunden bei 12° C inkubiert. Eine deutliche Reduzierung der Menge der *inclusion bodies* konnte nicht verzeichnet werden (Abb. 20-23 A, Spur 4). Allerdings war im Vergleich

zu den Versuchen mit den *E. coli*-Expressionsstämmen BL21(DE3) und BL21-CodonPlus(DE3) eine größere Menge der gesuchten Proteine im Rohextrakt, also in löslicher Form zu finden (Abb.20-23 A, Spur 3).

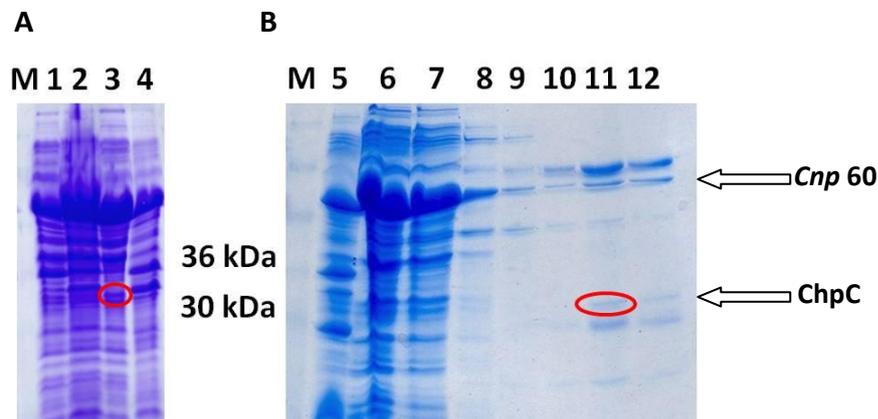


Abbildung 20: A: Expression des **ChpCoS**-Proteins im *E. coli ArcticExpress* bei 12° C (100 ml) nach Induktion mit 1 mM IPTG. 17,5 % SDS-PAGE, Coomassiefärbung. Spur 1: nicht induziert; Spur 2: 3 h nach Induktion; Spur 3: Rohextrakt; Spur 4: *inclusion bodies*; je 25 µl Probe; M: Proteinmarker SeeBlue (10 µl). Der rote Kreis markiert den löslichen Anteil der rekombinanten Proteine im Rohextrakt.

B: Reinigung über Nickel-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen. 17,5 % SDS-PAGE, Coomassiefärbung. Spur 5: *inclusion bodies*; Spur 6: Rohextrakt; Spur 7: Durchfluss; Spur 8: Waschfraktion 1; Spur 9: Waschfraktion 2; Spur 10: Elutionsfraktion 1 mit 300 mM Imidazol; Spur 11: Elutionsfraktion 2 mit 300 mM IPTG; Spur 12: Elutionsfraktion 3 mit 300mM Imidazol; je 25 µl Probe; M: Proteinmarker SeeBlue (10 µl). Der rote Kreis markiert das unter nativen Bedingungen gereinigte rekombinante Protein.

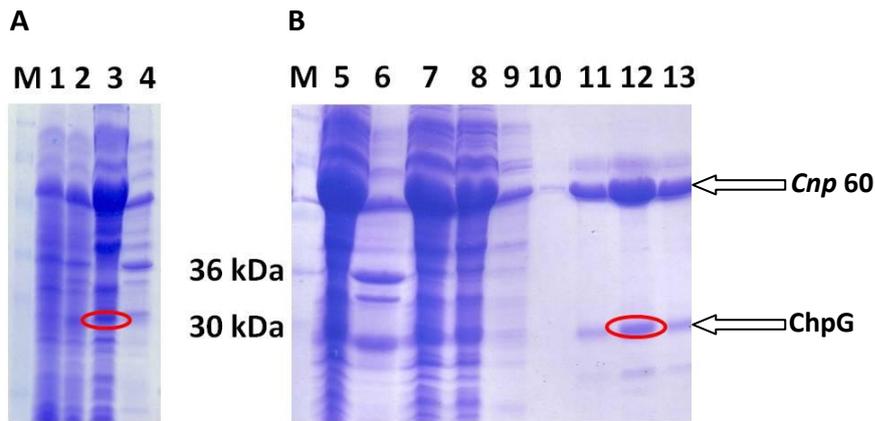


Abbildung 21: A: Expression des **ChpGoS**-Proteins im *E. coli ArcticExpress* bei 12° C (100 ml) mit einer IPTG-Induktion von 1 mM. 17,5 % SDS-PAGE, Coomassiefärbung. Spur 1: nicht induziert; Spur 2: 3 h nach Induktion; Spur 3: Rohextrakt; Spur 4: *inclusion bodies*; je 25 µl Probe; M: Proteinmarker SeeBlue (10 µl). Der rote Kreis markiert den löslichen Anteil der rekombinanten Proteine im Rohextrakt.

B: Reinigung über Nickel-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen. 17,5 % SDS-PAGE, Coomassiefärbung. Spur 5: Rohextrakt; Spur 6: *inclusion bodies*; Spur 7: Durchfluss; Spur 8: Waschfraktion 1; Spur 9: Waschfraktion 2; Spur 10: Waschfraktion 3; Spur 11: Elutionsfraktion 1 mit 300 mM IPTG; Spur 12: Elutionsfraktion 2 mit 300mM Imidazol; Spur 13: Elutionsfraktion 3 mit 300mM Imidazol je 25 µl Probe; M: Proteinmarker SeeBlue (10 µl). Der rote Kreis markiert das unter nativen Bedingungen gereinigte rekombinante Protein.

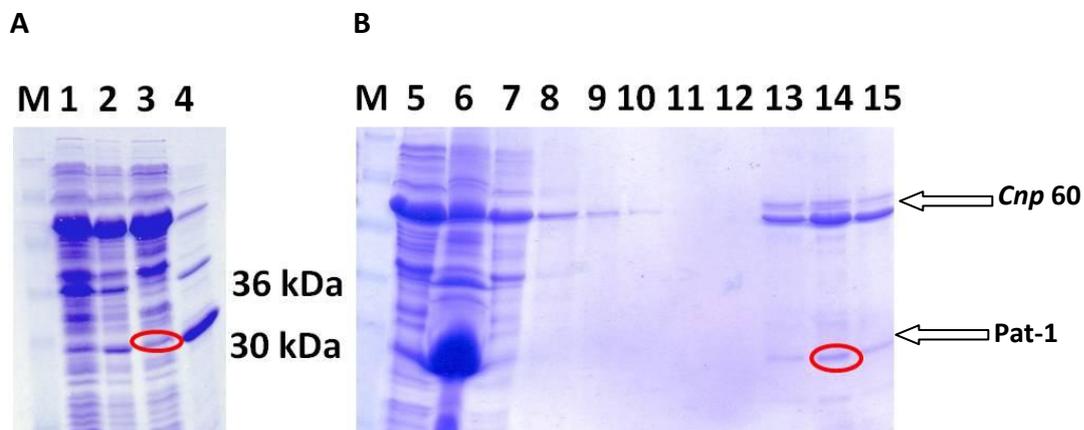


Abbildung 22: A: Expression des **Pat-1-PelB**-Proteins im *E. coli ArcticExpress* bei 12° C (100 ml) nach Induktion mit 1 mM IPTG. 17,5 % SDS-PAGE, Coomassiefärbung. Spuren 1: nicht induziert; 2: 3 h nach Induktion; 3: Rohextrakt; 4: *inclusion bodies*; je 25 µl Probe; M: Proteinmarker SeeBlue (10 µl). Der rote Kreis markiert den löslichen Anteil der rekombinanten Proteine im Rohextrakt.

B: Reinigung über Nickel-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen. 17,5 % SDS-PAGE, Coomassiefärbung. Spur 5: Rohextrakt; Spur 6: *inclusion bodies*; Spur 7: Durchfluss; Spur 8: Waschfraktion 1; Spur 9: Waschfraktion 2; Spur 10: Waschfraktion 3; Spur 11: Waschfraktion 4; Spur 12: Waschfraktion 5; Spur 13: Elutionsfraktion 1 mit 300 mM Imidazol; Spur 14: Elutionsfraktion 2 mit 300 mM Imidazol; Spur 15: Elutionsfraktion 3 mit 300 mM Imidazol; je 25 µl Probe; M: Proteinmarker SeeBlue (10 µl). Der rote Kreis markiert das unter nativen Bedingungen gereinigte rekombinante Protein.

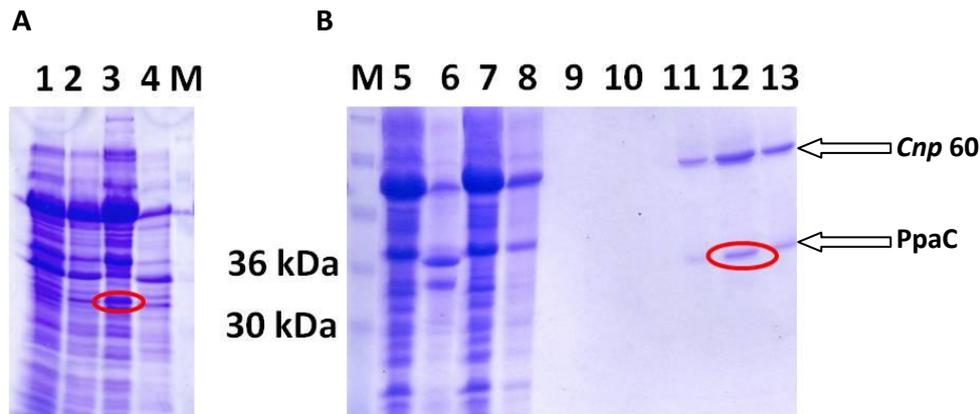


Abbildung 23: A: Expression des **PpaCoS**-Proteins im *E. coli ArcticExpress* bei 12° C (100 ml) nach Induktion mit 1 mM IPTG. 17,5 % SDS-PAGE, Coomassiefärbung. Spuren 1: nicht induziert; 2: 3 h nach Induktion; 3: Rohextrakt; 4: *inclusion bodies*; je 25 µl Probe; M: Proteinmarker SeeBlue (10 µl). Der rote Kreis markiert den löslichen Anteil der rekombinanten Proteine im Rohextrakt.

B: Reinigung über Nickel-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen. 17,5 % SDS-PAGE, Coomassiefärbung. Spur 5: Rohextrakt; Spur 6: *inclusion bodies*; Spur 7: Durchfluss; Spur 8: Waschfraktion 1; Spur 9: Waschfraktion 2; Spur 10: Waschfraktion 3; Spur 11: Elutionsfraktion 1 mit 300 mM IPTG; Spur 12: Elutionsfraktion 2 mit 300mM Imidazol; Spur 13: Elutionsfraktion 3 mit 300mM Imidazol je 25 µl Probe; M: Proteinmarker SeeBlue (10 µl). Der rote Kreis markiert das unter nativen Bedingungen gereinigte rekombinante Protein.

Zwar sind in den Durchflussfraktionen (Abb. 20-23 B, Spur 7) und in der ersten Waschfraktion (Abb.20-23 B, Spur 8) auch weiterhin größere Mengen des rekombinanten Proteins zu finden, allerdings konnte die überwiegende Menge mit Imidazol vom Säulenmaterial eluiert werden (Abb. 20-23 B). Auffällig bei den Elutionsfraktionen ist das hohe Vorkommen einer Proteinbande mit einer Größe von ca. 57 kDa. Die Proteinmenge konnte trotz stringenter Waschschriffe (bis zu 50 mM Imidazol) nicht im Eluat reduziert werden (Daten nicht gezeigt). Die Reinigung der His-getaggten Proteine durch Einsatz eines pH-Gradienten (von 20 mM bis 300 mM Imidazol) zeigte ebenfalls, dass die Mehrheit dieses Proteins mit dem rekombinanten Protein von der Nickel-Matrix coeluierte (Daten nicht gezeigt). Es hatte somit den Anschein, dass beide Proteine eine Interaktion miteinander eingehen. Der Nachweis dieser Interaktion durch eine Quervernetzung mit Glutaraldehyd und Analyse der Proteinfraction in der SDS-Page konnte bisher nicht erbracht werden. Aufgrund der Größe des Proteins (57 kDa) und seiner extrem hohen Expressionsrate selbst bei nicht induzierten Zellen konnte es dem schon erwähnten Chaperon-Protein Cpn60 zugeordnet werden. Da dieses Chaperon an der Faltung der Polypeptidkette beteiligt ist, ist eine Bindung dieses Helferproteins an die rekombinanten Proteine möglich. Für die

folgenden Aktivitätsnachweise der rekombinanten Proteine sollte dies aber unproblematisch sein, da davon ausgegangen werden kann, dass das Chaperon keine Proteaseaktivität besitzt. Desweiteren wurden für die Enzymassays die löslichen Proteine eines Rohextraktes ohne rekombinantes Protein, die ebenfalls das Chaperonproteine beinhalten, mitgeführt.

Identifizierung der His-getagten Proteine über Westernblot

Neben einer Identifizierung der rekombinanten Proteine über MALDI-TOF-Analyse können die His-Tags der Fusionsproteine in den Elutionsfraktionen immunologisch mit einem hochspezifischen monoklonalen Anti-His-Tag Antikörper mit Hilfe immunologischer Nachweismethoden nachgewiesen werden. Der Antikörper zeichnet sich durch eine sehr hohe Spezifität gegenüber rekombinanten Proteinen aus, die ein Epitop von mindestens sechs Histidinresten am N- oder C-Terminus tragen. Obwohl die Elutionsfraktionen neben dem gesuchten rekombinanten Protein noch einige Nebenbanden zeigten, ist in Abbildung 24 zu erkennen, dass für alle überexprimierten Proteine eine singuläre Bande in der zu erwarteten Molekulargröße auftauchte.

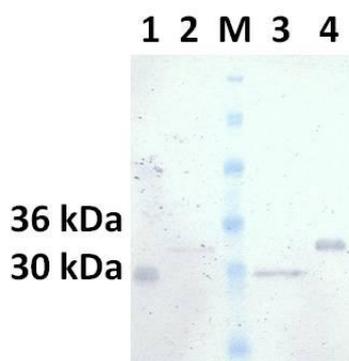


Abbildung 24: Westernblot-Analyse der Elutionsfraktionen. Primärer Antikörper Anti-His-Tag-IgG (Maus, Firma Abcam), Sekundär-Antikörper Anti-Maus-IgG-Alkalische Phosphatase (Ziege, Firma Abcam). Spur 1: ChpGoS gereinigt, 24 h nach Induktion mit 1mM IPTG; Spur 2: ChpCoS gereinigt, 24 h nach Induktion mit 1 mM IPTG; Spur 3: Pat-1-PelB gereinigt, 24 h nach Induktion mit 1 mM IPTG; Spur 4: PpaCoS gereinigt, 24 h nach Induktion mit 1 mM IPTG; je 25 μ l Probe; M: Proteinmarker SeeBlue (10 μ l).

Somit konnte anhand der Western Blot-Technik eine qualitative Bestimmung der rekombinanten Proteine aus einem Proteingemisch erfolgen. Durch die Signale bei den

Western Blot-Analysen wurde die korrekte Fusion des His-Tags an dem C-Terminus des Proteins nachgewiesen, womit gezeigt wurde, dass die rekombinanten und angereicherten Proteine über die komplette katalytische Domäne verfügen. Die über Nickel-Affinitätschromatographie gereinigten Proteine konnten somit zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität unter Verwendung chromogener Substrate eingesetzt werden.

Diskussion

Verschiedene Konstrukte wurden für die Überexpression der Serinpeptidasen erstellt. Die Reinigung sollte möglichst aus dem *E. coli*-Kulturüberstand/Periplasma erfolgen, da nur dort eine Prozessierung des Signalpeptids zu erwarten war, und somit der native N-Terminus der jeweiligen Serinproteasen erhalten werden sollte. Allerdings wurde in keinem der Konstrukte mit Signalpeptid eine Sekretion festgestellt, so dass die Reinigung der Proteine aus dem Cytoplasma erfolgen musste. Dementsprechend wurde nur noch mit den Konstrukten ohne jedes Signalpeptid gearbeitet. So könnte trotzdem der natürliche N-Terminus erhalten werden, sofern die bioinformatische Signalpeptid-Vorhersage, die für die Konstruktion der Expressionsplasmide verwendet wurde, korrekt war. Die Überexpression von *Clavibacter*-Proteinen in den *E. coli*-Expressionssystemen BL21(DE3) und BL21-CodonPlus(DE3) führten zur Ablagerung der Proteine in Form von *inclusion bodies*. Eine Akkumulierung in Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) von Proteinen scheint ein verbreitetes Problem zu sein. So wurde für die heterologe Expression von SNG2 (*sinapolyglucose accumulator 2*), das zur Gruppe der Serin Carboxypeptidase-ähnlichen (SCPL) Proteinen gehört und für die SCT (Sinapolyglukose:Cholin-Sinapolytransferase) in *Arabidopsis thaliana* codiert, unter Verwendung der Expressionsstämme BL21(DE3) und BL21-CodonPlus(DE3) ausschließlich die Ablagerung des rekombinanten Proteins in Form von *inclusion bodies* verzeichnet. Auch eine Reduzierung der Inkubationstemperatur und IPTG-Konzentration führte zu keiner Bildung von löslichem Protein (Shirley et al., 2001).

So war es erst unter Verwendung des *ArcticExpress*-Stammes, der ein Plasmid mit Genen für zwei Kälte-adaptierte Chaperone trägt, möglich, die Menge an löslichem Protein zu erhöhen und in akzeptabler Menge zu reinigen. Die Expression nativer extrazellulärer Proteine eines Gram-positiven Organismus in einem *E. coli*-System und die erfolgreiche Reinigung über

Affinitätschromatographie scheint von der Aktivität des Chaperons beeinflusst zu sein (Hartl, 1996). Diese konservierten Proteine können durch die Faltung neu synthetisierter Proteine die Anhäufung falsch gefalteter Proteinstrukturen, besonders in Stress-induzierten Zellen (z.B. durch hohe Temperatur), vermeiden. Die Chaperone binden ihre Substrate über eine Domäne, die hydrophobe Elemente im Zielprotein erkennt. Mehrere Zyklen von Bindung und Freisetzung des Substrates sind für die vollständige Faltung eines Proteins erforderlich. Die Bindung und Freisetzung geschieht in beiden Fällen durch eine von ATP-Bindung und – Hydrolyse vermittelte Konformationsänderung des Chaperons (Bukau & Horwich, 1998).

Kapitel III. Aktivitätstests mit den rekombinanten Proteine ChpC, ChpG, Pat-1 und PpaC

Nach erfolgreicher Überexpression und Reinigung (Ni^{2+} -Affinitätschromatographie) der rekombinanten Proteine unter Verwendung des *E. coli*-Expressionssystems (*ArcticExpress*) erfolgte die Überprüfung der enzymatischen Aktivität. Als Substrate wurden die synthetischen, chromogenen Substrate Azocasein, Azoalbumin und das für Serinproteasen spezifische Substrat S2288 ausgewählt.

Enzymassays mit Azocasein als chromogenem Substrat

Für dieses Substrat konnte bereits mit konzentriertem *Cmm382*-Kulturüberstand ein Umsatz nachgewiesen werden (s. Kapitel I, Ergebnisse). Die höchste Aktivität hatten die sekretierten *Cmm*-Proteine, wenn Azocasein, gelöst in 50 mM Tris-Puffer, als Substrat eingesetzt wurde, wobei das pH-Optimum bei pH 6,0 lag. Diese Versuchsbedingungen für den Aktivitätsnachweis der rekombinanten Proteine übernommen. Ebenso wie die Proteine des *Cmm*-Sekretoms, lagen die überexprimierten Proteine in Phosphatpuffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0) vor. Ebenfalls wie bei den bereits durchgeführten Experimenten (s. Kapitel I) wurde auch hier 150 μl Enzymlösung (der Anteil der rekombinanten Proteine am Proteingehalt kann nicht genau bestimmt werden, da die Enzymproben nicht rein waren) mit 250 μl Substratlösung bei 26 °C für 48 h inkubiert.

Die Freisetzung des Farbstoffs wurde photometrisch bei einer $\text{OD}_{440\text{nm}}$ verfolgt. Durch Messung der Absorption der Enzymprobe abzüglich der Absorption des Referenzwertes wird die Steigerung der Extinktion (ΔE) ermittelt, die die Intensität der Farbreaktion und damit den Substratumsatz widerspiegelt. Über die gemessenen OD-Werte (ΔE) kann nach Berechnung der Stoffmenge an gebildetem Produkt ($\mu\text{mol pNA/ml}$) die katalytische Aktivität berechnet werden. Die freigesetzte Farbstoffmenge ist ein Maß für die Enzymaktivität, die in „Units“ definiert werden. Dabei entspricht 1 Unit der Enzymaktivität, die einen Umsatz von 1 $\mu\text{mol pNA}$ pro Minute katalysiert.

Neben der α -Chymotrypsin-Kontrolle wurde die lösliche Proteinfraction (löslicher Proteinüberstand nach Zentrifugation des mittels *French Press* hergestellten Zellysats) des *E. coli*-Expressionsstammes (*ArcticExpress*) mit den Expressionsvektoren (pET22b(+)) und pET23b(+)) für den Enzymassay als Referenzwert eingesetzt. Um mit den rekombinanten Proteinen gleiche Versuchsbedingungen zu schaffen, lag die lösliche Proteinfraction der *ArcticExpress*-Stämme ebenfalls in Phosphatpuffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0) vor. Mit diesen Proteinfractionen erzielte Substratumsätze basieren ausschließlich auf proteolytischen Aktivitäten des eingesetzten Expressionsstammes und müssen von den Substratumsätzen der rekombinanten Proteine abgezogen werden. Die durch Hydrolyse der *E. coli*-Proteine freigesetzte Farbstoffmenge ist aber sehr gering und zeigt einen maximalen OD_{440} -Wert von 0,07.

Die Aktivität der gereinigten rekombinanten Proteine mit dem Substrat Azocasein (50 mM Tris-Puffer, pH-Wert Gesamtreaktionsansatz 6,0) ging nicht über die von den *E. coli*-Negativkontrollen hinaus, während mit α -Chymotrypsin eine deutliche Enzymaktivität detektiert wurde (Daten nicht gezeigt). Die rekombinanten Proteine zeigten folglich nicht die gleiche Aktivität wie die nativen *Cmm*-Proteine im Kulturüberstand. Dafür kann es mehrere Gründe geben:

- 1) Die gereinigten Proteine waren enzymatisch inaktiv.
- 2) Die für das Sekretom gemessene Enzymaktivität beruhte nicht auf den hier untersuchten Proteinen.
- 3) Die eingesetzten Enzyme zeigten unter den gewählten Bedingungen (Substrat, pH-Wert, Puffer und Molarität) keine Aktivität.

Also wurden die Pufferbedingungen des Enzymansatzes variiert. Neben dem getesteten pH-Wert (6,0), bei dem die Proteine aus dem Sekretom von *Cmm* die höchste Aktivität aufwiesen (s. Kapitel I), wurden weitere pH-Werte sowohl im neutralen als auch im alkalischen Bereich getestet. Da *Cmm382*-Kulturüberstände eine hohe Enzymaktivität mit PBS als Substratpuffer aufwies, sowohl mit 50 mM als auch mit 100 mM Molarität (s. Kapitel I), wurde neben den beiden Puffern (Tris- und PBS) auch der Einfluss der Puffermolarität auf die Enzymaktivität getestet. Tabelle 26 bietet einen Überblick über die getesteten Versuchsbedingungen.

Für alle Experimente blieb das Volumen des Reaktionsansatzes als auch die Inkubationsdauer von 48 Stunden bei einer Inkubationstemperatur von 26 °C unverändert.

Unter den in Tabelle 26 angeführten Bedingungen konnte für die gereinigten rekombinanten Proteine kein Substratumsatz gemessen werden, wodurch dieses Ergebnis im Widerspruch zu dem der Sekretomproteine aus *Cmm* stand.

Substrat	Pufferlösung	pH-Wert
Azocasein	50 mM PBS	6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0
	100 mM PBS	
	50 mM Tris	
	100 mM Tris	

Tabelle 26: Tabellarische Zusammenfassung der gewählten Versuchsbedingungen unter denen die Enzymtests mit Azocasein durchgeführt wurden. Der angegebene pH-Wert bezieht sich dabei auf den gesamten Enzymreaktionsansatz.

Dieses Ergebnis war vermutlich darauf zurückzuführen, dass noch Imidazol aus der Imidazolbehandlung (300 mM) in der eluierten Proteinfraction enthalten ist. Ein Verlust der Enzymaktivität durch die Zugabe von Imidazolderivaten wie Econazolnitrat ist bekannt (Raab & Högel, 1981). Die alternativ verwendete Methode zur Eluierung der His-getaggten Proteine durch einen pH-*shift* blieb erfolglos, da die Proteine an der Säule gebunden blieben.

Um zu überprüfen, ob die für das Sekretom gemessene Enzymaktivität auf den hier untersuchten Serinproteasen beruht, wurde die lösliche Proteinfraction zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Dieser Schritt bot gleich mehrere Vorteile. Zum einen wurde eine Reduzierung der Proteinmenge durch Dialyse der Proben, die möglicherweise durch Adhäsion der Proteine an den Dialyseschlauch (Dialyseschläuche Visking, Firma Roth, Cutoff: 14 kDa) auftreten kann, vermieden. Zudem wurde durch vorherige Enzymassays gezeigt, dass ein falsch positiver Farbumschlag durch Imidazol im Reaktionspuffer hervorgerufen wird. Imidazol ist bei der Reinigung der Proteine mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie sowohl im Wasch- als auch im Elutionspuffer enthalten. Um diesen Proteinverlust zu vermeiden und um sicherzustellen, dass der gemessene Substratumsatz auf die Aktivität der rekombinanten Proteine zurückzuführen war, wurde direkt die lösliche Proteinfraction verwendet. Doch auch mit diesen Proben konnte unter Verwendung von Azocasein als Substrat keine Enzymaktivität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die rekombinanten Proteine sind anscheinend unter eingesetzten Bedingungen nicht enzymatisch aktiv.

Enzymassay mit Azoalbumin als chromogenem Substrat

Azoalbumin wurde als weiteres Substrat eingesetzt, auch wenn die Proteine aus dem *Cmm*-Kulturüberstand keine Spezifität gegenüber diesem Substrat gezeigt haben.

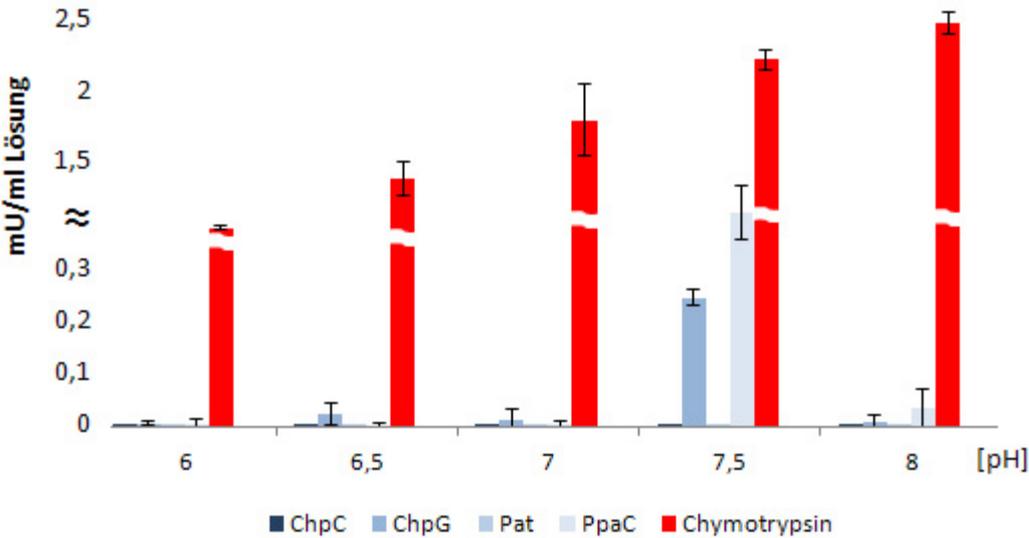
Auch bei diesen Enzymtests wurden die gleichen Pufferlösungen und pH-Bedingungen gewählt wie zuvor bei Azocasein (Tab. 27). Die Inkubationstemperatur und -dauer blieben unverändert.

Substrat	Pufferlösung	pH-Wert
Azoalbumin	50 mM PBS	6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0
	100 mM PBS	
	50 mM Tris	
	100 mM Tris	

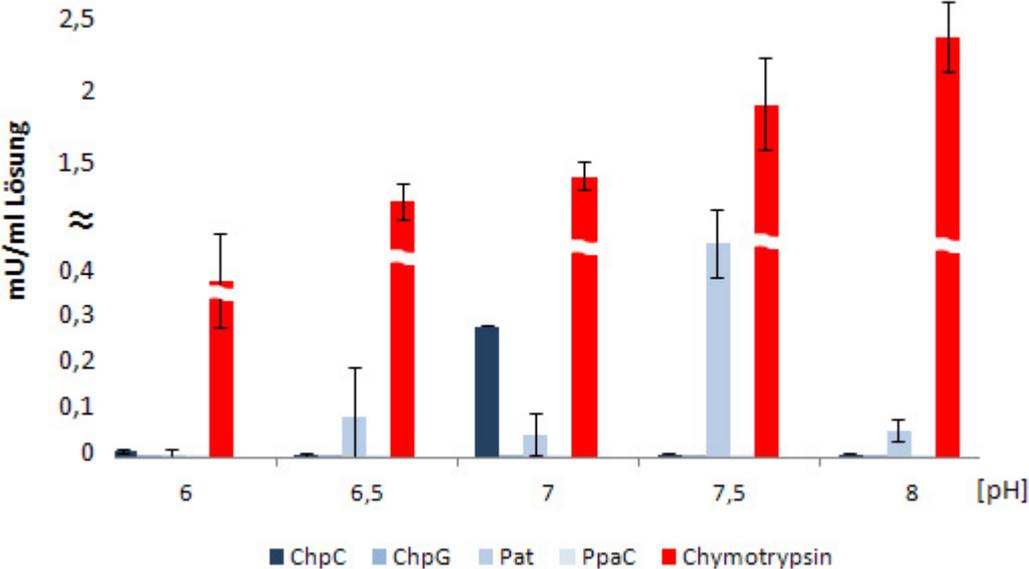
Tabelle 27: Tabellarische Übersicht der gewählten Versuchsbedingungen unter denen die Enzymtests mit Azoalbumin durchgeführt wurden.

Eine Umsetzung des chromogenen Substrates Azoalbumin konnte für die vier untersuchten Serinpeptidasen unabhängig von den Versuchsbedingungen gezeigt werden. Einzige Ausnahme war das chromogene Substrat gelöst in 100 mM Tris, mit dem nur mit α -Chymotrypsin, jedoch bei keinem der anderen rekombinanten Proteine eine Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Hierbei gilt es zu beachten, dass die lösliche Proteinfraction neben dem rekombinanten Protein auch alle *E. coli*-Proteine enthält, die sich in der löslichen Proteinfraction befinden, und die angegebene Proteinkonzentration sich nicht spezifisch auf die untersuchten Serinpeptidasen bezieht.

A



B



C

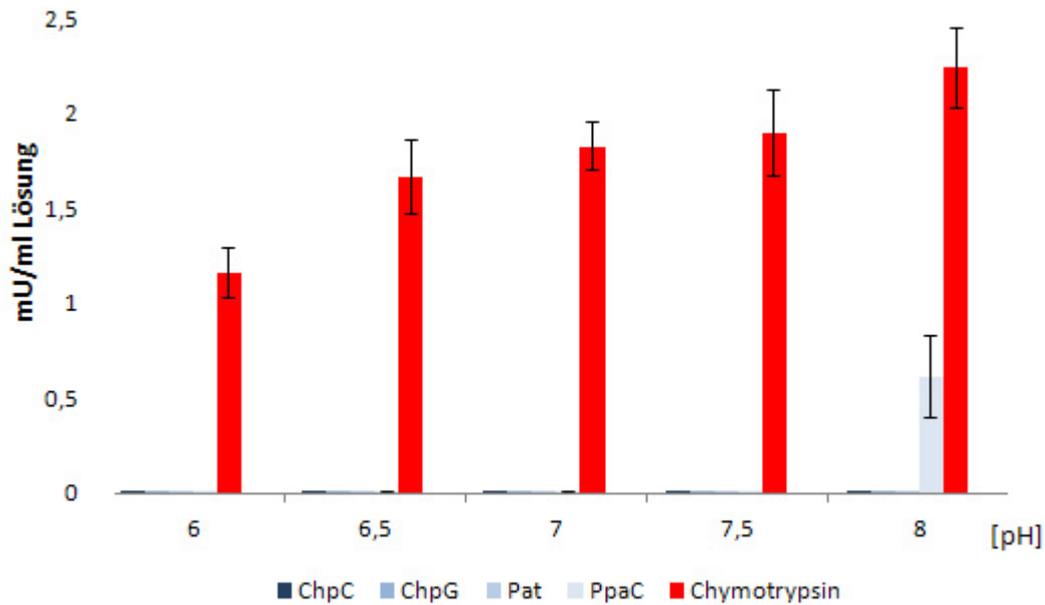


Abbildung 25: Enzymatische Aktivität (units) der rekombinanten Proteine ChpC (7,13 mg Protein/ml), ChpG (7,03 mg Protein/ml), Pat-1 (7,4 mg Protein/ml) und PpaC (7,45 mg Protein/ml) und des Enzyms α -Chymotrypsin (0,011 mg Protein/ml) gegen das chromogene Substrat Azoalbumin (Substratkonzentration: 0,38 %) unter verschiedenen Versuchsbedingungen (Puffer; pH-Wert) nach 48 h Inkubation bei 26° C. **A:** chromogenes Substrat Azoalbumin gelöst in 50 mM PBS-Puffer, **B:** chromogenes Substrat Azoalbumin gelöst in 100 mM PBS-Puffer, **C:** chromogenes Substrat Azoalbumin gelöst in 50 mM Tris-Puffer. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung dar. Einzelwerte können dem Anhang (s. S. 195-198) entnommen werden. mU: milliunits; 1mU= 1nmol pNA/ml Lösung pro Minute.

Tabelle 28 fasst die Ergebnisse des Enzymtests zusammen. Die Einzelwerte der Umsatzmessung können dem Anhang (s. Seite 195-198) entnommen werden.

Protein	Pufferlösung	pH-Wert	Aktivität [mU/ml]	Aktivität [in %]
ChpGoS	50 mM PBS	7,5	0,275	12,6
Chymotrypsin			2,183	
PpaCoS	50 mM PBS	7,5	0,456	20,89
Chymotrypsin			2,183	
ChpCoS	100 mM PBS	7,0	0,275	16,72
Chymotrypsin			1,645	
Pat-1-PelB	100 mM PBS	7,5	0,447	21,64
Chymotrypsin			2,066	
PpaC	50 mM Tris	8,0	0,613	24,45
Chymotrypsin			2,507	

Tabelle 28: Aktivität der rekombinanten Proteine unter verschiedenen Versuchsbedingungen gegen das chromogene Substrat Azoalbumin. Angegeben ist nur die jeweils höchste Aktivität der rekombinanten Proteine bezogen auf die α -Chymotrypsin-Enzymaktivität (100 %) unter den gleichen Versuchsbedingungen. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar. mU: milliunits; 1mU= 1nmol pNA/ml Lösung pro Minute.

Eine Ausnahme beim Aktivitätsnachweis bildet das rekombinante Protein ChpC, bei dem nur ein einmaliger Substratumsatz gezeigt werden konnte (Abb. 25), wahrscheinlich da der entsprechende *E. coli*-Klon das Expressionsplasmid verloren hatte. Eine wiederholte Transformation des *ArcticExpress*-Stammes mit dem Expressionsplasmids führte zwar wieder zur Überexpression des *chpC*-Gens, diese war aber verglichen mit dem ursprünglichen Klon deutlich abgeschwächt. Auch die Menge an gereinigtem ChpC-Protein fiel weitaus geringer aus und die Elutionsfraktionen wiesen zahlreiche *E. coli*-Nebenbanden auf. Die lösliche Proteinfraction des neuen Klons zeigte unter Verwendung der chromogenen Substrate keine enzymatische Aktivität.

Enzymassay mit dem chromogenen Substrat S2288

Aufgrund der nur geringen Proteaseaktivität im Kulturüberstand der Deletionsmutante CMM101 β 30-18 mit dem Substrat S2288 kann davon ausgegangen werden, dass in der *chp*-Region Proteasen kodiert werden, die das Substrat S2288 umzusetzen können. Auch das Sekretom der Mutanten CMM101*chpG* β und CMM101*ppaC* β zeigte einen verringerten S2288-Umsatz (s. Kapitel I, Ergebnisse). Für die rekombinanten Proteine (sowohl nativ gereinigt als auch für die lösliche Proteinfraction) konnte jedoch keine proteolytische Aktivität mit dem Substrat S2288, die über die des Referenzwertes (*ArcticExpress*-Stamm mit den Expressionsvektoren) hinausging, gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Da bei den Sekretomanalysen für die Deletionmutanten CMM101*chpG* β und CMM101*ppaC* β bereits eine Arginin-spezifische Aktivität gezeigt wurde, sollten die rekombinanten Proteine eigentlich eine dementsprechende Aktivität aufweisen. Da dies nicht der Fall war, scheinen in *E. coli* keine korrekt gefalteten/prozessierten aktiven Proteine gebildet zu werden.

Diskussion

Auffällig bei der Charakterisierung der rekombinanten Proteine aus *E. coli* ist nicht nur die relativ geringe bzw. fehlende Enzymaktivität (gegenüber S2288), sondern auch die im Vergleich zum *Cmm*-Sekretom veränderte Substratspezifität und Verschiebung des pH-Optimums in den alkalischen Bereich. Während Proteine des *Cmm*-Kulturüberstandes nur eine Aktivität mit dem chromogenen Substrat Azocasein und nicht mit Azoalbumin zeigten, war dies bei den His-getaggtten Proteinen genau umgekehrt. Auch die Menge des Substratumsatzes war bei den rekombinanten Proteinen stark vom pH-Wert, der Molarität und der Zusammensetzung des Substratpuffers abhängig und wich deutlich von den für das Sekretom ermittelten Werten ab. Neben der Verschiebung des pH-Optimums, das jetzt im neutralen Bereich lag (pH 7,0 und 7,5) lag, zeigte sich ein starker Effekt bei der Verwendung von Puffern mit unterschiedlicher Molarität. Unter gleichen Versuchsbedingungen (Substrat, Puffer, pH-Wert) führte die Erhöhung der Puffermolarität von 50 mM auf 100 mM entweder zum Verlust der Aktivität (ChpG und PpaC) oder die Erhöhung machte eine proteolytische Aktivität erst nachweisbar (ChpC und Pat-1).

Da diese Effekte sowohl beim Vorhandensein (Pat-1) als auch beim Fehlen (ChpC, ChpG und PpaC) des jeweiligen Signalpeptids zu verzeichnen sind, scheint das *Cmm*-Signalpeptid keinen Einfluss auf die proteolytische Aktivität zu haben. Allerdings könnte die Fusion eines Protein-Tags am C-Terminus des rekombinanten Proteins die Aktivität beeinflussen. So führte das Anfügen des His-Tags bei der Isoprensynthese (ISPS) aus der Graupappel zu einer Verschiebung des pH-Wertes weiter in den alkalischen Bereich (Bachl, 2005). Darüber hinaus hatte die Verwendung eines HisTag-markierten Proteins eine drastische Reduzierung der Aktivität (auf etwa 20 %) zur Folge (Bachl, 2005). Alternativ ist die Veränderung auch durch eine fehlende/falsche Prozessierung der Peptidasen oder eine veränderte Faltung und 3D-Struktur erklärbar.

Aufgrund der ausbleibenden Sekretion der rekombinanten Proteine verbleiben diese im Cytoplasma von *E. coli*. Die Produktion rekombinanter Proteine im cytoplasmatischen Raum kann hohe Ausbeuten an Protein ermöglichen, sie kann aber auch zu einer Bildung von *inclusion bodies* führen, die aufwendige Rückfaltungsverfahren erfordern. Ein weiterer Nachteil stellt das reduzierende Milieu des Cytoplasmas dar, das keine stabile Ausbildung von Disulfidbrücken ermöglicht (Stewart et al., 1998). Zwei Ausnahmen in *E. coli* bilden die beiden Proteine Hsp33 (Jacob et al., 1999) und OxyR (Zheng et al., 1998), deren Funktion durch eine Disulfidbrücke vermittelt oder gesteuert wird. Extrazelluläre Proteine besitzen häufig Disulfidbrücken, die durch kovalente Bindung zwischen den SH-Gruppen zweier Cysteinreste entstehen. So beinhalten die Proteine Pat-1, ChpC und ChpG sechs bzw. vier Cysteinreste, die an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt sein könnten. Die Wichtigkeit von Disulfidbrücken für die erfolgreiche Faltung des Proteins wurde von Spiess (1999) anhand von MalS (einer α -Amylase von *E. coli*) gezeigt. Disulfidbrücken bestimmen die strukturellen Eigenschaften eines Proteins und könnten, bei nicht korrekter Ausbildung, die Konformation des aktiven Zentrums modifizieren. Gemäß dem von Fischer (1884) postulierten „lock and key“ Konzept zur Beschreibung der Wechselwirkung zwischen einem Enzym und seinem Substrat, kann eine strukturelle Änderung des aktiven Zentrums eine veränderte Substratspezifität des Enzyms zur Folge haben.

Ein weiterer Faktor, der die Aktivität beeinflussen kann, ist das Auftreten von Cofaktoren. Im Allgemeinen sind Serinpeptidasen zwar frei von Cofaktoren, aber häufig wird Ca^{2+} zur Aufrechterhaltung der Struktur benötigt (Siezen & Leunissen, 1997). In dieser Arbeit konnte ohne den Zusatz von zweiwertigen Ionen eine eindeutige enzymatische Aktivität für

α -Chymotrypsin, die *Cmm*-Proteine des Sekretoms und die rekombinanten Proteine aufgezeigt werden. Somit scheinen Cofaktoren für die Aktivität dieser Proteine nicht zwingend notwendig. Dennoch könnten Cofaktoren wie Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} oder Zn^{2+} die Enzymaktivität stimulieren. So konnte bei der Trypsin-ähnlichen Protease (SNP1) des phytopathogenen Pilzes *Stagonospora nodorum* durch Zugabe von Calcium-Ionen (2,5 mM) die Proteaseaktivität um 22 % erhöht werden (Carlile et al., 2000). Deshalb müsste in zukünftigen Experimenten überprüft werden, ob durch die Zugabe von Cofaktoren die Enzymaktivität der untersuchten Proteasen erhöht werden kann.

Auch wenn der gemessene Substratumsatz im Vergleich zur Kontrolle (α -Chymotrypsin) deutlich geringer ausfällt, und die verwendeten rekombinanten Proteine eine zum Sekretom veränderte Substratspezifität aufweisen, konnte für alle vier untersuchten hypothetischen Serinproteasen proteolytische Aktivität nachgewiesen werden. Eine Arginin-spezifische Enzymaktivität konnte mit den überexprimierten Serinpeptidasen nicht gezeigt werden. Ob die verringerte Aktivität der Deletionsmutante CMM101 β 30-18, die diese Proteine nicht enthält, auf anderen Peptidasen aus der *chp/tomA*-Region beruht oder auch hier ein verändertes Substratspektrum (wie bei Azoalbumin/Azocasein) auftritt, muss in Zukunft untersucht werden. Dazu könnten synthetische, chromogene Peptide, bei denen unterschiedliche Aminosäuren die Bindung des Chromophors vermitteln, verwendet werden, um herauszufinden, ob die Hydrolyse durch die vier untersuchten *Cmm*-Serinproteasen spezifisch hinter bestimmten Aminosäuren stattfindet (wie z.B. beim Trypsin, das nach Lysin- oder Argininresten hydrolysiert). Die Verknüpfung der Chromophore durch ‚falsche‘ Aminosäuren (Arginin bei S2268, Phenylalanin bzw. Tryptophan bei Azocasein und Tyrosin und Histidin bei Azoalbumin) kann ein Grund für die geringe gemessene Aktivität sein, wenn diese nicht der Spezifität der Hydrolysespaltstelle der hier untersuchten Serinproteasen entspricht.

Weiterhin kann versucht werden, herauszufinden, ob Cofaktoren benötigt werden, oder über den Einsatz verschiedener Inhibitoren (z.B. verschiedene Serinpeptidasehemmer wie PMSF oder Aprotinin, EDTA) welche Inhibitoren gegen die *Cmm*-Peptidasen wirken, um davon ausgehend eine weitere Charakterisierung der Enzyme vorzunehmen.

Ein weiterer Punkt, der nur bei einer Reinigung der Proteine direkt aus dem *Cmm*-Überstand untersucht werden kann, ist die Aktivierung vieler Peptidasen durch Proteolyse, die eventuell in *E. coli* nicht stattfindet. Allerdings ist unbekannt, ob die Serinpeptidasen der

Chp- und Ppa-Familie einer proteolytischen Aktivierung unterliegen. Im Falle einer derartigen Aktivierung sollten im Sekretom von *Cmm* verkürzte Formen der jeweiligen Peptidasen nachweisbar sein. Bisher gibt es keine Anhaltspunkte für derartige Formen in 2D-Gelen des Sekretoms (Tews, 2012), allerdings ist der pH-Bereich der Peptidasen (mit pIs von etwa 9) nicht gut untersucht.

Die Identifizierung eines N-terminalen Signalpeptids und der Nachweis von ChpG und PpaC im Xylemsaft *Cmm382*-infizierter Pflanzen (Savidor et al., 2012; Tews, 2012) liefern erste Hinweise für die Sekretion dieser Serinproteasen. Fasst man diese Punkte zusammen, wäre es durchaus möglich, dass die Serinproteasen, im Rahmen der kompatiblen Interaktion, mit spezifischen Tomatenproteinen interagieren und damit interzelluläre Abläufe der Pflanze zugunsten einer erfolgreichen Kolonisation und der Ausprägung von Welkesymptomen beeinflussen. Eine Wirkung wie bei Effektorproteinen aus Proteobakterien erscheint möglich, besonders analog zu den über das T3SS sekretierten Cysteinpeptidasen. Ein Beispiel ist das Effektorprotein XopD aus dem Gram-negativen phytopathogenen Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Es wurde als Cysteinprotease charakterisiert, die das SUMO-Protein (*small ubiquitin-like modifier*) spaltet, das bei den Wirtspflanzen in verschiedenen Prozessen wie Pathogenabwehr (Hanania et al., 1999) und abiotischer Stress (Kurepa et al., 2003) involviert ist. Damit konnte gezeigt werden, dass die Proteolyse spezifischer Wirtssubstrate durch Cysteinproteasen eine wichtige Strategie des Pathogens darstellt, die Physiologie des Wirtes zu verändern.

Kapitel IV. Immunpräzipitation der Serinpeptidasen aus dem *Cmm*-Kulturüberstand

Die Synthese rekombinanter *Cmm*-Peptidasen mit einem *E. coli*-Expressionssystem scheint die Spezifität dieser Proteine zu beeinflussen. Außerdem ist unklar, ob die aus *E. coli* gereinigten Proteine, da sie nicht sekretiert wurden, eine korrekte Faltung und Prozessierung aufweisen. Aus diesem Grund war es wünschenswert die nativen Proteine aus dem *Cmm*-Kulturüberstand zu isolieren, sie biochemisch zu analysieren und mit den in *E. coli* exprimierten zu vergleichen. Für eine derartige Reinigung wurden zunächst polyklonale Antikörper gegen die rekombinanten Serinproteasen ChpC, ChpG, Pat-1 und PpaC hergestellt. Zur Gewinnung des Antigens wurden die Peptidasen in *E. coli* überexprimiert und unter denaturierenden Bedingungen aus den *inclusion bodies* gereinigt.

Antikörper besitzen eine Y-Struktur (Valentine and Green 1967), die aus zwei identischen Regionen, die die Antigen-Bindestelle tragen und als Fab-Fragment (*fragment having the antigen binding site*) bezeichnet wird. Die Basis des Antikörpermoleküls ist involviert in der Immunantwort und wird das Fc-Fragment (*fragment that crystallizes*) genannt. Jede Y-Form beinhaltet vier Polypeptide, von denen jeweils zwei die γ -Kette (schwere Kette; 55 kDa) und die κ - und λ -Kette (leichte Ketten; 25 kDa) bilden (Poljak et al., 1973). Sowohl bei schweren als auch bei leichten Ketten hat die Amino-terminale Domäne eine variable Primär-Aminosäuresequenz, während die Carboxy-terminale Domäne drei konstante Strukturen besitzt (Wu & Kabat, 1970). Die variable Region einer schweren und einer leichten Kette bilden dabei eine Antigen-Bindestelle. Neben der spezifischen Antikörper-Antigen-Bindung stellt die konstante Domäne ebenfalls einen wichtigen Aspekt der modernen Immunochemischen Technik dar, da dieser Bereich des Antikörpers zur Kopplung von Sekundärreagenzien genutzt werden kann. Die konstante Domäne kann auch dazu genutzt werden, den Antikörper kovalent an eine Affinitätsmatrix (CnBr-aktivierte Sepharose) zu koppeln. Mit Hilfe einer solchermaßen beladenen Antikörper-Säule können über Affinitätschromatographie aufgrund der spezifischen Antigen-Antikörper-Bindung die gesuchten Proteasen aus dem Überstand von *Cmm382* isoliert werden.

Herstellung und Gewinnung der Antikörper

Zur Gewinnung der Antikörper wurden die jeweiligen Proteine aus *inclusion bodies*, die aus *E. coli* in ausreichender Menge isoliert wurden (s. Kapitel II, Ergebnisse), eingesetzt. Die Proteine der *inclusion bodies* wurden unter denaturierenden Bedingungen und über Nickelaffinitätschromatographie gereinigt. Da eine anschließende Renaturierung nicht erfolgreich war, wurden die Proteine in dieser Konformation zur Immunisierung der Versuchstiere (Kaninchen) als Auftragsarbeit an die Firma Pineda Antikörperservice, Berlin übersandt. Vorab wurden Präimmunseren mehrerer Versuchstiere in einem Western Blot gegen *E. coli*- und *Cmm*-Gesamtprotein getestet, um auszuschließen, dass die Tiere bereits Antikörper gegen *Cmm382* besitzen. Die Westernblot-Analysen zeigten bei den ausgewählten Tieren nur minimale Kreuzreaktionen mit *E. coli*-Gesamtprotein, während mit *Cmm*-Gesamtprotein als Antigene keine Kreuzreaktionen mit den Kaninchen-Präimmunseren auftraten (Daten nicht gezeigt). Nach der Auswahl geeigneter Tiere wurden diese einer mehrstufigen Immunisierung mit insgesamt sieben Boost-Injektionen über einen Zeitraum von vier Monaten unterzogen. Das genaue Immunisierungsprotokoll kann dem Material und Methoden-Abschnitt (Seite 76) entnommen werden.

Polyklonale Antiseren bestehen häufig aus einer Mischung aus antigenspezifischen und kreuzreaktiven Antikörpern. Um zu gewährleisten, dass die eingesetzten Antikörper für ein Antigen spezifisch sind, wurde für weitere immunologische Tests die monospezifische IgG-Fraktion (Immunglobulin G) eingesetzt. Dazu wurde nach Abschluss der Immunisierung die Antiseren (totale IgG-Fraktion) von der Firma Pineda Antikörperservice über Immunoaffinitätschromatographie spezifisch gereinigt. Dabei werden die Antigene über Cysteinreste an eine Protein A-Sepharose 4B-Matrix gekoppelt. Protein A stammt von *Staphylococcus aureus*, der dieses Protein als Pathogenitätsfaktor an seiner Zelloberfläche exponiert, um Immunglobuline spezifisch über den Fc-Teil (*fragment that crystallizes*) zu binden (Deisenhofer et al., 1978). Über diese Methode kann man aus den Antiseren die monospezifische IgG-Fraktion erhalten und dadurch die Spezifität der eingesetzten Antikörper erhöhen.

Funktionalität der Antikörper (Westernblot)

Über Westernblot-Analysen wurde die Funktionalität und Spezifität der hergestellten, monospezifischen Antikörper getestet. Dazu wurden für jeden zu testenden Antikörper drei verschiedene Proteinfraktionen verwendet. Neben den in den BL21-Stämmen exprimierten und aus *inclusion bodies* gereinigten Proteinen (Abb. 26, Spur 1), die auch für die Immunisierung der Versuchstiere genutzt wurden, wurden auch die rekombinanten löslichen nativen Proteine (mit His-Tag), die aus dem *ArcticExpress*-Stamm gereinigt wurden, für die Analyse genutzt (Abb. 26, Spur 2). Desweiteren wurde ein konzentrierter *Cmm*-Kulturüberstand (1 Liter spät-logarithmische Kultur, konzentriert über Lyophilisierung und Phenolextraktion) in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (Abb. 26, Spur 3). Die monospezifischen Anti-Protein-IgG-Fraktionen dienten dabei als spezifischer Antikörper.

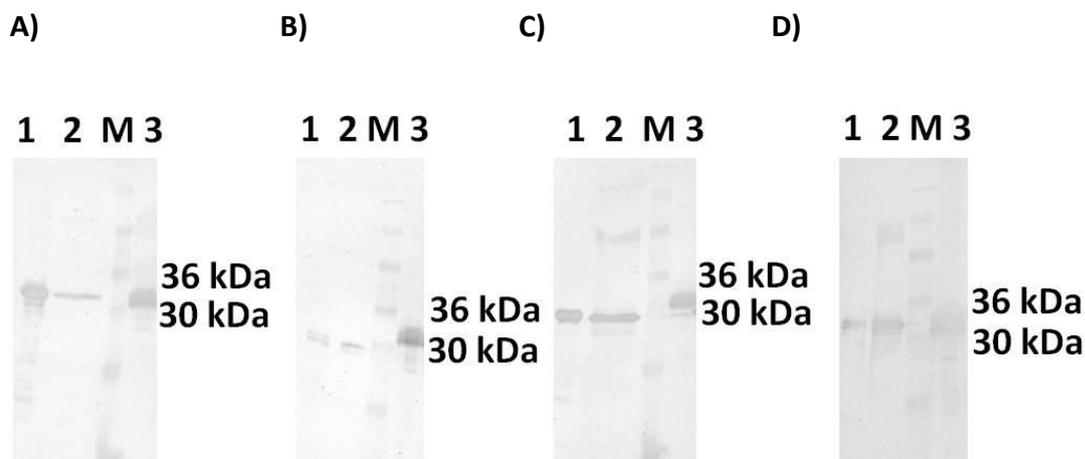


Abbildung 26: Nachweis der Spezifität der monospezifischen IgG-Fraktion gegen verschiedene Proteinfraktionen im Westernblot: 1. Antikörper: monospezifische Anti-Protein-IgG-Fraktion; 2. Antikörper: Anti-Rabbit AP.

A) Anti-ChpCoS-IgG: Spur 1: ChpC gereinigt aus *inclusion bodies* (BL21-CodonPlus(DE3)), Spur 2: natives, gereinigtes ChpC (*ArcticExpress*), Spur 3: *Cmm382*-Kulturüberstand (konzentriert).

B) Anti-ChpGoS-IgG: Spur 1: ChpG gereinigt aus *inclusion bodies* (BL21(DE3)), Spur 2: natives, gereinigtes ChpG (*ArcticExpress*), Spur 3: *Cmm382*-Kulturüberstand (konzentriert).

C) Anti-Pat-1-PelB: Spur 1: Pat-1 gereinigt aus *inclusion bodies* (BL21-CodonPlus(DE3)), Spur 2: natives, gereinigtes Pat-1 (*ArcticExpress*), Spur 3: *Cmm382*-Kulturüberstand (konzentriert), M: Proteinmarker SeeBlue (10 µl).

D) Anti-PpaCoS-IgG: Spur 1: PpaC gereinigt aus *inclusion bodies* (BL21-CodonPlus(DE3)), Spur 2: natives, gereinigtes PpaC (*ArcticExpress*), Spur 3: *Cmm382*-Kulturüberstand (konzentriert).

Der Westernblot (Abb. 26) zeigt für alle verwendeten Proteinfractionen deutliche Signale, in der für die Proteasen erwarteten Größe. Da auf den Blots in den Spuren der *Cmm*-Proteinfraction keine weiteren Banden auftraten, kann davon ausgegangen werden, dass die hergestellten Antikörper spezifisch gegen die gesuchten Proteine sind und dass es keine Kreuzreaktionen zu anderen *Cmm*-Proteinen aus dem Sekretom geben dürfte. Damit sollte es möglich sein, über Immunoaffinitätschromatographie die gesuchten Proteasen aus dem Kulturüberstand zu isolieren.

Reinigung der Proteasen aus *Cmm382*-Kulturüberstand

Zur Reinigung der hypothetischen Serinproteasen über Immunoaffinitätschromatographie musste ein Chromatographiematerial gewählt werden, an das die monospezifischen Antikörper gebunden werden konnten. Zu diesem Zweck wurde Bromcyan-aktivierte Sepharose (CNBr-aktivierte Sepharose 4 Fast Flow; Amersham) verwendet. An diese hochvernetzte Matrix lassen sich Liganden mit primären Amino-Gruppen koppeln. Eine häufige Anwendung findet diese Affinitätsmatrix in der Antigen-Antikörperreaktion mit über die konstante Domäne (Fc) immobilisierten monospezifischen Antikörpern als Liganden.

Nach Fertigstellung der Affinitätschromatographie-Säule wurde die Matrix mit einem konzentrierten *Cmm382*-Kulturüberstand beladen. Für diesen Überstand wurden *Cmm382*-Zellen in einem Liter M9-Medium bis zu einer spät-logarithmischen Phase (OD_{580} 2,5; 48 h) wachsen gelassen. Unter diesen Anzuchtbedingungen konnte anhand der monospezifischen IgG-Fraktion die nativen Serinproteasen im M9-Kulturüberstandes detektiert werden. Durch Lyophilisierung wurde das Ausgangsvolumen von einem Liter auf 10 ml konzentriert. Durch anschließende Dialyse gegen TBS-Puffer (pH 8,0) wurden die durch starke Konzentrierung störenden Salze entfernt.

Der so aufgearbeitete Kulturüberstand hatte eine Proteinkonzentration von ca. 1,8 mg/ml und wurde über Nacht bei 4° C unter leichtem Schütteln mit der äquilibrierten (TBS, pH 8,0) Säulenmatrix inkubiert. Um nicht gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule mit dem 10-fachen Säulenvolumen TBS-Puffer (pH 8,0) gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte durch Verwendung von Glycin-HCl-Puffer (pH 3,0). Durch den pH-*shift* sollte möglichst schonend die Antigen-Antikörperbindung gelöst werden. Eine schnelle Neutralisierung (mit 1 M Tris-HCl, pH 8,0) der Elutionsfraktionen und der Antikörpersäule

verhindert sowohl eine Schädigung der eluierten Proteine als auch der an der Matrix gebundenen Antikörper.

Western Blot-Analysen der Reinigungsversuche zeigten die Hauptmenge des gesuchten Proteins bei allen vier gesuchten Peptidasen (Abb. 27-30 **A**, Spur 2) in den jeweiligen Durchflussfraktionen, d. h. die Mehrzahl der Proteine banden nicht an das Säulenmaterial. Der gebundene Proteinanteil wurde während des Waschens von der Säule entfernt (Abb. 27-30 **A**, Spuren 7-9 bzw. Spuren 8-10). In den Elutionsfraktionen war kein Signal in der gesuchten Größe vorhanden.

In allen Elutionsfraktionen der unterschiedlichen Aufarbeitungen war im SDS-Acrylamidgel (Abb. 27-30 **B**, Spuren 3-6 bzw. Spuren 4-7) eine deutliche Bande eines Proteins zu sehen. Dabei handelte es sich aber nicht um die gesuchten Zielproteine oder um Proteine, die hohe Homologie zu diesen aufweisen (weitere Proteine aus der Chp oder Ppa-Familie). Das eluierte Protein konnte über MALDI-TOF-MS als *putative cell wall anchor family protein* (CMM_0150; 111,78 kDa) eindeutig identifiziert werden und gehört somit nicht zur Gruppe der Proteasen. Es könnte sich hierbei um eine unspezifische Antigen-Antikörperbindung handeln. Da dieses Protein (CMM_0150) aber im Westernblot nicht mit dem Antikörper reagiert, könnte auch eine unspezifische Bindung des Proteins direkt an das Säulenmaterial erfolgt sein.

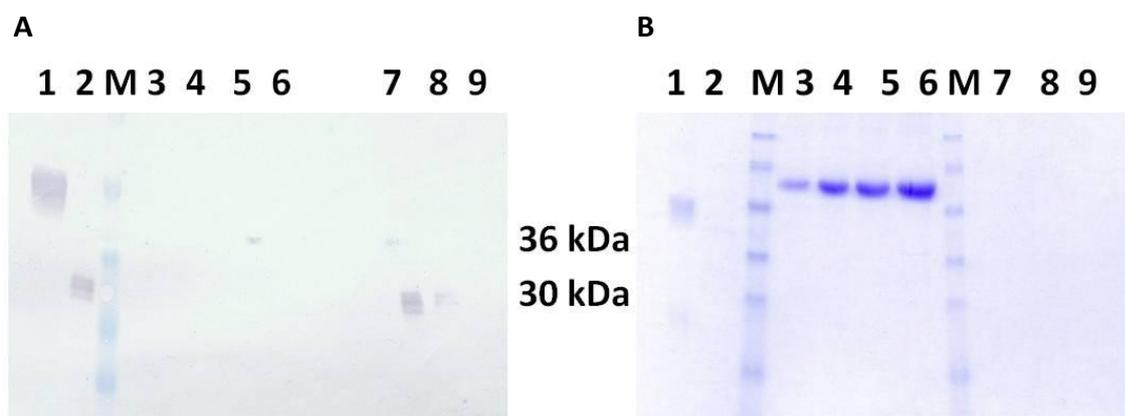


Abbildung 27: A: Westernblot: Nachweis der gesuchten Protease **ChpC**, 1. Antikörper: monospezifische Anti-Protein-IgG-Fraktion; 2. Antikörper: Anti-Rabbit AP. Spur 1: Anti-Protein-IgG; Spur 2: *Cmm382*-Durchfluss; Spur 3: Elutionsfraktion 1; Spur 4: Elutionsfraktion 2; Spur 5: Elutionsfraktion 3; Spur 6: Elutionsfraktion 4; Spur 7: Waschfraktion 1; Spur 8: Waschfraktion 2; Spur 9: Waschfraktion 3; je 25 µl Probe; M: Proteinmarker SeeBlue (10 µl).

B: SDS-PAGE, Coomassiefärbung: Reinigung aus *Cmm*. Spur 1: Anti-Protein-IgG; Spur 2: konzentrierter *Cmm382*-Kulturüberstand (M9-Medium); Spur 3: Elutionsfraktion 1; Spur 4: Elutionsfraktion 2; Spur 5: Elutionsfraktion 3; Spur 6: Elutionsfraktion 4; Spur 7: Waschfraktion 1; Spur 8: Waschfraktion 2; Spur 9: Waschfraktion 3; je 25 µl Probe; M: Proteinmarker SeeBlue(10 µl).

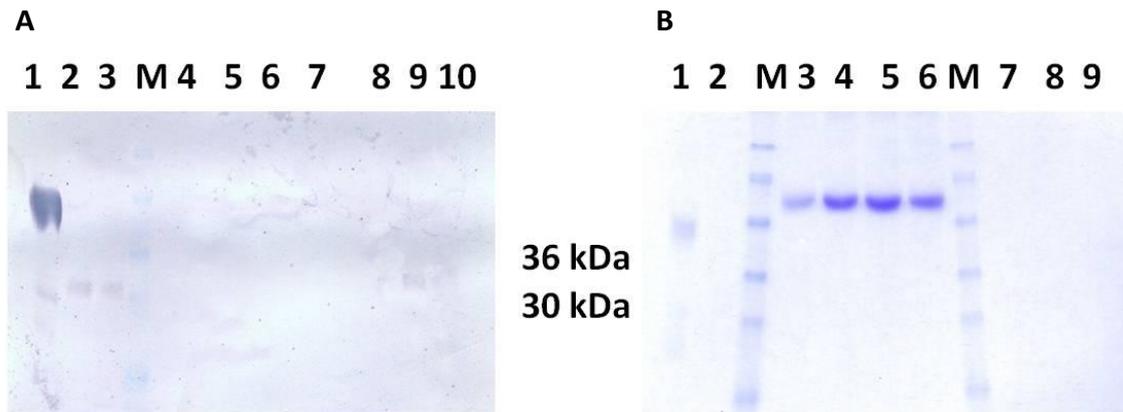


Abbildung 28: **A:** Westernblot: Nachweis der gesuchten Protease **ChpG**, 1. Antikörper: monospezifische Anti-Protein-IgG-Fraktion; 2. Antikörper: Anti-Rabbit AP. Spur 1: Anti-Protein-IgG; Spur 2: *Cmm382*-Durchfluss; Spur 3: konzentrierter *Cmm382*-Kulturüberstand (M9-Medium); Spur 4: Elutionsfraktion 1; Spur 5: Elutionsfraktion 2; Spur 6: Elutionsfraktion 3; Spur 7: Elutionsfraktion 4; Spur 8: Waschfraktion 1; Spur 9: Waschfraktion 2; Spur 10: Waschfraktion 3; je 25 µl Probe; M: Proteinmarker SeeBlue (10 µl).

B: SDS-PAGE, Coomassiefärbung: Reinigung aus *Cmm*. Spur 1: Anti-Protein-IgG; Spur 2: konzentrierter *Cmm382*-Kulturüberstand (M9-Medium); Spur 3: Elutionsfraktion 1; Spur 4: Elutionsfraktion 2; Spur 5: Elutionsfraktion 3; Spur 6: Elutionsfraktion 4; Spur 7: Waschfraktion 1; Spur 8: Waschfraktion 2; Spur 9: Waschfraktion 3; je 25 µl Probe; M: Proteinmarker SeeBlue(10 µl).

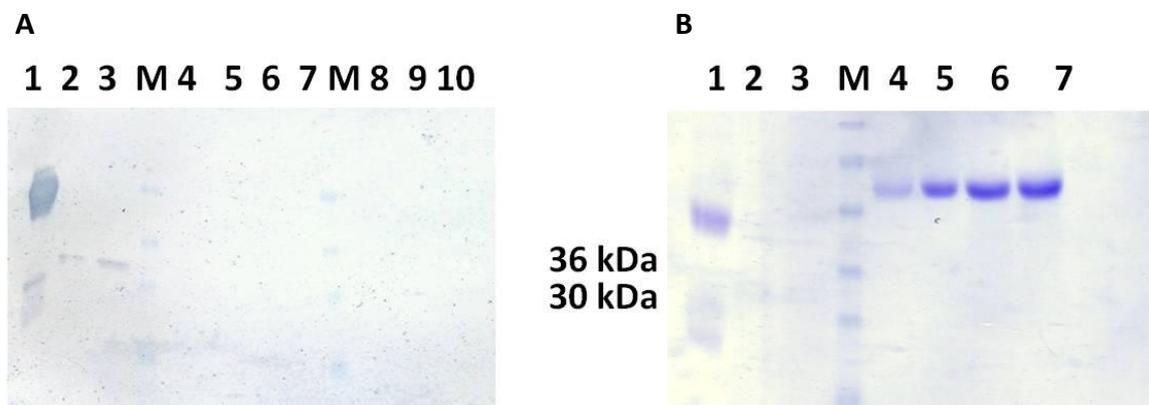


Abbildung 29: **A:** Westernblot: Nachweis der gesuchten Protease **Pat-1**, 1. Antikörper: monospezifische Anti-Protein-IgG-Fraktion; 2. Antikörper: Anti-Rabbit AP. Spur 1: Anti-Protein-IgG; Spur 2: *Cmm382*-Durchfluss; Spur 3: konzentrierter *Cmm382*-Kulturüberstand (M9-Medium); Spur 4: Elutionsfraktion 1; Spur 5: Elutionsfraktion 2; Spur 6: Elutionsfraktion 3; Spur 7: Elutionsfraktion 4; Spur 8: Waschfraktion 1; Spur 9: Waschfraktion 2; Spur 10: Waschfraktion 3; je 25 µl Probe; M: Proteinmarker SeeBlue (10 µl).

B: SDS-PAGE, Coomassiefärbung: Reinigung aus *Cmm*. Spur 1: Anti-Protein-IgG; Spur 2: konzentrierter *Cmm382*-Kulturüberstand (M9-Medium); Spur 3: *Cmm382*-Durchfluss; Spur 4: Elutionsfraktion 1; Spur 5: Elutionsfraktion 2; Spur 6: Elutionsfraktion 3; Spur 7: Elutionsfraktion 4; je 25 µl Probe; M: Proteinmarker SeeBlue(10 µl).

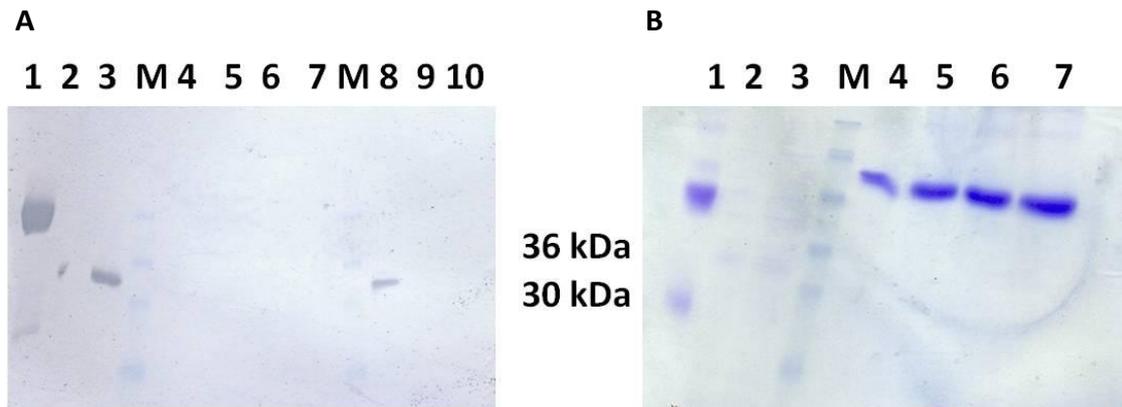


Abbildung 30: A: Westernblot: Nachweis der gesuchten Protease **PpaC**, 1. Antikörper: monospezifische Anti-Protein-IgG-Fraktion; 2. Antikörper: Anti-Rabbit AP. Spur 1: Anti-Protein-IgG; Spur 2: *Cmm382*-Durchfluss; Spur 3: konzentrierter *Cmm382*-Kulturüberstand (M9-Medium); Spur 4: Elutionsfraktion 1; Spur 5: Elutionsfraktion 2; Spur 6: Elutionsfraktion 3; Spur 7: Elutionsfraktion 4; Spur 8: Waschfraktion 1; Spur 9: Waschfraktion 2; Spur 10: Waschfraktion 3; je 25 μ l Probe; M: Proteinmarker SeeBlue (10 μ l).

B: SDS-PAGE, Coomassiefärbung: Reinigung aus *Cmm*. Spur 1: Anti-Protein-IgG; Spur 2: konzentrierter *Cmm382*-Kulturüberstand (M9-Medium); Spur 3: *Cmm382*-Durchfluss; Spur 4: Elutionsfraktion 1; Spur 5: Elutionsfraktion 2; Spur 6: Elutionsfraktion 3; Spur 7: Elutionsfraktion 4; je 25 μ l Probe; M: Proteinmarker SeeBlue(10 μ l).

Der Antigen-Antikörper-Komplex beruht auf nicht kovalenten Bindungen. Diese Bindung kann durch Änderung der physikochemischen Milieubedingungen aufgehoben werden. Zu diesen Änderungen zählen die Erniedrigung des pH-Wertes und die Erhöhung der Ionenstärke. Um die Spezifität der Antigen-Antikörperbindung zu erhöhen, wurde die Zusammensetzung des TBS-Puffers verändert. Desweiteren wurde der pH-Wert des TBS-Puffers, der Anwendung findet als Dialyse-, Äquilibrierungs- sowie als Waschpuffer, von pH 8,0 auf pH 7,2 gesenkt. Dieser pH-Wert wurde gewählt, da dies dem pH-Wert der Immunsereen, aus denen die Antikörper gewonnen wurden, entspricht. Eine Erhöhung der Natriumchloridkonzentration von 0,136 M auf 0,5 M wurde vorgenommen, um zu vermeiden, dass die Zielproteine vom Säulenmaterial gewaschen werden. Dies führte zu einer Verringerung des unspezifisch gebundenen Proteins in den Eluaten, während die gesuchten Zielproteine nun im Western Blot nicht mehr in den Waschfraktionen, sondern nur noch im Durchlauf nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt). Die Reinigung der nativen Proteasen aus dem *Cmm382*-Kulturüberstand war jedoch nicht möglich.

Diskussion

Es wurde gezeigt, dass die Funktionalität der monospezifischen IgG-Fraktion gegen die gesuchten Proteasen gegeben ist und sie somit zur Immunoaffinitätschromatographie eingesetzt werden konnten. Da in den Wasch- oder Elutionspuffern kein Antikörper-Signal nachweisbar war, scheint die kovalente Bindung des Antikörpers an das Chromatographiematerial stattgefunden zu haben.

Demnach muss es für die fehlgeschlagene Reinigung der Proteasen aus dem *Cmm382*-Kulturüberstand andere Gründe geben. Eine Möglichkeit könnte die zu geringe Proteinkonzentration der gesuchten Zielproteine darstellen, die dazu führte, dass unspezifisch Proteine an die Antikörper-Matrix banden. Dieses Problem war bereits von der Reinigung der rekombinanten Proteine über Nickelaffinitätschromatographie bekannt. Erst durch ein erhöhtes Expressionslevel des nativen löslichen Proteins konnte die Reinigungsrate verbessert werden (s. Kapitel II, *ArcticExpress*).

Das M9-Medium war im Gegensatz zum TBY-Medium die bevorzugte Wahl, da bereits nachgewiesen war, dass die meisten Serinproteasen der Chp und Ppa-Familie bei Wachstum in diesem Medium, nicht jedoch bei Wachstum auf Vollmedium, in den Kulturüberstand sekretiert werden (Tews, 2012; Savidor et al., 2012). Die Induktion von ChpG und PpaC in *Cmm* wurde durch Western Blot-Analysen gegen entsprechende Antikörper bestätigt (Savidor et al., 2012). Auch beim Tomatenpathogen *Ralstonia solanacearum* wird die Expression vieler Pflanzen-induzierter Gene (*hrp/hrc* Gene) durch Minimalmedium induziert (Brown & Allen, 2004). Bis zur Beendigung dieser Arbeit war allerdings kein Medium bzw. keine Bedingung bekannt, unter der die gesuchten Proteasen in höherer Konzentration gebildet werden. Bisherige Microarray-Analysen zeigten, dass die Expression vieler bekannter und potentieller Virulenzfaktoren, wie *pat-1*, *chpC* und *ppaC*, *in planta* in späten Infektionsphasen reprimiert war (Flügel et al., 2012). Dagegen zeigten neueste Untersuchungen (Savidor et al., 2012), dass durch die Zugabe von sterilfiltriertem Tomaten-Xylemsaft (10 ml/L) zum M9-Minimalmedium eine signifikante Erhöhung der ChpG- und PpaC-Mengen im Sekretom erreicht wird.

Ein weiteres Problem stellt die Viskosität konzentrierter Proteinlösungen dar, die mit wachsendem Bakterientiter zunimmt und damit die Reinigung erschwert. Dieses Problem tauchte sowohl bei der Lyophilisierung als auch bei der Ammoniumsulfat-Fällung des

Kulturüberstandes auf. Aufgrund der Korrelation mit der Zelldichte kann angenommen werden, dass die Viskosität durch etwas hervorgerufen wird, das von *Cmm* sekretiert wird, oder sich an der Außenseite der Zelle befindet. Wahrscheinlich ist sie auf die EPS-Produktion von *Cmm382* zurückzuführen. Die Produktion der Hauptmenge an EPS in *Cmm382* erfolgt vermutlich durch Proteine, die vom *wcm*-Cluster kodiert werden (Gartemann et al., 2008). Auch durch Zentrifugation (30 min bei 10.000 rpm) konnten die EPS nicht von der Proteinprobe abgetrennt werden. Durch Nutzung einer Mutante, die erheblich weniger EPS produziert (Schauer, 2004), wäre es möglich auch größere Volumina (von zwei Liter oder mehr) zu konzentrieren.

Ein anderer Ansatzpunkt wäre die Herstellung neuer Antikörper unter Verwendung der nativ gereinigten Proteine aus dem *ArcticExpress*-Stamm. Die Immunisierung der Versuchstiere mit den unter denaturierenden Bedingungen gereinigten Proteine aus *inclusion bodies* könnte ein Problem bei der Antikörper-Antigen-Interaktion darstellen, da diese Antigene keine natürliche Konformation besitzen. Aufgrund dieser sterischen Veränderungen liegen strukturelle (diskontinuierliche) Epitope, die faltungsabhängig sind und sich normalerweise innerhalb der Proteinstruktur befinden, außerhalb vor. Gegen diese Epitope entwickelt das Versuchstier während der Immunantwort spezifische Antikörper. Möglicherweise befinden sich deshalb in der monospezifischen IgG-Fraktion nur wenige Antikörper gegen die Epitope der nativen Serinproteasen. Aus diesem Grund ist lösliches natives Protein als Antigenform immer vorzuziehen, da dies der natürlichen Konformation des Zielproteins am meisten entspricht und somit die Spezifität der Antikörper erhöht. Die höchste Spezifität wird durch die Verwendung von oligoklonalen Antikörpern erreicht. Hierbei wird als Antigen ein 8 bis 10 Aminosäuren großes Peptid zur Immunisierung eingesetzt. Bei diesem beschränkten Material sind nur wenige Bindungsstellen vorhanden, wodurch die Synthese von polyklonalen Antikörpern ausbleibt und die entstehenden Antipeptid-Antikörper sehr spezifisch sind.

Kapitel V. Das ChpG-Protein von *Cmm* NCPPB382

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*) induziert eine hypersensitive Reaktion (Alarcón et al., 1998) auf den Pflanzen *Mirabilis jalapa* (japanische Wunderblume) und auf *Nicotiana tabacum*. Die Inaktivierung des *Cmm*-Gens *chpG* hatte keine Auswirkung auf die Ausbildung der Krankheitssymptome bei der Wirtspflanze *Solanum lycopersicum*. Allerdings löste die *chpG*-Mutante auf der Nicht-Wirtspflanze *Mirabilis jalapa* keine Nekrosenbildung mehr aus (Gräfen, 2005). Zuerst sollte durch Einführung eines intakten *chpG*-Gens die Mutante komplementiert werden. Dieser Schritt diente der Überprüfung, ob der beobachtete Phänotyp nur auf die Mutation im *chpG*-Gen zurückzuführen ist.

Anschließend sollte durch Infiltration von gereinigtem Protein ChpG untersucht werden, ob das *chpG*-Genprodukt die Funktion eines Elicitors besitzt oder an dessen Bildung beteiligt ist. Dazu wurde ChpG in einem *E. coli*-Expressionsstamm überexprimiert, unter nativen Bedingungen gereinigt und anschließend gegen Phosphatpuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0) dialysiert, um das Imidazol aus der Proteinlösung zu entfernen.

Komplementation der Mutante CMM101*chpG*β

Zur Herstellung der *chpG*-Mutante wurde das pSMART-Plasmid cmis2p0456h08, das ein geschertes chromosomales 2,3 kb Fragment von *Cmm* enthält, verwendet (Karte s. Anhang). Das Plasmid enthält zwei *Eco47III*-Schnittstellen. Das 640 bp große *Eco47III*-Fragment trägt die Promotorregion und den Anfang des offenen Leserahmens von *chpG*. Dieses *Eco47III*-Fragment wurde gegen die 1,9 kb große *BsaAI*-*cmx*-Kassette aus pEC70 ausgetauscht. Das auf diesem Wege konstruierte Mutageneseplasmid pIGGβ wurde für die Erzeugung der *chpG*-Mutante (CMM101*chpG*β, Gräfen, 2005) verwendet.

Für die Komplementation wurde das Plasmid pKM216*chpG*α erzeugt. Dieses Plasmid basiert auf dem Shuttlevektor pHN216. Dieser Vektor basiert auf pCM2 und wurde hier verwendet, um nach der Elektroporation eine Inkompatibilität mit dem *Cmm*-Plasmid pCM1 zu vermeiden. pHN216 vermittelt in *Clavibacter* eine Neomycinresistenz (75 µg/ml) und in *E. coli* zusätzlich eine Kanamycinresistenz (50 µg/ml). Zusätzlich ist eine Chloramphenicol-Resistenz auf dem Plasmid kodiert, in der die beiden einzigen *EcoRI*-Schnittstellen von

pHN216 liegen. Durch Hydrolyse des Plasmids cmis2p0456h08 mit *EcoRI* erhält man ein 1,8 kb große *EcoRI*-Fragment, auf dem das *chpG*-Gen vollständig vorliegt, wurde in den *EcoRI*-gespaltenen und dephosphorylierten Shuttlevektor pHN216 kloniert. Der *E. coli* Stamm DH5 α wurde anschließend mit dem konstruierten Plasmid pKM216*chpG* α transformiert. Aus Kanamycin-resistenten und Chloramphenicol-sensitiven Klonen wurden die Plasmide isoliert und mit *EcoRI* hydrolysiert, um die erfolgreiche Insertion des *chpG*-Gens in den Shuttlevektor zu überprüfen (Daten nicht gezeigt). Durch Elektroporation wurde der Stamm CMM101*chpG* β mit dem Komplementationsplasmid transformiert. Ganze Zellen dieser Komplementante wurden als Template-DNA für die PCR eingesetzt. Als Primerpaar dienten der forward- und reverse-Primer für das *chpG*-Gen, die auch schon für die Herstellung des *chpG*-Expressionsvektors (s. Kapitel II, Ergebnisse) genutzt wurden. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid cmis2p0456h08 verwendet. Das Vorhandensein des *chpG*-Gens wurde durch ein 837 bp großes PCR-Produkt nachgewiesen (Abb. 31, Spur 4). Die Abbildung 31 zeigt die erfolgreiche Komplementation der *chpG*-Mutante (CMM101*chpG* β pKM216*chpG* α), die damit wieder dem Phänotyp des Curing-Derivats CMM101 entspricht.

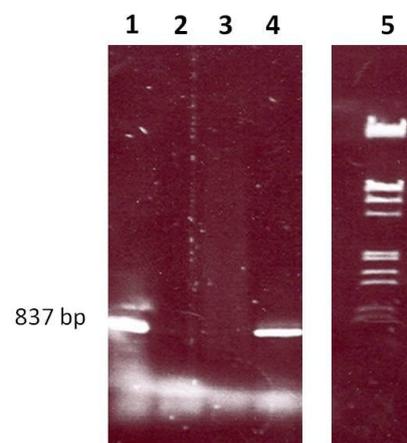


Abbildung 31: Nachweis des *chpG*-Gens in der hergestellten Komplementante mittels PCR. Spur 1: *chpG*-Sequenzierplasmid cmis2p0456h08 (Positivkontrolle), Spur 2: *chpG*-Mutante CMM101*chpG* β (Negativkontrolle), Spur 3: Wasserkontrolle, Spur 4: *chpG*-Komplementante, Spur 5: λ -Marker *EcoRI/HindIII* gespalten.

Untersuchung der hypersensitiven Reaktion auf der Nicht-Wirtspflanze *Mirabilis jalapa*

Das ChpG-Protein spielt wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Auslösung der hypersensitiven Reaktion (Gräfen, 2005). Zur Überprüfung, ob dieser Effekt allein auf die Mutation im *chpG*-Gen beruht, wurden mit der in dieser Arbeit konstruierten Komplementante Tests zur Auslösung der HR durchgeführt. Um zu überprüfen, ob die Komplementante wieder zu einer HR-Auslösung fähig ist, wurde das Blattgewebe der Nicht-Wirtspflanze (*Mirabilis jalapa*, *Nyctaginaceae*) mit dieser infiltriert. Als negative Kontrolle diente PS-Puffer, in dem die *Cmm*-Zellen resuspendiert vorlagen. Die Zellsuspensionen der Positivkontrollen (*Cmm382* und *CMM101*) zeigten 72 Stunden nach Infiltration eine hypersensitive Reaktion (Abb. 32).

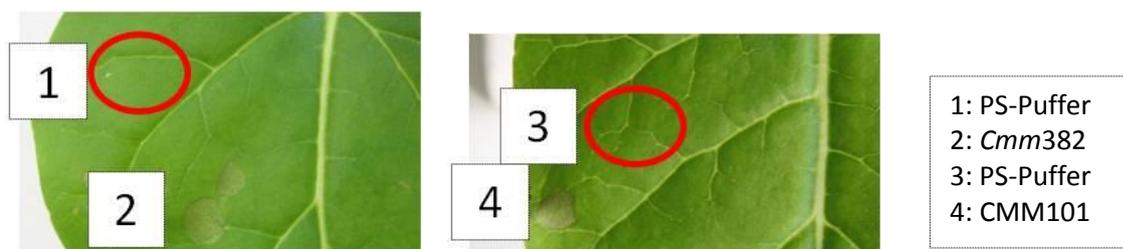


Abbildung 32: Blatt von *Mirabilis jalapa* drei Tage nach Infiltration mit den Bakterienstämmen *Cmm382* und *CMM101* und PS-Puffer (Kontrolle). Der rote Kreis markiert die Infiltrationsstelle. n= 5.

Im Gegensatz zur *chpG*-Mutante hatte die Behandlung mit der komplementierten Mutante in 95 % aller untersuchten Blätter (19 von 20 Blättern) wieder eine Nekrosenbildung zur Folge (Abb. 33). Damit konnte der veränderte Phänotyp der *chpG*-Mutante allein auf die Inaktivierung des Gens zurückgeführt werden und beruhte nicht auf einer weiteren unspezifischen Mutation im Genom. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass das Protein ChpG entweder selbst als Elicitor wirkt oder an dessen Bildung beteiligt ist. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurde das Protein in einem *E. coli*-System (*ArcticExpress*) überexprimiert, unter nativen Bedingungen angereichert (s. Kapitel II, Seite 113) und vor der Infiltration einer Dialyse unterzogen, um eventuell störende Imidazolreste zu entfernen. Dementsprechend wurden als weitere Negativkontrollen der Dialysepuffer (Phosphatpuffer; 50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0) als auch die Proteine des *E. coli*-Expressionsstammes, der das Expressionsplasmid ohne das jeweilige *Cmm*-Gen enthält, zur Infiltration der Blätter

eingesetzt. Um im Vergleich zu den heterolog exprimierten Proteinen vergleichbare Bedingungen zu schaffen, lagen die *E. coli*-Proteine ebenfalls in Phosphatpuffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0) vor. Die eingesetzten Proteinkonzentrationen sind in Tabelle 43 (s. Anhang, Seite 201) aufgelistet.

Im Vergleich zu den Kontrollen ist in der Abbildung 33 zu erkennen, dass die Nekrosenbildung bei Position 6 allein auf dem nativen ChpG-Protein beruht. Insgesamt zeigten bei 20 getesteten Pflanzenblättern 19 eine Abwehrreaktion der Nicht-Wirtspflanze gegen das angereicherte ChpG-Protein.

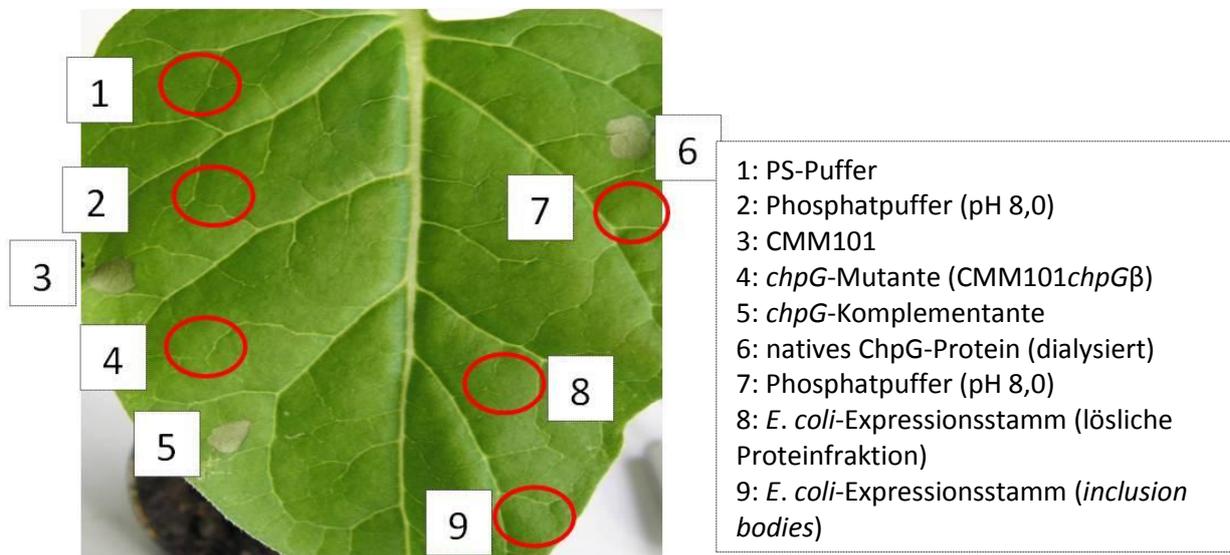


Abbildung 33: Blatt von *Mirabilis jalapa* drei Tage nach Infiltration mit verschiedenen *Cmm*-Stämmen, dem nativen ChpG-Protein und entsprechenden Kontrollen. Der rote Kreis markiert die Infiltrationsstelle. n= 20.

Durch eine Hitzeinaktivierung des ChpG-Proteins (10 min bei 100 °C) wurde die Ausbildung der hypersensitiven Reaktion reduziert, aber nicht verhindert (s. Anhang, Abb. 47, Seite 201). Nach einem tryptischen Verdau von ChpG reagierten alle fünf getesteten Pflanzenblätter auf die Proteinfragmente nicht mehr mit einer Abwehrreaktion (Abb. 34, roter Kreis).

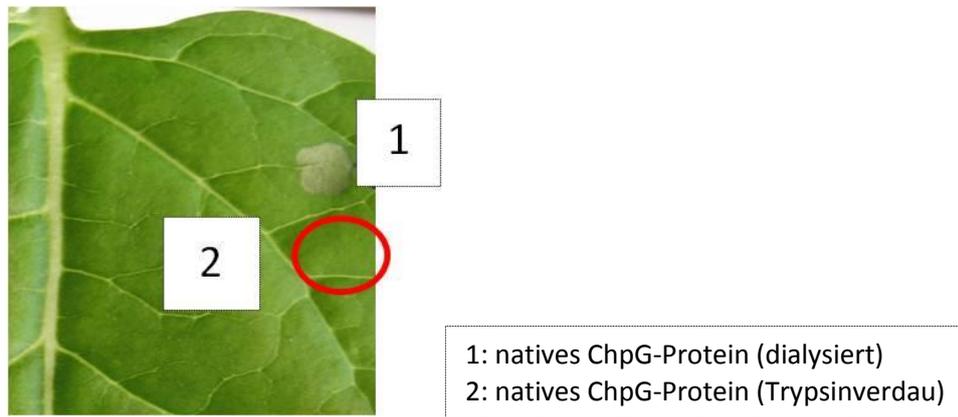


Abbildung 34: Blatt von *Mirabilis jalapa* drei Tage nach Infiltration mit dem nativen ChpG-Protein und dem tryptisch verdauten Enzym. Die Abbildung der Negativkontrollen (Trypsin und Pufferlösung) ist dem Anhang (Abb. 49) auf Seite 202 zu entnehmen. Der rote Kreis markiert die Infiltrationsstelle. n= 5.

Auch die übrigen partiell unter nativen Bedingungen gereinigten Serineptidasen ChpC, PpaC und Pat-1 (Expression im *ArcticExpress*) wurden auf Auslösung der HR an *Mirabilis jalapa* getestet. Alle drei Proteine lösten keine Nekrosenbildung aus (s. Anhang, Abb. 48, Seite 202).

Auslösung der hypersensitiven Reaktion auf der Solanacee *Nicotiana benthamiana*

Neben der Nicht-Wirtspflanze *Mirabilis jalapa* (*Nyctaginaceae*) wurde auch *Nicotiana benthamiana* (*Solanaceae*) auf die Auslösung der HR untersucht. Entsprechend wie bei der Untersuchung mit *Mirabilis jalapa* wurden auch hier der PS- und der Dialysepuffer (Phosphatpuffer; 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0) als Negativkontrollen mitgeführt. *Nicotiana benthamiana* nimmt eine Stellung zwischen einer Nicht-Wirtspflanze und einer Wirtspflanzen von *Cmm* ein, da zum einen nach Infiltration von *Cmm382* in die Blätter eine basale Abwehrreaktion ausgelöst wird, aber *Cmm* die Art nach artifizierlicher Infektion auch erfolgreich kolonisieren kann (Balaji et al., 2011).

Wurde allerdings die Deletionsmutante CMM101β30-18 in die Blätter injiziert, war bei allen getesteten Blättern keine Nekrosenbildung mehr zu erkennen (Abb. 35). Dieser Effekt ist dabei auf die Deletion der *chp/tomA*-Region zurückzuführen, da der Bakterienstamm CMM101, dem wie der Deletionsmutante das *pat-1*-Gen fehlt, zur HR-Auslösung fähig ist.

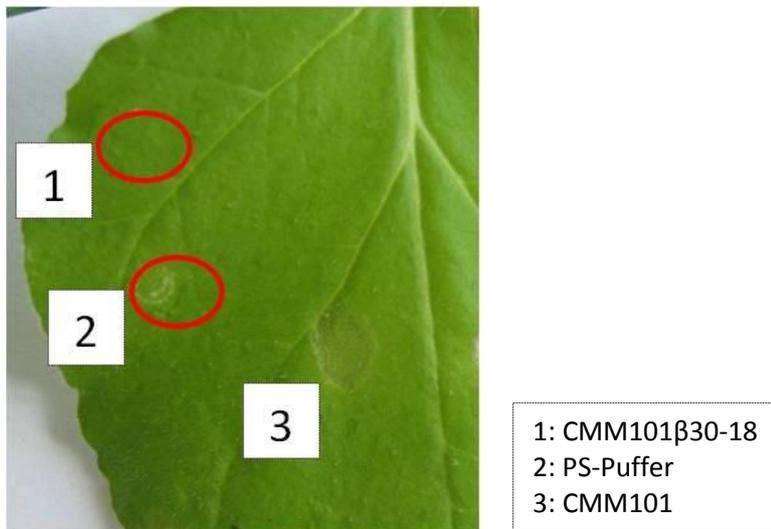
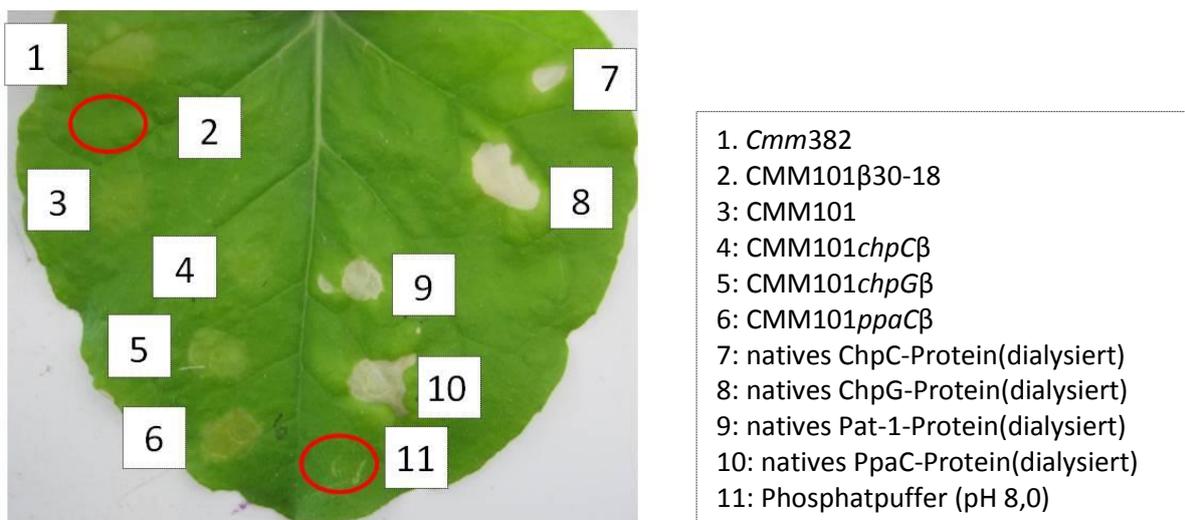


Abbildung 35: Blatt von *Nicotiana benthamiana* sechs Tage nach Infiltration mit verschiedenen *Cmm*-Stämmen und entsprechende Kontrolle. Der rote Kreis markiert die Infiltrationsstelle. n= 5.

Im Gegensatz zu der HR-Auslösung bei *Mirabilis jalapa* kann allerdings das ChpG-Protein nicht als alleiniger Elicitor fungieren, da bei insgesamt 10 getesteten Blättern die *chpG*-Mutante weiterhin einen Zelltod um die Infiltrationsstelle auslöst (Abb. 36 A, Position 5). Wie in Abbildung 36 zu sehen, lösen auch alle Inaktivierungsmutanten, der in dieser Arbeit untersuchten Serinproteasen *chpC* und *ppaC* (Abb. 36 A) und *sbtA*, *sbtB* und *sbtC* (Abb. 36 B) bei jedem Experiment (fünf Blätter) weiterhin eine hypersensitive Reaktion aus.

A



B

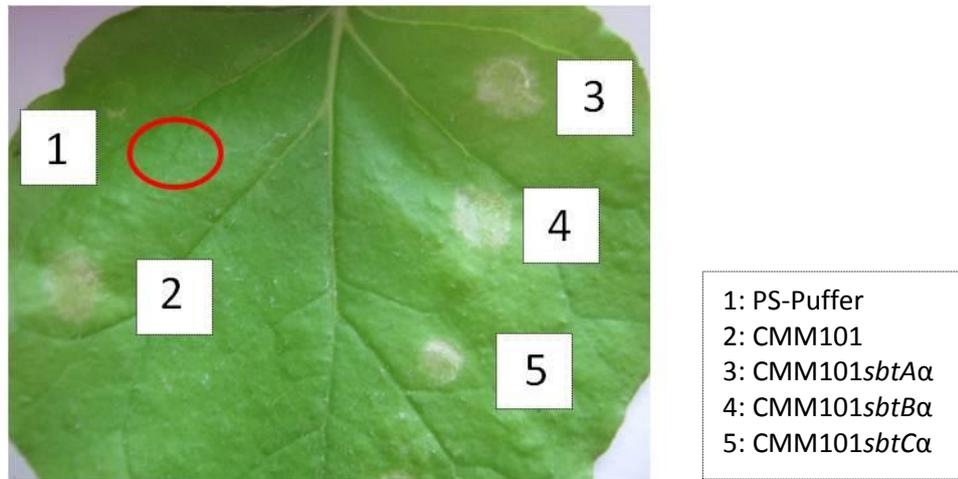


Abbildung 36: Blätter von *Nicotiana benthamiana* sechs Tage nach Infiltration. **A:** Infiltration der Blätter mit verschiedenen *Cmm*-Stämmen, angereicherten rekombinanten Serinpeptidasen und entsprechenden Kontrollen. Die Abbildung der Negativkontrollen (*E. coli*-Proteine des Expressionsstammes *ArcticExpress*) ist dem Anhang (Abb. 50) auf Seite 203 zu entnehmen. **B:** Infiltration der Blätter mit den Subtilase-Mutanten und entsprechenden Kontrollen. Der rote Kreis markiert die Infiltrationsstelle. n= 10.

Auch die Infiltration der nativ angereicherten Proteine ChpC, ChpG, Pat-1 und PpaC (Expression im *ArcticExpress*, s. Kapitel II, Seite 113) führten bei fünf von fünf Blättern zu einer Nekrosenbildung (Abb. 36 **A**). Das heißt, dass jede der untersuchten Serinpeptidasen bei *N. benthamiana* eine HR auslöst, während dies bei *Mirabilis jalapa* nur für ChpG der Fall ist (Abb. 33 und s. Anhang, Abb. 48, Seite 202).

Diskussion

Bisher war der HR-auslösende Faktor in *Clavibacter* nicht näher charakterisiert, auch wenn es genetische Indizien gab, dass Serinpeptidasen beteiligt sind (Nissinen et al., 1997; Gräfen, 2005). Bekannt war nur, dass es sich wahrscheinlich um ein Protein handelt, da zellfreie Kulturüberstände von *Cmm* sowohl bei *Mirabilis jalapa* als auch bei Tabak (Alarcón et al., 1998) und *Cms*-Kulturüberstände eine nekrotische Reaktion bei Tabak (Nissinen et al., 1997) induzieren. In beiden Fällen war diese HR-induzierende Aktivität sowohl hitzestabil als auch

Proteasesensitiv. Aufgrund der fehlenden Nekrosenbildung bei der Infiltration des Bakterienstammes CMM101 β 30-18 (Deletion der *chp/tomA*-Region) ließ sich rückschließen, dass zumindest ein Protein der *chp/tomA*-Region und/oder von pCM2 für die Auslösung der HR notwendig sind. In dieser Arbeit konnte durch Infiltration von ChpG erstmals für ein Protein eine direkte Beteiligung an der HR-Auslösung auf Nichtwirtspflanzen (*Mirabilis jalapa*) gezeigt werden, die zudem spezifisch ist da sie alleine als Elicitor ausreicht. Also sind zumindest einige Serinpeptidasen der Chp-Familie auch in die inkompatible *Cmm*-Pflanzeninteraktion involviert.

Allgemein ist eine Vielzahl von Proteinklassen bekannt, die eine hypersensitive Reaktion in Nicht-Wirtspflanzen induzieren können, wie z.B. die Harpine (Wei et al., 1992). Diese Glycin-reichen und hitzestabilen Proteine wurden bereits bei vielen phytopathogenen, Gram-negativen Bakterien wie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Preston et al., 1995) und *Erwinia amylovora* (Wei et al., 1992) identifiziert.

In Proteobakterien sind auch Proteasen als Effektorproteinen identifiziert worden, die in die Pflanze transloziert werden und in der inkompatiblen Interaktion Einfluss auf eine Pathogen-induzierte Nekrosenbildung nehmen. Dazu zählt HopPtoN, eine Cysteinpeptidase aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Diese Protease verfügt über die für Cysteinproteasen typische katalytische Triade (CHD) und zeigte *in vitro* eine Cysteinprotease-Aktivität (López-Solanilla et al., 2004). In der inkompatiblen Interaktion kann diese Peptidase die hypersensitive Reaktion auf der Nicht-Wirtspflanze Tabak suppremierem (López-Solanilla et al., 2004). Zwei weitere hypothetische Cysteinproteasen von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, die über das TyplII-Sekretionssystem in die Pflanze transloziert werden, wurden identifiziert. Beide Proteasen werden durch *avr*-Gene kodiert, die auf den Blättern der Paprikapflanze (*AvrBsT*, Escolar et al., 2001) bzw. der Wildtomate *Lycopersicon pennellii* (*AvrXv4*, Astua-Monge et al., 2000) eine hypersensitive Reaktion elicieren.

Die HR beruht auf einer Gen für Gen Pflanzen-Pathogen-Interaktion, in der die Resistenz der Pflanze durch ein spezifisches Resistenz (R)-Gen der Pflanze durch Bindung eines Avirulenz (*Avr*)-Gens des Pathogens vermittelt wird. In der Tomate verleiht eine cytoplasmatische Pto-Serin/Threonin-Kinase eine Resistenz gegen den Stamm PtoDC3000 durch Erkennung des korrespondierenden Avirulenz-Gen *avrPto*, dass vom Pathogen exprimiert wird. Nach Bindung des *Avr*-Genprodukts interagiert Pto mit einem Transkriptionsfaktor, der an das *cis*-

Element der PR (**p**athogenesis-related)-Gene bindet (Zhou et al., 1997). Diese *cis*-Elemente sind in der Elicitor- und Abwehr-induzierten Genexpression involviert. Pto kann aber auch mit einer anderen Serin/Threonin-Kinase (Pti1; *Pto-interacting*) interagieren, die an der Auslösung der HR involviert ist (Zhou et al., 1995).

Gemäß der von Flor (1955) postulierten Gen-für-Gen-Hypothese könnte also auch ChpG ein *avr*-Gen darstellen, dessen Genprodukt ein Effektorprotein produziert, das von einem entsprechenden R-Gen in den Pflanzen (*Mirabilis jalapa*) erkannt und damit eine Abwehrreaktion (hypersensitive Reaktion) hervorruft, auch wenn in Aktinomyceten kein T3SS vorkommt und das Vorkommen einer ETI bisher nicht gezeigt wurde. Auch wenn das Pathogen *Cmm* nicht über ein TyplII-Sekretionssystem verfügt (Gartemann et al., 2008), ist es dennoch möglich, dass der Elicitor (ChpG) über ein analoges-System in die Pflanzenzellen übertragen wird. Außerdem könnte ChpG seine Wirkung auch extrazellulär entfalten, wenn es in den pflanzlichen Xylemsaft sekretiert wird.

Im nah verwandten Kartoffelpathogen *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* konnte bereits auf genetischen Weg ein Zusammenhang zwischen einer Serinprotease der Chp-Familie (Chp-7) und der Auslösung der HR bei Tabak (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) gezeigt werden (Nissinen et al., 2009). Das Protein Chp-7 besitzt, genau wie die möglichen Serinproteasen der Chp-Familie bei *Cmm*, eine Signalpeptid und das Consensus-Motiv einer Serinprotease (Nissinen et al., 2009). Wie die *chp*-Gene aus der *chp/tomA*-Region bei *Cmm382*, befindet sich auch das *chp-7*-Gen in einer Region niedrigen GC-Gehalts (57 %) des *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*-Genoms (73 %) (Bentley et al., 2008). Auch die große Ähnlichkeit des Chp-7-Proteins zu den Mitgliedern der Chp-Familie Pat-1 (77 % Identität) und PhpA (71 % Identität) von *Cmm382*, liefert einen weiteren Hinweis dafür, dass die Genprodukte der *chp*-Gene, die Homologien zu *pat-1* aufweisen (*chp*= *chromosomal homology of pat-1*), an der Auslösung der hypersensitiven Reaktion beteiligt sein könnten. Neben den bereits untersuchten Serinpeptidasen könnten auch ChpE und ChpF als weitere Elicitoren der HR bei *Nicotiana benthamiana* in Frage kommen.

Kapitel VI. Die Subtilasen von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Bisher wurde schon für mehrere sekretierte Serinproteasen der Chp- und der Ppa-Familie von (*Cmm*) durch Konstruktion entsprechender Mutanten und ihrer phänotypischen Untersuchung eine Beteiligung an der Bakterien-Pflanzen-Interaktion nachgewiesen. Die Subtilasen SbtA, SbtB und SbtC stellen die dritte Gruppe extrazellulärer Serinproteasen von *Cmm* dar. Die Sekretion dieser Proteine wurde zunächst nach Identifizierung eines N-terminalen Leaderpeptids postuliert und mittlerweile durch Analysen des *Cmm*-Sekretoms für SbtA und SbtC bestätigt (Savidor et al., 2012). Eine genaue Charakterisierung der Subtilasen, insbesondere bezüglich ihrer Rolle an der pathogenen Interaktion mit der Tomate, ist bislang noch nicht erfolgt.

Alle drei Gene (*sbtA*: CMM_0070, *sbtB*: CMM_2535, *sbtC*: CMM_2536), die für die Subtilasen codieren, sind auf dem Chromosom lokalisiert. Das Gen *sbtA* liegt innerhalb der Pathogenitätsinsel von *Cmm382* (*chp/tomA*-Region), deren Deletion zu einer starken Reduktion der Kolonisationsfähigkeit des Pathogens in der Wirtspflanze führt. Durch Konstruktion von Mutanten mit nicht-funktionalen Subtilase-Genen und anschließender Untersuchung der Interaktion mit verschiedenen Pflanzen (*Solanum lycopersicum*, Tomate; *Mirabilis jalapa*, japanische Wunderblume) sollten Rückschlüsse auf die Funktion dieser Proteasen gezogen werden. Die Untersuchung mit der Wirtspflanze (*Solanum lycopersicum*) könnte dabei eine Veränderung des Krankheitsbildes oder eine Reduzierung des Titors *in planta* zur Folge haben. Bei der Infiltrierung der Nicht-Wirtspflanzen (*Mirabilis jalapa*) mit Suspensionen der Mutanten-Stämme könnte ein Ausbleiben der hypersensitiven Reaktion (HR) beobachtet werden.

Erzeugung von Mutanten durch Insertionsmutagenese im Chromosom von *Cmm382*

Zur Demonstration der Bedeutung der Subtilasen SbtA, SbtB und SbtC für die Interaktion von *Cmm* mit der Tomatenpflanze wurden diese Gene durch gezielte Mutagenese inaktiviert und entsprechende Mutanten phänotypisch analysiert.

Zu Beginn dieser Arbeit war die Sequenz der Gene bekannt und lagen auf pSMART-Vektoren in *E. coli* kloniert vor. Die Inaktivierung der Gene erfolgte durch die Insertion einer Chloramphenicol-Resistenzkassette in den Kodierbereich des Gens. Die konstruierten Mutageneseplasmide enthalten somit kein intaktes Gen mehr und können für die Inaktivierung des chromosomalen Wildtypgens verwendet werden. Nach erfolgter Transformation des *E. coli* Stammes DH5 α mit dem Mutageneseplasmid wurden diese Plasmide in kompetente Zellen von *Cmm382* elektroporiert.

Der verwendete Vektor pSMART basiert auf den pUC-Vektoren und ist in *Cmm* ein *Suicide*-Plasmid, kann also in *Cmm* nicht replizieren und somit auch nicht auf die nächste Generation übertragen werden. Gegen das entsprechende Antibiotikum resistente Klone können nur durch Integration des Vektors in das Genom entstehen. Bei der homologen Rekombination erfolgt eine Verknüpfung von Donor- und Empfänger-DNA in Bereichen, die eine gleiche oder sehr ähnliche Nukleotid-Sequenz aufweisen, wobei es zu einer Cointegrat-Bildung kommt. Über ein *double-crossover*-Ereignis (*gene-replacement*) beiderseits der *cmx*-Kassette wird das intakte Wildtypgen gegen das durch die Resistenzkassette unterbrochene Gen ausgetauscht. Das Plasmid, welches hierbei eine Excision erfährt, trägt nun das Wildtypgen des Chromosoms und geht in nachfolgenden Generationen verloren. Ein solches *double-crossover* ist allerdings ein seltenes Ereignis. Häufiger erfolgt die Integration des gesamten Plasmids oder eines Teils davon über ein *single-crossover* ins Genom. In diesen Fällen liegt sowohl das inaktivierte Gen, das vom Plasmid stammt, als auch das intakte Wildtypgen vor. Eine weitere Möglichkeit für das Auftreten von resistenten Kolonien ist die illegitime Rekombination, bei der nur kurze homologe Sequenzen (etwa 20-70 bp) verwendet werden, wodurch die Integration auch scheinbar zufällig erfolgen kann. In *Cmm* wurde durch Verwendung von alkalisch denaturierter Mutageneseplasmid-DNA die Ausbeute an Mutanten erhöht. Dies basiert wahrscheinlich darauf, dass die DNA-Reparatursysteme durch einzelsträngige DNA stimuliert werden und somit die homologe Rekombination gefördert wird (Kaup, 2002; Dickhut, 2003). Zusätzlich kann durch die Reduzierung der Glycin-Konzentration von 2,5% (Kirchner et al., 2001) auf 1,25% bei der

Herstellung kompetenter *Cmm*-Zellen die Anzahl der resistenten Klone erhöht werden (Mayer, 2006).

Der korrekte Austausch des Wildtyps gegen das inaktivierte Gen durch ein *double-crossover* wurde mittels Southern Hybridisierung von gespaltener Gesamt-DNA der entstandenen resistenten Kolonien überprüft. Die Sonden wurden mittels *Random-Priming* hergestellt. Die Integration des gesamten Plasmids durch ein *single-crossover* oder illegitime Rekombination in das Genom von *Cmm* konnte durch die Hybridisierung gegen die pUC13-Sonde aufgezeigt werden. Alle Kolonien, die bei dieser Hybridisierung kein Signal zeigten, wurden als potenziell korrekte Mutanten eingestuft. Der Nachweis eines *double-crossovers* erfolgte durch die Hybridisierung sowohl gegen eine genspezifische- als auch gegen die *cmx*-Sonde (die Chloramphenicol-Resistenzgenkassette). Die Hydrolyse der Gesamt-DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen ergibt sowohl bei der Mutante als auch beim Wildtyp ein spezifisches Bandenmuster, mit dem ein *double-crossover* von anderen *crossover*-Ereignissen unterschieden werden kann.

Beim *single-crossover* treten in der Gelelektrophorese neben den Banden des ortsspezifischen *Double-crossover* noch die dem Wildtyp entsprechenden Banden auf. Bei der illegitimen Rekombination sind neben den Wildtypbanden noch weitere Hybridisierungsbanden sichtbar, die aufgrund der unterschiedlichen Plasmidintegrationsstellen beliebige Größen besitzen können.

Konstruktion von Mutageneseplasmiden zur Inaktivierung der Gene *sbtA*, *sbtB* und *sbtC* von *Cmm382*

Für die Inaktivierung des *sbtA*-Gens wurde das Plasmid cmis3p0024f11 (Karte, siehe Anhang) verwendet, das ein geschertes 3,1 kb Fragment aus dem Genom von NCPPB382 enthält. Das *sbtA*-Gen liegt vollständig auf diesem Fragment, welches eine singuläre Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bgl*II innerhalb des offenen Leserasters von *sbtA* besitzt. Über diese Schnittstelle kann das Gen durch eine Resistenzgenkassette inaktiviert werden. Die für die Mutagenese eingesetzten Plasmide wurden wie folgt konstruiert: Für die Inaktivierung wurde das Plasmid pEC70 (Tauch et al., 1998; Karte siehe Anhang) mit *Bsa*AI und *Kpn*I hydrolysiert. Daraus resultierte ein 1,9kb großes *Bsa*AI-Fragment mit der Chloramphenicol-Resistenzgenkassette (*cmx*, codiert einen Chloramphenicolexporter), das für die

Inaktivierung genutzt werden konnte. Nach der Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease *Bgl*II wurde das linearisierte Plasmid cmis3p0024f11 (Karte, siehe Anhang) mit dem 1,9kb *Bsa*AI-Fragment ligiert. Da das linearisierte Plasmid *sticky ends*, die *cmx*-Kassette jedoch *blunt ends* besitzt, mussten die *sticky ends* vor der Ligation durch Klenow-Behandlung zu *blunt ends* aufgefüllt werden. Um eine Religation des linearisierten Plasmids zu verhindern, wurden die DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase behandelt und somit dephosphoryliert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Insertion der *cmx*-Resistenzkassette und ihrer Orientierung wurde das Insertionsmutageneseplasmid mit *Eco*RI hydrolysiert. Das daraus resultierende Bandenmuster (Tab. 29) gibt Aufschluss über die Orientierung der *cmx*-Kassette (Abb. 37, Spur 2). Das auf diese Weise entstandene Mutageneseplasmid pKMsbtA enthält das Chloramphenicol-Resistenzgen in gleicher (α) Orientierung wie das Zielgen (Karte, siehe Anhang) und wurde zur Erzeugung von *sbtA*-Mutanten eingesetzt.

Für die Konstruktion der *sbtB*-Mutante wurde das Plasmid cmis3p0013c10 (Karte, siehe Anhang), das ein geschertes 3,7kb Fragment des *Cmm*-Genoms enthält, verwendet. Das Plasmid besitzt ebenso wie *sbtA* eine singuläre *Bgl*II-Schnittstelle innerhalb des offenen Leserasters von *sbtB*, die zur Insertion einer Chloramphenicol-Resistenzkassette (*cmx*-Kassette) verwendet werden konnte. Die Herstellung des *sbtB*-Mutageneseplasmids (pKMsbtB α) erfolgte demnach analog zur Konstruktion des *sbtA*-Mutageneseplasmids.

Auch hier konnte nach *Eco*RI-Hydrolyse des Mutageneseplasmids durch Vergleich des Bandenmusters (Tab. 29) sowohl die erfolgreiche Insertion als auch die Orientierung der Chloramphenicol-Resistenzgenkassette zum *sbtB*-Gen (α -Orientierung; Karte siehe Anhang) nachgewiesen werden (Abb. 37, Spur 1).

Das Plasmid cmis3p0006a12 (Karte, siehe Anhang), das ein geschertes 3,6 kb Fragment des *Cmm*-Genoms enthält, wurde für die Inaktivierung des *sbtC*-Gens verwendet. Der Vektor enthält eine singuläre *Pvu*II-Schnittstelle innerhalb des *sbtC*-Gens, durch die ein linearisiertes Plasmid mit *blunt ends* erzeugt werden kann. Über diese Schnittstelle wurde das 1,9kb große *Bsa*AI-Fragment aus dem Plasmid pEC70 in das linearisierte und dephosphorylierte Plasmid cmis3p0006a12 inseriert und somit das *sbtC*-Gen durch die *cmx*-Kassette inaktiviert. Das auf diesem Weg entstandene Mutageneseplasmid pKMsbtC α (Karte, siehe Anhang) zeigte nach *Eco*RV-Hydrolyse (Tab. 29), dass es das Chloramphenicol-Resistenzgen in gleicher Richtung (α -Form) zum Zielgen enthält (Abb. 37, Spur 5).

Mutageneseplasmid	Restriktionsenzym	Bandengröße [bp] (für α -Orientierung)
pKMsbtAα	<i>EcoRI</i>	4386
		2653
		1821
pKMsbtBα	<i>EcoRI</i>	6577
		1821
		1333
pKMsbtCα	<i>EcoRV</i>	6467
		1799

Tabelle 29: Übersicht über die resultierenden Bandengrößen der hydrolysierten Mutageneseplasmide.

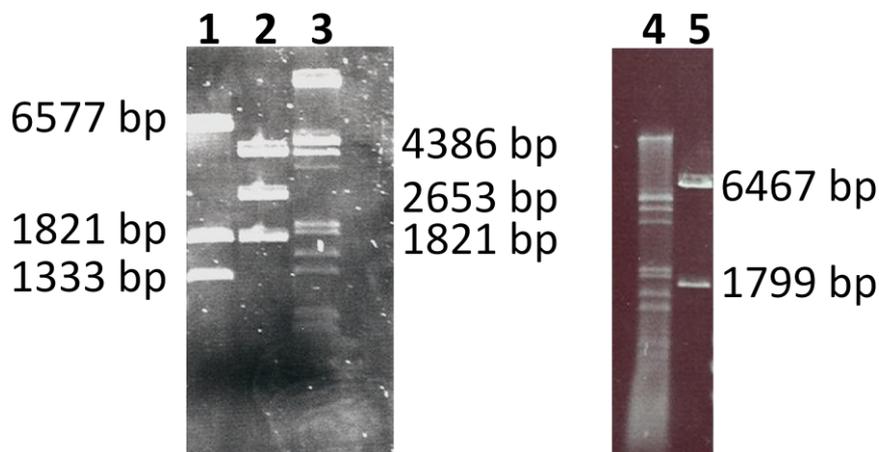


Abbildung 37: Spaltungsmuster der Mutageneseplasmide. Spur 1: pKMsbtB α hydrolysiert mit *EcoRI*, Spur 2: pKMsbtA α hydrolysiert mit *EcoRI*, Spur 5: pKMsbtC α hydrolysiert mit *EcoRV*, Spur 3 und 4: λ -Marker *EcoRI/HindIII* gespalten.

Die Inaktivierung des Gens *sbtA* durch Insertionsmutagenese

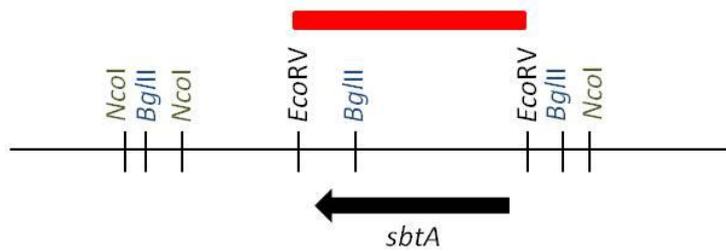
Zur Untersuchung der möglichen Beteiligung des *sbtA*-Gens an der Pathogenität von *Cmm*, wurden die Mutageneseplasmide durch Elektroporation in kompetente *Cmm*-Zellen eingebracht. Nach der Selektion auf Chloramphenicol-haltigem Medium wurde Gesamt-DNA aller Cm^R-Klone gegen eine pUC-Sonde hybridisiert, um eine Integration des Mutageneseplasmids in das *Cmm*-Genom durch illegitime Rekombination oder *single-crossover*, die ebenfalls zu einer Chloramphenicol-Resistenz führen kann, auszuschließen. Alle analysierten Klone, die kein Signal zeigten, wurden als potenziell richtige Klone gewertet und anschließend gegen die genspezifische und eine *cmx*-Sonde hybridisiert, um den

korrekten Austausch des Wildtyp-Gens gegen das inaktivierte Gen zu überprüfen. Zur Herstellung der genspezifischen Sonde wurde das Plasmid cmis3p0024f11 mit *EcoRV* hydrolysiert und das 4,6 kb große Fragment, das das *sbtA*-Gen enthält, mittels Random-Priming markiert. Für die *cmx*-Sonde wurde das 1,9 kb große *BsaAI*-Fragment aus dem Plasmid pEC70 ebenfalls mittels *Random-Priming* markiert.

A

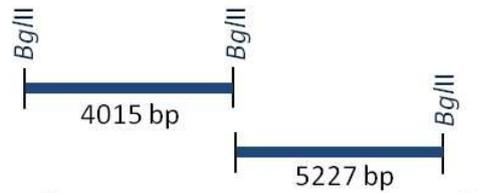
Wildtyp *Cmm* NCPPB382

sbtA-Sonde



hybridisierende Banden

bei *BglII*-Spaltung



bei *NcoI*-Spaltung

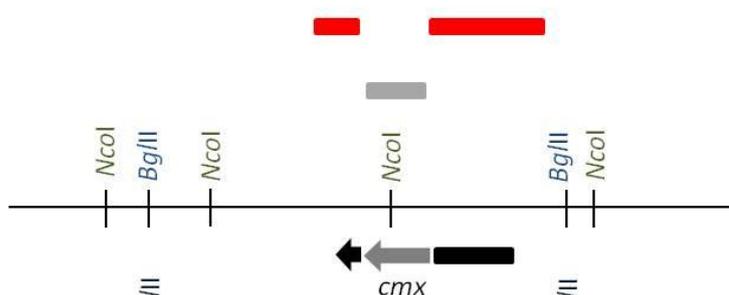


A

***sbtA*-Mutante α**

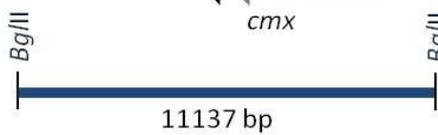
sbtA-Sonde

cmx-Sonde

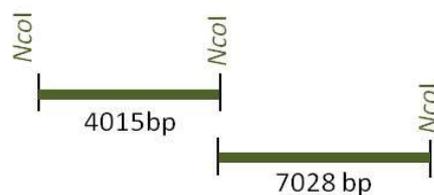


hybridisierende Banden

bei *BglII*-Spaltung



bei *NcoI*-Spaltung



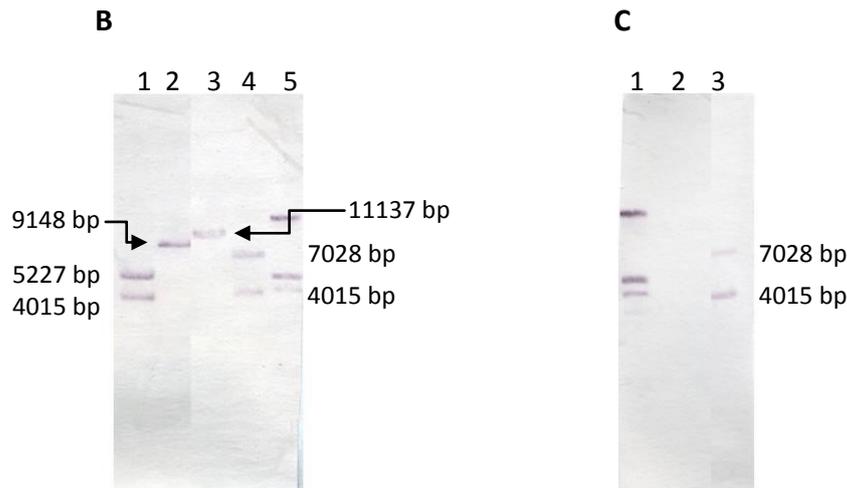


Abbildung 38: Hybridisierungsmuster des Wildtyps (NCPB382) und der *sbtA*-Mutante (CMM101*sbtA*α). **A:** Physikalische Karte der *sbtA*-Region (Cmm_0070) beider Stämme. Dargestellt sind die Sonden und die theoretisch zu erwartenden Hybridisierungsbanden. **B:** Hybridisierung *Bgl*II-hydrolysiertes DNA von NCPB382 (Spur 1) und der Mutante CMM101*sbtA*α (Spur 3) und Hybridisierung *Nco*I-hydrolysiertes DNA von NCPB382 (Spur 2) und der Mutante CMM101*sbtA*α (Spur 4) gegen die genspezifische Sonde, Spur 5: λ-Marker *Eco*RI/*Hind*III gespalten. **C:** Hybridisierung *Nco*I-hydrolysiertes DNA von NCPB382 (Spur 2) und der Mutante CMM101*sbtA*α (Spur 3) gegen die *cmx*-Sonde, Spur 1: λ-Marker *Eco*RI/*Hind*III gespalten.

Bei der Hybridisierung der *Nco*I- bzw. *Bgl*II- hydrolysierten Gesamt-DNA gegen die genspezifische Sonde sollte bei korrekt erfolgtem *double-crossover* das in Abb. 38 A dargestellte Bandenmuster auftreten. Die erhaltenen Fragmentgrößen der hybridisierenden Banden von 4015 bp und 7028 bp bei *Nco*I-Hydrolyse und von 11137 bp bei *Bgl*II-hydrolysiertes Gesamt-DNA stimmen mit dem rechnerisch ermittelten Werten überein (Abb 38 B). Durch die Hybridisierung der hydrolysierten Gesamt-DNA der *sbtA*-Mutante mit der *cmx*-Sonde konnte die Anwesenheit der *cmx*-Kassette nachgewiesen werden (Abb. 38 C). Nach der *Nco*I-Hydrolyse ist das Hybridisierungsmuster sowohl für die genspezifische als auch für die *cmx*-Sonde identisch, da die *cmx*-Kassette in das *sbtA*-Gen integriert ist und eine Schnittstelle für *Nco*I besitzt. Die Übereinstimmung der Fragmentgrößen bestätigen, dass das Chloramphenicol-Resistenzgen an der richtigen Position im Genom inseriert ist und es sich um die gesuchte *sbtA*-Mutante handelt (CMM101*sbtA*α, Karte s. Anhang).

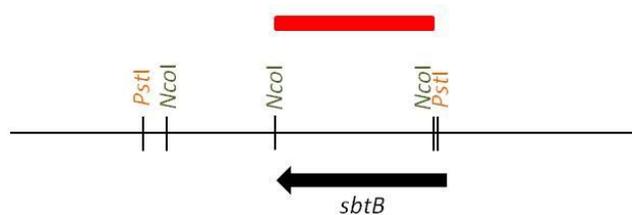
Inaktivierung des Gens *sbtB* durch Insertionsmutagenese

Ein 3,7 kb großes *NcoI*-Fragment aus dem Plasmid *cmis3p0013c10*, das das *sbtB*-Gen enthält, diente als genspezifische Sonde. Für die *cmx*-Sonde wurde der pEC70-Vektor mit *KpnI* und *BsaAI* hydrolysiert und das 1,9 kb große *BsaAI*-Fragment nach Isolierung aus dem Agarosegel für die Hybridisierung eingesetzt. Beide Fragmente wurden mittels Random-Priming markiert. Bei korrekter Integration sollte das in Abb. 39 A dargestellte Bandenmuster bei der Hybridisierung entstehen.

A

Wildtyp *Cmm* NCPPB382

sbtB-Sonde



hybridisierende Banden

bei *PstI*-Spaltung

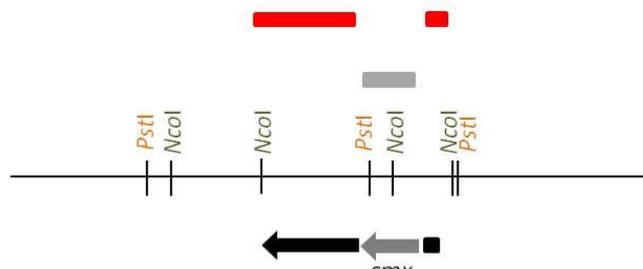


bei *NcoI*-Spaltung



A

sbtB-Mutante α

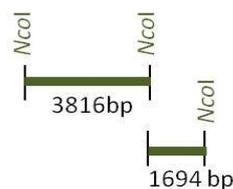


hybridisierende Banden

bei *PstI*-Spaltung



bei *NcoI*-Spaltung



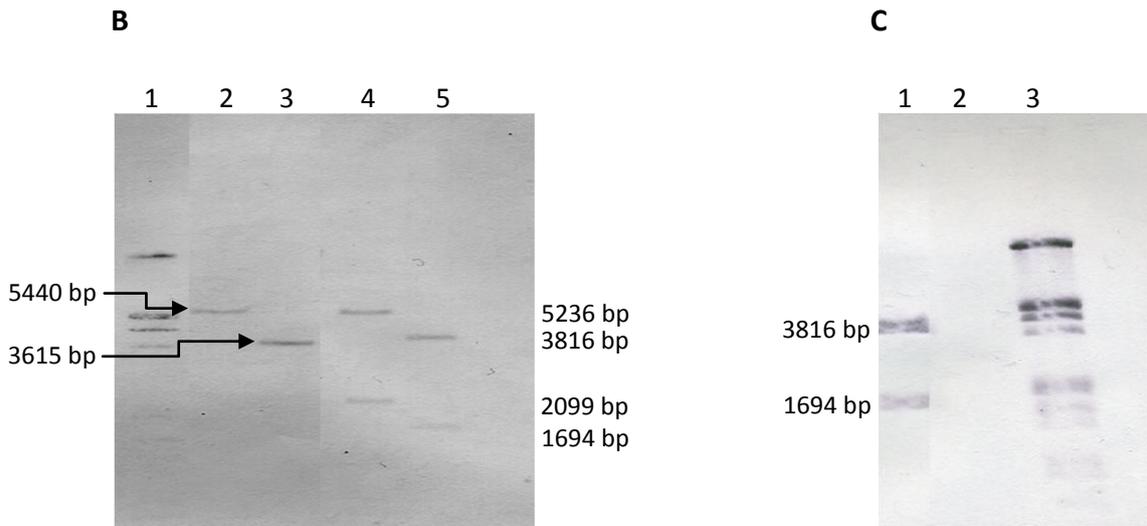


Abbildung 39: Hybridisierungsmuster des Wildtyps (NCPB382) und der *sbtB*-Mutante (CMM101*sbtB* α). **A:** Physikalische Karte der *sbtB*-Region (Cmm_2535) beider Stämme. Dargestellt sind die Sonden und die theoretisch zu erwartenden Hybridisierungsbanden. **B:** Hybridisierung *Pst*I-hydrolysiertes DNA von NCPB382 (Spur 2) und der Mutante CMM101*sbtB* α (Spur 4) und Hybridisierung *Nco*I-hydrolysiertes DNA von NCPB382 (Spur 3) und der Mutante CMM101*sbtB* α (Spur 5) gegen die genspezifische Sonde, Spur 1: λ -Marker *Eco*RI/*Hind*III gespalten. **C:** Hybridisierung *Nco*I-hydrolysiertes DNA von NCPB382 (Spur 2) und der Mutante CMM101*sbtB* α (Spur 1) gegen die *cmx*-Sonde, Spur 3: λ -Marker *Eco*RI/*Hind*III gespalten.

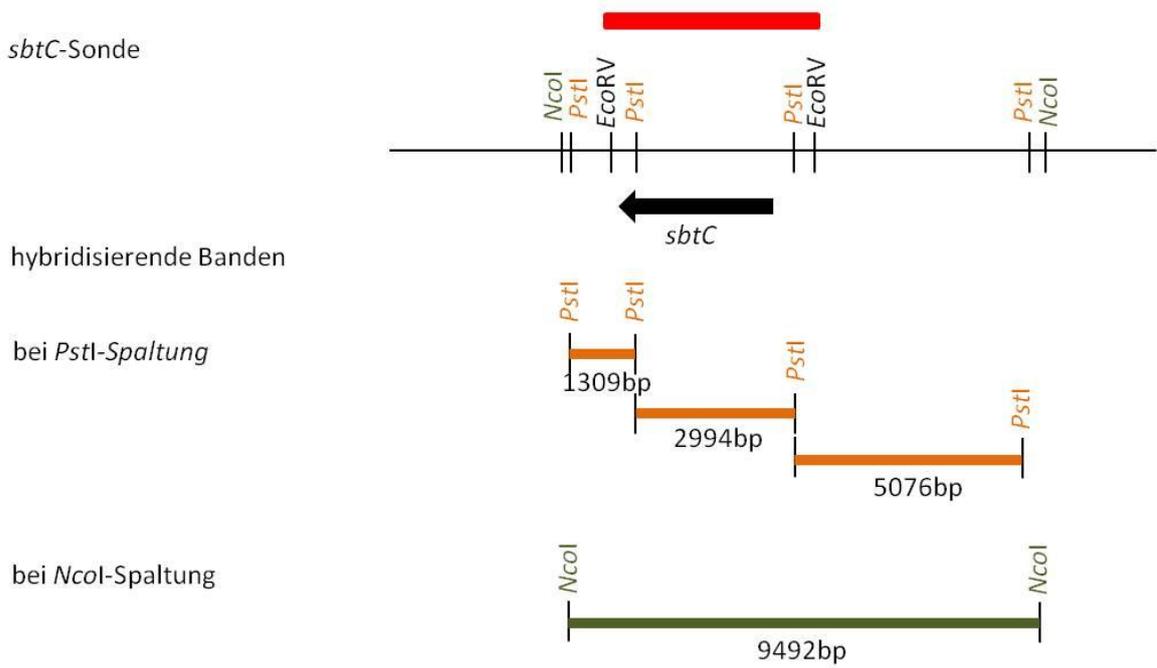
Anhand der Signale für die Hybridisierung der *Nco*I-gespaltenen Gesamt-DNA bei einer Größe von 3816 bp und 1694 bp als auch bei den Bandengrößen von 5236 bp und 2099 bp für *Pst*I-gesplante Gesamt-DNA (Abb. 39 B) konnte eine korrekte *sbtB*-Mutante identifiziert werden. Die Hybridisierung diente dem Nachweis der erfolgreichen Insertion der *cmx*-Kassette. Bei *Nco*I-gesplante Gesamt-DNA ist das gleiche Bandenmuster zu erwarten, wie bei der Hybridisierung gegen die genspezifische Sonde. Die Southern Hybridisierung gegen die *cmx*-Sonde zeigte (Abb. 39 C), dass die korrekte *sbtB*-Mutante CMM101*sbtB* α , (Karte s. Anhang) die Cm-Resistenz in gleicher Orientierung (α -Form) trägt wie das Zielgen.

Inaktivierung des *sbtC*-Gens durch Insertionsmutagenese

Für die Herstellung der *cmx*-Sonde wurde wie zuvor das 1,9 kb große *Bsa*AI-Fragment aus dem Vektor pEC70 verwendet. Für die genspezifische Sonde wurde das Plasmid cmis3p0006a12 mit *Eco*RV hydrolysiert und das daraus resultierende 4,6 kb große Fragment nach Markierung durch *Random-Priming* benutzt.

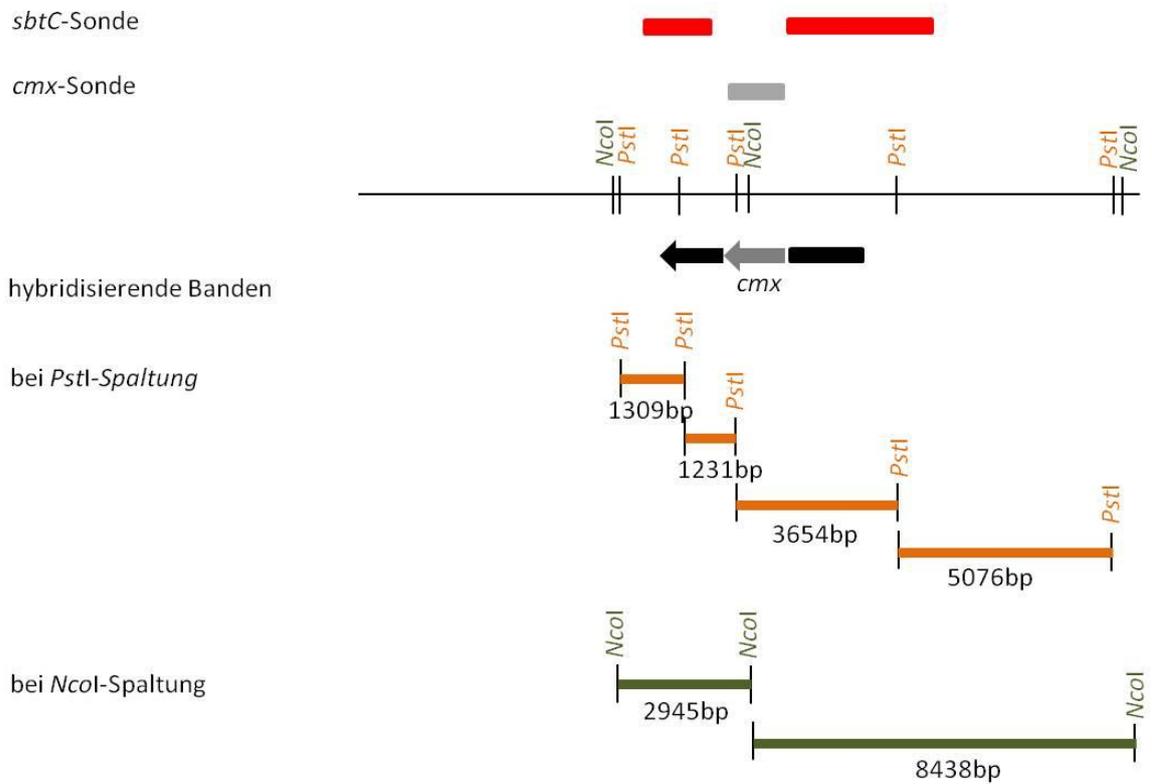
A

Wildtyp *Cmm* NCPPB382



A

***sbtC*-Mutante α**



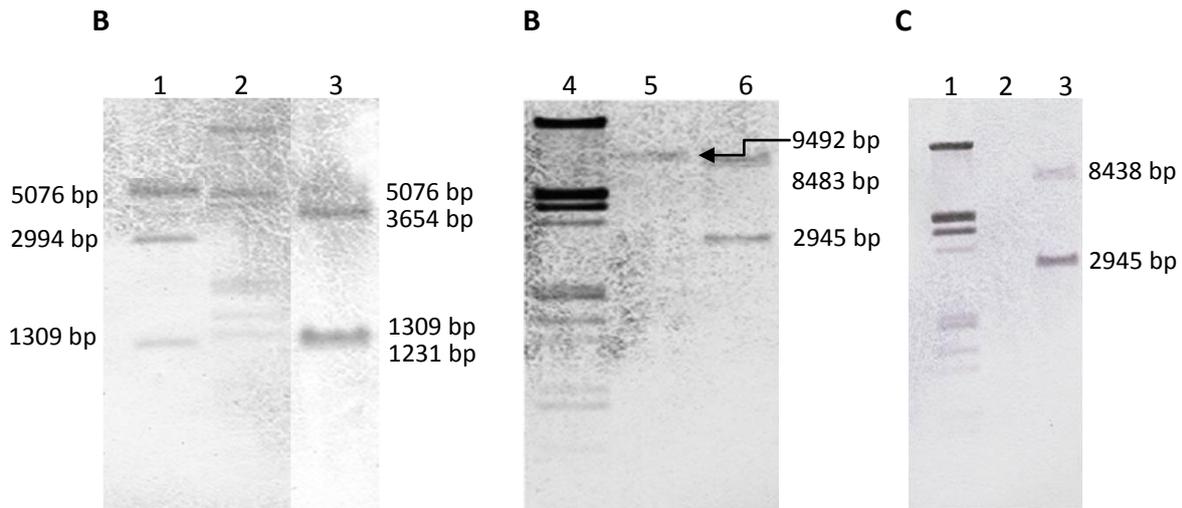


Abbildung 40: Hybridisierungsmuster des Wildtyps (NCPPB382) und der *sbtC*-Mutante (CMM101*sbtCa*). **A:** Physikalische Karte der *sbtC*-Region (Cmm_2536) beider Stämme. Dargestellt sind die Sonden und die theoretisch zu erwartenden Hybridisierungsbanden. **B:** Hybridisierung *Pst*I-hydrolysierter DNA von NCPPB382 (Spur 1) und der Mutante CMM101*sbtCa* (Spur 3), Spur 2: λ -Marker *Eco*RI/*Hind*III gespalten und Hybridisierung *Nco*I-hydrolysierter DNA von NCPPB382 (Spur 5) und der Mutante CMM101*sbtCa* (Spur 6) gegen die genspezifische Sonde, Spur 4: λ -Marker *Eco*RI/*Hind*III gespalten. **C:** Hybridisierung *Nco*I-hydrolysierter DNA von NCPPB382 (Spur 2) und der Mutante CMM101*sbtCa* (Spur 3) gegen die *cmx*-Sonde, Spur 1: λ -Marker *Eco*RI/*Hind*III gespalten.

Die Hybridisierung gegen die genspezifische Sonde zeigte bei *Pst*I-gespaltener Gesamt-DNA (Abb. 40 **B**) der getesteten resistenten Klone das bei Abb. 40 **A** erwartete Bandenmuster von 1231 bp, 1309 bp, 3654 bp und 5076 bp. Auch bei der *Nco*I-gespaltenen Gesamt-DNA konnten die errechneten Signale bei 2945 bp und 8438 bp detektiert werden (Abb. 40 **B**). Die Hybridisierung der *Nco*I-hydrolysierten Gesamt-DNA gegen die *cmx*-Sonde und die genspezifische Sonde ergab jeweils das gleiche Bandenmuster (Abb. 40 **C**). Die gewünschte Inaktivierung des *sbtC*-Gens wurde somit erreicht und die *sbtC*-Mutante CMM101*sbtCa* (Karte s. Anhang) enthält das Chloramphenicol-Resistenzgen in gleicher Orientierung (α -Form) zum Gen.

Überprüfung des Plasmidstatus der Mutanten durch PCR

Der Wildtyp *Cmm382* besitzt zwei endogene, für die Pathogenität relevante Plasmide, pCM1 (*celA*-Gen) und pCM2 (*pat-1*-Gen). Bei der Elektroporation gehen diese allerdings öfter einzeln oder gemeinsam verloren. Durch den Einsatz eines Primermix aus den für *celA* und

pat-1 spezifischen Primern wurde mittels PCR der Plasmidstatus der Mutanten überprüft werden. Dieser Nachweis ist für die spätere phänotypische Analyse im Pflanzentest wichtig, damit die Mutante mit der entsprechenden Kontrolle verglichen werden kann.

Mittels einer PCR mit *celA*- und *pat-1* spezifischen Primern wurden die erzeugten Stämme bezüglich ihres Plasmidstatus untersucht. Für *celA* wurde ein PCR-Produkt von 502 bp und für das *pat-1*-Gen ein PCR-Produkt von 851 bp erwartet. Als positive Kontrollen wurden der Wildtypstamm NCPPB382 und das Curing-Derivat CMM101 mitgeführt. Wie in Abbildung 41 zu erkennen ist, zeigen alle untersuchten Mutanten ausschließlich eine Bande bei 502 bp, die das *celA*-Gen repräsentiert.

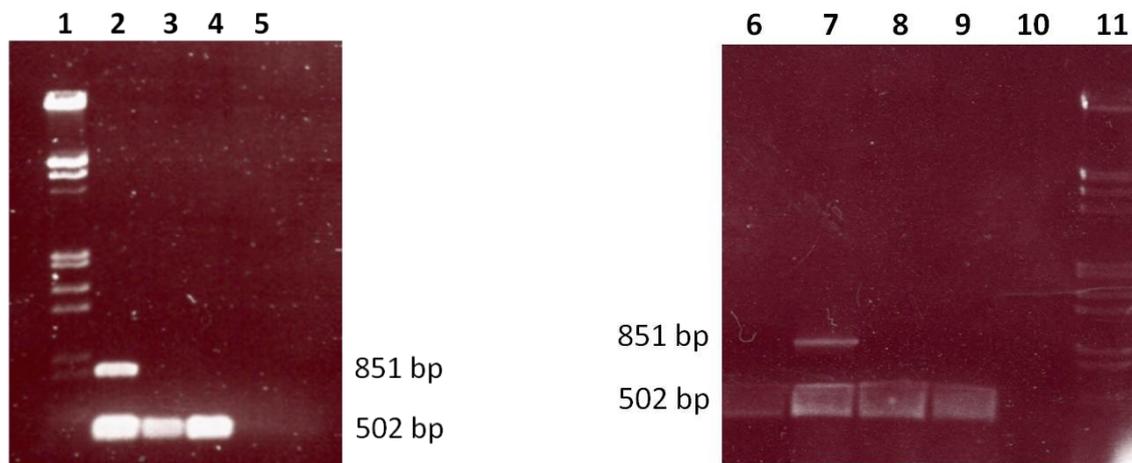


Abbildung 41: Überprüfung des Plasmidstatus der Subtilase-Mutanten mittels *celA*- und *pat-1*-Primern. Spur 1: λ -Marker *EcoRI/HindIII*, Spur 2: *Cmm382*, Spur 3: *CMM101sbtA α* , Spur 4: *Cmm100*, Spur 5: H_2O , Spur 6: *CMM101sbtB α* , Spur 7: *Cmm382*, Spur 8: *CMM101*, Spur 9: *CMM101sbtC α* , Spur 10: H_2O , Spur 11: λ -Marker *EcoRI/HindIII*.

Alle drei Subtilase-Mutanten tragen somit nur noch das native Plasmid pCM1 und mussten in den folgenden Pflanzentests mit dem Welkeverlauf des Curing-Derivat CMM101 verglichen werden.

Phänotypische Analyse der Subtilase-Mutanten von *Cmm* im Pflanzentest

Die kompatible Interaktion mit *Solanum lycopersicum*

Die Wirtspflanze von *Cmm382* ist die Tomatenpflanze (*Solanum lycopersicum*). *Cmm* dringt über äußere Verletzungen der Pflanze, zum Beispiel über das Wurzelwerk, in diese ein, kolonisiert das Xylem und führt zu Welkeerscheinungen und schließlich zum Absterben der Pflanze. Für die Ausprägung der Krankheitssymptome der Tomatenpflanze sind die plasmidkodierte Pathogenitätsfaktoren *celA* und *pat-1* notwendig. Aber auch die Produkte anderer Gene können indirekt an der Pathogenität beteiligt sein, indem sie z. B. Einfluss auf die Kolonisationsfähigkeit von *Cmm* in der Tomatenpflanze haben oder aber zusammen mit *celA* und *pat-1* an der Auslösung der Krankheitssymptome beteiligt sind. Mutationen in diesen Genen können z. B. durch eine verminderte Kolonisation der Tomate eine Abschwächung der Virulenz zur Folge haben. Um Erkenntnisse über das Pathogenitätsverhalten der Subtilase-Mutanten zu erhalten, wurden diese in einem Pflanzentest eingesetzt. Ist zu erkennen, dass eine Mutante virulent ist, gilt es zu überprüfen, ob sich der Virulenzgrad vom entsprechenden Kontrollstamm unterscheidet. Hierfür können mehrere Parameter zur Unterscheidung herangezogen werden. Ein wichtiges Indiz ist der Welkeindex, der angibt nach welchem Zeitraum die Hälfte aller untersuchten Pflanzen Welkesymptome aufzeigen. Die Erstellung eines Welkediagramms, das die Intensität der hervorgerufenen Welkesymptome widerspiegelt, als auch die Bestimmung des Bakterientiters *in planta* und der Größe der Pflanzen können ebenfalls wichtige Indizien liefern. Nach Infektion der Pflanzen mit dem jeweiligen Bakterienstamm wurde über einen Zeitraum von 28 Tagen täglich der Welkeverlauf der Pflanzen protokolliert. Dabei wurde das Ausmaß der sichtbaren Symptome über folgende Stadien differenziert:

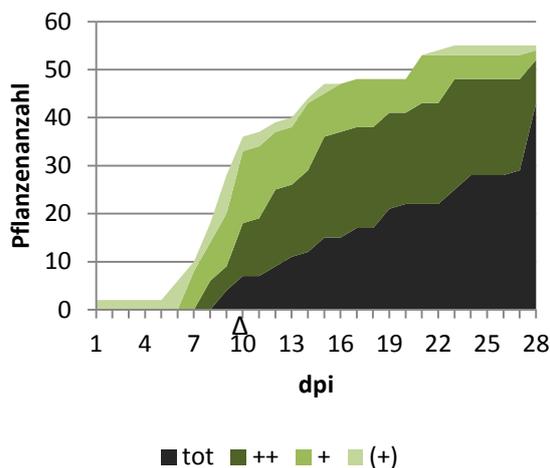
„-“ keine Welkesymptome, „(+““ beginnende Welkesymptome, „+“ eindeutige Welkesymptome, „++“ mindestens 2/3 aller Blätter zeigen eindeutige Welkesymptome, „tot“ alle Blätter welk

Da der Plasmidstatus Einfluss auf die Virulenz von *Cmm* hat (Meletzus et al., 1993) wurden die Subtilase-Mutanten mit dem Stamm CMM101, der ebenfalls nur pCM1 trägt, verwendet. Der Welkeverlauf des Wildtypstammes *Cmm382* wurde in dieser Arbeit ebenfalls dargestellt, um den natürlichen Krankheitsverlauf, und damit den Einfluss der Plasmide auf die Virulenz, aufzuzeigen. Der Pflanzentest wurde insgesamt zweimal durchgeführt und umfasste für

Cmm382 insgesamt 62 Pflanzen (Test1: 32; Test2: 30), für CMM101 63 Pflanzen (Test1: 32; Test2: 31) für CMM101*sbtA* 63 Pflanzen (Test1: 32; Test2: 31) und für CMM101*sbtB* 62 Pflanzen (Test1: 32; Test2: 30). Die Untersuchung der Subtilase-Mutante CMM101*sbtC* konnte aus Zeitmangel nicht mehr durchgeführt werden.

Die Welkediagramme der Kontrollstämme *CmmNCPB382* und CMM101 zeigten einen typischen Verlauf mit einem Welkeindex von 10 bzw. 14 Tagen. Die ersten charakteristischen Welkesymptome traten 6-7 Tage nach Infektion auf. Es ist zu erkennen, dass aufgrund des Plasmidstatus der weitere Krankheitsverlauf bei *Cmm382* schwerer verläuft als bei dem Curing-Derivat CMM101 (Abb. 42).

Cmm382



CMM101

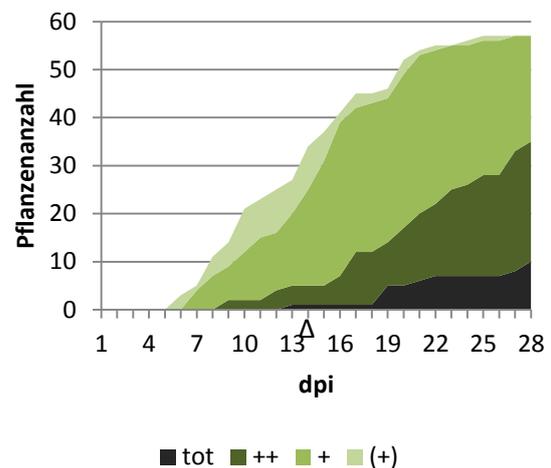


Abbildung 42: Welkeintensität der mit *Cmm382* (n= 62) und CMM101 (n= 63) infizierten Pflanzen über einen Zeitraum von vier Wochen. Klassisches Welkediagramm: Anzahl welkender Pflanzen gegen die Zeit; der Welkeindex (*Cmm382* 10 Tage, CMM101 14 Tage) ist durch das schwarze Dreieck gekennzeichnet.

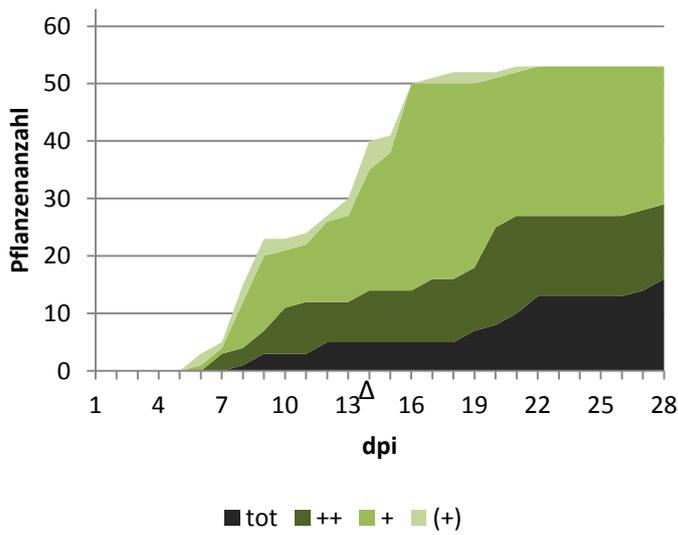
Phänotypische Analyse von CMM101*sbtA*

Die Mutante CMM101*sbtA* zeigte im Vergleich zum Kontrollstamm CMM101 innerhalb von vier Wochen nach Infektion mit 49,62 % welker Pflanzen keinen nennenswerten Unterschied zu den Kontrollpflanzen (51,61 %, Abb. 43). Zwar konnten in der Häufigkeit, mit der während des gesamten Pflanzentests die Kategorie „tot“ verteilt wurde, bei der Mutante ein geringerer Prozentsatz (4,19 %) als bei der Kontrolle (CMM101: 9,28 %) verzeichnet werden,

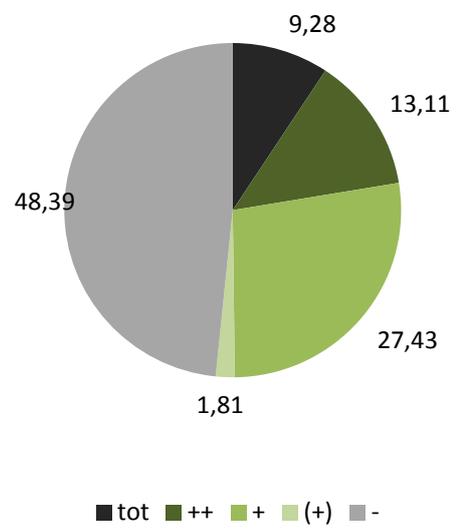
allerdings zeigte die statistische Auswertung, dass dieser Unterschied nicht signifikant ist (p -Wert des t-Tests: 0,514). Dies wird auch durch den ermittelten Welkeindex von 16 Tagen bestätigt, der sich damit nicht auffällig von dem des Kontrollstammes (14 Tagen) unterscheidet (Abb 43).

CMM101

A

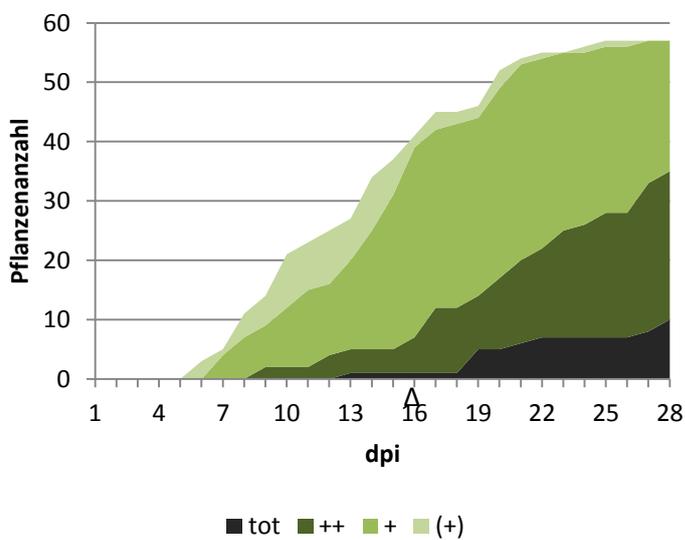


B

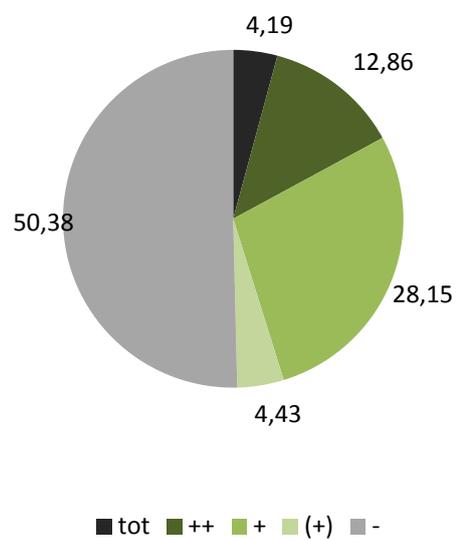


CMM101sbtA

A



B



C

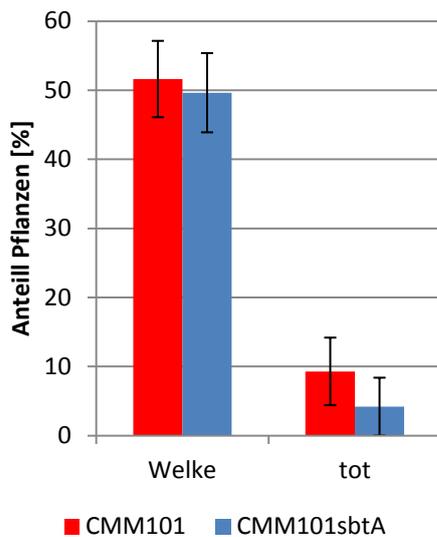


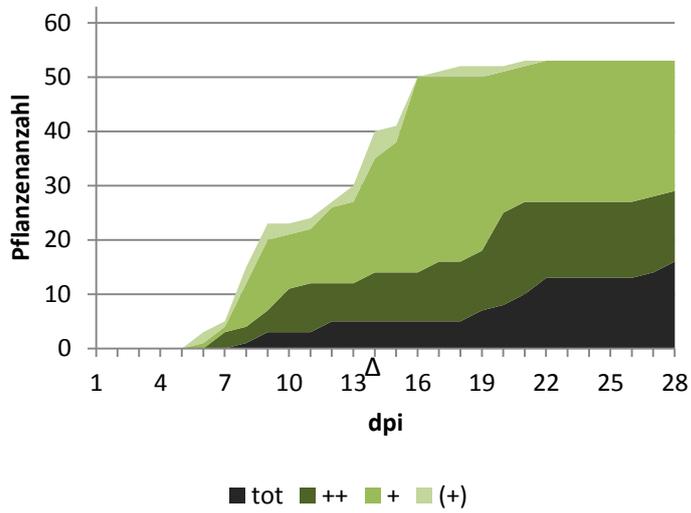
Abbildung 43: Welkeintensität der mit CMM101 (n= 63) und CMM101sbtA (n= 63) infizierten Pflanzen über einen Zeitraum von vier Wochen. **A:** klassisches Welkediagramm: Anzahl welkender Pflanzen gegen die Zeit; der Welkeindex (CMM101sbtA 16 Tage) ist durch das schwarze Dreieck gekennzeichnet. **B:** Dargestellt ist die prozentuale Häufigkeit [%] mit der die infizierten Pflanzen während des Testzeitraums in die einzelnen Kategorien „tot“, „++“, „+“, „(+)“ bzw. „-“ eingestuft wurden. **C:** Mittelwerte des Prozentsatzes infizierter Pflanzen, die während der 28 Tage Welkesymptome aufwiesen, bzw. in die Kategorie „tot“ eingestuft wurden. Zusätzlich angegeben wurde der Standardfehler. Rohdaten sind im Anhang (s. Tab. 40, Seite 199) zu finden.

Phänotypische Analyse von CMM101sbtB

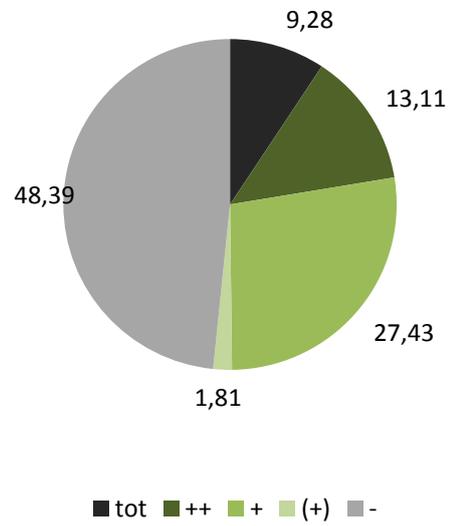
In Abbildung 44 ist zu erkennen, dass CMM101sbtB insgesamt geringere Welkesymptome hervorrief als CMM101 (39,1 % gegenüber 51,61 %). Nur 9,48 % der Pflanzen wiesen vier Wochen nach Infektion mit der Mutante CMM101sbtB starke Welkesymptome auf (Einstufung: ++) auf (CMM101: 13,11 %). Auch die prozentuale Häufigkeit der toten Pflanzen war reduziert (Mutante: 2,74 %, CMM101: 9,28 %). Durch Einbeziehen der Daten aus beiden Pflanzentests konnten aber die Unterschiede in der Häufigkeit, mit der Welkesymptome protokolliert wurden, (p-Wert t-Test: 0,375) als auch in der Häufigkeit, mit der Pflanzen in die Kategorie „tot“ eingeordnet wurden, (p-Wert t-Test: 0,363) als nicht signifikant beurteilt werden. Auch der berechnete Welkeindex von 16 Tagen zeigte im Vergleich zum Kontrollstamm CMM101 (14 Tage) keinen deutlichen Unterschied.

CMM101

A

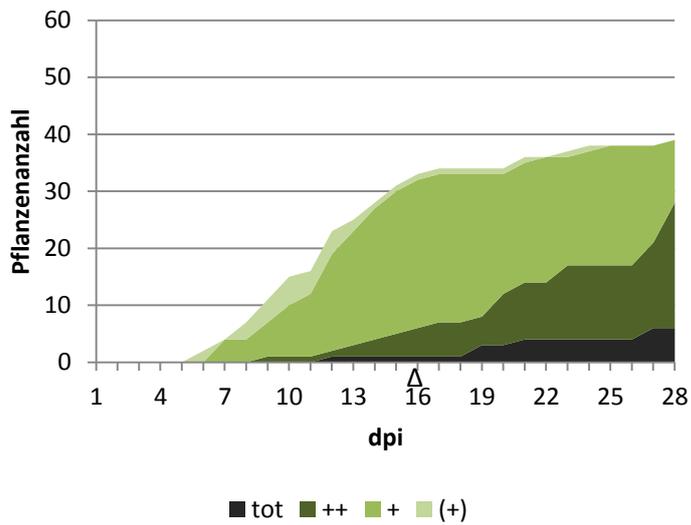


B

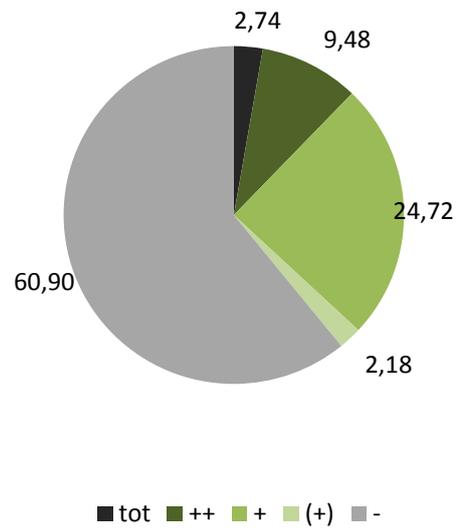


CMM101sbtB

A



B



C

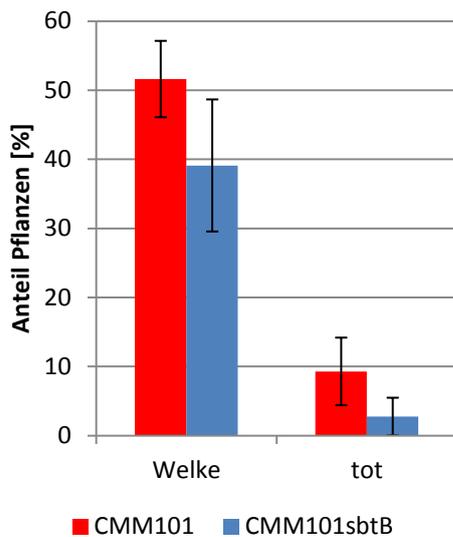


Abbildung 44: Welkeintensität der mit CMM101 (n= 63) und CMM101sbtB (n= 62) infizierten Pflanzen über einen Zeitraum von vier Wochen. **A:** klassisches Welkediagramm: Anzahl welkender Pflanzen gegen die Zeit; der Welkeindex (CMM101sbtB 16 Tage) ist durch das schwarze Dreieck gekennzeichnet. **B:** Dargestellt ist die prozentuale Häufigkeit [%] mit der die infizierten Pflanzen während des Testzeitraums in die einzelnen Kategorien „tot“, „++“, „+“, „(+)“ bzw. „-“ eingestuft wurden. **C:** Mittelwerte des Prozentsatzes infizierter Pflanzen, die während der 28 Tage Welkesymptome aufwiesen, bzw. in die Kategorie „tot“ eingestuft wurden. Zusätzlich angegeben wurde die Standardfehler. Rohdaten sind im Anhang (s. Tab. 40 , Seite 199) zu finden.

Ein weiteres Indiz für den Virulenzgrad stellt das Gewicht der Pflanzen dar. Hierzu wurde für die statistische Auswertung nicht das arithmetische Mittel, sondern der Median des Pflanzengewichts bestimmt, da das Gewicht der Pflanzen stark davon abhängt, wann und in welcher Intensität die Welkesymptome auftreten. Daher können hier große Streuungen zwischen den einzelnen Pflanzen auftreten. Bei Bestimmung des Frischgewichts wurden nur die Pflanzen aus dem zweiten Test genutzt (CMM101: Test 2= 31 Pflanzen; CMM101sbtA Test 2= 31 Pflanzen; CMM101sbt: Test 2= 30 Pflanzen). Dabei wurden alle Pflanzen, die keine Welkesymptome oder Sprossläsionen zeigten und bei denen kein *Cmm* im Xylemsaft nachgewiesen werden konnte, als nicht infiziert eingestuft und bei dieser Auswertung nicht mit einbezogen.

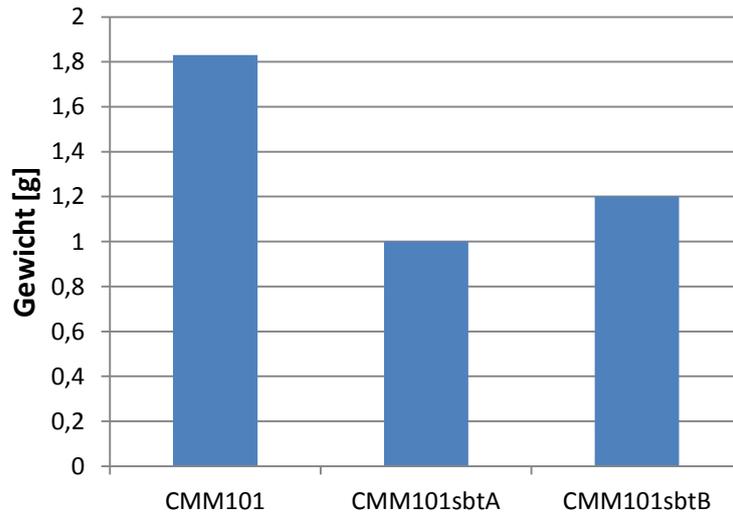


Abbildung 45: Median der Frischgewichte aller im 2. Pflanzentest welkenden Pflanzen. Anzahl der welkenden Pflanzen: CMM101=25, CMM101sbtA=27 und CMM101sbtB=19.

Die mit den Mutanten infizierten Pflanzen zeigen im Vergleich zu den Pflanzen, die mit dem Kontrollstamm CMM101 infiziert wurden, ein leicht verringertes Gewicht (CMM101sbtA: -45,36 %; CMM101sbtB: -34,43 %; s. Abb. 45). Allerdings kann aufgrund der vorliegenden geringen Datenmenge eine statistische Prüfung der Signifikanz nicht durchgeführt werden (da keine Normalverteilung und keine Varianzhomogenität vorliegt, müsste die Signifikanz mit dem Wilcoxon-Rangsummentest überprüft werden).

Da bereits für eine weitere putative Serinprotease (ChpC) eine Beteiligung an der Bakterien-Pflanzen-Interaktion (Reduzierung des Titors *in planta*) nachgewiesen werden konnte (Gräfen, 2005), wurde ebenfalls die Kolonisationsfähigkeit der Subtilase-Mutanten überprüft. Dazu wurde nach Abschluss des Pflanzentests (28 Tage) von je vier infizierten Pflanzen (Welkestatus: „++“) der Bakterientiter [cfu/g Frischgewicht Pflanze] bestimmt.

Cmm-Stamm	Titer [cfu/g Frischgewicht Pflanze] (Mittelwert)	Standardabweichung
CMM101	9,39x 10 ⁹	± 4,06 x 10 ⁹
CMM101sbtAα	1,11x 10 ¹⁰	± 6,96 x 10 ⁹
CMM101sbtBα	3,09x 10 ¹⁰	± 1,66 x 10 ¹⁰

Tabelle 30: Tabellarische Übersicht des errechneten Bakterientiters [cfu/g Frischgewicht Pflanze] der konstruierten Subtilase-Mutanten und der Kontrolle CMM101 (n= 4 Pflanzen). Die Einzelwerte sind dem Anhang (s. Tab. 42, Seite 201) zu entnehmen.

Der Vergleich der Werte zu der Kontrolle CMM101 (Tab. 30) zeigt keinen nennenswerten Unterschied. Somit hatte die Mutation keinen Effekt auf die Kolonisationsfähigkeit.

Die inkompatible Interaktion- die hypersensitive Reaktion (HR) bei *Mirabilis jalapa*

Neben der Analyse der konstruierten Subtilase-Mutanten im Pflanzentest wurde zudem untersucht, ob diese Bakterienstämme von der Nichtwirtspflanze weiterhin als Pathogen erkannt werden. Dazu wurde bei *Mirabilis jalapa* das Gewebe der Blattunterseite mit einer Suspension dieser Bakterienstämme infiltriert. Die Ausbildung einer Nekrose als hypersensitive Reaktion auf einen Pathogenbefall war 72 Stunden nach Infiltration zu erkennen. Als positive Kontrolle wurde der Stamm CMM101, der den gleichen Plasmidstatus wie die Subtilase-Mutanten aufweist, mitgeführt. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass der PS-Puffer, in dem die Bakterienstämme resuspendiert wurden, eine hypersensitive Reaktion auslöst, diente dieser Puffer als Negativkontrolle.

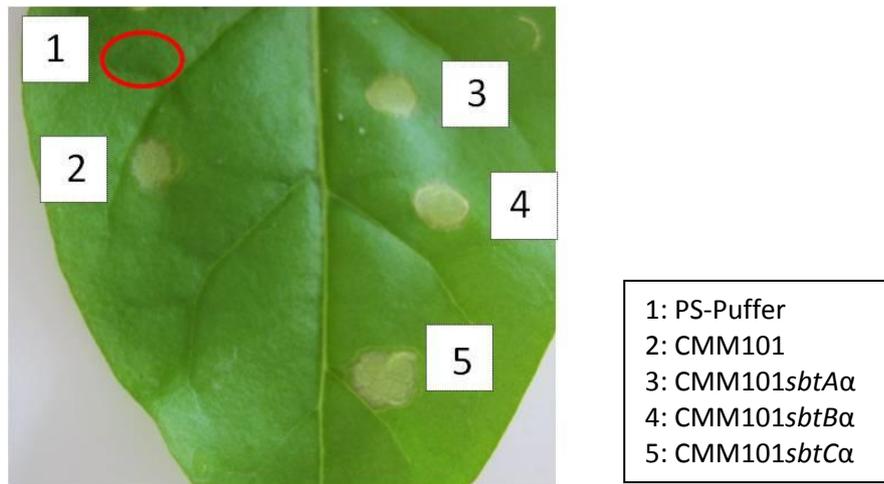


Abbildung 46: Blatt von *Mirabilis jalapa* drei Tage nach Infiltration mit verschiedenen *Cmm*-Stämmen und dem PS-Puffer (Kontrolle). Der rote Kreis markiert die Infiltrationsstelle. n= 5.

Die Infiltration mit den Subtilase-Mutanten CMM101*sbtA* α , CMM101*sbtB* α und CMM101*sbtC* α führte bei 75 % der untersuchten Blätter zu einer eindeutigen Auslösung der hypersensitiven Reaktion in der Nicht-Wirtspflanze (Abb. 46). Es gibt somit keinen Unterschied zum Kontrollstamm CMM101. Die Fähigkeit zur HR-Auslösung ist bei keiner der drei Subtilase-Mutanten beeinträchtigt.

Diskussion

Die Inaktivierung der Subtilasen SbtA und SbtB durch Insertionsmutagenese hatte nur eine geringe Verminderung der Virulenz zur Folge und schien keinen Effekt auf die Kolonisationsfähigkeit von *Cmm* zu haben, da in Pflanzentests mit den Mutanten kein signifikanter Unterschied zu der Kontrolle CMM101 detektiert werden konnten. Die Bedeutung dieser Proteasen als Virulenzfaktoren kann an dieser Stelle noch nicht eindeutig geklärt werden, da für eine statistisch abgesicherte Analyse der Datensatz von mindestens noch einem weiteren Pflanzentest notwendig wäre, sodass die Frage nach der Signifikanz offenbleiben muss.

Das Vorhandensein eines Signalpeptids bei den *Cmm*-Subtilasen SbtA, SbtB und SbtC lässt vermuten, dass es sich, wie bei den anderen in dieser Arbeit untersuchten hypothetischen

Serinproteasen, auch hier um extrazelluläre Proteasen handelt. Die Analyse des Sekretoms des *Cmm382*-Kulturüberstandes konnte diese Vermutung bereits bestätigen (Tews, 2012). Bisher konnte nur bei wenigen Subtilasen von (phyto-)pathogenen Organismen eine entscheidende Funktion in der Pathogenität nachgewiesen werden. Für die *alp mep*-Doppelmutante (ALP: alkaline Protease; MEP: Metalloprotease) aus *Aspergillus fumigatus*, einem humanpathogenen Pilz, konnte im Vergleich zum Wildtyp-Stamm kein Unterschied in der Pathogenität festgestellt werden (Jaton-Ogay et al., 1994). Für *Fusarium eumartii* (ein pilzliches Pathogen der Welke an Kartoffelstauden) wurde eine extrazelluläre Serinprotease, die der Subtilase-Subfamilie zugeordnet ist, identifiziert. Neben der *in vitro*-Hydrolyse von spezifischen Polypeptiden der Zellwand und der Degradation von PR-Proteinen der Kartoffel scheint dieser Protease eine große Bedeutung als Virulenzfaktor zuzukommen (Olivieri et al., 2001). Cytotoxin AB₅ (SubAB), das von bestimmten Toxin-bildenden *E. coli* Bakterien produziert wird, inaktiviert durch spezifische Proteolyse an einer einzigen Stelle das molekulare Chaperon BiP des endoplasmatischen Retikulums (ER) (Paton et al., 2006), ein hochkonservierter Hauptregulator des ER_s, der in eukaryotischen Zellen eine lebensnotwendige Funktion übernimmt (Kim & Arvan, 1998; Hendershot, 2004).

Aber auch bei pflanzlichen bzw. tierischen Subtilasen ist häufig ihre genaue Funktion unbekannt, wahrscheinlich weil viele Subtilasen hochspezifisch nur einige wenige Substrat-Proteine hydrolysieren, z.B. die Kexin-artigen Proprotein Konvertasen (PC) aus Säugern, die hochspezifisch agieren (Seidah et al., 2006). Typisch für die PC_s ist die hochspezifische Proteolyse ihrer Substrate C-terminal von dibasischen (Lys-Arg oder Arg-Arg) Motiven (Seidah & Chretien 1999). Die S1P (Site-1-Protease) und PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin Kexin 9, auch NARC-1), die im Gegensatz zu den anderen bekannten Proprotein-Konvertasen nicht zur Kexinfamilie sondern der Pyrolysin- bzw. Proteinase K-Familie angehören, spielen eine wichtige Rolle im Lipidmetabolismus (Sakai et al., 1998; Seidah et al., 1999; Seidah et al., 2003). PCSK9 ist indirekt an der Regulierung des LDL-Cholesterin-Spiegels beteiligt, indem es den LDL-Rezeptor inaktiviert (Seidah & Prat, 2007; Kwon et al., 2008). SP1 reguliert durch die Spaltung der so genannten SREBP_s (Sterol regulatory element-binding proteins) wichtige Elemente des Fettstoffwechsels (Duncan et al., 1997; Sakai et al., 1998). Nur wenige Subtilasen sind ‚Allround‘-Proteasen geringer Spezifität, die an der Nährstoffgewinnung beteiligt sind (wie die namensgebende Subtilisin aus *Bacillus subtilis*).

Subtilasen sind in Pflanzen wesentlich häufiger als in Tieren, es gibt alleine in *Arabidopsis* 56 Mitglieder der Subtilase-Familie, in Reis 63 und in Tomate 15 (Rose et al., 2010; Cedzich et al., 2009). Bisher sind aber nur wenige pflanzliche Subtilasen gereinigt und biochemisch charakterisiert und ihre Selektivität für spezifische Spaltstellen aufgezeigt worden. So besitzt die Subtilase C1 aus Sojabohne eine hohe Präferenz für Glu-Glu und Glu-Gln Bindungen (Boyd et al., 2002). Die Tomaten-Subtilase SISBT1 und die Subtilase Ara 12 aus *Arabidopsis thaliana* weisen eine Präferenz für Gln oder Leu bzw. Phe oder Ala in der P₁-Position ihrer synthetischen Substrate auf (Janzig et al., 2000; Hamilton et al., 2003). Im Falle der gereinigten Tomatensubtilase SISBT3 konnte *in vitro* die Spaltung und damit die Inaktivierung des Systemin-Peptids, eines wichtigen Signalmoleküls der Wundantwort in Tomatenpflanzen, nachgewiesen werden (Cedzich et al., 2009), wobei die spezifischen Hydrolysespaltstellen des Enzyms hinter Glutamin in der P₁-Position, sowie hinter basischen Aminosäuren in den Positionen P₂ und P₁' ihrer Substrate liegen (Cedzich et al., 2009).

Die Subtilasen von *Cmm382* gehören zu einer Multigenfamilie und zeigen beim Vergleich untereinander hohe Übereinstimmungen (Alignment s. Anhang, Seite 211). Demnach kann es sein, dass alle drei Subtilase-Gene (*sbtA*, *sbtB* und *sbtC*) ähnliche Funktionen in dem Organismus übernehmen. Somit könnte nach Inaktivierung eines Gens dessen Funktion durch die anderen beiden Gene ausgeglichen werden. Um diese Vermutung zu verifizieren, müsste eine Doppelmutante der Gene *sbtB* und *sbtC* oder eine Dreifach-Mutante konstruiert und weitere Pflanzentests durchgeführt werden.

Obwohl die Inaktivierung der Gene *sbtA* und *sbtB* keinen Einfluss auf die Krankheitsausprägung oder die Kolonisationsfähigkeit von NCPPB382 besitzt, sind diese Subtilasen von besonderem Interesse, da sie größere Sequenzübereinstimmungen zu den Subtilasen SISBT1, SISBT2 und P69 der Tomate aufweisen (Alignment s. Anhang, Seite 211). Diese Tomaten-Subtilasen besitzen ein N-terminales Leaderpeptid, durch das die Proteine über einen Sekretionsweg durch die Zellmembran ausgeschleust werden. Dieses Signalpeptid wird gefolgt von einem Propeptid, das wahrscheinlich autoproteolytisch abgespalten wird (Power et al., 1986) und das Protein somit in eine enzymatisch aktive Form überführt. Das Propeptid fungiert als intramolekulares Chaperon (Shinde et al., 1997) und/oder agiert als intramolekularer Inhibitor der Enzymaktivität (Ujwal et al., 1996; Siezen et al., 1995). Der NH₂-Terminus der Subtilase SISBT1 reguliert durch Bindung an das aktive Zentrum des Enzyms den Substratabbau *in vitro* (Janzig et al., 2000). Die genaue Funktion

der Subtilasen SISBT1 und SISBT2 ist weiterhin unbekannt. Die biochemische Charakterisierung des rekombinanten Proteins SISBT3 ergab, dass diese Subtilase als Präproenzym synthetisiert wird. Die Prozessierung der Prodomäne im Endoplasmatischen Retikulum ist eine Grundvoraussetzung für die Ausschleusung über den Sekretionsweg und die Überführung des Proteins in ein aktives Dimer. Im Gegensatz zu anderen eukaryotischen Subtilasen wie z.B. Kex2 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Fuller et al., 1989) ist die proteolytische Aktivität von SISBT3 Calcium-unabhängig (Cedzich et al., 2009). Die schon erwähnte eingeschränkte Substratspezifität von SISBT3 legt nahe, dass diese Subtilase an spezifischen Aufgaben in physiologischen Prozessen der Pflanze beteiligt ist (Cedzich et al., 2009).

Auch für die meisten Mitglieder der P69-Familie ist ihre Funktion noch unklar, allerdings konnten Untersuchungen zeigen, dass die Expression der Proteine P69B und P69C durch einen Pathogenbefall induziert wird und sie damit vermutlich eine zentrale Rolle in der Pathogenabwehr einnehmen könnten (Jordá et al., 1999).

Einen Hinweis auf die Sekretion von SbtA und SbtC liefert nicht nur das Vorhandensein eines Signalpeptids, sondern auch die Identifizierung dieser Proteine im Xylemsaft von Tomaten, die mit *Cmm382* infiziert wurden, wobei vor allem SbtC in großen Mengen vorkommt (Savidor et al., 2012). Das Alignment der *Clavibacter*-Subtilasen zeigt neben dem Propeptid und der katalytischen Domäne eine am C-Terminus folgende 200-300 AS große Domäne, die in den pflanzlichen Subtilasen nicht vorzufinden ist und als Bindedomäne fungieren könnte. Mit Hilfe dieser Domäne könnten die Subtilasen im Rahmen der Bakterien-Pflanzen-Interaktion Tomatenproteine binden und umsetzen. Die entsprechenden Spaltprodukte könnten dann als Elicitoren fungieren und somit Signaltransduktionswege induzieren, die wiederum verschiedene Wirtsantworten auslösen.

Fazit und Ausblick

Es konnte erstmals nachgewiesen werden, dass das Sekretom des phytopathogenen Aktinomyceten *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* proteolytische aktive Enzyme enthält. Ein überwiegender Teil dieser Enzymaktivität konnte dabei Proteinen zugeordnet werden, die von Genen der *chp/tomA*-Region, der potentiellen Pathogenitätsinsel, kodiert werden. Die durch Verwendung eines *E. coli*-Expressionssystems synthetisierten rekombinanten Proteine (ChpC, ChpG, Pat-1 und PpaC) zeigten jedoch eine gegenüber dem Sekretom veränderte Substratspezifität, die vermutlich auf die heterologe Expression der *Clavibacter*-Gene in einem Gram-negativen Organismus zurückzuführen ist, in dem sie nicht sekretiert wurden.

Dementsprechend wäre es für weitere Expressionsversuche notwendig, ein *Clavibacter*-Expressionssystem zu etablieren, das sowohl die Überexpression von GC-reichen Genen, als auch die Sekretion der Proteine und somit ihre korrekte Faltung, Prozessierung und Ausbildung von Disulfidbrücken ermöglicht. Allerdings ist die Entwicklung eines solchen Systems ein schwieriger und langwieriger Prozess, zumal bis heute über Promotorstrukturen bei *Clavibacter* kaum etwas bekannt ist. Auch Informationen über induzierbare Promotoren und deren Regulation gibt es bisher nicht. Eine Alternative würden bereits vorhandene Expressionssysteme bieten. Einen geeigneten Expressionsstamm könnte z.B. der Protease-defiziente Stamm *Bacillus subtilis* WB800 darstellen. Dieses Expressionssystem zeichnet sich durch eine starke Expression und Sekretion aus, wodurch die Proteinreinigung erleichtert werden würde (Zhang et al., 2005).

Ein negativer Einfluss des C-terminalen Poly-Histidin-Tags auf die biologische Aktivität und die Tertiärstruktur des rekombinanten Proteins kann nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund könnte in folgenden Expressionsexperimenten, immer wenn eine Sekretion im *E. coli*-Expressionsstamm nicht erfolgt, auch die Fusion des His-Tags am N-Terminus getestet werden. Die mit Hilfe von Expressionssystemen synthetisierten und unter physiologischen (nativen) Bedingungen gereinigten Proteine sollten zur Tertiärstruktur der nativen *Cmm*-Proteine hohe Übereinstimmungen zeigen und besser zur Immunisierung von Tieren geeignet sein, um Antikörpern zu produzieren, die die gesuchten Proteasen anhand ihrer Epitope erkennen. Unter diesen Voraussetzungen könnte es dann möglich sein, über die

Antigen-Antikörper-Bindung die entsprechenden Proteine aus dem *Cmm*-Kulturüberstand zu isolieren.

Eine wichtige Frage, die sich weiterhin stellt, ist die nach dem natürlichen Substrat der Proteasen. Die Identifizierung von ChpG und PpaC im Xylemsaft *Cmm382*-infizierter Tomatenpflanzen könnte auf ein Wirtsprotein als Substrat in der Bakterien-Pflanzen-Interaktion hindeuten. Nach Inkubation des Xylemsaftes der Tomate mit dem Kulturüberstand von *Clavibacter* brachte die Auftrennung des Enzymansatzes über 1D- bzw. 2D-Gelelektrophorese und die Analyse der Proteinspots über MALDI-TOF-MS bisher keine auswertbaren Ergebnisse bezüglich des Substrats. Gründe hierfür könnten die zu geringe Proteinkonzentration des Xylemsaftes und die hohe EPS-Bildung des *Clavibacter*-Wildtyps darstellen. In zukünftigen Experimenten sollte dieser Enzymassay mit gereinigten Proteinen wiederholt werden. Ein weiterer potentieller Wirkort sind Proteine der pflanzlichen Zellwand. Diese könnten in Zukunft nach der Isolierung von pflanzlichen Zellwandproteinen ebenfalls mittels MALDI-TOF-MS und MASCOT auf eine proteolytische Spaltung durch die *Clavibacter*-Peptidasen überprüft werden.

Außerdem könnte die Lokalisierung der Proteasen in der Pflanze über einen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper aufzeigen, in welchem Pflanzenkompartiment die Peptidasen zu finden sind, wodurch genauere Rückschlüsse auf das mögliche Substrat gezogen werden könnten.

Sehr wichtig in diesem Zusammenhang ist die Bestimmung der Spezifität der Hydrolysespaltstelle der hier untersuchten Serinproteasen, da ‚falsche‘ Substrate zu einer verminderten bzw. fehlenden Peptidaseaktivität führen können. Diese Spezifität könnte in weiteren Experimenten unter Verwendung weiterer synthetischer Substrate bestimmt und somit die Proteasen biochemisch genauer charakterisiert werden.

Die Rolle der Subtilasen, einer weiteren Gruppe an Serinproteasen in NCPPB382, ist weiterhin ungeklärt. Erste Untersuchungen der konstruierten Mutanten zeigten im Vergleich zum Kontrollstamm CMM101 keinen signifikanten Unterschied in der Virulenz. Neue Erkenntnisse könnten durch die Herstellung einer Doppel- oder Dreifach-Mutante gewonnen werden, da der Verlust der Aktivität einer Subtilase nicht durch das Vorhandensein von weiteren Subtilasen ausgeglichen werden kann.

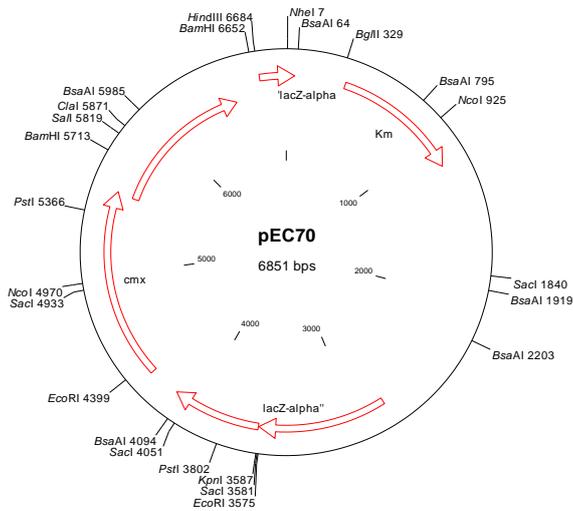
Anhang

Abkürzungsverzeichnis:

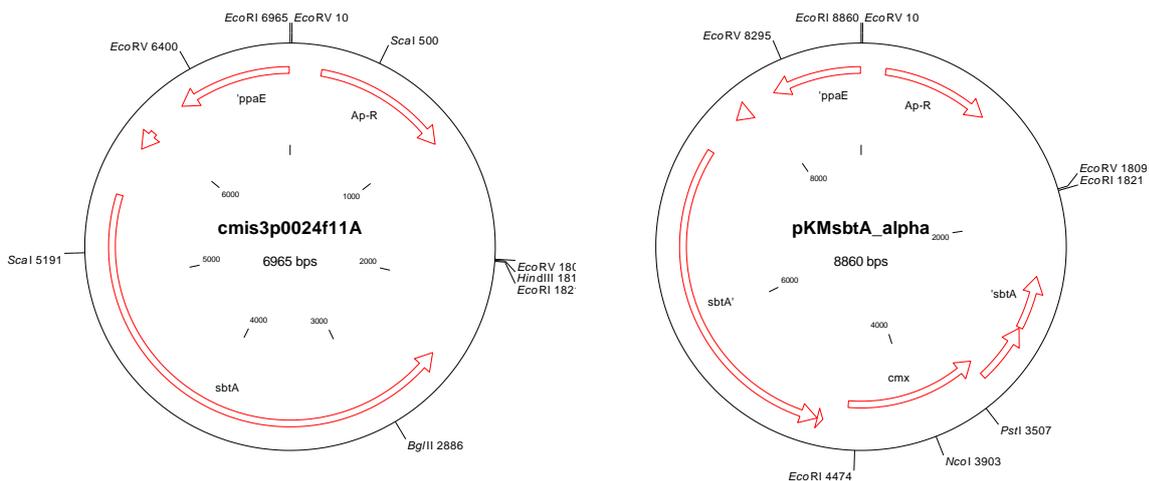
% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent
A	Adenin
Amp, Amp ^R	Ampicillin, ampicillinresistent
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylpyrophosphat
bidest.	Doppelt destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
ccc	supercoiled
cfu	<i>colony forming units</i>
Cm, Cm ^R	Chloramphenicol, Chloramphenicol-Resistenz
<i>Cmm382</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB382
<i>Cmn</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>
<i>Cms</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>Sepedonicus</i>
cv.	cultivar
<i>cmx</i>	Chloramphenicol-Exporter-Gen
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpi	<i>days post inoculation</i>
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiotreithol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-Aminoethylether)-tetraacetat
et al.	et alii (und andere)
ETI, ETS	<i>effector-triggered immunity, effector-triggered sensibility</i>
EtOH	Ethanol
Gn, Gn ^R	Gentamicin, gentamicinresistent
h	Stunde
HR	hypersensitive Reaktion
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
ISR	<i>induced systemic resistance</i>
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
Km, Km ^R	Kanamycin, kanamycinresistent
L	Liter
Lxx	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>Xyli</i>
M, mM	Mola, millimolar
M9	M9-Medium, Minimalmedium
mA	Milliampere
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization Time-Of-Flight-Mass-Spectrometry
MAMP	<i>microbe associated molecular pattern</i>

mcs	multiple cloning site
Millipore	entionisiertes Wasser aus der Millipore-Anlage
min	Minute
n	Replikatzahl
Neo, Neo ^R	Neomycin, Neomycinresistent
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
NCPPB	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria
oc	open circle
oD	optische Dichte
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
p	Wert der Fehlerwahrscheinlichkeit, t-Test Statistik
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMF	Peptidmassenfingerprint
PR	<i>pathogen related</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PS	Puffersaline
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
Pu	Purinbase
Py	Pyrimidinbase
R-Gen	Resistenz-Gen
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAR	<i>systemic acquired response</i>
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
SSC	Sodium-Saline-Citrat
Strep, Strep ^R	Streptomycin, streptomycinresistent
subsp.	Subspezies
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
Tat	<i>twin-arginine translocation</i>
TBY	Trypton-Broth-Yeast
TEMED	Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)Aminoethan
T3SS	TypIII-Sekretionssystem
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
ü/N	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
Vol.	Volumen
WI	Welkeindex
Xcv	<i>Xanthomonas campestris pv. vesicatoria</i>

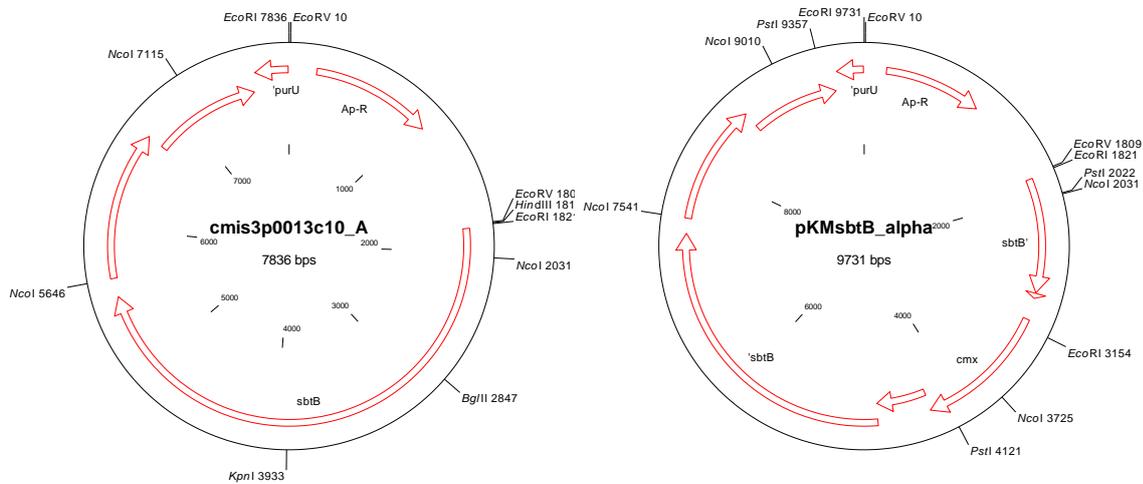
Plasmidkarten



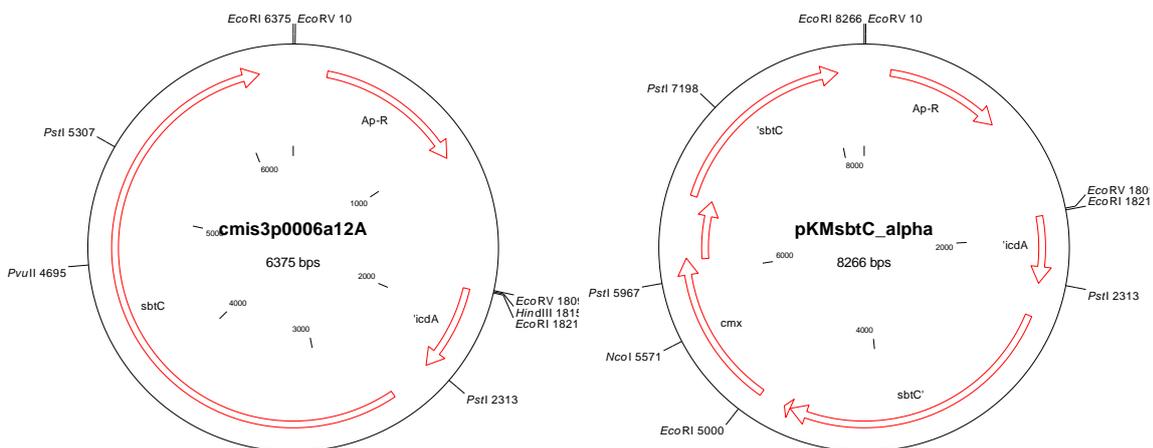
Physikalische Karte von pEC70, das eine *cmx*-Kassette enthält. Bei Restriktion des Plasmids mit *BsaAI* und *KpnI* entsteht u. a. ein 1,9 kb Fragment mit *blunt-ends*, das die *cmx*-Kassette trägt.



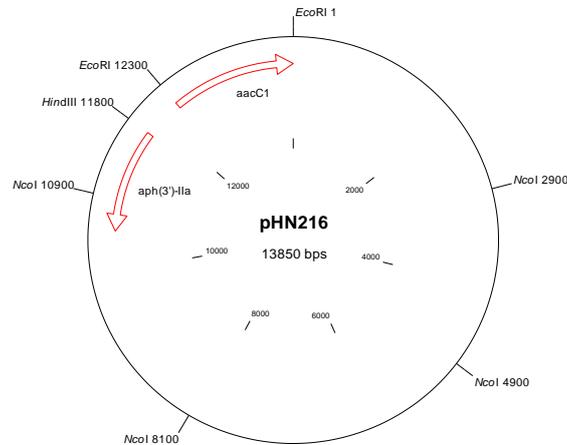
Physikalische Karten des Plasmids cmis3p0024f11A und des Mutageneseplasmids pKMsbta α (*sbtA*: Subtilisin- ähnliche Serinprotease, *cmx*: Chloramphenicol-Resistenzgen, *Ap*: Ampicillin-Resistenzgen).



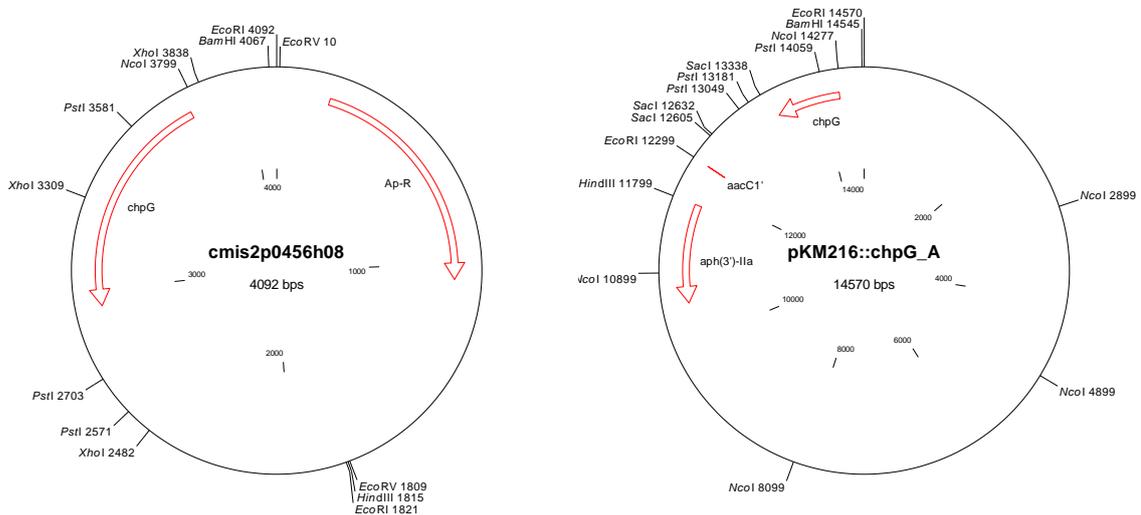
Physikalische Karten des Plasmids **cmis3p0013c10A** und des Mutageneseplasmids **pKMsbtB β** (*sbtB*: Subtilisin- ähnliche Serinprotease, *cmx*: Chloramphenicol-Resistenzgen, *Ap*: Ampicillin-Resistenzgen).



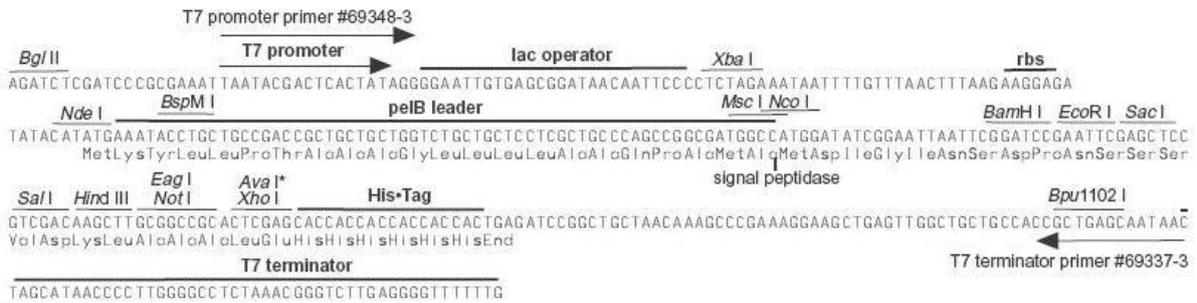
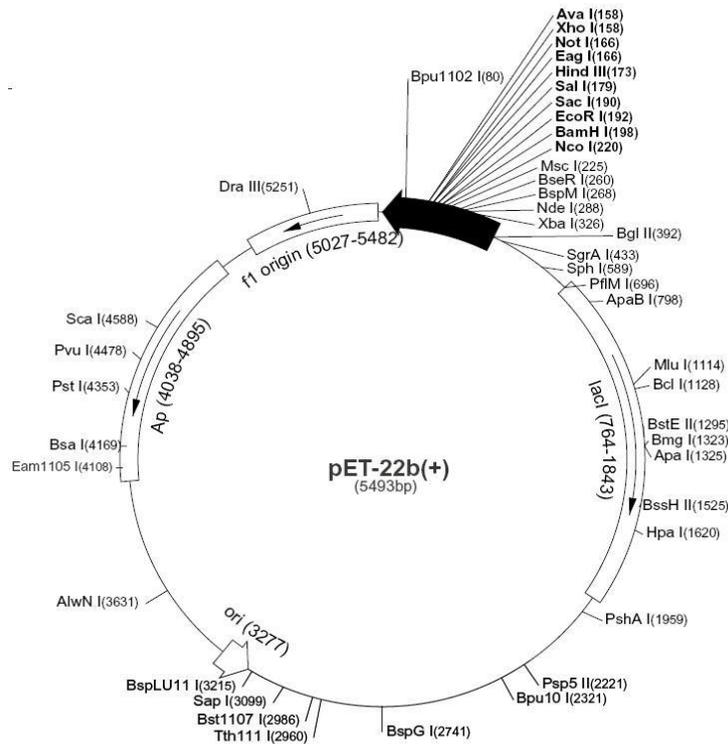
Physikalische Karte des Plasmids **cmis3p0006a12A** und des Mutageneseplasmids **pKMsbtC α** (*sbtC*: Subtilisin- ähnliche Serinprotease, *cmx*: Chloramphenicol-Resistenzgen, *Ap*: Ampicillin-Resistenzgen).



Physikalische Karte des *Clavibacter*-Shuttlevektors pHN216 (Replikon von pCM2, Rep./Stab.:Replikations-/Stabilitätsregion, *aacC1*: Gentamicin-Resistenzgen, *aph(3)IIA*: Neomycin-Resistenzgen).

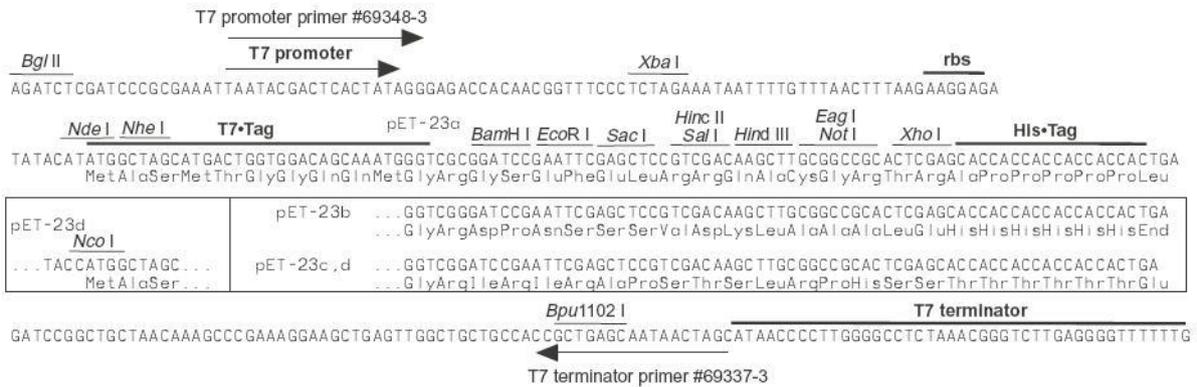
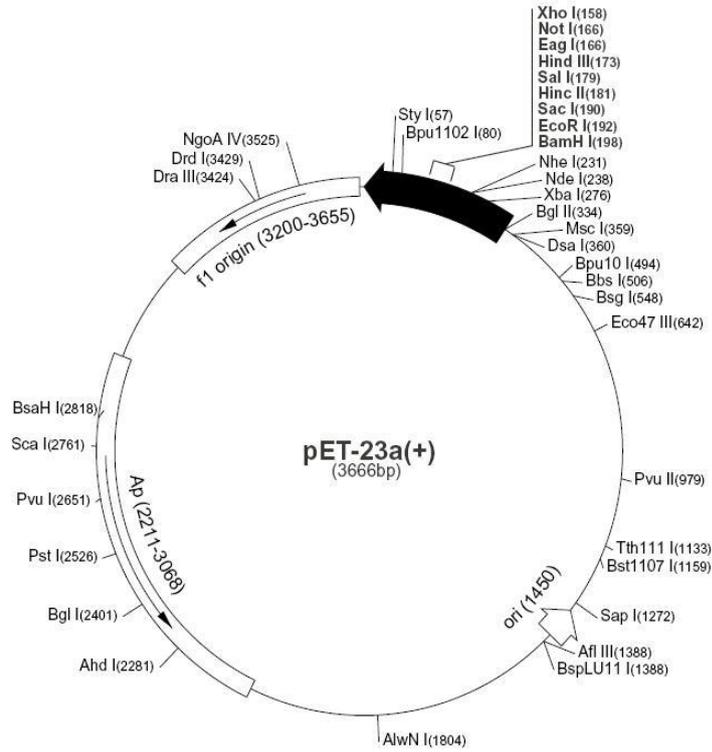


Physikalische Karte des Plasmids cmis2p0456h08 und des Komplementationsplasmids pIGchpGβ-pKM216chpG (*chpG*: Serinprotease, Replikon von pCM2, *aacC1*: Gentamicin-Resistenzgen, *aph(3)IIA*: Neomycin-Resistenzgen).



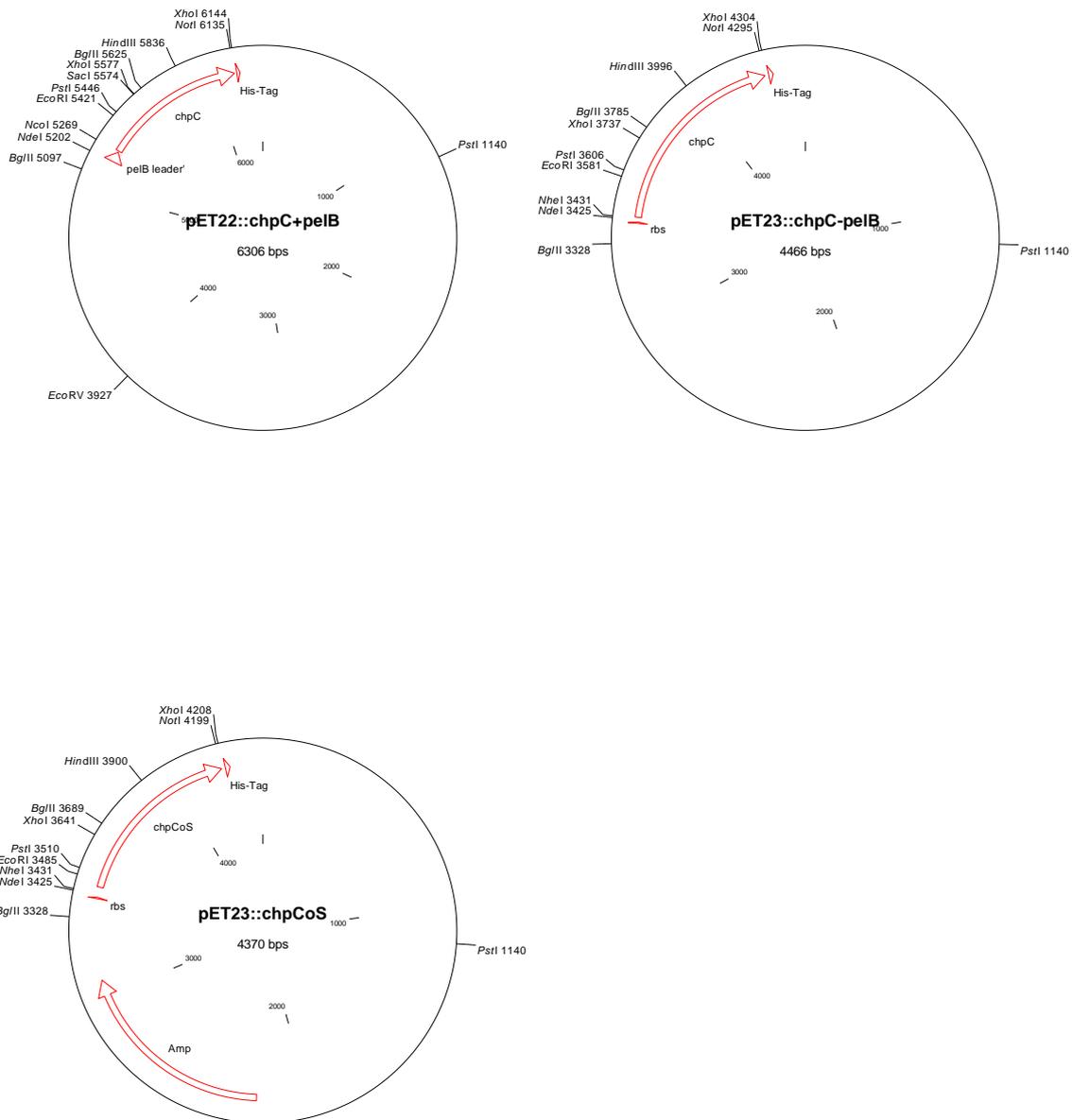
pET-22b(+) cloning/expression region

Physikalische Karte des *E. coli*-Expressionsvektors pET22b(+) und der Klonierungsregion (Firma. NOVAGEN) (T7 Promotor und His-Tag, *Amp*: β -Laktamase-Gen).

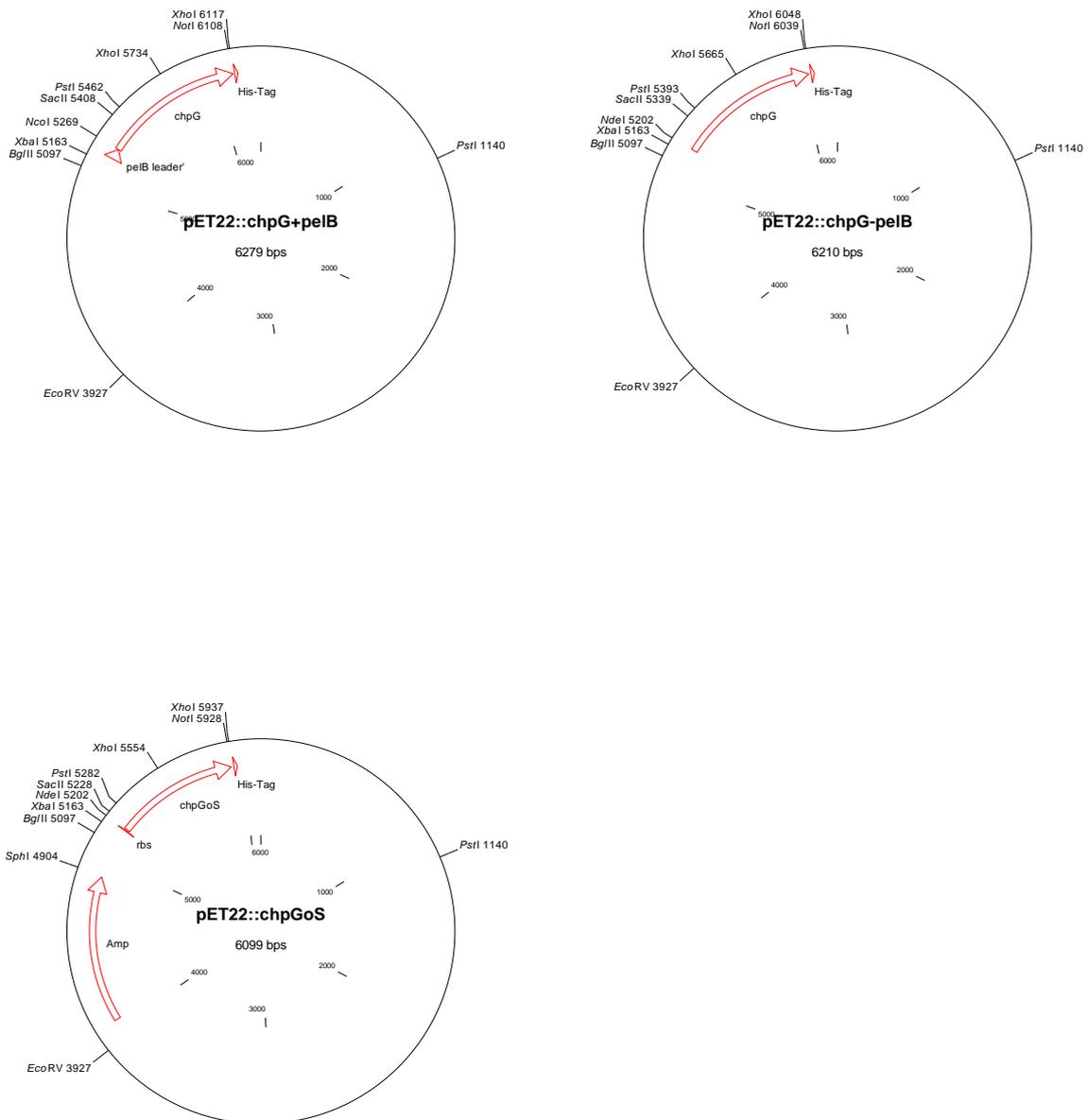


pET-23a-d(+) cloning/expression region

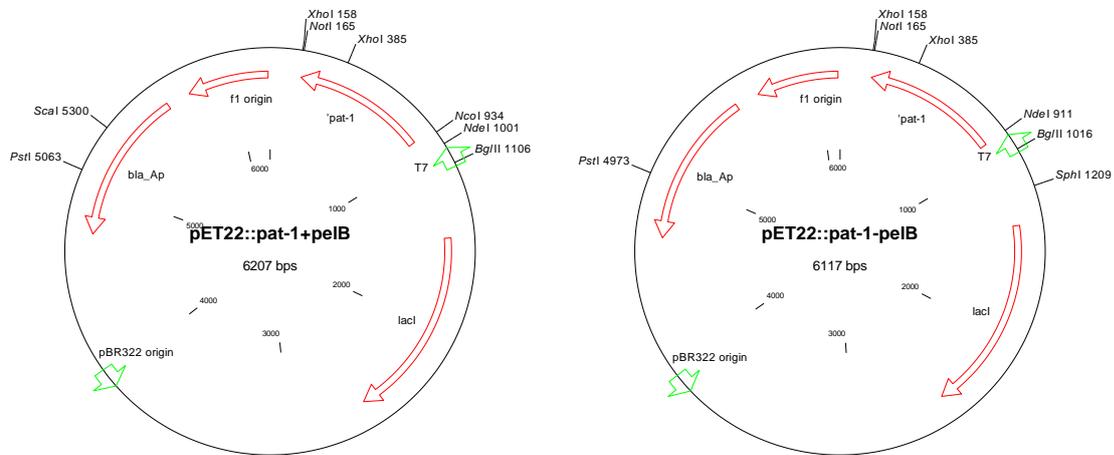
Physikalische Karte des *E. coli*-Expressionsvektors pET23b(+) und der Klonierungsregion (Firma NOVAGEN) (T7 Promotor und His-Tag, Amp: β-Laktamase-Gen).



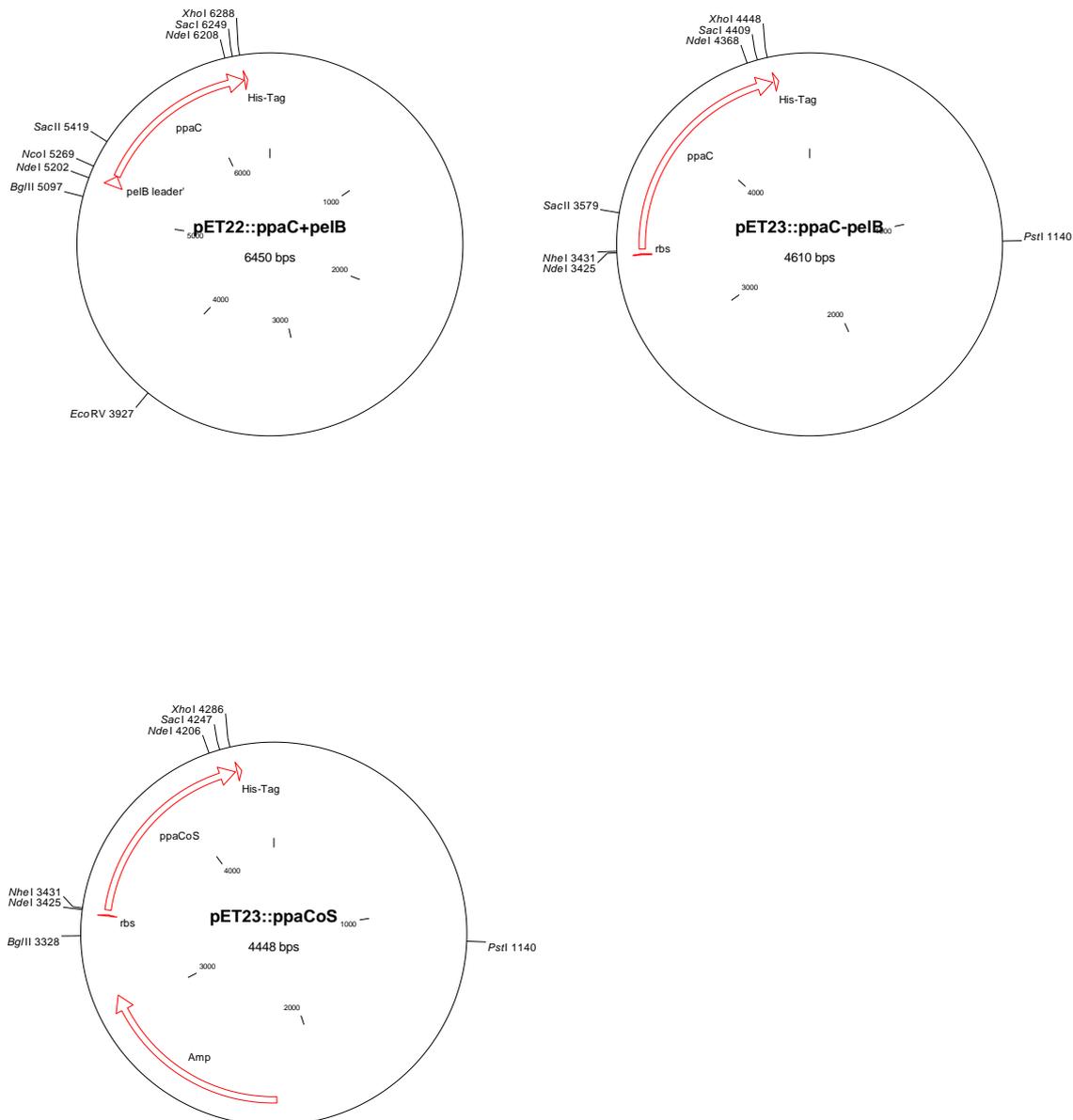
Plasmidkarten der Expressionsplasmide *pchpC+pelB* (886 bp *NcoI/NotI* PCR-Produkt von *chpC* in pET22b(+)), *pchpC-pelB* (883 bp *NheI/NotI* PCR-Produkt von *chpC* in pET23b(+)) und *pchpCoS* (787 bp *NheI/NotI* PCR-Produkt von *chpC* in pET23b(+)). rbs: Ribosomen-Bindestelle, His-Tag: 6-fach Histidin-Rest, *Amp*: β -Laktamase-Gen.



Plasmidkarten der Expressionsplasmide *pchpG+pelB* (840 bp *Nco*I/*Not*I PCR-Produkt von *chpG* in pET22b(+)), *pchpG-pelB* (837 bp *Nde*I/*Not*I PCR-Produkt von *chpG* in pET22b(+)) und *pchpGoS* (749 bp *Nde*I/*Not*I PCR-Produkt von *chpG* in pET22b(+)). rbs: Ribosomen-Bindestelle, His-Tag: 6-fach Histidin-Rest, *Amp*: β -Laktamase-Gen.



Plasmidkarten der Expressionsplasmide *ppat-1+pelB* (767 bp *NdeI/NotI* PCR-Produkt von *pat-1* in pET22b(+)) und *ppat-1-pelB* (763 bp *BglII/NotI* PCR-Produkt von *pat-1* in pET22b(+)).
 rbs: Ribosomen-Bindestelle, His-Tag: 6-fach Histidin-Rest, *Amp*: β -Laktamase-Gen.



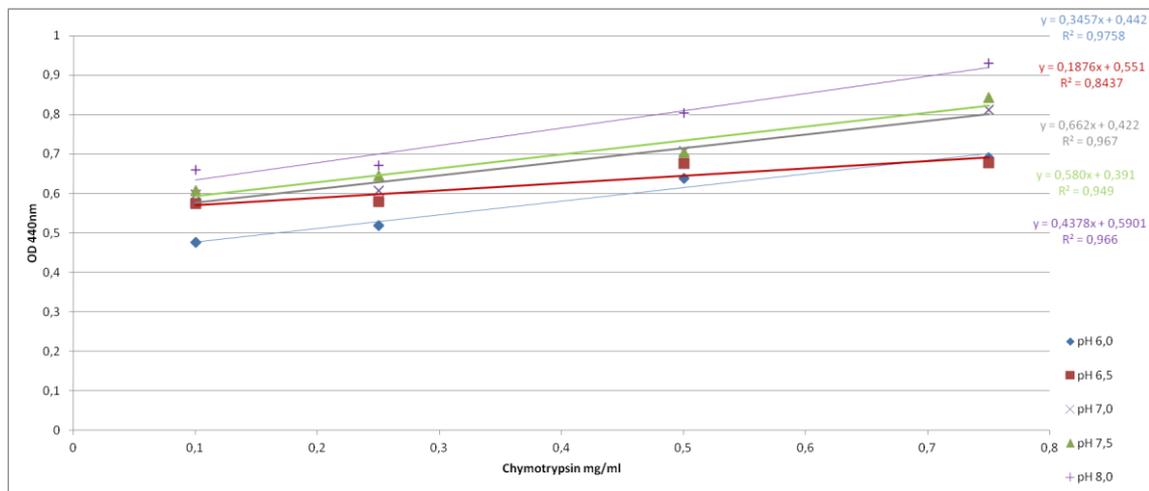
Plasmidkarten der Expressionsplasmide *ppaC+pelB* (1032 bp *NcoI/XhoI* PCR-Produkt von *ppaC* in pET22b(+)), *ppaC-pelB* (1029 bp *NheI/XhoI* PCR-Produkt von *ppaC* in pET23b(+)) und *ppaCoS* (1025 bp *NheI/XhoI* PCR-Produkt von *ppaC* in pET23b(+)). rbs: Ribosomen-Bindestelle, His-Tag: 6-fach Histidin-Rest, *Amp*: β -Laktamase-Gen.

Eichgeraden

Tabelle 31: Angegeben ist die photometrische Messung des freigesetzten pNA (ΔE) durch α -Chymotrypsin mit unterschiedlichen Enzymkonzentrationen (0,1 – 0,75mg/ml) unter verschiedenen Versuchsbedingungen (Substrat; Puffer; pH) nach 5 Stunden Inkubation bei 26° C.

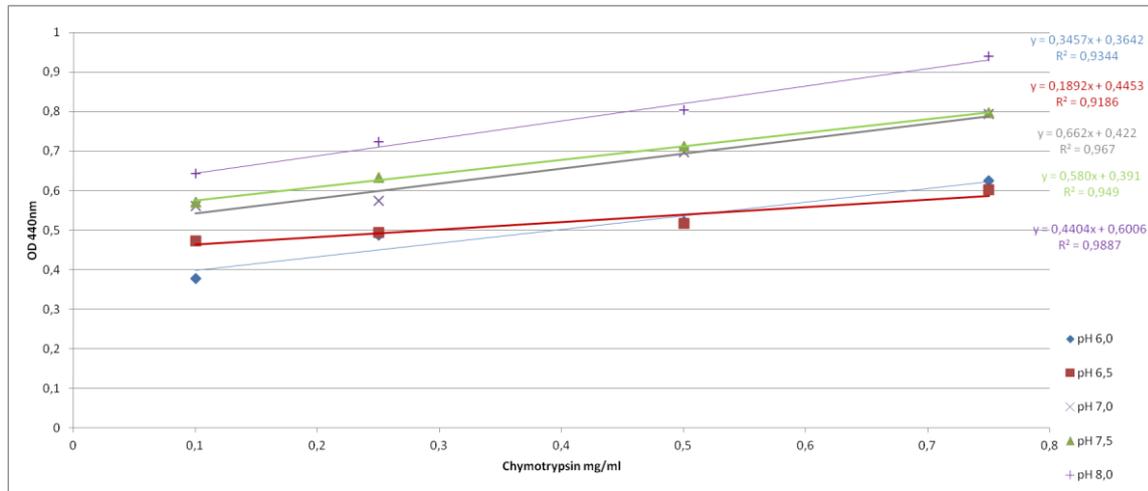
Azocasein 50 mM PBS

	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
Chymotrypsin [mg/ml]	OD _{440nm}				
0,1	0,476	0,573	0,596	0,607	0,659
0,25	0,518	0,578	0,607	0,644	0,67
0,5	0,637	0,676	0,706	0,703	0,803
0,75	0,69	0,677	0,811	0,843	0,929



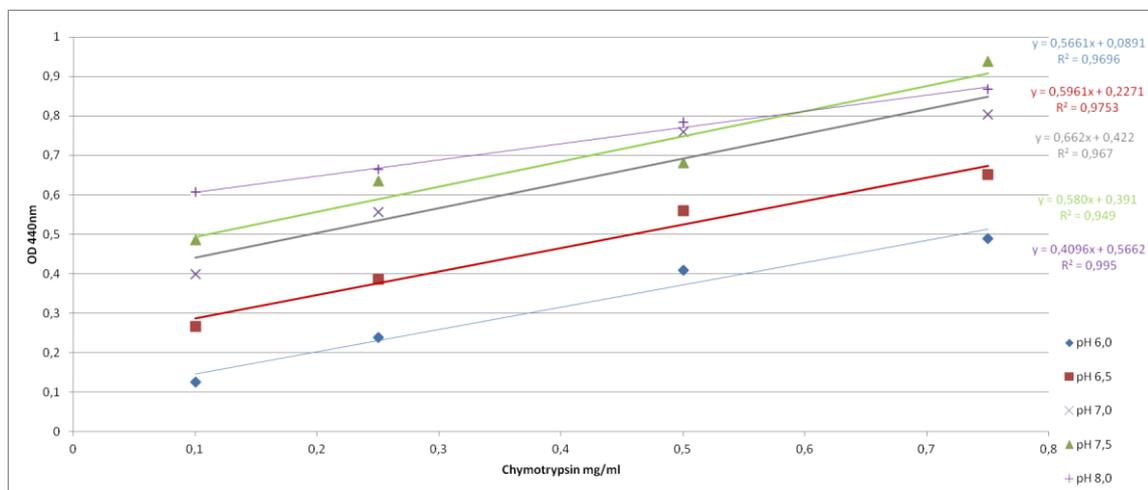
Azocasein 50 mM Tris

	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
Chymotrypsin [mg/ml]	OD _{440nm}				
0,1	0,377	0,472	0,561	0,57	0,642
0,25	0,487	0,494	0,574	0,633	0,723
0,5	0,521	0,517	0,696	0,712	0,803
0,75	0,625	0,601	0,793	0,796	0,939



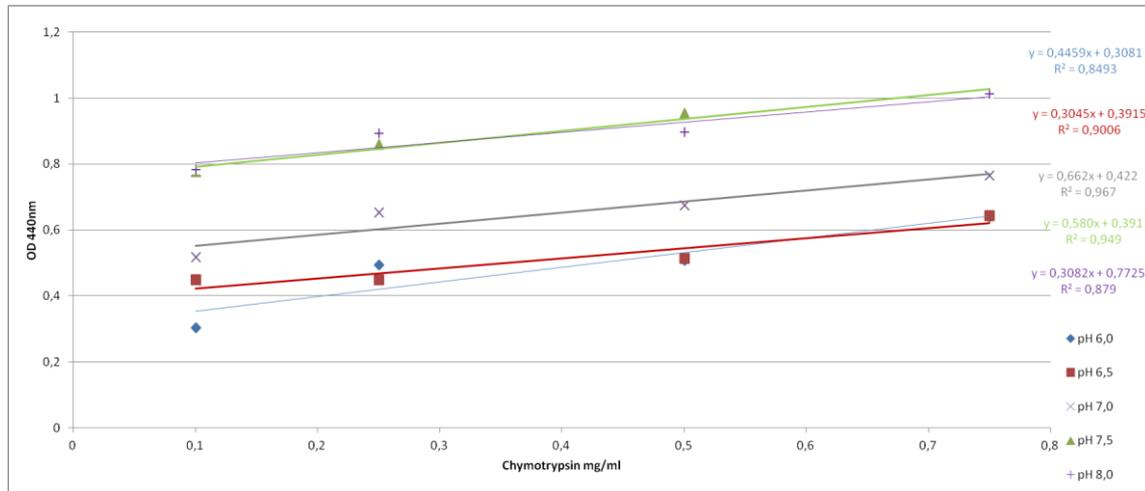
Azoalbumin 50 mM PBS

	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
Chymotrypsin [mg/ml]	OD _{440nm}				
0,1	0,125	0,266	0,399	0,485	0,606
0,25	0,239	0,386	0,555	0,634	0,664
0,5	0,409	0,559	0,758	0,681	0,783
0,75	0,489	0,651	0,803	0,938	0,867



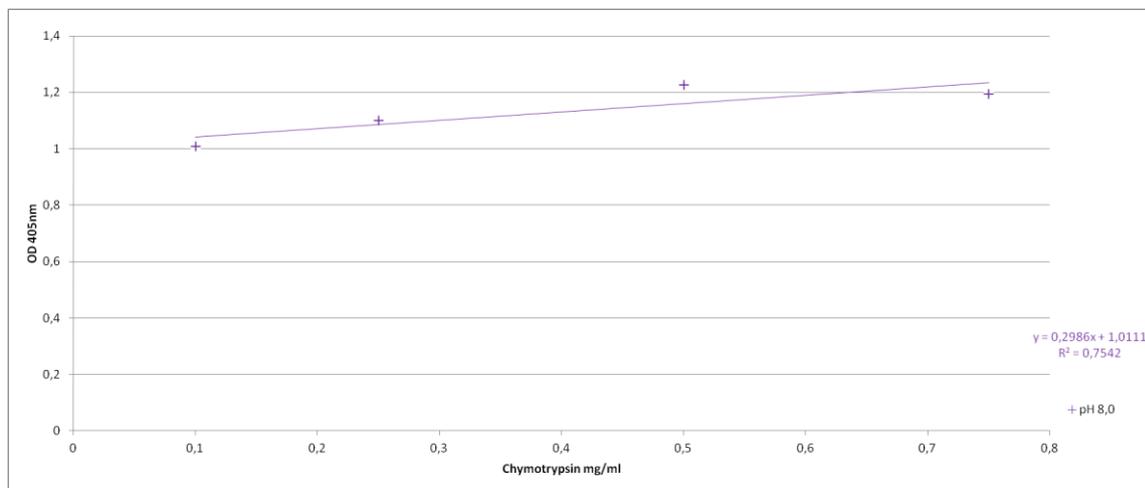
Azoalbumin 50 mM Tris

	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
Chymotrypsin [mg/ml]	OD _{440nm}				
0,1	0,304	0,448	0,518	0,776	0,782
0,25	0,495	0,449	0,653	0,859	0,892
0,5	0,507	0,513	0,675	0,954	0,897
0,75	0,64	0,643	0,765	1,014	1,012



S2288

	pH 8,0
Chymotrypsin [mg/mg]	OD _{405nm}
0,1	1,007
0,25	1,098
0,5	1,224
0,75	1,193



Daten zur Enzymaktivität

Tabelle 32: Angegeben ist der gemessene Substratumsatz (Δ OD) bei einer OD_{440nm} des **Cmm382-Sekretoms** (0,051 mg Protein /ml) und des Enzyms **α -Chymotrypsin** (0,011 mg Protein /ml). Gemessen wurde der Substratumsatz gegenüber dem chromogenen Substrat **Azocasein** (Konzentration 0,38 %; jeweils gelöst in 50 mM PBS- oder Tris-Reaktionspuffer) nach 48 h Inkubation bei 26 °C. Der angegebene pH-Wert bezieht sich auf den pH-Wert des Reaktionsansatzes (150 μ l Enzym + 250 μ l Substrat). Die Berechnung von Δ OD, die Stoffmenge an gebildetem Produkt je ml des Reaktionsansatzes (μ mol pNA/ml Lösung) und die katalytische Aktivität (mU/ml Lösung) kann dem Material und Methoden-Teil (s. S. x) entnommen werden. Dargestellt sind die Einzelwerte und die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. StabW= Standardabweichung.

pH	Probe 1 Δ OD	Probe 2 Δ OD	Probe 3 Δ OD	MW Δ OD	StabW Δ OD	Probe 1 μ M pNA	Probe 2 μ M pNA	Probe 3 μ M pNA
Cmm382-Sekretom: Azocasein in 50 mM PBS								
6,0	0,434	0,521	0,637	0,53067	0,10184	0,1240	0,1489	0,1820
6,5	0,477	0,427	0,549	0,48433	0,06133	0,1363	0,1220	0,1569
7,0	0,426	0,53	0,21	0,38867	0,16323	0,1217	0,1514	0,0600
7,5	0,441	0,381	0,376	0,39933	0,03617	0,1260	0,1089	0,1074
8,0	0,606	0,386	0,504	0,49867	0,11010	0,1731	0,1103	0,1440
α-Chymotrypsin: Azocasein in 50mM PBS								
6,0	0,754	0,41	0,477	0,54700	0,18237	0,2154	0,1171	0,1363
6,5	0,673	0,664	0,933	0,75667	0,15278	0,1923	0,1897	0,2666
7,0	0,819	0,772	1,086	0,89233	0,16936	0,2340	0,2206	0,3103
7,5	0,792	0,791	1,144	0,90900	0,20352	0,2263	0,2260	0,3269
8,0	0,828	0,849	1,218	0,96500	0,21936	0,2366	0,2426	0,3480

mU = nM pNA/ml Lösung pro Minute					
pH	Probe 1	Probe 2	Probe 3	MW	StabW
Cmm382-Sekretom: Azocasein in 50 mM PBS					
6,0	0,995062	1,1945	1,4605	1,216696	0,233506
6,5	1,093651	0,9790	1,2587	1,110464	0,140615
7,0	0,976720	1,2152	0,4815	0,891123	0,374258
7,5	1,011111	0,8735	0,8621	0,915579	0,082931
8,0	1,389418	0,8850	1,1556	1,143327	0,252427
α-Chymotrypsin: Azocasein in 50mM PBS					
6,0	1,728748	0,9400	1,0937	1,254145	0,418133
6,5	1,543034	1,5224	2,1392	1,734862	0,350279
7,0	1,877778	1,7700	2,4899	2,045914	0,388300
7,5	1,815873	1,8136	2,6229	2,084127	0,466617
8,0	1,898413	1,9466	2,7926	2,212522	0,502932

pH	Probe 1 Δ OD	Probe 2 Δ OD	Probe 3 Δ OD	MW Δ OD	StabW Δ OD	Probe 1 μ M pNA	Probe 2 μ M pNA	Probe 3 μ M pNA
Cmm382-Sekretom: Azoacasein in 50 mM Tris								
6,0	0,853	0,676	0,68	0,73633	0,10106	0,2437	0,1931	0,1943
6,5	0,517	0,492	0,553	0,52067	0,03066	0,1477	0,1406	0,1580
7,0	0,337	0,302	0,289	0,30933	0,02483	0,0963	0,0863	0,0826
7,5	0,285	0,292	0,345	0,30733	0,03281	0,0814	0,0834	0,0986
8,0	0,367	0,238	0,256	0,28700	0,06986	0,1049	0,0680	0,0731
α-Chymotrypsin: Azoacasein in 50 mM Tris								
6,0	0,363	0,457	0,504	0,44133	0,07179	0,1037	0,1306	0,1440
6,5	0,797	0,702	0,744	0,74767	0,04761	0,2277	0,2006	0,2126
7,0	0,759	0,734	0,725	0,73933	0,01762	0,2169	0,2097	0,2071
7,5	0,819	0,855	0,838	0,83733	0,01801	0,2340	0,2443	0,2394
8,0	0,934	0,775	0,837	0,84867	0,08014	0,2669	0,2214	0,2391

mU = nM pNA/ml Lösung pro min					
pH	Probe 1	Probe 2	Probe 3	MW	StabW
Cmm382-Sekretom: Azoacasein in 50 mM Tris					
6,0	1,955732	1,5499	1,5591	1,688242	0,231698
6,5	1,185362	1,1280	1,2679	1,193768	0,070307
7,0	0,772663	0,6924	0,6626	0,709230	0,056920
7,5	0,653439	0,6695	0,7910	0,704644	0,075220
8,0	0,841446	0,5457	0,5869	0,658025	0,160182
α-Chymotrypsin : Azocasein in 50 mM Tris					
6,0	0,832275	1,0478	1,1556	1,011875	0,164606
6,5	1,827337	1,6095	1,7058	1,714227	0,109150
7,0	1,740212	1,6829	1,6623	1,695121	0,040390
7,5	1,877778	1,9603	1,9213	1,919812	0,041291
8,0	2,141446	1,7769	1,9190	1,945797	0,183741

Tabelle 33: Angegeben ist der gemessene Substratumsatz (Δ OD) bei einer OD_{405nm} des **Cmm382-Sekretoms** (0,18 Protein mg/ml) und des Enzyms **α -Chymotrypsin** (0,04 mg Protein /ml). Gemessen wurde der Substratumsatz gegenüber dem chromogenen Substrat **S2288** (Konzentration 1,2 mM; in 100 mM Tris-Reaktionspuffer) nach 48 h Inkubation bei 26 °C. Der pH-Wert von 6,0 bezieht sich auf den pH-Wert des Reaktionsansatzes (100 μ l Enzym + 200 μ l Substrat). Die Berechnung von Δ OD, die Stoffmenge an gebildetem Produkt je ml des Reaktionsansatzes (μ mol pNA/ml) und die katalytische Aktivität (mU/ml Lösung) kann dem Material und Methoden-Teil (s. S. x) entnommen werden. Dargestellt sind die Einzelwerte und die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. StabW= Standardabweichung

t [h]	Probe 1 Δ OD	Probe 2 Δ OD	Probe 3 Δ OD	MW Δ OD	StabW Δ OD	Probe 1 μ M pNA	Probe 2 μ M pNA	Probe 3 μ M pNA
Cmm382-Sekretom: S2288 in 100 mM Tris								
0	0,068	0,014	0,029	0,03700	0,02787	0,0067	0,0014	0,0028
0,25	0,072	0,018	0,026	0,03867	0,02914	0,0071	0,0018	0,0025
0,5	0,065	0,015	0,026	0,03533	0,02627	0,0064	0,0015	0,0025
0,75	0,067	0,026	0,026	0,03967	0,02367	0,0066	0,0025	0,0025
1	0,073	0,019	0,030	0,04067	0,02854	0,0072	0,0019	0,0029
2	0,065	0,036	0,034	0,04500	0,01735	0,0064	0,0035	0,0033
3	0,080	0,021	0,039	0,04667	0,03024	0,0078	0,0021	0,0038
4	0,091	0,024	0,046	0,05367	0,03415	0,0089	0,0024	0,0045
5	0,099	0,053	0,054	0,06867	0,02627	0,0097	0,0052	0,0053
6	0,113	0,049	0,044	0,06867	0,03848	0,0111	0,0048	0,0043
7	0,090	0,095	0,112	0,09900	0,01153	0,0088	0,0093	0,0110
8	0,106	0,123	0,267	0,16533	0,08846	0,0104	0,0121	0,0262
9	0,120	0,118	0,196	0,14467	0,04447	0,0118	0,0116	0,0192
10	0,112	0,138	0,198	0,14933	0,04411	0,0110	0,0135	0,0194
15	0,181	0,187	0,250	0,20600	0,03822	0,0177	0,0183	0,0245
20	0,273	0,253	0,307	0,27767	0,02730	0,0268	0,0248	0,0301
24	0,325	0,303	0,333	0,32033	0,01553	0,0319	0,0297	0,0326
30	0,378	0,378	0,399	0,38500	0,01212	0,0371	0,0371	0,0391
35	0,415	0,420	0,432	0,42233	0,00874	0,0407	0,0412	0,0424
40	0,465	0,436	0,458	0,45300	0,01513	0,0456	0,0427	0,0449
45	0,519	0,480	0,477	0,49200	0,02343	0,0509	0,0471	0,0468
48	0,545	0,537	0,489	0,52367	0,03029	0,0534	0,0526	0,0479
α-Chymotrypsin: S2288 in 100 mM Tris								
0	0,195	0,183	0,178	0,18533	0,00874	0,0191	0,0179	0,0175
0,25	0,765	0,717	0,725	0,73567	0,02572	0,0750	0,0703	0,0711
0,5	1,012	0,998	1,012	1,00733	0,00808	0,0992	0,0978	0,0992
0,75	1,119	1,1	1,073	1,09733	0,02312	0,1097	0,1078	0,1052
1	1,152	1,106	1,086	1,11467	0,03384	0,1129	0,1084	0,1065
2	1,14	1,124	1,104	1,12267	0,01804	0,1118	0,1102	0,1082
3	1,123	1,123	1,097	1,11433	0,01501	0,1101	0,1101	0,1075
4	1,146	1,13	1,033	1,10300	0,06115	0,1124	0,1108	0,1013
5	1,135	1,123	1,095	1,11767	0,02053	0,1113	0,1101	0,1074
6	1,098	1,108	1,168	1,12467	0,03786	0,1076	0,1086	0,1145
7	1,116	1,06	0,96	1,04533	0,07903	0,1094	0,1039	0,0941
8	1,081	1,069	1,028	1,05933	0,02779	0,1060	0,1048	0,1008
9	1,09	1,09	1,015	1,06500	0,04330	0,1069	0,1069	0,0995
10	1,122	1,086	1,058	1,08867	0,03208	0,1100	0,1065	0,1037
15	1,076	1,043	1,019	1,04600	0,02862	0,1055	0,1023	0,0999
20	0,938	1,017	0,93	0,96167	0,04809	0,0920	0,0997	0,0912
24	1,025	0,989	0,937	0,98367	0,04424	0,1005	0,0970	0,0919
30	1,082	0,977	0,983	1,01400	0,05897	0,1061	0,0958	0,0964
35	1,045	0,999	0,967	1,00367	0,03921	0,1025	0,0979	0,0948

40	0,984	0,938	0,95	0,95733	0,02386	0,0965	0,0920	0,0931
45	0,967	0,907	0,879	0,91767	0,04496	0,0948	0,0889	0,0862
48	0,937	0,878	0,878	0,89767	0,03406	0,0919	0,0861	0,0861

mU = nM pNA/ml Lösung pro min					
t [h]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	MW	StabW
Cmm382-Sekretom: S2288 in 100 mM Tris					
0	0,011574	0,0024	0,0049	0,006298	0,004744
0,25	0,012255	0,0031	0,0044	0,006581	0,004960
0,5	0,011063	0,0026	0,0044	0,006014	0,004472
0,75	0,011404	0,0044	0,0044	0,006752	0,004029
1	0,012425	0,0032	0,0051	0,006922	0,004857
2	0,011063	0,0061	0,0058	0,007659	0,002953
3	0,013617	0,0036	0,0066	0,007943	0,005147
4	0,015489	0,0041	0,0078	0,009134	0,005813
5	0,016850	0,0090	0,0092	0,011688	0,004472
6	0,019233	0,0083	0,0075	0,011688	0,006549
7	0,015319	0,0162	0,0191	0,016850	0,001963
8	0,018042	0,0209	0,0454	0,028141	0,015056
9	0,020425	0,0201	0,0334	0,024623	0,007569
10	0,019063	0,0235	0,0337	0,025418	0,007507
15	0,030807	0,0318	0,0426	0,035063	0,006506
20	0,046467	0,0431	0,0523	0,047261	0,004647
24	0,055317	0,0516	0,0567	0,054523	0,002644
30	0,064338	0,0643	0,0679	0,065530	0,002064
35	0,070636	0,0715	0,0735	0,071884	0,001487
40	0,079146	0,0742	0,0780	0,077104	0,002576
45	0,088337	0,0817	0,0812	0,083742	0,003988
48	0,092763	0,0914	0,0832	0,089132	0,005155
α-Chymotrypsin: S2288 in 100 mM Tris					
0	0,033190	0,0311	0,0303	0,031545	0,001487
0,25	0,130208	0,1220	0,1234	0,125216	0,004377
0,5	0,172249	0,1699	0,1722	0,171455	0,001376
0,75	0,190462	0,1872	0,1826	0,186774	0,003934
1	0,196078	0,1882	0,1848	0,189724	0,005760
2	0,194036	0,1913	0,1879	0,191086	0,003070
3	0,191142	0,1911	0,1867	0,189667	0,002555
4	0,195057	0,1923	0,1758	0,187738	0,010408
5	0,193185	0,1911	0,1864	0,190235	0,003494
6	0,186887	0,1886	0,1988	0,191426	0,006444
7	0,189951	0,1804	0,1634	0,177923	0,013451
8	0,183994	0,1820	0,1750	0,180306	0,004730
9	0,185526	0,1855	0,1728	0,181270	0,007370
10	0,190972	0,1848	0,1801	0,185299	0,005461
15	0,183143	0,1775	0,1734	0,178036	0,004871

20	0,159654	0,1731	0,1583	0,163682	0,008185
24	0,174462	0,1683	0,1595	0,167427	0,007530
30	0,184164	0,1663	0,1673	0,172590	0,010036
35	0,177866	0,1700	0,1646	0,170831	0,006674
40	0,167484	0,1597	0,1617	0,162945	0,004061
45	0,164590	0,1544	0,1496	0,156193	0,007652
48	0,159484	0,1494	0,1494	0,152789	0,005798

Tabelle 34: Angegeben ist der gemessene Substratumsatz (Δ OD) bei einer OD_{405nm} des Sekretoms verschiedener *Clavibacter*-Stämme (0,18 mg Protein /ml) und α -Chymotrypsin (0,04 mg Protein/ml). Gemessen wurde der Substratumsatz gegenüber dem chromogenen Substrat **S2288** (Konzentration 1,2 mM; in 100 mM Tris) nach 48 h Inkubation bei 26 °C. Der pH-Wert von 6,0 bezieht sich auf den pH-Wert des Reaktionsansatzes (100 μ l Enzym + 200 μ l Substrat). Die Berechnung von Δ OD, die Stoffmenge an gebildetem Produkt je ml des Reaktionsansatzes (μ mol pNA/ml) und die katalytische Aktivität (mU/ml Lösung) kann dem Material und Methoden-Teil (s. S. x) entnommen werden. Dargestellt sind die Einzelwerte und die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. StabW= Standardabweichung.

Cmm-Sekretome und Chymotrypsin: S2288 in 100 mM Tris

Lösung	Probe 1 Δ OD	Probe 2 Δ OD	Probe 3 Δ OD	MW Δ OD	StabW Δ OD	Probe 1 μ M pNA	Probe 2 μ M pNA	Probe 3 μ M pNA
CMM101	0,452	0,642	0,636	0,576	0,108	0,0443	0,0629	0,0624
CMM101 β 30-18	0,03	0,227	0,182	0,146	0,103	0,0029	0,0223	0,0178
CMM101 <i>chpG</i> β	0,361	0,362	0,312	0,345	0,028	0,0354	0,0355	0,0306
CMM101 <i>chpC</i> β	0,561	0,560	0,549	0,556	0,006	0,0550	0,0549	0,0538
CMM101 <i>ppaC</i> β	0,308	0,296	0,356	0,320	0,031	0,0302	0,0290	0,0349
NCPPB382	0,545	0,537	0,489	0,523	0,030	0,0534	0,0526	0,0479
Chymotrypsin	0,937	0,878	0,878	0,897	0,034	0,0919	0,0861	0,0861

mU = nM pNA/Lösung pro min					
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	MW	StabW
CMM101	0,076934	0,1093	0,1083	0,098153	0,018383
CMM101 β 3018	0,005106	0,0386	0,0310	0,024907	0,017570
CMM101 <i>chpG</i> β	0,061445	0,0616	0,0531	0,058721	0,004865
CMM101 <i>chpC</i> β	0,095486	0,0953	0,0934	0,094749	0,001133
CMM101 <i>ppaC</i> β	0,052424	0,0504	0,0606	0,054466	0,005404
NCPPB382	0,092763	0,0914	0,0832	0,089132	0,005155
Chymotrypsin	0,159484	0,1494	0,1494	0,152789	0,005798

Tabelle 35: Angegeben ist der gemessene Substratumsatz (ΔOD) bei einer OD_{440nm} der löslichen Proteinfraktion der **rekombinanten Proteine ChpG** und **PpaC** und des Enzyms **α -Chymotrypsin** (0,011 mg Protein /ml). Gemessen wurde der Substratumsatz gegenüber dem chromogenen Substrat **Azoalbumin** (Konzentration 0,38 %; jeweils gelöst in 50mM PBS-Reaktionspuffer) nach 48 h Inkubation bei 26 °C. Der angegebene pH-Wert bezieht sich auf den pH-Wert des Reaktionsansatzes (150 μ l Enzym + 250 μ l Substrat). Die Berechnung von ΔOD , die Stoffmenge an gebildetem Produkt je ml des Reaktionsansatzes (μ mol pNA/ml) und die katalytische Aktivität (mU/ml Lösung) kann dem Material und Methoden-Teil (s. S. x) entnommen werden. Dargestellt sind die Einzelwerte und die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Für die rekombinanten Proteine ChpC und Pat-1 konnte unter diesen Versuchsbedingungen keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. StabW= Standardabweichung

pH	Probe 1 ΔOD	Probe 2 ΔOD	Probe 3 ΔOD	MW ΔOD	StabW ΔOD	Probe 1 μ M pNA	Probe 2 μ M pNA	Probe3 μ M pNA
ChpG: Azoalbumin in 50 mM PBS; 7,03 mg Protein/ml								
6,0	0,006	0,001	0,004	0,00367	0,00252	0,0017	0,0003	0,0011
6,5	0,018	0,019	0	0,01233	0,01069	0,0051	0,0054	0,0000
7,0	0	0	0,019	0,00633	0,01097	0,0000	0,0000	0,0054
7,5	0,124	0,125	0,111	0,12000	0,00781	0,0354	0,0357	0,0317
8,0	0	0	0,012	0,00400	0,00693	0,0000	0,0000	0,0034
PpaC: Azoalbumin in 50 mM PBS; 7,45 mg Protein/ml								
6,0	0,002	0,009	0	0,00367	0,00473	0,0000	0,0000	0,0009
6,5	0,004	0,001	0	0,00167	0,00208	0,0000	0,0006	0,0009
7,0	0,006	0	0,001	0,00233	0,00321	0,0011	0,0006	0,0000
7,5	0,224	0,199	0,174	0,19900	0,02500	0,0006	0,0003	0,0000
8,0	0	0,036	0,016	0,01733	0,01804	0,1074	0,0631	0,0586
Chymotrypsin: Azoalbumin in 50 mM PBS, 0,011 mg Protein/ml								
6,0	0,514	0,516	0,522	0,51733	0,00416	0,1469	0,1474	0,1491
6,5	0,638	0,691	0,603	0,64400	0,04431	0,1823	0,1974	0,1723
7,0	0,69	0,83	0,866	0,79533	0,09298	0,1971	0,2371	0,2474
7,5	0,959	0,924	0,974	0,95233	0,02566	0,2740	0,2640	0,2783
8,0	1,082	1,04	1,027	1,04967	0,02875	0,3091	0,2971	0,2934

mU = nM pNA/Lösung pro min					
pH	Probe 1	Probe 2	Probe 3	MW	StabW
ChpG: Azoalbumin in 50 mM PBS; 7,03 mg Protein/ml					
6,0	0,013757	0,0023	0,0092	0,008407	0,005770
6,5	0,041270	0,0436	0,0000	0,028277	0,024516
7,0	0,000000	0,0000	0,0436	0,014521	0,025151
7,5	0,284303	0,2866	0,2545	0,275132	0,017907
8,0	0,000000	0,0000	0,0275	0,009171	0,015885
PpaC: Azoalbumin in 50 mM PBS; 7,45 mg Protein/ml					
6,0	0,004586	0,0206	0,0000	0,008407	0,010835
6,5	0,009171	0,0023	0,0000	0,003821	0,004773
7,0	0,013757	0,0000	0,0023	0,005350	0,007370
7,5	0,513580	0,4563	0,3989	0,456261	0,057319
8,0	0,000000	0,0825	0,0367	0,039741	0,041355
Chymotrypsin: Azoalbumin in 50 mM PBS, 0,011 mg Protein/ml					
6,0	1,178483	1,1831	1,1968	1,186126	0,009546
6,5	1,462787	1,5843	1,3825	1,476543	0,101583
7,0	1,582011	1,9030	1,9855	1,823516	0,213182
7,5	2,198765	2,1185	2,2332	2,183480	0,058828
8,0	2,480776	2,3845	2,3547	2,406643	0,065908

Tabelle 36: Angegeben ist der gemessene Substratumsatz (ΔOD) bei einer OD_{440nm} der löslichen Proteinfraktion der **rekombinanten Proteine ChpC** und **Pat-1** und des Enzyms **α -Chymotrypsin** (0,011 mg Protein/ml). Gemessen wurde der Substratumsatz gegenüber dem chromogenen Substrat **Azoalbumin** (Konzentration 0,38 %; jeweils gelöst in 100 mM PBS-Reaktionspuffer) nach 48 h Inkubation bei 26 °C. Der angegebene pH-Wert bezieht sich auf den pH-Wert des Reaktionsansatzes (150 μ l Enzym + 250 μ l Substrat). Die Berechnung von ΔOD , die Stoffmenge an gebildetem Produkt je ml des Reaktionsansatzes (μ mol pNA/ml) und die katalytische Aktivität (mU/ml Lösung) kann dem Material und Methoden-Teil (s. S. x) entnommen werden. Dargestellt sind die Einzelwerte und die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Für die rekombinanten Proteine ChpG und PpaC konnte unter diesen Versuchsbedingungen keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. StabW= Standardabweichung

pH	Probe 1 ΔOD	Probe 2 ΔOD	Probe 3 ΔOD	MW ΔOD	StabW ΔOD	Probe 1 μM pNA	Probe 2 μM pNA	Probe 3 μM pNA
ChpC: Azoalbumin in 100 mM PBS, 7,13 mg Protein/ml								
6,0	0,007	0,003	0,007	0,00567	0,00231	0,0020	0,0009	0,0020
6,5	0,004	0	0	0,00133	0,00231	0,0011	0,0000	0,0000
7,0	0,12			0,12000		0,0343	0,0000	0,0000
7,5	0	0	0	0,00000	0,00000	0,0000	0,0000	0,0000
8,0	0	0	0	0,00000	0,00000	0,0000	0,0000	0,0000
Pat-1: Azoalbumin in 100 mM PBS, 7,4 mg Protein/ml								
6,0	0	0	0,008	0,00267	0,00462	0,0000	0,0000	0,0023
6,5	0,088	0,014	0,008	0,03667	0,04456	0,0251	0,0040	0,0023
7,0	0,027	0,036	0	0,02100	0,01873	0,0077	0,0103	0,0000
7,5	0,173	0,181	0,231	0,19500	0,03143	0,0494	0,0517	0,0660
8,0	0,02	0,035	0,016	0,02367	0,01002	0,0057	0,0100	0,0046
Chymotrypsin: Azoalbumin in 100 mM PBS, 0,011 mg Protein/ml								
6,0	0,342	0,577	0,435	0,45133	0,11835	0,0977	0,1649	0,1243
6,5	0,61	0,649	0,698	0,65233	0,04409	0,1743	0,1854	0,1994
7,0	0,756	0,71	0,687	0,71767	0,03513	0,2160	0,2029	0,1963
7,5	0,773	0,932	0,998	0,90100	0,11566	0,2209	0,2663	0,2851
8,0	1,163	1,064	0,985	1,07067	0,08919	0,3323	0,3040	0,2814

mU = nM Substrat / min pro ml					
pH	Probe 1	Probe 2	Probe 3	MW	StabW
ChpC: Azoalbumin in 100 mM PBS; 7,13 mg Protein/ml					
6,0	0,016049	0,0069	0,0160	0,012992	0,005295
6,5	0,009171	0,0000	0,0000	0,003057	0,005295
7,0	0,275132			0,275132	
7,5	0,000000	0,0000	0,0000	0,000000	0,000000
8,0	0,000000	0,0000	0,0000	0,000000	0,000000
Pat-1: Azoalbumin in 100 mM PBS; 7,4 mg Protein/ml					
6,0	0,000000	0,0000	0,0183	0,006114	0,010590
6,5	0,201764	0,0321	0,0183	0,084068	0,102159
7,0	0,061905	0,0825	0,0000	0,048148	0,042955
7,5	0,396649	0,4150	0,5296	0,447090	0,072067
8,0	0,045855	0,0802	0,0367	0,054262	0,022966
Chymotrypsin: Azoalbumin in 100 mM PBS, 0,011 mg Protein/ml					
6,0	0,784127	1,3229	0,9974	1,034803	0,271345
6,5	1,398589	1,4880	1,6004	1,495650	0,101099
7,0	1,733333	1,6279	1,5751	1,645444	0,080552
7,5	1,772310	2,1369	2,2882	2,065785	0,265179
8,0	2,666490	2,4395	2,2584	2,454791	0,204485

Tabelle 37: Angegeben ist der gemessene Substratumsatz (ΔOD) bei einer OD_{440nm} der löslichen Proteinfraktion der **rekombinanten Proteine PpaC** und des Enzyms **α -Chymotrypsin** (0,011 mg Protein/ml). Gemessen wurde der Substratumsatz gegenüber dem chromogenen Substrat **Azoalbumin** (Konzentration 0,38 %; jeweils gelöst in 50 mM Tris-Reaktionspuffer) nach 48 h Inkubation bei 26 °C. Der angegebene pH-Wert bezieht sich auf den pH-Wert des Reaktionsansatzes (150 μ l Enzym + 250 μ l Substrat). Die Berechnung von ΔOD , die Stoffmenge an gebildetem Produkt je ml des Reaktionsansatzes (μ mol pNA/ml) und die katalytische Aktivität (mU/ml Lösung) kann dem Material und Methoden-Teil (s. S. x) entnommen werden. Dargestellt sind die Einzelwerte und die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Für die rekombinanten Proteine ChpC, ChpG und Pat-1 konnte unter diesen Versuchsbedingungen keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. StabW= Standardabweichung

pH	Probe 1 ΔOD	Probe 2 ΔOD	Probe 3 ΔOD	MW ΔOD	StabW ΔOD	Probe 1 μ M pNA	Probe 2 μ M pNA	Probe 3 μ M pNA
PpaC: Azoalbumin in Tris 50 mM, 7,45 mg Protein /ml								
6,0	0	0	0,003	0,00100	0,00173	0,0000	0,0000	0,0009
6,5	0	0,002	0,003	0,00167	0,00153	0,0000	0,0006	0,0009
7,0	0,004	0,002	0	0,00200	0,00200	0,0011	0,0006	0,0000
7,5	0,002	0,001	0	0,00100	0,00100	0,0006	0,0003	0,0000
8,0	0,376	0,221	0,205	0,26733	0,09445	0,1074	0,0631	0,0586
Chymotrypsin: Azoalbumin in 50 mM Tris, 0,011 mg Protein/ml								
6,0	0,498	0,63	0,571	0,56633	0,06612	0,1423	0,1800	0,1631
6,5	0,906	0,718	0,819	0,81433	0,09409	0,2589	0,2051	0,2340
7,0	0,949	0,825	0,901	0,89167	0,06252	0,2711	0,2357	0,2574
7,5	1,026	0,809	0,944	0,92633	0,10957	0,2931	0,2311	0,2697
8,0	1,148	1,158	0,974	1,09333	0,10347	0,3280	0,3309	0,2783

mU = nM Substrat / min pro ml					
pH	Probe 1	Probe 2	Probe 3	MW	StabW
PpaC: Azoalbumin in Tris 50 mM, 7,45 mg Protein/ml					
6,0	0,000000	0,0000	0,0069	0,002293	0,003971
6,5	0,000000	0,0046	0,0069	0,003821	0,003502
7,0	0,009171	0,0046	0,0000	0,004586	0,004586
7,5	0,004586	0,0023	0,0000	0,002293	0,002293
8,0	0,862081	0,5067	0,4700	0,612934	0,216546
Chymotrypsin: Azoalbumin in 50 mM Tris, 0,011 mg Protein/ml					
pH	Probe 1	Probe 2	Probe 3	MW	StabW
6,0	1,141799	1,4444	1,3092	1,298471	0,151606
6,5	2,077249	1,6462	1,8778	1,867078	0,215719
7,0	2,175838	1,8915	2,0658	2,044386	0,143355
7,5	2,352381	1,8549	2,1644	2,123868	0,251227
8,0	2,632099	2,6550	2,2332	2,506761	0,237225

Immunpräzipitation

Tabelle 38: Eingesetzte Konzentration der aus den *inclusion bodies* gelösten und gereinigten Proteine zur Herstellung von Antikörpern. Die heterologe Expression der Proteine erfolgte in den *E. coli*-Stämmen BL21(DE3) bzw. BL21-CodonPlus(DE3).

rekombinantes Protein	Proteinkonzentration [mg/ml]
ChpG	1,50
ChpC	1,89
PpaC	2,72
Pat-1	1,79

Tabelle 39: Peptid-Dichte der von der Firma Pineda (Berlin) hergestellten Antikörper-Säulen zur Isolierung der *Clavibacter*-Proteine aus dem Sekretom.

Anti Protein Antikörper-Säule	Peptid-Dichte [mg/ml]
ChpG	1,8
ChpC	1,6
PpaC	2,1
Pat-1	1,9

Daten zum Pflanzentest mit den Subtilasen-Mutanten

Tabelle 40: Häufigkeit mit der während des Pflanzentests infizierte Pflanzen in die einzelnen Kategorien "tot", "++", "+", "(+)", "Welke" bzw. "keine Welke" eingestuft wurden. Die Kategorie "Welke" umfasst die Kategorien (+) bis tot. Für den hier verwendeten statistischen Test gilt: ist der berechnete Wert kleiner als 0,05, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Nullhypothese anzunehmen ist, kleiner als 5 %. Da die Standardabweichung (damit die Varianzen) zwischen Kontrolle und Teststamm zum Teil stark voneinander abweichen (zwei Stichproben, ungleiche Varianz; heteroskedastisch), wurde der t-Test mit ungleicher Varianz verwendet.

Stamm	Test	tot [%]	++ [%]	+ [%]	(+) [%]	Welke [%]	keine Welke [%]
Cmm382	1 (32 Pflanzen)	37,62	18,21	9,88	5,24	70,95	29,05
	2 (30 Pflanzen)	9,38	29,26	15,91	1,56	55,11	43,89
Mittelwert		23,5	23,74	12,9	3,4	63,54	36,47
Standardfehler		14,12	5,53	3,02	1,84	7,92	7,42

Stamm	Test	tot [%]	++ [%]	+ [%]	(+) [%]	Welke [%]	keine Welke [%]
CMM101	1 (32 Pflanzen)	14,17	16,07	24,44	2,46	57,14	42,86
	2 (31 Pflanzen)	4,38	10,14	30,41	1,15	46,08	53,92
Mittelwert		9,28	13,11	27,43	1,81	51,61	48,39
Standardfehler		4,90	2,97	2,99	0,66	5,53	5,53

Stamm	Test	tot [%]	++ [%]	+ [%]	(+) [%]	Welke [%]	keine Welke [%]
CMM101sbtAα	1 (32 Pflanzen)	8,37	20,54	22,54	3,91	55,36	44,64
	2 (31 Pflanzen)	0	5,18	33,76	4,95	43,89	56,11
Mittelwert		4,19	12,86	28,15	4,43	49,62	50,38
Standardfehler		4,19	7,68	5,91	0,52	5,74	5,74
t-Test		0,514	0,980	0,922	0,094	0,827	0,827

Stamm	Test	tot [%]	++ [%]	+ [%]	(+) [%]	Welke [%]	keine Welke [%]
CMM101sbtBα	1 (32 Pflanzen)	5,47	11,83	29,13	2,23	48,66	51,34
	2 (30 Pflanzen)	0	7,12	20,3	2,12	29,54	70,46
Mittelwert		2,74	9,48	24,72	2,18	39,1	60,9
Standardfehler		2,73	2,36	4,42	0,06	9,56	9,56
t-Test		0,363	0,44	0,66	0,63	0,375	0,37

Tabelle 41: Median, Mittelwert zum Gewicht der mit CMM101, CMM101sbtAα und CMM101sbtBα infizierten Pflanzen 28 Tage nach Infektion.

Stamm	Median	Mittelwert
CMM101	1,83	2,07
CMM101sbtAα	1,0	1,20
CMM101sbtBα	1,2	1,74

Tabelle 42: Titer der *Cmm*-Stämme in Tomatenpflanzen 28 Tage nach Wurzelinfektion. Titer in cfu/g Pflanzenhomogenat. StabW= Standardabweichung.

Stamm	Titer	Mittelwert	StabW
CMM101	8,05x10 ⁹	9,39x10 ⁹	4,06E+09
	4,50x10 ⁹		
	1,4x10 ¹⁰		
	1,1x10 ¹⁰		
CMM101sbtAα	6,9x10 ⁹	1,11x10 ¹⁰	6,96E+09
	1,8x10 ¹⁰		
	1,6x10 ¹⁰		
	3,6x10 ⁹		
CMM101sbtBα	3,1x10 ¹⁰	3,09x10 ¹⁰	1,66E+10
	3,4x10 ¹⁰		
	9,1x10 ⁹		
	4,95x10 ¹⁰		

Auslösung der HR auf *Mirabilis jalapa*

Tabelle 43: Eingesetzte Proteinkonzentration der heterolog exprimierten und nativ gereinigten und dialysierten Proteine (aus *ArcticExpress*). Proteinkonzentration wurde mittels Nanodrop ermittelt.

rekombinantes Protein	Proteinkonzentration [mg/ml]
ChpG	0,23
ChpC	0,246
PpaC	0,25
Pat-1	0,203
lösliche Proteinfraction	44,63
<i>inclusion bodies</i>	8,59

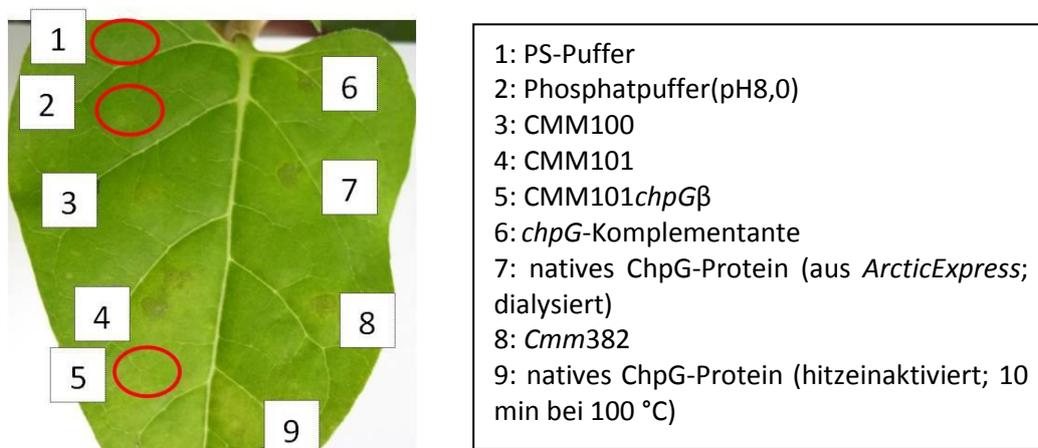


Abbildung 47: Blatt Blatt von *Mirabilis jalapa* drei Tage nach Infiltration mit verschiedenen *Cmm*-Bakterienstämmen, dem nativen, hitzeinaktivierten Protein ChpG und entsprechenden Kontrollen Der rote Kreis markiert die Infiltrationsstelle. n= 5.

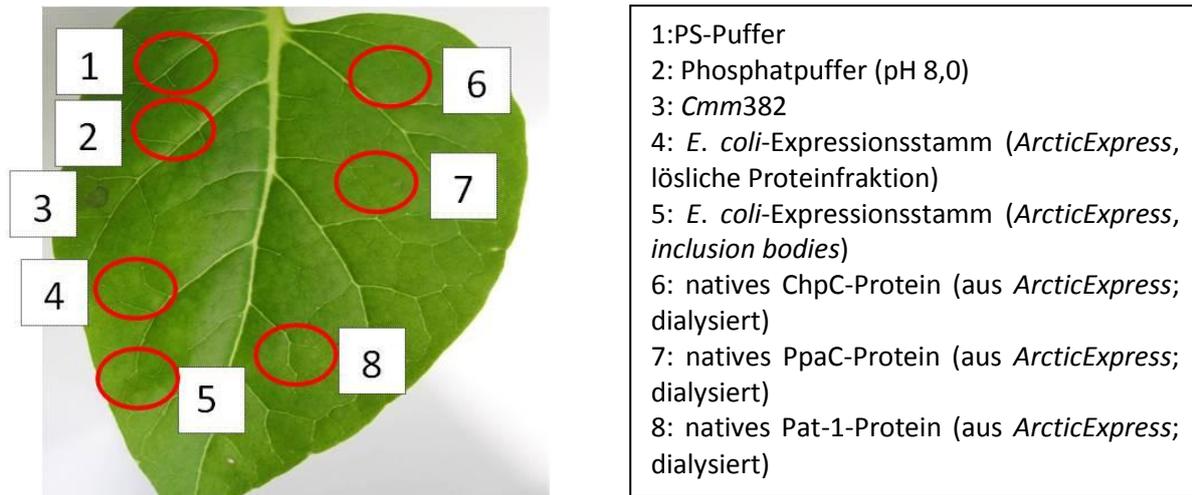


Abbildung 48: Blatt Blatt von *Mirabilis jalapa* drei Tage nach Infiltration mit verschiedenen *Cmm*-Bakterienstämmen, dem nativen Protein ChpC; PpaC und Pat-1 und entsprechenden Kontrollen. Der rote Kreis markiert die Infiltrationsstelle. n= 5.

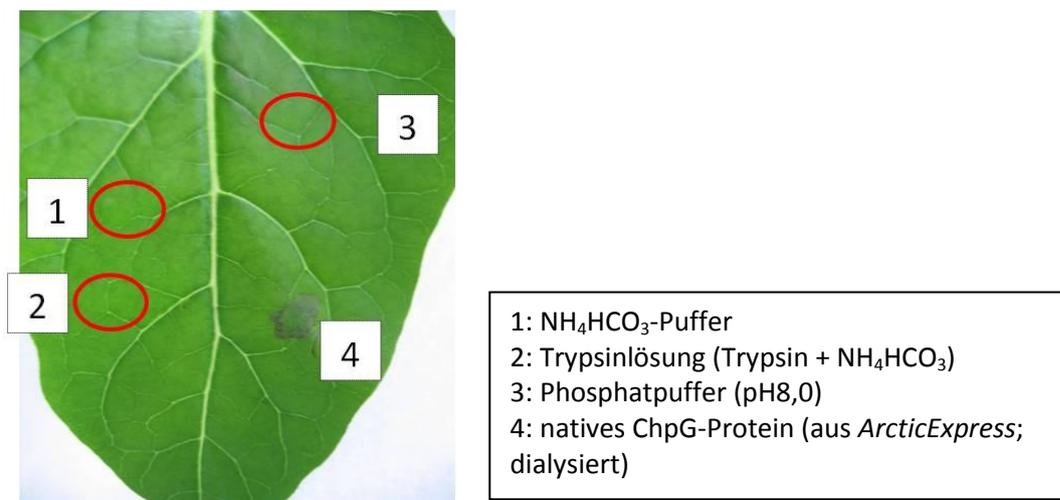
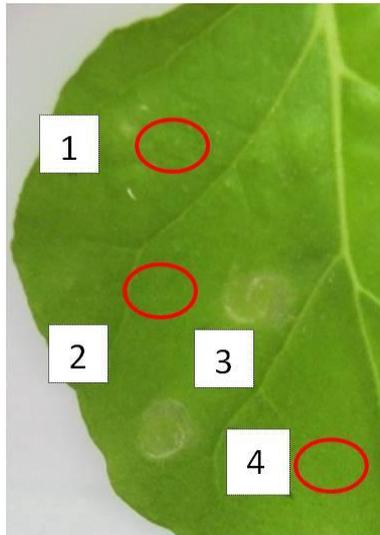


Abbildung 49: Blatt Blatt von *Mirabilis jalapa* drei Tage nach Infiltration mit dem nativen Protein ChpG, Trypsin und den für den tryptischen Verdau eingesetzten Puffern. Der rote Kreis markiert die Infiltrationsstelle. n= 5

Auslösung der HR auf *Nicotiana benthamiana*

- 1: *E. coli*-Expressionsstamm (*ArcticExpress*, lösliche Proteinfraction)
- 2: *E. coli*-Expressionsstamm (*ArcticExpress*, *inclusion bodies*)
- 3: natives ChpG-Protein (aus *ArcticExpress*; dialysiert)
- 4: Phosphatpuffer (pH 8,0)

Abbildung 50: : Blatt von *Nicotiana benthamiana* sechs Tage nach Infiltration mit dem nativen Protein ChpG, und den *E. coli*-Proteinen des Expressionsstammes. Der rote Kreis markiert die Infiltrationsstelle. n= 5

Proteinalignments

Multiples Alignment der Chp-Serinpeptidasefamilie.

Die Hintergrundfarbe der Aminosäuren zeigt an, ob die Aminosäuren an der jeweiligen Position zu 100% identisch (schwarz), zu 80% identisch (dunkelgrau) oder zu 60% identisch sind (hellgrau). Protein-Alignment der Familienmitglieder aus *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (ChpA - ChpG), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) und *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). Pseudogene sind unterstrichen.

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	100			
<u>ChpB</u>	:	---MPPTTSERKKPLMPKGS	DYP	SHRIPASDRMPQRRRQYNRF	RLFVLS	LLLSVTPAVTTAIP	-----	AQAVGSNRTSLPIVX	---	RIGTYVSF	: 84		
ChpS6	:	-----LLRTHHSLTSRS	---	ARLLIACA	AVTLTCLT	PLIVAPSS	-----	AQAVGAVRTSLPIV	---	AGTKLTF	: 57		
CMS1262	:	-----MRLPLHHP	PRRRL	LGLVTALAAA	LVLTGAAP	-----	ASAVSPLRLATPVM	---	AGSQIRN	: 55			
CMS2837	:	-----MIPARSK	--	RLALAMLLTAFV	TSPSVV	GGAASDA	-----	SAQISPLRLQRPVM	---	AGTKLRS	: 52		
CMS1260	:	-----MRRLPLL	TRASIGRVIDGLRRVLP	SQVLR	FALATLAGA	ALLPLGATP	-----	ASAVDAVRLQAPVM	---	AGSQIRN	: 69		
Pat-1	:	-----MQFMSRINRI	-----	LFVAVV	SLLSVL	GCCVAAAPA	-----	QAVDRIARVSLPVR	---	AGTHLI	: 51		
<u>ChpA</u>	:	-----MWRIDRP	-----	LFVAVIS	SVLSVL	LACGVAAAPA	-----	QAVDRVARNSLPVR	---	AGTHLI	: 48		
PhpA	:	-----VTFGRV	CGERASPACFVAIVRF	MSHISRS	---	LIVICVTIASAL	GCCVAAAPA	-----	QAVDRVARNSLPVR	---	AGTHLI	: 70	
CMS2989	:	-----MSTSVRI	PHKS	---	IFALLLAFATV	AGCCSVAAPA	-----	QAVDRIARNSLPVR	---	AGTHLI	: 52		
ChpS3	:	-----VRIPSKS	-----	ILTLVLA	FATILGCCS	IAAPARAPARPPPARAVDRLA	NSLPVV	---	AGTHLI	: 57			
PhpB	:	-----MNTSTNSHHPA	-----	IIKLVIA	VIVIGIC	LLDSAPA	-----	NAVDDAARTSLPVR	---	AGSELR	: 53		
CMS0981	:	---MRGATHDRDVARP	-PRAGAGSRWRAVR	GRASS	---	LIAVAV	---	VVIASLTVAAAPA	-----	RAVDFAARSETPIR	---	AGSVITF	: 71
CMS0980	:	MPALLPVLHRRRLSGPYPTNSPVTGSQRARRPRRSSGPT	RSPLLA	LAILVGLVVA	VAVSCLVPDAPA	-----	QAVDRWARNSLPVH	---	AGSALVI	: 85			
ChpF	:	-----VAVQASHAAQARHTRGVLRRQA	AILLLTVAVL	TGTLNYATPAQA	-----	VTIPSNPDRIREPVV	---	AGSKV	---	: 64			
ChpG	:	-----LPARHHTIQRK	---	RSIGAALLALPATLVLT	CMAGTPAYA	-----	NGL-SNPDRGNFP	---	AGSEV	---	: 56		
CMS2909	:	---MSPLSSRPRLRLHRRRHGHAGASTTSPRTTPHTRRWTRALVVLA	AVSALILSSP	VSAAN	-----	AAPPLNPDRIRLPIV	---	AGTKL	---	: 79			
ChpE	:	-----MKHFKILTSA	AVMGAI	ALALMAPSA	-----	ANARTSPESSVPVV	---	VCTEV	---	: 45			
<u>ChpD</u>	:	-----MLNPHLAAVA	AITCLCAVIL	PAAA	-----	ASAI DRQRIVLP	PIVXALALS	---	SYSS	---	: 47		
ChpC	:	-----MSKTHFR	---	GIYFIVI	PLALGLMAAS	STVWS	-----	AFATEGARQTRPVIA	---	GSQI	---	: 48	
pCSL0117	:	-----MTKTCSR	---	RLYFLI	IFITLGLAAV	STGSS	-----	AFATEGARQTRPVVA	---	GSQI	---	: 48	
Lxx_Pat1	:	-----MFSFRWRVLR	---	RASIAGL	VIALVAGL	VATGTP	-----	ASAVQPIRSGPMTVG	---	CTEI	---	: 52	
CMS2991	:	-----MSPTFVSSISVALRGYARRRP	FRTWRHRAA	VVLVTAAL	VASATP	-----	ASAVDYERTQY	---	PVVG	---	CTAI	---	: 63

```

*          120          *          140          *          160          *          180          *          200
ChpB      : TH-PTPPGTYSADVRCCTAGAVLKSTTLYSR LP--FAAAKRYIPTAK-HCGDLNAD-VYAGDTN-----VCKVIWQSPDR : 154
ChpS6     : SE-PSPPGTYTADSYCTAGAVLKSTTLYSR LP--FSAATRYVLTAK-HCASLGAT-VRVGEDN-----VCRVTWTSPDR : 127
CMS1262   : A-----SGYKCTAGAVLKYDRWTTYFNS--WEGATRYVVTAA-HCGDLNEN-VTLGSSV-----PCKVIWRDELH : 116
CMS2837   : A-----SGANCTAGAVMKYSGIGTALSG--FAAAKRYVLTSE-HCGKKGK-FTLGSTV-----TCTVTWVSPDT : 113
CMS1260   : S-----DGSFCTAGAVLDYHSVASYVLP--AQRATRYVLTAK-HCNPLHAA-VLIGSGV-----ACRVDWVSDQH : 130
Pat-1     : FS-DSQGPARSADYDCTAGAVLTGSGILSRTP--YQRAVRYVVTAK-HCGGRGAH-VRVGDVQ-----VCSVIWESSDA : 121
ChpA      : FG-DRQVPARSPDYDCPAGAVLTGSGILSRTP--ISTCCRICRYREXHCGRSAH-VCVGDVQ-----VCSVIWESPDA : 119
PhpA      : FS-DSQGPARSADYDCTAGAVLTGSGILSRTP--YQRAVRYVVTAK-HCGGRGAH-VRVGDVQ-----VCSVIWEAPDI : 140
CMS2989   : FS-ESDGPTYTRDYDCTAGAVLTGSGFLSRTP--YQRAVRYVATAK-HCGGRGAH-VHNDVE-----VCSVIWESPDT : 122
ChpS3     : FS-ESHGSTYTRDYDCTAGAVLTGTGILSRTP--YQRAVRYVATTK-HCGGRGAH-VRVYDVE-----VCTVIWESPDT : 127
PhpB      : VA-TPSGPFYSRDVRCCTAGAVLRATGLLANLTS--YYRAVRYVATSA-HCVTLGQK-VRVGNTE-----VCAVSWVSTDS : 123
CMS0981   : YGGSGSGFAHPVDHHCCTAGAVLVARGIISNFTE--YLRAVRYVTIPV-HCGVQGQK-AYAGDVE-----ICAVSWESPDA : 142
CMS0980   : AG-AQSGFAHGTDDQCTAGAVLTKGTGLIANLSQ--YQRAVRFVAIPK-HCGGRGPRGVFAGGTE-----ICSVIWESPDA : 156
ChpF      : -----NTPTG--SCTVGAFLIPRSIYSRTP--YQRAVRYVVIK-HCAR-MYAPLHVGTSL-----LCDVWVQSATS : 126
ChpG      : -----GVPNG--YCSVGAFLVPSIFQRTP--YQRAVRYVVLAK-HCAP-LNSPLIYFAQQD-----LCDVWVQSAAS : 118
CMS2909   : -----NGDAG--SCTAGAVLQ-YDFYQLPAGFAAKATRYVVTAK-HCFA-VGEIVRVGGVP-----VCHVIEQAEHA : 142
ChpE      : -----WGKWSGQNCITVGVVLQKSGLWAAISP--SERGARVYVVIK-HCVRRTTEPEVRTANG-----TDVEVCSVVALADPD : 115
ChpD      : -----PHGNCCTAGAVVVRTGMFRNLISA--YQRAVRYVVTAE-HCGTLNSV-VSVGGRR-----VGVVSWVDPAA : 107
ChpC      : -----EFEFGGDCTAGAVVQKNWSAVFFA--KERATRYVVTAN-HCVARIGERVVFR-----NELESRHGHVPPICITVYWRSDDV : 121
pCSL0117 : -----EFEFGGDCTAGAVVQKNWSVFFA--KERATRYVVTAN-HCVARTGERVVFR-----NELESRHGNTAPGCFYWRSDNV : 121
Lxx_Pat1  : -----QFPGNTECTAGLVVNTLRLLWNLTA--YQRNTRYVLTAG-HCGN-VGDRVKNVNDIGWVSWKPGPPDPSRPPGPRPPGPRPPHPVPIYP : 140
CMS2991   : -----QMRG-GYCTAGAVVKKDGLANLISA--ASRATRYVVTAK-HCGP-VGTDVSVG-----GOYLCKVWVTSQIS : 125

```

```

*      220      *      240      *      260      *      280      *      300
ChpB   : DEELVEVDPEVSRST---HCSGTPSGAPRCISVQSYAPRAVCKILLNLPFSNFER--AVPAGTGDENSTQSIICISGYVTCVNCTEKLVTLFPPTEEAQAR : 249
ChpS6  : DEELITVNEPESHRT---QCGETHSGAARCSIIQSFTPRAICKIVLHLPYSNFER--AIPVAGMGESATQOICTSGYRTPCPCNCTERLVTLPNNAEAEAR : 222
CMS1262 : DEELIVVSESTERAA---VCSHTSAG-EYCRIVLTYHFOAVCRUITRD--DNTWREQRTPEVATGEP-DDRVFCVSAIRACVACGLVTRTTFAAIAAVHP : 209
CMS2837 : DEELITVLEPSTRSR---YCGPSSHGTLFCQNVTTYTPOADCRVVLSA--LNTGSPITPIVNRGTSGDEESFCRSGAVGCVDCITLMLTHIPSPVLAGLP : 208
CMS1260 : DVELITVAPLAQRQ---ICSYTSYG-PYCHVIVAYEPRAVCSVLAPAPYSRDYRPMVTPVRGVGSEPTPREQFCTSGRTTCIICGFVPGQLPRTWVSDP : 226
Pat-1  : DESIVRTEPLQTTRR--SCYPTS--AGIRCTLVNDYEPRASCEVFGAR--NRSGQESSVQVAGTKVPADREIFCTSGAITCILCNWVSAPPFGL-IGS : 214
ChpA   : DESIVRTEPLTTRIX--SCYPTS--AGMRC TLVKDDEPRTSCEVSAAW--NRSGQESAVQVVGTEIRAD-EIFCTSGAITCILCYWVSAPPFGL-VGS : 211
PhpA   : DESIVRTEPSQTTRR--SCYPTS--AGIRCTLVNDYEPRASCEVFGAR--NRSGQESSVQVAGTKVPSEREIFCTSGINTCLMCNWSIPPRLRGT-RGP : 233
CMS2989 : DESIVRTEPLQTTRR--SCYPTS--AGIRCTLTSDYEPRATCEVFAVR--NRSGQESSVQVAGTKVEDAREIFCTSGYITCRLCNVVS TNREPGLI-VEN : 215
ChpS3  : DESIVRTEPLQTTRR--SCYPTS--AGIRCTLTSDYEPRARSEVLAVR--NRSGQESSVQVAGTKVEDAREIFCTSGYITCRLCNVVS VASEPPGLE-VEN : 220
PhpB   : DEALIRTEPTTSRSQ--YCYPTS--AGHRC EIVLTYEPRAVCEVFLGR--NRSGQESSIPVTGTGIPSDREIYCTSGASTCINC SWTQTSPPAGIH-IGP : 216
CMS0981 : DEAVVRVEPSAVRVS--QCYHTS--SGPRCTIVTHYTERAVCEVFAV--NRGQELPLRVAGAKVPSDREVECSSEMVTCVKCTWTTTPEPPGWRPTGP : 236
CMS0980 : DEALIRVEERTTSP--VCHTGS--WASGCSLVSHYEQRASCDVFIAT--NRNGQELALPVTGKTPSDREVEFCISGSKSCARCTWENVAREPLFR-VGS : 249
ChpF   : DEELVRVSRPDPSP-LICVAHHPKNPAVCSFPQTFETARACQVFMTA--RG--HVARLPVTGSGAADD-RECTSGWSTCVQCIWHGVSI PPRTPLS-- : 218
ChpG   : DEELVRVSRPDRNMT-LHCAGHS--TPATCSPIQTFETPRANQVFMTA--PPSPIVGRRAVAGTGIPSATGTEFCTSGHVTCVICDFQPTSLPVGVLRA-- : 211
CMS2909 : DEELVEIDAKLDPSAGLHCATHG--SHPAFCAHNYVPRATCEIITNS--GG--HPRRMPVEGHTEAPAG-RECTSGYFTCVQCDWTSFRGPEPQPSHGD : 235
ChpE   : DEALVRIEGSPHGAR--TCSATS--GHFIEMPSTVYSPQAFNRVFLPG--FAPGHETTLPTRQGVGPRETEFCTSGAVTRSLCEWTSTNVPPAVVQH-- : 207
ChpD   : DEELVKIDPEIHGQP--ICAPTS--SGFHCSGTQTYTTPRAVCRILMST--LRYRSLQSTPVAGTGAGDNEIFCISGKSCXSCFEFTSTPWLPRFDDQHR : 201
ChpC   : DEALIKIDPIVHVS---TCGSSSHGAPHCLPVTTWTPNALPRVLTASLRMSIYAQPVIYGDN--EGLNEAFATSGSTTCVQVNRNLSVRAWPPGFRD : 216
pCSL0117 : DEALIKIDPIVHVS---TCGSSSHGAPHCLPVTTWTPNALPRVLTASLRTRSIYQQPVIYGYD--EGLNEAFATSGSTTCVQVNRNLSVRAWPPGFRN : 216
Lxx Pat1 : DMMVQVKPTVNTTF---HCHNE-RSGFHLPIYHSAPRAVCRVITYQPRLRQFGAVPVETWQDDVPDNVNWFCTSGISLDFTCLEWEKY--QQLPPGVDI : 234
CMS2991 : DEGMIEVAPNVRRIIP---HCSSR-STGISCTIVITSYDPRAVCRVLLASLRTRSI STVPVTGFGDGA PSGD TDVCTSCATCGLSCLWTAH---ELTTEQV : 217

```

```

*      320      *      340      *      360      *      380
ChpB   : SRGQKVIIRSGS--RGSESGDSCGCPVSSSESG-----VIFGTHHGSA---DPTRFKNVSIVTPISEFFREQPN---YALAPSS : 317
ChpS6  : ARGQMVIIRSTV--AGTDQGDSCGCPVASPPG-----VIFGTHHGSA---DPEHYSNVSIVTPLSEFFREQPN---YALAPSS : 290
CMS1262 : GIRAAEDRS---LDVQPCDSCGCPVMSRSG-----TYGCFVSGGG---IYGGVRKI--DMPWSVFAHLQPN---YVLA PAG : 274
CMS2837 : GVASASPTSR--RASEDGDSCAPVTSGGGGFTN---VALYCYLHYGGG---WYGGVWKN--HYITTIKFFFEETSG---YSLAPAL : 279
CMS1260 : -ILHTGDIAG--PNIFDGDSCGCPVMSVDG-----KLYGTIVGYG---RYAGVDKM--TYLPFAVIQQQLPS---YGLAPA- : 290
Pat-1  : HQVVAETFSA---ATRQGDSCGCPVVS RDM-----KVICVICDGG--LPGAGDDTYMSLPIISVLFREQPY---YILATS- : 280
ChpA   : HQVVAETFSA---ATRQGDSCG--XSRDI-----KIVGHCICGGS--LPGSGDDIYMRSLLISMRF----- : 264
PhpA   : EEVEAETFSA---GVLPCDSCGCPVFSRDM-----KVICIMRKRK--NPGTAAETYMTYYPIDALFREPEY---YVLA TS- : 299
CMS2989 : QQVLAETFST---ATQRGDSCGCPVVS RDM-----KVICIGAGG--LPGSGDETYMSLPIIAVLFREQPY---YVLA T- : 280
ChpS3  : QEVVAETFST---ATRTGDSCGCPVLGRDM-----KVICIGAGG--LPGSGRETYMSLVPMAVLFREQPY---YALAM-- : 285
PhpB   : HQVTSRTSGA---NTXPCDSCGCPVGRTRSG-----TYCYIHSAGGGAINGQFADG--ESVVPVIGVLLRERPT---EALVTGR : 284
CMS0981 : HELIARTSGG---NVLNGDSCAPVVSQDA-----KVICMVVVGSG--DDDGPYRTFMTYIPISYILQERSA---EALATS- : 302
CMS0980 : HELVAETYRG---NLAHGDSCAPVFGDRD-----KVICMAIGVG--EENEDFATYTAIPIGYVLAEQPY---YAVATD- : 315
ChpF   : YEHLVAGESGQLLNLDPCDSCGCPVVNYS A-----ELICHISSV-----LPRTTLMVTPMSQVLSELHD---YQLASGD : 284
ChpG   : YEHLAAGQSAAVGALRPGDSCGCPVVS KDR-----RILCHISGD-----VPNTHFLVTPMAQVLHELSS---YKLA PAN : 277
CMS2909 : IHSLKAAES PVLGTTDAGDSCGCPVYTYDR-----ELICINSQS-----AYFGSILEVVPFSFVFSNFPG---YSLATNR : 301
ChpE   : --HVYAAARSTGANLLKGDSCGAVVSRTG-----DFYCHATDSDGLYSDHSNIDIMGVTDAARVLSDFRG---YHMAPAS : 277
ChpD   : GEVAVRGDTL----IFPGDSCAPVSSPDA-----RILCHAGETS-----TGPSFTIMKVTRIIQFFEDAGT---YALAPS- : 264
ChpC   : PRSGDQAASSTDFLLPGDSCGCPVFN-PDTG-----MLYGIMTDQVPHR--LTEQSTMVYIKLSQFFHEQRE---YNVTR- : 286
pCSL0117 : PHSGDQAASSTDFLLPGDSCGCPVFN-PDTG-----MLYGIMTDQVPRR--PTEQSTMVYIKLSEFFKEQRE---YNVLI- : 286
Lxx_Pat1 : G-PYRKAARSLSSSTAPPDSCGCPVFS DPNAGNANPNGVAFYGVVLRGFRAP---PAPENAMYLPAGVFFTQWEWQAVAVAPA : 313
CMS2991 : KYAGEHGATTSGTLLG DSCGCPVVS--TSG-----LYGVHSAVFRS-----DPSLMTYISAGQFFLERPG---YSLAPS- : 283

```

Multiples Alignment der Ppa-Serinpeptidasefamilie.

Die Hintergrundfarbe der Aminosäuren zeigt an, ob die Aminosäuren an der jeweiligen Position zu 100% identisch (schwarz), zu 80% identisch (dunkelgrau) oder zu 60% identisch sind (hellgrau). Protein-Alignment der Familienmitglieder aus *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Ppa) und *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (CMS).

```

          *      20      *      40      *      60      *      80      *
PpaB1    : -----MATRTGSTLIGAATCATLALTLMGAGAATAATTAETGTLRHTIISTETAAAGSTWSRAMH : 62
PpaB2    : -----MATRTGSTLIGAATCATLALTLMGAGAATAATTAEPASTLRHTIISTETAAAGSTWSRAMH : 62
CMS_PpaB : -----MMAPATCSTLLGSAACAALALTLGSAAGAATAATARPADILQHVIPSSASAAATGWITAMH : 63
PpaG     : -----MTHPH---RSAARLIARALLHRPLLGAAGLAGLLALATVSPAAAATDGGTPAPTTVTRSAADAADAVAFWTPERLA : 75
CMS_PpaG : -----MTHAS---RTAARILARTLLRRPALAVVAGAAGLIALVAVSPTSSATADDAVPAPSTVTRSAEEAADAVAFWTPERLE : 75
PpaH     : -----MPSHP--ARTARRSLAAVAALGLTASLLGVASAASAASVHERSARAGASIPVSAPVVGFSVSAEEAAVARWTPERRA : 77
PpaI     : -----MPHRT--APPARRRLAAVSAICLGAALLGAASSATAA--ERPAAPASVTLDAASSATVGIHVSSEDAEEAVDFWTPERRA : 75
CMS_PpaH : -----MPSLVPAPRPGRLRISALALAGAAALFSGAAPAALATAPADTRSSSEIVRAPVTLPETGSPDARARAHWTPERMA : 79
PpaA     : -----MKKIYPKRRHAASMAALSVGIGLVLCGPHDIGGESARAASSASGPASGASDTGMSVSDADAAESENYWTPDKIA : 75
PpaD     : -----MTALWKNRFSVLALLLVVMVGQSSVARPAQAAGPTGTAFS-----DDTGQSFSDAEASDAVRSWTPPEALA : 66
PpaC     : MRKLPISRVRPRASSSQGRRSVRVLMTIAAATASVAAGGVIQGGALSAPALAATPDVSAVSAASLGSRAFSDEEMTSTSDYWTVDRLO : 90
pCS1_ppaC : -----VTTAVCIFASGVIGGPLCSVAHAASLPMNTGPSRTAAVTADQ-VRAPSDDEASATETYWSDDRLR : 65
PpaF     : MRIRSTTAPTAPGPSAPRPR-----SRRVAALALAGGLASAAVLA VPVAASAQDASVVVASASADHAAS-----AAHWTPAARA : 75
CMS_PpaF : MRMRPSRGATTSETRDPQEHPAALPVPVGRRRRPLAGLGALAVVASLAVVSPASASAASVADPAAAAGTASVSASTTEETAYWTVADRRA : 90
PpaE     : VKLHLLSVTKRARPRS-----AHLRANAAGVGGAMI IALSTGAGAVYASENEGQSHIATATDSSEAS-----TTYWTVTAQA : 73
CMS_PpaJ : -----MMQIGARWALASAVVAACLGGGPATAAGSAPRPA LPPPAARGEASSGDIVDATVESPGETASDVSSTEYWTPERM : 78
PpaJ_pCM1 : -----VPLTLLACSVGAASASAAPTPSVPASVTS PGSDPNAVSVITQSQHERDETQSYWTPERLR : 60

```

```

          100      *      120      *      140      *      160      *      180
PpaB1 : AAVTNS--FVDPDPADGNPP-ADDQDSALTATSTSDASPGAASPHVSETTPVPG--FTANDHLGVVFERSGG--IDQRTGNVVVSDSGN : 145
PpaB2 : AAVTNS--FVDPDPADGNPP-ADDQDSALTATSTSDASPGAASPHVSETTPVPG--FTANDHLGVVFERSGG--IDQRTGNVVVSDSGN : 145
CMS_PpaB : AAVPSA--FVDDDPVDGDDP--TTDED--VPAALDTSAVSADAALPSAETIPVPG--FSANDHLGVVFERSGG--VDQRTGNVVVSASGD : 145
PpaG : GAASPV--LTRATGTPGTVDVPSADELTTSAARDQRRARFVIPVAQEVDPVS-----HIGVVAIVVDC--KEMSCGANAVESANGL : 153
CMS_PpaG : GAGSPE--LTRVTGTPSPDDTSADELTTSAARDQRRAPVIPVAQQVDPVS-----HIGIVAVVDC--KEFSCGANAVESANGL : 153
PpaH : AATDAD--GAADGATDGAA---GSAPADDALAASAASTVP---VAEQVAVVP-----HMGRLFVHRDG--EDFSCSANVVESANRS : 148
PpaI : AATDAD--APAP--ADGTS---DSG---AVATDAVADSA---HATQIEPIP-----HMGRIEYIQAG--KGYACSANVVESANRS : 140
CMS_PpaH : AASLAS--AAADDDAVPTSS--GPSSRPAQAALASAATAAPPISIAQRVTPVS-----HIGRIEYTLNG--QDYACSANVVKANRS : 156
PpaA : AA-----VPADGVTVTP--QKQSPSLGASAVTS---VFEPVY-----WIGRIEYTAGG--IDYACTASSIKSDSKL : 134
PpaD : AASDL-----RPSDAVNAPV--TGATEQALITQGAG---TFEPVY-----WIGRIEYDVG--RQYS--SGSSIRSDSQL : 129
PpaC : RAI-----PDDGSASVVGASDAGSGVHSVSG---SITATA-----WVCKIARRRG--LDRLCSASAVHSDSGY : 150
pCS1_ppaC : AAE-----PDDIPSSLNTATADSAIVHAVSG---SIASVP-----WVGTIAFIRDG--RDKKCSAAAVQSDSGL : 125
PpaF : AALAAD----APSVAGSASAGSTQSGTLSSDAASAAGAP----VPHDPQP-----FVGVIKIVVSG--RNHACTASVVDTPSGD : 147
CMS_PpaF : DALATEGAHGAATDGAATAATEATAATDATADTTATGSTPGRIVTHPLE-----YVGILFVADG--RNRTCTASVVDTPQGD : 170
PpaE : QAIASS-----SPEADMTPELSTSAVQTSARHA-----HAVLP-----YVGELEFVQGG--KNRACATVINTPDGD : 134
CMS_PpaJ : TATEAPVPTSLSDPGHPDASGVPEDEESGSAAVARMETLAQPAAPTSAAVGPEQAFEEPRGSAVVGRRVMTDFGEVHRYACSGVAINTPSGR : 168
PpaJ_pCM1 : EADTRAG-----VRQDADGVSAQLNSTVVDAREIN-----SLGVLEGRKDG--RPWRCSANAVDARNLS : 117

```

```

          *      200      *      220      *      240      *      260      *
PpaB1 : LVATAGRCVSAIKDAFVTD-LVEVPOYDGTAPK---GITPATAVTVQSQVVTGRQ-----VDFDTAEFQVKAPVG---AAAGTTTSS : 220
PpaB2 : LVATAGRCVSAIKDAFVTD-LVEVPOYDGTAPK---GITPATAVTVQSQVVTGRQ-----VDFDTAEFQVKAPVG---AAAGTTTSS : 220
CMS_PpaB : LVTTSGRSVSALKGAFVTD-LVEVPOYDGTAPK---GITPATVVTVKSOVTDRA-----VDFDTAEFVQAPAG---SAAGTTTSS : 220
PpaG : TVATAGHCAPP--GKDPSK-MVEVPGYVKGQPY---TVVPTSVTLPAGVRETLD-----PARDTAEFLTVG-----SPDGRTE : 222
CMS_PpaG : TVATAGHCAPP--GKDPSK-MVEVPGYMKGQPY---TVVPTSVTLAAGVRETLD-----PSRDTAEFLTVG-----SPDGRTE : 222
PpaH : TIATAGHCLTVR--QEFSTD-MVEYPRYEEGSPS--LGAEPVVGNTVIGVYERNDDD-----QAEDTSELVAH-----DDEGDDVQS : 222
PpaI : TIATAGHCLTQK--QVFSDH--IVEYPAVDHGSEQ--YGAVPVITGYVPSGVYQRNDDD-----QGDDSEEMAVKR-----DDSGQDVQS : 214
CMS_PpaH : TVATAAHCLTAK--GAFATD--AVEVPGYHDGDHGDYGTVPVVG--VVAGGYTEDNDD-----LGDDAGEVVAL-----DADGRNQS : 231
PpaA : VIATAGHCLYHKGEFSTN--LREIIPADGANKP--LLTNGANDYQVPRARYQED-----QQHDAGEVQLKQRSW--LGAKQYAD : 210
PpaD : VVATAAHCLYDHGEWSTR--VVEIIPADGANKP--LGVVGAFFYAVSRDVRTTED-----PGHDAAEIKMAPKTAW--DGSKEYAS : 205
PpaC : LVATAGHCLLNDDQTATG--VTEVPGYDGNMP--YGTIYIAKFYSVTPERVRAD-----DSHDVGEIKVQPIG-----SKSAD : 221
pCS1_ppaC : MVATAGHCLVSDGKFATS--VAETPGYDGRKLAG--R---ADTYQVPEPVSRED-----DSHDVGEVVKVIRHA-----GRSIEA : 192
PpaF : TIATAAHCLVDRRTGAATTLATEIPGAQGAAP--HGIWVVRVAAVSSAVTATGR-----ASDDAGEARVSGPA-----GEVAA : 220
CMS_PpaF : ATATAAHCLVDPATGAPVRLATEVPGTKAAQAP--FGLWVVDTSSTVTDSEKRTA-----VVDDAGEARVRSLD-----GRTAD : 243
PpaE : TIATAASCLIDRGAKTVHRLATEVPSDHAAP--QGIWPIRVAAEATPQVATGA-----TSADVAEAKVAGPT-----GTHKD : 207
CMS_PpaJ : VVMTAGHCVHTGQGGGWQRHWEVPGYVDGRAP--FGHPEKHLLTSTAVITKSEGPIPSDVAATDICEAVTAPDP-----AGRSIGS : 250
PpaJ_pCM1 : VVSTAGHCLIAER--GHTIDHLLEAAGYRGNSTPLFGT--DVLWSVAPNGVTLQHG-----DGFDTAEVVDTRRETRTDGSAHPGHP : 197

```

```

                280          *          300          *          320          *          340          *          360
PpaB1 : NVGASGVREHAGQEDDDD-----YRSTGYALDG-GHDGTKPISVSESSVEPNPWMNKDYAIEGIETD-LRACIISGSSPWNTDDDDSGD----- : 298
PpaB2 : NVGASGVREHAGQEDDDD-----YRSTGYALDG-GHDGTKPISVSESSVEPNPWMNKDYAIEGIETD-LRACIISGSSPWNTDDDDSGD----- : 298
CMS_PpaB : VVGASGVREHAGQDDED-----YRSTGYALDG-GHDGTKPVSSESSVEPNPWMNKDYAIEGIETE-LRACIISGSSPWNTDDDDSGD----- : 298
PpaG : AVGASPVEHEH-QPRTHY-----TTVIGYPAVG-RFTGDAPFLCSGFFARAT--HLEGQTGQELDCD-MKECASCAPFLDGSGPGA----- : 296
CMS_PpaG : AVGASPVEHEH-QKLTHY-----TTIIGYPASG-RFTGDAPFLCSGIIARAT--HLEGQSGQELDCD-MKECASCAPFLDGSGPGA----- : 296
PpaH : VAGASPVRFRF-APAAQE-----VSMYGYPAAG-RFDGGELERCAGLG----HVYTEMQIDLGCD-MTGCVSGGPILEGDGPDG----- : 293
PpaI : AVGASPVLDLD-QPGAEH-----ASAYGYPAAG-RFDGESLQWCSGQG----EAVSAEQIALPCD-MNACTSGGPILAGDFTDS----- : 285
CMS_PpaH : VVGASPVLDLD-QPLVKE-----GTVYGYPAAR-RFDGESLQRCRGVF----QRESADQINLPCD-MNECVSGGPIFAGDDANG----- : 302
PpaA : RACATATNEEGLAKTGLH-----YEAFGYEQVS-GFTSHPLLTCSGNG--YRRFSQFSLLSINDCA-MVGCSGGPVYHESGKGV-----N : 286
PpaD : KACAPAPTTSAAAMPGLH-----FEAFGYRPLG-GYVPAPLYTCAGEGRHFRGFASIPEYEIANCD-PPGCASGGPVYHASTHGP-----N : 283
PpaC : TVSALRVNEESLAKPQLH-----YFSLAMGNIGGGFQAKPLSTCVGPPA---YRLHDEQSLAMIGCK-AVGCMSGGPVYHASTEEP-----R : 297
pCS1_ppaC : VTNAPRADETTLAKSSLH-----YFSLAMANIASGYSPRPLATCVGPPA---YSMRAERSLAMVGCI-ASPCSGGAVYHVSSTAP-----K : 268
PpaF : SVGAEPVEEGSALVPASGVAPRLAVLGYPTAG-SAT-AALEACAGRP--QHDTGGQTS--LQCT-LGTCAACSPVLTAAG----- : 293
CMS_PpaF : VVGAARPVEEDRPLVPAQGAAGTSVLGYMPQAA-PYSGTQLVACASVP---RRSAHHTVS--LPCA-LGDCAGCAPIYTRGARVVPVRGELR : 326
PpaE : AACSVPAVEEDTITPPAT---ELLRVFAMPQEK-PYSGQKLVGCGGAIA---HRLAAPSAAREIGCD-INDCAMCGPALSPAG----- : 280
CMS_PpaJ : IVGGDLTIGAAPSGLP-----IELLAMPVNR--LGGARLSACRTST---VDSGHAGVMAAEGCG-FEGCSGGPVWDRFDAKTG----- : 324
PpaJ_pCM1 : VLGQSGPTMSGVAFAATP---TGYAAAMGYPGAIQNGNVPVRCSDEIQTLLPTVGPYLRIMDGCENFSGCASGGPVVQNVSGHR----- : 278

                *          380          *          400
PpaB1 : IQRGMTTFAYHQFTHAAFGPQWTATLHATYRAAAAA----- : 334
PpaB2 : IQRGMTTFAYHQFTHAAFGPQWTATLHATYRAAAAA----- : 333
CMS_PpaB : VQRGMTTFAYKRFTHAAFGPQWTGALHAVFQVAAAS----- : 334
PpaG : -RQYSVLSGGLDEKPLVVAPVWDRVIEAAYRVAQSRVG---- : 333
CMS_PpaG : -RQYSVLSGGLLEEKPLVVAPVWDRVIEAAYRTAQSRVG---- : 333
PpaH : -AQFGNVAERALDGMHNIGPVWQDAAQSAYELTAAISV---- : 330
PpaI : -PQFGNVAERYEDDSHVLGPVWKDEHSAYDLTAAVAN---- : 322
CMS_PpaH : -AQYADEDARYDDYSHILGPIWQANEHTAYDGAARIQPAEG- : 342
PpaA : GTQVGVVSSVIPQGEHS-IMTFAPWGDAEYQVFRTVDAWGR- : 326
PpaD : GTQYGVITETRRARDGSPLLIFVPWGQVEYSLYRSVDLWPK- : 324
PpaC : GTQVGVIGRNVETAYGD-AIAFTPFGKAELSTYKTVDSFTK- : 337
pCS1_ppaC : GTQVGVISRALETVNGP-ATAFTPFGDVELLVFRLVDSFHR- : 308
PpaF : -EQRAVVAR---PSAGRG-VLLASWGADAERALTSLHGR--- : 327
CMS_PpaF : PEQRSVVAAPASPAAGRADVVLAEWGAEAQALALTAR--- : 365
PpaE : -ELRSVIAQSSDQRVGKRGLVLAAWGTDAATLADLSKR--- : 318
CMS_PpaJ : ---RGFVRGVTSGSAGEVYLEAAVPSELTKRMLAQADRDGRG : 363
PpaJ_pCM1 : -RVTGTVEGYVPGTHEVRVTYWETAARNSWEYAQTH----- : 313

```

Multiples Alignment der *Clavibacter* Subtilasen.

Die Hintergrundfarbe der Aminosäuren zeigt an, ob die Aminosäuren an der jeweiligen Position zu 100% identisch (schwarz), zu 80% identisch (dunkelgrau) oder zu 60% identisch sind (hellgrau). Protein-Alignment der Subtilasen von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (SbtA, SbtB und SbtC), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms_0598 und Cms_0597) und ausgewählter Homologe von *Arabidopsis thaliana* (Ara12); von *Solanum lycopersicum* (P69 und SBT2).

```

                *      20      *      40      *      60      *      80      *      100
SBT2_Lyc  : -----MAGMLLKCMFFFVSVCTAIN-----LAKCSPNTKKYIIQMDK----WAKPDVFDHVQWYSS : 54
Ara12_Ara : -----MSSSFLSSTAFFLLCGFC-----HVSSSSSDQGTIIVHMAK----SQMPSSFDLHSNWYDS : 54
P69_Lyc   : -----MG--FLKILLVFFCSFPWP-----TIQSN---LETYLHVHESPESLISTQSILTDLDSYVLS : 53
sbtC      : -----MPIHRDPLLPDRRRRLRAGRPLAACALAFALVAA-----GTTTASADDAATAVVPVGGAG-EGSYLVTRIQPAASYDG : 72
Cms0598   : -----MPIHRDPLMPDRRRRLRAGRPLAACALAFALVAA-----GTTTASAADTPTAAVPPVGGAG-DGNYLVTRIQPASAYDG : 72
sbtA      : -----MPSHRHPLPPGRRRLRSARPLAACALAVAVVA-----GGSAAGAAVLPQAAVSLDAA-DGHYLIITIKQPAATYDG : 72
sbtB      : MLRIRACRKGCARATHPHSKDVFVI PRSPRLRSESDRASSLRATASVAATALVAAGLVTFGAAGAMAAPPTVATPASALEDGRYIVTIAADAAATYRG : 100
Cms0597   : -----MFVI PRSPRLRPESDRAPSLRRATASVAATALVAAGLVTFGAAGAMAAPPTVATPASALEDGRYIVTIAADAAATYRG : 79

                *      120     *      140     *      160     *      180     *      200
SBT2_Lyc  : LVKSLVLPSTTEV-----EKTGDGEERILYSYQTAFHGVAQLSEEEVKKIQERNGVLAVFTEIKYQLHTTTRSPLEFLGLDRED : 131
Ara12_Ara : SLRSISDS-----AELLYTVENATHGFSTRITQEEADSLMTQPGVISVLEHRYELHTTTRTPLFLGLD-EH : 119
P69_Lyc   : FLPKTTTAAIS-----SSGNEEAATMIYSYHNVTGFAARLTAEQVKEMEKIHGFVSAQKQRTLSLDTHTSSFLGLQ--Q : 126
sbtC      : TLDGLAPTRVEPGARLDAQSDAVQRYSDHLTRLQDSAASAAGVTPTRNRYALTVDGFSAE LTAQVQALGHDRDVLSVEPDRTLHTTSTPDSRFLGLE--G : 170
Cms0598   : TLDGLAPTRVEPGARLDAQSDAVQRYSDHLTQRQDSAADAAGVTPTRNRYSLTVNGFSADLTAQVQELSHDRDVLSVEPDQALHTTSTPDSRFLGLE--G : 170
sbtA      : TLDGLARTEVDPGARLDARSDAVERYTDHLARAQRSVADAIGVTPTHQYSLTTNGFSASLTAQVRAAHLDGVDLSVEPDQTLHPOSTPAIRSLGLE--G : 170
sbtB      : GVDGLPATQARSGAQLDAKAGPVVAYTDYLEDQOEDVAASVGDIEYSYSLTVNGFSADLTAEQASKLSGDREVASVEPDRIYHPTSTPAADFLGLT--G : 198
Cms0597   : GVDGLPATEARSGAQLDAKAGPVVAYTDYLEDROEDVAASVGDIEYSYSLTVNGFSADLTAEQASKLSGDRAVASVEPERLYHPTSTPAADFLGLT--G : 177

                *      220     *      240     *      260     *      280     *      300
SBT2_Lyc  : SSKLWADRL---SDHNVIVGVLDGTGIVPESSPFSNDSGTTSVPE-----SHWKGVCEIETGRGFEKHHCSKKIVGARVFRGYEAASGKI : 209
Ara12_Ara : TADLFPEAG---SYSDVIVGVLDGTGIVPESSKYSDEGFCPIPE-----SSWKGGEACNFTASLGNRKLIGARFFARGYESTMGPI : 197
P69_Lyc   : NMGVWKDSN---YGKGVIIIGVIDTGIILPDHPSFSDVGMPPPE-----AKWKGVCEI---NFTN-KCNKLGARSYQLGHG----- : 195
sbtC      : DDGLWSKVGSDKAGEGTVIGVLDGTGIAFDNPSFAGKPLGSTPGADPYLDGSRIDFRKGDGTVFHGTCETGDFTAADDCSTKIVGARSEFAGRAASGDPN : 270
Cms0598   : DHGLWSKAGGVDAAGKGTIVGVLDGTGIAFDNPSFAGKPLGSTPGADPYLDGSRIDFRKGDGTVFHGTCQETGDFTAADDCSTKIVGARAFEAGWAATGSP : 270
sbtA      : DHGLWAAAAGAEHAGACTVIGVLDGTGIAFDNPSFAGKPLGSAFGAEPYRDGTGIAFRKADGTVFHGTCETGDFTAADDCSTKIVGARSEFVSGRDASGVPL : 270
sbtB      : ADGVWAKTGGQEEAGEGAVIGVLDGTGIAFDNPAFAGEPLGTAGAEPYRDGSAIAYAKGDGTVFRGTCQETGDFTAADDCSTKIVGARYFVTGFGQENIGT : 298
Cms0597   : PDGVWAKTGGQEEAGEGAVIGVLDGTGIAFDNPAFVGEPLGTAGAEPYRDGSAIAYAKGDGTVFRGTCQETGDFTAADDCSTKIVGARYYVTGFGQENIGT : 277

```

```

          *           320           *           340           *           360           *           380           *           400
SBT2_Lyc : NERGFFKSARQDDGHGHTHTACTVAGSVVRGANLCGYAYGTARGMAPGARVAAYKVCWVC-----GCFSSDIISAVDAQAVADGVNIISISLGGG-VS : 299
Ara12_Ara : DESKESRSPRDDDGHGHTHTSSTAAGSVVEGASLCGYASGTARGMAPRARVAVYKVCWLC-----GCFSSDIILAADKAIADNVNVLSMSLGGG-MS : 287
P69_Lyc : -----SPIDDDGHGHTHTASTAAGAFVNGANVFCNANGTAAGVAPFAHLAVYKVCNSD-----GCADTDVLAAMDAAIDDGVDIISISLGGGGSS : 279
sbtC : GPQ-EKLSPLDTAGHGSHTASTAAGDDAGVAATAG-TIQETIAGIAPAAKIAAYKVCWSGPDESKETDDGCELSDDIVAGTEQATADGVDVLNMSLGG---P : 365
Cms0598 : GPQ-EKVSPLDTAGHGSHTASTAAGDDAGVAATTG-AVQEAIAGIAPAAIAAYKVCWSGPDEVETDDGCATSDDIVAGTEQATSDGVDVLNMSLGG---A : 365
sbtA : GPQ-ERRSARDTNGHGSHTASTAAGDDADVPAVIHCRTLDTIAGVAPAARIAAYKVCWDCPDFTVETDDGCAASDIIAATDQATADGVDVLNMSLGG---D : 366
sbtB : AATGEYVSPRDDGHGSHTASTAAGEADVTATDIGNDLGEISGVVAPASKIAAYKVCWSGPDFAVQTDDGCAGADLVAATEQATKDGVDVINYSIGGG-SA : 397
Cms0597 : AATGEYDSPRDDGHGSHTASTAAGEAGVTATDIGKDLGEISGVVAPASKIAAYKVCWSGPDFAVKTDDGCAGADLIAATEQATADGVDVINYSIGGG-SA : 376

```

H

```

*           420           *           440           *           460           *           480           *           500
SBT2_Lyc : SYNRDSLSIAAFGAMEKGVFVSCSAGNGGPDPISLTNVSPWITTVGASTMDRDFPATVELGTGKIVTGASIYKGRMNLSTQKQYPLIYLGSNSSNLMPSS : 399
Ara12_Ara : DYYRDGVAIGAFAAMERGILVSCSAGNAGPSSSSLSNVAPWITTVGAGTDRDFPALAILGNGKNFTGVSLFKG--EALPDKLPFIYAG-NASNATINGN : 384
P69_Lyc : DFYSNPIALGAYSATERGILVSCSAGNGPSTGSVGNEAPWILTVGASTQDRKLKATVKLCNREEFEGESAYRP--KISNSIFFALFDAGNASDEFETP : 377
sbtC : GKTEDAFQRALLGAADAGIFVAASAGNSGPDAGTVANTEPWITTVAASSPRNYSGIVTLGSAKFAGASATVG---SPVSGPLVRAVDSGVKGATSPE : 461
Cms0598 : GKAEDTFQRALLGAADAGIFVAAAGNSGPDAGTVSNTEPWITTVAASSPDNYSGIVTLGDGASFSGASVTVG---STVSGPLVRAADSGVAGASPE : 461
sbtA : GPSPDEEQRALLGAASAGIFVAASAGNSGPDASTVSNLEPWITTVAASSPDNYAATLTLGDGRRFAGASHMGP---SPVSGPLVRAASGVAGATSPE : 462
sbtB : RTTFSATDSAFLGAASAGIFVAASAGNSGPGASTLDNASPWITTVAASTVAGNFEATAQLGDGQAFAGSSITVT---EPVTGSFVTAASVAAGATTPA : 493
Cms0597 : ATTFSATDRAFLGAASAGIFVSASAGNSGPGASTLDNASPWITTVAASTVAGNFEATAKLGDGQAFAGSSITVT---EPVTGDFVTAASVAVAGATTPA : 472

```

N

n

```

          *           520           *           540           *           560           *           580           *           600
SBT2_Lyc : ICLDGTLDKASVAGKIVICDRG-ISPRVOKQVVKEAGGVGMILTNTAANGEELVADSHLLFAVAVGEREGRATKLYAAG-RSATATLRFLGTKLGIRES : 497
Ara12_Ara : ICMTGTLIEKVKGKIVMCDRG-INARVOKGDVVKAGGVGMILANTAANGEELVADAHLLFATTVGEKAGDITRHVVTDPNPTASISILGTVVGVKES : 483
P69_Lyc : YCRSGSLTDPVTRGKIVICLAGGVPRVDKQAVKDAGGVGMIINQRSGVTKSADAHVIFALDISDADGTKLAYMNSTSNPVATITFQTIIGDKNA : 477
sbtC : ICGKILDPNKVRGRIVQCDRG-VSPRIEKSAEVKRAGGIGMVLTNVKPDSQ--DLDRHTVPTVHLDADARQTIVDYAAK-AGATATLDGNTTGVEREA : 557
Cms0598 : ICGDGTLDPNKVRGRIVQCDRG-VSARIDKSAEVRAGGIGMVLTNVKPDSE--DLDAHSVPTVHLDVDSRQTIVDYAAK-AGATATLINGNTTGVTREA : 557
sbtA : ICGKILDPAKVTGRIVQCDRG-VSARVDKSAEVTRAGGIGMVLTNVKADSE--DLNSHAVPTVHLDADVDARPAIVAYAAK-AGATATLTAGDTSGVEREA : 558
sbtB : ICGPGVLDPAKTAGKIVLCERG-TFDRVAKSAEVERAGGIGMVLNPTPNSV--DADTHSVPTVHLDADVYAAVSAYAAT-PGATVTLVPDNTTGVSAPT : 589
Cms0597 : ICGPGVLDPAKTAGKIVLCERG-TIDRVAKSAEVERAGGIGMVLNPTPNSI--DADTHSVPTVHLDADVYAAVSAYAAT-PGATVTLVPDNTTGVSAPT : 568

```

```

          *           620           *           640           *           660           *           680           *           700
SBT2_Lyc : EVVAAFSSRGE--NFLSLEILKPDMPVAPGVNIIAGWTGALGPSSLPIDQRRTNFNIIISGTSMSCPHVSGLAALLKARHPDWSPAAIKSALMTTAYVHDNT : 595
Ara12_Ara : EVVAAFSSRGE--NSITPNIILKPDLIAPGVNIIAAWTGAAAGPTGLASDSRRVEFNIIISGTSMSCPHVSGLAALLKSVHPDWSPAAIRSAALMTTAYKYK : 581
P69_Lyc   : EVVAAFSSRGE--SGASIGILKPDIIIGPGVNIILAAWPTSVDDN----KNTKSTFNIIISGTSMSCPHLSGVRALLKSTHPDWSPAAIKSAMMTTADTLNLA : 571
sbtC      : FOVAGFSSRGAASEVDVGGDTIKPDITAPGVGIIAAISDDGK-----FAFAPYSGTSMSSPHIAGFGLVYLGVHPKASPAEVKSALMTTATDT---- : 645
Cms0598   : FOVAGFSSRGAEEAVDGGDTIKPDITAPGVGIIAAVSDKGK-----PDEAADSGETSMASPHIAGFALVYLGVHPKASPAEVKSALMTTATDT---- : 645
sbtA      : FOVTGFSSRGE--DPADGADTIKPDITAPGSGIIPAAVKDVGCR-----PGFAALSGTSMSSPHIAGFALVYLGVIHPTASPSEIKSAMMTTATDT---- : 645
sbtB      : FOVAGFSSRGE--VLADGSDILKPDVITAPGVSTIIAATNNAEGED-----PTEALLSGTSMASPHVACLALLYLGEHPKATPAEIKSAMMTTAYDIT---- : 677
Cms0597   : FOVAGFSSRGE--VLADGSDILKPDVITAPGVSTIIAATNNAEGEE-----PTLALLSGTSMASPHVASLALLYLGEHPKATPAEIKSAMMTTAYDIT---- : 656

```

```

          *           720           *           740           *           760           *           780           *           800
SBT2_Lyc : YKSLKDASSVTPSTPYDHGAGHVNPRKAVDEPLIYDIGAQDYFEFLCTQELSPSQLMVFQKFSNRTCHHSLAN-PGDNLNYEATISAVFPEKTKLSMLTTHR : 694
Ara12_Ara : GKPLLDIATGKPSSTPFDHGAGHVSPTTATNPLIYDLTTEBYLGLFCALNYSQPQRSVSRN-NYTCDPKSYSVADLNYPSFANVVDG---VGAYKYTR : 677
P69_Lyc   : NSPILDER-LLPADIIYAIAGHVNPSRANDEPLIYDTPFEDYVPIYLCGLNYTNRQVGNLQQR-KVNCSEVKSILEAQLNYPSFSIYDITG---STPQTYTR : 666
sbtC      : ----LDANGKPATDPFAQGAGQIAPDRFLNPGLIYYPGSAKDWAGYAAATGLALPHVAVPAP-----SOLNLPISIGVGKILG----STTVTR : 724
Cms0598   : ----VDAKGEPATDPFAQGAGQIAPDRFLNPGLIYYPGSAKDWAAAYAAATGLELPHVAVPAP-----SOLNLPISIGVGKILG----STTVTR : 724
sbtA      : ----VDAQKAVTDPFAQGAGEIISARYLHPGLIYVYASGPPDWAGYAAQTGLELPHVAVPAP-----SOLNLPISIAVGSILG----GTTLTR : 724
sbtB      : ----VDEDGGKVTDPFTQAGHVDARRYLDPGLIYLNDRADWLAAYLAATGYASG--IDPVDP-----SELNLSIAIAGITG----SETVTR : 754
Cms0597   : ----LDEDGGKVTDPFTQAGHVDARRYLDPGLIYLNDRADWLAAYLAATGYASG--IDPVDP-----SELNLSIAIAGITG----SETVTR : 733

```

```

          *           820           *           840           *           860           *           880           *           900
SBT2_Lyc : TVTNVGGSPISNYHVVVSAFKGAVVKVEPERLNEFTSKNQKLSYKVTFTKTVSRQK--APEFGSLIWKDGTGTHKVRSPIALTWLASV----- : 775
Ara12_Ara : TVTSSVGAGTYSVKVTSETTGKVISVEPAVLEKEANEKRSYTVTFTVDSSKPSGSNSFGSIEWSDGKHVVGSPVAISWT----- : 757
P69_Lyc   : TVTNVGDAKSISYKVEVASPEALPSKLT-LRANFSS-DQKLTQVTFSTKANSNTEVIEGFLKWTSNRHSVRSPIALLLIQ----- : 745
sbtC      : TVTSLTAG--TWTASVQGVSQADVKTTPARTTFTAPGQTKSFQVRIITAKRGAPSDVWSTGSLTWTGSACTVRSPIAVRPTAIVAPASVDGTGRSGKADV : 822
Cms0598   : TVTSLTAG--TWTASVQGVQADVKTTPARTTFTAPGQTKSFQVRIITAKRGAPSDAWSTGSLTWTGSACTVRSPIAVRPTAVVAPASVDGTGTSGKVDV : 822
sbtA      : TVTSSQAAG--TWRASVQGVAGADVTVSPARTTFTAPGQTRTFHVRIQAKVGASTGAWTTGSLTWTGPGGTVRSPVAVRPELQELGVPSSVSGSGTSGKLDVA : 822
sbtB      : EVTSTRAG--SYTASVQGLAGVTAEVTPKTEFTEAGQTKSYEVAFTRTT-ADIDAYATGSLTWTGDDTIVRSPVAVRPEVSIAPDEVQKGITGSDVDT : 851
Cms0597   : EVTSTRAG--TYTASVQGLAGVSAEVTPKTEFTEAGQTKSYEVAFTRTT-ADIDAYATGSLTWTGDDTIVRSPVAVRPEVSIAPDEVQKGIKIRGSDVDT : 830

```

```

          *          920          *          940          *          960          *          980          *          1000
SBT2_Lyc : ----- : -
Ara12_Ara : ----- : -
P69_Lyc : ----- : -
sbtC : VDAGTTGRIPLT TAGLAAGELLS DGDGTGHPGHS GS SVTATDADGAEITVKAGEKALVLD AAPVDGASDLLLYLQKVGKTDDDRKLISLQQTSSLSERIVVQ : 922
Cms0598 : VDAGITGRIPLT TAGAARGELLS DGDGSGHPGHS GS SVTATDADGAEITVKAGEEALVLDVAPVDGASDFLLALEKVGKDDDRKLISLQQTSSLSERIVVP : 922
sbtA : VDSGVTGRIAL EASGLAPAQR LHDP SGTQSGPTGSLAPNREYAMQINVPANEKALVVDVAPRDGASDLALELERIG-DGGKRTVIDVKITPSPSERIVVQ : 921
sbtB : VTPGTTGP IALTA EGLTAGRVYANPKDASSPISGTGPAKAE LQYATTVPAGQLATRIDLDSADDKADLDSVFRLE--DGE PVEQFDSATESADESVTIE : 949
Cms0597 : VTPGTTGP IALTA EGLTAGRVYANPDDAS PPI SGTGPAKAE LQYATTVPAGQIATRIDLDSADDKADLDSVFRLE--GGK PVEQFDSATESADESVTIE : 928

          *          1020         *          1040         *          1060         *          1080         *          1100
SBT2_Lyc : ----- : -
Ara12_Ara : ----- : -
P69_Lyc : ----- : -
sbtC : APEAGDYIVGVQASKLAGSATSVD FDLTRYDVQGTGGEGSF AVSPAQLPVTAGKKATY TASWSGLAAGRSYVGLVGYGGSTATAIVGVTPAASAAPTAT : 1022
Cms0598 : APEAGKYIVTVQASTLAGSATS VGYDLTRYDVQGTGGEGSF QVSPAQLPVTAGKKATY TASWSGLAAGNSYVGLVSYGGTAATTIVDVSTPAASAAPTAT : 1022
sbtA : APEAGEYVATVA AESVAGSAAMTGFDLTRYDVVASGGQGA FATTVPVQLPVQRGKKATYEASWSGLAVGSRYLGLLSYSGSDATTLFDITVPADSTAPSAS : 1021
sbtB : TPEAGDYVVVVSIFSI PAGATTQDFTVTQFDLSESTDEGAFTVSPNPLDAVQSQPITYTASWSGLAPETAYLGRVAYAGTEALTYVRVES-GAIPAPAAT : 1048
Cms0597 : TPEAGDYVVVVS VFSVPAGQKTQDFTLTQFDLSESTDEGAFTVSPNPLDAVQSRPVTY TASWSGLAPETAYLGRVAYSGETESSTYVRIES-GAIPAPTAT : 1027

          *          1120         *          1140         *          1160         *          1180         *          1200
SBT2_Lyc : ----- : -
Ara12_Ara : ----- : -
P69_Lyc : ----- : -
sbtC : TAPAITGTPDVGQTLTASTGTWTPQGVTLATQWLSNGTPIAGATGSTFRVTS AVAGTALAVRVTATASDGRTGVATSPTVTARDAATVHLQVTQPRGTAS : 1122
Cms0598 : TAPAITGTPDVGRTL TASTGAWAPQGVTLATQWLSNGTPIAGATGSTFRVTS AVAGTALAVRVTATASDGRTGVATSPTVTARDAATVHLQATRPRGTAS : 1122
sbtA : APLAAT-----SYRIRR----- : 1033
sbtB : APPVITGTPTAGQTLTASPGTWDQEGLKFSYQWFADGKALAGQTRATYKVS P SVAGKSITVVVTAKPATGPTGTATSEAVVIKLASTVTVSVKPPVLTSA : 1148
Cms0597 : APPVISGTPVAGQTLTATPGTWDQEGLKYSYQWYADGKALAGQTRATYKVS P SVAGKSITVVVTAKPATGPGTATSEAVVIKLASTVTVSVKPPVLTSA : 1127

          *          1220         *          1240         *          1260         *
SBT2_Lyc : ----- : -
Ara12_Ara : ----- : -
P69_Lyc : ----- : -
sbtC : GTVHV RVSVTSAGKQAATGVVRVTVDGAEHDVPLDGS GTCADIAGIAPGTRTVQASYAGDNLVGGGTSRAQRILVR- : 1199
Cms0598 : GTVHVQVSVTSAAKQAATGVVRVTVDGAEHDVPLDGS GTCADITGVAPGTRTVQASYVGDNLVGGGTSRAQRILVR- : 1199
sbtA : ----- : -
sbtB : QKAVVTVKVDSQAKAAPTGTVTVKVGADSF E VALDAAGTGRVELPAYAKGRYSVTATYAGDAANA AKASSPKYLYVSR : 1226
Cms0597 : QKAVVTVKVDS T AKAAPTGTVTVKVGS DSYEVALDASGTGRVELPSYAKGRYAVTATYAGDTANA AKTSAPKYLYVSR : 1205

```

Literaturverzeichnis

Abramovitch, R., Martin, G. (2004). Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7, 356-364.

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

Alarcón, C., Castro, J., Muñoz, F., Arce-Johnson, P., Delgado, J. (1998). Protein(s) from the gram-positive bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* induces a hypersensitive response in plants. *Phytopathology*, 88, 306-310.

Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., W., M., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402.

Astua-Monge, G., Minsavage, G. V., Stall, R. E., Vallejos, C. E., Davis, M. J., Jones, J. B. (2000). Xv4-vrxv4: A new gene-for-gene interaction identified between *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* race T3 and the wild tomato relative *Lycopersicon pennellii*. *MPMI*, 13, 1346-1355.

Ausmees, N., H. Kobayashi, W. J. Deakin, C. Marie, H. B. Krishnan et al. (2004). Characterization of NopP, a type III secreted effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J. Bacteriol*, 186, 4774-4780.

Axtell, M. J., Chisholm, S. T., Dahlbeck, D., Staskawicz, B. J. (2003). Genetic and molecular evidence that the *Pseudomonas syringae* type III effector protein AvrRpt2 is a cysteine protease. *Mol Microbiol.*, 49, 1537-46.

Bachl, A. (2005). Biochemische Charakterisierung der Isoprensynthase aus der Graupappel (*Populus x canescens* (Ait.) Sm.) und ihre Expression in *Arabidopsis thaliana* L. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Köln.

Baker C. J., Orlandi E. W. (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 33, 299-321.

Balaji, V., Sessa, G. (2008). Activation and manipulation of host responses by a Grampositive bacterium. *Plant Signal. Behav.*, 3, 839-841.

Balaji, V., Mayrose, M., Sherf, O., Jacob-Hirsch, J. , Eichenlaub, R., Iraki, N., et al. (2008). Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiol.*, 146, 1797-1809.

- Balaji V., Sessa G., Smart C. D. (2011). Silencing of host basal defense response-related gene expression increases susceptibility of *Nicotiana benthamiana* to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology.*, 101, 349-357.
- Barr, P. J. (1991). Mammalian subtilisins: the long-sought dibasic processing endoproteases. *Cell*, 66, 1-3.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J. F. (1998) Handbook of proteolytic enzymes. *Academic Press*, London, UK.
- Barrett A. J., Rawlings, N. D. (1995). Families and clans of serine peptidases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 318, 247-250.
- Beers, E. P., Jones, A. M., Dickerman, A. W. (2004). The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry*, 65, 43-58.
- Beimen, A., Bempohl, A., Meletzus, D., Eichenlaub, R., Barz, W. (1992). Accumulation of phenolic compounds in leaves of tomato plants after infection with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains differing in virulence. *Z. Naturforsch.*, 47, 898-909.
- Bentley, W. E., Davis R. H., Kompala, D. S. (1991). Dynamics of induced CAT expression in *E. coli*. *Biotechnol. Bioengin.*, 38, 749-760.
- Bentley, S., Corton, C., Brown, S., Barron, A., Clark, L., Doggett, J., et al. (2008). Genome of the actinomycete plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* suggests recent niche adaptation. *J. Bacteriol.*, 190, 2150-2160.
- Bempohl, A. (1990). Untersuchungen der pathogenen Wechselwirkungen zwischen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und der Tomate (*Lycopersicon esculentum*). Diplomarbeit, Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Berks, B.C. et al. (2005). Protein targeting by the twin-arginine (Tat) translocation pathway (review). *Curr.Opin.Microbiol.*, 8, 174-181.
- Beynon, R. J., Bond J. S. (2001). Proteolytic enzymes: a practical approach. 2nd ed, Oxford University Press, Oxford.
- Bialczyk, J., Lechowski, Z., Dzigala, D. (2004). Composition of the xylem sap of tomato seedlings cultivated on media with HCO₃⁻ and nitrogen source as NO₃⁻ or NH₄⁺. *Plant Soil*, 263, 265-272.
- Bindschedler, L. V., Sanchez, P., Dunn, S., Mikan, J., Thangavelu, M., Clarkson, J. M., Cooper, R. M. (2003). Deletion of the SNP1 trypsin protease from *Stagonospora nodorum* reveals another major protease expressed during infection. *Fungal Genetics and Biology*, 38, 43-53.
- Bittel, P., Robatzek, S. (2007). Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10, 335-341.

- Blackwell, J. R., Horgan, R. (1991). A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett.*, *295*, 10-12.
- Block, A. (2011). Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr. Opin. Microbiol.*, *14*, 39-46.
- Bohlman, H. (1994). The role of thionins in plant protection. *Crit. Rev. Plant Sci.*, *13*, 1-16.
- Bonas, U., Conrads-Strauch, J., Balbo, I. (1993). Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBs3*. *Mol. Gen. Genet.*, *238*, 261-269.
- Bonas, U., Lahaye, T. (2002). Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: Refined models of specific recognition. *Curr. Opin. Microbiol.*, *5*, 44-50.
- Bonshtien, A., Lev, A., Gibly, A., Debbie, P., Avni, A., Sessa, G. (2005). Molecular properties of the *Xanthomonas* AvrRxv effector and global transcriptional changes determined by its expression in resistant tomato plants. *MPMI*, *18*, 300-310.
- Borg-von Zepelin M, Meyer I, Thomssen R, Würzner R, Sanglard D, Telenti A, Monod M. (1999). HIV-Protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. *J. Invest. Dermatol.*, *113*, 747-751.
- Boyd, P. M., Barnaby, N., Tan-Wilson, A., Wilson, K. A (2002). Cleavage specificity of the subtilisin-like protease C1 from soybean. *Biochim. Biophys. Acta*, *1596*, 269-282.
- Boyer, E. W., Ingle, M. B. (1972). Extracellular alkaline amylase from a *Bacillus* species *J. Bacteriol.*, *110*, 992-1000.
- Brown, W. E., Wold, F. (1973). Alkyl isocyanates as active site specific reagents for serine proteases. Reaction properties. *Biochemistry*, *12*, 828-835.
- Brown, D. G., Allen, C. (2004). *Ralstonia solanacearum* genes induced during growth in tomato. An inside view of bacterial wilt. *Mol. Microbiol.*, *53*, 1641-1660.
- Bukau, B., Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, *92*, 351-366.
- Burger, A., Gräfen, I., Engemann, J., Niermann, E., Pieper, M., Kirchner, O., et al. (2005). Identification of homologues to the pathogenicity factor, Pat-1, a putative serine protease of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Microbiol. Res.*, *160*, 417-427.
- Callis, J. (1995). Regulation of protein degradation. *Plant Cell*, *7*, 845-857.
- Carlile, A. J., Bindschedler, L. V., Bailey, A. M., Bowyer, P., Clarkson, J. M., Cooper, R. M. (2000). Characterization of SNP1, a cell wall-degrading trypsin, produced during infection by *Stagonospora nodorum*. *Mol. Plant Microbe Interaction*, *13*, 538-550.

- Carlson, R. R., 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.
- Cedzich, A., Huttenlocher, F., Kuhn, B. M., Pfannstiel, J., Gabler, L., Stintzi, A., Schaller, A. (2009). The protease-associated domain and C-terminal extension are required for zymogen processing, sorting within the secretory pathway, and activity of tomato subtilase 3 (SISBT3). *J. Biol. Chem.*, 284, 14068-14078.
- Chalupowicz, L., Cohen-Kandli, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K.-H., Sessa, G., et al. (2010). Sequential expression of bacterial virulence and plant defense genes during infection of tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 100, 252-261.
- Charney, J., Tomarelli R. M. (1947). A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chem.*, 171, 501-505.
- Chisholm, S. T., Dahlbeck, D., Krishnamurthy, N., Day, B., Sjolander, K., Staskawicz, B. J. (2004). Molecular characterization of proteolytic cleavage sites of the *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 2087-2092.
- Chiu, H.-C., Zalipsky, S., Kopečková, P., Kopeček, J. (1993). Enzymatic activity of Chymotrypsin and its poly- (ethylene glycol) conjugates toward low and high molecular weight substrates. *Bioconjugate Chem.*, 4, 290-295.
- Ciesiolka, L.D., Hwin, T., Gearlds, J. D., Minsavage, G. V., Saenz, R., Bravo, M., Handley, V., Conover, S. M., Zhang, H., Caporgno, J., Phengrasamy, N. B., Toms, A. O., Stall, R. E., Whalen, M. C. (1999). Regulation of expression of avirulence gene *avrRxv* and identification of a family of host Interaction factors by sequence analysis of *avrBsT*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 12, 35-44.
- Chosed, R., Tomchick, D.R., Brautigam, C.A., Mukherjee, S., Negi, V.S., Machius, M., Orth, K. (2007). Structural analysis of *Xanthomonas* XopD provides insights into substrate specificity of ubiquitinlike protein proteases. *J. Biol. Chem.*, 282, 6773-6782.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Hsu, L. (1972): Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2110-2114.
- Collmer, A., Ried, J., Mount, M. (1988). Assay methods for pectic enzymes. *Methods Enzymology*, 161, 329-336.
- Cornelis, G., Van Gijsegem, F. (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54, 735-774.
- Cosgrove, D. (1998). Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiol.*, 118, 333-339.

- Dai, W. J., Zeng, Y., Xie, Z.-P., Staehelin, C (2008). Symbiosis-promoting and deleterious effects of NopT, a novel type 3 effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J. Bacteriol.*, *190*, 5101-5110.
- Danhash N., Wagemakers C. A. M, Van Kan, J. A. L., De Wit, P. J. G. M (1993). Molecular characterization of four chitinase cDNAs obtained from *Cladosporium fulvum*-infected tomato. *Plant Mol.Biol.*, *22*, 1017-1029.
- Datar, R. V., Cartwright, T., Rosen, C.-G. (1993). Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Biotechnology.*, *11*, 349-357.
- Davis, M., Gillaspie, A., Vidaver, A., Harris, R. (1984). *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov. pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. *Int. J. Syst. Bact.*, *34*, 107-117.
- Deisenhofer, J., Jones, T. A., Huber, R. (1978). Crystallization, crystal structure analysis and atomic model of the complex formed by a human Fc fragment and fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, *359*, 975-985.
- Dempsey, D. A., Shah, J., Klessig, D. F. (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Rev. Plant Sci.*, *18*, 547-575.
- de Wit, P. J. (2007). How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol. Life Sci.*, *64*, 2726-32.
- Dickhut, A. (2003). Erzeugung von Insertionsmutanten der gene *bipA* und *oppDF* von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Charakterisierung der Mutanten. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Di Pietro, A., Huertas-González, M. D., Gutierrez-Corona, J. F., Martínez-Cadena, G., Méglecz, E., Roncero, M. I. G. (2001). Molecular characterization of a subtilase from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *MPMI*, *14*, 653-662.
- Dreier, J. (1995). Molekulargenetische Analyse der *pat-1* Region des Plasmids pCM2 von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Entwicklung diagnostischer Nachweisverfahren. Dissertation, Lehrstuhl für Mikrobiologie und Gentechnologie, Universität Bielefeld.
- Dreier, J., Meletus, D., Eichenlaub, R. (1997). Characterization of the plasmid encoded virulence region *pat-1* of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, *10*, 195-206.

- Doke N. (1997). The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress. In JG Scandalios, ed, Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defences. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 785-813.
- Dong, H., Nilsson, L., Kurland, C. (1996). Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *J. Mol. Biol.*, 260, 649-663.
- Dow, J. M., Clarke B. R., Milligan, D. E., Tang, J. L., Daniels, M. (1990). Extracellular proteases from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the black rot pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2994-2998.
- Dow, M., Newman, M., von Roepenack, E. (2000). The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharids. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 38, 241-261.
- Downen, R. H., Engel, J. L., Shao, F., Ecker, J. R., Dixon, J. E. (2009). A family of bacterial cysteine protease type III effectors utilizes acylation-dependent and -independent strategies to localize to plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, 284, 15867-15879.
- Duncan, E. A., Brown, M.S., Goldstein, J. L., Sakai, J. (1997). Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a Leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Biol. Chem.*, 272, 12778-12785.
- Ebel, J., Scheel, D. (1997). Signals in host-parasite interactions. *The Mycota., Plant Relationships, Part A.*, 85-105.
- Eder, J. and Fersht, A. R. (1995). Pro-sequence-assisted protein folding. *Mol. Microbiol.*, 16, 609-614.
- Eichenlaub, R., Gartemann, K.-H. (2011). The *Clavibacter michiganensis* subspecies, molecular investigation of Gram-positive bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 7.1-7.20.
- Engemann, J. (2006). Charakterisierung des Peroxiredoxins Bcp von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Dissertation, Lehrstuhl für Gentechnologie/Mikrobiologie der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld.
- Epple, P., Apel, K., Bohlmann, H. (1997). Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell*, 9, 509-520.
- Escolar, L., Van Den Ackerveken, G., Pieplow, S., Rossier, O., Bonas, U. (2001). Type III secretion and *in planta* recognition of the *Xanthomonas* avirulence proteins AvrBs1 and AvrBsT. *Mol. Plant Pathol.*, 5, 287-296.
- Fatmi, M., Schaad, N. (2002). Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathol.*, 51, 149-154.

Felix, G., Duran, J. D., Volko, S., Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.*, *18*, 265–276.

Felix, G., Boller, T. (2003). Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J. Biol. Chem.*, *278*, 6201-6208.

Fernandez-Espla, M. D., Garault, P., Monnet, V., Rul, F. (2000). *Streptococcus thermophilus* cell wall anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microbiol.*, *66*, 4772-4778.

Ferrer, M., Chernikova, T. N., Yakimov, M., Golyshin, P. N., Timmis, K. N. (2003). Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nat. Biotechnol.* *21*, 1266-1267.

Fischer, E. (1894): Einfluß der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Chem.Ber.*, *27*, 2985-2993.

Flor, H. (1955). Host-parasite interaction in flax rust—its genetics and other implications. *Phytopathology*, *45*, 680-685.

Flor, H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *9*, 275-296.

Flügel, M., Becker, A., Gartemann, K.-H., Eichenlaub, R. (2012). Analysis of the interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with its host plant tomato by genome-wide expression profiling. *J. Biotechnol.* [dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.01.023](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.01.023).

Fuller, R. S., Brake A., Thorner, J. (1989). Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca²⁺-dependent serine protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *86*, 1434-1438.

Gartemann, K.-H. (1992): Sequenzierung und Analyse der Dehalogenase-Gene von *Arthrobacter* Spezies. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie und Gentechnologie, Fakultät Biologie, Universität Bielefeld.

Gartemann, K.-H., Eichenlaub, R. (2001). Isolation and characterization of IS1409, an insertion element of 4-chlorbenzoate-degrading *Arthrobacter* sp. strain TM1 and development of a system for transposon mutagenesis. *J. Bacteriol.*, *183*, 3729-3736.

Gartemann, K.-H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flugel, M., et al. (2008). The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J. Bacteriol.*, *190*, 2138-2149.

Gelli A., Higgins V. J., Blumwald E. (1997). Activation of plant plasma membrane Ca²⁺-permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiol.*, *113*, 269-279.

- Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imal, B.S., Mische, S. M. (1999). Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis*, 20, 601-605.
- Gomez-Gomez, L., Boller, T. (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.*, 7, 251-256.
- Gottesman, S. (1996). Proteases: and their targets in *Escherichia*. *Annu. Rev. Genet.*, 30, 465–506.
- Gottesman, S., Wickner, S., and Maurizi, M.R. (1997). Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev.*, 11, 815–823.
- Gräfen, I. (2005). Identifizierung eines Gens von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* für die Kolonisation von *Solanum lycopersicum*. Dissertation, Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Grant, S., Jessee, J., Bloom, F., Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* metylaton-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4645-4649.
- Green, A. A., Hughes, W. L. (1955). *Method in Enzymology*, 67.
- Hamilton, J. M. U., Simpson, D. J., Hyman, S. C., Ndimba, B. K., Slabas, A. R. (2003). Ara12 subtilisin-like protease from *Arabidopsis thaliana*: purification, substrat specificity and tissue localization. *Biochem. J.*, 370, 57-67.
- Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. G. (1997). Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 575-607.
- Hanania, U., Furman-Matarasso, N., Ron, M., Avni, A. (1999). Isolation of a novel SUMO protein from tomato that suppresses EIX-induced cell death. *Plant J.*, 19, 533-541.
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381, 571-580.
- Hayashi, K., Inoue, Y., Shiga, M. Sato, S. I., Takano, R., Hirayae, K., Hibi, T., Hara, S. (1997). Pectinolytic enzymes from *Pseudomonas marginalis*. *Phytochem.*, 45, 1359-1363.
- He, S. Y., Huang, H. C., Collmer, A. (1993). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin_{PS5}: A protein that is secreted via the hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell*, 73, 1255-1266.
- Heath, M. C. (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3, 315-9.
- Hedstrom L., Szilagyi L., Rutter, W. (1992). Converting trypsin to chymotrypsin: The role of surface loops. *Science*, 255, 1249-1253.

- Heilbronn, J., Johnston, J., Dunbar, B., Lyon, G. D. (1995). Purification of a metalloprotease by *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* and the degradation of potato lectin *in vitro*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, *47*, 285-292.
- Hendershot, L. M. (2004). The ER function BiP is a master regulator of ER function. *The Mount Sinai Journal of Medicine*, *71*, 289-297.
- Hong, J. K., Jung, H. W., Kim, Y. J. & Hwang, B. K. (2000). Pepper gene encoding a basic class II chitinase is inducible by pathogen and ethephon. *Plant Science*, *159*, 39-49.
- 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., Schrempf, H. (1985): Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. *John Innes Foundation, Norwich, U.K.*
- Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K., Mudgett, M. B. (2003). *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins *in planta*. *Mol. Microbiol.*, *50*, 377-389.
- Jabs, T., Dietrich, R. A., Dangl, J. L. (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science*, *273*, 1853-1856.
- Jabs T., Tschöpe M., Colling C., Hahlbrock K., Scheel D. (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O²⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, *94*, 4800-4805.
- Jacob, U., Muse, W., Eser, M., Bardwell, J. C. A. (1999). Chaperone activity with a redox switch. *Cell*, *96*, 341-352.
- Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R., Eichenlaub, R. (2000). The endo-beta-1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.*, *13*, 703-714.
- Janzik, I., Macheroux, P., Amrehin, N., Schaller, A. (2000). LeSBT1, a Subtilase from Tomato Plants. *J. Biol. Chem.*, *18*, 5193-5199.
- Jaton-Ogay, K., Paris, S., Huerre, M., Quadroni, M., Falchetto, R., Tongi, G., Latge, J. P., Monod, M. (1994). Cloning and disruption of the gene encoding an extracellular Metalloprotease of *Aspergillus fumigates*. *Mol. Microbiol.*, *14*, 917-928.
- Jauneau A., Morvan O., Morvan C., Demarty M., Devauchelle G. (1986). Demonstration of pectin-lyase in *Bacillus subtilis*. *C. R. Acad. Sci. Iii.*, *302*, 641-660.
- Jeong, Y., Cheong, H., Choi, O., Kim, J. K., Kang, Y., Kim, J., Lee, S., Koh, S., Moon, J. S., Hwang, I. (2011). A HrpB-dependent but type III-independent extracellular aspartic protease is a virulence factor of *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Plant Pathol.*, *12*, 373-380.
- Jones, J., Dangl, J. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*, 323-329.

- Jordá, L., Coego, A., Conejero, V., Vera, P. (1999). A genomic cluster containing four differentially regulated subtilisin-like processing protease genes is in tomato plants. *J. Biol. Chem.*, 274, 2360-2365.
- Jordá, L., Vera, P. (2000). Local and systematic induction of two defense-related subtilisin-like protease promoters in transgenic *Arabidopsis* plants. Luciferin induction of PR gene expression. *Plant Physiol.*, 124, 1049-1057.
- Jordá, L., Conejero, V., Vera, P. (2000). Characterization of two differentially regulated genes (P69E and P69F) encoding new members of the subtilisin-like protease clan from tomato plants. *Plant Physiol.*, 122, 67-74.
- Julius, D., Blair, L., Brake, A., Sprague, G., Thorner, J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell*, 37, 1074-1089.
- Jung, H. W., Hwang, B. K. (2000). Pepper gene encoding a basic β -1,3-glucanase is differentially expressed in pepper tissues upon pathogen infection and ethephon or methyl jasmonate treatment. *Plant Science*, 159, 97-106.
- Kambara, K., Ardisson, S., Kobayashi, H., Saad, M. M., Schumpp, O., Broughton, W. J., Deakin, W. J. (2009). Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis. *Mol. Microbiol.*, 71, 92-106.
- Kane, J. F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6, 494-500.
- Kaup, O., Grafen, I., Zellermann, E., Eichenlaub, R., Gartemann, K. (2005). Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 18, 1090-1098.
- Kessler, E., Safrin, M. (1994) The propeptide of *Pseudomonas aeruginosa* elastase acts as an elastase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 269, 22726-22731.
- Kim, P. S., P. Arvan (1998). Endocrinopathies in the family of endoplasmic reticulum (ER) storage diseases: disorders of protein trafficking and the role of ER molecular chaperones. *Endocrine Rev.*, 19, 173-202.
- Kirchner, O., Gartemann, K.-H., Zellermann, E.-M., Eichenlaub, R., Burger, A. (2001). A highly efficient transposon mutagenesis system for the tomato pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 14, 216-228.
- Kirchner, O. (2003). Etablierung genetischer Methoden für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Charakterisierung von Mutanten mit veränderter Morphologie, Physiologie und Virulenz. Dissertation, Lehrstuhl für Mikrobiologie und Gentechnologie, Universität Bielefeld.

- Kita, N., Boyd, C. M., Garrett, M. R., Journak, F., Keen, N. T. (1996). Differential effect of site-directed mutations in PelC of pectate lyase activity, plant tissue maceration, and elicitor activity. *J. Biol. Chem.*, 271, 26529–26535.
- Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J., Yvin, J., Kopp, M., Kloareg, B., et al. (2000). Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol.*, 124, 1027-1038.
- Kleitman, F., Barash, I., Burger, A., Iraki, N., Falah, Y., Sessa, G., et al. (2008). Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *Eur. J. Plant Pathol.*, 121, 463-475.
- Klute, A. (2011). Isolierung und Charakterisierung sekretierter Proteine von *Piriformospora indica* während der Besiedlung von *Arabidopsis* Wurzeln. Dissertation, Fakultät für Phytopathologie und angewandte Zoologie, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Kolattukudy, P. E., Lee, J. D., Rogers, L. M., Zimmerman, P., Ceselski, S., Fox, B., Stein, B., Copelan, E. A. (1993). Evidence for possible involvement of an elastolytic serine protease in aspergillosis. *Infect. Immun.*, 61, 2357-2368.
- Kurepa, J., Walker, J. M., Smalle, J., Mark M. Gosink, M. M., Davis, S. J., Durham, T. L., Yul Sung, D., Vierstra, R. D. (2003). The SUMO protein modification system in *Arabidopsis*: accumulation of SUMO1 and 2 conjugates is increased by stress. *J. Biol. Chem.*, 278, 6862-6872.
- Kwon, H. J., Lagace, T. A., McNutt, M. C., Horton, J. D., Deisenhofer, J. (2008). Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 1820-1825.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laine, M. J., Nakhei, H., Dreier, J., Meletzus, D., Eichenlaub, R., 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.
- Lamb, C., Dixon, R. A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 251-275.
- Lay, F. T., Anderson, M. A. (2005). Defensins - Components of the innate immune system in plants. *Current Protein & Peptide Science*, 6, 85-101.
- Legendre, L., Heinstejn, P. F., Low, P. S. (1992). Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. *J. Biol. Chem.*, 267, 20140-20147.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. A., Lamb, C. J. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive response. *Cell*, 79, 583-593.

Levine, M.W., Cleland, B.G., Mukherjee, P., Kaplan, E. (1996). Tailoring of variability in the lateral geniculate nucleus of the cat. *Biol. Cybern.*, 75, 219-227.

Liu, Y., Bolen, D. W. (1995). The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. *Biochem.*, 34, 12884-12891.

López-Solanilla, E., Bronstein, P. A., Schneider, A. R., Collmer, A. (2004). HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions. *Mol. Microbiol.*, 54, 353–365.

Lund, S. T., Stall R. E., Klee, H. J. (1998). Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell*, 10, 371-382.

Mackey, D., Belkhadir, Y., M. Alonso, J. M., Ecker, J. R., Jeffery L. Dang (2003). *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell*, 112, 379-389.

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., Genereux, H. (1981). Ring rot. In: Hooker, W. J. (Ed.), Compendium of potato diseases. *American Phytopathological Society, St. Paul, Minn., U.S.A.*, 31-33.

Martis, R., Kõiv, V., Laasi, E., Mäe, A. (1999). Isolation of an extracellular protease gene of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain SCC3193 by transposon mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity. *Microbiology*, 145, 1959-1966.

Mayer, K. (2006). Versuche zur Identifikation regulatorischer Proteine bei *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.

McCulloch, L. (1925). *Aplanobacter insidiosum* n. sp., the cause of an alfalfa disease. *Phytopathology*, 15, 496-497.

Meichtry, J., Amrhein, N., Schaller, A. (1999). Characterization of the subtilase gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Mol. Biology*, 39, 749-760.

Meletzus, D., Eichenlaub, R. (1991). Transformation of the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* by electroporation and development of a cloning vector. *J. Bacteriol.*, 173, 184-190.

Meletzus, D., 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.

- Messens, J., Collet, J. F. (2006). Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Internat. J. Biochem. Cell Biol.*, *38*, 1050-1062.
- Meyer, F., Goesmann, A., McHardy, A., Bartels, D., Bekel, T., Clausen, J., et al. (2003). GenDB - an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res.*, *31*, 2187-2195.
- Molia, A., Matsumoto, K., Oyamada, I., Katsuki, T., Maeda, H. (1986). Degradation of protease inhibitors, immunoglobulins, and other serum proteins by *Serratia* protease and its toxicity to fibroblasts in culture. *Infect. Immun.*, *53*, 522-529.
- Morrissey, J. P., Osbourn, A. E. (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, *3*, 708-724.
- Müller, M., Klösgen, R. B. (2005). The Tat pathway in bacteria and chloroplasts. *Mol. Membr. Biol.*, *22*, 113-121.
- Nakhei, H. (1993). Entwicklung eines Vektorsystems für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* auf Basis des Plasmides pCM2. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Neu, H. C. (1983). The role of *Pseudomonas aeruginosa* in infections. *J. Antimicrob. Chem.*, *11*, 1-13.
- Niermann, E. (1997). Ortsspezifische Mutagenese der *pat-1* Region des Plasmids pCM2 von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Nissinen, R., Lai, F.-M., Laine, M. J., Bauer, P. J., Reilley, A. A., Li, X., De Boer, S. H., Ishimaru, C. A., Metzler, M. C. (1997). *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* elicits a hypersensitive response in tobacco and secretes hypersensitive response-inducing protein(s). *Phytopathology*, *87*, 678-684.
- Nissinen, R., Xia, Y., Mattinen, L., Ishimaru, C. A., Knudson, D. L., Knudson, S. E., Metzler, M., Pirhonen, M. (2009). The putative secreted serine protease Chp-7 is required for full virulence and induction of a nonhost hypersensitive response by *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interact.*, *7*, 809-819.
- Northrop, J. H., Kunitz, M., Herriott, R. M. (1939). Crystalline Enzymes. *New York: Columbia University Press*.
- O'Donohue, M. J., Beaumont, A. (1996). The roles of the prosequence of thermolysin in enzyme inhibition and folding in vitro. *J. Biol. Chem.*, *271*, 26477-26481.
- Olivieri, F., Zanetti, M. E., Oliva, C. R., Covarrubias, A. A., Casalengué, C. A. (2001). Characterization of an extracellular serine protease of *Fusarium eumartii* and its action on pathogenesis related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.*, *108*, 63-72.

- Osbourn, A. (1996): Preformed antimicrobial compounds and plant defense fungal attack. *Plant Cell*, *8*, 1821-1831.
- Papadopoulou, K., Melton, R. E., Leggett, M., Daniels, M. J. und Osbourn, A. E. (1999). Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *96*, 12923-12928.
- Passardi, F., Penel, C., Dunand, C. (2004). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.*, *9*, 534-540.
- Paton, A. W., Srimanote, P., Talbot, U. M., Wang, H., Paton, J. C. (2004). A new family of potent AB5 cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J. Experimental Med.*, *200*, 35-46.
- Paton, A. W., Beddoe, T., Thorpe, C. M., Whisstock, J. C., Wilce, M. C. J., Rossjohn, J., Talbot, U. M., Paton, J. C. (2006). AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BIP. *Nature*, *443*, 548-552.
- Power, S. D., Adams, R. M., Wells, J. A. (1986). Secretion and autoproteolytic maturation of subtilisin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *83*, 3096–3100.
- Pederson, J., Mileski, G. J., Weimer, B. C., Steele, J. L. (1999). Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J. Bacteriol.*, *181*, 4592-4597.
- Perkampus, H.-H. (1992). UV-VIS Atlas of organic compounds. Wiley-VCH Verlag, 2. Auflage, Weinheim, New York.
- Perona, J. J., Craik, C. S. (1995). Structural basis of substrate specificity in the serine proteinases. *Protein Sci.*, *4*, 337-360.
- Poljak, R. J., Amzel, L. M., Avey, H. P., Chen, B. L., Phizackerley, R. P., Saul, F. (1973). Three-dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2.8-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, *70*, 3305-3310.
- Preston, G., Huang, H.-C., He, S. Y., Collmer, A. (1995). The HrpZ proteins of *Pseudomonas syringae* pvs. *syringae*, *glycinea*, and *tomato* are encoded by an operon containing *Yersinia ysc* homologs and elicit the hypersensitive response in tomato but not in soybean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* *8*: 717-732.
- Pugin, A., Frachisse, J.-M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R., Guern, J. (1997). Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant Cell*, *9*, 2077-2091.
- Pugsley, A. P. (1993). The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, *57*, 50-108.

- Raab, W., Högl, F. (1981). Inhibition of enzymatic activities by antifungal imidazole derivatives. *Mycoses*, *24*, 525-533.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J. (1994). Families of serine peptidases. *Methods Enzymol.*, *244*, 19-61.
- Rawlings, N. D., Morton, F. R., Barrett, A. J. (2006). MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Res.*, *34*, 270-272.
- Redman, R. S., Rodriguez, R. J. (2002). Characterization and isolation of an extracellular serine protease from the tomato pathogen *Colletotrichum coccodes*, and its role in pathogenicity. *Mycological Res.*, *106*, 1427–1434.
- Rehner, G., Daniel, H. (2010). Biochemie der Ernährung. Gabler Wissenschaftsverlage.
- Ried, J. L., Collmer, A. (1986). Comparison of pectic enzymes produced by *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, *52*, 305-310.
- Rose, R., Schaller, A., Ottmann, C. (2010). Structural features of plant subtilases. *Plant Signaling Behavior*, *5*, 180-183.
- Rudolph, R., Lillie, H. (1996). *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J.*, *10*, 49-56.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H. Y., Hunt, M. D. (1996). Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell.*, *8*, 1809-1819.
- Sakai, J., Rawson, R. B., Espenshade, P. J., Cheng, D., Seegmiller, A. C., Goldstein, J. L., Brown, M., S (1998). Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Molecular Cell*, *2*, 505-514.
- Sanabria, N., Goring, D., Nürnberger, T., Dubery, I. (2008). Self/nonself perception and recognition mechanisms in plants: a comparison of self-incompatibility and innate immunity. *New Phytologist*, *178*, 503-513.
- Sandeman, R. M., Feehan, J.P., Chandler, R.A., Bowles, V.M. (1990). Tryptic and chymotryptic proteases released by larvae of the blowfly, *Lucilia cuprina*. *Internat. J. Parasitol.*, *20*, 1019-1023.
- Savidor, A., Teper, D., Gartemann, K. H., Eichenlaub, R., Chalupowicz, L., Manulis-Sasson, S., Barash, I., Tews, H., Mayer, K., Giannone, R. J., Hettich, R. L., Sessa, G. (2012). The *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-tomato interactome reveals perception of pathogen by host and suggests mechanisms of infection. *J. Proteome Res.*, *11*, 736-750.
- Schaller, A., Roy, P., Amrhein, N. (2000). Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related gene expression by fusicoccin. *Planta*, *210*, 599-606.

Schaller, A. (2004). A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta*, **220**, 183-197.

Schauer, K. (2004). Genetische und biochemische Analyse der Exopolysaccharid-Biosynthese von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Untersuchung ihrer Rolle in der Pathogenität. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.

Schein, C. H. (1989). Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Nature Biotechnology*, **7**, 1141-1149.

Schliess, F., Wiese, S., Häussinger, D. (1999). Osmotic regulation of the heat shock response in H4IIE rat hepatoma cells. *FASEB J.*, **13**, 1557-1564.

Schott, S. (2004). Charakterisierung von Transposonmutanten von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* mit veränderter Virulenz. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.

Schröder, M., Hahlbrock, K., Kombrink, E. (1992). Temporal and spatial patterns of 1,3- β -glucanase and chitinase induction in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. *Plant J.*, **2**, 161-172.

Schuster, M. L. (1975). Leaf freckles and wilt of corn incited by *Corynebacterium nebraskense* 1972. *Institute of Agriculture and Natural Resources*. UNL Research Bulletin 270.

Seidah, N. G., Chretien, M. (1999). Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.*, **848**, 45-62.

Seidah, N. G., Mowla, S. J., Hamelin, J., Mamarbachi, A. M., Benjannet, S., Touré, B. B., Basak, A., Munzer, J. S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M., Barale, J.-C., Lazure, C., Murphy, R. A., Chrétien, M., M. Marcinkiewicz (1999). Mammalian subtilisin/kexin isoenzyme SKI-1: a widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1321-1326.

Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Bélanger, S., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., Chrétien, M. (2003). The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 928-933.

Seidah, N. G., Khatib, A. M., Prat, A. (2006). The proprotein convertases and their implication in sterol and/or lipid metabolism. *Biol. Chem.*, **387**, 871-877.

Seidah, N.G., Prat, A. (2007). The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J. Molecular Medicine*, **85**, 685-696.

- Shao, F., Merritt, P. M., Bao, Z., Innes, R. W., Dixon, J. E. (2002). A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell*, 109, 575-588.
- Shcherban, T., Shi, J., Durchko, D., Guiltinan, M., McQueen-Mason, S., Shieh, M., et al. (1995). Molecular cloning and sequence analysis of expansions- a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 9245-9249.
- Shinde, U. P., Lui, J. J., Inoye, M. (1997). Protein memory through altered folding mediate by intramolecular chaperons. *Nature*, 389, 520-522.
- Shirakawa, T., Sasaki, T., Ozaki, K. (1991): Ecology and control of tomato bacterial canker and detection methods of this pathogen. *Jpn. Agric. Res. Quart.*, 25, 27-32.
- Shirley A. M., McMichael C. M., Chapple C. (2001). The sng2 mutant of *Arabidopsis* is defective in the gene encoding the serine carboxypeptidase-like protein sinapoylglucose:choline sinapoyltransferase. *Plant J.*, 28, 83-94.
- Shirley, A. M., Chapple, C. (2003). Biochemical characterization of sinapoylglucose:choline sinapoyltransferase, a serine carboxypeptidase-like protein that functions as an acyltransferase. *Plant Sec. Metabol.*, 278, 19870-19877.
- Siezen, R. J., de Vos, W.M., Leunissen, J. A. M., Dijkstra, B. W. (1991). Homology modeling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteases. *Protein Eng.*, 4, 719-737.
- Siezen R. J., Leunissen J. A. M., Shinde, U. (1995). Homology analysis of the propeptides of subtilisin-like serine proteases (subtilases). In: *Shinde U (ed) Intramolecular Chaperons and Folding*, 231-253. R. G. Landes Company, Austin, USA.
- Siezen, R. J., Leunissen, J. A. M. (1997). Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci.*, 6, 501-523.
- Simpson, A., Reinach, F., Arruda, P., Abreu, F., Acencio, M., Alvarenga, R., et al. (2000). The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, 406, 151-159.
- Sitte, P., Strasburger, E. (1999). Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Heidelberg; Berlin, Spektrum Akad. Verl.
- Skorpil, P., Saad, M. M., Boukli, N. M., Kobayashi, H., Ares-Orpel, F., Broughton, W. J., Deakin, W. J. (2005). NopP, a phosphorylated effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii*. *Mol Microbiol.*, 57, 1304-1317.
- Smith, E. F. (1910): A new tomato disease of economic importance. *Science*, 31, 794-796.

- Spiess (1999). Amylase MalS und Protease DegP aus *Escherichia coli*: Faltung und Abbau unter Kontrolle der Temperatur. Dissertation, Fakultät für Biologie, Universität Konstanz.
- Sreedhar, L., Kobayashi, D. Y., Bunting, T. E., Hillman, B. I., Belanger, F. C. (1999). Fungal protease expression in the interaction of the plant pathogen *Magnaporthe poae* with its host. *Gene*, 235, 121-129.
- Stackebrandt, E., Rainey, F., Ward-Rainey, N. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 47, 479-491.
- Steingröver, M. (2003). Charakterisierung der *chp*-Region von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Stewart, E. J., Åslund, F., Beckwith, J. (1998). Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an *in vivo* role reversal for the thioredoxins. *EMBO J.*, 17, 5543-5550.
- Stolov, A., Valverde, A., Ronald, P., Burdman, S. (2006). Purification of soluble and active RaxH, a transmembrane histidin protein kinase from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* required for AvrXa21 activity. *Mol. Plant Pathol.*, 8, 93-101.
- Stork, I., Gartemann, K.-H., Burger, A., Eichenlaub, R. (2008). A family of serine proteases of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: *chpC* plays a role in colonization of the host plant tomato. *Mol. Plant Pathol.*, 9, 599-608.
- Strauch, K. L., K. Johnson, Beckwith, J. (1989). Characterization of *degP*, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *Bacteriol.*, 171, 2689-2696.
- Strider, D. (1969). Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. A literature review and bibliography. *North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin*, 193.
- Studier, F. W., Moffat, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, 189, 113-130.
- Svendsen, L., Stocker, K. (1977) New methods for the analysis of coagulation using chromogenic substrates (I. Witt, ed.), Berlin-New York: W. de Gruyter, 23-35.
- Tabor, S., Richardson, C. (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 1074–1078.
- Tanaka, H., Onouchi, H., Kondo, M., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., Machida, C., Machida, Y. (2001). A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in *Arabidopsis* embryos and juvenile plants. *Development*, 128, 4681-4689.

- Tauch, A., Zheng, Z., Pühler, A., Kalinowski, J. (1998). The *Corynebacterium striatum* resistance transposon Tn5564: genetic organization and transposition in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, *40*, 126-139.
- Tenhaken, R., Levine, A., Brisson, L.F., Dixon, R.A., Lamb, C. (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *92*, 4158-4163.
- Tews (2012). Das Exoproteom von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Untersuchung von Mutanten im Sec- und Tat-Sekretionssystem. Dissertation, Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Thomma, B. P., Penninckx, I. A., Broekaert, W. F., Cammue, B. P. (2001) The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol.*, *13*, 63-68.
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. (1997). CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, *25*, 4876-82.
- Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., Collinge D. B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barleypowdery mildew interaction. *Plant J.*, *11*, 1187-1194.
- Thorner, J. (1985). Pheromone-processing protease of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, *314*, 384-385.
- Tian, L., Greenberg, S. A., Kong, S. W., Altschuler, J., Kohane, I. S., Park, P. J. (2005) Discovering statistically significant pathways in expression profiling studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *102*, 13544-13549.
- Tornero, P., Conejero, V., Vera, P. (1996). Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *93*, 6332-6337.
- Tornero, P., Conejero, V., Vera, P. (1997a). Identification of a new pathogen-induced member of the subtilisin-like processing protease family from plants. *J. Biol. Chem.*, *272*, 14412-14419.
- Tornero, P., Gadea, J., Conejero, V., Vera, P. (1997b). Two PR-1 genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis-related gene during the hypersensitive response and development. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, *10*, 624-634.
- Tsiantos, J. (1987). Transmission of *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. *J. Phytopathol.*, *119*, 142-146.
- Ueland, P. M., Holm, P. I., Hustad, S. (2005). Betaine: a key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status. *Clin. Chem. Lab. Med.*, *43*, 1069-1075.

- Ujwal, S., Masayori, I. (1996) Propeptide-mediated folding in subtilisin: the intramolecular chaperone concept. *Pract. Protein Engin.*, 379, 147-154.
- Vallejo, L. F., Rinas, U. (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb. Cell Fact.*, 3, 11.
- Vera, P., Conejero, V. (1988). Pathogenesis-related proteins of tomato - P-69 as an alkaline endoproteinase. *Plant Physiol.*, 87, 58-63.
- Vidaver, A.K., Mandel, M. (1974). *Corynebacterium nebraskense*, a new, orange-pigmented phytopathogenic species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24, 482-485.
- Vidaver, A. (1982). The plant pathogenic corynebacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 36, 495-517.
- Vieira, J., Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for intertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 19, 259-268.
- Visick, J. E., Clarke, S. (1995). Repair, refold, recycle: how bacteria can deal with spontaneous and environmental damage to proteins. *Mol. Microbiol.*, 16, 835-845.
- von Groll, U., Berger, D., Altmann, T. (2002): The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during *Arabidopsis* stomatal development. *Plant Cell*, 14, 1527-1539.
- van Loon, L. C., Rep, M., Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 135-162.
- Wallis, F. (1977). Ultrastructural histopathology of tomato plants infected with *Corynebacterium michiganense*. *Physiol. Plant Pathol.*, 13, 333-342.
- Wei, Z. M., Laby, R. J., Zumoff, C. H., Bauer, D. W., He, S. Y., Collmer, A., Beer, S. V. (1992b). Harpin, elicitor, of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 257, 58-88.
- Wettstein, M., Häussinger, D. (1997). Cytoprotection by the osmolytes betaine and taurine in ischemia-reoxygenation injury in the perfused rat liver. *Hepatology*, 126, 1560-1566.
- White, F., Potnis, N., Jones, J., Koebnik, R. (2009). The type III effectors of *Xanthomonas*. *Mol. Plant Pathol.*, 10, 749-766.
- Wiederanders, B., Kaulmann, G., Schilling, K. (2003). Functions of propeptide parts in cysteine proteases. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 4, 309-326.
- Wu, T., Kabat, E. A. (1970). An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J. Exp. Med.*, 132, 211-250.

Xing, T., Higgins, V. J., Blumwald, E. (1997). Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells. *Plant Cell*, 9, 249-259.

Yamaguchi, I., Yamada, A., Hong, N., Ogawa, T., Ishii, T., Shibuya, N. (2000). Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: beta-glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension cultured rice cells. *Plant Cell*, 12, 817-826.

Zeidler, D., Zahringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., et al. (2004). Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 15811-15816.

Zhang, X. Cui, Z., Hong, Q., Li, S. P. (2005). High-level expression and secretion of methyl parathion hydrolase in *Bacillus subtilis* WB800. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 4101-4103.

Zheng, M., Åslund, F., Storz, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science*, 279, 1718-1721.

Zhou, J., Lob, Y.-T., Bressan, R. A., Martin, G. B. (1995). The tomato gene *pti1* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response. *Cell*, 83, 925-935.

Zhou, J., Tang, X., Martin, G. B. (1997). The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. *EMBO J.*, 16, 3207-3218.

Zhou J, Xu Z. (2005). The structural view of bacterial translocation-specific chaperone SecB: implications for function. *Mol. Microbiol.*, 58, 349-57.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Eichenlaub für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die wissenschaftliche Betreuung. Darüber hinaus möchte ich mich für die großzügige finanzielle Unterstützung während meiner Doktorarbeit bedanken.

Außerdem geht mein Dank an:

Dr. Karl-Heinz Gartemann für die wissenschaftlichen Anregungen im Laboralltag und das Korrekturlesen der Arbeit,

Carola Eck und Manuela Meyer für die zahlreichen MALDI-Analysen,

Herrn Pineda für die Herstellung der Antikörper,

die gesamte Arbeitsgruppe für das wirklich tolle Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft bei Problemen. Mein ganz besonderer Dank geht dabei an Dr. Monika Flügel für das kritische Korrekturlesen meiner Arbeit. Danken möchte ich Dr. Johannes Wittmann und Tom Trapphoff, für die vielen konstruktiven Gespräche nicht nur auf wissenschaftlicher, sondern auch auf privater Ebene.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden. Danke für die schönen Ablenkungen abseits des Laborlebens.

Mein größter Dank geht aber an meine Eltern und meinen Bruder Carsten, die immer an mich geglaubt haben. Danke für eure Geduld und die liebevolle Unterstützung gerade in schwierigen Momenten. Ohne Euch hätte ich das nicht geschafft!

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

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

Bielefeld, im März 2012

Kerstin Mayer