

Das Exoproteom von *Clavibacter michiganensis* subsp.
michiganensis und Untersuchung von Mutanten im
Sec- und Tat-Sekretionssystem

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

vorgelegt von
Helena Tews

März 2012

Inhaltsverzeichnis

A. Zusammenfassung	1
B. Einleitung	3
1. Die Bakterien-Pflanzen-Interaktionen	3
1.1 <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> - ein phytopathogenes Bakterium	3
1.2 Resistenzmechanismen bei Pflanzen	6
2. Die pflanzliche Zellwand - eine effektive äußere Barriere	8
2.1 Aufbau der Zellwand	8
2.2 Zellwand-hydrolysierende extrazelluläre Enzyme	9
3. Proteinsekretion	11
3.1 Proteinsekretionssysteme in Proteobakterien	12
3.2 Proteinsekretionssysteme in Gram-positiven Bakterien	15
3.3 Proteinsekretion über die Sec- und Tat-Systeme	19
3.3.1 Charakteristische Eigenschaften verschiedener Signalpeptide	19
3.3.2 Das Sec-Sekretionssystem	20
3.3.3 Das Tat-Sekretionssystem	22
4. Extrazelluläre Enzyme und Sekretionssysteme - ihre Rolle in der Pathogenität von <i>Cmm</i>	23
5. Zielsetzung	26
C. Material	27
1. Bakterienstämme	27
2. Plasmide und Vektoren	27
3. Pflanzenmaterial	29
4. Enzyme und Enzymreaktionspuffer	29
5. Oligonukleotidprimer für PCR	30
6. Chemikalien und Kits	30
7. Nährmedien	31
7.1 Zusätze zu Nährmedien	32
7.2 Antibiotika	32
8. Puffer und Lösungen	32
8.1 Agarosegelelektrophorese	32
8.2 DNA-Isolierung	33
8.2.1 Plasmid-Isolierung	33
8.2.2 Gesamt-DNA-Isolierung	33
8.3 Puffer und Lösungen für DNA-DNA-Hybridisierung	33
9. Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
10. Puffer und Lösungen für die 2D-Gelelektrophorese	34
11. Puffer und Lösungen für den tryptischen Verdau	35
12. Lösungen für die massenspektrometrischen Analysen	36
13. Lösung zur Konservierung von Zellen	36
14. Geräte	36

D. Methoden	37
1. Kultivierung von Bakterien und Pflanzen	37
1.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	37
1.2 Kultivierung von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	37
1.3 Kultivierung von Pflanzen	37
2. Konservierung von Bakterien (Glycerinkultur)	37
3. DNA-Isolierung	37
3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	37
3.2 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit	38
3.3 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem „Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System“	38
3.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen mit dem „NucleoSpin® Extract II	39
3.5 Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Cmm</i>	39
4. Reinigung, Konzentrierung und Denaturierung von DNA	40
4.1 Alkoholfällung	40
4.2 Alkalische Denaturierung von Plasmid-DNA	40
4.3 Phenolextraktion	40
4.4 Sephadex-Behandlung	40
5. Techniken zur Charakterisierung von DNA-Molekülen	41
5.1 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	41
5.2 Agarosegelelektrophorese	41
5.3 Bestimmung des Molekulargewichts von DNA	41
6. Klonierung von DNA-Fragmenten und Transformation	42
6.1 Dephosphorylierung von Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase	42
6.2 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA	42
6.3 Shotgun-Klonierung	43
7. DNA-Transfer	43
7.1 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	43
7.1.1 Herstellung kompetenter Zellen (CaCl ₂ -Methode)	43
7.1.2 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	43
7.2 Elektroporation von <i>Cmm</i>	43
7.2.1 Herstellung kompetenter <i>Cmm</i> -Zellen	43
7.2.2 Elektroporation kompetenter <i>Cmm</i> -Zellen	44
8. DNA-DNA-Hybridisierung	44
8.1 Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden durch Random-Priming	44
8.2 Überprüfung der Markierungsreaktion (Dot-Blot)	45
8.3 Southern-Blot (Kapillarblot)	45
8.4 Prähybridisierung und Hybridisierung	46
8.5 Immunologischer Nachweis	46
9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
9.1 PCR mit Gesamt-DNA als Template	46
9.2 PCR mit ganzen Zellen als Template	47
10. Isolierung von Xylemsaft (zur Supplementierung des M9-Mediums)	47
11. Herstellung von Tomatenblatthomogenat(zur Supplementierung des M9-Mediums)	48
12. Nachweis der Xylanaseaktivität	48
12.1 Agarplattentest für Xylanase	48
12.2 Nachweis der Xylanaseaktivität im Zymogram	48

13. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
13.1 Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen	50
14. Proteomanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese	50
14.1 Phenolextraktion sekretierter Proteine aus dem Kulturüberstand von <i>Cmm</i>	50
14.2 Isoelektrische Fokussierung	51
14.3 SDS-PAGE	52
14.4 Tryptischer Verdau	52
14.5 Identifizierung der Proteine mittels MALDI-TOF-MS, MASCOT	53
15. Isolierung von Xylemsaft <i>Cmm</i> -infizierter und nicht infizierter Tomatenpflanzen zur Charakterisierung des Xylemsaftproteoms	53
16. Methoden zur Analyse des Pathogenitätsverhaltens von <i>Cmm</i>	53
16.1 Petiolusinfektion der Tomatenpflanzen mit <i>Cmm</i>	53
16.2 Welkeindex und Welkeverlauf	54
16.3 Größen- und Gewichtsbestimmung der Pflanzen	54
16.4 Analyse der Kolonisationsfähigkeit	54
16.4.1 Reisolierung von <i>Cmm</i> aus infizierten Pflanzen	54
16.4.2 Bestimmung des <i>Cmm</i> -Titers in der infizierten Pflanze	55
E. Ergebnisse	56
A. Erzeugung von Mutanten in den extrazelluläre Enzyme kodierenden Genen durch Insertionsmutagenese	57
1. Konstruktion der Mutageneseplasmide der Gene <i>xysA</i> , <i>xysB</i> , <i>pgaA</i> , <i>celB</i> , <i>endX</i> und <i>endXY</i>	58
1.1 Die Inaktivierung des <i>xysA</i> -Gens (Xylanase)	58
1.2 Die Inaktivierung des <i>xysB</i> -Gens (Xylanase)	59
1.3 Die Inaktivierung des <i>pgaA</i> -Gens (Polygalakturonase)	60
1.4 Die Inaktivierung des <i>celB</i> -Gens (Cellulase)	61
1.5 Die Inaktivierung des <i>endX</i> -Gens (Endoglukanase)	62
1.6 Die Inaktivierung der <i>endXY</i> -Gene (Endoglukanasen)	63
2. Nachweis der Pathogenitätsdeterminanten <i>celA</i> und <i>pat-1</i> in den Mutanten	64
3. Phänotypische Charakterisierung der Insertionsmutanten im Pflanzentest	65
4. Nachweis des Xylanabbaus durch die <i>Cmm</i> -Xylanasen A und B	68
B. Analyse des Exoproteoms von <i>Cmm</i> mittels 2D-Gelelektrophorese	72
1. Einteilung der <i>Cmm</i> -Gene in funktionelle Gruppen	73
2. Proteinsekretion von <i>Cmm</i> NCPPB382 in M9-Minimalmedium	74
3. Proteinsekretion von NCPPB382 in weiteren Medien	84
3.1 Proteinsekretion von NCPPB382 in Minimalmedium nach Supplementierung mit Xylemsaft, Tomatenblatthomogenat oder Zuckerpolymeren	85
3.2 Proteinsekretion von NCPPB382 in Vollmedium	89
4. Proteinsekretion der nicht-virulenten Stämme CMM100 und CMM30-18 in M9-Medium nach Supplementierung mit Xylemsaft und Tomatenblatthomogenat	93
C. Transport potentieller Virulenzfaktoren über die Tat-/Sec-Sekretionssysteme	97
1. Inaktivierung der <i>secG</i> - und <i>secY</i> -Gene durch Insertionsmutagenese	103
2. Inaktivierung des <i>tatB</i> -Gens durch Insertionsmutagenese	104
3. Charakterisierung des SecG-Proteins von <i>Cmm</i> NCPPB382	106
4. Charakterisierung des TatB-Proteins von <i>Cmm</i> NCPPB382	108
5. Phänotypische Analyse der <i>secG</i> - und <i>tatB</i> -Mutanten im Pflanzentest	111
D. Die Proteomanalyse von Xylemsaft aus <i>Cmm</i>-infizierten Tomatenpflanzen	113

F. Diskussion	117
1. Zellwand-degradierende Enzyme von <i>Cmm</i> und ihre Rolle in der Pathogenese	117
1.1 Nachweis der Xylanase-Aktivität in <i>Cmm</i>	121
2. Analyse des Exoproteoms von <i>Cmm</i>	122
3. Sekretionswege in <i>Cmm</i>	126
3.1 Das Sec-Sekretionssystem	127
3.2 Das Tat-Sekretionssystem	130
4. Extrazellulär lokalisierte Proteine ohne ein klassisches Signalpeptid	132
5. Potentielle Modifizierung von <i>Cmm</i> -Proteinen	133
6. Analyse des Xylemsaftproteoms	135
G. Literaturverzeichnis	138
H. Anhang	149
1. Plasmidkarten	149
2. Auftrennung von <i>Cmm</i> -Proteinen, die unter verschiedenen Kulturbedingungen isoliert wurden, in 2D-SDS-Gelen	153
3. Identifizierte Proteine unter verschiedenen Kulturbedingungen	163
4. Abkürzungsverzeichnis	171

A. Zusammenfassung

Exportierte bakterielle Proteine können aufgrund ihrer extrazellulären Lokalisation eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer Bakterien-Pflanzen-Interaktion übernehmen. Um die potentiellen Faktoren, die an der Interaktion zwischen dem phytopathogenen Bakterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und seiner Wirtspflanze Tomate beteiligt sind, zu identifizieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-MS umfangreiche Exoproteomanalysen der ins Aussenmedium sekretierten Proteine (dem Exoproteom) von *Cmm* durchgeführt. Unter allen untersuchten Bedingungen wurden insgesamt 150 verschiedene Proteine identifiziert. Die Analyse der Aminosäuresequenzen dieser Proteine mit Hilfe verschiedener computergestützter Vorhersageprogramme, zeigte bei 52% (78 Proteine) die Präsenz eines Signalpeptides. Die restlichen 48% (73 Proteine) besitzen kein Signalpeptid, es handelt sich um intrazelluläre Proteine, die entweder über Zellyse oder über noch unbekannte Sekretionsmechanismen nach außen gelangten.

Die Analyse des Exoproteoms von *Cmm* in M9-Minimalmedium, das Glukose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, führte zur Identifizierung zahlreicher extrazellulärer Proteine, unter denen sich mehrere bereits bekannte Virulenzfaktoren (Cela, Pat-1, PpaC, ChpC), aber auch vermutete Virulenzfaktoren (Ppa-Familie: PpaB1/B2, C, D, E, F, G, H, I, J; Chp-Familie: ChpE; Subtilasen-Familie: SbtB, C) befinden, die alle in hohen Mengen sekretiert wurden und für die eine Beteiligung an der Phytopathogenität des Bakteriums angenommen wird. Von den extrazellulären Enzymen, die pflanzliche Zellwandpolymere abbauen können, konnten neben der Cellulase (Cela), eine Xylanase (XysA), die Polygalakturonase (PgaA) und eine der beiden putativen Endoglukanasen (EndY) nachgewiesen werden. Bei mehreren Proteinen (Cela, SbtC, mehrere Ppa-Serinpeptidasen) wurden aufgrund der teilweise starken Abweichung der tatsächlichen von den vorhergesagten Werten für den isoelektrischen Punkt und/oder Molekulargewicht, Anzeichen für eine Prozessierung gefunden.

Die vergleichenden Analysen der Exoproteome von *Cmm* in verschiedenen Medien führten zu dem Ergebnis, dass die Supplementierung des M9-Minimalmediums mit Xylemsaft/Tomatenblatthomogenat aus nicht infizierten Pflanzen zur Induktion von extrazellulären für die pathogene Interaktion relevanten Proteinen nicht benötigt wird. Auch die Zugabe von Zuckerpolymeren, die Bestandteile der pflanzlichen Zellwand darstellen, hatte keinen induzierenden Effekt auf die Synthese dieser Zuckerpolymere-abbauenden Enzyme. Die vergleichenden Exoproteomanalysen in M9-Minimalmedium und Vollmedium zeigten dagegen, dass die in M9-Minimalmedium hoch induzierten Virulenzfaktoren in Vollmedium reprimiert sind und die Zugabe von Glukose weder Induktion noch Repression dieser Virulenzfaktoren hervorruft.

Um die Rolle der Zellwandpolymere-abbauenden Enzyme in der Virulenz zu überprüfen, wurden in den zwei Xylanasen (XysA, XysB), eine Polygalakturonase (PgaA), eine Cellulase (CelB) und zwei Endoglukanasen (EndX, EndY) kodierenden Genen „Knock out“-Mutanten hergestellt. Mit Ausnahme der *endX*- und *endXY*-Mutanten, die zu einem verzögerten Auftreten der Welke führten, hatte keine dieser Mutanten Auswirkung auf die Pathogenität. Zuletzt konnte für beide Xylanasen (XysA und XysB) über Agarplattentests und Zymogramme eine Xylanaseaktivität nachgewiesen werden.

Die Sec- und Tat-Systeme wurden in *Cmm* als zwei generelle Proteintransportsysteme identifiziert, die eine Signalpeptid-abhängige Sekretion extrazellulärer Proteine in die Umgebung der Zelle vermitteln. Um die Rolle dieser Systeme für die Proteinsekretion allgemein und für die Sekretion von Virulenzfaktoren zu bestimmen, wurden das *secG*-Gen und das *tatB*-Gen durch die Insertion einer Antibiotikaresistenzkassette inaktiviert. Beide Gene kodieren Komponenten, die am Aufbau der Translokationspore beteiligt sind. Die Inaktivierung des *secG*-Gens und auch des *tatB*-Gens hatte einen Wachstumsdefekt der Mutanten auf Minimal- und Vollmedium zur Folge. Der Vergleich der Exoproteome der Sekretionsmutanten und des Wildtyps NCPPB382 ergab, dass die Mutation des *secG*-Gens zu einer reduzierten Sekretionsrate mehrerer Proteine führte, während die Zusammensetzung des Exoproteoms unverändert blieb. Im Gegensatz dazu bewirkte die Mutation des *tatB*-Gens eine vollständige Blockade in der Sekretion von zwei Proteinen (NagA und CMM_0338). Folglich scheint die SecG-Komponente für die Funktionalität der Sec-Translokase nicht essentiell zu sein, aber deren Effizienz zu erhöhen. Das TatB-Protein stellt dagegen eine essentielle Komponente der Tat-Translokase dar. *In planta* zeigten beide Mutanten einen avirulenten Phänotyp, sie waren nicht mehr in der Lage, die Pflanzen erfolgreich zu kolonisieren und Krankheitssymptome auszulösen. Allerdings lässt sich die Avirulenz der Sekretionsmutanten nicht durch die beobachteten Veränderungen des Exoproteoms erklären, so dass in Zukunft das Membran- und das Zellwandproteom untersucht werden sollten, um weitere über die Sec-/Tat-Systeme translozierte Proteine zu identifizieren, die Zellhüllen-gebunden sind, aber für die Virulenz wichtige Funktionen besitzen könnten.

B. Einleitung

1. Die Bakterien-Pflanzen-Interaktionen

Pflanzen sind im Laufe ihrer Entwicklung einer Vielzahl biotischer und abiotischer Schadfaktoren ausgesetzt. Einen für die Landwirtschaft wichtigen biotischen Schadfaktor stellen die phytopathogenen Bakterien dar. Die stetige Entwicklung neuer Kultursorten und deren systematischer Anbau - meist als Monokultur - tragen erheblich zur epidemischen Vermehrung phytopathogener Bakterien u.a. der Gattungen *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* und *Clavibacter* bei, die eine Vielzahl von Nutzpflanzen infizieren und zu großen Ernteeinbußen führen können. Obwohl die zugrunde liegenden Virulenzmechanismen sehr verschieden sind, ist die Sekretion extrazellulärer Enzyme und Proteine für diese Bakteriengruppe sehr charakteristisch und häufig mit der Entwicklung von Virulenz verbunden. Daher bildet die Erforschung extrazellulärer Proteine, sowohl von Enzymen als auch Oberflächenproteinen, die z.B. eine Zell-Zellwechselwirkung vermitteln, eine Voraussetzung für die Aufklärung der molekularen Grundlagen der Bakterien-Pflanzen-Interaktion und die Entwicklung neuer Ansätze diese zu kontrollieren und zu verhindern.

1.1 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* - ein phytopathogenes Bakterium

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*) ist ein Gram-positives, phytopathogenes Bakterium aus der Gruppe der Actinomyceten, das bei der Tomate die bakterielle Welkekrankheit auslöst und weltweit zu großen Ernteaufschlägen führt. Die Infektion kann sowohl über kontaminiertes Saatgut, über Wunden in Wurzel oder Sprossbereich oder die Hydathoden erfolgen. Ist das Pathogen in die Pflanze eingedrungen, breitet es sich dort systemisch aus und besiedelt das Xylem (Strider, 1969). *Cmm* ist zunächst ein biotrophes Phytopathogen und bezieht seine Nährstoffe aus dem Xylem der Pflanzen. Dort sind die Zucker und Carbonsäuren in so hohen Mengen vorhanden, dass *Cmm* sich bis zu einem Titer 10^9 - 10^{10} Bakterien pro Gramm Pflanzenhomogenat vermehren kann.

Eines der frühen Symptome der Krankheit ist die unilaterale Welke der Fiederblätter (Abb. 1, A, B), die mit der Zeit auf die gesamte Pflanze übergreift. In späteren Stadien kommt es aufgrund der hochtitrigen Kolonisation der Pflanze und der damit einhergehenden Gewebemazeration zur Bildung von Sprossläsionen (Abb. 1, C) und schließlich zum Tod der Pflanze. Da es keine *Cmm* resistenten Tomatenpflanzen gibt (van Steekelenburg, 1985) und chemische Bekämpfungsmaßnahmen bestenfalls zu einer Befallsreduktion führen (Thompson, 1986), müssen neben strikter Einhaltung hygienischer Vorschriften in den

Anbaubetrieben Präventivmaßnahmen wie z.B. die Zertifizierung des Saatgutes ergriffen werden, um größere Verluste in der Landwirtschaft zu vermeiden (Anonymous, 2005).



Abb. 1. Durch *Cmm* verursachte Krankheitssymptome: A. welkende Tomatenpflanze; B. Fiederblattwelke; C. Sprossläsion.

Die beiden essentiellen Virulenzfaktoren des Wildtypstammes *Cmm* NCPPB382 wurden auf den beiden Plasmiden pCM1 und pCM2 identifiziert. Das auf pCM1 lokalisierte *celA*-Gen kodiert eine β -1,4-Endoglukanase, ein 78 kDa Protein mit 746 Aminosäuren, das zu der Familie 5 der Glykosylhydrolasen gehört (Jahr *et al.*, 2000). CelA ist aus drei Domänen aufgebaut, einer katalytischen, einer Cellulose-bindenden und einer dritten C-terminalen Domäne, die zu α -Expansinen der Pflanzen homolog ist. Diese dritte Domäne könnte CelA den Abbau kristalliner Cellulose in nativen pflanzlichen Zellwänden erlauben und daher zum Pathogenitätsmechanismus beitragen (Jahr *et al.*, 2000). Das auf dem pCM2 lokalisierte *pat-1*-Gen kodiert eine Serinpeptidase, die zweite Pathogenitätsdeterminante, ein Protein mit 280 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 29,7 kDa (Dreier *et al.*, 1997). Das Pat-1 Protein ist homolog zu den Serinpeptidasen der Chymotrypsinfamilie, die Serin und Histidin in der katalytischen Triade tragen. Der Verlust jeweils eines der Plasmide und somit einer der Pathogenitätsdeterminanten führt zur verminderten Virulenz, während der Verlust beider Plasmide in der kompletten Avirulenz von *Cmm* resultiert und das Bakterium in einen Endophyten verwandelt (Meletzus *et al.*, 1993). Die Tatsache, dass der plasmidfreie und avirulente Stamm CMM100 die Tomatenpflanze genauso hochtitrig kolonisieren kann wie der Wildtyp, führte zu dem Schluss, dass alle für die Wirtserkennung, Invasion, Unterdrückung der Wirtsabwehr und die erfolgreiche Kolonisation der Pflanze notwendigen Genprodukte chromosomal kodiert werden.

Cmm produziert ein Exopolysaccharid (EPS) bekannter Struktur in großen Mengen, wodurch bei Anzucht auf Festmedium eine mucoide Kolonienmorphologie entsteht (Berpohl *et al.*, 1996). Für dieses EPS wurde ursprünglich eine Rolle als wichtiger Virulenzfaktor postuliert (Rai *et al.*, 1969). Dies konnte allerdings inzwischen ausgeschlossen werden, da EPS-Mutanten weiterhin voll virulent sind (Berpohl *et al.*, 1996; Schauer, 2004) und der

plasmidfreie EPS-produzierende Stamm CMM100 die Tomate genauso wie der Wildtyp kolonisiert. Allerdings ist *Cmm* nach der Genomannotation in der Lage, drei weitere EPS-Typen zu produzieren, deren Rolle bisher nicht untersucht ist (Gartemann *et al.*, 2008). Sie werden allerdings auf Vollmedium nur in geringen Mengen produziert (Schauer, 2004).

Hingegen konnte eine Beteiligung einiger Gene der 129 kb großen chromosomalen *chp/tomA*-Region an der Bakterien-Pflanzen-Interaktion nachgewiesen werden. Die *chp/tomA*-Region ist eine Pathogenitätsinsel mit einem niedrigeren GC-Gehalt als bei dem Rest des Genoms. Aufgrund struktureller Eigenschaften lässt sich die Region in zwei Subregionen unterteilen. Die *chp*-Region kodiert u.a. 14 Serineptidasen: sechs Vertreter der Ppa-Familie (Familie S1X), die Proteine PpaA, B1, B2, C, D, E, sieben Vertreter der Chp-Familie (Familie S1A), die Proteine ChpA, B, C, D, E, F, G, und eine Subtilase (SbtA; Familie S8), sowie eine N-Acetylglucosaminidase (NagA) und zwei Pektatlyasen (PelA1, A2). Die Proteine der Chp-Familie sind, wie der Name schon sagt („chromosomal homology to *pat-1*“), homolog zu der auf pCM2 kodierten Pat-1 Serineptidase. Drei der Gene der *chp*-Familie sind allerdings Pseudogene (*chpA*, *B* und *D*). Mit „Knock out“-Mutanten ist für ChpC eine Beteiligung an der Kolonisation der Tomate, für ChpG an der Auslösung der pflanzlichen Abwehr (hypersensitive Reaktion, HR) gezeigt worden (Stork *et al.*, 2008). Auch für die Gene *chpF*, *ppaA* und *ppaC* ist eine verringerte Kolonisation von Insertionsmutanten beschrieben (Teper *et al.*, pers. Mitteilung; Schott, 2004).

In der *tomA*-Region sind u.a. 12 unterschiedliche α - und β -Glykosidasen, ein Cytochrom P450 und die Tomatinase (TomA) kodiert. Die Tomatinase ist an der Detoxifikation von α -Tomatin beteiligt, einem von der Tomate gebildeten Alkaloid, das u.a. bakterielles Wachstum hemmt (Kaup *et al.*, 2005). Zusätzlich sind Gene, die verschiedene Transporter und Regulatoren kodieren, die wahrscheinlich am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt sind, in der *tomA*-Region vorhergesagt. Die Inaktivierung des *tomA*-Gens zeigte allerdings keine Auswirkung auf das Virulenzverhalten mit dem Tomatenkultivar „MoneyMaker“ (Kaup *et al.*, 2005).

Die *chp/tomA*-Pathogenitätsinsel ist von 1,9 kb großen „direct repeats“ nahe beider Enden flankiert, die unter bestimmten Stressbedingungen wie der Elektroporation ein Rekombinationsereignis ermöglichen, das zum Verlust der kompletten *chp/tomA*-Region führt (Schott, 2004). Eine Deletion der Pathogenitätsinsel, die in dem Stamm CMM30-18 nachgewiesen werden konnte, führte zu einer drastisch verringerten Kolonisationsfähigkeit, der Stamm ist avirulent (Gartemann *et al.*, 2008).

Für alle bisher identifizierten/vermuteten Virulenzfaktoren sind Signalpeptide vorhergesagt, sie werden also wahrscheinlich sekretiert.

1.2 Resistenzmechanismen bei Pflanzen

Welcher Art die Wechselbeziehung zwischen einem Wirt und einem potentiellen Pathogen ist, hängt von der Virulenz des Pathogens sowie dem Grad der Anfälligkeit oder der Resistenz des Wirts ab. Die Interaktion zwischen einem virulenten Erreger und einer anfälligen Pflanze wird als kompatibel (mit der Folge der Krankheitsauslösung), die zwischen einem avirulenten Erreger und einer resistenten Pflanze als inkompatibel (mit der Folge der Abwehr des Pathogens) bezeichnet. In der Regel sind Pflanzen gegen die meisten Mikroorganismen resistent. Dieses als Nicht-Wirtsresistenz bezeichnete Phänomen beschreibt eine unspezifische, gegen eine Vielzahl von Pathogenen gerichtete Basisresistenz, die auf zahlreichen präformierten Barrieren sowie induzierten Abwehrreaktionen der Pflanzen beruht (Heath, 2000). Die Fähigkeit zwischen „selbst“ und „nicht selbst“ unterscheiden zu können, bildet die Basis für die Aktivierung pflanzlicher Abwehrmechanismen nach einer mikrobiellen Infektion (Nürnberger, 2004). Pathogen-assoziierte Oberflächenstrukturen, die sogenannten PAMPs („pathogen-associated molecular patterns“), auch als „generelle Elicitoren“ bekannt, sind als Auslöser pflanzlicher Abwehr beschrieben worden (Jones, 2006). PAMPs unterschiedlichster chemischer Natur und von verschiedenen Mikroorganismen sind bereits charakterisiert. Zu den Elicitoren aus der Gruppe der Pilze gehören viele Zellwandkomponenten wie Glukane, Chitin, Peptide und Proteine mit für Pilze spezifischer N-Glykosylierung sowie die Membrankomponente Ergosterol (Felix *et al.*, 2003). Unter den bakteriellen PAMPs befinden sich das Oberflächenprotein Flagellin, das Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer und das Peptidoglykan Gram-positiver Bakterien, sowie Kälteschockproteine und der Translationsfaktor EF-Tu (Felix *et al.*, 2003; Aderem *et al.*, 2000; Zipfel *et al.*, 2006). Auch Zellwandbestandteile eindringender Pathogene, die durch pflanzliche Enzyme wie Endochitinasen oder Endo- β -1,3-Glukanasen herausgelöst werden, können als Elicitoren fungieren (Heath, 2000). Die für alle PAMPs charakteristischen Eigenschaften sind ihre hochkonservierten Strukturen, ihre Präsenz in verschiedenen pathogenen und nicht pathogenen Mikroorganismen sowie ihr Fehlen in potentiellen Wirten (Nürnberger, 2004). Die Erkennung dieser „generellen Elicitoren“ erfolgt durch pflanzliche Rezeptoren, die PRRs („pattern recognition receptors“), und führt zur Aktivierung pflanzlicher Abwehrreaktionen wie Alkalisierung, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) oder Auslösung der hypersensitiven Reaktion.

Im Laufe der Evolution haben pflanzenpathogene Bakterien die Nicht-Wirtsresistenz durch die Entwicklung von Virulenzfaktoren überwunden. Diese Effektoren sind in der Lage mit der Pflanzenabwehr zu interferieren und diese zu supprimieren. Folglich kann das Pathogen die Pflanze kolonisieren und in eine Wirtspflanze verwandeln (Heath, 2000; Cohn *et al.*, 2001). Diese Entwicklung führte in bestimmten Sorten suszeptibler Pflanzenspezies coevolutiv zur Entstehung einer Kultivar-spezifischen Resistenz, auch als Wirtsresistenz oder ETI („effector-

triggered immunity“) bekannt, die sich sehr spezifisch gegen eine oder nur wenige Stämme virulenter Pathogene richtet (Nimchuk *et al.*, 2001). Viele Proteobakterien nutzen das hochkonservierte Typ III-Sekretionssystem, um Effektorproteine zu exportieren und in das Cytosol pflanzlicher Zellen zu translozieren (Nürnberg *et al.*, 2001). Zusätzlich können auch bakterielle Pilusstrukturen den Transport von Effektorproteinen über die Pflanzenzellwand erleichtern (Galan *et al.*, 1999).

Die genetischen Grundlagen der Wirtsresistenz werden durch die Gen-für-Gen-Hypothese beschrieben, die für jedes Avirulenzgen (*avr*-Gen) des Pathogens das Vorhandensein eines Resistenzgens (R-Gen) der Pflanze annimmt (Flor, 1971). Die direkte Interaktion der Genprodukte dieser Gene führt zur Auslösung der pflanzlichen Abwehr und letztlich zur Resistenz. Fehlt eines der beiden einander komplementärer Proteine/Gene, so führt das zur Krankheit der infizierten Pflanze (Kompatibilität). Manchmal interagieren die Avr-Proteine des Pathogens und die R-Proteine der Pflanze nicht direkt miteinander. Diese Tatsache führte zur Formulierung der Guard-Hypothese, dass das Avr-Protein zuerst mit einem Zielprotein der Pflanze interagiert. Die damit verbundene Änderung der Zellfunktionen wird von dem R-Protein, das als eine Art „Wächter“ fungiert, erkannt und führt zur Aktivierung der Abwehr (Dangl *et al.*, 2001). Die meisten Avr-Proteine sind Virulenzfaktoren, die für die Kolonisation und die Symptomausprägung in suszeptiblen Pflanzen benötigt werden und für die mikrobielle „fitness“ von Vorteil sind (White *et al.*, 2000).

Die Erkennung von PAMPs durch PRRs bzw. der spezifischen Elicitoren (Avr-Proteine) durch die R-Proteine der Wirtszelle löst eine Signalübertragungskaskade aus, an der verschiedene Botenstoffe beteiligt sind, die zur Aktivierung komplexer Abwehrmechanismen führen. In Pflanzen sind keine Unterschiede in den Signalmechanismen beobachtet worden, die als Reaktion auf die Erkennung genereller bzw. spezifischer Elicitoren ausgelöst werden (Grant *et al.*, 1999). Zu den wichtigen frühen Elicitor-stimulierten Signalen gehören der Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und von Stickstoffmonoxid (NO), sowie die Aktivierung von MAP-Kinasen (Nürnberg *et al.*, 2001).

Die pflanzlichen Abwehrreaktionen, die in den meisten Pflanzen-Pathogen-Interaktionen ablaufen, sind sehr komplex, aber auch sehr ähnlich (Dangl *et al.*, 2001; Heath, 2000). Nach Aktivierung spezieller Enzyme wird durch Quervernetzung pflanzlicher Zellwandproteine und Einlagerung von Lignin und Kallose die Zellwand verstärkt und eine effektive mechanische Barriere aufgebaut. Ein häufiges nach einer Infektion auftretendes Ereignis ist die hypersensitive Reaktion (HR), die eine Form des schnellen programmierten Zelltodes im Bereich des Infektionsherdes darstellt (Hammond-Kosack *et al.*, 1996). Andere mit der Abwehr assoziierte Reaktionen basieren auf der Biosynthese Pathogen-induzierter Proteine („pathogenesis-related proteins, PR-Proteine), die teilweise unbekannter Funktion sind, aber

auch hydrolytische Enzyme wie Chitinasen, Glukanasen, und Proteasen umfassen. Diese wirken vor allem gegen infizierende Pilze, in dem sie Bestandteile der pilzlichen Zellwand angreifen (Cohn *et al.*, 2001). Eine bedeutende Rolle in der Abwehr kommt den Phytoalexinen zu, die ebenfalls (partiell) *de novo* synthetisiert werden. Diese antimikrobiell wirkenden Substanzen entstehen in Folge von Wirt-Pathogen-Interaktionen in der Nähe eines Infektionsortes. Es sind chemisch nicht verwandte Verbindungen, die folgenden Stoffklassen zugeordnet werden können: Polyacetylene, Polyphenole, Isoflavonoide, Terpenoide und die Stilbene.

Diese lokal aktivierte Abwehr kann wiederum die systemische Abwehr („systemic-acquired resistance“, SAR) aktivieren, die die Pflanzen gegen Folgeinfektionen durch eine Vielzahl verschiedener Erreger schützt, wobei Salicylsäure als Signalmolekül eine zentrale Rolle spielt (Cohn *et al.*, 2001).

Im Falle von *Clavibacter* tritt scheinbar keine ETI auf, es sind weder Effektoren aufgrund von Sequenzvergleichen identifiziert worden noch gibt es ein Typ III-Sekretionssystem (wie auch in allen untersuchten pathogenen Actinomyceten). Allerdings werden Abwehrreaktionen wie die HR in Nichtwirtspflanzen ausgelöst, wohl aufgrund der Erkennung von *Clavibacter*-PAMPs, die aber bisher noch nicht bekannt sind. In Wirtspflanzen scheint eine Supprimierung und/oder Umgehung der pflanzlichen Abwehr über unbekannte Mechanismen stattzufinden, Abwehrreaktionen treten auch in der kompatiblen Interaktion auf (Beimen *et al.*, 1992), sind aber entweder zu schwach oder zu spät, um eine erfolgreiche Pathogenabwehr zu gewährleisten.

2. Die pflanzliche Zellwand - eine effektive äußere Barriere

2.1 Aufbau der Zellwand

Die pflanzliche Zellwand wird aus der Mittellamelle sowie einer primären und manchmal auch sekundären Zellwand aufgebaut und bietet jeder Zelle neben der Stabilität auch eine effektive äußere Barriere gegen schädigende Umwelteinflüsse. Sie besteht hauptsächlich aus Polysacchariden, von denen Cellulose, Hemicellulosen und Pektine die wichtigsten sind, und zusammen ungefähr 90 % des Trockengewichts der Zellwand ausmachen (Schindler, 1993). Cellulose bildet die Hauptkomponente der Primärwand und besteht aus unverzweigten Ketten mehrerer hundert bis zehntausend β -1,4-verknüpfter Glukose-Moleküle, die bei der Biosynthese zu Mikrofibrillen assoziieren. Diese Mikrofibrillen sind parakristalline, fast wasserfreie Strukturen und bieten durch ihre mechanischen Festigkeit und hohe Resistenz gegen enzymatischen Verdau ein ideales Material für ein Grundgerüst (Cosgrove, 2005). Diese reißfesten, fibrillären Strukturen sind in eine amorphe Matrix, die aus Hemicellulosen, Pektinen und Proteinen besteht, eingebettet. Bei den Hemicellulosen handelt es sich um die

Zellwandfraktion mit der größten Variabilität, nicht nur zwischen unterschiedlichen Gattungen, sondern auch im Laufe der Entwicklung einer Pflanze (Schindler, 1993). Sie stellen die Hauptkomponenten der primären und sekundären Zellwände dar und fungieren als Verbindungselemente zwischen den Pektin- und der Cellulosefraktionen (Bauer *et al.*, 1973). Die wichtigsten Hemicellulosen sind die Xyloglukane, die Xylane und die β -1,3- oder β -1,4-verknüpften D-Glukane. Xyloglukane bestehen aus Ketten β -1,4-verknüpfter Glukoseeinheiten, von denen die meisten α -1,6-gebundene Xylose-Seitenketten tragen. Die Seitenketten können durch Fukose, Galaktose und Arabinose erweitert sein. Die Xylane, die aus β -1,4-verknüpften Xylose-Molekülen bestehen, sind in höheren Pflanzen weit verbreitet. Xylane tragen häufig Seitenketten (Glukuronsäure, Arabinose, Ferulasäure), die den Aufbau kristalliner Strukturen, wie es bei der Cellulose der Fall ist, verhindern. Die β -1,3-1,4-D-Glukane sind unverzweigte Glukosepolymere, die nur in den Zellwänden monocotyler Pflanzen, insbesondere bei Gräsern, vorkommen.

Die Pektine sind die Hauptkomponenten der Mittellamelle und der primären Zellwand und bilden eine sehr heterogene und komplexe Gruppe der Polysaccharide, zu denen die sauren Rhamnogalakturonane I und II, die Polygalakturonsäureester, aber auch neutrale Polysaccharide wie die Arabinane, Galaktane und Arabinogalaktane gehören (Cosgrove, 2005). Das Rückgrat dieser Polysaccharide besteht aus einer linearen Kette β -1,4-verknüpfter Galakturonsäurereste, die durch den Einbau von Rhamnose-Bausteinen stark verzweigt sein können. Neben den Verzweigungen können die Galakturonsäure-Moleküle natürlicher Pektine mit Methanol oder Essigsäure verestert oder neutralen Zuckern substituiert sein.

Im Falle epidermaler Zellen treten zusätzlich zur Zellwand häufig weitere aufgelagerte Verbindungen wie z.B. Suberin auf, die ein Eindringen von Bakterien über eine intakte Epidermis zusätzlich erschweren (Kolattukudy, 1984).

2.2 Zellwand-hydrolysierende extrazelluläre Enzyme

Zellwand-Polysaccharide sind häufig das Ziel von Angriffen hydrolytisch aktiver Enzyme, die von vielen phytopathogenen Mikroorganismen sekretiert werden. Derartige degradative Enzyme, die u.a. Cellulasen, Xylanasen, Polygalacturonasen und Proteinasen umfassen, sind in mehrere Prozesse während einer Infektion involviert. Während der Abbau pflanzlicher Zellwände zu Beginn des Infektionsprozesses die Penetration der Pflanze erlaubt, können die bei der Hydrolyse anfallenden Oligo- und Monosaccharide als Ernährungsbasis dienen und zu einer raschen Vermehrung und Ausbreitung des Pathogens im Wirtsgewebe beitragen. Pektine sind hauptsächliche Ziele von Angriffen durch pilzliche und bakterielle Enzyme und Pektin-abbauende Enzyme können wichtige Virulenzfaktoren eines Pathogens darstellen (Rogers *et al.*, 2000). Andererseits können durch Degradierung von Pektin freigesetzte

Oligosaccharide als Elicitoren pflanzlicher Abwehr fungieren (Cosgrove, 2005). Oligogalakturonide, die aus dem Abbau von Homogalakturonan stammen, agieren als endogene Elicitoren und induzieren die Expression zahlreicher Gene, die Proteinaseinhibitoren, PR-Proteine sowie der Enzyme, die die Bildung von Phytoalexinen katalysieren, kodieren (Willats *et al.*, 2001). Der Abbau von Pektin wird von Pektinasen katalysiert, die ihrem Reaktionsmechanismus nach in Lyasen und Hydrolasen aufgeteilt werden. Die Pektin- bzw. Pektatlyasen spalten die glykosidischen Bindungen über β -Eliminierung, während die Polygalakturonasen die Spaltung über einen hydrolytischen Mechanismus katalysieren (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2002). Eine essentielle Rolle in der Pathogenese wurde den Pektinasen bei bakteriellen Weichfäuleerregern, wie *Dickeya chrysanthemi* und *Pectobacterium carotovorum*, zugeschrieben (Perombelon, 2002). Diese wurden bis 1998 in der Gattung *Erwinia* zusammengefasst.

Xylanasen sind Glykosidasen, die die Endo-Hydrolyse von β -1,4-glykosidischen Bindungen in Xylan katalysieren und Xylo-Oligosaccharide unterschiedlicher Länge bilden. Aufgrund seiner Heterogenität und Komplexität benötigt der komplette Abbau von Xylan einen Komplex mehrerer kooperativ agierender Xylanasen. Die Xylanasen unterscheiden sich in physikochemischen und funktionalen Eigenschaften und werden mehreren verschiedenen Familien zugeordnet (Collins *et al.*, 2004). Am besten charakterisiert sind die sauren hochmolekularen Endo-Xylanasen aus der Familie 10 und die basischen mit niedrigem Molekulargewicht aus der Familie 11. Beispiele von Mikroorganismen, die mehrere Xylanasen produzieren, sind *Aspergillus niger* mit 15 und *Trichoderma viride* mit 13 extrazellulären Xylanasen (Biely *et al.*, 1985). Diese große Anzahl ist das Resultat genetischer Redundanz, kann aber auch eine Folge unterschiedlicher posttranslationaler Prozessierung sein (Wong *et al.*, 1988; Biely, 1985). Ein deutlich ausgeprägter Effekt auf die Virulenz konnte für die Xylanase eines pflanzenpathogenen Pilzes, *Botrytis cinerea*, nachgewiesen werden (Brito *et al.*, 2006). Zusätzlich zu der Rolle, die die Endo-Xylanasen beim Abbau von Xylan übernehmen, sind Endo- β -1,4-Xylanasen der Pilze aus der Familie 11 unabhängig von ihrer enzymatischen Aktivität auch als Elicitoren pflanzlicher Abwehrmechanismen beschrieben (Enkerli *et al.*, 1999; Lotan *et al.*, 1990).

Der biologische Abbau von Cellulose zu Glukose bedarf der Aktivität von drei Typen von Enzymen. Endo- β -1,4-Glukanasen (EC 3.2.1.4) und Exo- β -1,4-Glukanasen (EC 3.2.1.91) greifen zuerst den kristallinen, unlöslichen Teil der Cellulose an und degradieren es bis zur Cellobiose, die anschließend durch β -1,4-Glukosidasen (EC 3.2.2.21) zu Glukose umgewandelt wird (Wong *et al.*, 1986). Die Rolle der Endoglukanasen ist vor allem in den phytopathogenen Bakterien *Ralstonia solanacearum* und *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* studiert worden (Roberts *et al.*, 1988; Gough *et al.*, 1988). Während die Endoglukanase-Mutation in *Ralstonia solanacearum* zu einem verzögerten Auftreten der

Symptome und einem verzögerten Absterben der Tomatenpflanzen führt, ist ihre Auswirkung für *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* mit einer nur geringen Reduktion der Virulenz verbunden.

Allgemein sind nur wenige Fälle (wie z.B. die Cellulase CelA in *Cmm*) bekannt, in denen ein einzelnes extrazelluläres Enzym eine essentielle Rolle in der Pathogenität spielt, zumeist ist das Zusammenwirken mehrerer dieser Enzyme erforderlich, um die jeweiligen Symptome auszulösen.

3. Proteinsekretion

Die Proteine, die in die Zellerkennung, Zelladhäsion, die Supprimierung der Pflanzenabwehr, und die Degradierung der pflanzlichen Zellwand involviert sind, werden alle sekretiert, so dass den bakteriellen Proteinsekretionssystemen in den Bakterien-/Pflanzen-Interaktionen eine besondere Rolle zukommt.

Unter Proteinsekretion versteht man einen aktiven Transport von Proteinen über die Cytoplasmamembran und teilweise weiter in das umgebende extrazelluläre Medium. Grundlegende Unterschiede treten zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien aufgrund ihres unterschiedlichen Zellhüllenaufbaus mit zwei bzw. nur einer Membran auf. Während die Proteinsekretion in Gram-negativen Bakterien zwei Translokationsschritte über die innere und die äußere Membranen erfordert, müssen die Proteine in Gram-positiven Bakterien nur eine Membran überqueren, um sekretiert zu werden. Als Konsequenz dieses aktiven Prozesses kann ein über die äußere Membran transloziertes Protein unabhängig von der strukturellen Organisation der Bakterienzelle entweder frei im extrazellulären Raum vorliegen oder mit der Zelloberfläche assoziiert bleiben. In Gram-positiven Bakterien kann dies die Verankerung in der Membran oder kovalente bzw. nicht kovalente Bindung an die Zellwandkomponenten bedeuten, während bei den Gram-negativen Bakterien neben der Verankerung in der äußeren Membran auch der Einbau in makromolekulare Strukturen (Flagellen, Pili) oder die Injektion in Wirtszellen beschrieben wurden (Desvaux *et al.*, 2009; Henderson *et al.*, 2004; Desvaux *et al.*, 2006).

Historisch gesehen ist die Proteinsekretion in Gram-negativen Bakterien am besten untersucht. Acht verschiedene Transportsysteme, abgekürzt als T1SS bis T8SS bezeichnet (Abb. 2), sind bereits identifiziert und für den Transport von Proteinen, und indirekt auch DNA zuständig (Desvaux *et al.*, 2009). Einige der sekretierten Proteine werden von den Transportsystemen vom Typ I, III, IV oder VI in einem einzigen Schritt gleichzeitig über beide Membranen transloziert, während andere zuerst über die universellen in der Cytoplasmamembran lokalisierten Sec („secretion“)- und Tat-Transportsystemen („twin-arginine translocation“) in den periplasmatischen Raum und anschließend über die T2SS und

T5SS, seltener über T1SS und T4SS, nach außen gelangen (Tseng *et al.*, 2009). Teile dieser Systeme finden sich auch in Gram-positiven Bakterien, deren Proteine allerdings hauptsächlich mittels der Sec- und Tat-Systeme über die Cytoplasmamembran transportiert werden (Tseng *et al.*, 2009; Desvaux *et al.*, 2009). Die Nomenklatur vieler Sekretionssysteme ist in der Literatur nicht einheitlich, deshalb wird in dieser Arbeit auf die Definitionen von Desvaux *et al.* (2009) zurückgegriffen, der die Proteinsekretion in Gram-negativen Bakterien nach alphanummerischem System und die Proteinsekretionssysteme der Gram-positiven Bakterien sowie den allgemeinen Transport über die Cytoplasmamembran mit ihren deskriptiven Namen beschreibt.

3.1 Proteinsekretionssysteme in Proteobakterien

Das **Typ I**-Sekretionssystem (T1SS) besteht aus drei Proteinen, einem ABC-Transporter und zwei weiteren Proteinen (MFP, „membrane fusion protein“ und OMP, „outer membrane protein“), die zusammen einen durchgehenden Proteinkanal vom Cytoplasma bis in das Zelläußere bilden und die Sekretion in einem einzigen Schritt ohne ein periplasmatisches Intermediat erlauben. Die Sekretion von Substraten erfolgt posttranslational, im ungefalteten Zustand und ist von der Präsenz eines spezifischen, nicht-konservierten carboxyterminalen Sekretionssignals abhängig, das weder während noch nach der Translokation abgespalten wird. Das am besten untersuchte Beispiel für Typ I-Sekretion ist der TolC-HlyD-HlyB-Komplex von *E. coli*, der den Transport von Hämolyisin A vermittelt (Mackman *et al.*, 1984). Beinahe alle Typ I-Sekretionssubstrate spielen eine entscheidende Rolle in der Interaktion mit dem Wirt, in dem sie ihn entweder direkt angreifen z.B. über HlyA oder essentiell für seine Kolonisation sind (Jenewein *et al.*, 2009). Virulenzfaktoren wie Metalloproteasen, Adhäsine und Glykanasen, die über das Typ I-Sekretionssystem ausgeschleust werden, sind in vielen pflanzenpathogenen Bakterien wie *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* und *Xylella fastidiosa* gefunden worden (Delepelaire, 2004; Reddy *et al.*, 2007).

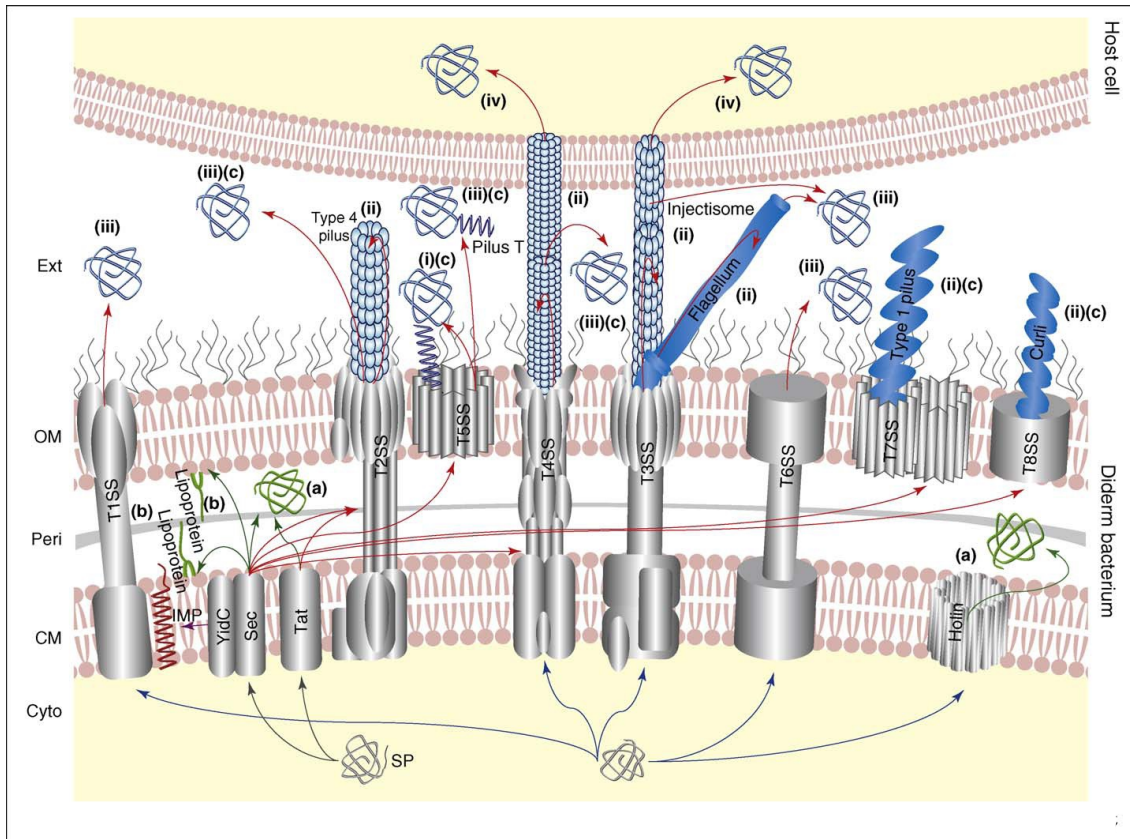


Abb. 2. Schematische Darstellung verschiedener Sekretionssysteme und der subzellulären Lokalisation sekretierter Proteine in Gram-negativen Bakterien. In Gram-negativen Bakterien können die Proteine (a) aus dem Cytoplasma ins Periplasma transportiert, (b) entweder an der Cytoplasmamembran oder dem Periplasma zugewandter Seite der äußeren Membran verankert (z.B. als Lipoprotein) oder (c) zur zweiten Translokation mittels T2SS, T4SS, T5SS, T7SS oder T8SS über die äußere Membran dirigiert werden. Die sekretierten Proteine können sein: (i) verankert in der äußeren Membran (z.B. über das T5SS), (ii) Teil von Zelloberflächenkomplexen verschiedener Transportsysteme, z.B. T3SS, (iii) extrazellulär (Sekretion über T1SS-T6SS), (iv) oder direkt über das T3SS oder T4SS in eukaryotische Wirtszellen injiziert. Schwarze bzw. blaue Pfeile markieren den Weg zu der Cytoplasmamembran für Proteine mit bzw. ohne ein N-terminales Signalpeptid. Rote Pfeile kennzeichnen die Sekretion und die violetten die Integration von Proteinen in die Membran. Sekretierte Proteine sind blau und die exportierten Proteine sind grün dargestellt. Cyto, das Cytoplasma; CM, die Cytoplasmamembran; CW, die Zellwand; Peri, das Periplasma; OM, die äußere Membran; Ext, der extrazelluläre Raum (nach Desvaux *et al.*, 2009).

Das **Typ II**-Sekretionssystem ist ein hoch konserviertes, weit verbreitetes System, das die Sekretion vieler Virulenzfaktoren, einschließlich extrazellulärer Toxine, Proteasen, Zellwand-degradierender Enzyme, und anderer für die Adaptation an die Umwelt notwendiger Proteine vermittelt (Ciancotto, 2005; Sandkvist, 2001). Das Typ II-Sekretionssystem, häufig auch als MTB („main terminal branch“) des Sec-abhängigen GSP („general secretion pathway“) bezeichnet, beschreibt die Translokation über die äußere Membran (Sandkvist, 2001). Es besteht aus einem aus 12-16 GSP-Proteinen organisierten Multiproteinkomplex, der das Periplasma durchspannt und vermutlich die innere und die äußere Membranen

verbindet (Filloux, 2004). Die über das T2SS sekretierten Exoproteine werden an ihrem N-terminalen Signalpeptid erkannt und in einem Zwei-Schritte-Prozess, der ein periplasmatisches Intermediat einschließt, transloziert. Im ersten Schritt erfolgt die Sec- bzw. Tat-Systeme abhängige Translokation ungefalteter bzw. bereits gefalteter Proteine über die innere Membran, der sich im zweiten Schritt nach der Abspaltung des Signalpeptides die Translokation reifer Exoproteine über die äußere Membran mittels T2SS anschließt. Dabei werden die Exoproteine von einem Pseudopilus, der strukturell homolog zu den Typ IV Pili ist, durch einen von den Sekretinen (GspD-Proteinen) in der äußeren Membran gebildeten Kanal direkt in die Umgebung geschleust (Filloux, 2004).

Das **Typ III**-Sekretionssystem, auch „Injektisom“ genannt, ist ausschließlich aus manchen Proteobakterien bekannt. Es ist ein für die Virulenz pflanzenpathogener Bakterien zentrales System, das für den Transport von Effektorproteinen direkt in das Cytosol der eukaryotischen Wirtszellen verantwortlich ist (Pugsley, 1993). Die Effektorproteine werden an den ersten 20 Aminosäuren am N-terminalen Ende der Polypeptidkette oder auch der 5'-Region der mRNA erkannt und ohne die Bildung von periplasmatischen Intermediaten durch eine Nadel-ähnliche Struktur, an deren Aufbau bis zu 20 verschiedene Proteinen beteiligt sind, sekretiert (Hueck, 1998; Cheng *et al.*, 2000; Mota *et al.*, 2005). Die Injektion der Effektorproteine erfolgt erst nach der Kontaktaufnahme zwischen dem Bakterium und der Wirtszelle (Zierler *et al.*, 1995). Die so sekretierten Effektorproteine greifen in die zellulären Prozesse des Wirts ein und führen in den meisten Fällen zur Entstehung einer pathogenen Beziehung zwischen dem Wirt und dem Bakterium, oder sie sind - im Falle der inkompatiblen Interaktion - die Auslöser der kultivar-spezifischen Resistenz (Ghosh, 2004; Büttner, 2009). Sekretionssysteme vom Typ III wurden in vielen tier- und pflanzenpathogenen Bakterien einschließlich *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *E. coli*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* und *Chlamydia trachomatis* identifiziert und können sieben verschiedenen Familien zugeordnet werden (Hueck, 1998; Troisfontaines *et al.*, 2005). Die in den pflanzenpathogenen Bakterien *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum* und *Xanthomonas campestris* identifizierten Typ III-Sekretionssysteme gehören den Hrp1- und Hrp2-Familien an. Allerdings besitzen nicht alle pflanzenpathogenen Proteobakterien ein T3SS, es fehlt z.B. in *Agrobacterium* und *Xylella*.

Das **Typ IV**-Sekretionssystem vermittelt den Transport von DNA und Proteinen, die entweder in das extrazelluläre Medium oder direkt in eine Rezipientenzelle übertragen werden. Beide Prozesse sind eng mit der Virulenz verbunden. Zum einen kann eine Protein-vermittelte Übertragung von DNA stattfinden, die die Adaptation des Pathogens an sich ändernde Umweltbedingungen während der Invasion ermöglicht. Zum anderen kann die Interaktion

translozierter Effektorproteine mit Wirtsproteinen Prozesse auslösen, die die Kolonisation des Wirts begünstigen (Cascales *et al.*, 2003). Drei Familien des T4SS sind beschrieben worden: (i) Konjugationssysteme, die einen Kontakt-abhängigen Transfer von DNA in die Rezipientenzelle vermitteln (z.B. klassische Konjugationssysteme und das VirB-System von *Agrobacterium tumefaciens*); (ii) DNA-Übertragungssysteme, die die DNA in oder aus dem extrazellulären Milieu transportieren (z.B. das ComB-System von *Helicobacter pylori*). (iii) Effektortranslokationssysteme, die für die Translokation von (Effektor)proteinen in eukaryotische Zellen verantwortlich sind (z.B. das Cag-System von *Helicobacter pylori*) (Zhu *et al.*, 2000; Hofreuter *et al.*, 2000; Censini *et al.*, 1997).

Vier weitere Sekretionssysteme (T5SS-T8SS) sind in Gram-negativen Bakterien beschrieben (Tab. 1). Auf sie wird hier nicht genauer eingegangen, da bisher keine Homologen in Gram-positiven Bakterien entdeckt wurden, und sie teilweise nicht im Detail untersucht sind. Allerdings werden durch das T5SS auch Virulenzfaktoren sekretiert.

Tab. 1. Sekretionssysteme T5-T8SS Gram-negativer Bakterien.

Sekretions-system	Vorkommen (Beispiele)	Signalpeptid-abhängig	Virulenzfaktor-Transport	Referenz
T5SS	<i>Helicobacter, Rickettsia, Neisseria, E. coli</i>	ja	ja	Henderson <i>et al.</i> , 2004; Bernstein, 2007
T6SS	<i>Vibrio, Pseudomonas, Agrobacterium</i>	nein	ja	Filloux <i>et al.</i> , 2008
T7SS	Enterobakterien, <i>Pseudomonas, Agrobacterium</i>	ja	ja	Desvaux <i>et al.</i> , 2009
T8SS	Enterobakterien	unbekannt	ja	Desvaux <i>et al.</i> , 2009

3.2 Proteinsekretionssysteme in Gram-positiven Bakterien

Die Proteinsekretion in Gram-positiven Bakterien wird hauptsächlich durch das Sec- und das Tat-System vermittelt (Abb. 3). Zusätzlich sind noch drei weitere Sekretionssysteme FPE („fimbriin-protein exporter“), FEA („flagella export apparatus“) und ESAT-6 beschrieben, auf die nur kurz eingegangen wird, da sie nur in wenigen Bakterien untersucht wurden und daher noch schlecht charakterisiert sind (Abb. 3). Auf ein weiteres System, das Holine von Phagen umfasst und nur für die Lyse von Bakterien durch Phagen eine Rolle spielt, wird hier nicht weiter eingegangen. Im Gegensatz zu Sec, Tat und den Holinen, die in Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien vorkommen, konnte die Existenz des ESAT-6-Systems ausschließlich in Gram-positiven Bakterien nachgewiesen werden, während die beiden FPE- und FEA-Systeme in einigen Komponenten Homologie zu den T2SS bzw. T3SS Gram-negativer Bakterien zeigen (Desvaux *et al.*, 2009).

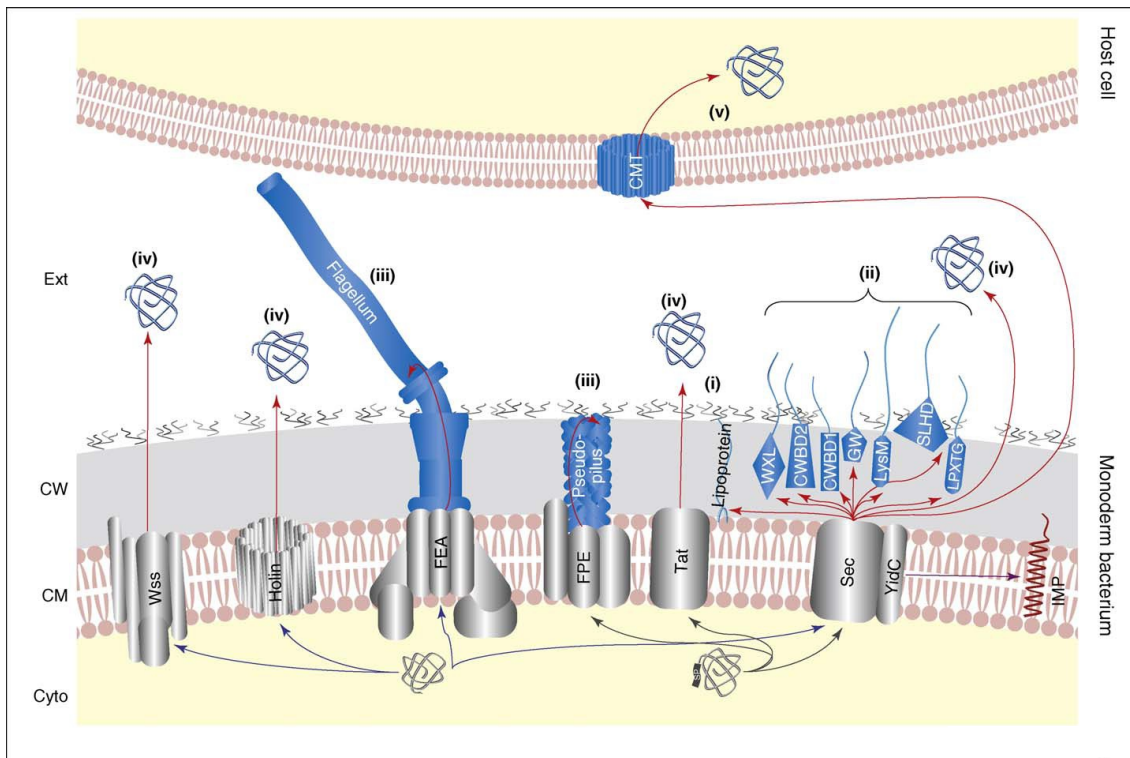


Abb. 3. Schematische Darstellung verschiedener Sekretionssysteme und der subzellulären Lokalisation sekretierter Proteine in Gram-positiven Bakterien. Die sekretierten Proteine können (i) verankert in der Cytoplasmamembran (z.B. Lipoprotein), (ii) kovalent (z.B. über das LPXTG-Motiv) oder nicht kovalent (z.B. über das LysM, GW, CWBD1, CWBD2, SLHD oder WXL-Motive an die Zellwand gebunden, (iii) Teil von Zelloberflächenkomplexen wie Pili (Sekretion über Sec), Pseudopili (Sekretion über FPE) oder Flagellen (Sekretion über FEA), oder (iv) extrazellulär (Sekretion über Sec, Tat, Holin, Wss) sein. Auch die Translokation in Wirtszellen über die Cytolysin-vermittelte Translokation (CMT) ist bekannt. Schwarze bzw. blaue Pfeile markieren den Weg zu der Cytoplasmamembran für Proteine mit bzw. ohne ein N-terminales Signalpeptid. Rote Pfeile kennzeichnen die Sekretion und die violetten die Integration von Proteinen in die Membran. Sekretierte Proteine sind blau. Cyto, das Cytoplasma; CM, die Cytoplasmamembran; CW, die Zellwand; Ext, der extrazelluläre Raum (nach Desvaux *et al.*, 2009).

Das FPE („fimbriin-protein exporter“-)System ist bislang das einzige in Gram-positiven Bakterien bekannte System für die Pilus-Biogenese. In *Bacillus subtilis* vermittelt es den Export und die Assemblierung von Pilin-ähnlichen Proteinen (ComG-Proteinen), die zu einem multimeren Komplex aggregieren und den Zellen natürliche Kompetenz verleihen (Dubnau, 1999). Aufgrund seiner Ähnlichkeit zum Typ IV Pilus und dem Pseudopilus des T2SS wird dieser Komplex als „competence pseudopilus“ bezeichnet (Chen *et al.*, 2006). Neben dem DNA-Transport können die aus Typ IV Pilinen aufgebauten Pili auch in die bakterielle Adhäsion und Motilität involviert sein und werden u.a. in Actinomyceten, Clostridien und Streptococcen gefunden (Desvaux, 2006).

Das FEA-System („flagella export apparatus“) Gram-positiver Bakterien ist zu dem T3SS Gram-negativer Bakterien homolog und besteht aus mehreren Transmembrankomponenten, Chaperonen, einer ATPase und einem Regulator (Desvaux, 2006), über die Komponenten transloziert werden, die zum Aufbau des Flagellums benötigt werden. Die FEA-Sekretion verläuft Sec-unabhängig, die sekretierten Proteine besitzen kein Signalpeptid. Die Funktion der Flagellen besteht in der bakteriellen Motilität, sie können aber auch in die bakterielle Adhäsion, Biofilmbildung oder Pathogenität involviert sein (Jonson *et al.*, 2005).

Das ESAT-6-System (auch als Wss oder WXG100 Sekretionssystem genannt) wurde zuerst für das *Mycobacterium tuberculosis* beschrieben, in dem es die Sec-unabhängige Sekretion von mindestens zwei Virulenzfaktoren, ESAT-6 („early secreted antigen target“, 6 kDa) und CFP-10 („culture filtrate protein“, 10 kDa), vermittelt. Weitere ESAT-6 Homologe konnten im Genom von *M. tuberculosis* nachgewiesen werden und scheinen essentiell für die Pathogenität des Bakteriums zu sein (Sorensen *et al.*, 1995). Zwei häufig auftretende Merkmale, die die meisten ESAT-6-Substrate gemeinsam haben, sind ihre geringe Größe aus ca. 100 Aminosäuren und die Präsenz eines WXG-Motivs. ESAT-6 homologe Proteine sind in den Genomen anderer Gram-positiver Bakterien wie *B. anthracis*, *B. subtilis*, *C. acetobutylicum*, *L. monocytogenes* und *S. aureus* nachgewiesen. Für einige dieser Bakterien konnte gezeigt werden, dass die ESAT-6-Homologe kodierenden Gene in Genclustern organisiert sind, die andere für die Translokation der ESAT-6-Substrate wichtige Proteine kodieren (Pallen, 2002; Sibbald *et al.*, 2006). In den beiden sequenzierten *Clavibacter*-Genomen wurde kein ESAT-6-System vorhergesagt.

Eventuell existiert noch ein weiteres System, das die Injektion von Effektorproteinen in das Cytosol von Wirtszellen vermittelt, also ein funktionelles Analogon zum Typ III-Sekretionssystem der Proteobakterien darstellt (Abb. 3). In *Streptococcus* wurde eine Cytolysin-vermittelte-Proteintranslokation („cytolysin mediated translocation“, CMT) nachgewiesen (Madden *et al.*, 2001). Die meisten Cytolysine Gram-positiver Bakterien, einschließlich des Streptolysins O (SLO) aus *Streptococcus pyogenes* und des Listeriolysins O von *Listeria monocytogenes*, gehören zu der Gruppe hochkonservierter CDC „cholesterol dependent cytolysins“, die an Cholesterin enthaltende Zellmembranen binden, oligomerisieren und Transmembranporen ausbilden. Diese bis zu 30 nm im Durchmesser betragenden Poren ermöglichen die gezielte Translokation von Effektorproteinen in das Cytosol der Wirtszelle. Im Gegensatz zur T3SS-vermittelten Translokation werden die über CMT translozierten Effektoren zuerst über ein generelles Sekretionssystem in das extrazelluläre Medium sekretiert. Ein ähnliches Modell für Poren-vermittelte Translokation von Effektorproteinen wurde auch für eukaryotische Zellen postuliert (Shresta *et al.*, 1998).

Das *Cmm*-Protein CMM_2382 kodiert ein Perforin und könnte somit analog zum CMT-Mechanismus durch die Oligomerisierung seiner Monomere eine Pore in der Zellmembran der Zielzellen ausbilden und die Translokation von Proteinen in das Cytosol infizierter Zellen vermitteln (Flügel, 2010).

Das wichtigste System Gram-positiver Bakterien zur Sekretion von Proteinen ist das Sec-/Tat-System, über das ein Großteil der Proteine exportiert wird. Aufgrund des Zellwandaufbaus der Gram-positiven mit nur einer Membran sind die entsprechenden Transportsysteme einfacher aufgebaut als bei Proteobakterien, vor allem bestehen sie aus weniger Proteinen. Dagegen ist die endgültige Lokalisierung exportierter Proteine in Gram-positiven Bakterien komplizierter. Zusätzlich zu den extrazellulären, frei im Medium vorliegenden Proteinen finden sich Membran- und Zellwand-assoziierte Proteine auf der Oberfläche Gram-positiver Bakterien, die auch in verschiedenen Subproteomen zusammengefasst werden. Zu den Membran-assoziierten Proteinen gehören einerseits die durch eine oder mehrere hydrophobe Domänen nicht kovalent in der Cytoplasmamembran verankerten Proteine sowie Lipoproteine, die über einen Lipidanker kovalent an die Membranlipide gebunden sind. An der Lipoproteinbiosynthese sind neben der Lipoprotein-spezifischen Signalpeptidase II (Lsp), die für die Abspaltung des Signalpeptides verantwortlich ist, noch zwei weitere Enzyme, die Prälipoprotein-Diacylglyceryl-Transferase (Lgt) und die N-Acyl-Transferase (Lnt) beteiligt (Hutchings *et al.*, 2008). Bakterielle Lipoproteine sind vor allem als Substratbindeproteine der ABC-Transporter am Transport von Nährstoffen beteiligt.

Die Zellwand-assoziierten Proteine können ebenfalls entweder nicht kovalent über spezifische Domänen z.B. die Lysin-Motiv-Domäne (LysM), die Cholin-Bindedomäne (Abb. 3) oder kovalent, in einer von den Sortasen katalysierten Reaktion an die Zellwand gebunden werden. Die Sortasen erkennen ein spezifisches C-terminales LPXTG-Motiv des Proteins und katalysieren die enzymatische Verknüpfung mit dem Peptidoglykan. Sortase-ähnliche Proteine wurden in beinahe allen Gram-positiven Bakterien identifiziert und werden auf der Basis ihrer Sequenzverwandschaft in fünf Gruppen eingeteilt (Comfort *et al.*, 2004; Tab. 2). Die in der Zellwand verankerten Proteine erfüllen verschiedenste Funktionen und können als Adhäsine, Antigene, Rezeptoren oder Enzyme (Amidasen, Hydrolasen, Lyasen, Proteasen, Transferasen) aktiv sein (Desvaux, 2006). Für die meisten Actinomyceten, deren Genom sequenziert ist, ist mit nur 15-20 Proteinen eine relativ geringe Anzahl potentieller Sortase-Substrate vorhergesagt.

Tab. 2. Einteilung der Sortasen Gram-positiver Bakterien in 5 verschiedene Gruppen (nach Comfort *et al.*, 2004). F: Firmicutes, A: Actinomyceten.

Familie	Motiv	Vorkommen	Genprodukte in <i>Cmm</i>
SrtA	LPXTG	F	-
SrtB	NP[Q/K]T[N/G][D/A]	F	-
3	LPXTGG	A/F	CMM_0013
4	LPNTA	F	-
5	LAXTG	A	CMM_0129

Diese gerade beschriebenen Systeme führen zu einer Bindung der translozierten Proteine an die Zellhülle, sie sollten nicht frei im extrazellulären Medium auftreten. Um zu untersuchen, welche Proteine derartig sekretiert werden und zelloberflächengebunden vorliegen, sind spezielle Methoden der Membran- und Zellwandproteomcharakterisierung notwendig. Alternativ ermöglicht die Einführung von Mutationen in den Zellhüllen-verknüpfenden Enzymen, worauf die entsprechenden Proteine frei im Überstand vorliegen sollten, eine Bestimmung dieser Proteine. Um es schon an dieser Stelle hervorzuheben, werden in dieser Arbeit nur die freien, nicht über spezifische Domänen mit der Zellhülle verknüpften Proteine untersucht, die das extrazelluläre Proteom (Exoproteom) bilden.

3.3 Proteinsekretion über die Sec- und Tat-Systeme

Die Sec- und Tat-Sekretionssysteme kommen universell bei den Eubakterien, Archaeen und den Eukaryoten vor (Tseng *et al.*, 2009). Die über diese Systeme translozierten extrazellulären Präproteine werden in der Regel mit einem N-terminalen Signalpeptid synthetisiert. Während oder kurz nach der Translokation wird das Signalpeptid durch Signalpeptidasen abgespalten und das Protein in seine native Form überführt. Ob das Präprotein ungefaltet über das Sec- oder komplett gefaltet über das Tat-System transloziert wird, entscheidet die Art des Signalpeptides.

3.3.1 Charakteristische Eigenschaften verschiedener Signalpeptide

Derzeit sind verschiedene Typen der N-terminalen bakteriellen Signalpeptide bekannt, die eine entscheidende Rolle im frühen Stadium der Proteinsortierung spielen. Allen gemeinsam ist der dreigliedrige Aufbau aus der N-, H- und der C-Domäne (Hedge *et al.*, 2006). Die N-Domäne besteht hauptsächlich aus positiv geladenen Aminosäuren, die mit den negativ geladenen Phospholipiden und/oder den Komponenten des Sekretionsapparates der Membran interagieren. Die H-Domäne bildet einen hydrophoben Kern, der α -helikale Konformation annehmen kann. In der Mitte des hydrophoben Kerns werden oft Helix-brechende Glycine oder Proline gefunden, die die Ausbildung eines Loops und die damit

verbundene Insertion des Signalpeptides in die Membran ermöglichen (Tsjalma *et al.*, 2004). Die C-Domäne enthält die Spaltstelle für die Signalpeptidase, die sich nach Öffnung des Loops auf der Außenseite der Membran befindet, wo auch die katalytischen Domänen der Signalpeptidasen vom Typ I und II lokalisiert sind. Nach dem Abspalten des Signalpeptides wird es von den Signalpeptidasen abgebaut und das translozierte Protein in seine native Konformation überführt. Abhängig vom Sekretionssystem (Sec oder Tat) und der prozessierenden Signalpeptidase gibt es zwischen den Signalpeptiden geringe Unterschiede. Über das Sec-System sekretierte Proteine werden von der Signalpeptidase Typ I oder im Fall eines Lipoproteins von der Signalpeptidase Typ II prozessiert.

Das Signalpeptid von Proteinen, die über das Tat-Sekretionssystem sekretiert werden, zeigt einen etwas anderen Aufbau. An der Grenze zwischen dem N-Terminus und der H-Region findet sich zusätzlich das namensgebende -RR- oder -KR- Motiv. Die C-Region ist stärker basisch und der N-Terminus ist im Durchschnitt 14 Aminosäuren länger als das der Sec-Signalpeptide. Hinzu kommt, dass im Tat-Signalpeptid in der H-Region die Aminosäuren Glycin und Threonin häufiger vorkommen als Leucin, was eine Abnahme der Hydrophobizität zur Folge hat (Taylor *et al.*, 2006).

3.3.2 Das Sec-Sekretionssystem

Das Sec-System dient dem Export sekretorischer Proteine, die im ungefalteten Zustand entweder posttranslational nach außen sekretiert werden oder im Falle der Membranproteine während des Translokationsprozesses (cotranslational) in die Membran eingebaut werden. Die bakterielle Sec-Translokase ist ein Proteinkomplex, der aus einer Translokationspore SecYEG, einer cytoplasmatischen ATPase SecA und zwei weiteren akzessorischen Proteinen SecD und SecF aufgebaut ist. Die integralen Membranproteine SecE, Y und G interagieren miteinander und bilden in der Cytoplasmamembran einen Kanal, über den die sekretorischen Proteine aus dem Cytoplasma in die Umgebung ausgeschleust werden. Das SecA-Protein treibt durch die Hydrolyse von ATP die Insertion und die Translokation von Proteinen an. SecA besitzt Affinitäten sowohl zu sekretorischen Proteinen als auch zum Translokationskanal in der Membran. Die Komponenten SecY, SecE und SecA sind in *E. coli* für den Aufbau einer funktionsfähigen Translokase essentiell und ausreichend (Flower, 2001). Dennoch erreicht die nur aus diesen drei Proteinen aufgebaute Translokase nicht die optimale Effizienz. Die Interaktion weiterer Membranproteine mit dem SecEY-Komplex erhöht die Translokationsaktivität. In *E. coli* bilden SecD, SecF und YajC einen heterotrimeren Komplex, der mit dem SecEY-Komplex interagiert und seine Translokationsaktivität stimuliert (Flower, 2001). Eine ähnliche Funktion wurde für das SecG-Protein, die dritte Komponente der Translokationspore, beschrieben. Duong und Wickner (1997) haben gezeigt, dass erst die Assoziation des SecEY-Komplexes mit SecG oder dem

SecDFYajC-Komplex zur Generierung der vollen Translokationsaktivität der Translokase führt. Die akzessorischen Proteine sind für das Überleben von *E. coli* nicht essentiell, dennoch zeigt die Inaktivierung dieser Proteine kodierender Gene einen deutlichen negativen Effekt auf das Zellwachstum und den Proteinexport bei niedrigen Temperaturen (Nishiyama *et al.*, 1994; Pogliano *et al.*, 1994).

Auch in den Gram-positiven Bakterien wie *Bacillus subtilis* oder *Streptomyces lividans* sind zu den Komponenten der Sec-Translokase von *E. coli* homologe Proteine identifiziert worden. Die Inaktivierung einzelner dieser Proteine hat unterschiedliche Phänotypen zur Folge. Das Fehlen des SecA-Proteins von *B. subtilis*, das durch das *divA*-Gen kodiert wird, führt zu Defekten in Sporulation und Zellwachstum, während die Abwesenheit des SecG-homologen Proteins YvaL Kälte-Sensitivität bewirkt und die Sekretion einiger weniger Proteine, vor allem bei niedrigen Temperaturen, negativ beeinflusst (van Wely *et al.*, 1999). Die Deletion des *secG*-Gens in *S. lividans* ist dagegen mit einer quantitativen Änderung der Proteinsekretion und einer verzögerten Sporulation unter normalen Temperaturen assoziiert, wobei kein Effekt auf das Wachstum unter niedrigen Temperaturen beobachtet werden konnte (Palomino *et al.*, 2008).

Das Sec-System ist für den Transport von ungefalteten Proteinen verantwortlich, die entweder co- oder posttranslational transloziert werden. Für den posttranslationalen Transport ist das SecB-Protein, ein nur in Gram-negativen Bakterien vorkommendes cytoplasmatisches Chaperon, das ein vorzeitiges Falten der entstehenden Polypeptidkette verhindert, verantwortlich. Dieses Chaperon erkennt das Exportsignal der Polypeptidkette, bindet das zu translozierende Protein in seiner gesamten Länge und dirigiert es posttranslational zu der SecYEG-Translokase.

Für den cotranslationalen Transport ist das „signal recognition particle“ SRP, ein Ribonukleoproteinkomplex, der bei Bakterien aus dem Ffh-Protein und der 4.5S RNA besteht, als zusätzliche Komponente erforderlich (Buskiewicz *et al.*, 2005). Das SRP bindet die naszierende Polypeptidkette und transportiert den Translationskomplex an die Membran, wo der SRP von seinem Rezeptor, FtsY, erkannt wird. Die Interaktion von Ffh und dem FtsY, zweier GTP-bindender Proteine, aktiviert die GTP-Hydrolyse, die die Ablösung beider Proteine voneinander und den Transfer der naszierenden Polypeptidkette in das Translokon zur Folge hat. Der bakterielle SRP-Weg wird bei Gram-negativen Bakterien hauptsächlich für die Integration von Membranproteinen in die Membran verwendet.

In *S. lividans* und vermutlich auch in *B. subtilis* kommt das SecB-Chaperon nicht vor und kann funktional durch SRP ersetzt werden, das sowohl Membran- als auch sekretorische Proteine zu der Membran steuert (Palomino *et al.*, 2008).

3.3.3 Das Tat-Sekretionssystem

Das Tat-Sekretionssystem ist für die Translokation bereits im Cytoplasma vollständig gefalteter Proteine zuständig. Namensgebend für das System sind die zwei aufeinander folgenden Argininreste in der Signalpeptidsequenz, auch als das -RR- („twin arginine“) Motiv bezeichnet. Die meisten Tat-Substrate sind z.B. Cofaktor-haltige Proteine, bei denen der Einbau dieser Cofaktoren (z.B. Molybdopterin, FAD, NADP+, Eisen-Schwefel-, Eisen-Nickel-Cluster sowie Kupfer) im Cytoplasma der Zellen erfolgt, um Verluste an Spurenelementen oder unerwünschte Oxidationsprozesse zu vermeiden. Aber auch Membranproteine können über das Tat-System transportiert werden (Widdick *et al.*, 2006). In manchen Fällen erfolgt auch ein Cotransport eines Bestandteils eines Proteinkomplexes, das dann kein eigenes Signalpeptid aufweisen muss (Schaerlekens *et al.*, 2001).

Die meisten Tat-Systeme bestehen aus den drei Membranproteinen TatA, B und C, die in *E. coli* für die Tat-abhängige Translokation essentiell sind. Bei Gram-positiven Bakterien findet man auch Systeme, die nur aus TatA und C aufgebaut sind, wobei TatA die Funktion des TatB mit übernimmt (Jongbloed *et al.*, 2005). Während der Komplex aus TatB und TatC für die Erkennung des Signalpeptides und seiner Insertion in die Membran zuständig ist, bildet die TatA-Komponente einen homooligomeren Komplex in der Membran und könnte daher die Poren-bildende Komponente der Tat-Translokase darstellen. Die für den Translokationsprozess benötigte Energie wird von dem Protonengradient bereitgestellt.

Das Tat-System scheint in verschiedenen Organismen unterschiedlich wichtig zu sein. Laut Vorhersagen sollen in *E. coli* nur 26 Proteine Tat-abhängig sekretiert werden, so dass das Tat-System neben dem Sec-System nur eine untergeordnete Rolle in der Sekretion spielt. In Gram-positiven Bakterien (Widdick *et al.*, 2006) und Archaeen (Rose *et al.*, 2002) scheint es dagegen häufiger zum Einsatz zu kommen. In dem Actinomyceten *Streptomyces coelicolor* wird für rund 200 Proteine ein Tat-System spezifisches Signalpeptid vorhergesagt (Widdick *et al.*, 2006).

In einigen Organismen kommt der Tat-abhängigen Sekretion eine wichtige Rolle in der Pathogenese zu, z.B. vermittelt sie in *Pseudomonas aeruginosa* und *Streptomyces scabies* den Transport von mehreren Virulenzfaktoren (Ochsner *et al.*, 2002; Joshi *et al.*, 2010). In *Agrobacterium tumefaciens* führt die Deletion der Tat-Gene zum Verlust der Fähigkeit, Tumore in Pflanzengewebe auszubilden (Ding *et al.*, 2003).

4. Extrazelluläre Enzyme und Sekretionssysteme - ihre Rolle in der Pathogenität von *Cmm*

Die Infektion pflanzlichen Gewebes durch phytopathogene Mikroorganismen beginnt meistens mit einem wechselseitigen Erkennungsvorgang zwischen Wirtszelle und Pathogen. Wird der eingedrungene Pathogen als „fremd“ erkannt, induziert die Wirtszelle eine Reihe biochemischer Reaktionen, die die Infektion nicht manifest werden lassen. Kann das Pathogen die Erkennung durch die Wirtspflanze umgehen, dringt es in sie ein, vermehrt und breitet sich aus. Die erfolgreiche Infektion ist in der Regel durch die Ausbildung charakteristischer Symptome erkennbar. Für das tiefere Verständnis der Wirt-Pathogen-Interaktion sind die Fragen des Eindringens und Ausbreitens, und dabei vor allem die gegenseitige Erkennung und - in der kompatiblen Interaktion - die Umgehung basaler und/oder induzierter Abwehrreaktionen der Wirtspflanzen seitens des Pathogens von entscheidender Bedeutung. Eine wichtige Rolle in diesen Prozessen wird den nach außen sekretierten oder an der Zelloberfläche gebundenen Proteinen sowohl beim Wirt als auch dem Pathogen zugeschrieben.

Extrazelluläre Enzyme spielen bei *Clavibacter* eine Rolle in der Nährstoffgewinnung, wohl vor allem in späteren Stadien der Tomatenkolonisierung durch den Abbau von Zellwandpolymeren der Xylembahnen und/oder des umgebenden Parenchymgewebes. Ob extrazelluläre Enzyme direkt in der Infektion oder in frühen Kolonisationsstadien auch an der Generierung von Signalen, die die Pflanzenabwehr beeinflussen, beteiligt sind, ist bisher unbekannt. Der *Cmm*-Stamm NCPPB382 weist neben der auf dem Plasmid pCM1 kodierten β -1,4-Endoglukanase CelA (pCM1_0020), eine weitere chromosomal kodierte β -1,4-Endoglukanase CelB (CMM_2443), zwei chromosomal kodierte Xylanasen XysA und XysB (CMM_1673, 1674), eine Polygalakturonase PgaA (CMM_2871) und zwei Endoglukanasen EndX und EndY (CMM_2691, 2692) auf, die pflanzliches Gewebe mazerieren können. Die Sequenzanalyse dieser extrazellulären Enzyme und der bereits bekannten Virulenzfaktoren CelA, Pat-1 und aller weiteren Mitglieder der Chp- und Ppa-Familien ergab, dass für alle diese Proteine ein Signalpeptid vorhergesagt werden konnte, das deren Sekretion in das extrazelluläre Medium signalisiert.

Obwohl noch wenig über die Proteintranslokation und daran beteiligter Transportsysteme in *Cmm* bekannt ist, konnte bei der Annotation die Existenz mehrerer Komponenten verschiedener Transportsysteme, die an der Sekretion von Proteinen und deren post-translationalen Modifikationen beteiligt sein können, nachgewiesen werden (Tab. 3).

Cmm kodiert ungefähr 70 hypothetische ABC-Transporter, ob einer oder mehrere allerdings am Proteintransport beteiligt sind, ist unbekannt, und dementsprechend auch die Existenz eines T1SS. Die in Gram-negativen Bakterien unter T2SS zusammengefassten Sec- und Tat-Systeme sind in *Cmm* vorhanden. Das Sec-System von *Cmm* setzt sich zusammen aus dem

Membrankanal-bildenden Komplex SecYEG, der cytosolischen ATPase SecA, den akzessorischen Proteinen SecD und SecF sowie den Chaperonen Ffh und FtsY. Ein Gegenstück zum SecB, das für den posttranslationalen Transport über das Sec-Translokon gebraucht wird, scheint bei *Cmm* wie in den meisten Actinomyceten nicht zu existieren. Die zum Aufbau einer funktionsfähigen Tat-Translokase notwendigen Komponenten TatA, TatB, TatC sind ebenfalls vorhanden.

Tab. 3. Sekretionssysteme in *Cmm*.

Sekretionssystem	Proteine
T1SS	ca. 70 ABC-Transporter, eine Beteiligung am Proteinexport ist unbekannt
T2SS	
Sec-System	SecA, D, E, F, G, Y
SRP	Ffh, FtsY, RNA
Signalpeptidase I	SipX (CMM_1247); LepB (CMM_1374); CMM_0147
Signalpeptidase II	LspA (CMM_2058)
Lipidmodifikation	LgtA (CMM_1761); LntA (CMM_1684)
Tat-System	TatA, B, C
T3SS	nicht vorhanden
T4SS	Tra-Proteine auf pCM2 und teilweise pCM1
T5SS	unbekannt
T6SS	unbekannt
T7SS	
Esat-6	unbekannt
T8SS	unbekannt
Sortase-System	CMM_0013, CMM_0129

Das T3S System, das bei den meisten Proteobakterien zur Translokation von Proteinen direkt in den Wirt benutzt wird, fehlt bei allen untersuchten Pathogenen aus der Gruppe der Actinomyceten. Die Konjugationssysteme der Plasmide pCM1 und pCM2 sind wahrscheinlich, trotz ihres einfacheren Aufbaus, zum T4SS homolog (Abt, 2008). Beide Plasmide enthalten Transferregionen, die Membranproteine und einige zu den Tra-Proteinen aus Proteobakterien homologe Proteine kodieren. Bisher sind in *Cmm* bioinformatisch keine weiteren Systeme, die zu den Sekretionssystemen T5-T8 aus Gram-negativen Bakterien oder zum ESAT-6-System Gram-positiver Bakterien homolog sind, identifiziert worden.

Zusätzlich zu den Komponenten der Sec-, SRP-, und Tat-Sekretionssysteme konnten weitere Komponenten identifiziert werden, die für die posttranslationalen Modifikationen exportierter Proteine verantwortlich sind. Dazu gehören die drei Schlüsselenzyme der Lipoproteinbiosynthese: die Prälipoprotein-Diacylglyceryl-Transferase LgtA (CMM_1761), die Lipoprotein-spezifische Signalpeptidase II LspA (CMM_2058) und die N-Acyl-Transferase LntA

(CMM_1684) und drei verschiedene Typ I Signalpeptidasen (SipX, CMM_1247; LepB, CMM_1374; CMM_0147), die für die Abspaltung des Signalpeptides nach der Translokation und die Freisetzung des Proteins in das extrazelluläre Milieu verantwortlich sind. Für die kovalente Verankerung sind je eine Sortase von Typ3 (CMM_0013) und Typ5 (CMM_0129) im Genom von *Cmm* annotiert worden.

In den letzten Jahren sind eine Reihe von Programmen (SignalP, LocateP, TatFIND, etc.) entwickelt worden, die Signalpeptide und die zelluläre Lokalisierung von Proteinen in sequenzierten Genomen vorhersagen. Für *Clavibacter* zeigen diese Vorhersagen, dass etwa 400-500 Proteine sekretiert werden sollten, darunter alle bekannten und vermuteten Virulenzfaktoren.

5. Zielsetzung

Erstes Ziel dieser Arbeit ist eine Bestandsaufnahme des Exoproteoms von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, also aller frei ins Außenmedium sekretierten Proteine. Membran-oder Zellwand-gebundene Proteine werden zunächst nicht erfasst. Davon ausgehend sollte untersucht werden, (1) wie sich das Exoproteom unter Anzucht von *Cmm* in verschiedenen Medien Minimalmedium und Vollmedium ändert. (2) Ob die Supplementierung des Medium mit Xylemsaft, Pflanzenblatthomogenat oder anderen im Pflanzenmaterial vorkommenden Zuckerpolymeren wie Cellulose, Xylan oder Polygalakturonat eine Induktion von bestimmten evtl. für die Pathogenität relevanten Genen bewirkt. (3) Welche Unterschiede sich beim Vergleich des virulenten Stammes NCPPB382 und dem avirulenten CMM100 Stamm ergeben.

In *Cmm* sind mehrere an der Hydrolyse von Zellwandpolymeren beteiligte Enzyme annotiert, deren genaue Funktion in der Virulenz unbekannt ist. Die Konstruktion von „Knock out“-Mutanten in diesen Genen und die anschließende Analyse *in planta* sollen die Bedeutung dieser Enzyme für die Krankheitsentwicklung deutlich machen. Über biochemische Untersuchungen sollen die Substrate dieser Enzyme identifiziert werden. Durch Proteomuntersuchung soll die Expression dieser Gene unter verschiedenen Bedingungen überprüft werden.

Da alle bekannten Virulenzfaktoren ein Signalpeptid tragen und für die Sekretion bestimmt sind, ist ein weiteres Ziel die Charakterisierung der Sec- und Tat-Sekretionssysteme. Die Konstruktion von Mutanten in den entsprechenden Sekretionssystemen und der Vergleich der Exoproteome von Sekretionsmutanten und dem Wildtyp erlauben erste Aussagen darüber, welche Proteine von welchem Sekretionssystem ausgeschleust werden. Weitere Analysen der Mutante in Pflanzentests sollen die Auswirkungen dieser Mutationen auf die Kolonisation und die Virulenz zeigen.

Zusätzlich wurden die Proteome des Xylemsafts von Tomaten vergleichend untersucht, wobei sowohl Tomaten- als auch *Cmm*-Proteine identifiziert werden sollten. Dazu sollte Xylemsaft aus mit unterschiedlich virulenten *Cmm*-Stämmen infizierten Tomaten gewonnen werden und dessen Proteome untereinander und mit dem nicht infizierter Tomaten verglichen werden. So können eventuell durch die Bakterien *in vivo* induzierte Pflanzenproteine (und umgekehrt) identifiziert werden, um neue Erkenntnisse über die Beteiligung exportierter Proteine an der Virulenz und von der Pflanzenseite her die Induktion von Abwehrproteinen zu erhalten.

C. Material

1. Bakterienstämme

Escherichia coli

Tab. 1. In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme.

Stamm	Genotyp/ relevante Eigenschaften	Referenz
DH5 α mcr	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> λ <i>recA1</i> , <i>gyrA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , <i>mcrA</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)-U169 Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>mrr</i> <i>hsdMS</i> <i>mcrBC</i>)	Grant <i>et al.</i> , 1990

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*

Tab. 2. In dieser Arbeit verwendete *Cmm*-Stämme.

Stamm	Genotyp, relevante Eigenschaften	Herkunft / Referenz
NCPB382	virulent, <i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate), pCM1, pCM2	NCPB
CMM101	Curing-Derivat von <i>Cmm</i> NCPB382, pCM1, virulent	Meletzus <i>et al.</i> , 1991
CMM100	Curing-Derivat von <i>Cmm</i> NCPB382, plasmidfrei, avirulent	Meletzus <i>et al.</i> , 1991
CMM382 <i>xysA</i> α	<i>Cmm</i> NCPB382, <i>xysA::cmx</i> , Cm ^R	diese Arbeit
CMM101 <i>xysB</i> α	CMM101, <i>xysB::cmx</i> , Cm ^R	diese Arbeit
CMM101 <i>endX</i> β	CMM101, <i>endX::cmx</i> , Cm ^R	diese Arbeit
CMM101 <i>endXY</i> α	CMM101, <i>endXY::cmx</i> , Cm ^R	diese Arbeit
CMM382 <i>pgaA</i> α	<i>Cmm</i> NCPB382, <i>pgaA::cmx</i> , Cm ^R	diese Arbeit
CMM101 <i>celB</i> α	CMM101, <i>celB::cmx</i> , Cm ^R	diese Arbeit
CMM382 <i>secG</i> α	<i>Cmm</i> NCPB382, <i>secG::cmx</i> , Cm ^R	diese Arbeit
CMM382 <i>tatB</i> β	<i>Cmm</i> NCPB382, <i>tatB::cmx</i> , Cm ^R	diese Arbeit

2. Plasmide und Vektoren

Tab. 3. In dieser Arbeit verwendete Plasmide und Vektoren.

Plasmid /Vektor	relevante Eigenschaften	Herkunft / Referenz
pUC18	Ap ^R , <i>lacZ</i> α -Komplementationssystem	Yanish-Perron, 1985
pOKU9-cmB α	pUC19::1,5 kb <i>Bam</i> HI (<i>cmx</i>), Ap ^R , Cm ^R	Kirchner, 2003
pEC70	pK18mob mit 3,1 kb- <i>Hpa</i> I/ <i>Hind</i> III-Fragment von pTP10 aus <i>Corynebacterium striatum</i> , Cm ^R	Tauch <i>et al.</i> , 1998
cmis3p0009g02	geschertes 6,0 kb-Fragment aus CMM382, kloniert in pSmart, flankiert von <i>Eco</i> RI-Schnittstellen, <i>xysA</i> , <i>xysB</i>	Sequenzierungsprojekt NCPB382
cmis3p0004f07	geschertes 6,0 kb-Fragment aus CMM382, kloniert in pSmart, flankiert von <i>Eco</i> RI-Schnittstellen, <i>endX</i> , <i>endY</i>	Sequenzierungsprojekt NCPB382
cmis3p0006g09	geschertes 6,0 kb-Fragment aus CMM382, kloniert in pSmart, flankiert von <i>Eco</i> RI-Schnittstellen, <i>endX</i> , <i>endY</i>	Sequenzierungsprojekt NCPB382

cmis1p0512b05	geschertes 1,0 kb-Fragment aus CMM382, kloniert in pSmart, flankiert von <i>EcoRI</i> -Schnittstellen, <i>pgaA</i>	Sequenzierungsprojekt NCPPB382
cmis3p0002g07	geschertes 6,0 kb-Fragment aus CMM382, kloniert in pSmart, flankiert von <i>EcoRI</i> -Schnittstellen, <i>celB</i>	Sequenzierungsprojekt NCPPB382
cmis3p0010b07	geschertes 6,0 kb-Fragment aus CMM382, kloniert in pSmart, flankiert von <i>EcoRI</i> -Schnittstellen, <i>secG</i>	Sequenzierungsprojekt NCPPB382
cmis3p0005c06	geschertes 6,0 kb-Fragment aus CMM382, kloniert in pSmart, flankiert von <i>EcoRI</i> -Schnittstellen, <i>secY</i>	Sequenzierungsprojekt NCPPB382
cmis3p0015f08	geschertes 6,0 kb-Fragment aus CMM382, kloniert in pSmart, flankiert von <i>EcoRI</i> -Schnittstellen, <i>tatB</i>	Sequenzierungsprojekt NCPPB382
pHTxysA α	pSmart_cmis3p0009g02 mit in <i>StuI</i> kloniertem <i>cmx</i> -Gen (1,9 kb <i>BsaAI</i> -Fragment) aus pEC70; <i>cmx</i> in gleicher Orientierung wie <i>xysA</i>	diese Arbeit
pHTxysB α	pSmart_cmis3p0009g02 mit in <i>PvuII</i> -Deletion kloniertem <i>cmx</i> -Gen (1,9 kb <i>BsaAI</i> -Fragment) aus pEC70; <i>cmx</i> in gleicher Orientierung wie <i>xysB</i>	diese Arbeit
pHTendX β	pSmart_cmis3p0004f07 mit in <i>PshAI</i> kloniertem <i>cmx</i> -Gen (1,9 kb <i>BsaAI</i> -Fragment) aus pEC70; <i>cmx</i> in entgegengesetzter Orientierung wie <i>endX</i>	diese Arbeit
pHTendXY α	pSmart_cmis3p0006g09 mit in <i>Eco47III</i> -Deletion kloniertem <i>cmx</i> -Gen (1,9 kb <i>BsaAI</i> -Fragment) aus pEC70; <i>cmx</i> in gleicher Orientierung wie <i>endX</i> , <i>endY</i>	diese Arbeit
pHTpgaA α	pSmart_cmis1p0512b05 mit in <i>HincII</i> -Deletion kloniertem <i>cmx</i> -Gen (1,9 kb <i>BsaAI</i> -Fragment) aus pEC70; <i>cmx</i> in gleicher Orientierung wie <i>pgaA</i>	diese Arbeit
pHTcelA α	pSmart_cmis3p0002g07 mit in <i>AgeI</i> -Deletion kloniertem <i>cmx</i> -Gen (1,9 kb <i>BsaAI</i> -Fragment) aus pEC70; <i>cmx</i> in gleicher Orientierung wie <i>celB</i>	diese Arbeit
pHTsecG α	pSmart_cmis3p0010b07 mit in <i>TfiI</i> kloniertem <i>cmx</i> -Gen (1,9 kb <i>BsaAI</i> -Fragment) aus pEC70; <i>cmx</i> in gleicher Orientierung wie <i>secG</i>	diese Arbeit
pHTsecY α	pSmart_cmis3p0005c06 mit in <i>PvuII</i> -Deletion kloniertem <i>cmx</i> -Gen (1,9 kb <i>BsaAI</i> -Fragment) aus pEC70; <i>cmx</i> in gleicher Orientierung wie <i>secY</i>	diese Arbeit
pHTtatB β	pSmart_cmis3p0015f08 mit in <i>MscI</i> kloniertem <i>cmx</i> -Gen (1,9 kb <i>BsaAI</i> -Fragment) aus pEC70; <i>cmx</i> in entgegengesetzter Orientierung wie <i>tatB</i>	diese Arbeit

3. Pflanzenmaterial

Tab. 4. In dieser Arbeit verwendete Pflanzensamen.

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

4. Enzyme und Enzymreaktionspuffer

Tab. 5. In dieser Arbeit verwendete Enzyme.

Enzym	Bezugsquelle
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs
T4 DNA-Ligase	New England BioLabs
Lysozym	Sigma
DNase	Sigma
Trypsin	Promega

Ligase-Puffer (Firma New England BioLabs)

1xT4-DNA-Ligase-Puffer	50 mM	Tris-HCl	
	10 mM	MgCl ₂	
	1 mM	Dithiothreitol	
	1 mM	ATP	
	25 mg/ml	BSA	→ pH 7,5

Tab. 6. in dieser Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen; / gibt die Schnittstelle an.

Enzym	Restriktionspuffer	Erkennungssequenz 5'-3'
<i>AgeI</i>	NEBuffer 1	A/CCGGT
<i>BamHI</i>	NEBuffer 3	G/GATCC
<i>BsaAI</i>	NEBuffer 4	PyAC/GTPu
<i>Eco47III</i>	NEBuffer 3	AGC/GCT
<i>EcoRI</i>	NEBuffer <i>EcoRI</i>	G/AATTC
<i>HincII</i>	NEBuffer 3	GTPy/PuAC
<i>MscI</i>	NEBuffer 4	TGG/CCA
<i>PshAI</i>	NEBuffer 4	GACNN/NNGTC
<i>PvuII</i>	NEBuffer 2	CAG/CTG
<i>StuI</i>	NEBuffer 2	AGG/CCT
<i>TfiI</i>	NEBuffer 4	G/AWTC

Enzymreaktionspuffer (10x konzentriert):

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

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

NEBuffer 3	50 mM	Tris-HCl	
	10 mM	MgCl ₂	
	100 mM	NaCl	
	1 mM	Dithiothreitol	→ pH 7,9
NEBuffer 4	20 mM	Tris-Acetat	
	10 mM	Mg-Acetat	
	50 mM	K-Acetat	
	10 mM	Dithiothreitol	→ pH 7,9
NEBuffer <i>EcoRI</i>	10 mM	Tris-HCl	
	10 mM	MgCl ₂	
	50 mM	NaCl	
	0,02%	Triton X-100	→ pH 7,5

5. Oligonukleotidprimer für PCR

Tab. 7. In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotid-Primer.

Amplifikat /Annealingtemperatur	Größe des Amplifikats [bp]	Primer	Nukleotidsequenz
celA / 55°C	502	PFC1	GTCTGAGCTCTGGTACACAT
		PRC3	TCGTCTCGAACTTCGTACCG
pat-1 / 55°C	851	P6	CGTCAGGAGGTCGCTAATA
		pat-1 fwd	GCTACTATGCAGTTCATGTC

6. Chemikalien und Kits

Tab. 8. In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Kits.

Bezugsquelle	Chemikalien / Material
Bioline	dNTPs (je 10 mM)
Biozym	Agarose Seakem LE
Eurogentec, Equibio	Elektroporations-Küvetten (2 mm Elektrodenabstand)
GE Healthcare	Immobiline Dry Strip gels 18 cm (pH 3-10, 4-7, 6-11), IPG buffer, DryStrip Cover fluid
GibcoBRL	Select Agar, Select Tryptone 140, Select Yeast Extract
Greiner Bio-One	PS-Mikrotiterplatten
Macherey und Nagel	Porablot NY amp, 0,2 µm
Merck	alle hier nicht aufgeführten Chemikalien
MoBiTec	Phenol (buffer saturated, pH 6,6-7,9, Amresco)
Peqlab	10x Reaktionspuffer S, PCR-Puffer, peqGOLD (Proteinmarker V)
Promega	Seq. Grade Modified Trypsin
Quiagen	Plasmid Mini kit (100)
Roche	DIG DNA Labeling and Detection Kit, NBT/BCIP Stock Solution
Roth	Ampicillin, Glasperlen, Glycerin, Glycin, Natriumchlorid, Tween80, X-Gal, Harnstoff, Brillant Blau G250, Rotiphorese ^R Gel 30 (37,5:1)
Serva	Bromphenolblau, N-Laurylsarkosyl, Silicon, DTT
Sigma	Chloramphenicol, EDTA, Mineralöl, Natriumhydroxid, Sorbitol, Tris, TritonX-100, α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (Zimtsäure)
Whatman	3MM Papier

7. Nährmedien

TBY-Medium	10 g	Trypton	
	5 g	Yeast Extract	
	5 g	NaCl → pH 7,5	
C-Medium	10 g	Trypton	
	5 g	Yeast Extract	
	5 g	NaCl	
	5 g	Glucose → pH 7,5	
SB-Medium	10 g	Trypton	
	5 g	Yeast Extract	
	5 g	NaCl	
		mit Millipore auf 600 ml auffüllen, pH 6,5	
	92 g	Sorbitol	
	5 ml	5 M CaCl ₂	
	20 ml	1 M MgCl ₂	
	mit Millipore auf 400 ml auffüllen		
getrennt autoklavieren, auf ca. 50 °C abkühlen lassen und zusammengeben.			
M9-Medium	6 g	Na ₂ HPO ₄	
	3 g	KH ₂ PO ₄	
	0,5 g	NaCl	
	1 g	NH ₄ Cl → pH 6,5 (mit den Salzen einstellen)	

zum Basismedium hinzufügen:

2 ml	1 M MgSO ₄
20 ml	20% Glukose
100 µl	1 M CaCl ₂
2,5 µl	200 mg/ml Nicotinsäure
2,5 µl	200 mg/ml Thiamin
200 µl	Spurenelemente (10x)

Medium zum Nachweis der Exoenzymproduktion

		<u>M9-Medium (Basismedium)</u>
	0,5 g	Yeast Extract
		in 450 ml H ₂ O lösen, pH 7,4, autoklavieren
getrennt autoklavieren	8 g	Agarose (in 500 ml H ₂ O)
beide Lösungen mischen, folgende Lösungen steril zugeben		
	2 ml	1 M MgSO ₄
	0,5 ml	20 % Glukose
	100 µl	1 M CaCl ₂
spez. Substrat:	1,5 g	lösliches Xylan (oat spelts)/1L M9-Medium

7.1 Zusätze zu Nährmedien

Festmedium:	15 g	Agar pro 1L Medium
10x Spurenelemente	2000 mg/l	FeCl ₃ x 6H ₂ O
	100 mg/l	CuCl ₂ x 2H ₂ O
	100 mg/l	MnCl ₂ x 4H ₂ O
	100 mg/l	Na ₂ B ₄ O ₇ x 10H ₂ O
	100 mg/l	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O
	400 mg/l	ZnCl ₂
	24 ml	Xylemsaft pro 1L M9-Medium
	10 ml	Tomatenblatthomogenat pro 1L M9-Medium
Zuckerpolymere	1 g	gelöstes Xylan („oat spelts“) pro 1L M9-Medium
	1 g	Polygalakturonat pro 1L M9-Medium
	1 g	Carboxymethylcellulose (CMC) pro 1L M9-Medium

7.2 Antibiotika

Tab. 9. In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Abkürzung	Lösungsmittel	Konzentration [µg/ml]	
			<i>E. coli</i>	<i>Cmm</i>
Ampicillin	Ap	H ₂ O	150	-
Chloramphenicol	Cm	70 % (v/v) EtOH	10	10

8. Puffer und Lösungen

8.1 Agarosegelelektrophorese

Agarose	0,8-1,5 % (w/v)	Agarose in TBE (1x), aufkochen
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml	in H ₂ O
Gel-Lade-Puffer (5x)	0,03% (w/v)	Bromphenolblau
	40 %	Glycerin
	50 mM	EDTA
		pH 8,0
TBE (10x)	108 g	Tris-Base
	9,3 g	EDTA
	55 g	Borsäure
		mit Millipore auf 1L auffüllen

8.2 DNA-Isolierung

8.2.1 Plasmid-Isolierung

P1	50 mM 10 mM 100 µg/ml	Tris-HCl EDTA RNaseA → pH 8,0
P2	200 mM 1 %	NaOH SDS
P3	3 M	K-Acetat → pH 5,5
TE (1x)	10 mM 1 mM	Tris-HCl, pH 8,0 EDTA

8.2.2 Gesamt-DNA-Isolierung

AKI	6,7 % (w/v) 50 mM 1 mM	Saccharose Tris-HCl, pH 8,0 EDTA
------------	------------------------------	--

8.3 Puffer und Lösungen für DNA-DNA-Hybridisierung

20 x SSC	3 M 300 mM	NaCl Na-Citrat	pH 7,0
Blot I (Depurinierung)	250 mM	HCl	
Blot II (Denaturierung)	1,5 M 0,5 m	NaCl NaOH	
Blot III (Neutralisierung)	1 M 0,02 M	NH ₄ -Acetat NaOH	
Blocking-Stammlösung	10 % (w/v)	Blocking-Reagenz in DIG I	
Prähybridisierungslösung	5x 2 % 0,02 % 0,1 %	SSC Blocking-Reagenz (Stammlösung) SDS N-Laurylsarkosyl	
Hybridisierungslösung		Prähybridisierungslösung mit DIG- markierter DNA-Sonde	
Wash I	2x 0,1 %	SSC SDS	
Wash II	0,1x 0,1 %	SSC SDS	

DIG I	0,1 M 0,15 M	Maleinsäure NaCl pH 7,5
DIG II	2 %	Blocking-Reagenz (Stammlösung) in DIG I
DIG III	100 mM 100 mM 50 mM	Tris-HCl, pH 9,5 NaCl MgCl ₂
DIG-Wash	0,3 % (v/v)	Tween80 in DIG I
DIG-Färbelösung	100 µl	NBT/BCIP Stock Solution in 20 ml DIG II

9. Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

RB-Stammlösung (10x)	121 g 75 g	Glycin Tris mit H ₂ O auf 1L auffüllen
RB-Gebrauchslösung	100 ml 10 ml	RB-Stammlösung 10 % SDS mit H ₂ O auf 1L auffüllen
Färbelösung	25 % 10 % 1 %	Isopropanol Essigsäure Coomassie Brilliant Blue G 250
Entfärber	25 % 10 %	Isopropanol Essigsäure
Probenpuffer	10 mM 1 M 6 % 12 % 0,2 %	Tris-HCl, pH 6,8 β-Mercaptoethanol SDS Glycerin Bromphenolblau

10. Puffer und Lösungen für die 2D-Gelelektrophorese

4x Trenngelpuffer	1,5 M 0,4 % (w/v)	Tris SDS pH 8,8
12,5 %-iges SDS-PAGE	12,5 ml 10 ml 17,4 ml 250 µl 100 µl	Acrylamid 4xTrenngelpuffer H ₂ O 10 % APS (w/v) TEMED
Rehydrierungspuffer	8 M 2 % (w/v) 0,01 % (w/v)	Harnstoff CHAPS Bromphenolblau

Äquilibriumspuffer (ÄP)	8 M 30 % (w/v) 50 mM	Harnstoff Glycerin Tris, pH 8,8
ÄP1	5 ml 2 % (w/v)	Äquilibriumspuffer DTT
ÄP2	5 ml 2,5 % (w/v)	Äquilibriumspuffer Iodacetamid
Sealing-Solution	50 ml 250 mg 0,01 % (w/v)	SDS-Laufpuffer (10x) Agarose Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer (10x)	1,92 M 1 % (w/v) 250 mM	Glycin SDS Tris, pH 8,8

Coomassie Brilliant Blau (CBB G-250)-Färbung

Fixierlösung	40 % (v/v) 10 % (v/v)	Methanol Essigsäure
Lösung A	2 % 10 %	<i>ortho</i> -Phosphorsäure (85 %) (NH ₄) ₂ SO ₄
Lösung B	5 %	CBB-G250
Färbelösung	98 % 2 % 80 % 20 %	Lösung A Lösung B ü/N schütteln und kurz vor dem Färben Färbelösung Methanol mischen und aufs Gel geben

11. Puffer und Lösungen für den tryptischen Verdau

Lösung A	50 % 50 %	CH ₃ CN H ₂ O
Lösung B	50 % 50 mM	CH ₃ CN NH ₄ HCO ₃
Lösung C	50 % 10 mM	CH ₃ CN NH ₄ HCO ₃
Lösung D	10 mM	NH ₄ HCO ₃

12. Lösungen für die massenspektrometrischen Analysen

HCCA-Konzentration	0,7 mg /ml	HCCA (α -Cyano-4-Hydroxycimtsäure)
HCCA-Matrixlösung	90 %	CH ₃ CN
	10 %	H ₂ O
	0,1 %	TriFluorAcetat

13. Lösung zur Konservierung von Zellen

TBY-Einfriermedium	TBY	pH 7,5
	50 % Glycerin	

14. Geräte

Tab. 10. Verwendete Geräte.

Gerät/Funktion	Bezeichnung	Firma
2D-Gelelektrophoresesystem (isoelektrische Fokussierung)	Ettan IPGphor 3 IEF System	GE Healthcare
Elektroporationsgerät	Gene Pulser	Bio-Rad
Gefriertrocknungsanlage	Alpha2-4	Martin Christ GmbH
Hybridisierungsöfen	OV2	Biometra
Kühlzentrifuge	Sorvall RC5B Plus	Sorvall
Kühlzentrifuge	Sigma 3-18K	Sigma
MALDI-TOF Massenspektrometer	Ultraflex	Bruker Daltonic
NanoDrop	ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop Technologies
PCR-Gerät	RoboCycler Gradient 96	Stratagene
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 D	Eppendorf
UV-VIS-Spektrometer	UV-1220	Shimadzu
Zellaufschluss	French Pressure Cell Press	AMINCO

D. Methoden

1. Kultivierung von Bakterien und Pflanzen

1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgt auf festem oder in flüssigem TBY-Medium, ggf. unter Zusatz von Antibiotika. Die Kulturausstriche auf Festmedien werden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Flüssigkulturen werden durch Beimpfen von 5 ml TBY-Medium mit einer Einzelkolonie und anschließender Inkubation über Nacht bei 37°C im Roller angezogen. Größere Volumina werden in Erlenmeyer-Kolben bei 37°C und 200 U/min im Luftschüttler inkubiert.

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

Cmm wird in flüssigem oder festem TBY- oder C-Medium, ggf. unter Zusatz von Antibiotika, bei 25-28°C im Brutschrank oder Schüttler (150 U/min) über 2-5 Tage angezogen. Die Inkubation der elektroporierten *Cmm*-Zellen erfolgt auf dem SB-Medium.

1.3 Kultivierung von Pflanzen

Die Pflanzensamen werden zunächst in autoklavierte Erde in Pflanzenschalen ausgesät und im Pflanzenschrank inkubiert. Etwa zwei Wochen nach der Aussaat erreichen die Pflanzen das Zwei-Blattstadium und die für die Petiolus-Infektion optimale Größe. Die infizierten Pflanzen werden anschließend im Pflanzenraum inkubiert. Die Anzuchttemperatur beträgt 25°C am Tag und 19°C in der Nacht (16 h Tag bei 12 0000 Lux, 8 h Nacht im Dunkeln). Die relative Luftfeuchtigkeit liegt bei 60-80 %.

2. Konservierung von Bakterien (Glycerinkultur)

- Bakterien von einer frischen Agar-Platte in ein Eppendorfgefäß überführen
- 1 ml TBY-Einfriermedium zugeben, Zellen resuspendieren
- ggf. Antibiotikum zugeben
- Lagerung bei -20°C oder -80°C

3. DNA-Isolierung

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

HB-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA (Klonanalyse) (nach Birnboim & Doly, 1979)

- 1,5 ml Übernachtskultur in Eppendorfgefäß bei 13.000 rpm 5 min pelletieren
- Pellet in 0,3 ml P1 durch Vortexen resuspendieren
- 0,3 ml P2 zugeben, invertieren
- 0,5 min bei RT inkubieren
- 0,3 ml P3 zugeben, invertieren
- 10 min 0 °C
- 15 min 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen
- 600 µl Isopropanol zugeben, invertieren

- 30 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet waschen mit 200 µl 70 % (v/v) Ethanol
- 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet trocknen
- DNA in 20 µl 1x TE resuspendieren

3.2 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit

(zur Isolierung kleiner hochreiner Plasmid-DNA)

- 3 x 1,5 ml Übernachtkultur im Eppendorfgefäß bei 13.000 rpm 5 min pelletieren, Überstand verwerfen
- Pellet in 1 ml TE waschen
- Pellet in 250 µl P1 mit 25 µl RNase (10mg/ml) resuspendieren
- 250 µl P2 hinzufügen, sofort mischen
- 5 min bei RT inkubieren
- 250 µl P3 zugeben, sofort mehrmals invertieren
- 10 min bei 0°C inkubieren
- 15 min bei 13.000 rpm in der Eppendorfschleuder zentrifugieren
- Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- Qiagen-20 Säule mit 1 ml QBT-Puffer äquilibrieren, QBT durchlaufen lassen
- DNA-Lösung auftragen
- 4x mit 1 ml QC-Puffer waschen
- mit 0,8 ml QF-Puffer die Plasmid-DNA eluieren
- 700 µl Isopropanol zugeben
- 30 min bei 13.000 rpm in der Eppendorfschleuder zentrifugieren
- Pellet mit 200 µl 70 % Ethanol waschen
- Pellet trocknen
- Pellet in 20 µl TE resuspendieren

3.3 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem „Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System“ (Promega)

- Bakterien von der Agar-Platte in ein Eppendorfgefäß überführen
- Zellen in 250 µl Cell Resuspension Solution resuspendieren
- add. 250 µl Cell Lysis Solution, 4-6x invertieren, 3 min inkubieren
- add. 10 µl Alkaline Protease Solution, 4-6x invertieren, 5 min inkubieren
- add. 350 µl Neutralization Solution, 4-6x invertieren
- 10 min bei 13.200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Spin Column in Sammelgefäß einsetzen
- Überstand auf die Säule geben
- 1 min bei 13.200 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- Säule mit 750 µl Column Wash Solution waschen
- 1 min bei 13.200 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- Säule mit 250 µl Column Wash Solution waschen
- 2 min bei 13.200 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- Säule in ein Eppendorfgefäß einsetzen

- 100 µl Nuklease-freies Wasser auf die Membran der Säule geben
- 1 min bei RT inkubieren
- 1 min bei 13.200 rpm zentrifugieren
- zweiter Elutionsschritt kann ausgeschlossen werden
- Lagerung der DNA bei 4°C oder -20°C

3.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen mit dem NucleoSpin® Extract II (Macherey und Nagel)

- DNA-Bande aus dem Agarosegel ausschneiden und wiegen
- add. 200 µl NT-Puffer/100 mg Gel
- 10 min bei 50°C inkubieren (alle 3 min vortexen)
- Säule auf 2 ml Sammelgefäß setzen, Ansatz auf die Säule pipettieren
- 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf), Durchlauf verwerfen
- add. 700 µl NT3-Puffer
- 1 min bei 11.000 x g zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- 2 min bei 11.000 x g zentrifugieren
- Säule auf Eppendorfggefäß setzen
- 15-50 µl NE-Puffer oder Millipore in die Säule pipettieren
- 1 min bei RT inkubieren
- 1 min bei 11.0000 x g zentrifugieren
- Lagerung der DNA bei -20°C

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

- 10 ml Bakterienflüssigkultur (2 Tage-Kultur) 10 min bei 6.000 rpm und 4°C abzentrifugieren
- Pellet in 500 µl AKI mit 10 mg/ml Lysozym aufnehmen und in ein Eppendorfggefäß überführen
- 1h bei 37°C inkubieren
- 250 µl 2% SDS zugeben, 1 min auf dem Vortex mischen
- 250 µl neutrales Phenol/Chloroform zugeben, auf dem Vortex mischen, bis Lösung milchig weiß ist
- 15 min bei 13.000 rpm und RT in der Eppendorfzentrifuge abzentrifugieren
- wässrigen Überstand in ein neues Eppendorfggefäß überführen
- 1/10 Vol. von 3M Na-Acetat pH 7,5 zugeben, mischen
- 1 Vol. Isopropanol zugeben, nicht mischen
- DNA auf Pasteurpipette wickeln
- aufgewickelte DNA 1 min in 70% Ethanol waschen
- aufgewickelte DNA in 100% Ethanol waschen
- aufgewickelte DNA in 70% Ethanol waschen
- DNA trocknen lassen
- DNA in 50-200 µl TE resuspendieren

4. Reinigung, Konzentrierung und Denaturierung von DNA

4.1 Alkoholfällung

(zur Konzentrierung und Reinigung von DNA und zur Entfernung kurzer DNA-Fragmente)

- 1 Vol. DNA-Lösung mit 1/10 Vol. 3M Na-Acetat pH 7,5 versetzen und mischen
- 2 Vol. 100 % Ethanol (bei kleinen DNA Volumina) oder 1 Vol. Isopropanol (bei großen DNA Volumina) zugeben, invertieren
- (20-30 min bei -20°C inkubieren)
- 20 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet 2x mit 300 µl 70% (v/v) Ethanol waschen
- 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand entfernen
- Pellet trocknen
- Pellet in TE resuspendieren

4.2 Alkalische Denaturierung von Plasmid-DNA

- 18 µl DNA-Lösung
- 2 ml 2M NaOH, 2 mM EDTA zugeben
- 5 min bei RT inkubieren
- 2 µl 2M HN₄-Acetat, pH 4,6 zugeben, mischen
- 75 µl 100% Ethanol zugeben, mischen
- 10 min bei -70°C inkubieren
- 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit 200 µl 70% (v/v) Ethanol waschen
- 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Pellet trocknen
- Pellet in H₂O resuspendieren
- auf Eis stellen und schnell verwenden

4.3 Phenolextraktion

- 1 Vol. DNA-Lösung
- 1 Vol. neutrales Phenol zugeben, mischen
- 15 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- obere Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol zugeben, mischen
- 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Oberphase in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- Konzentrierung der DNA durch Alkoholfällung

4.4 Sephadex-Behandlung (zur Aufreinigung von Plasmid-DNA zur Elektroporation)

- Sephadex G50-Pulver in Millipore quellen lassen und autoklavieren
- silikonisiertes Glaskügelchen (Durchmesser ca. 2,5 mm) in blaue Pipettenspitze geben (Silikonisierung: Glaskügelchen in Silikonisierungslösung für 1h bei 100°C backen)
- Pipettenspitzen mit Glaskügelchen in Weichagarröhrchen stellen

- 800 µl der Sephadex-Lösung in die Pipettenspitze geben
- 15 min bei 13.000 rpm (Megafuge) zentrifugieren
- Spitze in ein neues Weichgarröhrchen überführen
- DNA auf die Sephadex-Säule auftragen
- 15 min bei 3.000 rpm zentrifugieren
- gereinigtes DNA-Eluat zur Elektroporation einsetzen oder bei -20°C lagern

5. Techniken zur Charakterisierung von DNA-Molekülen

5.1 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltungen der Plasmid- und Gesamt-DNA werden entsprechend der Empfehlung des Herstellers der Restriktionsenzyme durchgeführt. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgt durch Inkubation bei 70°C für 10 min. Hitzeresistente Enzyme werden durch Phenolisierung inaktiviert.

5.2 Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wird zur Auftrennung und Charakterisierung geladener Teilchen in einem Substanzgemisch eingesetzt. Die negativ geladenen Phosphatreste der DNA erlauben den DNA-Molekülen im elektrischen Feld zu wandern. Bei der Auftrennung ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA von der Größe und der Konformation (ss, ds, linear, oc, ccc) der Moleküle abhängig. Die eingesetzten Agarosekonzentrationen richten sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Moleküle. Je größer die Agarosekonzentration, desto kürzer ist die Wanderungstrecke der DNA-Moleküle unter gleich bleibenden Bedingungen.

In dieser Arbeit wurde 0,8% Agarose verwendet. Für die Auftrennung der *celA/pat-1*-PCR-Produkte wurde 1,5% Agarose eingesetzt.

- Agarose in TBE-Puffer unter Rühren aufkochen
- auf ca. 60°C abkühlen lassen, in den Gelträger gießen und Kamm einsetzen
- Gel fest werden lassen (ca. 20 min), in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer einsetzen und den Kamm entfernen
- DNA-Proben mit ca. 1/5 Vol. Gel-Lade-Puffer (5x) versetzen
- Geltaschen mit Proben beladen
- Auftrennung bei einer Spannung von 90-120V
- anschließend die Färbung des Gels in einer Ethidiumbromidlösung
- Gel ggf. in TBE-Puffer entfärben
- Gel wässern und unter UV-Licht ($\lambda=302$ nm) fotografieren

5.3 Bestimmung des Molekulargewichts von DNA

Die Mobilität der DNA-Moleküle bei der Gelelektrophorese ist bis zu einer gewissen Grenze umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes. Der Vergleich der Mobilität des untersuchten DNA-Fragmentes mit der eines DNA-Standards erlaubt eine Aussage über das Molekulargewicht, wenn dieselbe Konformation vorliegt.

In dieser Arbeit wurde neben dem λ -Marker aus *PstI*- bzw. *EcoRI/HindIII*-Restriktionsfragmenten ein weiterer 100 bp DNA Ladder (NEB) verwendet. Bei den Hybridisierungsgelen wurde ein λ -Marker aus Digoxigenin-markierten *EcoRI/HindIII*-Restriktionsfragmenten verwendet.

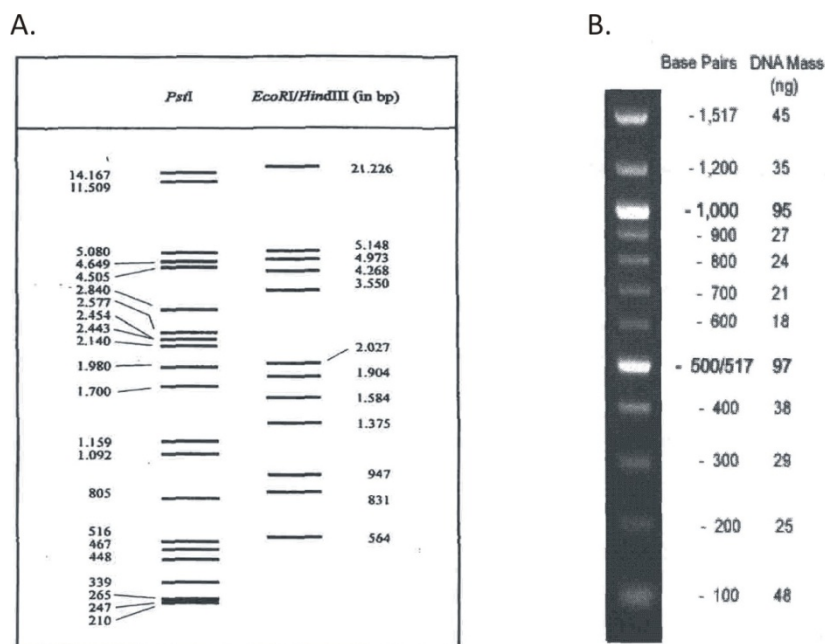


Abb. 1. In dieser Arbeit verwendete Längenmarker. (A) Restriktionsfragmente des *Pst*I bzw. *Eco*RI/*Hind*III-hydrolysierten Phagen Lambda als DNA-Längenmarker. (B) 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs).

6. Klonierung von DNA-Fragmenten und Transformation

6.1 Dephosphorylierung von Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase

- 98 µl hydrolysierte Vektor-DNA (Restriktionsspaltung)
- 12 µl 10x Phosphatase-Puffer zugeben, mischen
- 3 µl alkalische Phosphatase zugeben
- 7 µl bidest. H₂O zugeben, mischen
- 30 min bei 37°C inkubieren
- 6 µl 100 mM EGTA pH 7,0 zugeben, mischen
- 10 min 70°C inkubieren
- anschließend Phenolextraktion und Alkohol-fällung
- DNA in 100 µl bidest. H₂O aufnehmen

6.2 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA

Vektor-DNA und Insert-DNA werden nach Restriktion mit geeigneten Restriktionsendonukleasen und anschließender Inaktivierung in einem Verhältnis von ca. 1:3 bis 1:5 gemischt und durch Einsatz einer Ligase ligiert.

20 µl Ligationsansatz:

- ca. 10-15 µl Vektor-Insert-Gemisch
- 2 µl 10x Ligase-Puffer
- 1 µl T4-DNA-Ligase
- mit Millipore auf 20 µl auffüllen
- 2-3h bei RT oder über Nacht bei 4°C oder 16°C ligieren
- 10 min bei 70°C inaktivieren

6.3 Shotgun-Klonierung

Die Shotgun-Klonierung ist die Ligation von Vektor-DNA mit einem Gemisch von hydrolysierten DNA-Fragmenten, die direkt nach der Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen für die Klonierung verwendet werden. Die Klonierung des Inserts in die Vektor-DNA erfolgt zufällig.

7. DNA-Transfer

7.1 Transformation von *Escherichia coli*

7.1.1 Herstellung kompetenter Zellen (CaCl₂-Methode)

- 20 ml TBY mit 0,2 ml Übernachtskultur animpfen
- Bakterien bei 37°C zu einem Titer von 2×10^8 Zellen (log-Phase) inkubieren
- 5 min bei 6.500 rpm (Sorvall RC5B Plus; Rotor SS-34) und 4°C zentrifugieren
- Pellet in 10 ml 100 mM CaCl₂ (kalt) resuspendieren
- 30 min 0°C
- 5 min bei 6.500 rpm und 4°C zentrifugieren
- Pellet in 2 ml 100 mM CaCl₂ und 20% Glycerin resuspendieren
- Zellen aliquotieren (200 µl) und bei -80°C lagern

7.1.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

- kompetente Zellen auf Eis auftauen
- mit Ligationsansatz bzw. Plasmid-DNA mischen
- 20 min auf Eis inkubieren
- 3 min Hitzeschock bei 42°C
- 5 min auf Eis inkubieren
- 1 ml TBY zugeben, invertieren
- bei Ampicillin-Resistenz 30 min, bei anderen Antibiotika 90 min bei 37°C inkubieren
- 100 µl auf antibiotikahaltigem Selektionsmedium ausplattieren
- Rest 2 min bei 13.000 rpm abzentrifugieren, Überstand verwerfen
- Zellen im Rücklauf resuspendieren und auf Selektionsmedium ausplattieren
- über Nacht bei 37°C inkubieren

7.2 Elektroporation von *Cmm* (Kirchner *et al.*, 2001)

7.2.1 Herstellung kompetenter *Cmm*-Zellen

- 250 ml TBY-Medium mit *Cmm* animpfen
- über Nacht bei 25°C bis o.D.₅₈₀ von 1-1,2 im Luftschüttler anziehen
- mit TBY auf o.D.₅₈₀ von 0,3 verdünnen
- 218,5 ml in neuen Kolben überführen und bei 25°C bis o.D.₅₈₀ von 0,6 inkubieren (2-2,5h)
- 31,5 ml 20% (w/v) Glycin zugeben (Endkonzentration: 2,5% Glycin)
- 2h bei 25°C im Schüttler inkubieren
- alle weiteren Schritte auf Eis durchführen, alle Lösungen auf 0°C vorkühlen
- Zellsuspension in 500 ml-Zentrifugenbecher überführen

- 10 min 6.500 rpm zentrifugieren (Sorvall RC5B Plus; Rotor SLA3000), Überstand und Rücklauf entfernen
- Pellet in 5 ml Millipore resuspendieren
- Suspension in 40 ml-Zentrifugenbecher überführen
- 25 ml Millipore zugeben, durch Vortexen mischen
- 10 min bei 7.500 rpm und 4°C zentrifugieren (Sorvall RC5B Plus; Rotor SS-34)
- Pellet in 2 ml eiskaltem Millipore resuspendieren
- 25 ml eiskaltes Millipore zugeben, mischen
- 10 min bei 7.500 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand restlos abziehen
- Waschschrift wiederholen
- Pellet in 2 ml eiskaltem 10% Glycerin resuspendieren
- 25 ml eiskaltes 10% Glycerin zugeben, mischen
- 10 min bei 7.500 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand restlos abziehen
- Waschschrift wiederholen
- Pellet in 0,5 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 einfrieren

7.2.2 Elektroporation kompetenter *Cmm*-Zellen (Kirchner, 2003, modifiziert)

- Einstellung des Gene Pulser (Firma BioRad)
 - Kapazität 25 µF
 - Parallelwiderstand 400 Ω
 - Spannung 12,5 kV/cm (2,5 kV bei 2 mm Küvetten)
- kompetente Zellen auf Eis auftauen lassen
- Elektroporationsküvette (d=2 mm) auf Eis vorkühlen
- 400 µl SB-Medium in ein Eppendorfgefäß geben
- zu transformierende DNA (18 µl) mit 100 µl kompetenten Zellen mischen und in die Elektroporationsküvette überführen
- Puls auslösen
- sofort 150 µl der 400 µl SB-Medium zu den Zellen geben, mischen
- den Inhalt der Küvette in das Eppendorfgefäß mit dem restlichen SB-Medium geben
- 3 h bei 25°C inkubieren
- gleichmäßig auf drei SB-Mediumplatten ausplattieren
- 4-5 Tage bei 25°C inkubieren

8. DNA-DNA-Hybridisierung

8.1 Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden über Random-Priming (Roche Diagnostics, Mannheim)

- 15 µl DNA-Lösung
- 10 min bei 98°C denaturieren
- sofort auf Eis stellen

- 2 µl Hexanukleotid-Mix, 2 µl dNTP *Labeling Mixture*, 1 µl Klenow-Polymerase zugeben, mischen
- über Nacht (oder 1-24 h) bei 37°C inkubieren
- 2 µl 0,2 mM EDTA (pH 8,0) zugeben
- 10 min bei 70°C inaktivieren
- 2 µl 3 M Na-Acetat (pH 7,5) und 75 ml 100% Ethanol zugeben
- 10 min bei -20°C inkubieren
- 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Pellet trocknen
- Pellet in 50 µl TE resuspendieren
- Hybridisierungslösung: Sonde mit 5 ml Prähybridisierungslösung vermischen, Lagerung bei -20°C
- Sonde vor jeder Hybridisierung durch 10-minütiges Aufkochen bei 98°C denaturieren, sofort auf Eis stellen und zur Hybridisierung verwenden

8.2 Überprüfung der Markierungsreaktion (Dot-Blot)

- 1 µl der Sonden-DNA auf Nylonmembran (Porablot NY) auftropfen
- bei RT trocknen lassen
- 3-5 min im UV-Licht ($\lambda=302$ nm) quervernetzen
- 1 min in DIG Puffer 1 waschen
- 30 min in DIG-Puffer 2 inkubieren (Schüttler)
- 1 min DIG-Puffer 1 waschen
- 30 min DIG-Puffer 2 mit Antikörperkonjugat (1:10.000) inkubieren (Schüttler)
- zweimal 15 min mit DIG-Wash waschen
- 2 min in DIG-Puffer 3 äquilibrieren
- Nylonmembran in 5 ml DIG-Puffer 3 mit 50 µl NBT/BCIP im Dunkeln färben
- Färbelösung abgießen und die Färbereaktion durch Millipore stoppen
- Membran trocknen und vor Licht geschützt aufbewahren

8.3 Southern-Blot (Kapillarblot) (Smith & Summers, 1980)

- Agarosegel 2 x 5 min in Blot I inkubieren (Depurinierung), Lösung abgießen
- zweimal 15 min in Blot II inkubieren (Denaturierung), Lösung abgießen
- zweimal 15 min in Blot III inkubieren (Neutralisierung), 5 Lagen Whatmanpapier mit Blot III anfeuchten, Lösung abgießen
- Frischhaltefolie faltenfrei mit Klebeband auf der Tischoberfläche befestigen
- Agarosegel blasenfrei mit der Oberseite nach unten auf die Folie legen
- Nylonmembran blasenfrei auf das Gel legen
- das angefeuchtete Whatmanpapier auf die Membran legen
- ca. 5-10 cm hohen Stapel Einmal-Papierhandtücher auf das Whatmanpapier legen
- Stapel mit einer Platte und einem Gewicht bedecken
- Transfer der DNA auf die Membran bei RT über Nacht
- Membran durch Inkubation bei 80°C für 1h oder durch 3 min UV-Licht ($\lambda=302$ nm) quervernetzen
- Membran zur Hybridisierung einsetzen

8.4 Prähybridisierung und Hybridisierung

- Hybridisierungszylinder mit Millipore füllen, Nylonmembran mit der DNA-Seite nach innen aufrollen und in Hybridisierungszylinder überführen, Millipore abgießen
- Zylinder mit präinkubierter Prähybridisierungslösung (68°C) befüllen, mindestens 1h bei 68°C in einer Rollvorrichtung inkubieren
- Hybridisierungslösung (Sonde) bei 98°C 10 min denaturieren und sofort gegen Prähybridisierungslösung austauschen
- über Nacht bei 68°C in einer Rollvorrichtung inkubieren

8.5 Immunologischer Nachweis

- Hybridisierungslösung abgießen und bei -20°C lagern (mehrmals wieder verwendbar)
- Membran im Hybridisierungszylinder zweimal 5 min bei RT mit 100 ml Wash I waschen (Rollvorrichtung), die Lösung abgießen
- Membran im Hybridisierungszylinder zweimal 15 min bei 68°C mit 100 ml Wash II waschen (Rollvorrichtung), Lösung abgießen
- Membran mit einer Pinzette in eine Kunststoffschale überführen, die DNA-Seite nach unten
- Membran mit 50 ml DIG Puffer 1 bedecken und 1 min bei RT inkubieren, Lösung abgießen
- Membran mit 100 ml DIG Puffer 2 (mehrfach wieder verwendbar, Lagerung bei 4°C) bedecken und 30 min bei RT auf einem Schüttler inkubieren
- 1 min in 50 ml DIG-Puffer 1 inkubieren, Lösung abgießen
- Membran mit 20 ml DIG-Puffer 2 mit Antikörperkonjugat (1:10.000), mehrmals wieder verwendbar, Lagerung bei 4°C, gelegentlich neuen Antikörper zugeben) bedecken und 30 min bei RT auf einem Schüttler inkubieren
- Membran mit 100 ml DIG-Wash bedecken und zweimal 15 min auf einem Schüttler bei RT inkubieren
- Membran 2 min in 50 ml DIG-Puffer 3 bei RT äquilibrieren
- Membran in 20 ml DIG-Puffer 3 mit 100 µl NBT/BCIP im Dunkeln färben, bis die Membran ausreichend gefärbt ist
- Färbelösung gegen Millipore (stoppt die Färbereaktion) austauschen
- Membran zwischen Whatmanpapier trocknen und im Dunkeln aufbewahren

9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

9.1 PCR mit Gesamt-DNA als Template

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine etablierte Methode, die unter geeigneten Pufferbedingungen und Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase und spezifischen Oligonukleotid-Primern zur Amplifizierung beliebiger Nukleinsäureabschnitte eingesetzt wird. Als Template wird ungespaltene, verdünnte Gesamt-DNA oder hydrolysierte Plasmid-DNA eingesetzt.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für einen PCR stripe á 8 Tubes:

225 µl Ansatz

22,5 µl	10 x Reaktionspuffer S (Peglab)
4,5 µl	dNTPs (je 10 mM) (Bioline)
4,5 µl	Primer 1 (50 µM)
4,5 µl	Primer 2 (50 µM)
6,75 µl	Taq-Polymerase

9 µl	Gesamt-DNA (1/50 verdünnt)
14,4 µl	DMSO
158,85 µl	H ₂ O (Millipore)
<hr/>	
225,0 µl	Gesamtvolumen

- den Reaktionsansatz auf 8 PCR-Tubes verteilen
- jeden Ansatz mit 25 µl PCR-Öl überschichten, um ein Verdampfen zu verhindern
- Reaktionsansätze in den RoboCycler Gradient 96 (Firma Stratagene) stellen
- die Amplifikation erfolgt nach folgendem Programm

Zyklen	Dauer [min]	Temperatur [°C]
1	4	94
	1	94
35	1	Annealingtemperatur
	1	72
1	10	72

- Lagerung der PCR-Produkte bei 4°C oder -20°C
- Charakterisierung der PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese

9.2 PCR mit ganzen Zellen als Template

- Zellen von der Platte mit gelber Spitze in Eppendorfgefäß überführen
- in 500 µl H₂O (Millipore) lösen
- 5 min bei 13.200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand verwerfen
- Zellen im Rücklauf resuspendieren
- 1 µl für PCR (je 25 µl Ansatz) verwenden

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

10. Isolierung von Xylemsaft (zur Supplementierung des M9-Mediums)

Für die Isolierung von Xylemsaft wurden 6 Wochen alte Pflanzen verwendet.

- Aussaat der Tomatenpflanzen in steriler Erde (Pikiererde)
- Vereinzelung der ca. 2 Wochen alten Keimlinge (Zwei-Blatt-Stadium) durch Umpflanzen in Plastiktöpfe 8 cm x 8 cm mit steriler Topferde
- Anzucht der Pflanzen für weitere 4 Wochen im Pflanzenraum (25°C, 40-50% Luftfeuchtigkeit)
- Pflanzen etwa 1 cm über dem Boden abtrennen
- Xylemsaft innerhalb der folgenden 1-2h von der Schnittfläche pipettieren
- den entnommenen Xylemsaft zunächst auf Eis lagern, 1x sterilfiltrieren (0,45 µm Porengröße)
- den sterilen Xylemsaft bei -20°C lagern

11. Herstellung von Tomatenblatthomogenat (zur Supplementierung des M9-Mediums)

Zur Herstellung von Tomatenblatthomogenat wurden 6 Wochen alte Tomaten verwendet, die 2 Wochen nach Aussaat vereinzelt und im Pflanzenraum angezogen wurden.

- Fiederblätter vom Spross trennen und Gewicht bestimmen
- Fiederblätter mit Mörser und Pistill bearbeiten
- flüssigen Anteil des Homogenats 10 min bei 10.000rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand 1x über einen Faltenfilter filtrieren
- Filtrat 1x sterilfiltrieren (0,45 µm Porengröße)
- Lagerung des Tomatenblatthomogenats bei -20°C

12. Nachweis der Xylanaseaktivität

12.1 Agarplattentest für Xylanase

Der Agarplattentest erlaubt den Nachweis der Enzymproduktion. Die Bakterien werden auf Minimalmedium (M9) mit dem zu testenden Polysaccharid als C-Quelle angezogen, wobei der Abbau der entsprechenden Polysaccharide mit Hilfe der Farbstoffe z.B. Kongorot sichtbar gemacht wird. Dieser Farbstoff färbt das nicht degradierte Substrat an, so dass Exoenzym-produzierende Kolonien von klaren Höfen umgeben sind.

- Bakterien strichförmig auf M9-Medium Agarplatten austreichen
- Inkubation 3-5 Tage 25°C
- Überschichten der Platten mit 5ml 0,5% (w/v) Kongorot, 5% (v/v) EtOH in H₂O
- 30 min RT
- waschen mit H₂O
- entfärben mit 5ml 1M NaCl, bis die Substratdegradation an klaren Zonen um Produzenten-Kolonien erkennbar ist

12.2 Nachweis der Xylanaseaktivität im Zymogram

- Anzucht von *Cmm* NCPPB382, *CMMxysA*, *CMMxysB* im mit 0,15% Xylan (oat spelts) supplementiertem M9-Medium, bis die Kultur stationär ist
- Kultur 15 min bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Pellet verwerfen
- Überstandes 30 min bei 10.000rpm und 4°C zentrifugieren
- Pellet verwerfen
- Protein aus dem Überstand mit 80% NH₄SO₄ fällen
- Protein in 50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ resuspendieren
- Proteinkonzentration bestimmen (NanoDrop)
- Protein auf 1D-SDS-PAGE, nach Einpolymerisierung von Xylan (0,15%) auftragen und nach MW auftrennen
- SDS-PAGE 1 x mit H₂O waschen
- SDS-PAGE 1 x mit 1% Triton X-100 für 30 min waschen
- SDS-PAGE 2 x mit 0,1% Triton X-100 waschen
- SDS-PAGE 1 x mit 50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ waschen
- SDS-PAGE über Nacht in 50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ bei 26°C inkubieren
- SDS-PAGE mit 0,5% (w/v) Kongorot und 5% (v/v) EtOH in H₂O färben

- entfärben mit 1M NaCl bis die Substratdegradation über das Auftreten eines klaren Hofes erkennbar wird

13. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli,1970)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Als Apparatur wird die Minigel-Elektrophoreseeinheit benutzt.

	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	-	0,31 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, mit Agarose abdichten
- sofort nach APS und TEMED-Zugabe das Trenngel gießen, bis etwa 1 cm unter Kamm
- vorsichtig mit Wasser überschichten
- polymerisieren lassen (bis Kanten des Gels abgerundet sind)
- Wasser gut abgießen
- Sammelgel gießen, Kamm einsetzen
- polymerisieren lassen (das Gel kann mehrere Tage in feuchtem Milieu bei 4°C aufbewahrt werden)
- Kamm entfernen, Gummidichtung bzw. unteren Spacer entfernen
- Gel in Kammer setzen
- Kammer mit RB-Puffer füllen, darauf achten, dass Spacerraum luftblasenfrei gefüllt ist
- Proben (1:1 mit Probenpuffer gemischt) auf das auspolymerisierte Gel auftragen
- Elektrophorese: 15 min 10 mA, anschließend 20 mA
- Färben: mindestens 20 min in Färbelösung
- Färbelösung abgießen, Gel mit H₂O abspülen und entfärben bis Hintergrund nahezu farblos ist

13.1 Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen

Bei der Elektrophorese im Polyacrylamidgel wandern die negativ geladenen Polypeptide und Proteine zur Anode und werden nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Mit Hilfe von Standards lassen sich die Molekulargewichte der Proteine bestimmen.

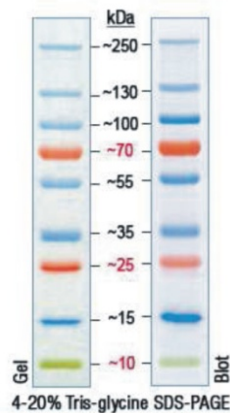


Abb. 2. In dieser Arbeit verwendeter Proteinmarker V (peqGOLD).

14. Proteomanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese

In der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2DE) werden Proteine nach dem isoelektrischen Punkt und dem Molekulargewicht aufgetrennt, wobei die Kombination beider Techniken die Auftrennung und Darstellung komplexer Proteingemische erlaubt.

Während der isoelektrischen Fokussierung (IEF) wandern die Proteine im elektrischen Feld zu ihrem isoelektrischen Punkt, der Stelle im pH-Gradienten, an der ihre Netto-Ladung gleich Null ist. Der pH-Gradient wird aus einer Mischung zwitterionischer Verbindungen, die ebenfalls im elektrischen Feld zu ihrem isoelektrischen Punkt wandern, gebildet. Inzwischen können immobilisierte, im Gel kovalent fixierte pH-Gradienten mit unterschiedlichsten pH-Bereichen käuflich erworben werden (GE Healthcare). Die immobilisierten pH-Gradienten bieten den Vorteil, dass die Zwitterionen nicht mehr wandern und der Gradient stabil bleibt.

Vor der IEF werden die Proteine im denaturierenden Puffer mit dem für den jeweiligen pH-Gradienten entsprechenden IPG Puffer (GE Healthcare) aufgenommen. Bei der Wahl des Probenpuffers ist zu beachten, dass die Eigenladung der Proteine erhalten wird. Anschließend wird der IEF-Streifen zusammen mit der Probe bei geringer Spannung aufgequollen (rehydratisiert) und über Nacht fokussiert. Nach der IEF müssen die im IEF-Gel fokussierten Proteine äquilibriert werden. Das Ziel der Äquilibrierung ist die Sättigung der fokussierten Proteine mit SDS, Auflösung der Disulfidbrücken und die Blockierung der freien SH-Gruppen durch Zugabe von DTT bzw. Iodacetamid zum Puffer. Die mit SDS äquilibrierten Gelstreifen werden auf ein SDS-Gel aufgelegt und die fokussierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

14.1 Phenolextraktion sekretierter Proteine aus dem Kulturüberstand von *Cmm*

- 1000 ml M9/TBY mit einer Start-o.D.₅₈₀ von 0,05 *Cmm* animpfen
- ü/N bei 25°C im Luftschüttler anziehen
- Zellsuspension 15 min bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Pellet verwerfen
- Kulturüberstand 30 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Pellet verwerfen
- zellfreien Kulturüberstand bei -80°C einfrieren und komplett lyophilisieren

- den trockenen Überstand in Extraktionspuffer aufnehmen (60 ml bei 1L M9/M9+Zusätze bzw. 120 ml bei TBY/TBY+Glukose)
- 30 min bei RT inkubieren
- Überstand in 40 ml Zentrifugenröhrchen überführen (max. 15 ml pro Röhrchen)
- add. β -Mercaptoethanol (20 μ l/ml Puffer), vortexen und 10 min auf Eis inkubieren
- add. 1 Vol. Phenol (saturated, pH6,6/7,9 von Amresco), vortexen und 30 min bei RT schütteln
- 30 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Phenolphase (oben) in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen
- (bei zu großer Interphase erneut Phenol zugeben und den Zentrifugationsschritt wiederholen)
- Phenolphase mit gleichem Vol. Extraktionspuffer versetzen und vortexen
- 30 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- den Waschschrift mit dem Extraktionspuffer so oft wiederholen, bis keine oder nur kleine Interphase zu sehen ist
- Phenolphase abnehmen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen
- add. 4 Vol. an 0,1M NH_4 Acetat-Lösung in Methanol
- Proteinfällung bei -20°C für mind. 4h oder ü/N
- 45 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen und das Pellet 5 x waschen:
- 3 x mit 0,1M NH_4 Acetat in Methanol
- 2 x mit 80% Aceton
- Überstand vollständig abnehmen und das Pellet unter dem Abzug trocknen
- Proteinpellet in 200 μ l Rehydrierungspuffer lösen

14.2 Isoelektrische Fokussierung

Die Proteinproben wurden auf 18 cm lange Immobiline Dry Strips (GE Healthcare) unterschiedlicher pH-Gradienten (3-10, 4-7, 6-11) aufgetragen und im Ettan IPGphor 3 System (GE Healthcare) fokussiert. Die Fokussierung lief mind. 24 h, wobei mind. 65.000 Vhs erreicht werden sollten.

- 350 μ l Proteinprobe (Konzentration mind. 2,2 mg/ml) mit 5 μ l DTT (28%) versetzen
- 30 min bei RT auf dem Schüttler inkubieren
- 3,5 μ l IPG-Puffer (GE Healthcare) hinzufügen, mischen
- 10 min bei 13.200 rpm und RT zentrifugieren
- Überstand gleichmäßig auf dem Keramikschiffchen verteilen
- Streifen luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten auflegen
- Streifen mit 600 μ l Coverfluid (GE Healthcare) überschichten
- Deckel auflegen

IEF Protokoll (Einstellung IPGphor 3: 20°C, max. 50 μ A pro Strip)

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

Total 24h 81.860Vhs

Nach der Fokussierung wurden die Streifen luftdicht verschlossen bei -80°C aufbewahrt.

14.3 SDS-PAGE

Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte in einem Gelelektrophoresesystem von ROTH. Die Streifen mit den fokussierten Proteinen wurde zuerst äquilibriert und anschließend luftblasenfrei auf das 12,5% Gel aufgesteckt. Die Befestigung und der Kontakt zwischen dem Streifen und dem SDS-Gel wurden über eine dünne Schicht von Agarose hergestellt.

Äquilibration der Immobiline Dry Strips:

- Streifen 1 x 15 min mit 5 ml Äquilierungspuffer und DTT (2%, immer frisch zugeben) auf dem Schüttler inkubieren (unter Abzug)
- Streifen 1 x 15 min mit 5 ml Äquilierungspuffer und Iodacetamid (2,5%, immer frisch zugeben) auf dem Schüttler inkubieren (unter Abzug)
- Streifen 1 x SDS-Laufpuffer geben
- Streifen luftblasenfrei auf das Gel aufsetzen

Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte bei 1W und über Nacht (ca. 18h) bei RT. Anschließend wurden die Proteine im Gel für mind. 2h fixiert und mit Coomassie Brilliant Blau CBB-G250 gefärbt (in der Regel 3-4 h oder ü/N). Diese Färbemethode macht nur eine sehr schwache Hintergrundfärbung, so dass die Gele in der Regel mit Wasser entfärbt werden könnten.

14.4 Tryptischer Verdau

Trypsin spaltet die Peptidbindungen von Proteinen hinter den Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R), sofern kein Prolin folgt. Dadurch entsteht für jedes Protein nach Trypsin-Behandlung ein spezifisches Peptid-Muster aus zahlreichen Protein-Fragmenten. Die molekulare Masse dieser Teilpeptide kann mittels MALDI-TOF-MS-Analysen bis auf ca. 1 Da genau bestimmt werden. Da für jedes Protein ein anderes Peptidmuster mit anderen Peptidmassen entsteht, kann bei bekannter Proteinsequenz anhand des Peptidmusters auf das Protein geschlossen werden.

- Proteinbande aus dem gefärbten Gel ausschneiden, in die Mikrotiterplatte überführen
- Zusatz von 100 µl 50% H₂O/50% CH₃CN (Acetonitril), 5 min auf Wipptisch schütteln
- Waschlösung verwerfen
- Zusatz von 100 µl 50% CH₃CN/50 mM NH₄HCO₃ (Ammoniumhydrogencarbonat), 30 min auf Wipptisch schütteln
- Waschlösung verwerfen
- Zusatz von 50% CH₃CN/10 mM NH₄HCO₃, 30 min auf Wipptisch schütteln
- Waschlösung verwerfen
- Trocknung der Gelstücke über Nacht unter dem Abzug
- ein Vial (20µg) Trypsin (Promega) mit 200 µl des mitgelieferten Puffers ansetzen und 15 min bei 30°C aktivieren
- je 1 µl aktiviertes Trypsin mit 14 µl 10 mM NH₄HCO₃ mischen und auf ein getrocknetes Gelstück geben
- Mikrotiterplatte luftdicht verschließen
- 24h bei 37°C inkubieren, anschließend bei -20°C lagern

Die Matrix wird aus der Matrixlösung und der α -Cyano-4-Hydroxymizsäure mit einer Endkonzentration von 0,7 mg/ml hergestellt.

- 1 µl Proteinprobe aus der Mikrotiterplatte auf das Target pipettieren
- den Wasseranteil im Tropfen durch Verdampfen unter Abzug reduzieren (der Tropfen darf nicht eintrocknen)
- 1 µl Matrix hinzufügen, mischen durch 1- bis 2 x Auf- und Abziehen mit der Pipette
- unter dem Abzug trocknen

14.5 Identifizierung der Proteine mittels MALDI-TOF-MS und MASCOT

Die tryptisch verdauten Proteine werden mittels MALDI-TOF-MS massenspektrometrisch analysiert. MALDI-TOF-MS ist eine sehr schonende Ionisierungstechnik, die es erlaubt, die Molekülmasse von Peptiden und Proteinen zu bestimmen. Die Analyt-Probe wird in eine Matrix eingebettet, die bei der eingestrahlten Laserwellenlänge eine hohe Absorption zeigt. Dieses Gemisch wird auf einen Anchor-Chip aufgetragen und an der Luft getrocknet. Bei der Verdunstung des Lösungsmittels erfolgt eine Kokristallisation von Analyt und Matrix. Durch die Bestrahlung der Probe mit UV-Licht wird eine direkte Desorption intakter Molekül-Ionen aus der kondensierten Phase erreicht. Die Massenbestimmung bei MALDI erfolgt über einen Flugzeitmassenspektrometer, der die Zeit misst, die zwischen dem Start der Ionen in der Quelle bis zum Eintreffen am Detektor vergeht.

Durch die MALDI-TOF-MS-Analyse werden nur die Massen einzelner (im Idealfall aller) tryptischen Fragmente eines Proteins (Trypsin spaltet hinter Arginin und Lysin) bestimmt. Die eigentliche Identifizierung des Proteins erfolgt mit dem Programm MASCOT, das den Vergleich der gemessenen Massen mit den theoretischen, durch einen *in silico*-Verdau erhaltenen Massen aller Proteine aus der *Cmm*-Datenbank erlaubt. Proteine mit einem Score von 47 (*Cmm*, Tomate) galten als sicher identifiziert.

15. Isolierung von Xylemsaft *Cmm*-infizierter und nicht infizierter Tomatenpflanzen zur Charakterisierung des Xylemsaftproteoms

Für die Isolierung von Xylemsaft wurden 6 bis 7 Wochen alte Tomatenpflanzen verwendet, die im 5- bis 6-Blattstadium über den Petiolus mit *Cmm* infiziert wurden.

- Pflanzen etwa 1 cm über der Infektionsstelle abschneiden
- Seitenzweige entfernen und den Spross in 1 cm große Stücke schneiden
- die Sprosstücke in Filtereinheiten mit Sammelgefäßen einsetzen und 10 sec bei 5.000 rpm zentrifugieren
- den Xylemsaft mehrerer Pflanzen sammeln und auf Eis lagern
- den gesammelten Xylemsaft 15 min bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Pellet verwerfen, den Überstand 30 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- den zellfreien Xylemsaft bei -80°C einfrieren und lyophilisieren
- den Xylemsaft im Extraktionspuffer lösen, phenolisieren und zur Analyse mittels 2D-Gelelektrophorese einsetzen

16. Methoden zur Analyse des Pathogenitätsverhaltens von *Cmm*

16.1 Petiolusinfektion der Tomatenpflanzen mit *Cmm*

- Aussaat der Tomatenpflanzen in steriler Erde (Pikiererde)
- Vereinzelung der ca. 2 Wochen alten Keimlinge (Zwei-Blatt-Stadium) durch Umpflanzen in

Plastiktöpfe 8 cm x 8 cm mit steriler Topferde

- Anzucht der Pflanzen für ca. 2 Wochen im Pflanzenraum bei 40-50% relativer Luftfeuchtigkeit im Tag-Nacht-Rhythmus bei 25°C (Tag 16h bei 12.000 Lux, Nacht 8h im Dunkeln)
- Infektion der Pflanzen im 5- bis 6-Blattstadium (incl. Keimblätter) durch Abschneiden des ersten Fiederblattes mit einem sterilen Skalpell und Auftragung von *Cmm* auf die entstandene Wunde
- weitere Anzucht der Pflanzen im Pflanzenraum
- tägliches Protokollieren der Welkesymptome

16.2 Welkeindex und Welkeverlauf

Für die Ermittlung der Welkeindices wird eine Serieninfektion der 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
++	starke Welke
tot	so starke Welke, dass keine Photosynthese mehr möglich ist

16.3 Größen- und Frischgewichtsbestimmung der Pflanzen

Am Ende des Pflanzentests (nach ca. 28 Tagen) werden die Tomatenpflanzen zur Bestimmung der Größe und des Gewichts direkt über der Erde mit einer sterilen Schere abgeschnitten. Die Pflanzen werden gewogen und die Länge der Sprossachse von der Schnittstelle bis zum letzten Vegetationspunkt gemessen.

16.4 Analyse der Kolonisationsfähigkeit

16.4.1 Reisolierung von *Cmm* aus infizierten Pflanzen

- Mörser und Pistill mit 100% EtOH (v/v) abflammen
- Pflanze direkt über der Erde mit einer sterilen Schere abschneiden, wiegen, messen, in kleine Stücke schneiden und in den Mörser geben
- zerkleinerte Pflanze mit flüssigem Stickstoff bedecken und nach Abdampfen des N₂ mit Pistill zerkleinern
- PS-Puffer zugeben (1 ml/g Frischgewicht)
- solange mörsern, bis eine homogene Masse entstanden ist
- Verdünnungsreihen anlegen und 100 µl der ausgewählten Verdünnungsstufen auf TBY- oder C-Medium (ggf. mit Antibiotikumzusatz) ausplattieren
- 3-5 Tage bei 25-28°C inkubieren

Bei Pflanzen, die im Alter von ca. 4 Wochen über den Petiolus infiziert wurden und nach Ablauf des Pflanzentest bis zu 50 cm groß und daher für die Titerbestimmung durch das Mörsern einer ganzen Pflanze zu groß sind, wurde nur ein ca. 1 cm großes Stück des Sprosses direkt über der Infektionsstelle gemörsert. Zuvor wurden die Größe und das Gewicht dieses Sprosstücks

gemessen und gewogen, so dass der bestimmte Titer sich auf [cfu/g Spross] bezog. Vergleiche des Titer infizierter Pflanzen, die für die Titerbestimmung ganz oder nur teilweise gemörsert wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede, so dass die zuletzt genannte Methode ebenfalls zuverlässige Ergebnisse über die Kolonisationsfähigkeit des untersuchten Stammes liefert.

16.4.2 Bestimmung des *Cmm*-Titers in der infizierten Pflanze

Für die Berechnung des Titer [cfu/g Pflanzenmaterial] wird die Kolonienzahl unterschiedlicher Verdünnungsstufen bestimmt und der gewichtete Mittelwert gebildet. dabei werden die Kolonienzahlen einzelner Verdünnungsstufen addiert und die Summe durch 11 bei zwei ausgezählten Verdünnungsstufen oder durch 111 bei drei ausgezählten Verdünnungsstufen usw. dividiert. Ist eine Verdünnungsstufe wegen einer starken Kontamination nicht auszählbar, geht sie nicht in den gewichteten Mittelwert ein. In so einem Fall wird die Summe z.B. durch 101 dividiert, wenn die zweite von den drei ausplattierten Verdünnungsstufen nicht auszählbar ist. Der erhaltene Wert wird mit dem Verdünnungsfaktor der höchsten Verdünnungsstufe und dem Faktor 10 (es wurde nur 1/10 eines Milliliters ausplattiert) multipliziert. Da die Zugabe von PS-Puffer beim Mörsern zu einer weiteren Verdünnung des Titer führt, muss dieser bei der Berechnung ebenfalls berücksichtigt werden. Dies wird durch die Multiplikation des gewichteten Mittelwertes mit der n-fachen Menge des PS-Puffers, in der die Pflanze resuspendiert worden ist, erreicht. Das Ermitteln des gewichteten Mittelwertes statt des arithmetischen Mittelwertes hat den Vorteil, dass die niedrigen Verdünnungsstufen zu einem größeren Anteil in den Mittelwert eingehen als die höheren und den Verdünnungsfehler dadurch ausgleichen. Durch diese Berechnung geht die niedrigste Verdünnungsstufe mit 100 %, die folgenden nur mit 10 %, 1 % usw. in den Mittelwert ein.

E. Ergebnisse

Die von einem Pathogen nach außen sekretierten Proteine spielen in der Bakterien-Pflanzen-Interaktion eine wichtige Rolle und können für die Ausprägung der Virulenz von großer Bedeutung sein. Zu den sekretierten Proteinen gehören die extrazellulären hydrolytischen Enzyme, die durch den Abbau bzw. die Auflockerung zellulärer pflanzlicher Strukturen den Zugang in den Wirt ermöglichen. In der Phase der Vermehrung und Ausbreitung sind die hydrolytischen Enzyme an der Nährstoffversorgung beteiligt, indem sie makromolekulare Verbindungen des Wirts abbauen und in Form von Oligo- bis Monosacchariden dem Pathogen zur Verfügung stellen. Die hydrolytischen Enzyme können aber auch entweder direkt oder über ihre Spaltprodukte als Elicitoren wirken und in die Signaltransduktionskaskaden der Wirtspflanze einbezogen werden, in der sie viele physiologische Prozesse, einschließlich der Induktion der Abwehr, auslösen können.

Die von *Cmm* während der Interaktion mit der Tomate sekretierten Proteine sind mit Ausnahme der beiden plasmidkodierten Virulenzfaktoren, der Cellulase CelA und der Serinpeptidase Pat-1, noch weitestgehend unbekannt und sind ein zentrales Thema dieser Arbeit. Die Untersuchung der extrazellulären Proteine von *Cmm* setzt sich aus zwei Hauptteilen zusammen. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Charakterisierung von sechs im Genom von *Cmm* annotierten extrazellulären Enzymen, denen eine mögliche Funktion im Abbau von Zuckerpolymeren zugeordnet wird. Aufgrund der vielfältigen Funktionen, die sich über Penetration, Vermehrung, Ausbreitung bis zur Signalübertragung erstrecken, könnten die hydrolytischen Enzyme wichtige Virulenzfaktoren darstellen und entscheidend zur Krankheitsauslösung beitragen. Die Charakterisierung konzentriert sich vor allem auf die Rolle dieser Enzyme in der Pathogenese, aber auch auf die Bestimmung der tatsächlichen Substrate dieser Enzyme (Kap. A). Der Fokus des zweiten Teils der Arbeit liegt auf der Erfassung des *in vitro*-Exoproteoms von *Cmm*. Mittels 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-MS sollen alle unter bestimmten Bedingungen ins Medium sekretierten *Cmm*-Proteine identifiziert werden. Die Exoproteomstudien sollen einen ersten Überblick über die Gesamtheit aller zu einem bestimmten Zeitpunkt sekretierten Proteine geben und könnten zur Identifizierung potentieller Virulenzfaktoren führen (Kap. B). Anschließend soll durch vergleichende Exoproteomstudien zwischen Wildtyp- und Mutantstämmen, die Deletionen in einzelnen Komponenten der Sec- bzw. Tat-Transportsysteme aufweisen, die Beteiligung dieser Transportsysteme an der Sekretion extrazellulärer Proteinen bestimmt werden (Kap. C).

Abschließend wurde das Proteom des Xylemsafts der Tomate untersucht, um begrenzt *in vivo*-Daten über sekretierte *Cmm*-Proteine zu erhalten, und die Reaktion der Tomate zu erfassen (Kap. D). Dies wurde vergleichend nach Infektion mit unterschiedlichen *Cmm*-Stämmen durchgeführt.

A. Erzeugung von Mutanten in den extrazelluläre Enzyme kodierenden Genen durch Insertionsmutagenese

Für die Penetration, Ausbreitung in der Pflanze, aber auch die Versorgung mit Nährstoffen setzen Pathogene verschiedene Zellwand-degradierende hydrolytische Enzyme ein. Im Genom von *Cmm* sind mehrere extrazelluläre Enzyme (Hydrolasen, Proteasen, Lipasen, insgesamt etwa 36) annotiert worden. Neben der durch das Plasmid pCM1 kodierten Cellulase CelA, die direkt für die Pathogenität verantwortlich ist, konnten u.a. sechs weitere Polysaccharid-abbauende Enzyme vorhergesagt werden: die zwei Xylanasen XysA (CMM_1673) und XysB (CMM_1674), eine Polygalakturonase PgaA (CMM_2871), eine zu CelA homologe chromosomal kodierte Cellulase CelB (CMM_2443) und zwei weitere Endoglukanasen EndX (CMM_2691) und EndY (CMM_2692).

Die beiden putativen Xylanasen (EC 3.2.1.8), die von den *xysA*- und *xysB*-Genen kodiert werden, werden der Familie 10 der Glykosylhydrolasen zugeordnet, die hauptsächlich Xylanasen enthält. Daher besteht die Annahme, dass beide Proteine am Abbau von Xylan, der wichtigsten Komponente der Hemicellulose in pflanzlichen Zellwänden beteiligt sein könnten. Die durch das *pgaA*-Gen kodierte putative Polygalakturonase (EC 3.2.1.15) gehört zu den Pektinasen und ist homolog zu den Endopolygalakturonasen von *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* und *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Die Pektinasen sind am Abbau von Pektin, das die Hauptkomponente der Mittellamelle und der primären Zellwand höherer Pflanzen darstellt, beteiligt. Bei der durch das *celB*-Gen kodierten Cellulase (EC 3.2.1.4) handelt es sich um eine β -1,4-Endoglukanase, die der Familie 5 der Glykosylhydrolasen angehört und homolog zu der Cellulase von *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* ist. CelB ist auch homolog (64 % Identität bzw. 76 % Ähnlichkeit auf Aminosäureebene) zu dem plasmidkodierten Virulenzfaktor CelA aus *Cmm*, enthält allerdings nur die katalytische und die Substratbinde-Domänen, während die dritte Expansin-artige Domäne von CelA, die für die Degradation kristalliner Cellulose entscheidend ist, im chromosomalen CelB fehlt. Die Endoglukanasen könnten in Kooperation mit anderen cellulolytischen Enzymen die Hydrolyse von Cellulose zu Glukose katalysieren. Die beiden als Endoglukanasen annotierten Proteine EndX und EndY werden von den auf dem Chromosom hintereinander angeordneten *endX*- und *endY*-Genen kodiert und zeigen in ihrer Sequenz eine nur schwache Ähnlichkeit zu den Mitgliedern der Familie 26 der Glykosylhydrolasen, so dass derzeit noch keine Vermutung zu deren Substrat existiert. Die genaue Funktion all dieser Enzyme ist derzeit noch unbekannt. Inwieweit einige dieser extrazellulären Enzyme pflanzliche Zellwandpolymere degradieren können und welche Auswirkung ihre Aktivität auf die Pathogenität von *Cmm* hat, wurde über Agarplattentests bzw. Zymogramme und über *in planta*-Experimente mit den „Knock out“-Mutanten in diesen Genen überprüft.

1. Konstruktion der Mutageneseplasmide der Gene *xysA*, *xysB*, *pgaA*, *celB*, *endX* und *endXY*

Für das Genomprojekt von *Cmm* NCPPB382 sind auf der Basis des pSmart-Vektors Sequenzierungsplasmide konstruiert worden, die ca. 1 bis 6 kb große gescherte Fragmente des *Cmm*-Genoms enthalten (Gartemann *et al.*, 2008). Die Sequenzierungsplasmide, die die zu inaktivierenden Gene (in den meisten Fällen) vollständig enthalten und zur Konstruktion von Mutageneseplasmiden eingesetzt wurden, sind: cmis3p0009g02 (*xysA*, *xysB*); cmis3p0004f07 (*endX*); cmis3p0006g09 (*endXY*); cmis1p0512b05 (*pgaA*) und cmis3p0002g07 (*celB*). Die physikalischen Karten der Mutageneseplasmide sowie anderer Plasmide, die zur Konstruktion verwendet wurden, sind im Anhang (S. 149) dargestellt. Alle Klonierungsschritte wurden in dem *E. coli*-Stamm DH5 α durchgeführt. Die Inaktivierung der Gene erfolgte durch die Insertion einer *cmx*-Kassette (*cmx*: Chloramphenicolexportgen aus *Corynebacterium striatum*, Tauch *et al.*, 1998) in geeignete Restriktionsschnittstellen. Die konstruierten Mutageneseplasmide wurden mittels Elektroporation in kompetente *Cmm*-Zellen transferiert, so dass das intakte chromosomale Gen durch das unterbrochene Gen auf dem Mutageneseplasmid durch ein „doublecrossover“ ausgetauscht werden konnte. Der pSmart-Vektor ist in *Cmm* ein „suicide“-Plasmid, das nicht replizieren kann und nicht auf die nächste Generation übertragen wird. Die Identifizierung richtiger *Cmm*-Mutanten, bei denen tatsächlich ein „doublecrossover“ stattgefunden hat, erfolgte über die Southern-Hybridisierung von gespaltener Gesamt-DNA mit drei verschiedenen Sonden. Eine Hybridisierung mit dem pUC-Vektor schloss die Mutanten aus, bei den aufgrund eines „singlecrossovers“ oder einer illegitimen Rekombination zusätzlich zum intakten Gen noch Bereiche des Vektors mit ins Chromosom integrierten. Die anschließende Hybridisierung mit einer Gen-spezifischen Sonde bzw. der *cmx*-Kassette und der Vergleich der Hybridisierungsmuster mit den theoretisch errechneten Fragmentgrößen erbrachten den endgültigen Nachweis der Richtigkeit der Mutanten.

1.1. Die Inaktivierung des *xysA*-Gens (Xylanase)

Die Inaktivierung des *xysA*-Gens, das vollständig auf dem Plasmid cmis3p0009g02 vorliegt, erfolgte durch die Insertion der *cmx*-Kassette in die singuläre *StuI*-Schnittstelle innerhalb des Gens. Die aus dem pEC70-Vektor mit *BsaI*/*KpnI* ausgeschnittene *cmx*-Kassette ist von *BsaI*-Enden flankiert. Sowohl die von *StuI* als auch von *BsaI* erzeugten „blunt ends“ können problemlos miteinander ligieren. Das konstruierte Mutageneseplasmid pHT*xysA* α enthält die *cmx*-Kassette in der gleichen Orientierung wie das *xysA*-Gen. Nach der Elektroporation wurde die *SphI*/*PstI* gespaltene Gesamt-DNA Cm-resistenter Klone, die bei der Hybridisierung mit der pUC-Sonde kein positives Signal lieferten, mit der *xysA*- und

zuletzt mit der *cmx*-Sonde hybridisiert. Die Hybridisierungsergebnisse sind in Abb. 1 dargestellt. Die Fragmentgrößen der hybridisierenden Banden der potentiellen Mutante und des Wildtyps stimmen mit den berechneten Größen überein und bestätigen, dass es sich um eine *xysA*-Mutante handelt.

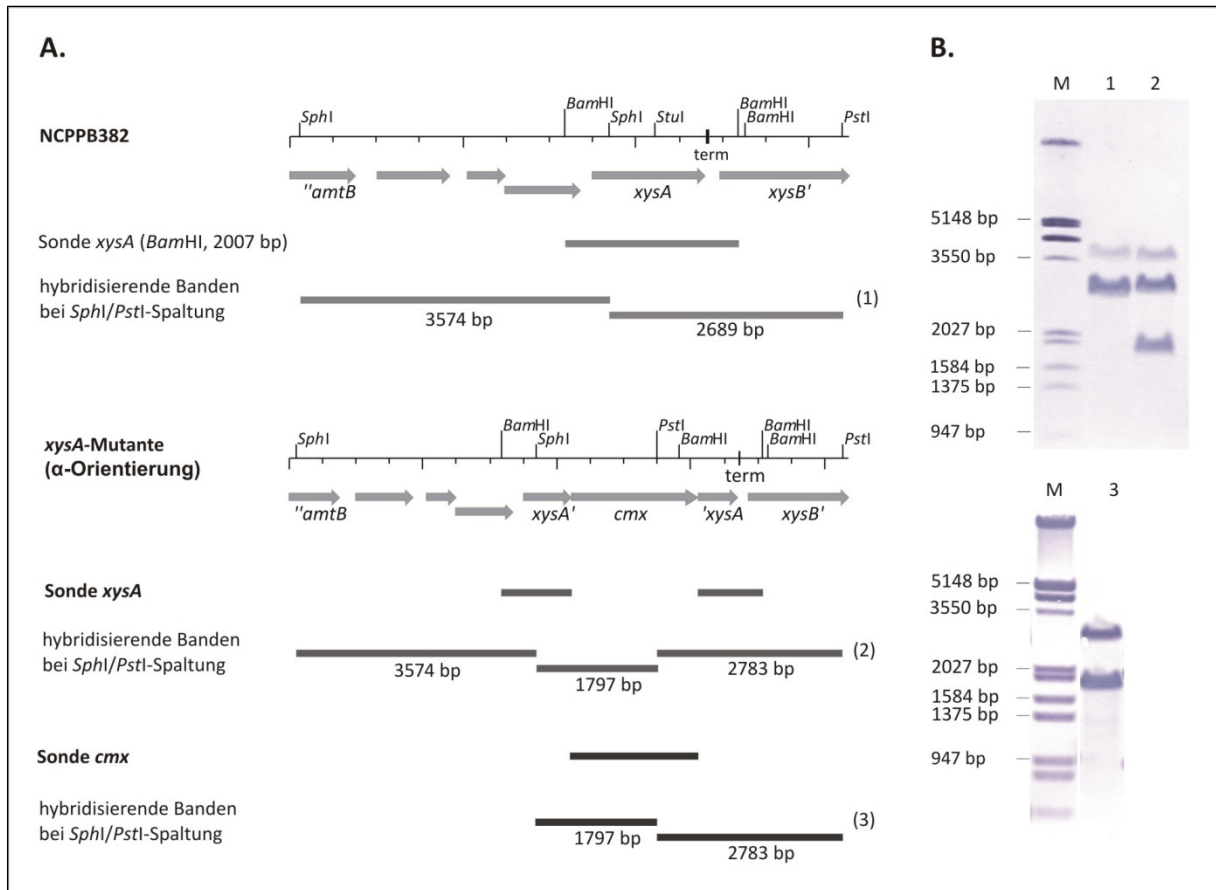


Abb. 1. (A) Physikalische Karte der *xysA*-Genregion, die Sonden sowie das zu erwartende Hybridisierungsmuster der Mutante und des Wildtyps. (B) Southern Hybridisierung *SphI/PstI*-gespaltener Gesamt-DNA des Wildtyps mit der *xysA*-Sonde (Spur 2) und der Mutante mit der *xysA*-Sonde (Spur 1) und *cmx*-Sonde (Spur 3), Digoxigenin-11-dUTP-markierter *EcoRI/HindIII*-gespaltener λ -Marker (M).

1.2 Die Inaktivierung des *xysB*-Gens (Xylanase)

Die Inaktivierung des *xysB*-Gens, das nur partiell (1552 bp von insgesamt 2010 bp) auf dem *cmis3p0009g02* liegt, erfolgte durch den Austausch eines internen 231 bp großen *PvuII*-Fragmentes im Gen durch die mit *BsaI/KpnI* ausgeschnittene *cmx*-Kassette aus pEC70. Die Insertion der *cmx*-Kassette erfolgte in der gleichen Orientierung zum Gen. Die Elektroporation des Mutageneseplasmids pHT*xysBa* und die anschließende Hybridisierung der *BamHI*-gespaltener Gesamt-DNA Cm-resistenter Klone führte zur Identifizierung einer *xysB*-Mutante. Das zusätzliche etwa 2,0 kb große Fragment, das bei der Hybridisierung des

Wildtyps mit dem Zielgen ein Signal gibt, ist möglicherweise auf eine Kreuzhybridisierung mit einem anderen Gen zurückzuführen. Ob diese Bande auch bei der Hybridisierung der potentiellen Mutante mit der Gensonde auftaucht, ist schwer zu sagen, da für die Mutante ein ähnlich großes Fragment vorhergesagt wurde. Allerdings liefern die Hybridisierungen (Abb. 2) der potentiellen Mutante sowohl mit dem Zielgen als auch der *cmx*-Kassette das gewünschte Bandenmuster und gelten damit als Bestätigung für den erfolgreichen Genaustausch.

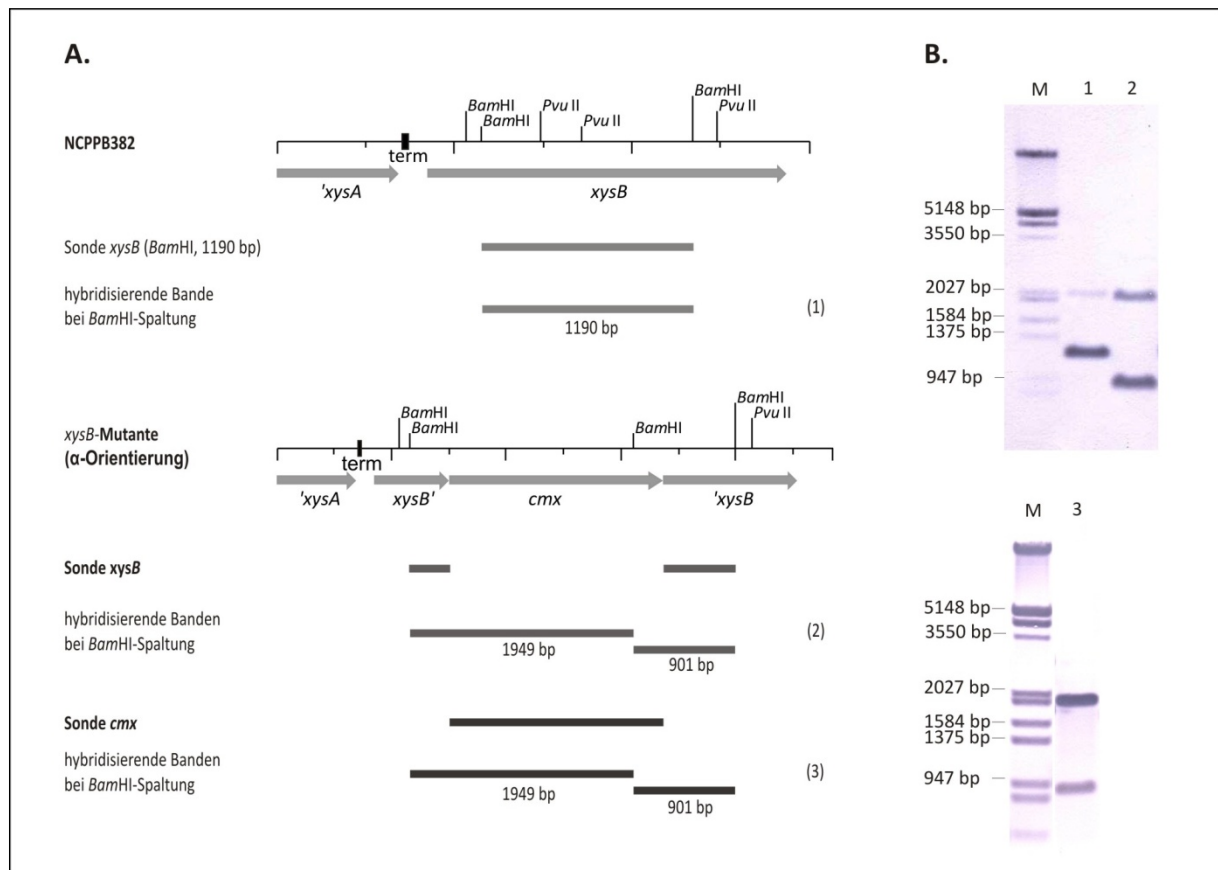


Abb. 2. (A) Physikalische Karte der *xysB*-Genregion, die Sonden sowie das zu erwartende Hybridisierungsmuster der Mutante und des Wildtyps. (B) Southern Hybridisierung *Bam*HI-gespaltener Gesamt-DNA des Wildtyps mit der *xysB*-Sonde (Spur 1) und der Mutante mit der *xysB*-Sonde (Spur 2) und der *cmx*-Sonde (Spur 3), Digoxigenin-11-dUTP-markierter *Eco*RI/*Hind*III-gespaltener λ -Marker (M).

1.3 Die Inaktivierung des *pgaA*-Gens (Polygalakturonase)

Zur Inaktivierung des *pgaA*-Gens, von dem nur die letzten 754 bp (von 1491 bp) auf dem *cmis1p0512b05* lokalisiert sind, wurde die *cmx*-Kassette aus pEC70 in die *Hinc*II-Schnittstelle eingesetzt. Sowohl *Hinc*II als auch die *Bsa*AI-Restriktionsendonuklease, die die beiden Enden der *cmx*-Kassette flankiert, bilden „blunt ends“, die miteinander ligieren können. Die *cmx*-Kassette ist in dem Mutageneseplasmid pHT*pgaA* α in der gleichen Richtung wie das *pgaA*-

Gen orientiert. Die Hybridisierung potentieller *Cmm*-Klone mit den drei verschiedenen Sonden zeigte das theoretisch errechnete Bandenmuster (Abb. 3) und bestätigte den erfolgreichen Austausch des intakten gegen das inaktivierte Gen.

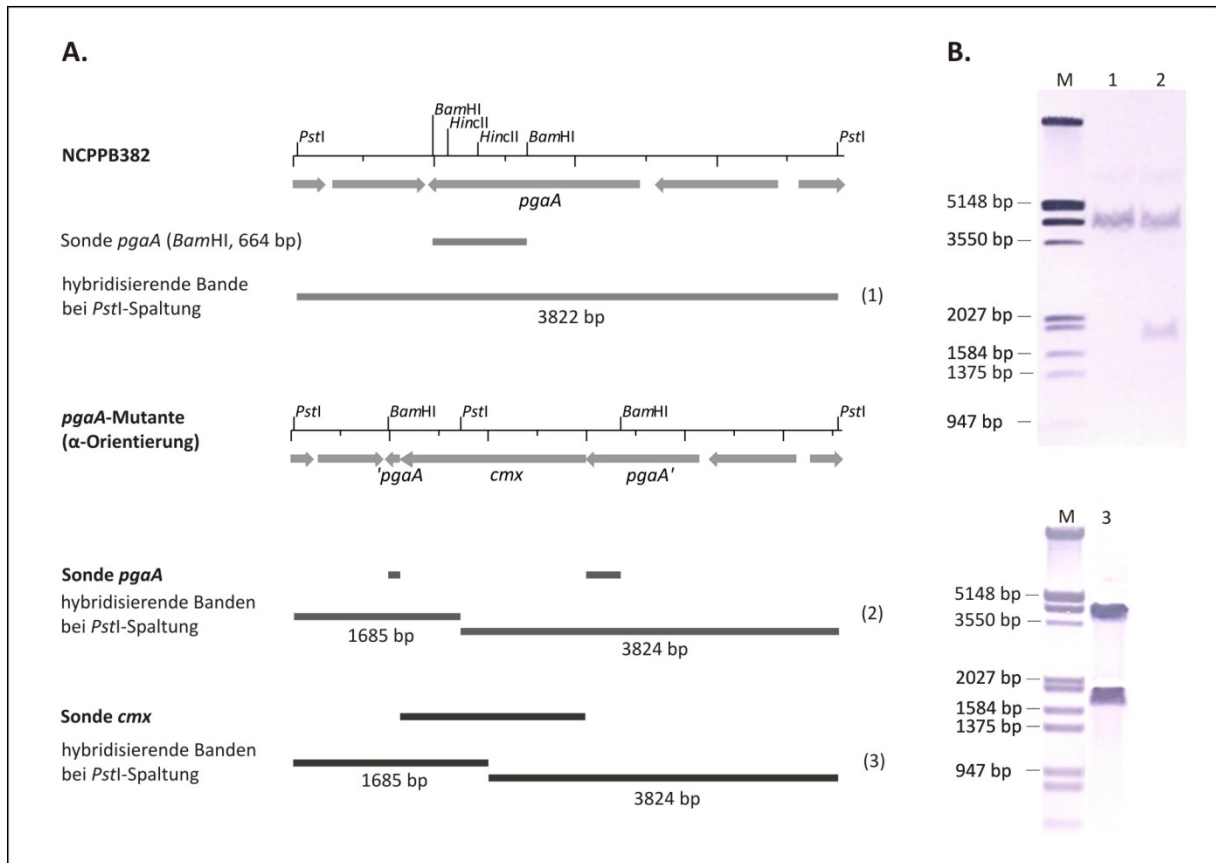


Abb. 3. (A) Physikalische Karte der *pgaA*-Genregion, die Sonden sowie das zu erwartende Hybridisierungsmuster der Mutante und des Wildtyps. (B) Southern Hybridisierung *PstI*-gespaltener Gesamt-DNA des Wildtyps NCPPB382 mit der *pgaA*-Sonde (Spur 1) und der Mutante mit der *pgaA*- (Spur 2) und *cmx*-Sonde (Spur 3), Digoxigenin-11-dUTP-markierter *EcoRI*/*HindIII*-gespaltener λ -Marker (M).

1.4 Die Inaktivierung des *celB*-Gens (Cellulase)

Zur Inaktivierung der chromosomal kodierten Cellulase CelB wurde das cmis3p0002g07-Sequenzierplasmid verwendet. Die Spaltung mit *AgeI* und Austausch des 1485 bp großen *AgeI*-Fragments gegen die *cmx*-Kassette führt zur Deletion des beinahe kompletten *celB*-Gens. Da die *AgeI*-Restriktionsendonuklease 5'-Überhänge erzeugt, mussten diese vor der Ligation mit der 1,9 kb großen *cmx*-Kassette durch Klenow-Polymerase aufgefüllt werden. Die anschließende Hybridisierung (Abb. 4) des Wildtyps und der potentiellen Mutante mit der *celB*-Sonde, zeigte bei der Mutante das gewünschte Bandenmuster, während bei dem Wildtyp ein zusätzliches etwa 900 bp großes Fragment auftauchte. Da das chromosomale *celB*-Gen und das Plasmid kodierte *celA*-Gen homolog sind, könnte diese zusätzliche Bande

durch die Hybridisierung des *celA*-Gens mit der *celB*-Sonde kommen. Da die Hybridisierung der Mutante mit der *cmx*-Sonde wie auch schon mit der Gensonde die erwarteten Banden lieferte, ist der Beweis erbracht, dass die Kasette an der richtigen Stelle im Zielgen vorliegt.

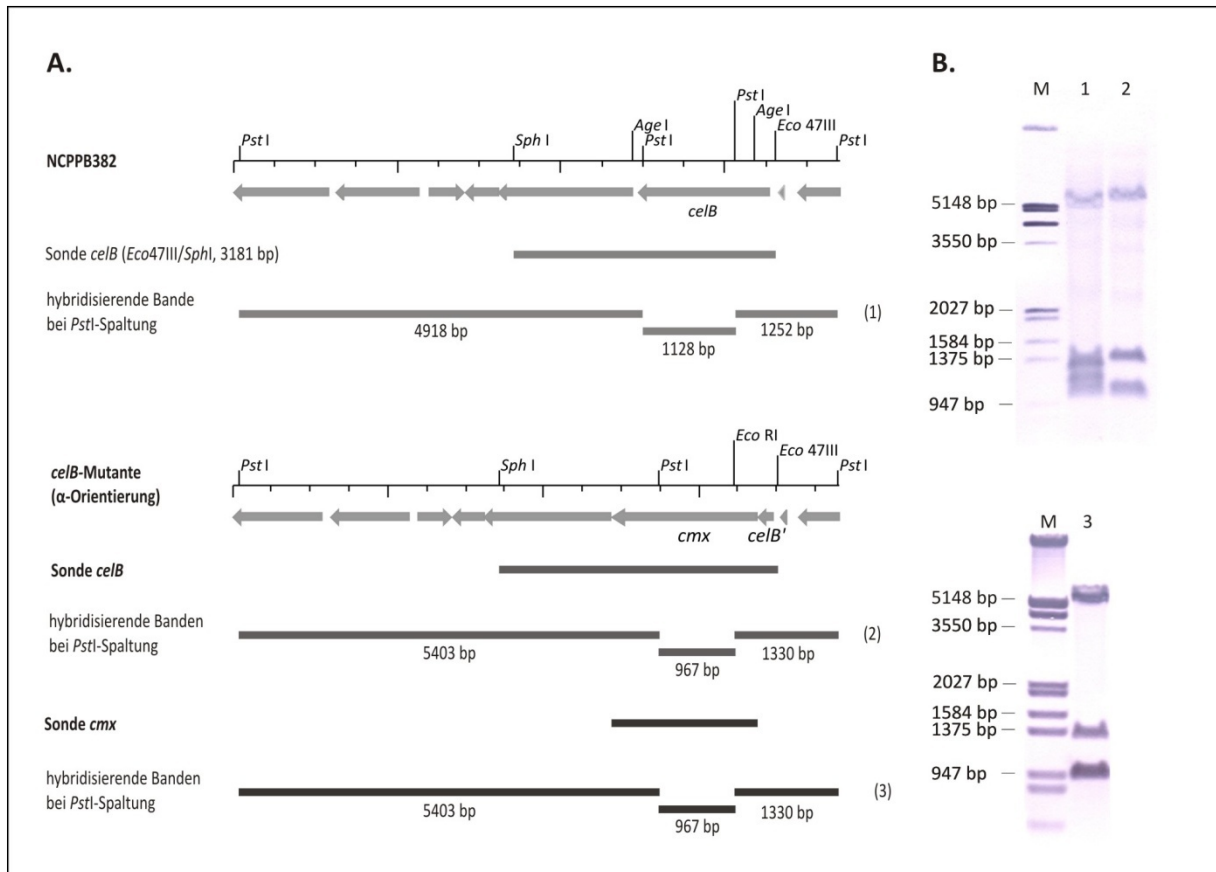


Abb. 4. (A) Physikalische Karte der *celB*-Genregion, die Sonden sowie das zu erwartende Hybridisierungsmuster der Mutante und des Wildtyps. (B) Southern Hybridisierung *Pst*I-gespaltener Gesamt-DNA des Wildtyps mit der *celB*-Sonde (Spur 1) und der Mutante mit der *celB*- (Spur 2) und *cmx*-Sonde (Spur 3), Digoxigenin-11-dUTP-markierter *Eco*RI/*Hind*III-gespaltener λ -Marker (M).

1.5 Die Inaktivierung des *endX*-Gens (Endoglukanase)

Zur Inaktivierung des *endX*-Gens, das vollständig auf cmis3p0004f07 lokalisiert ist, wurde die *Bsa*AI/*Kpn*I ausgeschnittene *cmx*-Kasette aus pEC70 in die singuläre *Psh*AI-Schnittstelle, die ebenfalls wie die *Bsa*AI-Restriktionsendonuklease „blunt ends“ erzeugt, inseriert. Die *cmx*-Kasette ist in pHT*endX* β entgegengesetzt zum *endX*-Gen orientiert. Die Elektroporation und anschließende Hybridisierung *Sph*I-gespaltener Gesamt-DNA führten, wie in Abb. 5 dargestellt, bei einem *Cmm*-Klon zum rechnerisch ermittelten Bandenmuster.

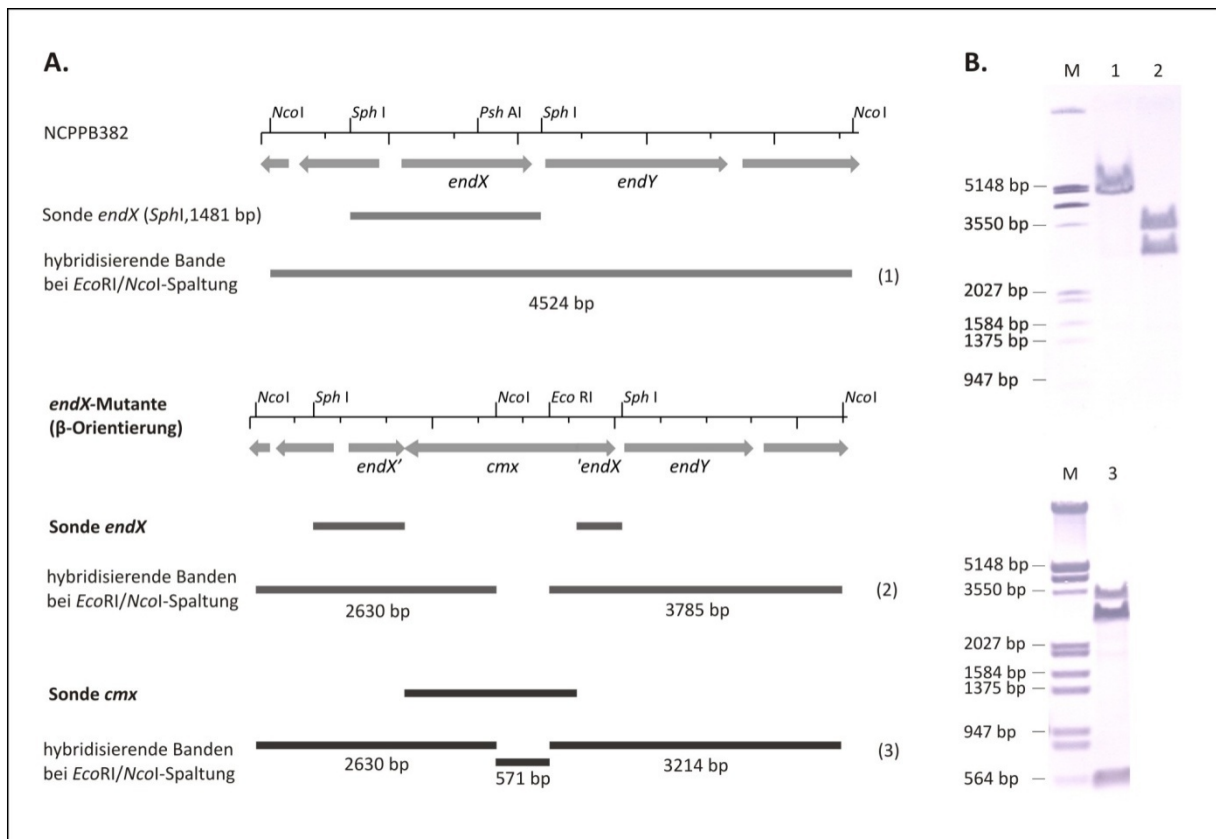


Abb. 5. (A) Physikalische Karte der *endX*-Genregion, die Sonden sowie das zu erwartende Hybridisierungsmuster der Mutante und des Wildtyps. (B) Southern Hybridisierung *EcoRI/NcoI*-gespaltener Gesamt-DNA des Wildtyps mit der *endX*-Sonde (Spur 1) und der Mutante mit der *endX*-Sonde (Spur 2) und *cmx*-Sonde (Spur 3), Digoxigenin-11-dUTP-markierter *EcoRI/HindIII*-gespaltener λ -Marker (M).

1.6 Die Inaktivierung der *endXY*-Gene (Endoglukanasen)

Die Erzeugung einer *endY*-Mutante konnte aufgrund des Fehlens geeigneter Schnittstellen im Gen mit dem Sequenzierungsplamid cmis3p0006g09 nicht durchgeführt werden. Der Austausch des 1522bp großen *Eco47III* Fragments durch die *cmx*-Kassette deletiert fast das komplette *endY*-Gen, aber auch die letzten 277 Basenpaare des *endX*-Gens und führt damit zur Inaktivierung beider Gene. Das Mutageneseplasmid pHT*endXY* α enthält die *cmx*-Kassette in gleicher Orientierung zu den beiden Genen. Nach Elektroporation und der Hybridisierung potentieller *Cmm*-Klone führte der Vergleich der tatsächlichen mit den errechneten Fragmentgrößen (Abb. 6) zur Identifizierung einer *endXY*-Doppelmutante. Die bei der Hybridisierung der Mutante mit der Zielsonde resultierende Doppelbande erscheint als Einzelbande, da die Fragmente mit 2,0 kb und 2,2 kb Größe nicht deutlich aufgetrennt sind.

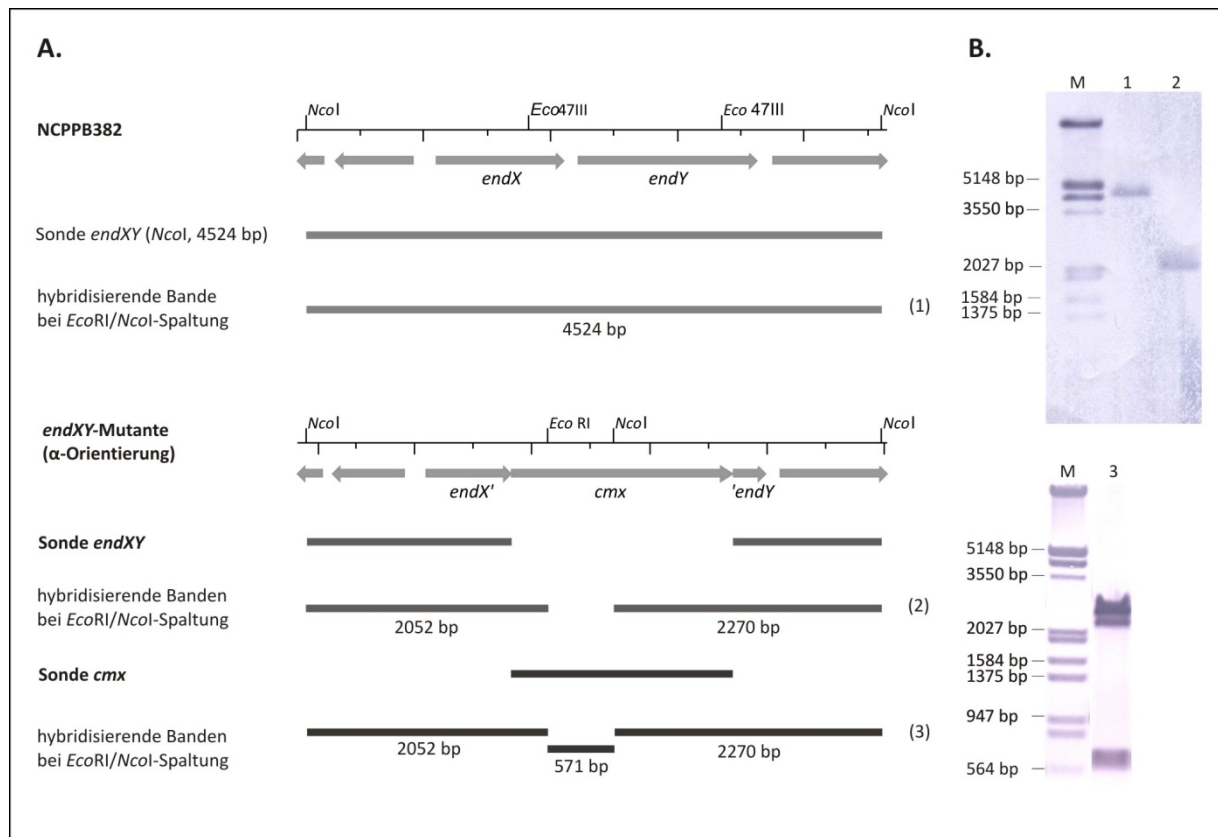


Abb. 6. (A) Physikalische Karte der *endXY*-Genregion, die Sonden sowie das zu erwartende Hybridisierungsmuster der Mutante und des Wildtyps. (B) Southern Hybridisierung *EcoRI/NcoI*-gespaltener Gesamt-DNA des Wildtyps mit der *endXY*-Sonde (Spur 1) und der Mutante mit der *endXY*- (Spur 2) und *cmx*-Sonde (Spur 3), Digoxigenin-11-dUTP-markierter *EcoRI/HindIII*-gespaltener λ -Marker (M).

2. Nachweis der Pathogenitätsdeterminanten *celA* und *pat-1* in den Mutanten

Während der Elektroporation der Mutageneseplasmide in kompetente Zellen des Stammes NCPPB382 kann es zum Verlust eines oder beider Plasmide pCM1 und pCM2 kommen (Kirchner, 2003). Da die Plasmide die beiden Pathogenitätsdeterminanten tragen und somit entscheidend für das Virulenzverhalten von *Cmm* sind, wurden alle Mutanten vor dem Pflanzentest auf ihren Plasmidstatus überprüft. Sowohl für das pCM1- als auch das pCM2-Plasmid liegen PCR-Primer vor, die bestimmte Regionen des *celA*- bzw. *pat-1*-Gens amplifizieren. Die Untersuchung der sechs Mutanten auf ihren Plasmidstatus zeigte, dass nur die Stämme CMM*xysA* und CMM*pgaA* beide Plasmide enthielten und somit mit dem Wildtypstamm NCPPB382 verglichen werden mussten, während die anderen vier pCM2 verloren haben und daher der Stamm CMM101, ein NCPPB382-Derivat, das nur pCM1 enthält, als Kontrolle eingesetzt wird.

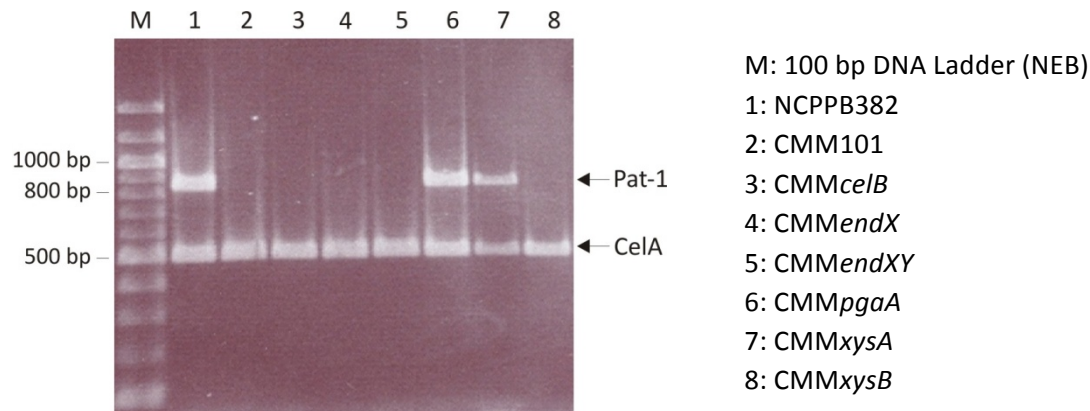


Abb. 7. Nachweis von *celA* und *pat-1* über PCR.

3. Phänotypische Charakterisierung der Insertionsmutanten im Pflanzentest

Die plasmidkodierte Pathogenitätsdeterminante CelA und Pat-1 sind für die Auslösung von Krankheitssymptomen verantwortlich. Die extrazellulären Enzyme interagieren wahrscheinlich direkt mit dem Wirt, in dem sie die pflanzliche Zellwand angreifen. Der Abbau bestimmter Bestandteile der Zellwand könnte dem Pathogen den Eintritt in den Wirt erleichtern und zur erfolgreichen Infektion führen. Inwieweit die extrazellulären Enzyme für die Virulenz und die Kolonisationsfähigkeit verantwortlich sind, sollte die phänotypische Charakterisierung der Mutanten im Pflanzentest klären.

Pro Stamm wurden 60 zwei Wochen alte Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum*) der Sorte Moneymaker mittels Petiolusinfektion infiziert und das Auftreten von Welkesymptomen und Sprossläsionen innerhalb von 28 Tagen verfolgt. Zur Beurteilung des Virulenzverhaltens wurden täglich die Intensität der hervorgerufenen Welkesymptome nach einem festgelegten Schema protokolliert und der Welkeindex bestimmt, der den Zeitraum, in dem die Hälfte der infizierten Pflanzen Welkesymptome zeigen, angibt. Am Ende des Pflanzentests wurden schließlich weitere für die Virulenz wichtige Parameter wie das Gewicht, die Größe und der Bakterientiter in der Pflanze bestimmt. Der Bakterientiter ist ein wichtiges Indiz für die Kolonisationsfähigkeit der Mutanten. Von den 60 pro Stamm getesteten Pflanzen wurden zur Berechnung der Bakterientiter 12 Pflanzen komplett homogenisiert. Da die Infektionsrate nicht immer bei 100 % liegt, wurde durch Auftropfen von Xylemsaft aller getesteten Pflanzen auf Agarplatten, der Anteil der Pflanzen bestimmt, die nicht erfolgreich infiziert wurden. Die Pflanzen, bei denen kein *Cmm* im Xylemsaft nachgewiesen werden konnte, wurden nicht in die Auswertung einbezogen, sofern ihr Anteil gering blieb. Da die plasmidkodierte Pathogenitätsdeterminante eine entscheidende Rolle in der Pathogenität spielen, müssen beim Vergleich des Virulenzverhaltens der Plasmidstatus der Mutante und der Kontrollstämme übereinstimmen. Daher wurden die *xysA*- und die *pgaA*-Mutanten mit

dem Wildtypstamm NCPPB382 und die *xysB*-, *celB*-, *endX*- und *endXY*-Mutanten mit dem Stamm CMM101 verglichen.

Tab. 1. Die Exoenzymmutanten im Pflanzentest.

Stamm	Plasmide	WI ^a	Größe [cm] ^b	Gewicht [g] ^b	Titer [cfu/g Pflanze] ^c
NCPPB382	pCM1,pCM2	10	17,4±1,94	10,73±2,4	8,9·10 ⁹ ±2,1·10 ⁹
CMM101	pCM1	15	37,3±11,3	21,55±8,45	4,2·10 ⁹ ±1,0·10 ⁹
CMM100	-	-	45,6±7,89	23,27±6,6	3,1·10 ⁹ ±1,2·10 ⁹
CMM <i>xysA</i>	pCM1,pCM2	9	17,5±3,38	10,42±4,75	6,0·10 ⁹ ±1,2·10 ⁹
CMM <i>xysB</i>	pCM1	14	22,32±9,5	11,25±7,7	3,8·10 ⁹ ±1,2·10 ⁹
CMM <i>pgaA</i>	pCM1,pCM2	11	17,3±6,0	10,32±9,05	1,06·10 ¹⁰ ±1,3·10 ⁹
CMM <i>celB</i>	pCM1	17	36,1±8,17	17,9±7,7	6,6·10 ⁹ ±2,0·10 ⁹
CMM <i>endX</i>	pCM1	20	39,2±10,8	20,53±9,7	5,9·10 ⁹ ±2,1·10 ⁹
CMM <i>endXY</i>	pCM1	19	38,1±10,3	18,12±6,8	4,63·10 ⁹ ±1,5·10 ⁹

^a WI: Welkeindex, der Zeitraum in Tagen, an dem 50% der infizierten Pflanzen eindeutige Symptome aufweisen. ^b Größe: Sprosslänge; Gewicht: Frischgewicht. Mittelwerte aus 60 Pflanzen. ^c Titer: Mittelwerte von 12 Pflanzen mit Standardabweichung von arithmetischem Mittel.

Die Ergebnisse der Pflanzentests sind in der Tabelle 1 zusammengefasst und zeigen, dass alle getesteten Mutanten die Tomate mit hohem Titer kolonisieren und die für *Cmm* typische Blattwelke hervorrufen. Die mit den *xysA*- bzw. *pgaA*-Mutanten infizierten Pflanzen lagen mit Welkeindices von 9 bzw. 11 Tagen sehr nah an dem von NCPPB382 (WI 10) und waren auch in anderen untersuchten Parametern wie Gewicht, Größe und Bakterientiter gut vergleichbar mit dem Kontrollstamm. Auch das Welkediagramm (Abb. 8), in dem die Anzahl welkender Pflanzen der *xysA*-Mutante und des Kontrollstammes NCPPB382 gegen die Zeit aufgetragen sind, zeigt exemplarisch für beide Mutanten deren unveränderte Pathogenität, die sich in einer ähnlich hohen Anzahl von Pflanzen mit Symptomen ähnlicher Intensität widerspiegelt.

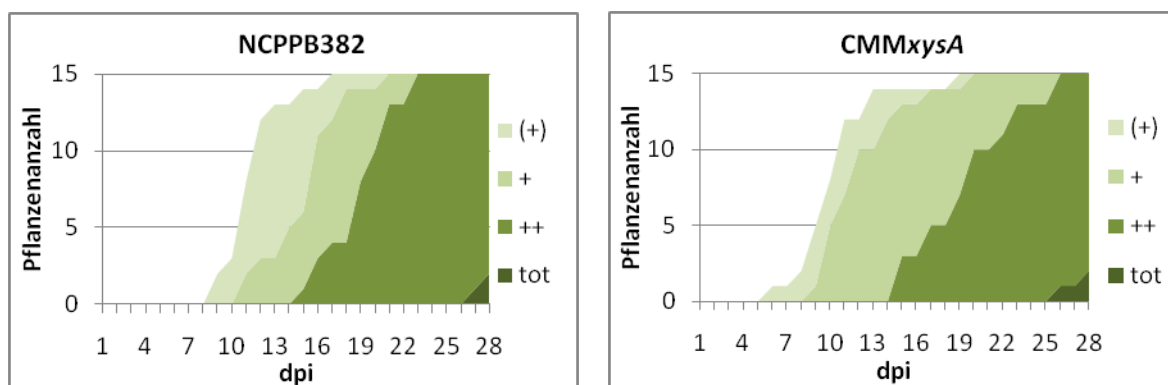


Abb. 8. Welkediagramme der Stämme NCPPB382 und CMM*xysA*, in denen die Anzahl welkender Pflanzen gegen die Zeit aufgetragen ist (n=60).

Die angegebenen Mittelwerte für Gewicht und Größe weisen zum Teil große Standardabweichungen auf, die einerseits auf unterschiedlich starker Symptomausprägung innerhalb eines Tests und andererseits auf Unterschieden zwischen den beiden Pflanzentests basieren, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt wurden.

Die übrigen Mutanten entsprachen vom Plasmidstatus CMM101, sie enthalten nur pCM1. Bei den Stämme mit inaktiviertem *xysB* bzw. *celB* wichen die Welkeindices von 14 und 17 Tagen nicht signifikant vom dem des Kontrollstammes (WI 15) ab. Währenddessen wiesen die beiden Mutanten mit defekten *endX*- bzw. *endXY*-Genen eine Abweichung des WI von 5 bzw. 4 Tagen auf. Obwohl diese Daten aufgrund der geringen Pflanzenanzahl statistisch nicht abgesichert sind, scheint die Deletion mindestens einer der putativen Endoglukanasen sich negativ auf die Ausprägung der Welkesymptome auszuwirken. Allerdings scheint sich dieses verzögerte Auftreten der Welkesymptome weder auf den Bakterientiter noch das Gewicht oder Größe der Pflanzen auszuwirken. Alle Mutanten, die nur CeaA als Pathogenitätsdeterminante tragen, erreichten in der Pflanze einen mit dem Kontrollstamm vergleichbar hohen Titer, der im Bereich von 10^9 Bakterien/g Pflanze lag. Auch beim Gewicht und der Größe gab es lediglich bei dem Stamm CMM*xysB* einen geringen Unterschied zum Kontrollstamm, der aber nicht signifikant ist. Dies zeigt auch das Welkediagramm (Abb. 9), das wieder exemplarisch für das Virulenzverhalten aller Mutanten mit nur einem Plasmid (pCM1) steht und nur sehr geringe Unterschiede in der Anzahl der welkenden Pflanzen an bestimmten Tagen aufweist.

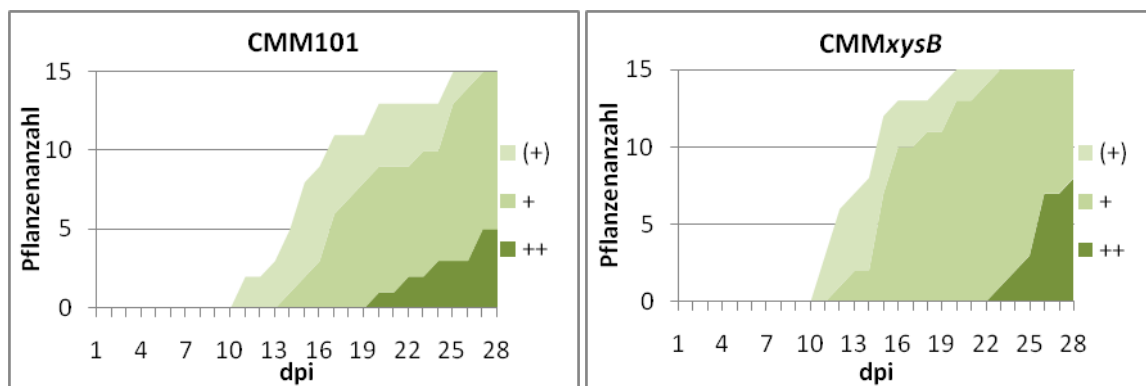


Abb. 9. Welkediagramme der Stämme CMM101 und CMM*xysB*, in denen die Anzahl welkender Pflanzen gegen die Zeit aufgetragen ist (n=60).

Während die um 5 Tage verzögerte Welke der *endX*-Mutante mit Sicherheit auf die Deletion des *endX*-Gens zurückzuführen ist, lässt sich über die Rolle der Endoglukanase Y in der Pathogenese wenig aussagen, da der durch die *endXY*-Mutation hervorgerufene Effekt ebenfalls auf der Mutation im *endX*-Gen basieren könnte. Außer diesen beiden Mutationen, die einen sehr schwachen Einfluss auf die Pathogenität haben, scheinen die Mutationen in den Genen *xysA*, *xysB*, *pgaA* und *celB* keinen Einfluss auf die Virulenz oder die

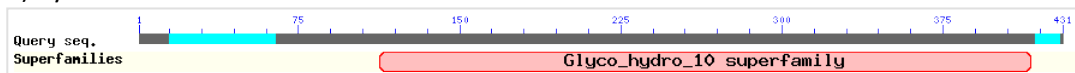
Kolonisationsfähigkeit zu haben. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtung, dass einzelne Hydrolasen in den meisten Pflanzenpathogenen keine wichtigen Virulenzdeterminanten darstellen. Für eine mögliche Rolle der Hydrolasen in der Signaltransduktion heißt das aber auch, dass weder sie selbst noch ihre Produkte von der Pflanze als alleiniges Signal erkannt werden.

Ein Grund für die fehlende Auswirkung der Deletion einzelner Hydrolasen auf die Pathogenität könnte in der Redundanz der sie kodierenden Gene liegen. Dies ist in vielen phytopathogenen Bakterien der Fall, so wurden z.B. in *Erwinia* fünf verschiedene Gene identifiziert, die Pektatlyasen kodieren (Walton, 1994). Daher erscheint es verständlich, dass die Inaktivierung eines einzelnen Gens in den meisten Fällen keine Auswirkung auf das Virulenzverhalten dieser Mutanten hat. Doppel- und Mehrfachmutanten, in denen gleichzeitig alle/mehrere Gene eines Enzymtyps ausgeknockt sind, könnten zukünftig eine Alternative sein, die Bedeutung dieser Enzyme für die Pathogenität von *Cmm* zu bestimmen.

4. Nachweis des Xylanabbaus durch die *Cmm*-Xylanasen A und B

Xylan ist ein heterogenes, weit verbreitetes Polysaccharid, das zu den Hemicellulosen gehört. Xylane kommen in allen Landpflanzen vor und sind nach der Cellulose das zweithäufigste Polysaccharid in der Natur. In *Cmm* konnten mindestens drei hypothetische am Abbau von Xylan beteiligten Proteine vorhergesagt werden. Die beiden putativen Endo- β -1,4-Xylanasen A (CMM_1673) und B (CMM_1674), und die Acetylxylanesterase (CMM_2688), die die Hydrolyse der Haupt- und Seitenketten katalysieren könnten. Die Endo- β -1,4-Xylanasen A und B sind auf dem Chromosom benachbart lokalisiert. Da am Ende beider Gene eine potentielle Terminationssequenz zu finden ist, werden die Gene wohl unabhängig voneinander transkribiert. Die Endo- β -1,4-Xylanase A ist ein 46 863 kDa großes Protein mit 431 AS, das ein putatives Signalpeptid aufweist, und daher wahrscheinlich extrazellulär lokalisiert ist. Das Proteins besteht aus nur einer katalytischen Dömane (Glykosylhydrolase Familie 10; Abb. 10A).

A) XysA



B) XysB



Abb. 10. Konservierte Domänen der XysA und XysB-Proteine aus *Cmm*.

Die Endo- β -1,4-Xylanase B ist ein 71 305 kDa großes Protein mit 669 AS, das aus drei verschiedenen Domänen zusammengesetzt ist: einer Kohlenhydratbindedomäne (Carbohydrate binding domain, CBM), einer Glykosylhydrolasen Domäne Familie 10 und einer HYR („hyalin repeat“)-Domäne, die nach dem Protein Hyalin benannt ist und wahrscheinlich in die Zelladhäsion involviert ist (Abb. 10B). Um zu überprüfen, ob *Cmm* überhaupt in der Lage ist, auf Xylan zu wachsen, wurden *Cmm*-Stämme in Flüssigmedium (M9-Minimalmedium ohne Glukose mit Xylan als einziger C-Quelle) angezogen. Allerdings zeigten alle drei Stämme (NCPB382, CMMxysA und CMMxysB) ein ziemlich schlechtes Wachstum (Abb. 11A). Während die Stämme NCPB382 und CMMxysA nach einer langen lag-Phase wenigstens die o. D.₅₈₀ von 0,6 bzw. 0,8 erreichten, wuchs CMMxysB gar nicht. Erst durch die Zugabe geringer Mengen von Hefeextrakt (0,05%) und Glukose (0,01%) wurde bei allen drei Stämmen eine Verbesserung des Wachstums erreicht (Abb. 11B). Alle Stämme wuchsen besser und erreichten höhere o.D.₅₈₀-Werte, sind also anscheinend fähig, Xylan abzubauen.

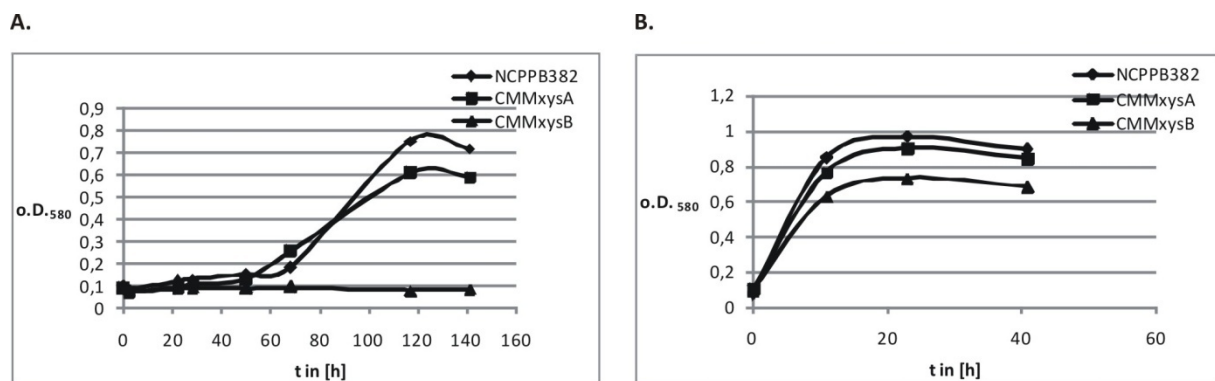


Abb. 11. Wachstum der Xylanase-Mutanten CMMxysA und CMMxysB im Vergleich zu NCPB382. **A.** M9-Minimalmedium ohne Glukose und Hefe, supplementiert mit 0,15% Xylan („oat spelts“) **B.** M9-Minimalmedium supplementiert mit 0,15% Xylan („oat spelts“), 0,01% Glukose und 0,05% Hefe.

Anschließend erfolgte ein Aktivitätsnachweis für die Xylanasen von *Cmm* mittels Agarplattentests, in denen die Bakterien auf Minimalmedium mit dem zu testenden Polysaccharid Xylan (aus Haferspelzen) angezogen wurden. Es wurde hierzu das mit Glukose und Hefe supplementierte M9-Minimalmedium, dem noch 0,15 % Xylan beigefügt wurden, verwendet. Nachdem die Kolonien gut angewachsen waren, wurden die Platten mit Kongorot gefärbt. Da dieser Farbstoff das nicht degradierte Substrat anfärbt, wird der Xylanabbau durch das Auftreten von klaren Höfen um die Kolonien herum erkennbar.

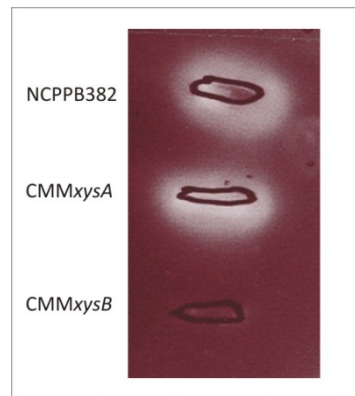


Abb. 12. Xylanaseproduktion verschiedener *Cmm*-Stämme. Durch die schwarzen Ovale ist Ausbreitung der Kolonien markiert. Die *xysB*-Mutante zeigt nur eine sehr schwache, schlecht zu erkennende Aufklärung.

Kolonien des Wildtypstammes NCPP382 und der *xysA*-Mutante sind nach 4 Tagen Wachstum von deutlichen klaren Höfen umgeben, während bei der *xysB*-Mutante nur ein kleiner, sehr schwacher Hof auftrat (Abb. 12). Diese Aufklärung liefert den Beweis, dass alle drei Stämme Xylanaseaktivität aufweisen. Während der Substratabbau bei dem Wildtyp und der *xysA*-Mutante etwa gleich stark ist, fällt er bei der *xysB*-Mutante sehr gering aus. Sowohl der Plattentest als auch der Wachstumstest in Flüssigkultur zeigen deutlich, dass die Deletion des *xysB*-Gens im Vergleich zu der des *xysA*-Gens einen drastischeren Effekt für das Wachstum der Mutante auf Xylan hervorruft.

Zur weiteren Charakterisierung der Xylanasen wurden alle extrazellulären Proteine aus Kulturüberständen isoliert und auf ihre Aktivität in einem Zymogram untersucht. Um sicherzustellen, dass die Xylanasen exprimiert werden, erfolgte die Anzucht der zu testenden Stämme NCPPB382, CMM*xysA* und CMM*xysB* in M9-Minimalmedium, das mit Xylan (0,15%), Hefe (0,05%) und Glukose (0,01%) supplementiert wurde. Zur Proteinisolierung aus dem Überstand wurde die Ammoniumsulfatfällung (80 %) eingesetzt, eine Methode, bei der die biologische Aktivität der Proteine erhalten bleibt. Um die Xylanaseaktivität zu lokalisieren, wurden die Proteingemische in einem SDS-PAGE, in dem das Xylan mit einer Konzentration von 0,15% mit Acrylamid copolymerisiert wurde, aufgetrennt. Es wurden parallel zwei gleiche SDS-Gelelektrophoresen durchgeführt. Während das eine Gel zur Visualisierung aller Proteine mit Coomassie Blue angefärbt wurde, diente das zweite als Zymogram und wurde zum Nachweis des Substratabbaus mit Kongorot angefärbt.

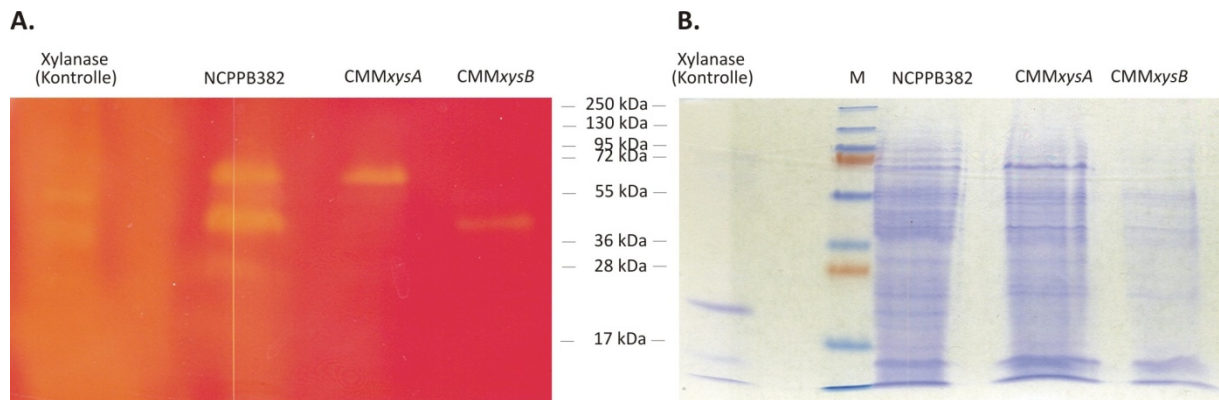


Abb. 13. Nachweis der Xylanaseaktivität von CMMxysA, CMMxysB im Vergleich mit NCPPB382 auf mit Xylan (0,15%) supplementiertem M9-Medium. (A) Zymogram, (B) Coomassie-Gel, aufgetragen wurden jeweils 250-350 µg Protein.

In dem in Abb. 13 dargestellten Zymogram ist in der ersten Spur als positive Kontrolle die Endo- β -1,4-Xylanase Xyn2 aus *Trichoderma viride* aufgetragen, gefolgt von den extrazellulären Proteinen des Wildtyps NCPPB382 und den Mutanten CMMxysA und CMMxysB. Der Wildtyp zeigt zwei klare Banden, die beiden Mutanten jeweils nur eine Bande. Die größere Bande von etwa 70 kDa entspricht der Xylanase B und wird nur in der xysA-Mutante gebildet. Die kleinere Bande, mit einer Größe zwischen 36 und 55 kDa, repräsentiert die Xylanase A (46 kDa) und wird nur von der xysB-Mutante produziert. In allen drei Spuren waren zusätzliche weitere schwache Aufhellungen zu erkennen, die auf einen Xylan-Abbau durch andere Proteine schließen lassen (in Abb. 13 kaum zu erkennen). Eines dieser Proteine könnte die Tomatinase von *Cmm* sein, die neben Tomatin, ihrem eigentlichen Substrat, auch Xylan in geringen Mengen umsetzen kann (Kaup, 2009). Sowohl die Agarplattentests als auch das Zymogram bestätigen die Annahme, dass es sich bei den inaktivierten Proteinen tatsächlich um zwei verschiedene aktive Xylanasen handelt, die von *Cmm* synthetisiert und in den Kulturüberstand sekretiert werden. Allerdings zeigen die Wachstumstests in Flüssigkultur wie auch die Agarplattentests, dass die Mutation des xysB-Gens einen im Vergleich zur xysA-Mutation drastischeren Effekt auf das Wachstum der Mutante hat. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass zwar beide Xylanasen in der Lage sind, das verwendete Xylan abzubauen, aber nur XysB hat eine Substratbindedomäne, die möglicherweise zu einer höheren Aktivität führt, wenn hochmolekulare Substrate vorliegen. Von allen drei untersuchten Stämmen zeigt der Wildtypstamm NCPPB382 das beste Wachstum auf Xylan als C-Quelle und bestätigt damit die Theorie, dass der komplette Abbau und die damit verbundene bessere Verwertung von Xylan einer konzentrierten Aktivität mehrerer verschiedener Xylanasen bedarf.

B. Analyse des Exoproteoms von *Cmm* mittels 2D-Gelelektrophorese

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* geht mit seiner Wirtspflanze Tomate eine kompatible Wirt-Pathogen-Interaktion ein, an der mehrere bereits bekannte Virulenzfaktoren beteiligt sind. Eine besondere Rolle in der Wechselwirkung zwischen dem Wirt und dem Pathogen wird den Oberflächen- und den in das extrazelluläre Medium sekretierten Proteinen zugeschrieben. Diese Proteine können aufgrund ihrer Lokalisation für die Penetration, Kolonisation und Ausbreitung des Pathogens im Wirt verantwortlich sein oder das Pathogen vor der Wirtsabwehr oder auch anderen in der Umgebung lokalisierten Bakterien schützen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher umfangreiche Exoproteomstudien durchgeführt, um das Exoproteom von *Cmm* unter verschiedenen (Anzucht- und Umwelt-)bedingungen zu inventarisieren. Mit Hinblick auf die Pathogenität lag der Fokus vor allem auf der Identifizierung neuer Kandidatengene, deren Genprodukte sekretiert werden und die potentielle Virulenzfaktoren darstellen könnten. Diese Faktoren könnten dann gezielt auf ihre Rolle in der Pathogenität näher untersucht werden.

Eine gute Möglichkeit mehrere hundert Proteine aufzutrennen und gleichzeitig sichtbar zu machen, bietet die zweidimensionale Gelelektrophorese. In Kombination mit massenspektrometrischer Analyse erlaubt sie bei bekannter Genomsequenz die Identifizierung jedes einzelnen Proteins in einem komplexen Proteingemisch. Beide Techniken kamen zum Einsatz, um das extrazelluläre Proteinexpressionsmuster von *Cmm* unter verschiedenen Bedingungen zu analysieren. Durch Variationen der Anzuchtbedingungen wie Probenentnahme in verschiedenen Wachstumsphasen und Verwendung unterschiedlicher Medien sollte der Einfluss dieser Faktoren auf die Expression der extrazellulären Proteine analysiert werden. Um die Expression extrazellulärer Proteine direkt während der Infektion zu verfolgen, wurde zusätzlich das Exoproteom aus dem Xylemsaft infizierter Tomaten analysiert und mit dem der nicht infizierten Kontrollpflanzen verglichen (siehe Kap. D). Solche Analysen erlauben einen Einblick in die molekularen Vorgänge während der Infektion sowohl von der Seite des Pathogens als auch des Wirts.

Allerdings können nicht alle Proteine gleichzeitig in einem 2D-Gel dargestellt werden, so dass die Rückschlüsse, die man aus den Vergleichen der Exoproteommuster zieht, nur Hinweise auf die eventuelle Beteiligung dieser Faktoren an der Pathogenität darstellen und weiter untersucht werden müssen.

1. Einteilung der *Cmm*-Gene in funktionelle Gruppen

Die Sequenzierung und Annotation des *Cmm* Genoms führten zur Identifizierung von 3080 Protein-kodierenden Genen, deren Genprodukte für die Auswertung von Mikroarray-Daten aufgrund der vorhergesagten biologischen Funktion in 5 verschiedene Hauptgruppen eingeteilt wurden (Flügel, 2010). Als Basis für die Eingruppierung dienten die COG-Gruppen, wobei jedes Gen nur einer funktionellen Gruppe zugeteilt wurde. Ca. 70 % (2210 Gene) aller *Cmm*-Gene konnten den COG-Hauptgruppen „Metabolismus“, „Zelluläre Prozesse“, Informationsspeicherung und -prozessierung“ sowie der Gruppe „Schlecht charakterisiert“, die Gene mit unbekannter bzw. genereller Funktion umfasst, zugeordnet werden (Tab. 2).

Tab. 2. Vereinfachte funktionelle Gruppeneinteilung aller 3080 manuell annotierter Protein-kodierender Gene in *Cmm*. Die Gruppe „hypothetische Proteine“ enthält zusätzlich 108 in der manuellen Annotation verworfenen ORFs und 39 Pseudogenfragmente.

Haupt-/Untergruppe	Anzahl
I. Metabolismus	578
I.1 Energie-, Kohlenstoffmetabolismus → 12 Untergruppen	212
I.2 Aminosäuren → 4 Untergruppen	134
I.3 Nukleotide → 3 Untergruppen	60
I.4 Lipide → 3 Untergruppen	47
I.5 Coenzyme → 11 Untergruppen	83
I.6 Sekundärmetabolismus → 4 Untergruppen	42
II. Zelluläre Prozesse	177
II.1 Zellzyklus → 2 Untergruppen	34
II.2 Zellwand → 4 Untergruppen	143
III. Informationsspeicherung und -prozessierung	277
III.1 Replikation → 9 Untergruppen	116
III.2 Transkription → 2 Untergruppen	24
III.3 Translation → 5 Untergruppen	137
IV. Potentiell relevant für die phytopathogene Interaktion	921
IV.1 Transporter → 5 Untergruppen	393
IV.2 Proteintransport → 3 Untergruppen	61
IV.3 Regulatoren → 8 Untergruppen	288
IV.4 Stress → 6 Untergruppen	36
IV.5 Resistenz → 8 Untergruppen	60
IV.6 extrazelluläre Enzyme → 3 Untergruppen	44
IV.7 intrazelluläre Proteasen → 4 Untergruppen	39
V. Schlecht/kaum charakterisiert	1286
V.1 generelle Funktionszuordnung → 7 Untergruppen	244
V.2 Funktion unbekannt → 3 Untergruppen	1042

Die vier COG-Hauptgruppen wurden für *Cmm* um eine weitere wichtige Hauptgruppe ergänzt, in der alle Gene zusammengefasst sind, denen potentiell eine Rolle in der pathogenen Interaktion von *Cmm* mit der Tomate zugeschrieben wird, darunter auch einige wenige, für die eine Beteiligung durch Experimente belegt ist (Flügel, 2010). Diese als „Potentiell relevant für die phytopathogene Interaktion“ bezeichnete Gruppe umfasst 921 Gene, die in die Untergruppen „Transporter“, „Proteintransport“, „Regulatoren“, „Stress“, „Resistenz“, „Extrazelluläre Enzyme“ und die „Intrazellulären Proteasen“ unterteilt werden. Vor allem die extrazellulären Enzyme sowie Substratbindepoteine einzelner Transporter könnten an der Interaktion mit dem Wirt beteiligt sein und sollten im Zellüberstand zu finden sein.

2. Proteinsekretion von *Cmm* NCPPB382 in M9-Minimalmedium

Die ersten Exoproteomanalysen wurden im Minimalmedium (M9) durchgeführt, das neben Glukose als einziger Kohlenstoffquelle die für das Wachstum von *Cmm* essentiellen Aminosäure Methionin und Vitamine Thiamin und Nicotinamid enthält. Zellfreie Kulturüberstände von NCPPB382 wurden aus der logarithmischen (25h), spät-logarithmischen (48h) und der stationären (92h) Phase gesammelt, bei -80°C eingefroren und lyophilisiert. Um das EPS, das von *Cmm* in hohen Mengen produziert wird und die isoelektrische Fokussierung stört, zu entfernen, wurden die Lyophilisate phenolisiert und das in der Phenolphase gelöste Protein mit einem Ammoniumacetat/Methanol-Gemisch gefällt. Aus einem Liter zellfreien Kulturüberstand konnten so in der Regel 800-1000 µg Protein isoliert werden. Um die Expressionsprofile unterschiedlicher Proben miteinander vergleichen zu können, wurden standardmäßig 800 µg Protein pro 2D-Gel eingesetzt. Die Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension erfolgte mittels isoelektrischer Fokussierung auf 18 cm langen „Immobiline Dry Strips“ unterschiedlicher linearer pH-Gradienten nach einem festen Protokoll und dauerte bis zu 28 Stunden. Nach der Auftrennung in der zweiten Dimension in 20 cm x 20 cm großen 12,5% SDS-Gelen wurden die Proteine mit Coomassie Brilliant Blau G-250 (CBB G-250) angefärbt und für weitere Analysen ausgeschnitten. Die Bestimmung der Masse einzelner Peptide Trypsin-verdauter Proteine mittels MALDI-TOF-MS und der Abgleich dieser mit den Massen eines theoretischen Trypsin-Verdauers der Proteine in der NCPPB382 Datenbank führte zur Identifizierung der aufgetrennten Proteine. Proteine mit einem Score über 47 gelten mit 95% Wahrscheinlichkeit als sicher identifiziert, dabei wurden im Durchschnitt etwa 25-30% des identifizierten Proteins abgedeckt.

Für jede der untersuchten Bedingungen wurden für die Proteinisolierung Überstände von mindestens drei verschiedenen unabhängig angezogenen Kulturen verwendet. Die Auftrennung der Proteine in verschiedenen pH-Bereichen (4-7, 3-10, 6-11) zeigte, dass die

meisten Proteine einen isoelektrischen Punkt zwischen 4 und 7 haben. Aus diesem Grund wurde hauptsächlich dieser pH-Gradient für die Vergleiche der Expressionsprofile eingesetzt. Ein auffälliges Merkmal einer Vielzahl extrazellulärer Proteine von *Cmm* war ihr Erscheinen in nicht nur einem Spot, sondern ganzen Spotreihen, so dass die Zahl der ausgeschnittenen Spots und die Zahl tatsächlich identifizierter Proteine stark voneinander abwichen. Beispielsweise konnten nach der Auftrennung des extrazellulären Proteinextraktes einer logarithmischen bzw. spät-logarithmischen *Cmm*-Kultur aus M9-Minimalmedium im pH-Bereich 4-7 in der Regel 150-200 Spots ausgeschnitten werden, 75% dieser Spots konnte sicher ein Protein zugeordnet werden und resultierte schließlich in der Identifizierung etwa 100 verschiedener Proteine. In der Abb. 14 ist exemplarisch das Exoproteom einer logarithmisch wachsenden Kultur von NCPPB382 in M9-Minimalmedium dargestellt.

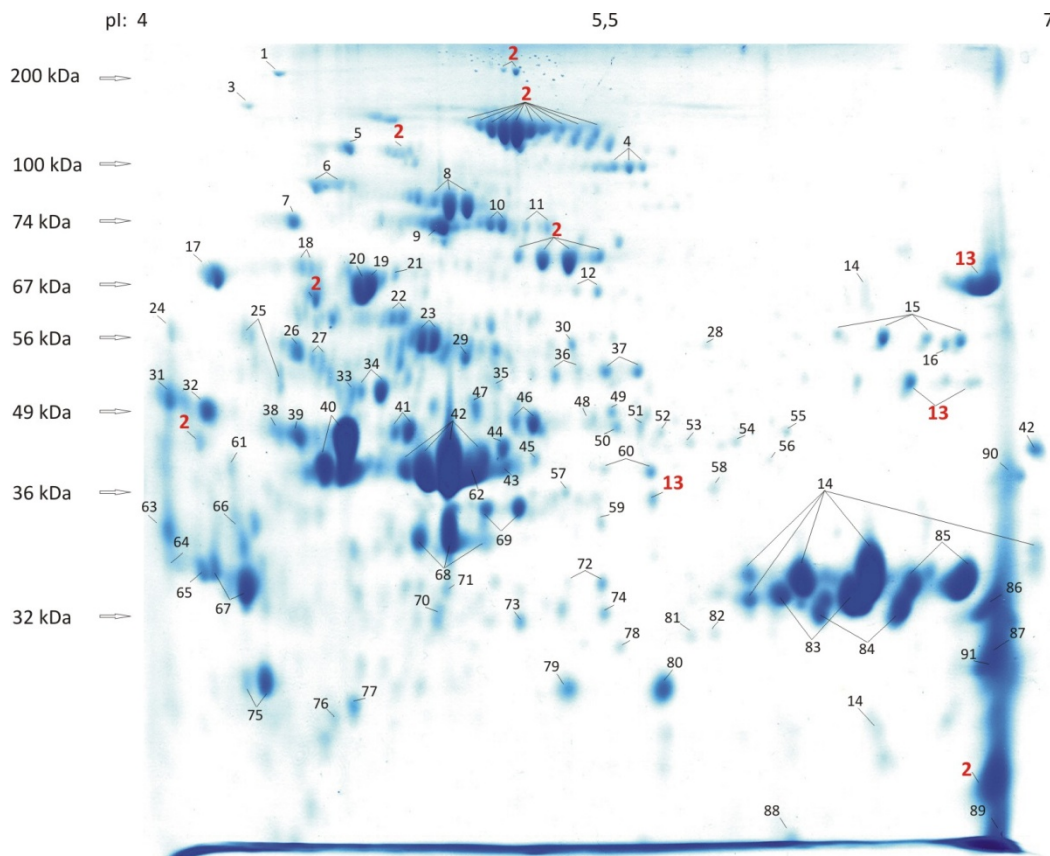


Abb. 14. Das Exoproteom von NCPPB382. Die extrazellulären Proteine wurden nach 25-stündiger Inkubation in M9-Minimalmedium aus dem Kulturüberstand von NCPPB382 isoliert. 800 µg Protein wurden zuerst im pH-Bereich 4-7 isoelektrisch fokussiert und anschließend im 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Färbung mit CBB G-250 wurden 204 Spots ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und mit MALDI-TOF-MS analysiert. 145 Spots konnte ein Protein zugeordnet werden und resultierte in der Identifizierung von 96 verschiedenen Proteinen.

In Tabelle 3 sind die 96 Proteine aufgelistet, die im Kulturüberstand logarithmisch wachsender *Cmm*-Zellen identifiziert werden konnten. Für 51 (53%) dieser Proteine ist ein Signalpeptid vorhergesagt. Die übrigen 45 erfüllen cytoplasmatische Funktionen und sollten

intrazellulär lokalisiert sein. Die extrazelluläre Lokalisation dieser Proteine könnte somit ein Indiz für abgestorbene lysierte Zellen sein (entweder schon in der Anzucht oder während des Aberntens durch Zentrifugation).

Tab. 3. Auflistung von 96 im Exoproteom von *Cmm* NCPPB382 identifizierten Proteine mit den vorhergesagten pIs und MWs sowie der Spotnummerangabe auf dem 2D-SDS-PAGE in Abb. 14.

Spot-Nr.	GenDB-ID	Gen-name	mögliche Funktion	MW _{theoret.}	pI _{theoret.}	Signal-peptid
I. Energie- und Kohlenstoffmetabolismus						
27	CMM_1034	-	Phosphohexomutase	50 095	4,25	-
26	CMM_1736	<i>pgiA</i>	Glucose-6-phosphat-Isomerase	54 787	12,1	-
78	CMM_1742	<i>tpiA</i>	Triosephosphat-Isomerase	27 889	5,08	-
69	CMM_1744	<i>gapA</i>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	35 770	4,81	-
36	CMM_1758	<i>pykA</i>	Pyruvat-Kinase	51 414	4,92	-
70	CMM_0003	<i>gndA1</i>	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	31 622	4,56	-
9	CMM_1734	<i>tktA</i>	Transketolase	74 984	4,61	-
39	CMM_1735	<i>talA</i>	Transaldolase	39 891	4,57	-
30	CMM_1737	<i>zwfA2</i>	Glucose-6-Phosphat-1-Dehydrogenase	57 868	4,93	-
4	CMM_1621	<i>aceE</i>	Pyruvatdehydrogenase E1 Untereinheit	100 939	5,19	-
37	CMM_1642	<i>lpdB</i>	Dihydrolipoyl-Dehydrogenase	48 142	5,18	-
5	CMM_1659	<i>acnA</i>	Aconitathydratase	101 014	4,32	-
49	CMM_2171	<i>gltA2</i>	Citrat-Synthase	48 782	5,23	-
62	CMM_2537	<i>icdA</i>	Isocitrat-Dehydrogenase	45 029	5,28	-
74	CMM_2547	<i>sucD</i>	Succinyl-CoA-Ligase [ADP-bildend], α -Untereinheit	29 939	5,05	-
76	CMM_1842	<i>ctaC</i>	Cytochrome c Oxidase, Untereinheit 2	30 354	4,81	+
28	CMM_2380	<i>prpD</i>	2-Methylcitrat-Dehydratase	54 905	5,51	-
75	CMM_2688	-	Acetyl-Xylan-Esterase	24 142	4,06	-
15	CMM_0049	<i>nagA</i>	β -N-Acetylglucosaminidase	63302	5,95	+
72	CMM_2446	<i>galU</i>	UTP-Glucose-1-Phosphat-Uridyltransferase	32 812	4,99	-
29	CMM_1636	<i>glnA1</i>	Glutaminsynthetase I	52 995	4,67	-
50	CMM_2522	<i>glyA</i>	Serin-Hydroxymethyltransferase (Serin-Methylase) (SHMT)	45 183	5,15	-
59	CMM_1154	<i>thrC</i>	Threonin-Synthase	37 359	5,1	-
48	CMM_1798	<i>aroC</i>	Chorismat-Synthase (5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphat-Phospholyase)	43 058	5,04	-
6	CMM_1457	<i>pepN</i>	Aminopeptidase N	93 642	4,53	-
82	CMM_0989	<i>punA</i>	Purin-Nucleosid-Phosphorylase	28 861	5,46	-
51	CMM_2950	<i>purB</i>	Adenylosuccinat-Lyase	50 581	5,2	-
43	CMM_1616	<i>fabF</i>	3-Oxoacyl-[acyl-carrier-Protein]-Synthase	43 049	4,84	-
II. Zelluläre Prozesse						
11	CMM_0915	<i>pbpC</i>	Penicillin-Bindeprotein	75 440	5,19	+
8	CMM_0919	<i>pbpD</i>	Penicillin-Bindeprotein	84 124	5,01	+
47	CMM_0931	<i>pbpE</i>	D-Alanyl-D-Alanin- Carboxypeptidase	43 874	5,05	+

19	CMM_1865	<i>ftsI</i>	Peptidoglycan-Glycosyltransferase/Penicillin-Bindeprotein	58 579	4,7	+
1	CMM_2169	-	Oberflächenprotein, RTX Toxin	200 894	4,42	+
16	CMM_1022	<i>wcqK</i>	sekretiertes Protein	59 456	6,25	+
57	CMM_1600	<i>gmdA</i>	GDP-Mannose 4,6-Dehydratase	39 012	4,97	-
III. Informationsspeicherung- /Prozessierung						
45	CMM_1383	<i>rpsB</i>	30S ribosomales Protein S2	35 112	4,81	-
22	CMM_1752	<i>rpsA</i>	30S ribosomales Protein S1	53 047	4,51	-
73	CMM_1384	<i>tsf</i>	Elongationsfaktor Ts (EF-Ts)	29 326	4,85	-
46	CMM_2620	<i>tuf</i>	Elongationsfaktor Tu (EF-Tu)	43 371	4,88	-
10	CMM_2621	<i>fusA</i>	Elongationsfaktor G (EF-G)	77 619	4,78	-
IV. Potentiell relevant für phytopathogene Interaktion						
24	CMM_1587	-	Oligopeptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	54 484	4,14	+
25	CMM_1960	-	Peptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	55 020	4,33	+
17	CMM_2185	-	Peptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	63 844	4,26	+
31	CMM_0866	-	α -Glucosid ABC Transporter, Substratbindeprotein	44 897	4,09	+
60	CMM_2485	-	Zucker ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	39 340	5,57	-
64	CMM_1703	- ^b	Glycin/Betain ABC Transporter, Substratbindeprotein	32 046	4,14	+
66	CMM_0363	- ^b	Fe ³⁺ -Hydroxamat ABC Transporter, Substratbindeprotein	34 212	4,31	+
79	CMM_1717	<i>modF</i>	Molybdat ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	28 661	4,98	-
65	CMM_2283	-	Metall ABC Transporter, Substratbindeprotein	27 877	4,14	+
55	CMM_2177	-	mögliche Fe-abhängige Peroxidase	46 262	5,34	-
33	CMM_1831	<i>glpK</i>	Glycerol Kinase	55 485	4,62	-
38	CMM_0560	-	Transkriptionsregulator	37 059	4,47	+
20	CMM_0151	<i>dnaK</i>	Chaperon (Hitzeschockprotein 70)	67 112	4,38	-
23	CMM_2478	<i>groL</i> (<i>groEL</i>)	60 kDa Chaperonin (Protein Cpn60) (GroEL Protein)	56 746	4,62	-
7	CMM_1463	<i>tig</i>	<i>trigger factor</i> (TF) (Prolyl Isomerase, Chaperon)	52 565	4,12	-
12	CMM_0737	<i>katA</i>	Katalase	56 645	5,17	-
86	CMM_0039	<i>chpE</i>	extrazelluläre Serin-Protease, S1A-Familie	26 467	6,77	+
40	CMM_0042/ 0050	<i>ppaB1/ B2</i>	extrazelluläre Serin-Protease	31 593	4,54	+
84	CMM_0044	<i>ppaC</i>	extrazelluläre Serin-Protease	29 676	5,97	+
- ^a	CMM_0052	<i>chpC</i>	extrazelluläre Serin-Protease, SA1-Familie	27 997	7,04	+
83	CMM_0071	<i>ppaE</i>	extrazelluläre Serin-Protease	28 162	5,96	+
85	CMM_0764	<i>ppaF</i>	extrazelluläre Serin-Protease	26 730	6,23	+
68	CMM_1942	<i>ppaG</i>	extrazelluläre Serin-Protease	30 240	4,95	+
61	CMM_1947	<i>ppaH</i> ^b	extrazelluläre Serin-Protease	30 384	4,23	+

32	CMM_1948	<i>ppaI</i>	extrazelluläre Serin-Protease	30 066	4,23	+
3	CMM_2535	<i>sbtB</i>	Subtilisin-ähnliche Serin-Protease, Peptidase-Familie S8A	117 082	4,29	+
2	CMM_2536	<i>sbtC</i>	Subtilisin-ähnliche Serin-Protease, Peptidase-Familie S8A	115 572	5,08	+
14	pCM1_0023	<i>ppaJ</i>	extrazelluläre Serin-Protease	30 812	5,91	+
- ^a	pCM2_0052	<i>phpB</i>	extrazelluläre Serin-Protease	26 123	9,0	+
- ^a	pCM2_0053	<i>phpA</i>	extrazelluläre Serin-Protease	26 673	8,96	+
87	pCM2_0054	<i>pat-1</i>	extrazelluläre Serin-Protease	26 195	7,73	+
21	CMM_0795	-	extrazelluläre Nuclease / Phosphatase	69 417	4,81	+
34	CMM_0840	-	sekretiertes Protein, NPL/P60-Familie	42 458	4,72	+
91	CMM_1480	<i>expA</i>	Expansin	21 700	6,31	+
44	CMM_1673	<i>xysA</i>	Endo-1,4- β -Xylanase A	41 265	5,06	+
- ^a	CMM_2692	- ^b	Endoglukanase	44 147	8,69	+
35	CMM_2871	<i>pgaA</i>	Polygalakturonase	45 359	5,04	+
13	pCM1_0020	<i>celA</i>	Cellulase	72 030	6,29	+
54	CMM_0638	-	Membran-,Metalloendopeptidase, Subfamilie M23B	41 207	5,61	+
41	CMM_0839	-	membrangebundene Metalloprotease	40 463	4,79	+
18	CMM_2819	-	Metallopeptidase, M13-Familie	73 449	4,25	-
80 ^c	CMM_2467	-	Hydrolase	32 470	7,9	-
V. Schlecht/kaum charakterisiert						
58	CMM_0132	- ^b	konserviertes, sekretiertes Protein	41 359	5,47	+
67	CMM_0144	-	konserviertes, sekretiertes Protein	30 251	4,26	+
42	CMM_0338	-	konserviertes, sekretiertes Protein, PBP	40 651	4,96	+
80 ^c	CMM_0429	-	konserviertes, sekretiertes Protein, ? Zelloberflächenprotein	22 951	5,57	+
63	CMM_0466	-	konserviertes, sekretiertes Protein	27 175	3,13	+
52	CMM_1553	-	konserviert hypothetisches Protein, Amidohydrolase	43 996	5,22	-
53	CMM_1807	-	konserviertes hypothetisches Protein, ATPase	45 418	5,32	-
90	CMM_1872	-	konserviert hypothetisches Protein, peptidoglycanbindend	37 369	9,2	+
81	CMM_2664	-	konserviert hypothetisches Protein, ? Trehaloseabbau	27 569	5,44	-
88	CMM_0631	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	12 094	5,64	+
56	CMM_1081	- ^b	hypothetisches, sekretiertes Protein	41 246	5,51	+
77	CMM_1557	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	24 878	4,69	+
89	CMM_1675	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	13 012	8,69	+
71	CMM_2043	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	28 210	5,0	+

-^a: nur im pH-Bereich 3-10, 6-11 sichtbar. -^b: Proteine, die sehr schwache Spots bilden und daher nicht in vergleichende Exoproteomanalysen einbezogen werden. -^c: Spot 80 wurde in unterschiedlichen Gelen unterschiedlich identifiziert.

Die identifizierten Proteine lassen sich in 5 Haupt- und 13 Untergruppen einteilen (Tab. 4). In der ersten Gruppe sind Proteine zusammengefasst, die für den gesamten Zellmetabolismus von Bedeutung sind. Diese Hauptgruppe wird in sechs Untergruppen unterteilt, aus denen

28 Proteine im Kulturüberstand von *Cmm* auftauchen. Es handelt sich hierbei um 20 Proteine, die an intrazellulären Prozessen des Energie- und Kohlenstoffmetabolismus wie Glykolyse, Pentose-Phosphatweg, Citrat-Zyklus und oxidativer Phosphorylierung beteiligt sind und daher nicht ausgeschieden werden sollten. Dennoch wurde für zwei Proteine dieser Untergruppe ein Signalpeptid vorhergesagt. Die putative β -N-Acetylglucosaminidase (NagA, CMM_0049) gehört zu der Familie 3 der Glykosylhydrolasen und katalysiert die Spaltung von β -N-Acetylglucosaminen und β -D-Glukosiden wie z.B. Chitin. In den ersten 35 Aminosäuren des NagA-Proteins wurde ein „twin arginine“-Motiv gefunden, weshalb das Protein möglicherweise über das Tat-Sekretionssystem exportiert wird. Die Untereinheit II der Cytochrom c Oxidase ist eine Komponente der Atmungskette und könnte über das Sec-System ausgeschleust werden. Die anderen 8 Proteine sind am Aminosäuren-, Nukleotid- oder Lipidstoffwechsel beteiligt und enthalten kein erkennbares Signalpeptid für die Sekretion. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass es sich um bioinformatische Signalpeptidvorhersagen handelt, die fehlerhaft sein können.

Die zweite Hauptgruppe umfasst Proteine, die an zellulären Prozessen wie dem Zellzyklus oder der Zellwandbiogenese beteiligt sind. Von den 7 aus dieser Gruppe im *Cmm*-Kulturüberstand identifizierten Proteinen enthalten 6 ein Signalpeptid für die Sekretion über das Sec-System. Es handelt sich um die vier Penicillin-Bindeproteine PbpC, D, E (CMM_0915, 0919, 0931) und FtsI (CMM_1865), die in die Peptidoglycanbiosynthese involviert sind, ein Oberflächenprotein (CMM_2169), das Ähnlichkeiten zu einem RTX-Toxin aufweist, und ein sekretiertes Protein WcqK (CMM_1022), dessen kodierendes Gen im EPS Cluster III liegt, und das am Aufbau von EPSIII beteiligt zu sein scheint.

Aus der Gruppe der Informationsspeicherung und -prozessierung konnten 5 weitere Proteine isoliert werden, die an der Proteintranslation beteiligt sind und alle kein erkennbares Signalpeptid enthalten. Unter diesen sind zwei ribosomale Proteine RpsA und B (CMM_1752, 1383) und drei Elongationsfaktoren EF-Ts, Tu, G (CMM_1384, 2620, 2621).

Die größte Gruppe, mit dem höchsten Anteil an extrazellulären Proteinen bildet die vierte Hauptgruppe, die alle für die phytopathogene Interaktion potentiell relevanten Proteine zusammenfasst. Von den 42 aus dieser Gruppe im *Cmm*-Überstand nachgewiesenen Proteinen sind 32 Proteine (76%) aufgrund des Vorhandenseins eines putativen Signalpeptides für die Sekretion bestimmt. Aus der ersten Untergruppe, die von diversen ABC-Transportern gebildet wird, konnten 11 im Überstand von *Cmm* nachgewiesen werden. Einen Teil dieser Transporter bilden ATP-bindende Proteine und eine Glycerolkinase, die kein Signalpeptid tragen und intrazelluläre Komponenten darstellen sollten. Den größeren Anteil bilden allerdings Substratbindeproteine von ABC-Transportern wie CMM_1587, CMM_1960, CMM_2185 oder CMM_0866, die am Aminosäuren- bzw. am Zuckertransport beteiligt sind. Andere wie CMM_1703 transportieren Bausteine für die Zellwand oder wie CMM_0363 und

CMM_2283 anorganische Ionen. Aus der Untergruppe der Regulatoren konnte der Transkriptionsregulator CMM_0560 nachgewiesen werden, für den ebenfalls ein Signalpeptid vorhergesagt wird. Die nächste Untergruppe bilden Proteine, die für die Stressabwehr zuständig sind. Aus dieser Gruppe konnten eine Katalase KatA (CMM_0737) und drei Proteine DnaK (CMM_0151), GroEL (CMM_2478) und eine Prolyl-Isomerase (CMM_1463) mit Chaperon-Funktion nachgewiesen werden, und obwohl für sie kein Signalpeptid vorhergesagt wurde, werden sie häufig auch in anderen Proteomstudien im extrazellulären Milieu gefunden.

Aus der Untergruppe der extrazellulären Enzyme wurden 22 verschiedene Proteine gefunden, für die alle ein Signalpeptid vorhergesagt wird. Den größten Anteil bilden die 16 Serinpeptidasen, die teilweise in sehr großen Mengen sekretiert werden und der Ppa- bzw. Chp-Familien angehören. Von der Ppa-Familie, die Serinpeptidasen vom Chymotrypsin-Typ kodiert, wurden alle Vertreter (PpaB1/B2, C, E, F, G, H, I, J) außer den Proteinen PpaA und D nachgewiesen. Die Proteine PpaB1/B2 unterscheiden sich in nur zwei Aminosäuren, die sich nach Abspaltung des Signalpeptides im N-terminalen Peptid befinden. Sie können in MALDI-Analysen nicht auseinander gehalten werden, da die Masse des ‚neuen‘ N-terminalen Peptides im theoretischen Verdau nicht vorkommt. Von der Chp-Familie, die sich aus dem Pat-1 Protein, den chromosomal kodierten Homologen ChpA-G sowie den pCM2-kodierten Homologen PhpA und B zusammensetzt, konnten neben Pat-1 und ChpE, die in relativ hohen Mengen sekretiert wurden, ChpC und PhpA, B in relativ geringen Mengen nachgewiesen werden. Außerdem konnten zwei Vertreter der Subtilase-Familie der Serinpeptidasen (SbtB und SbtC), eine extrazelluläre Nuklease/Phosphatase (CMM_0795) und ein sekretiertes Protein der NPL/P60 Familie identifiziert werden. Während SbtB nur einen sehr schwachen Spot bildet, erscheint SbtC in mehreren kräftigen Spots, die aufgrund unterschiedlicher Massen und pI's an verschiedenen Stellen im SDS-PAGE zu finden sind (Abb. 14). SbtC scheint also prozessiert zu werden.

Weiterhin erscheinen im M9-Überstand von *Cmm* mehrere extrazelluläre Enzyme, die am Abbau von Bestandteilen pflanzlicher Zellwände beteiligt sein könnten. Neben der auf pCM1 kodierten essentiellen Virulenzdeterminante CelsA, die in hohen Mengen sekretiert wird, wurden eine Xylanase (XysA), eine Polygalakturonase (PgaA) und eine Endoglukanase (EndY, CMM_2692), deren Substrat noch unbekannt ist, gefunden. Während CelsA, wie bereits bekannt, prozessiert wird (Jahr *et al.*, 2000) und daher an drei verschiedenen Stellen im SDS-PAGE zu finden ist, bilden die anderen Enzyme nur einzelne schwache Spots.

Die letzte Untergruppe der für die Pathogenität potentiell relevanten Proteine bilden eine Hydrolase und drei Metalloproteasen, deren Substrate unbekannt sind, und von denen die Metalloendopeptidase aus der Subfamilie M23B (CMM_0638) und die membrangebundene Metalloprotease (CMM_0839) sekretiert werden sollten.

Tab. 4. Einteilung der von *Cmm* NCPPB382 ins M9-Medium sekretierten Proteine nach Haupt- und Untergruppe (nach 25h).

Haupt-/Untergruppe	Anzahl der Proteine (mit SP)	Proteinname
I. Metabolismus		
I.1 Energie- und Kohlenstoffmetabolismus	20 (2)	NagA, CtaC
I.2 Aminosäuren	5 (0)	
I.3 Nukleotide	2 (0)	
I.4 Lipide	1 (0)	
II. Zelluläre Prozesse		
II.2 Zellwand	7 (6)	PbpC, D, E, WcqK, FtsI, CMM_2169
III. Informationsspeicherung und -prozessierung		
III.3 Translation	5 (0)	
IV. Potentiell relevant für die phytopathogene Interaktion		
IV.1 Transporter	11 (7)	CMM_0363, CMM_0866, CMM_1587, CMM_1703, CMM_1960, CMM_2185, CMM_2283
IV.3 Regulatoren	1 (1)	CMM_0560
IV.4 Stress	3 (0)	
IV.5 Resistenz	1 (0)	
IV.6 extrazelluläre Enzyme	22 (22)	ChpC,E, PpaB1/B2,C, E, F, G, H, I, J, SbtB,C, CMM_0795, CMM_0840, ExpA, XysA, CMM_2692, PgaA,CelA, PhpA/B, Pat-1
IV.7 intrazelluläre Proteasen	4 (2)	CMM_0638, CMM_0839
V. Schlecht / kaum charakterisiert		
V.2 Funktion unbekannt	14 (11)	CMM_0132, CMM_0144, CMM_0338, CMM_0429, CMM_0466, CMM_0631, CMM_1081, CMM_1557, CMM_1675, CMM_1872, CMM_2043

Der letzten Hauptgruppe wurden Proteine zugeordnet, die schlecht oder kaum charakterisiert sind. Im Überstand von *Cmm* wurden 14 dieser konserviert hypothetischen oder hypothetischen sekretierten Proteine identifiziert, von denen 11 Signalpeptid-abhängig sekretiert werden sollten. Außer CMM_0144, CMM_0338 und CMM_0429 erscheinen diese Proteine in schwachen bis sehr schwachen Spots.

Von den 96 im Kulturüberstand von *Cmm* identifizierter Proteine erfüllen 45 (47%) cytoplasmatische Funktionen und weisen kein Signalpeptid auf. Sie sollten daher eigentlich nicht ausgeschieden werden. Es zeigen sich deutliche Unterschiede in den Spotintensitäten dieser Proteine. Während die meisten nur sehr schwache Spots bilden, das eventuell ein Indiz für die Zelllyse sein könnte, sind andere mengenmäßig stärker vertreten und zeigen zu den Spots der hypothetisch sekretierten Proteine ähnlich hohe Intensitäten. Im Vergleich zu anderen cytoplasmatischen Proteinen sind die beiden Elongationsfaktoren EF-Tu, EF-G (CMM_2620, 2621), die drei Chaperone DnaK (CMM_0151), GroEL (CMM_2478) und TigA

(CMM_1463), die Acetylxylanesterase (CMM_2688) und ein zentrales Enzym der Glykolyse, die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, CMM_1744) in höheren Mengen im *Cmm*-Überstand vorhanden. Obwohl diese Proteine auch in Überständen anderer Bakterien aufgefunden werden konnten (Bendtsen *et al.*, 2005), ist die Art ihrer Sekretion noch nicht geklärt. Entweder werden sie auf einem noch unbekanntem Weg sekretiert oder sie gelangen durch die während der Probenaufbereitung unvermeidbare Zelllyse nach außen.

Um abzuschätzen, ob diese Proteine in größerem Maße durch Zelllyse nach außen gelangt sind, wurde auch das intrazelluläre Proteom untersucht und die Spotintensitäten mehrerer sowohl in intrazellulären als auch extrazellulären Proteomen detektierter cytoplasmatischer Proteine verglichen (Daten nicht gezeigt). Der Vergleich beider Proteome einer Probe ergab, dass cytoplasmatische Proteine, die intrazellulär in hohen Mengen vorliegen auch häufiger und in größeren Mengen im Exoproteom nachgewiesen werden konnten, während andere mit Spots mittlerer bis schwacher Intensität überhaupt nicht nachweisbar waren. Diese Tatsache spricht für die Zelllyse, während der die intrazellulär überrepräsentierten Proteine nach außen gelangen. Der Vergleich der Mengenverhältnisse cytoplasmatischer Proteine in drei verschiedenen Proben zeigte Abweichungen in den extrazellulären Mengen dieser Proteine in unterschiedlichen Proben, obwohl sie intrazellulär gut vergleichbar waren. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass die Zelllyse während der Aufbereitung der Zellen (vor allem beim Zentrifugationsschritt) und nicht schon bei der Anzucht stattfindet. Eine eventuell auftretende Lyse während der Kultivierung sollte dagegen Zeit-abhängig sein, je älter die Kultur, desto mehr lysierte Zellen. In der Mehrzahl der Gele sind mengenmäßig nur sehr wenig cytoplasmatische Proteine im Exoproteom vorhanden, wahrscheinlich durch eine geringe Anzahl lysierter Zellen während der Kultivierung verursacht. Allerdings treten in einzelnen Gelen hohe Mengenanteile an cytoplasmatischen Proteine auf, so dass in diesen Fällen von einer Lyse größerer Zellmengen während der Aufarbeitung ausgegangen werden muss (Daten nicht gezeigt).

Exoproteomanalysen von *Cmm*-Kulturen aus logarithmischen und spät-logarithmischen Phasen nach 25-bzw. 48-stündiger Anzucht in M9-Minimalmedium zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Proteingehalts. Alle bereits nach 25h identifizierten extrazellulären und cytoplasmatischen Proteine lagen auch nach 48h in vergleichbar hohen Mengen vor. In der stationären Phase dagegen nach 92h ließen sich außer dem ABC-Transporter (CMM_2283) und den Peptidasen PpaB1/B2 und SbtC keine extrazellulären Proteine mehr nachweisen. Die Produktion extrazellulärer Proteine ist also in der stationären Phase reprimiert. Allerdings blieb die Anzahl an cytoplasmatischen Proteinen ähnlich wie bei logarithmischen Zellen, während die Menge der jeweiligen Proteine leicht anstieg. Eine Lyse

von *Cmm* bereits während der Anzucht findet also statt, aber wohl nicht in größeren Mengen.

In der Regel stimmten die tatsächlichen 2D-SDS-PAGE Koordinaten der meisten identifizierten Proteine gut mit den theoretisch kalkulierten Werten für Molekulargewicht (MW) und isoelektrischen Punkt (pI) überein. Allerdings konnte auf jedem Gel eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, deren tatsächliche pI/MW-Werte von den theoretischen so signifikant abwichen, dass posttranslationale Modifikationen dieser Proteine anzunehmen sind. Im Allgemeinen fielen diese Proteine in zwei Kategorien: (1) mehrere hintereinander angeordnete Spots (Spotreihen) gleicher Masse, aber unterschiedlicher isoelektrischer Punkte oder (2) ein/mehrere Spots mit geringerer Masse und auch anderen isoelektrischen Punkten als erwartet.

Modifikationen der ersten Kategorie können auf kovalenter Bindung funktioneller geladener Gruppen (z.B. Phosphat, Acetat) an das Protein basieren. Dieses Auftreten von Spotreihen konnte bei den meisten extrazellulären Proteinen beobachtet werden und fiel bei den Serinpeptidasen der Ppa-Familie, außer Ppal und H, bei den Penicillin-Bindeproteinen PbpC und D, der Subtilase SbtC, Cella, NagA, CMM_0338 und GroEL am deutlichsten auf. Während die meisten dieser Proteine zwischen zwei und vier Spots in einer Reihe bildeten, wurde die Subtilase (SbtC, Spot Nr. 2, Abb. 14) in bis zu 7 und mehr Spots einer Reihe nachgewiesen. Diese hohe Anzahl an Spots, die in einem sehr engen pH-Bereich (5,1-5,4) aufgetrennt werden, ist möglicherweise nicht nur eine Folge von Modifikationen durch Anfügen geladener Gruppen, sondern kann ein Artefakt der isoelektrischen Fokussierung darstellen.

In die zweite Kategorie fallen Proteine, die proteolytisch prozessiert wurden und daher in Spots unterschiedlicher Masse und pI identifiziert werden konnten. Diese Art der Modifikation konnte bei der pCM1-kodierten Pathogenitätsdeterminante Cella und der Subtilase (SbtC) beobachtet werden (in Abb. 14 rot markiert). Von der Cellulase A ist bekannt, dass sie aus drei Domänen aufgebaut ist (Jahr, 2000). einer Cellulase-Domäne, einer Cellulose-Bindedomäne (CBD II) und einer Expansin-Domäne. Neben der Form, die alle drei Domänen aufweist und als einzige kristalline Cellulose abbauen kann, konnten im Kulturüberstand von *Cmm* NCPPB382 zwei weitere kleinere Formen, die entweder nur aus der Cellulase-Domäne oder der Cellulase und der CBD II-Domänen bestehen, nachgewiesen werden (Jahr, 2000), was auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt wurde (s. Abb. 14, S.75; Spot 13 ist Cella).

Die Subtilase SbtC von *Cmm* gehört zu der Familie der Subtilisine. Dies sind Serinpeptidasen, die Signalpeptid-abhängig als Prä-Pro-Proteine über die Cytoplasmamembran transloziert und durch Autoproteolyse des Propeptides (Inhibitors) in ihre aktive Form überführt werden (Power *et al.*, 1986). Neben dem Signal- und dem Propeptid (das als Inhibitor und Chaperon fungiert) besteht SbtC von *Cmm* aus einer konservierten Peptidase-Domänen, die von einer

Peptidase-assoziierten Domäne (PA) unterbrochen wird, und einer C-Terminalen Fibronectin-ähnlichen Bindedomäne (FN) (Abb. 15). Diese Domänen treten auch in den homologen Subtilasen aus Tomate auf. Zusätzlich besitzen die *Cmm*-Subtilasen eine weitere C-terminale Domäne unbekannter Funktion von 100-300 AS, die in den pflanzlichen Homologen fehlt. Zwischen den Domänen könnten proteolytische Prozessierungen stattfinden, die zu 8 möglichen Proteinvarianten führen können.

Die Detektion der SbtC an mindestens sieben verschiedenen Positionen im SDS-PAGE (200 kDa/ pI 5,2; >120 kDa/pI 5,1-5,4; 110 kDa/pI 4,8-4,9; 74 kDa/pI 5,3-5,5; 65 kDa/pI 4,6; 48 kDa/pI 4,2; 15 kDa/pI 6,9) bekräftigt ihre proteolytische Prozessierung (s. Abb. 14, S.75; Spot 2 repräsentiert SbtC).

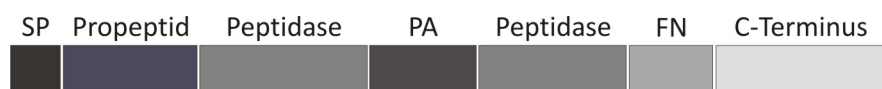


Abb. 15. Domänenstruktur der SbtC von *Cmm*.

Wenn man allerdings die Verteilung aus den experimentell ermittelten Massen vorhergesagter Peptide über das gesamte SbtC-Protein betrachtet, war keine stimmige Zuordnung der verkürzten Proteinformen z.B. zu einer Form ohne die C-terminale Domäne oder ohne das Propeptid möglich (Daten nicht gezeigt).

3. Proteinsekretion von NCPPB382 in weiteren Medien

Die meisten für die Pathogenität potentiell relevanten Proteine wurden schon bei Anzucht von *Cmm* in Minimalmedium identifiziert. Es wurden jedoch noch weitere Medien getestet, um zu prüfen, ob und wie sich die Zusammensetzung des Exoproteoms verändert. Die Synthese bestimmter Proteine könnte durch Zugabe von Pflanzenbestandteilen oder Zuckerpolymeren wie sie z.B. in der pflanzlichen Zellwand vorkommen, induziert sein. Dementsprechend wurde M9-Minimalmedium jeweils mit Xylemsaft und Tomatenblatthomogenat mit einer Endkonzentration von 2,4% bzw. 1% und schließlich den drei verschiedenen Zuckerpolymeren Xylan, Polygalakturonat und Carboxymethylcellulose (CMC), der löslichen Form der Cellulose, supplementiert. Die Tatsache, dass viele der in das M9-Minimalmedium sekretierten Proteine an der Bakterien-Pflanzen-Interaktion beteiligt sind, warf die Frage auf, ob ihre Synthese konstitutiv ist oder ob sie durch bestimmte Komponenten im M9-Minimalmedium induziert wird. Um das zu überprüfen, wurden die extrazellulären Proteine nach Anzucht von *Cmm* in den beiden Vollmedien TBY und TBY mit Glukose (C-Medium) als Kohlenstoffquelle untersucht.

3.1 Proteinsekretion von NCPPB382 in Minimalmedium nach Supplementierung mit Xylemsaft, Tomatenblatthomogenat oder Zuckerpolymeren

Die Xylemgefäße der Tomatenpflanze stellen ein natürliches Habitat von *Cmm* dar. Um dieses Habitat zu simulieren, wurde *Cmm* in M9-Minimalmedium, das zusätzlich 2,4% Xylemsaft (M9_{2,4%-Xy}) bzw. 1% Tomatenblatthomogenat (M9_{1%-T-Hom}) enthielt, angezogen und der Effekt auf die Art, Anzahl und Menge der sekretierten Proteine untersucht.

Vor der Analyse des Exoproteoms wurden Wachstumstests durchgeführt, um den Einfluss, den die Zugabe von Xylemsaft bzw. Tomatenblatthomogenat auf das Wachstum haben, zu überprüfen. Die in Abb. 16 dargestellten Wachstumsverläufe für NCPPB382 in den untersuchten Medien zeigen, dass die Supplementierung des M9-Minimalmediums mit 2,4% Xylemsaft zu einem in Vergleich zum M9-Minimalmedium etwas schwächeren Wachstum mit niedrigeren o.D.₅₈₀-Werten führt. Die Abschwächung des Wachstums ist vor allem nach den ersten 24h zu beobachten und spielt für die Untersuchung des Exoproteoms keine Rolle, da die Kulturen nach 24h in der log-Phase für die Isolierung extrazellulärer Proteine eingesetzt wurden. Im Gegensatz zum Xylemsaft hatte die Supplementierung des M9-Minimalmediums mit 1% Tomatenblatthomogenat eine leichte Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit und auch höhere maximale o.D.₅₈₀-Werte zur Folge. Da das Wachstum von NCPPB382 in den supplementierten Medien sich nur geringfügig von dem in dem M9-Minimalmedium unterschied, wurden für die Analyse und die Vergleiche der Exoproteome Überstände nach 24- bzw. 23-stündiger Kultivierung in mit Xylemsaft (o.D.₅₈₀ 1,2) bzw. Tomatenblatthomogenat (o.D.₅₈₀ 1,5) supplementiertem M9-Minimalmedium eingesetzt.

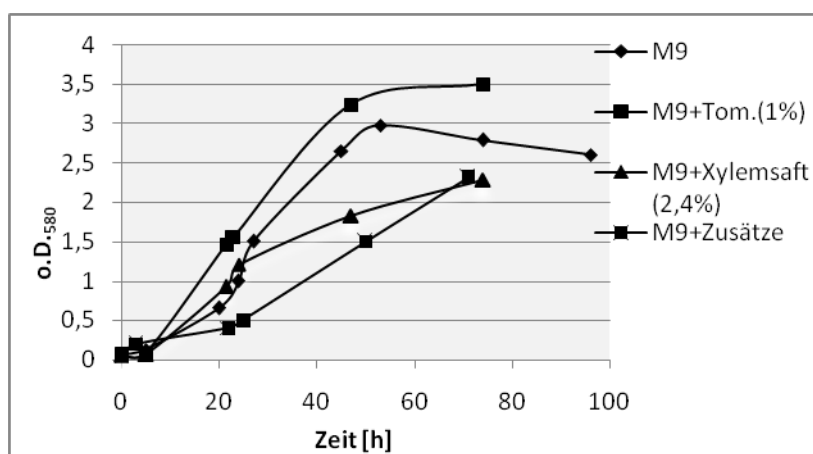


Abb. 16. Wachstum von NCPPB382 im M9-Minimalmedium im Vergleich zum mit Tomatenblatthomogenat (1%), Xylemsaft (2,4%) und anderen Zuckerpolymeren (Xylan aus Haferspелzen, Polygalakturonat und Carboxymethylcellulose, Endkonzentration je 0,1%) supplementiertem M9-Minimalmedium.

Verglichen mit den aus dem M9-Überstand isolierten extrazellulären Proteinen traten nur geringfügige Unterschiede zu denen aus dem M9_{2,4%-xy}-Überstand auf, die Expressionsprofile in beiden Medien zeigten fast identische Proteinmuster. Insgesamt konnten 82 Proteine identifiziert werden (s. Anhang S. 153, Abb. 10; Tab. 1, S. 163), von denen nur 40 ein putatives Signalpeptid tragen. Die meisten der 42 cytoplasmatischen Proteine bildeten sehr schwache Spots und wurden nicht in die Vergleichsstudien miteinbezogen, da sie wahrscheinlich über die Zelllyse nach außen gelangen und nicht aktiv sekretiert werden. Lediglich die Elongationsfaktoren (EF-Ts, EF-Tu, EF-G), die GAPDH und die Acetylxylanesterase (CMM_2688) bildeten in ihrer Intensität mit den putativ sekretierten Proteinen vergleichbare Spots. Die meisten der putativ sekretierten Proteine, die im M9_{2,4%-xy}-Überstand identifiziert werden konnten, stammen aus der Gruppe „Potentiell relevant für die phytopathogene Interaktion“, hauptsächlich aus den Untergruppen Transporter und extrazelluläre Enzyme. In der Gruppe der Transporter wurden einige Unterschiede zwischen den Medien M9 und M9_{2,4%-xy} festgestellt, die allerdings aufgrund der geringen Intensität der Spots und der teilweise schlechten Auftrennung der Proteine im sauren pH-Bereich wohl nicht als signifikant angesehen werden dürfen. Es handelt sich um vier Substratbindeproteine von ABC-Transportern (CMM_1478, 1960, 0363, 2283), die in M9-Minimalmedium aber nicht in M9_{2,4%-xy} und drei weitere Substratbindeproteine die im M9_{2,4%-xy}, aber nicht in M9-Minimalmedium auftreten. Unter den nur in M9_{2,4%-xy} nachgewiesenen Transportern befinden sich die Substratbindeproteine zweier Peptid ABC- (BldKB, CMM_0799; CMM_2420) und eines Zucker ABC-Transporter (CMM_0879).

Die Proteine aus der Gruppe der extrazellulären Enzyme sind in M9_{2,4%-xy} ebenso wie in M9-Minimalmedium mengenmäßig sehr stark vertreten. Mit Ausnahme von SbtB, ChpC, CMM_2692 und den beiden Pat-1 Homologen PhpA und B, die in dem hier aufgetrennten Bereich entweder keine oder nur schwache Spots bilden und daher nicht verlässlich detektierbar sind, konnten alle anderen Proteine dieser Gruppe sicher nachgewiesen werden. Auch quantitativ scheint die Zugabe von Xylemsaft lediglich bei einigen Proteinen wie den beiden Pathogenitätsdeterminanten CelA und Pat-1, einigen der Ppa-Proteine (PpaC, E, F und J), der Acetylxylanesterase (CMM_2688) und einem sekretierten Protein (CMM_0144) eine leichte Zunahme der Expression zu bewirken (Abb. 17). Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die Zugabe von Xylemsaft keinen wesentlichen Einfluss auf die Zusammensetzung des Exoproteoms hat und M9-Minimalmedium alleine zur Induktion vieler für die Phytopathogenität relevanter Gene ausreicht.

Nach Anzucht von NCPPB382 in M9 mit 1% Tomatenblatthomogenat und der anschließenden Isolierung extrazellulärer Proteine aus dem Kulturüberstand wurden 85 verschiedenen Proteine identifiziert (s. Anhang S. 154, Abb. 11). Für 54 (64%) dieser Proteine ist ein Signalpeptid vorhergesagt, die restlichen 31 sollten intrazellulär lokalisiert sein oder

werden über ein derzeit noch unbekanntes System exportiert. Die identifizierten Proteine wurden nach Haupt- und Untergruppen sortiert und sind im Anhang in der Tab. 1 (S. 163) aufgelistet. In M9 mit 1% Tomatenblatthomogenat wurden 14 extrazelluläre Proteinen identifiziert, die im M9-Überstand nicht auftauchten. Die größte Gruppe bilden 7 konserviert hypothetische/hypothetische sekretierte Proteine, gefolgt von 4 verschiedenen Transportern und 3 Zellwandproteinen (Tab. 5). Obwohl alle neu identifizierten Proteine in nur sehr geringen Mengen sekretiert werden, scheinen sie durch die Zugabe von pflanzlichen Bestandteilen im Tomatenblatthomogenat induziert. Neben den neu auftauchenden Proteinen gibt es auch wenige Proteine wie z.B. die drei ABC Transporter CMM_1478, 1703, 0363, die im Vergleich zum M9-Minimalmedium in M9_{1%-T-Hom} nicht identifiziert werden konnten. Allerdings handelt es sich auch hier um Proteine, die schon im M9-Überstand nur in sehr geringen Mengen vorlagen. Insgesamt lässt sich nicht sicher schließen, dass diese in sehr geringen Mengen vorhandenen Proteine induziert, bzw. reprimiert wurden.

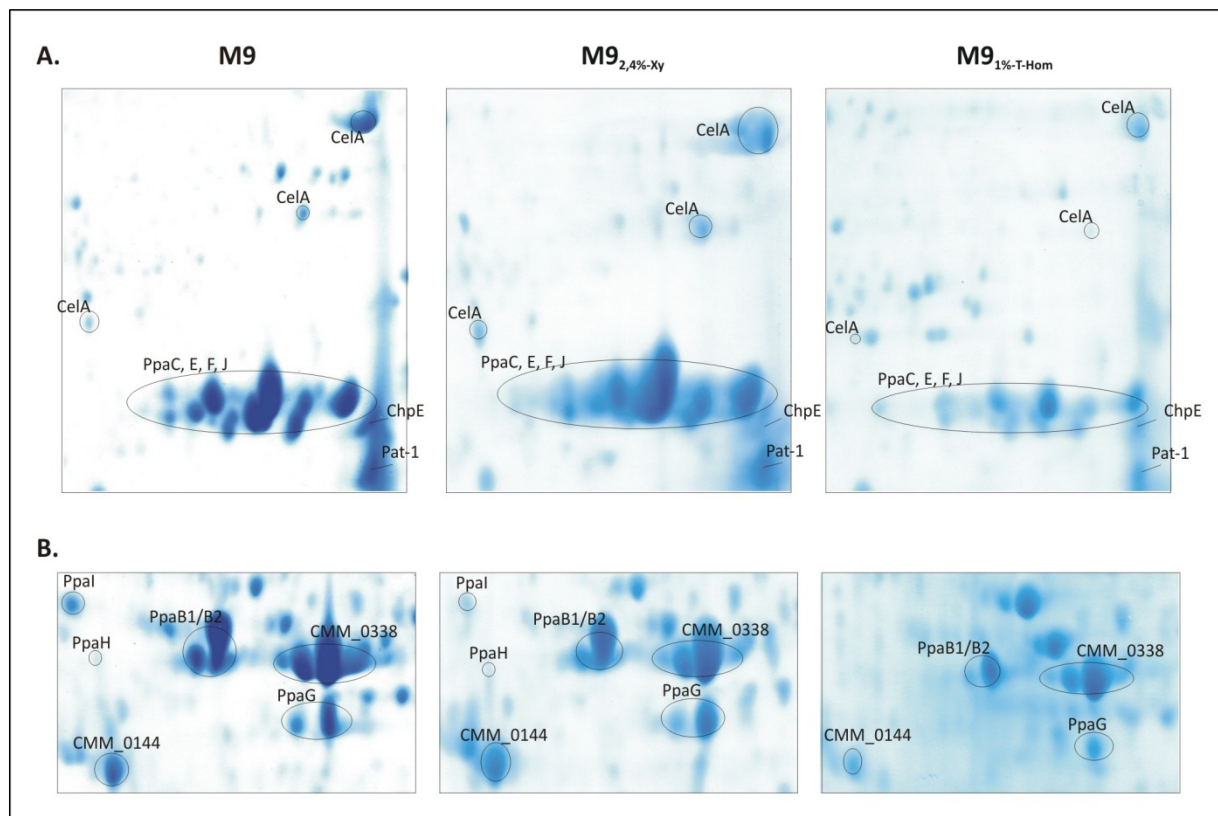


Abb. 17. Vergleich der Expressionsstärke verschiedener extrazellulärer Proteine in den Medien M9, M9_{2,4%-Xy}, M9_{1%-T-Hom}. Dargestellt sind zwei unterschiedliche Gelausschnitte (A, B).

Des Weiteren fällt auf, dass die Mehrheit der in M9-Minimalmedium in hohen Mengen sekretierten extrazellulären Proteine in M9_{1%-T-Hom} quantitativ deutlich reduziert sind. Zu diesen Proteinen zählen vor allem die Vertreter der Untergruppe der extrazellulären Enzyme, für die eine Beteiligung an der Bakterien-Pflanzen-Interaktion angenommen wird.

Dies sind die Serinproteasen der Ppa-Familie PpaB-G, ChpE, die beiden plasmidkodierten Virulenzfaktoren Pat-1 und CeiA, sowie CMM_0144, ein sekretiertes Protein unbekannter Funktion (Abb. 17). Die putativen Serinproteasen PpaH und Ppal und die Zellwandpolymere-abbauenden Enzyme PgaA und XysA konnten überhaupt nicht detektiert werden, während für die Proteine ChpC, ExpA und die beiden plasmidkodierten Pat-1-Homologen PhpA und B keine Angaben gemacht werden können, da sie in dem hier aufgetrennten pH-Bereich (4-7) nicht sichtbar sind. Unterdessen schienen Proteine wie CMM_0338, NPL/P60, FtsI, CMM_0839 und GroEL nicht von der Zugabe von Tomatenblatthomogenat betroffen zu sein und zeigten im Vergleich zum M9-Minimalmedium ähnlich hohe Expressionslevel.

Tab. 5. Extrazelluläre Proteine, die im Vergleich zur Anzucht in M9-Minimalmedium in M9_{1%-T-Hom} in geringen Mengen zusätzlich sekretiert werden.

Gen DB-ID	Gen	Funktion	Gruppenbeschreibung
II.2 Zellwand			
CMM_0464	-	Nucleosid-Diphosphat-Zucker-Epimerase	Glycosyltransferasen
CMM_0430	-	hypothetisches, sekretiertes Protein, Zelloberflächenprotein	Zelloberfläche
pCM2_0035	<i>rhsA</i>	Rhs ähnliches Protein	Zelloberfläche
IV.1 Transporter			
CMM_0956	-	Peptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	ABC, Aminosäuren
CMM_0879	-	Zucker ABC Transporter, Substratbindeprotein	ABC, Zucker
CMM_0435	<i>fepB</i>	Eisen-Siderophor ABC Transporter, Substratbindeprotein	ABC, anorganische Ionen
CMM_2176	-	konserviertes, sekretiertes Lipoprotein	Permeasen, anorganische Ionen
V.2 Funktion unbekannt			
CMM_0337	-	konserviertes, sekretiertes Protein, Carboxypeptidase oder PBP	konserviert hypothetische Proteine
CMM_1215	-	konserviertes, sekretiertes Protein, ? Zelloberflächenprotein	konserviert hypothetische Proteine
CMM_1389	-	konserviertes, sekretiertes Protein	konserviert hypothetische Proteine
CMM_2204	-	konserviertes, sekretiertes Protein, Glycosyl-Hydrolase mit Sensor-Domäne	konserviert hypothetische Proteine
CMM_2252	-	konserviertes, sekretiertes Protein	konserviert hypothetische Proteine
CMM_1921	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	hypothetische Proteine
CMM_2250	-	hypothetisches Membranprotein, Zelloberflächenprotein	hypothetische Proteine

Um die Synthese Zellwand-degradierender Enzyme zu induzieren, wurde *Cmm* NCPPB382 in einem mit Xylan, Polygalakturonat und Carboxymethylcellulose supplementiertem M9-Minimalmedium, dem nur ein Viertel (0,1 %) der ursprünglichen Menge an Glukose

zugegeben wurde, angezogen. Der in Abb. 16 dargestellte Wachstumsverlauf zeigte eine im Vergleich zu M9-Minimalmedium verlängerte lag-Phase und eine Wachstumsverzögerung um 24h. Um extrazelluläre Proteine aus logarithmisch wachsenden Zellen zu erhalten, wurden die Überstände für die Proteinisolierung erst nach 48 bis 50 Stunden gewonnen. Insgesamt konnten 44 verschiedene Proteine identifiziert werden (s. Anhang S. 155, Abb. 12; Tab. 1, S. 163), von denen 36 ein Signalpeptid tragen. Auffallend an diesem Medium sind die geringe Anzahl und die geringe Menge an cytoplasmatischen Proteinen. Von den im M9-Überstand häufig auftauchenden cytoplasmatischen Proteinen konnten in dem mit Zuckerpolymeren supplementierten Medium nur die Acetylxylanesterase in größeren, und das Chaperon GroEL und die GAPDH in sehr geringen Mengen gefunden werden. Die Mengen des größten Teils der putativ sekretierten Proteine entsprach denen aus dem M9-Überstand. Die putativen Cellulose-, Xylan- und Polygalakturonat-abbauenden Enzyme CelA, XysA und PgaA zeigten im Vergleich zum M9-Minimalmedium unveränderte Expression. Daher ist das M9-Medium für die Induktion einer Reihe extrazellulärer Enzyme ausreichend und die Supplementierung mit weiteren Zuckerpolymeren hat keinen deutlich induzierenden Effekt auf die Synthese dieser oder weiterer im M9-Überstand noch nicht nachgewiesener Enzyme wie z.B. CelB, XysB, oder EndX.

3.2 Proteinsekretion von NCPPB382 in Vollmedium

Die Tatsache, dass die meisten Virulenzfaktoren schon im M9-Minimalmedium in sehr hohen Mengen exprimiert werden, und scheinbar keine Substratinduktion der Polysaccharid-abbauenden Enzyme auftritt, warf die Frage auf, welche Komponente dieses Mediums die Synthese dieser Faktoren induziert oder ob deren Synthese konstitutiv ist. Um die Rolle von Glukose für die Expression extrazellulärer Enzyme zu untersuchen, wurden Exoproteomanalysen von NCPPB382 in TBY und in mit Glukose supplementiertem TBY, weiter als C-Medium bezeichnet, durchgeführt. TBY ist ein Vollmedium, das als Nährstoffquelle enzymatisch vorverdautes Protein enthält. Es enthält kaum Zucker (Sezonov *et al.*, 2007). Falls Glukose einen Einfluss auf die Expression der Virulenzfaktoren hat, sollten die Exoproteomprofile dieser beiden Medien deutliche Unterschiede zeigen. NCPPB382 wächst in diesen Medien gleich gut, erreicht im C-Medium aber eine höhere o.D.₅₈₀. Die Probenentnahme erfolgte in der log-Phase nach 24-stündiger Inkubation bei 26°C. Die Exoproteome von TBY und C-Medium (s. Anhang S. 156/157, Abb. 13/14, Tab. 1, S. 163) zeigten untereinander und im Vergleich zu M9-Minimalmedium eine sehr hohe Ähnlichkeit hinsichtlich ihrer Zusammensetzung. Allerdings zeigten die im M9-Minimalmedium so hoch exprimierten Virulenzfaktoren in diesen beiden Medien nur eine sehr schwache bis kaum wahrnehmbare Expression. Die meisten Proteine wie PpaB1/2, C, E, F und J, ChpC und E,

XysA, ExpA, sowie CelA und Pat-1 lagen in sehr geringen Mengen vor, während andere wie SbtC und PpaG überhaupt nicht identifizierbar waren. In Abb. 18 ist die veränderte Expression in C-Medium in Vergleich zu M9-Minimalmedium für die wichtigen Virulenzfaktoren CelA und Pat-1 sowie zweier Vertreter der Serinpeptidasen (PpaF und ChpE) exemplarisch dargestellt.

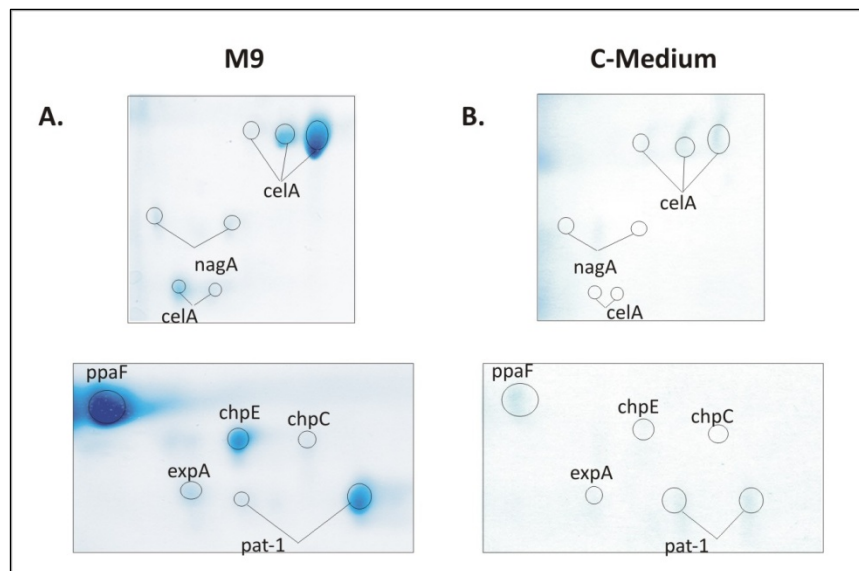


Abb. 18. Exemplarisch ist die veränderte Expression der extrazellulären Proteine von NCPPB382 in M9 (A) und C-Medium (B) dargestellt. Dargestellt sind jeweils zwei unterschiedliche Gelausschnitte.

Zusätzlich sind drei weitere sekretierte Proteine CMM_0144, CMM_0338 und CMM_0466, deren Funktion bislang noch unbekannt ist, in der Expression verringert. Andere Proteine wie CMM_0638 und CMM_0795 sind im Vergleich zu M9-Minimalmedium höher exprimiert, oder wie im Fall von CMM_1126, einer extrazellulären 5'-Nukleotidase, CMM_1215 und pCM2_0035, einem Rhs-ähnlichen Protein nur in TBY und C-Medium identifizierbar. Alle extrazellulären Proteine, die eine im Vergleich zu M9-Minimalmedium veränderte Expression zeigen, sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tab 6. Extrazelluläre Proteine, die im Vergleich zum M9-Minimalmedium in TBY- und in C-Medium eine deutlich veränderte Expression zeigen.

Gen DB-ID	Gen	Funktion	Medium
CMM_0039	<i>chpE</i>	extrazelluläre Serin-Protease, S1A-Familie	TBY/C-Med.↓
CMM_0042/0050	<i>ppaB1/B2</i>	extrazelluläre Serin-Protease	TBY/C-Med.↓
CMM_0044	<i>ppaC</i>	extrazelluläre Serin-Protease	TBY/C-Med.↓
CMM_0049	<i>nagA</i>	β-N-Acetylglucosaminidase	TBY/C-Med.↓
CMM_0052	<i>chpC</i>	extrazelluläre Serin-Protease, S1-Familie (Chymotrypsin)	TBY/C-Med.↓
CMM_0071	<i>ppaE</i>	extrazelluläre Serin-Protease	TBY/C-Med.↓
CMM_0144	-	konserviertes, sekretiertes Protein	TBY/C-Med.↓
CMM_0338	-	konserviertes, sekretiertes Protein, PBP	TBY/C-Med.↓

CMM_0466	-	konserviertes, sekretiertes Protein	TBY/C-Med. ↓
CMM_0638	-	Membran-, Metalloendopeptidase, Subfamilie M23B	TBY/C-Med. ↑
CMM_0764	<i>ppaF</i>	extrazelluläre Serin-Protease	TBY/C-Med. ↓
CMM_0795	-	extrazelluläre Nuclease / Phosphatase	TBY/C-Med. ↑
CMM_0879	-	Zucker ABC Transporter, Substratbindeprotein	TBY ^b
CMM_1126	-	extrazelluläre 5'-Nucleotidase	TBY/C-Med. ↑
CMM_1215	-	konserviertes, sekretiertes Protein, ? Zelloberflächenprotein	TBY/C-Med. ↑
CMM_1480	<i>expA</i>	Expansin	TBY/C-Med. ↓
CMM_1587	-	Oligopeptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	TBY/M9 ^c
CMM_1673	<i>xysA</i>	Endo-1,4-β-Xylanase A	TBY/C-Med. ↓
CMM_1942	<i>ppaG</i>	extrazelluläre Serin-Protease	TBY/C-Med. ↓
CMM_1947	<i>ppaH</i>	extrazelluläre Serin-Protease	TBY/C-Med. ↓
CMM_1948	<i>ppaI</i>	extrazelluläre Serin-Protease	TBY/C-Med. ↓
CMM_1960	-	Peptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	C-Med./M9 ^a
CMM_2283	-	Metall ABC Transporter, Substratbindeprotein	C-Med./M9 ^a
CMM_2536	<i>sbtC</i>	Subtilisin-ähnliche Serin-Protease, Peptidase-Familie S8A	TBY/C-Med. ↓
CMM_2692	-	Endoglukanase	TBY/C-Med. ↓
CMM_2871	<i>pgaA</i>	Polygalakturonase	TBY/C-Med. ↓
pCM1_0020	<i>celA</i>	Cellulase	TBY/C-Med. ↓
pCM1_0023	<i>ppaI</i>	extrazelluläre Serin-Protease	TBY/C-Med. ↓
pCM2_0035	<i>rhsA</i>	Rhs ähnliches Protein	TBY/C-Med. ↑
pCM2_0054	<i>pat-1</i>	extrazelluläre Serin-Protease	TBY/C-Med. ↓

TBY/C-Med. ↓/↑: eine im Vergleich zum M9 geringere bzw. höhere Expression in den Medien TBY und C-Medium. ^a Expression in C-Med. und M9, aber nicht in TBY. ^b Expression in TBY, aber nicht in C-Med. und M9. ^c Expression in TBY und M9, aber nicht in C-Med.

Die Tatsache, dass die in M9-Minimalmedium hoch exprimierten Virulenzfaktoren und andere an der Bakterien-Pflanzen-Interaktion beteiligten Proteine sowohl in TBY als auch in C-Medium drastisch reduzierte Expression zeigen, lässt zwei Schlussfolgerungen zu. Einerseits scheint das M9-Minimalmedium induzierend auf die Synthese vieler für die Pathogenität relevanter Proteine zu wirken und andererseits scheidet Glukose als induzierender oder reprimierender Faktor aus. Was den Anstieg der Proteinsekretion in M9-Minimalmedium bewirkt, bleibt unbekannt.

Zusammenfassend sind in Tabelle 7 alle unter Verwendung verschiedener Medien im Kulturüberstand von *Cmm* NCPPB382 nachgewiesenen Proteine aufgelistet. Aus dieser Zusammenfassung geht hervor, dass das „core“-Exoproteom von *Cmm* hauptsächlich aus Proteinen der Gruppen Energie- und Kohlenstoffmetabolismus, Zellwand, Transporter, extrazelluläre Enzyme und der Gruppe, die Proteine unbekannter Funktion zusammenfasst, besteht, wobei nur die letzten vier Gruppen zum größten Teil Proteinen mit vorhergesagtem Signalpeptid umfassen.

Tab. 7. Zusammenfassung sekretierter Proteine bei Anzucht von NCPPB382 auf verschiedenen Medien.

Haupt-/Untergruppe	M9	M9 _{2,4%-Xy}	M9 _{1%-T-Hom}	M9 _{0,1%Xylan;} 0,1% PG; 0,1% CMC	TBY	C-Med.
I. Metabolismus						
I.1. Energie- und Kohlenstoffmetabolismus	21 (2)	18 (1)	18 (2)	6 (1)	19 (2)	13
I.2. Aminosäuren	5	2	2	0	2	2
I.3. Nukleotide	2	1	0	0	1	1
I.4. Lipide	1	1	0	0	1	1
I.5. Coenzyme	0	0	0	0	0	0
I.6. Sekundärmetabolismus	0	1	0	0	1	0
II. Zelluläre Prozesse						
II.1. Zellzyklus	0	0	0	0	0	0
II.2. Zellwand	7 (6)	5 (4)	8 (8)	3 (3)	9 (8)	9 (8)
III. Informationsspeicherung und -prozessierung						
III.1. Replikation	0	0	0	0	2	1
III.2. Transkription	0	1	1	0	2	1
III.3. Translation	5	5	4	0	6	5
IV. Potentiell relevant für phytopathogene Interaktion						
IV.1. Transporter	11 (8)	11 (7)	11 (9)	6 (6)	7 (4)	5 (4)
IV.2. Proteintransport	0	0	0	0	0	0
IV.3. Regulatoren	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
IV.4. Stress	3 (0)	2	3	2	5	5 (0)
IV.5. Resistenz	1	1	1	0	1	1
IV.6. Extrazelluläre Enzyme	22 (22)	17 (17)	14 (14)	17 (17)	8 (8)	10 (10)
IV.7. Intrazelluläre Proteasen	3 (2)	2 (1)	2 (2)	3 (2)	2 (2)	3 (3)
V. Schlecht/kaum charakterisiert						
V.1. generelle Funktionszuordnung	0	1	0	0	2	2
V.2. Funktion unbekannt	15 (12)	13 (9)	20 (18)	6 (6)	10 (9)	9 (9)
Gesamtmenge	96 (53)	82 (40)	85 (54)	44 (36)	79 (34)	69 (35)

*In Klammern ist die Zahl der Proteine mit vorhergesagtem Signalpeptid angegeben.

4. Proteinsekretion der nicht-virulenten Stämme CMM100 und CMM30-18 in M9-Medium nach Supplementierung mit Xylemsaft und Tomatenblatthomogenat

Die Untersuchung des NCPPB382 Exoproteoms in verschiedenen Medien führte zur Identifizierung zahlreicher extrazellulärer Proteine, von denen vor allem die Plasmid-kodierten Virulenzfaktoren CeiA und Pat-1 und die chromosomal, unter anderem auch in der *chp-/tomA*-Region oder auch auf pCM1 kodierten Serinpeptidasen durch ihre hohen Sekretionsmengen auffielen.

Auf RNA-Ebene ist gezeigt, dass sich die Expression der in der *chp-/tomA*-Region kodierten Gene und der Gene der Plasmide wechselseitig beeinflussen (Chalupowicz *et al.*, 2010). Die Transkriptmenge der untersuchten Virulenzgene (der plasmidkodierten *ceiA* und *pat-1* bzw. der PAI-Gene *chpC* und *ppaA*) nahm bei Abwesenheit der PAI bzw. von pCM1 ab. Daher wurde untersucht, ob dieser wechselseitige Einfluss auch auf der Proteinebene nachweisbar ist. Verglichen wurden das plasmidfreie NCPPB382 Derivat CMM100 und die Mutante CMM30-18, die eine Deletion der *chp-/tomA*-Region trägt.

Die Anzucht von CMM100 erfolgte in mit 2,4% Xylemsaft bzw. 1% Tomatenblatthomogenat supplementierten Medien, so zusätzlich zum Vergleich zwischen den Medien ein Vergleich zwischen den Stämmen CMM100 und NCPPB382 ermöglicht war.

Im Wesentlichen ist die Zusammensetzung der Exoproteome von CMM100 in den beiden Medien identisch (s. Anhang S. 158/159, Abb. 15/16; Tab. 1, S. 163), es gibt keine eindeutigen Unterschiede hinsichtlich des Fehlens oder Hinzukommens von Proteinen.

Tab 8. Vergleich der Expression der Stämme CMM100 und NCPPB382 in M9-Minimalmedium nach Supplementierung mit 2,4% Xylemsaft und 1% Tomatenblatthomogenat.

Stamm	höhere Expression in M9 _{1%-T-Hom}	höhere Expression in M9 _{2,4%-Xy}	exclusive Expression
CMM100	CMM_0132, CMM_2252	SbtC, PpaC, E, F, CMM_1703, CMM_0144, CMM_0466, ChpE	CMM_0976, CMM_1921
NCPPB382	CMM_0795	SbtC, CeiA, PpaC, E, F, G, H, I, J, Pat-1, CMM_0144, CMM_1703 ChpE	

Allerdings traten Unterschiede in der Expressionsstärke auf, mehrere Proteine im mit Xylemsaft supplementierten M9-Medium sind etwas höher exprimiert (Tab 8). Es handelt sich dabei um ein konserviertes hypothetisches Protein (CMM_0144), einen Glycin-Betain ABC-Transporter (CMM_1703), die Peptidasen SbtC, ChpE und die drei Vertreter der Ppa-Familie PpaC, E und F. In Minimalmedium mit Tomatenblatthomogenat sind die Proteine CMM_0132 und CMM_2252, für die Signalpeptide vorhergesagt sind, deren Funktion aber unbekannt ist, etwas höher exprimiert.

Vergleicht man nun die Stämme CMM100 und NCPPB382 miteinander, so konnte im CMM100-Exoproteom keine signifikante Reduktion der in der *chp-/tomA*-Region kodierten Serinpeptidasen PpaB1/B2, C, E und ChpE festgestellt werden. Die Transkriptomstudien wurden mit den Genen *ppaA* und *chpC* durchgeführt (Chalupowicz *et al.*, 2010), deren Beteiligung an der *Cmm*-Tomate-Interaktion bereits nachgewiesen wurde. Von den von diesen Genen kodierten Serinpeptidasen konnte nur das ChpC-Protein in sehr geringen Mengen im *Cmm*-Überstand detektiert werden. Obwohl die Expression anderer Serinpeptidasen nicht gemessen wurde, ist davon auszugehen, dass die Abwesenheit der Plasmide sich auch auf die Expression anderer Serinpeptidasen reduzierend auswirkt. Die Tatsache, dass auf der Proteomebene keine signifikante Reduktion beobachtet wurde, ist wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Anzuchtbedingungen zurückzuführen. Die Bestimmung der Transkriptmengen erfolgte unter natürlichen Bedingungen aus den Pflanzen, im Gegensatz zu den Proteomstudien, in denen das M9-Medium mit Xylemsaft bzw. Tomatenblatthomogenat supplementiert wurde, um die natürliche Umgebung zu simulieren. Außerdem wurden keine genauen Messungen der Spotintensitäten durchgeführt und diese nur visuell verglichen.

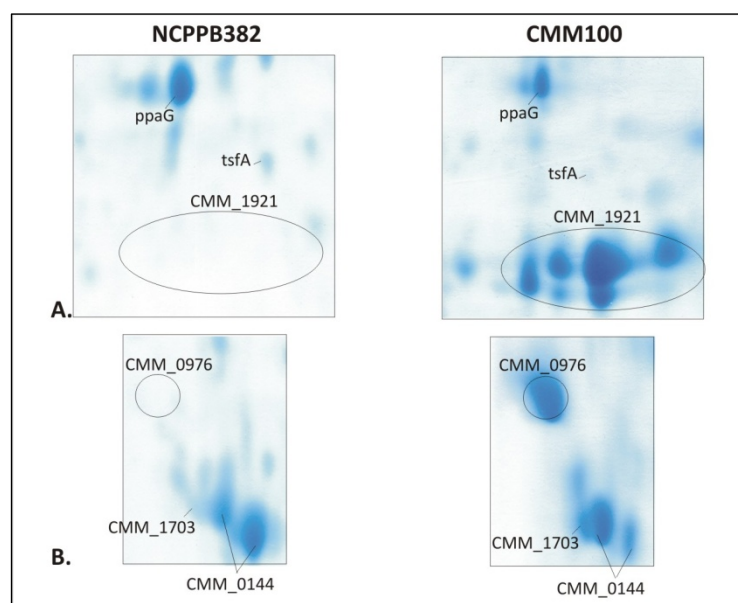


Abb. 19. Nachweis der veränderten Expression von CMM_0976 und CMM_1921 in CMM100 in Vergleich zu NCPPB382 in M9_{2,4%-Xy}. Dargestellt sind zwei unterschiedliche Gelausschnitte (A, B).

Zusätzlich zu den bereits im NCPPB382-Exoproteom nachgewiesenen Proteinen wurden im CMM100-Exoproteom zwei weitere stark exprimierte Proteine, ein ABC-Transporter (CMM_0976) und ein hypothetisches sekretiertes Protein CMM_1921 detektiert (Abb. 19).

Der Stamm CMM30-18 hat in Folge einer Mutagenese mit dem Transposon Tn1409 die komplette *chp/tomA*-Region verloren. Diese 129 kb große Region niedrigen GC-Gehaltes kodiert u.a. mehrere Serinpeptidasen und verschiedene Gene aus dem Zuckermetabolismus. Die nähere Charakterisierung von CMM30-18 *in planta* zeigte, dass der Verlust der *chp/tomA*-Region zur Avirulenz des Stammes führt, der nicht in der Lage ist die Pflanze effektiv zu kolonisieren und mit $2,8 \times 10^4$ Bakterien/g Pflanzenhomogenat einen viel niedrigeren Titer als der Wildtypstamm erreicht (Gartemann *et al.*, 2008). Für einige dieser Serinpeptidasen ist eine Beteiligung an der Bakterien-Pflanzen-Interaktion nachgewiesen. Die Inaktivierung des *chpG*-Gens hat zwar keinen direkten Effekt auf die Virulenz in der Tomate, führt aber zum Verlust der Fähigkeit in der Nichtwirtspflanze *Mirabilis jalapa* die HR auszulösen (Stork *et al.*, 2008). Die Inaktivierung der Gene *ppaA* und *C* sowie des *chpC*-Gens führen dagegen zu einer drastischen Reduktion des Kolonisationstiters und der dadurch verminderten Virulenz in der Tomate (Eichenlaub *et al.*, 2011; Stork *et al.*, 2008).

Ein Einfluss der *chp/tomA*-Region auf die Expression der plasmidkodierten Virulenzfaktoren CelA und Pat-1 wurde mit der Mutante CMM27 gezeigt (Chalupowicz *et al.*, 2010). Diese enthält neben der Deletion der *chp/tomA*-Region noch beide Plasmide, im Gegensatz zu CMM30-18, der pCM2 verloren hat. Der Vergleich der Transkriptlevel von *celA* und *pat-1* zwischen NCPPB382 und CMM27 zeigte ein deutlich reduziertes mRNA-Level beider Virulenzfaktoren in der Mutante. Die RNA Messungen wurden sowohl im M9-Medium als auch *in planta* durchgeführt, wo die Expression der Virulenzfaktoren deutlich höher ist.

Daher wurde überprüft, ob dieser Einfluss auf der Translationsebene ebenfalls zu beobachten ist und ob die Abwesenheit der *chp/tomA*-Region weitere Änderungen in der Zusammensetzung der extrazellulären Proteine bewirkt. Da die Proteinisolierung aus Pflanzen schwierig ist und aufgrund der für die 2D-Gelelektrophorese benötigten Mengen erst zu einem viel späteren Infektionsstadium durchgeführt werden kann, wurde für die Vergleichsstudien das M9-Minimalmedium ausgewählt. Zu diesem Zweck wurden die extrazellulären Proteine der Stämme NCPPB382 und CMM30-18 (s. Anhang S. 160, Abb. 17; Tab. 1, S. 163) nach etwa 24h Kultivierung in M9-Medium aus den zellfreien Überständen isoliert und miteinander verglichen. Der Verlust von pCM2 von CMM30-18 erlaubt keine Aussagen über den Einfluss der deletierten *chp/tomA*-Region auf die Pat-1 Serinpeptidase, spielt aber für den Vergleich der anderen extrazellulären Proteine keine Rolle. Der Vergleich der Exoproteome von NCPPB382 (Abb.14) und CMM30-18 bestätigt die Annahme, dass die Deletion der *chp/tomA*-Region sich auch auf der Translationsebene negativ auf die Expression

der Virulenzdeterminante C_{el}A auswirkt. Die Menge an C_{el}A ist in dem CMM30-18 im Vergleich zu NCPPB382 drastisch reduziert. Hinsichtlich anderer in NCPPB382 in hohen Mengen sekretierter Proteine wie CMM_0338, SbtC, PbpC, D und E sowie einigen Vertretern der Ppa-Familie (PpaG, H, I und J), die nicht in der *chp/tomA*-Region kodiert sind, konnten in CMM30-18 keine Veränderungen beobachtet werden. Einige bereits im NCPPB382 Überstand nachgewiesene Proteine wie CMM_1557 und 1960 erscheinen in CMM30-18 etwas höher exprimiert, andere in der Tabelle 9 aufgelistete Proteine konnten nur im CMM30-18 Überstand, teilweise aber auch in Exoproteomen von CMM100 und NCPPB382 nach Kultivierung in M9_{2,4%xy} oder M9_{1%T-Hom.} nachgewiesen werden. Die meisten dieser in CMM30-18 induzierten Proteine bilden auf dem Gel nur sehr schwache Spots (mit Sternchen gekennzeichnet).

Tab. 9. Extrazelluläre Proteine, die im CMM30-18 Exoproteom im Vergleich zu NCPPB382 höher exprimiert sind (in M9-Medium).

Gen DB-ID	Gen	Funktion	Gruppe
CMM_1126*	-	extrazelluläre 5'-Nucleotidase	Zelloberfläche
CMM_2067*	<i>dacB</i>	D-Alanyl-D-Alanin-Carboxypeptidase	Peptidoglycanbiosynthese
CMM_0017*	<i>pbpA</i>	Penicillin-Bindeprotein	Peptidoglycanbiosynthese
CMM_0430*	-	hypothetisches, sekretiertes Protein, Zelloberflächenprotein	Zelloberfläche
CMM_2006*	<i>gluB</i>	Glutamat ABC Transporter, Substratbindeprotein	ABC, Aminosäuren
CMM_0956*	-	Peptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	ABC, Aminosäuren
CMM_0879*	-	Zucker ABC Transporter, Substratbindeprotein	ABC, Zucker
CMM_2628*	-	polare Aminosäuren ABC Transporter, Substratbindeprotein	ABC, Aminosäuren
CMM_2941	-	Metall ABC Transporter, Substratbindeprotein	ABC, anorganische Ionen
CMM_0976	-	ABC Transporter, Substratbindeprotein	ABC, Zucker
CMM_2176*	-	konserviertes, sekretiertes Lipoprotein	Permeasen, anorganische Ionen
CMM_1921	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	hypothetische Proteine

Einige dieser Proteine wie PbpA und DacB könnten zuvor von den Proteinen PpaB1/B2 aus der *chp/tom*-Region verdeckt und daher nicht nachgewiesen worden sein. Eine hohe Expression und Sekretion zeigen dagegen ein hypothetisch sekretiertes Protein unbekannter Funktion CMM_1921 und ein Bindeprotein eines ABC-Transporters (CMM_0976). Eine ähnlich hohe Expression dieser beiden Proteine wurde auch bei dem Stamm CMM100 beobachtet. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass sowohl der Verlust der *chp/tomA*-Region als auch beider Plasmide sich induzierend auf die Synthese dieser Proteine auswirken.

C. Transport potentieller Virulenzfaktoren über die Tat-/Sec-Sekretionssysteme

Die Untersuchung des *Cmm*-Exoproteoms mittels 2D-Gelelektrophorese resultierte in der Bestimmung zahlreicher Oberflächenproteine bzw. ins Medium sekretierter Proteine. Unter den von *Cmm* sekretierten Proteinen befinden sich mehrere bereits bekannte Virulenzfaktoren (Cela, Pat-1), aber auch zahlreiche andere Proteine, die aufgrund ihrer extrazellulären Lokalisation ebenfalls Virulenzfaktoren darstellen könnten. Über welche Systeme die Sekretion dieser Proteine in *Cmm* erfolgt, ist noch unbekannt. Proteine, die in das extrazelluläre Milieu ausgeschleust werden sollen, werden in der Regel mit einem N-terminalen Signalpeptid synthetisiert, das das entsprechende Präprotein zu dem Translokationssystem in der Membran steuert. Die Anwendung verschiedener Signalpeptid-Vorhersageprogramme (SignalP3.0, TatFIND1.4; Bendtsen *et al.*, 2004; Rose *et al.*, 2002) auf das komplette Genom von *Cmm* führte zu dem Ergebnis, dass *Cmm* etwa 450 Proteine kodiert, die ein putatives Signalpeptid enthalten. Die meisten dieser Proteine sollen über das Sec-System und nur etwa 10 % über das Tat-System sekretiert werden. SignalP und TatFIND liefern lediglich Aussagen, ob das Protein eventuell über das entsprechende System sekretiert wird. Interessant sind aber Vorhersagen, die den endgültigen Ort des Proteins bestimmen. LocateP ist ein weiteres Programm, das Anwendung findet, um auf Genom-ebene die subzelluläre Lokalisation von Proteinen vorherzusagen. Es integriert mehrere verschiedene Programme und bietet so eine gute Basis für verlässliche Vorhersageergebnisse (Zhou *et al.*, 2008). Das Programm unterscheidet sieben verschiedene subzelluläre Orte in Gram-positiven Bakterien: intrazellulär (a), membranverankert über eine/mehrere Transmembrandomänen (b), über den N-Terminus (c), über den C-Terminus (d), kovalent über einen Lipidanker (e), zellwandgebunden über das LPXTG-Motiv (f) und extrazellulär (g). Dagegen erfolgt die Einteilung in SwissProt in nur vier Kategorien: intrazellulär (a), membrangebunden (b), zellwandgebunden (c) und extrazellulär (d), wobei die Membranproteine mit einem Lipidanker zu den extrazellulären Proteinen zählen. In Tabelle 10 sind die Abfrageergebnisse für *Cmm* NCPPB382 mit LocateP dargestellt. Obwohl die bioinformatischen Berechnungsmethoden immer besser werden, bleibt die Anwendung dieser Programme mit Unsicherheiten behaftet und eine experimentelle Überprüfung der Vorhersagen unerlässlich.

Tab. 10. Theoretische Klassifizierung extrazellulärer Proteine von *Cmm* nach Swiss Prot/LocateP.

Swiss Prot	LocateP	Anzahl in <i>Cmm</i>
sekretierte Proteine		371 (12,0 %)
extrazelluläre Proteine	Lipidanker	99 (3,2 %)
	sekretiert	128 (4,2 %)
Zellwandproteine	LPXTG-Motiv	10 (0,3 %)
Membranproteine	C-terminaler Anker	6 (0,2 %)
	N-terminaler Anker	128 (4,2 %)

Nur die 128 sekretierten Proteine sollten mit der in dieser Arbeit verwendeten Methodik direkt nachweisbar sein. Die übrigen Proteine sind membranassoziiert oder kovalent an die Zellwand gebunden und sollten dementsprechend nur in entsprechenden Subproteomen (Membranproteom, bzw. Zellwandproteom) nachweisbar sein.

In dieser Arbeit konnten unter verschiedenen Bedingungen insgesamt 150 verschiedene Proteine im Exoproteom von *Cmm* identifiziert werden, 52% (78) dieser Proteine tragen laut den Vorhersagen mehrerer Programme ein Signalpeptid und sollten extrazellulär lokalisiert sein, die übrigen 48% (72) Proteine tragen kein konventionelles Signalpeptid und erfüllen in den meisten Fällen cytoplasmatische Funktionen. Von den 78 extrazellulären Proteinen (Tab. 11) werden über 70% über das Sec-System exportiert und je nach der Signalpeptidase (SP), die das Protein prozessiert, kovalent in der Membran verankert (SPII), nicht-kovalent an die Membran gebunden oder ins Medium ausgeschleust (SPI). Ein geringer Anteil, nämlich nur die Proteine NagA, CMM_0338, 2252, 1389, 0631, 0429, 1480, 2177, 0430, 0464 (Vorhersage nach TatFIND 1.4) weisen das Tat-Signalpeptid auf. Für ein Protein, die 5'-Nukleotidase, wurde eine Verankerung über das LPXTG Motiv durch Sortasen von *Cmm* in der Zellwand vorhergesagt.

Alle Proteine aus der Kategorie „extrazelluläre Proteine“ bis auf drei Ausnahmen werden von LocateP als sekretiert vorhergesagt und auch im Exoproteom gefunden. Die Ausnahmen (SbtB, SbtC und CeaA) sind prozessierte Proteine, wobei zu mindestens bei SbtC die Vorhersage wahrscheinlich falsch ist, da bei den charakterisierten Mitgliedern der Familie eine N-terminale Prozessierung auftritt (Janzik *et al.*, 2000). In der Gruppe der Transporter sind fast alle Proteine (18 von 20 identifizierten) als membranassoziiert vorhergesagt, in den meisten Fällen über eine kovalente Verknüpfung durch das Lgt/Lnt-System. Da alle experimentell gefundenen Transportproteine nur in geringen Mengen auftraten, kann ein partielles Wegdiffundieren vor der kovalenten Verknüpfung die Ursache sein. Alternativ könnten in geringen Mengen kovalent gebundene Proteine in Kultur oder während der Aufarbeitung von der Membran gelöst werden.

Tab. 11. Auflistung aller im *Cmm*-Überstand identifizierter Proteine mit den entsprechenden Signalpeptiden und der sie prozessierenden Signalpeptidasen (SPI/SPII).

GenDB-ID	Gen-name	mögliche Funktion	MW	pI	Membran-assoziert	Vorhersage (LocateP /TatFIND)
I. Energie- und Kohlenstoffmetabolismus						
I.1 Glycolyse						
CMM_0049	<i>nagA</i>	β -N-Acetylglucosaminidase	63 302	5,95	-	Tat ^{a,b}
CMM_1842	<i>ctaC</i>	Cytochrome c Oxidase, Untereinheit 2	30 354	4,81	+	Sec-(SPII)
II. Zelluläre Prozesse						
II.2 Zellwand						

CMM_0017	<i>pbpA</i>	Penicillin-Bindeprotein	46 307	4,54	-	Sec-(SPI)
CMM_0464	-	Nucleosid-Diphosphat-Zucker-Epimerase	30 463	5,62	+	Sec-(SPI)/Tat ^a
CMM_0430	-	hypothetisches, sekretiertes Protein, Zelloberflächenprotein	59 402	6,08	+	Sec-(SPI)/Tat ^a
CMM_0915	<i>pbpC</i>	Penicillin-Bindeprotein	75 440	5,19	-	Sec-(SPI)
CMM_0919	<i>pbpD</i>	Penicillin-Bindeprotein	84 124	5,01	+	Sec-(SPI)
CMM_0931	<i>pbpE</i>	D-Alanyl-D-Alanin-Carboxypeptidase	43 874	5,05	-	Sec-(SPI)
CMM_1022	<i>wcqK</i>	sekretiertes Protein	59 456	6,25	-	Sec-(SPI)
CMM_1126	-	extrazelluläre 5'-Nucleotidase	69 583	4,3	-	Sec(SPI) LPxTG
CMM_1865	<i>ftsI</i>	Peptidoglycan-Glycosyltransferase/ Penicillin-Bindeprotein	58 579	4,70	+	Sec-(SPI)
CMM_2067	<i>dacB</i>	D-Alanyl-D-Alanin-Carboxypeptidase	48 142	4,79	+	Sec-(SPI)??
CMM_2169	-	Oberflächenprotein, RTX Toxin	200 894	4,42	+	Sec-(SPI)
pCM2_0035	<i>rhsA</i>	Rhs ähnliches Protein	114 585	5,2	-	Sec-(SPI)
IV. Potentiell relevant für die phytopathogene Interaktion						
IV.1 Transporter						
CMM_0363	-	Fe ³⁺ -Hydroxamat ABC Transporter, Substratbindeprotein	34 212	4,31	+	Sec-(SPII)
CMM_0435	<i>fepB</i>	Eisen-Siderophor ABC Transporter, Substratbindeprotein	31 414	4,15	+	Sec-(SPII)
CMM_0799	<i>bldKB</i>	Oligopeptid ABC Transporter, Substrat-bindendes Lipoprotein	56 348	4,49	+	Sec-(SPII)
CMM_0866	-	α-Glucosid ABC Transporter, Substratbindeprotein	44 897	4,09	+	Sec-(SPII)
CMM_0879	-	Zucker ABC Transporter, Substratbindeprotein	36 473	4,32	+	Sec-(SPII)
CMM_0956	-	Peptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	49 713	4,44	+	Sec-(SPII)
CMM_0976	-	ABC Transporter, Substratbindeprotein	34 905	4,05	+	Sec-(SPII)
CMM_1478	-	Oligopeptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	54 797	4,32	+	Sec-(SPII)
CMM_1587	-	Oligopeptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	54 484	4,14	+	Sec-(SPII)
CMM_1703	-	Glycin/Betain ABC Transporter, Substratbindeprotein	32 046	4,14	+	Sec-(SPII)
CMM_1960	-	Peptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	55 020	4,33	+	Sec-(SPII)
CMM_2006	<i>gluB</i>	Glutamat ABC Transporter, Substratbindeprotein	29 491	4,16	+	Sec-(SPII)
CMM_2033	-	konserviert hypothetisches Protein, ?? Protein Export	33 950	4,04	-	Sec-(SPI)
CMM_2176	-	konserviertes, sekretiertes Lipoprotein	39 470	4,15	+	Sec-(SPII)
CMM_2177	-	Fe-abhängige Peroxidase	46 262	5,34	+	Sec-(SPI)/Tat ^{a,b}
CMM_2185	-	Peptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	63 844	4,26	+	Sec-(SPII)

CMM_2283	-	Metall ABC Transporter, Substratbindeprotein	27 877	4,14	-	Sec-(SPI)
CMM_2420	-	Peptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	49 561	4,45	+	Sec-(SPII)
CMM_2628	-	polare Aminosäuren ABC Transporter, Substratbindeprotein	25 605	4,18	+	Sec-(SPII)
CMM_2941	-	Metall ABC Transporter, Substratbindeprotein	29 289	4,15	+	Sec-(SPII)
IV.3 Regulatoren						
CMM_0560	-	Transkriptionsregulator	37 059	4,47	-	Sec-(SPI)
IV.6 Extrazelluläre Enzyme						
CMM_0039	<i>chpE</i>	extrazelluläre Serin-Protease, S1A- Familie	26 467	6,77	-	Sec-(SPI)
CMM_0042/ 0050	<i>ppaB1/2</i>	extrazelluläre Serin-Protease	31 593	4,54	-	Sec-(SPI)
CMM_0044	<i>ppaC</i>	extrazelluläre Serin-Protease	29 676	5,97	-	Sec-(SPI)
CMM_0052	<i>chpC</i>	extrazelluläre Serin-Protease, S1A- Familie (Chymotrypsin)	27 997	7,04	-	Sec-(SPI)
CMM_0071	<i>ppaE</i>	extrazelluläre Serin-Protease	28 162	5,96	-	Sec-(SPI)
CMM_0764	<i>ppaF</i>	extrazelluläre Serin-Protease	26 730	6,23	-	Sec-(SPI)
CMM_0795	-	extrazelluläre Nuclease/Phosphatase	69 417	4,81	-	Sec-(SPI)
CMM_0840	-	sekretiertes Protein, NPL/P60- Familie	42 458	4,72	-	Sec-(SPI)
CMM_1480	<i>expA</i>	Expansin	21 700	6,31	-	Sec- (SPI)/Tat ^a
CMM_1673	<i>xysA</i>	Endo-1,4- β -Xylanase A	41 265	5,06	-	Sec-(SPI)
CMM_1942	<i>ppaG</i>	extrazelluläre Serin-Protease	30 240	4,95	-	Sec-(SPI)
CMM_1947	<i>ppaH</i>	extrazelluläre Serin-Protease	30 384	4,23	-	Sec-(SPI)
CMM_1948	<i>ppaI</i>	extrazelluläre Serin-Protease	30 066	4,23	-	Sec-(SPI)
CMM_2535	<i>sbtB</i>	Subtilisin-ähnliche Serin-Protease, Peptidase-Familie S8A	117 082	4,29	+	Sec-(SPI)
CMM_2536	<i>sbtC</i>	Subtilisin-ähnliche Serin-Protease, Peptidase-Familie S8A	115 572	5,08	+	Sec-(SPII)
CMM_2692	-	Endoglukanase	44 147	8,69	-	Sec-(SPI)
CMM_2871	<i>pgaA</i>	Polygalakturonase	45 359	5,04	-	Sec-(SPI)
pCM1_0020	<i>celA</i>	Cellulase	72 030	6,29	+	Sec-(SPI)
pCM1_0023	<i>ppaJ</i>	extrazelluläre Serin-Protease	30 812	5,91	-	Sec-(SPI)
pCM2_0052	<i>phpB</i>	extrazelluläre Serin-Protease	26 123	9	-	Sec-(SPI)
pCM2_0053	<i>phpA</i>	extrazelluläre Serin-Protease	26 673	8,96	-	Sec-(SPI)
pCM2_0054	<i>pat-1</i>	extrazelluläre Serin-Protease	26 195	7,73	-	Sec-(SPI)
IV.7 Intrazelluläre Proteasen						
CMM_0638	-	Membran-Metalloendopeptidase, Subfamilie M23B	41 207	5,61	-	Sec-(SPI)
CMM_0839	-	membrangebundene Metalloprotease	40 463	4,79	-	Sec-(SPI)
CMM_2260	-	Serin-Peptidase, S8-Familie	38 854	4,84	+	Sec-(SPI)
V.2 Funktion unbekannt						
CMM_0132	-	konserviertes, sekretiertes Protein	41 359	5,47	-	Sec-(SPI)
CMM_0144	-	konserviertes, sekretiertes Protein	30 251	4,26	+	Sec-(SPII)

CMM_0337	-	konserviertes, sekretiertes Protein, Carboxypeptidase oder PBP	41 773	4,29	+	Sec-(SPI)
CMM_0338	-	konserviertes, sekretiertes Protein, PBP	40 651	4,96	-	Sec-(SPI)/Tat ^{a,b}
CMM_0429	-	konserviertes, sekretiertes Protein, ? Zelloberflächenprotein	22 951	5,57	+	Sec-(SPI)/Tat ^a
CMM_0466	-	konserviertes, sekretiertes Protein	27 175	3,13	+	Sec-(SPII)
CMM_0631	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	12 094	5,64	+	Sec-(SPI)/Tat ^a
CMM_1081	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	41 246	5,51	+	Sec-(SPI)
CMM_1215	-	konserviertes, sekretiertes Protein, ? Zelloberflächenprotein	111 952	5,43	-	Sec-(SPI)
CMM_1389	-	konserviertes, sekretiertes Protein	18 169	5,2	-	Sec-(SPI)/Tat ^{a,b}
CMM_1557	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	24 878	4,69	-	Sec-(SPI)
CMM_1675	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	12 941	8,65	-	Sec-(SPI)
CMM_1872	-	konserviert hypothetisches Protein, Peptidoglycan-bindend, LysM-Dom.	37 369	9,2	-	Sec-(SPI)
CMM_1921	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	22 332	5,15	-	Sec-(SPI)
CMM_2043	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	28 210	5	-	Sec-(SPI)
CMM_2204	-	konserviertes, sekretiertes Protein, Glycosyl-Hydrolase mit Sensor-Domäne	93 131	4,55	+	Sec-(SPI)/Tat ^b
CMM_2250	-	hypothetisches Membranprotein, Zelloberflächenprotein	69 436	9,19	+	Sec-(SPI)
CMM_2252	-	konserviertes, sekretiertes Protein	27 323	4,9	-	Sec-(SPI)/Tat ^{a,b}

^a Vorhersage nach TatFIND 1.4

^b Vorhersage nach LocateP

Die Sekretion von Proteinen ohne ein konventionelles Signalpeptid ist schon für mehrere Organismen beschrieben worden, z.B. für GlnA und EF-Tu (Bendtsen *et al.*, 2005). Die meisten der 72 *Cmm*-Proteine, die extrazellulär gefunden wurden aber eigentlich cytoplasmatisch lokalisiert sein sollten, bildeten nur sehr schwache Spots, so dass ihre Präsenz im Überstand wohl tatsächlich auf eine geringe Anzahl lysierter Zellen während der Kultivierung oder Probenaufbereitung zurückgeführt werden kann. Dagegen lagen folgende Proteine im Überstand in relativ hohen Mengen vor und wurden unabhängig von den Anzuchtbedingungen in nahezu jedem Gel identifiziert: die Elongationsfaktoren EF-Tu, G, die Chaperone DnaK, GroEL, TigA, die GAPDH, die Aconitathydratase, und die Acetylxylosterase (CMM_2688). Die parallele Auftrennung extrazellulärer und intrazellulärer Proteome mehrerer Proben zeigte, dass diese Proteine meistens auch

intrazellulär in großen Mengen vorliegen und daher in größeren Mengen aus den lysierten Zellen austreten könnten. Es gibt auch Untersuchungen, die belegen, dass einige dieser cytoplasmatischen Proteine aufgrund der Änderung der zellulären Lokalisation die sogenannten „moonlighting“ Proteine sind, die mehr als eine Funktion in der Zelle haben (Bendtsen *et al.*, 2005). Über den EF-Tu Elongationsfaktor wird spekuliert, dass er am Aufbau fibrillärer Strukturen des Cytoskelets in Prokaryoten beteiligt sein könnte (Mayer, 2003).

Da in Gram-positiven Bakterien kein spezialisiertes Sekretionssystem für Virulenzfaktoren vorhanden zu sein scheint (wie z.B. das Typ III-Sekretionssystem, das für die Injektion von Virulenzfaktoren direkt in den Wirt verantwortlich ist, aber auch das Typ VI-SS), sollten die die beiden generellen Proteintransportsysteme, das Sec- und das Tat-System, in *Cmm* auch an der Translokation von Virulenzfaktoren beteiligt sein, was durch entsprechende Vorhersagen der Computerprogramm SignalP, bzw. TatFIND für die potentiellen Virulenzfaktoren unterstützt wird.

Zur experimentellen Verifikation der Computervorhersagen wurden versucht, in den beiden Sekretionssystemen „Knock out“-Mutanten zu konstruieren, und die Auswirkungen dieser Mutationen auf das bakterielle Wachstum, den Proteinexport und die Virulenz zu untersuchen. Im Sec-System wurden das *secG*-Gen und im Tat-System das *tatB*-Gen durch die Insertion einer Antibiotikaresistenzkassette inaktiviert. Beide Gene kodieren jeweils eine Komponente des Translokationsapparats. Allerdings könnten diese Sekretionssysteme (auch die ausgewählten Proteine) für das bakterielle Wachstum essentiell sein, vor allem aufgrund des Sec-vermittelten Exports der Substratbindeproteine von ABC-Transportern, die zur bakteriellen Nährstoffversorgung notwendig sind. Ist das der Fall, ist die Konstruktion der Mutanten unmöglich, da der resultierende Phänotyp letal ist.

Ist die Mutation nicht letal, kann sie zur Klärung verschiedener Fragestellungen herangezogen werden. Über Wachstumstests kann die Auswirkung der Mutation auf das bakterielle Wachstum oder allgemein die bakterielle „fitness“ festgestellt werden. Exoproteomvergleiche zwischen den Mutanten und dem Wildtyp erlauben Aussagen über den Effekt, den die Mutation auf den Proteinexport hat und ermöglichen die Identifizierung der über das entsprechende System sekretierten Proteine. Die anschließende Untersuchung des Pathogenitätsverhaltens der Mutanten *in planta* und die sich daraus möglicherweise resultierende Änderung der Virulenz können mit dem Sekretionsdefekt korrelieren und zur Identifizierung möglicher Virulenzfaktoren führen. Die Rolle dieser neu identifizierten Virulenzfaktoren in der Pathogenität kann dann auf dem klassischen Weg über „Knock out“-Mutanten und ihre Untersuchungen *in planta* verifiziert werden.

1. Inaktivierung der *secG*- und *secY*-Gene durch Insertionsmutagenese

Am Aufbau des Sec-Systems von *Cmm* könnten sechs Proteine (SecA, D, E, F, G, Y) beteiligt sein. Die Präproteine könnten von der SecA-Komponente gebunden werden, die durch die wiederholten Zyklen der ATP-Spaltung die Insertion und die Translokation des ungefalteten Proteins durch den Membran-verankerten SecYEG-Kanal katalysiert. In *E. coli* und *B. subtilis* stellen die SecY und die SecE-Proteine die essentiellen Komponenten des Translokons dar, während das SecG-Protein eher akzessorische Funktion übernimmt und für die Proteintranslokation und das Zellwachstum nicht essentiell ist. In vielen Studien an Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien wurde bestätigt, dass SecG die Effizienz der Proteintranslokation durch den SecYE-Kanal erhöht und dies vor allem bei niedrigen Temperaturen der Fall ist (Sibbald *et al.*, 2010).

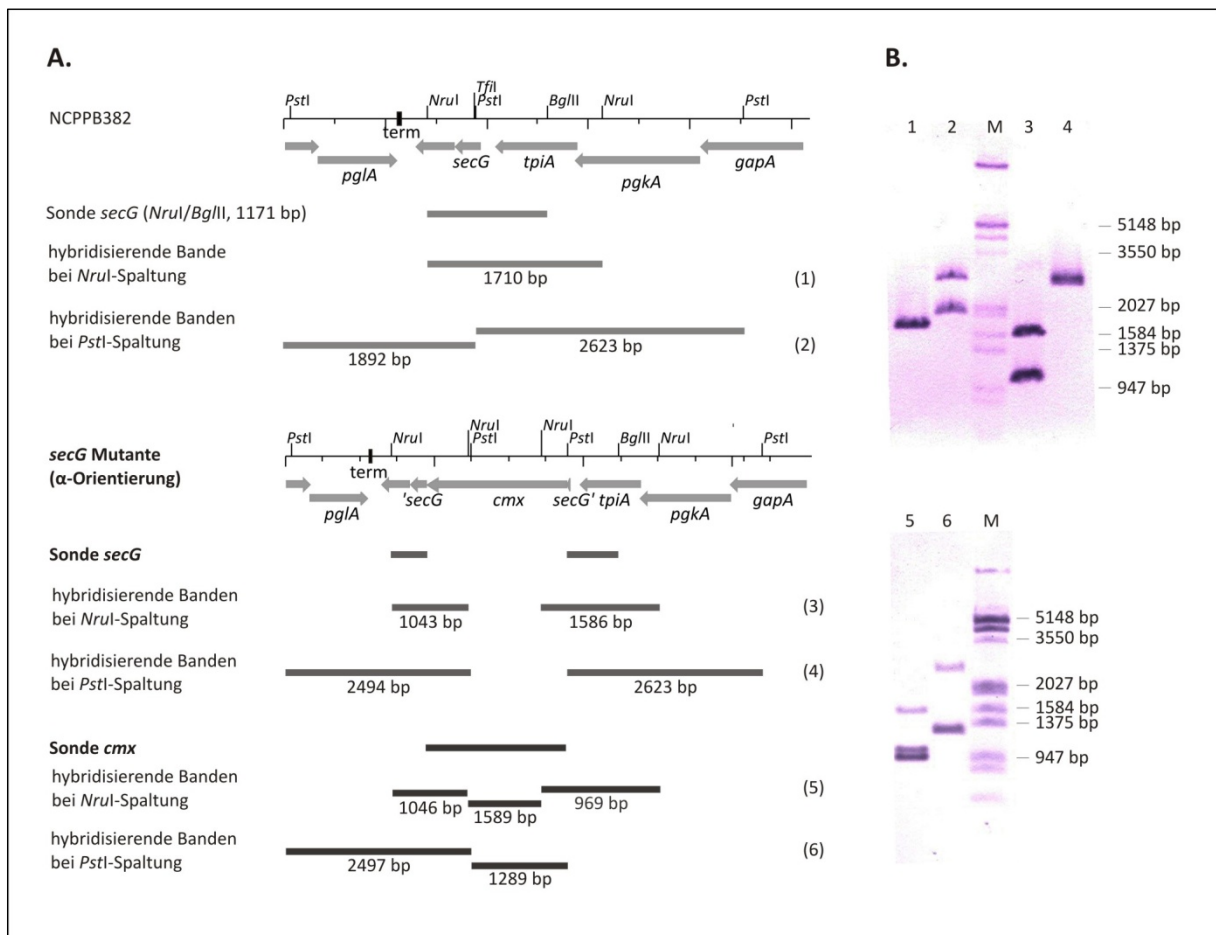


Abb. 20. (A) Physikalische Karte der *secG*-Genregion, die Sonden sowie das zu erwartende Hybridisierungsmuster der Mutante und des Wildtyps. (B) Southern Hybridisierung der *NruI*- bzw. *PstI*-gespaltener Gesamt-DNA des Wildtyps mit der *secG*-Sonde (Spur 1,2) und der Mutante mit der *secG*-Sonde (Spur 3,4) und *cmx*-Sonde (Spur 5,6), Digoxigenin-11-dUTP-markierter *EcoRI*/*HindIII*-gespaltener λ -Marker (M).

Zur Inaktivierung des *secG*-Gens wurde ein 1,9 kb großes *Bsa*I-Fragment aus pEC70, das die *cmx*-Kassette enthält, in die singuläre *Tfi*I-Schnittstelle im *secG*-Gen inseriert. Die durch *Tfi*I erzeugten 5'-Überhänge wurden vor der Ligation durch eine Klenow-Polymerase aufgefüllt. Die Mutageneseplasmide pHT*secG* α und pHT*secG* β , die die *cmx*-Kassette entweder in der gleichen oder der entgegengesetzten Orientierung zum Gen *secG* enthalten, wurden in kompetente Zellen des Stammes NCPPB328 elektroporiert.

Cm-resistente Klone wurden durch die Southern Hybridisierung auf den korrekten Austausch des Zielgens durch die *cmx*-Kassette überprüft. Die Klone, die kein Signal mit der pUC-Sonde lieferten, wurden gegen die *secG* und schließlich die *cmx*-Sonde hybridisiert. Die Hybridisierung der *Nru*I bzw. *Pst*I-gespaltener Gesamt-DNA des Wildtyps und der CMM*secG* α -Mutante zeigte das gewünschte Bandenmuster und bewies den korrekten Genaustausch (Abb.20).

Die Inaktivierung des *secY*-Gens, das vollständig auf dem cmis3p0005c06 lokalisiert ist, erfolgte durch den Austausch eines 1017 bp großen *Pvu*II-Fragmentes im Gen durch die *Bsa*I/*Kpn*I ausgeschnittene *cmx*-Kassette aus pEC70. Die Insertion der *cmx*-Kassette erfolgte in der gleichen Orientierung zum Gen. Die Elektroporation des Mutageneseplasmids pHT*secY* α und die anschließende Hybridisierung der *Nru*I-gespaltener Gesamt-DNA führten zur Identifizierung zahlreicher Cm-resistenter Klone, die alle ein Cointegrat mit pUC gebildet hatten. Obwohl mehr als 70 Klone in Vergleich zu den 34 Klonen der *tatB*- oder 50 Klonen der *secG*-Mutanten getestet wurden, konnte kein *Cmm*-Klon identifiziert werden, bei dem ein „doublecrossover“ stattgefunden hatte und das intakte gegen das inaktivierte *secY*-Gen ausgetauscht war. Dies unterstützt die Vermutung, dass SecY eine essentielle Komponente des Sec-Systems bildet und die Deletion des entsprechenden Gens einen letalen Phänotyp erzeugt (Flower, 2001).

2. Inaktivierung des *tatB*-Gens durch Insertionsmutagenese

Die Tat-Translokase von *Cmm* sollte aus den drei Membranproteinen TatA, TatB und TatC aufgebaut sein und für den Transport von 47 Proteinen, für die das „twin arginine“-Motiv in der Signalpeptidsequenz vorhergesagt wurde (s. Anhang, S. 169, Tab. 2), zuständig sein. Um diese Vorhersagen zu verifizieren, wurde die putative TatB-Komponente des Translokons inaktiviert und der Effekt dieser Inaktivierung auf den Export extrazellulärer Proteine und die Virulenz in der Pflanze untersucht.

Die Inaktivierung des *tatB*-Gens, das komplett auf dem cmis3p0015f08-Plasmid lokalisiert ist, erfolgte durch die Restriktion des Sequenzierklons mit *Msc*I-Endonuklease, das „blunt ends“ erzeugt und der anschließenden Insertion der aus pEC70 mit *Bsa*I/*Kpn*I-ausgeschnittenen *cmx*-Kassette, das ebenfalls von „blunt ends“ flankiert ist. Die anschließende

Elektroporation, Selektion der *Cmm*-Klone auf Chloramphenicol-haltigen Medium und Hybridisierung lieferten eine korrekte *CMMtatBα*-Mutante (Abb. 21). Die zusätzlichen Fragmente, die mit der Gensonde hybridisieren, tauchen sowohl bei dem Wildtyp als auch der Mutante auf und deuten auf eine Kreuzhybridisierung mit einem anderen Gen hin.

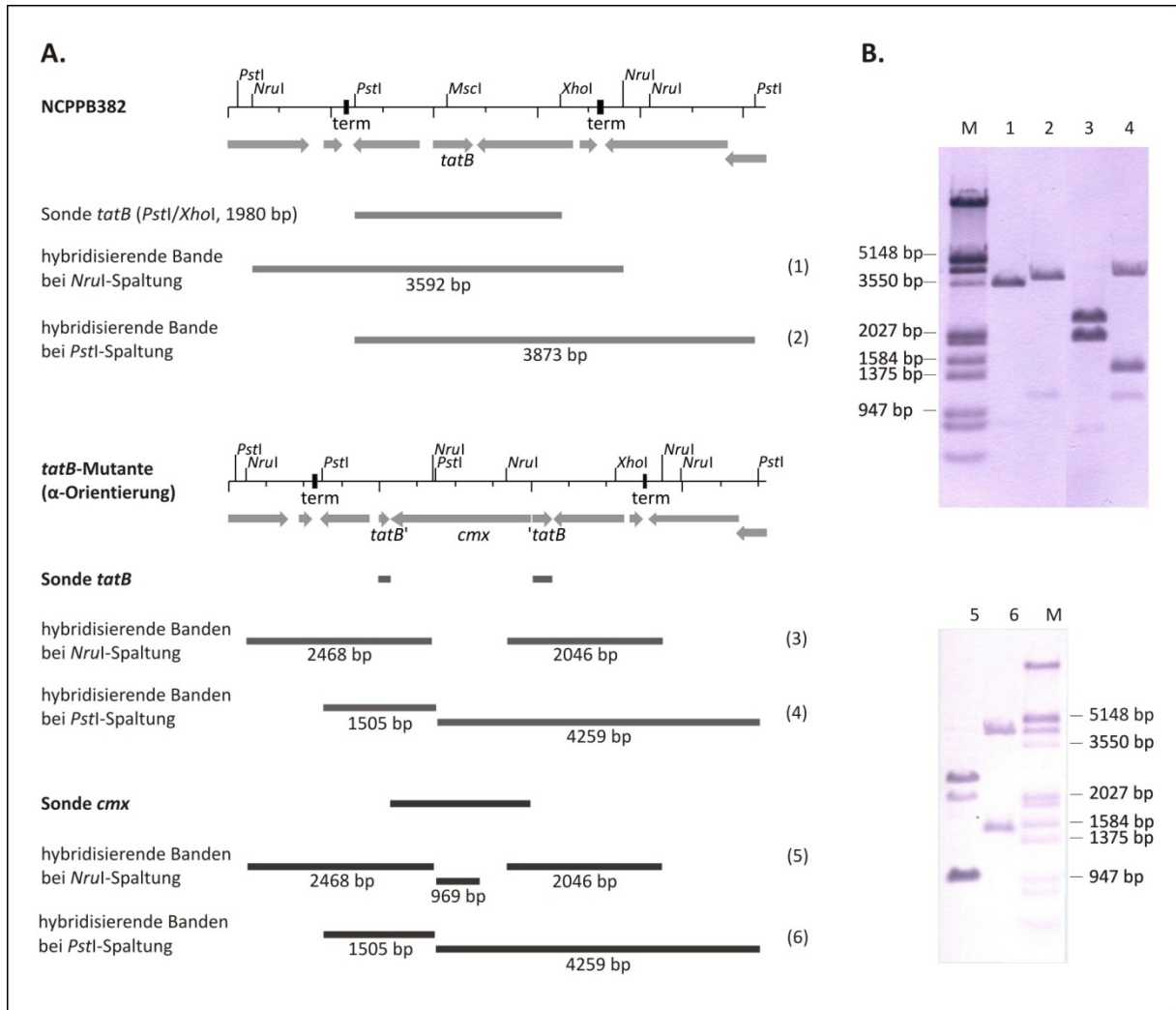


Abb. 21. (A) Physikalische Karte der *tatB*-Genregion, die Sonden sowie das zu erwartende Hybridisierungsmuster der Mutante und des Wildtyps. (B) Southern Hybridisierung der *NruI*- bzw. *PstI*-gespaltener Gesamt-DNA des Wildtyps mit der *tatB*-Sonde (Spur 1,2) und der Mutante mit der *tatB*-Sonde (Spur 3,4) und *cmx*-Sonde (Spur 5,6), Digoxigenin-11-dUTP-markierter *EcoRI/HindIII*-gespaltener λ -Marker (M).

Dass die Konstruktion von „Knock out“-Mutanten in *TatB* und *SecG* überhaupt möglich war, zeigt, dass die beiden Transportsysteme (und die inaktivierten Proteine) in *Cmm* wahrscheinlich nicht essentiell sind.

3. Charakterisierung des SecG-Proteins von *Cmm* NCPPB382

Die Inaktivierung eines Gens kann das Wachstum der Mutante im Vergleich zum Wildtyp stark beeinträchtigen. Um festzustellen, ob die Deletion des *secG*-Gens sich negativ auf das Wachstum auswirkt, wurde die Mutante zunächst auf ihr Wachstumsverhalten in verschiedenen Flüssigmedien untersucht. Beim Vergleich der Wachstumsverläufe auf Voll- bzw. Minimalmedium zeigt die Mutante ein ähnlich gutes Wachstum in der log-Phase, mit dem Unterschied, dass beim Übergang von der log- in die stationäre Phase der maximale o.D.₅₈₀-Wert des Wildtyps nicht erreicht wird und immer um etwa eine Einheit abweicht (Abb.22: A; B). Auch auf Platten zeigt die *secG*-Mutante verlangsamtes Wachstum.

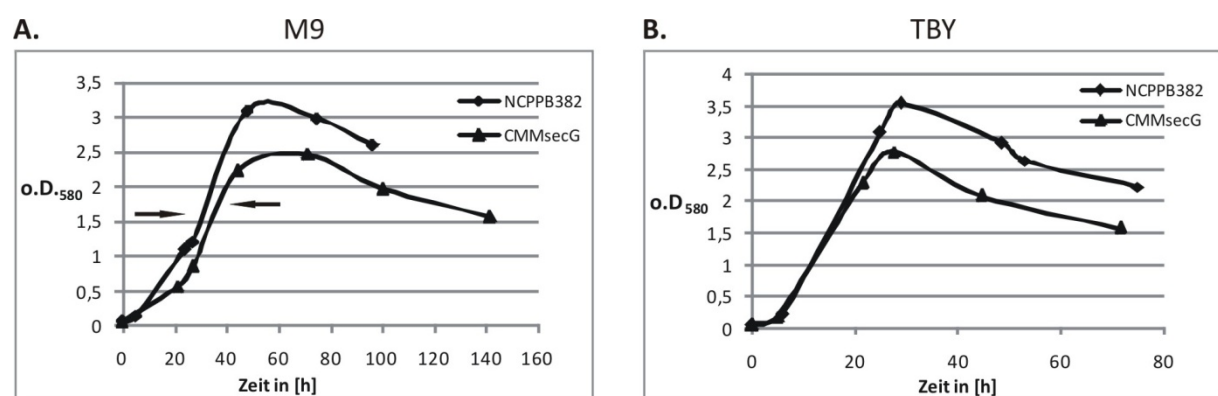


Abb. 22. (A, B) Das Wachstum von CMMsecG in M9-Medium und TBY in Vergleich zum Wildtyp NCPPB382. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Probenentnahme für die Proteinisolierung aus dem Kulturüberstand.

Um den Effekt, den die *secG*-Mutation auf die Proteinsekretion hat, zu bestimmen, wurde die Mutante unter den gleichen Bedingungen wie der Wildtyp in Minimalmedium angezogen und die Kulturüberstände von mindestens drei verschiedenen unabhängig voneinander angezogenen Kulturen gesammelt. Die Kulturüberstände 32h-alter Kulturen wurden lyophilisiert und zur Proteinisolierung eingesetzt. Nach der Auftrennung des extrazellulären Proteingemisches im 2D-SDS-PAGE und Färbung mit CBB G-250 (s. Anhang S. 162, Abb. 19) konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der exprimierten Proteine festgestellt werden. Die zuvor beim Wildtyp identifizierten Proteine konnten auch im Expressionsprofil der *secG*-Mutante nachgewiesen werden. Allerdings fiel auf, dass die Menge einiger Proteine im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert war (Abb. 23). Am auffälligsten war die mengenmäßige Reduktion der meisten Vertreter der Ppa-Familie: PpaB1/B2, C, E, F, G, I und J, der pCM2-kodierten Pathogenitätsdeterminate Pat-1 und des ChpE-Proteins, eines Vertreters der in der Pathogenitätsinsel kodierten Chp-Familie. Über PpaH kann keine Aussage gemacht werden, da es schon im Wildtyp nur in geringen Mengen auftaucht. Weniger drastisch, aber dennoch deutlich war die mengenmäßige Reduktion der Proteine

CMM_0144, CMM_0839, CMM_0866. Bei anderen Proteinen wie XysA, NPL/P60, CelA, für die ebenfalls ein putatives Sec-System abhängiges Signalpeptid vorhergesagt ist, wurde ebenfalls eine allerdings nicht so starke Reduktion in der Menge festgestellt. Proteine wie CMM_0338 bzw. EF-Tu und GAPDH, die über das Tat-System ausgeschleust werden, bzw. cytoplasmatisch sein sollten, sind in ihren Mengen unverändert.

Untersuchungen mit 48h-alten Kulturüberständen der *secG*-Mutanten zeigten, dass die Menge des sekretierten Proteins allgemein zunimmt, das Level des Wildtyps aber nicht erreicht wird (Daten nicht gezeigt).

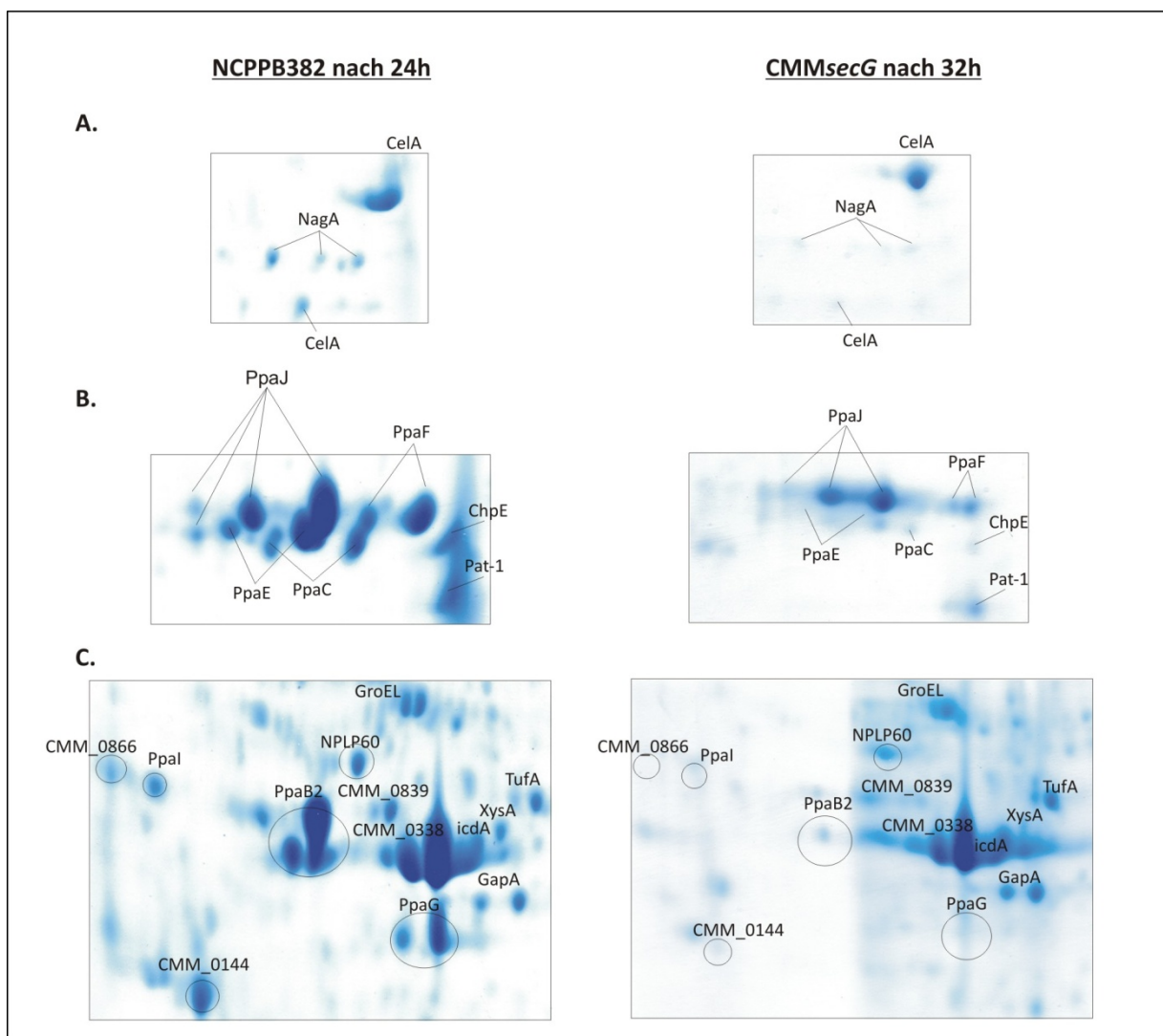


Abb. 23. Vergleich von Proteinexpressionsprofilen *secG*-Mutante und dem Wildtyp NCPB382 nach Isolierung der Proteine aus dem M9-Kulturüberstand. Dargestellt sind drei unterschiedliche Gelausschnitte (A, B, C).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Deletion des *secG*-Gens in *Cmm* die Proteinsekretion nicht vollständig blockiert, deren Geschwindigkeit/Effizienz aber deutlich verringert. Die deutlich reduzierte Sekretion mehrerer Serinpeptidasen der Ppa- und Chp-Familien sowie zahlreicher

anderer Proteine zeigt einerseits, dass diese Proteine Sec-System-abhängig sekretiert werden und andererseits, dass das SecG-Protein nicht essentiell für die Sekretion ist, diese aber effizienter macht.

4. Charakterisierung des TatB-Proteins von *Cmm* NCPPB382

Bei der Untersuchung, ob die Inaktivierung des *tatB*-Gens Auswirkungen auf das Wachstum der Mutante in verschiedenen Flüssigmedien hat, konnte eine deutliche Wachstumsreduktion sowohl auf dem Voll- als auch dem Minimalmedium beobachtet werden. Beim Wachstum der Mutante auf Minimalmedium liegt die maximal erreichte o.D.₅₈₀ bei 1,75 im Vergleich zu 3,25 beim Wildtyp und die mittlere log-Phase wird erst nach ca. 72h (Wildtyp 24h) erreicht (Abb. 24A). Bei Wachstum auf Vollmedium wird der Wachstumsdefizit noch deutlicher, die maximale erreichte o.D.₅₈₀ liegt mit höchstens 0,5 deutlich unter der des Wildtyps (3,5) (Abb. 24B). Eine Supplementierung des Vollmediums (TBY) mit Glukose hatte eine Verbesserung des Wachstums zur Folge, allerdings wurde das Level des Wildtyps nicht erreicht (Abb. 24C).

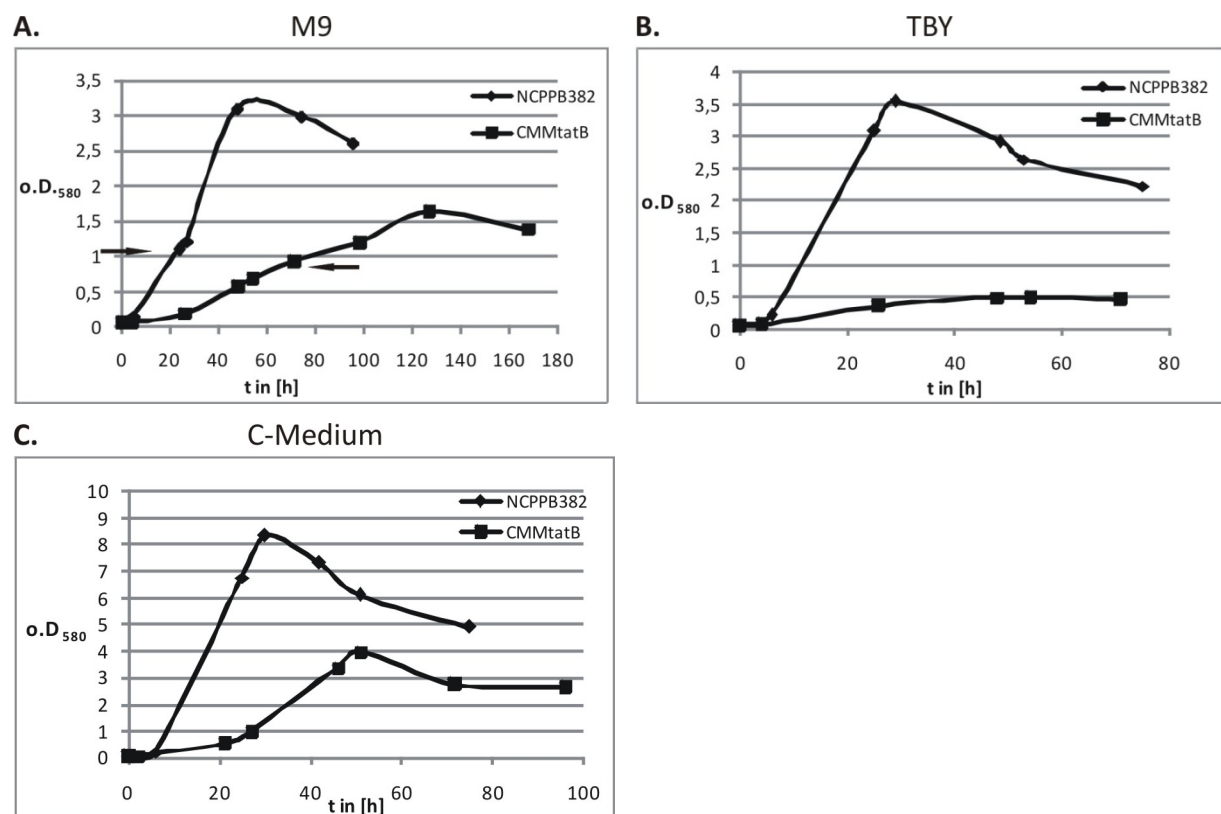


Abb. 24. Das Wachstum von CMMtatB in M9- (A), TBY- (B), C-Medium (C) in Vergleich zu dem Wildtyp NCPPB382. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Probenentnahme für die Proteinisolierung aus dem Kulturüberstand.

Die Inaktivierung des *tatB*-Gens scheint einen drastischen Effekt auf die Sekretion von Proteinen zu haben, die für den bakteriellen Stoffwechsel von Bedeutung sind. Um zu ermitteln, welche Proteine durch die Deletion des *tatB*-Gen in der Sekretion betroffen sind, wurden Exoproteomanalysen durchgeführt. Um die Proteinisolierung der Mutante aus annähernd gleicher Wachstumsphase wie beim Wildtyp durchzuführen, wurden die Kulturen 72h lang in M9-Minimalmedium angezogen und die lyophilisierten Kulturüberstände zur Proteinisolierung eingesetzt (s. Anhang S. 161, Abb. 18). Nach dem Vergleich der Expressionsprofile mehrerer unabhängig voneinander angezogener Kulturen des Wildtyps und der Mutante, konnte gezeigt werden, dass die Mutante zwei Proteine, die N-Acetylglucosaminidase NagA (CMM_0049) und CMM_0338, ein Protein noch unbekannter Funktion nicht mehr sekretiert (Abb. 25). Dieses Ergebnis bestätigt die vorhergesagten Tat-Signalpeptide dieser Proteine. Außerdem war das Protein CMM_0429, das als Zelloberflächenprotein mit Tat-Signalpeptid annotiert ist, nicht nachweisbar. Da dieses Protein allerdings auch in NCPPB382 nur in etwa der Hälfte der Gele gefunden wurde, bleibt ein Transport über das Tat-System unsicher. Das Protein liegt an etwa derselben Position im Gel wie die nach Vorhersage nicht sekretierte Hydrolase CMM_2467, die in den restlichen Gelen des Wildtyps und auch in der *tatB*-Mutante identifiziert wurde.

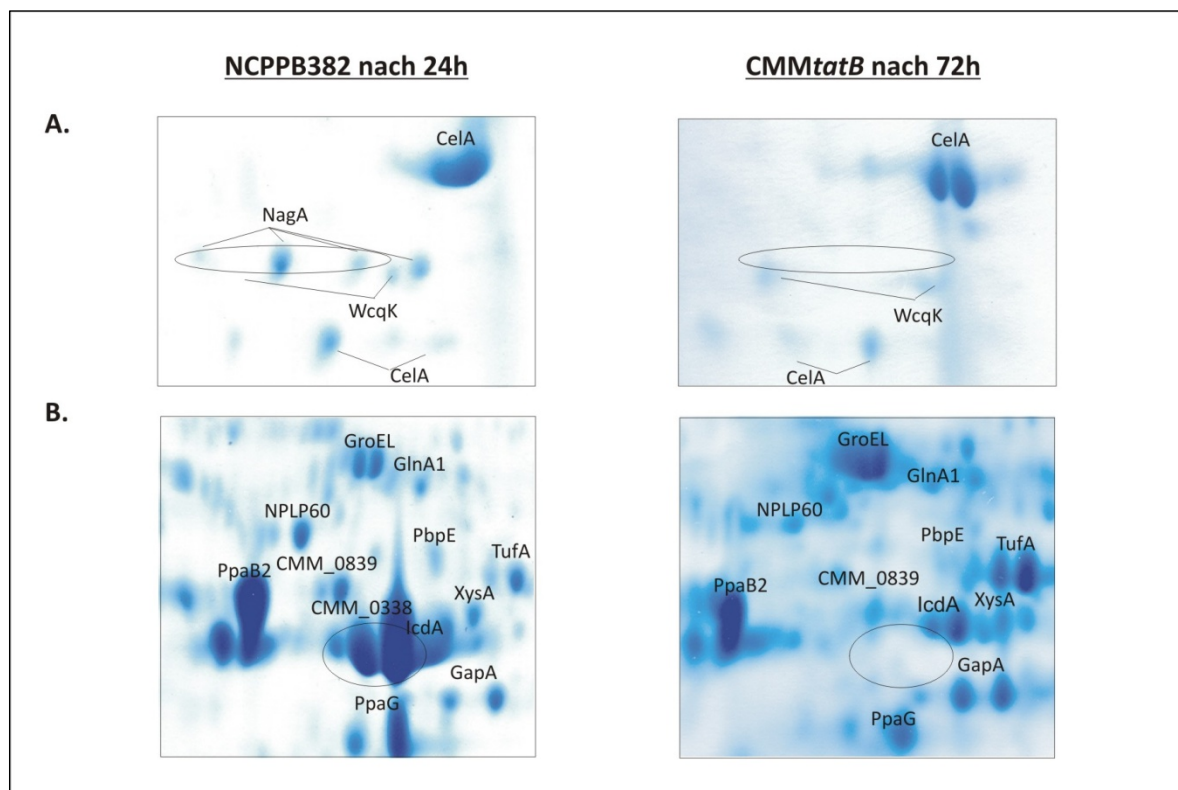


Abb. 25. Vergleich von Proteinexpressionsprofilen der *tatB*-Mutante und dem Wildtyp NCPPB382 nach Isolierung der Proteine aus dem M9-Kulturüberstand. Nachweis über den Verlust der Sekretionsfähigkeit der Proteine NagA (A) und CMM_0338 (B) über den Tat-abhängigen Sekretionsweg.

Die Deletion des *tatB*-Gens und dadurch das Fehlen von NagA und CMM_0338 im Exoproteom, lassen schließen, dass das TatB-Protein in *Cmm* eine für den Aufbau des Translokasekomplexes essentielle Komponente darstellt.

Insgesamt sollen 47 Proteine von *Cmm* ein Tat-Signalpeptid enthalten. Unter diesen sind mehrere Proteine, die an Energie- und Kohlenstoffmetabolismus oder der Zellwandbiogenese beteiligt sind. Die zwei größten Untergruppen bilden aber die 13 Substratbindeproteine (Tab. 12) verschiedener ABC-Transporter, von denen mehr als die Hälfte am Zuckertransport beteiligt sein sollten, und 19 hypothetische Proteine aus der Gruppe der unbekanntenen Funktion. Für das Expansin (CMM_1480) und eine potentielle Peroxidase (CMM_2177) konnte die Tat-abhängige Sekretion nicht bestätigt werden, da beide Proteine im Exoproteom der *tatB*-Mutante detektiert werden konnten. Die Tat-abhängige Sekretion anderer Proteine muss noch bestätigt werden, dennoch könnte der ausgeprägte Wachstumsdefizit der Mutante auf die Abwesenheit zahlreicher Substratbindeproteine oder anderer Proteine, deren Funktion noch unbekannt ist, basieren und ihre Tat-abhängige Sekretion indirekt bestätigen.

Tab. 12. 13 *Cmm*-Substratbindeproteine, die nach Vorhersage mit TatFIND1.4 über das Tat-System sekretiert werden.

Gen DB-ID	Genname	mögliche Funktion	RR-Motiv	hydrophobe Region (AS)	Score
CMM_1892	-	Polyamin ABC Transporter, Substratbindeprotein	PRRSLL	22	2.75
CMM_0108	-	Zucker ABC Transporter, Permease	RRRRPL	18	5.34
CMM_0109	-	Zucker ABC Transporter, Substratbindeprotein	RRRRPL	21	4.13
CMM_0196	-	Zucker ABC Transporter, Substratbindeprotein	TRRSLL	22	0.28
CMM_0270	-	Zucker ABC Transporter, Substratbindeprotein	ARRRLV	21	4.12
CMM_2106	-	Zucker ABC Transporter, Substratbindeprotein	SRRQAL	22	-0.76
CMM_2238	-	Zucker ABC Transporter, Substratbindeprotein	DRRSVL	18	2.46
CMM_2438	-	L-Arabinose ABC Transporter, Substratbindeprotein	SRRQIL	22	0.87
CMM_1532	<i>proX</i>	Prolin/Glycin/Betain/Cholin ABC Transporter, Substratbindeprotein	SRRALL	20	2.48
CMM_0166	<i>fhuD</i>	Fe ³⁺ -Siderophor ABC Transporter, Substratbindeprotein	TRRRTL	21	2.23
CMM_0941	-	MFS-Typ Efflux Transporter	PRRPLL	15	4.54
CMM_2177	-	mögliche Fe-abhängige Peroxidase	SRRGML	22	0.8
CMM_0238	-	Bicyclomycin Efflux MFS Permease	ARRGPL	17	5.89

5. Phänotypische Analyse der *secG*- und *tatB*-Mutanten im Pflanzentest

Das *secG*-Gen von *Cmm* kodiert eine für die Translokation nicht essentielle Komponente der Sec-Translokase. Dennoch muss ihre Inaktivierung einen Defekt verursachen, der sich in der deutlich schwächeren oder zeitlich verzögerten Sekretion einiger extrazellulärer Proteine widerspiegelt. Das *tatB*-Gen hingegen scheint eine essentielle Komponente zu kodieren, deren Fehlen zur kompletten Blockade mindestens eines Teils der über dieses System sekretierten Proteine führt. Zur Klärung der Frage, ob sich unter den von dem Sekretionsdefekt betroffenen Proteinen auch potentielle Virulenzfaktoren befinden, wurden Pflanzentests durchgeführt, in denen das Pathogenitätsverhalten der Transport-Mutanten mit dem des Wildtyps verglichen wurde.

Jede Mutante wurde in zwei unabhängigen, zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführten Pflanzentests mit jeweils 30 Pflanzen über einen Zeitraum von 4 Wochen getestet. Zwei Wochen alte Setzlinge wurden über Petiolusinfektion infiziert. Beide Mutanten enthalten sowohl pCM1 als auch pCM2 (Daten nicht gezeigt), und sollten hinsichtlich ihres Pathogenitätsverhaltens dem Wildtypstamm NCPPB382 entsprechen. Das Auftreten der Welkesymptome bzw. Sprossläsionen wurde täglich verfolgt und nach einem festgelegten Schema protokolliert. Nach Ablauf der vier Wochen wurde jede Pflanze etwa 1 cm über der Infektionsstelle abgeschnitten, gewogen und vermessen. Um die nicht infizierten Pflanzen aus der Auswertung auszuschließen, wurde der an der Schnittstelle austretende Xylemsaft entnommen und aufgetropft. Von den 30 infizierten Pflanzen wurden 10 zur Bestimmung des Bakterientiters homogenisiert. Da die Pflanzen sehr groß waren, wurden sie nicht komplett homogenisiert, sondern ein etwa 1 cm langes Stück des Sprosses, das sich etwa 1 cm über der Infektionsstelle befand. Diese Methode wurde in Israel etabliert und liefert die gleichen Ergebnisse wie beim Homogenisieren einer ganzen Pflanze (Chalupowicz *et al.*, 2010).

Tab. 13. Transportmutanten im Pflanzentest.

Stamm	Plasmid	Welkeindex	Titer [cfu/g Pflanze]
NCPPB382	pCM1,pCM2	10	$8,9 \cdot 10^9 \pm 2,1 \cdot 10^9$
CMM <i>secG</i> α	pCM1,pCM2	-	-
CMM <i>tatB</i> β	pCM1,pCM2	-	10^4 - 10^5

WI: Welkeindex, der Zeitraum in Tagen, nach dem 50% der infizierten Pflanzen eindeutige Symptome aufweisen. Titer: Mittelwerte von 10 homogenisierten Pflanzen, n=30

Nach Ablauf von vier Wochen waren die Pflanzen im Durchschnitt 50 cm groß, 30 g schwer und entsprachen vom Phänotyp her den nicht infizierten bzw. mit CMM100 infizierten Pflanzen. Wie in Tab. 13 dargestellt, konnten bei keiner der 30 jeweils mit der *secG*- oder der *tatB*-Mutanten infizierten Pflanzen Welkesymptome beobachtet werden. Die Pflanzen

blieben über die gesamte Testdauer und auch darüber hinaus symptomlos. Eine Reisolierung von *Cmm* aus den mit der *secG*-Mutante infizierten Pflanzen gelang sowohl beim Auftropftest als auch beim Mörsern der Pflanzen nicht. In keiner der 30 infizierten Pflanzen konnte *Cmm* nachgewiesen werden. Der durch die Mutation des *secG*-Gens ausgelöste Defekt im Proteintransport scheint so schwerwiegend zu sein, dass *Cmm* nicht mehr in der Lage ist, in der Tomate zu überleben oder sich auszubreiten. Im Gegensatz dazu war die Reisolierung von *Cmm* aus den mit der *tatB*-Mutante infizierten Pflanzen bei 29 von 30 Pflanzen erfolgreich. Der berechnete Titer der *tatB*-Mutante lag allerdings mit nur 10^4 - 10^5 cfu/g Pflanze deutlich (4-5 Potenzen) unter dem des Kontrollstammes NCPPB382 und deutete auf eine stark eingeschränkte Kolonisationsfähigkeit hin. Die Mutation des *tatB*-Gens verursacht einen schweren Wachstumsdefekt, so dass die reisolierten Zellen nur sehr schlecht und so langsam wuchsen (sehr kleine Kolonien, wobei über zwei Wochen immer wieder neue Kolonien auftauchten), dass auf eine genaue Titerbestimmung verzichtet wurde.

Die durchgeführten Tests sind aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Pflanzen nicht signifikant, bieten aber einen ersten Eindruck über die Rolle der Sekretionssysteme in der Pathogenität. Da die Inaktivierung des *secG*- bzw. *tatB*-Gens zu einem vollständigen Verlust bzw. einer deutlichen Reduktion der Kolonisationsfähigkeit führt, scheinen beide Systeme essentiell für den Transport von Proteinen zu sein, die zu mindestens für die Kolonisation und wahrscheinlich auch für die Ausprägung von Welkesymptomen notwendig sind. Andererseits könnte die fehlende/geringe Kolonisation auch an dem schon *in vitro* deutlich ausgeprägtem Wachstumsdefekt liegen, vor allem im Falle der *tatB*-Mutante, der auch die Etablierung der Mutanten in dem Wirt erschwert. Da die von *Cmm* ausgelösten Welkesymptome erst bei einem Schwellenwert von etwa 10^7 beobachtet werden (Stork *et al.*, 2008), ist ihr Ausbleiben in den mit den Mutanten infizierten Pflanzen schwer zu beurteilen. Es kann sowohl ein Effekt der fehlenden oder eingeschränkten Sekretion bestimmter Proteine sein als auch einfach auf der schlechten Wachstumsrate der Mutanten beruhen, die zu einer erfolgreichen Kolonisation nicht ausreicht. Zudem könnte durch den Ausfall des Tat-System die Sekretion mehrerer potentieller Zelloberflächenproteine (CMM_0429, 0430, 0431) und einer Sortase (CMM_0129) blockiert sein, die Tat-Signalpeptide aufweisen, aber aufgrund ihrer Bindung an Membran oder Zellwand nicht im Exoproteom nachweisbar sind. Eine veränderte Zelloberfläche könnte sich z.B. negativ auf die Erkennung zwischen *Cmm* und Tomate auswirken und damit entscheidend zur Reduktion der Virulenz beitragen.

D. Die Proteomanalyse von Xylemsaft aus *Cmm*-infizierten Tomatenpflanzen

Die Untersuchung der Proteinsekretion von *Cmm* in verschiedenen Medien führte zur Identifizierung zahlreicher extrazellulärer Proteine, die an der Bakterien-Pflanzen-Interaktion beteiligt sein könnten. Diese Proteine können entweder extrazellulär agieren, in dem sie die pflanzliche Zellwand angreifen oder nach Aufnahme oder Eintritt in Wirtszellen auch intrazellulär ihre Wirkung entfalten, indem sie z.B. die Wirtsabwehr manipulieren. Die Erkennung des Eindringlings durch den Wirt führt auch seinerseits zur Induktion und Sekretion einer Reihe von Proteinen, die das Pathogen abwehren und ihn am Eindringen und in der Ausbreitung hindern. Diese sogenannten PR-Proteine („pathogenesis-related“) können das Pathogen direkt schädigen oder seine schädigende Wirkung außer Kraft setzen, in dem sie z.B. die Zellwand-degradierenden Enzyme des Pathogens inhibieren. Da das Xylem ein natürliches Habitat von *Cmm* ist, sollten die meisten während der *Cmm*-Kolonisation von der Pflanze und *Cmm* sekretierten Proteinen im Xylemsaft zu finden sein. Proteomuntersuchungen des Xylemsafts infizierter Pflanzen ermöglichen simultan die Analyse der Proteine, die von der Pflanze und dem Pathogen während der Interaktion sekretiert werden. Die parallele Infektion mit virulenten und avirulenten Stämmen und der Vergleich ihrer Profile liefern Informationen über die Abwehrmechanismen der Pflanze und auch über die für den Ausbruch der Krankheit entscheidende Faktoren. Um die Proteinzusammensetzung des Xylemsaftes nach Infektion mit *Cmm* zu studieren, wurden etwa 4 Wochen alte Tomatenpflanzen mit den beiden virulenten Stämmen NCPPB382 und CMM101 sowie dem avirulenten Stamm CMM100 infiziert. Die Gewinnung von Xylemsaft erfolgte etwa 2 bis 3 Wochen nach Infektion, als die erfolgreiche Kolonisation an der Ausprägung der Krankheitssymptome schon deutlich erkennbar war. Die Infektion der Pflanzen erfolgte über den Petiolus, in dem das erste Fiederblatt abgeschnitten und eine *Cmm*-Suspension auf die Schnittstelle aufgetragen wurde. Als Kontrolle diente der Xylemsaft *mock*-infizierter Pflanzen. Die Untersuchung des Xylemsaftes zu einem früheren Zeitpunkt der Infektion war aufgrund der geringen Menge an *Cmm* im Xylem der Pflanzen nicht möglich. Um genügend Protein für die Visualisierung mit CBB G-250 und die anschließende massenspektrometrische Analyse zu erhalten, wurde pro Stamm und Probe der Xylemsaft aus 10-15 Pflanzen gepoolt eingesetzt. Für jeden Stamm wurden drei biologische Replikate angefertigt, die aus drei unabhängig durchgeführten Pflanzentests stammten.

Die Auftrennung der Proteine im pH-Bereich 4-7 führte zur Visualisierung von durchschnittlich 60 Spots pro Gel, wobei wieder das Phänomen auftrat, dass ein Protein in mehreren horizontal hintereinander angeordneten Spots lokalisiert war (Abb. 26). Über 60% der ausgeschnittenen Spots konnten nicht identifiziert werden. In den meisten dieser Fälle gelang es wegen der geringen Proteinmenge nicht, ein Spektrum aufzunehmen. Einige Spektren konnten allerdings auch keinem Protein zugeordnet werden, wahrscheinlich da es

sich um Proteine der Tomate handelt, die nicht in dem bisher sequenzierten Bereich des Tomatengenoms kodiert sind.

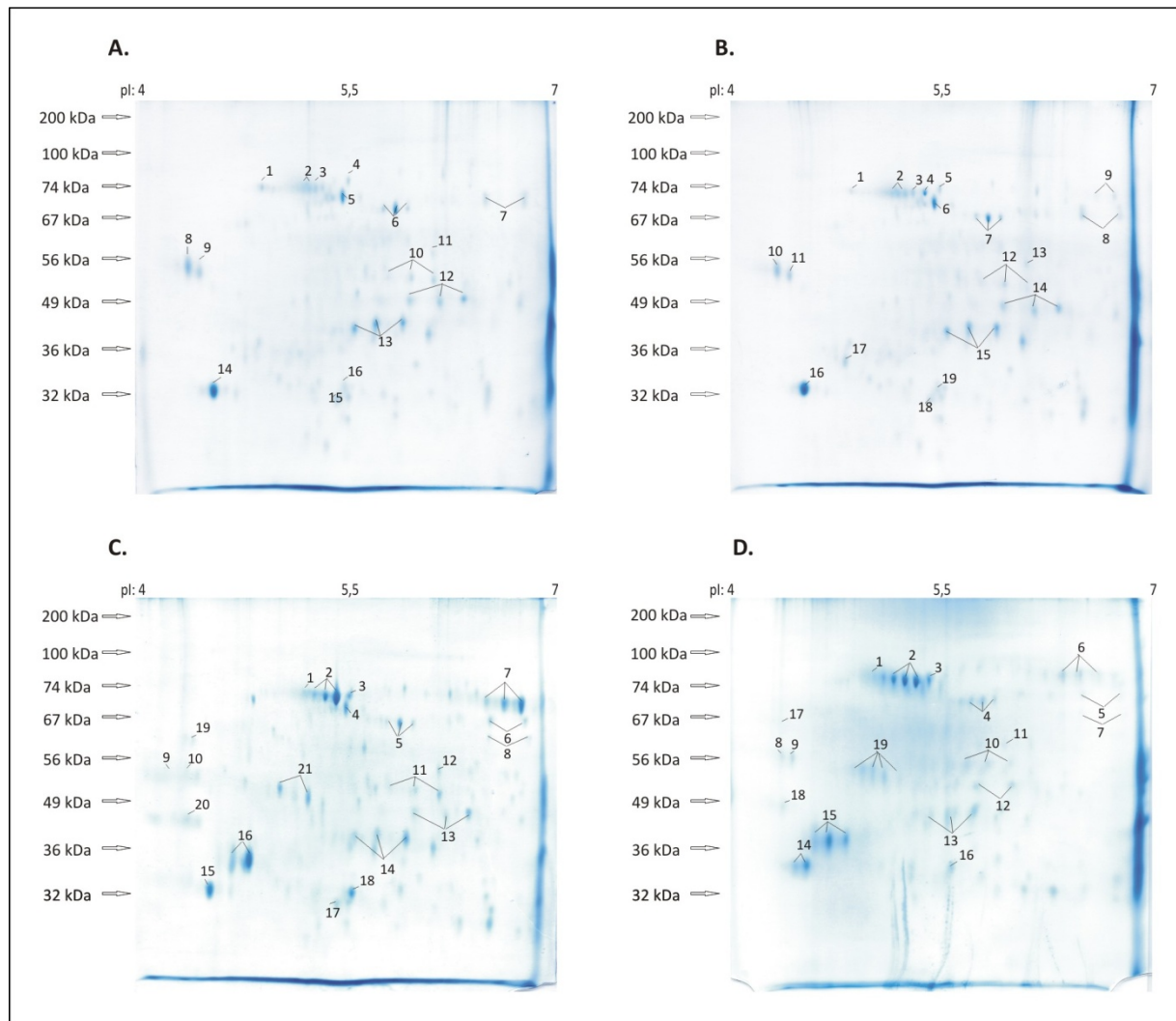


Abb. 26. Proteine aus dem Xylemsaft mock- (A), CMM100- (B), CMM101- (C) und NCPPB382- (D) infizierter Tomatenpflanzen. Die Proteine wurden in der ersten Dimension im linearen pH-Bereich von 4-7 isoelektrisch fokussiert und in der zweiten Dimension im 12,5% SDS-PAGE nach der Größe aufgetrennt. Die Visualisierung der Spots mit CBB G-250 und die massenspektrometrischen Analysen führten zur Identifizierung von 6 *Cmm*- und 16 Tomatenproteinen (Tab. 14).

Von 22 sicher identifizierten Proteinen stammen bei Infektion mit NCPPB382 und CMM101 6 von *Cmm* und 16 von der Tomate. Die nachgewiesenen *Cmm*-Proteine umfassen zwei Serinpeptidasen der Ppa-Familie, PpaB1/B2 und Ppal, die Subtilase C, die ABC-Transporter-Untereinheit CMM_2185, die β -N-Acetylglucosaminidase NagA und CMM_0338. Im Xylemsaft CMM100-infizierter Pflanzen konnten nur die Proteine PpaB1/B2 und SbtC nachgewiesen werden, die darüberhinaus im Vergleich zu den Spots aus dem Xylemsaft NCPPB382-, bzw. 101-infizierter Pflanzen eine deutlich geringere Intensität zeigten. Im Falle von SbtC wurde *in planta* nur eine Form identifiziert, mit einem Molekulargewicht im

Bereich von 74 kDa. Die anderen Proteinvarianten, die bei *in vitro*-Anzucht nachweisbar waren, fehlen. Teilweise ist dies sicher in der geringen Menge begründet (bei Formen, die auch *in vitro* nur in kleinen Mengen auftraten), aber die 110 kDa- Variante fehlt trotz großer Menge *in vitro* (Spot 2 in Abb. 14, S. 75).

Tab. 14. Auflistung aller im Xylemsaft *mock*-inokulierter und CMM100, 101, 382-infizierter Tomatenpflanzen identifizierten Proteine. Die Proteine sind mit den entsprechenden Spot Nummern in den 2D-SDS-Gelen in der Abb. 26 markiert. Die Tomatenproteine, die abhängig von *Cmm* verändert auftreten, sind grau unterlegt.

					Spotnummer			
	Accession	Protein, wahrscheinliche Funktion	MW	pI	<i>mock</i> -inf.	CMM100	CMM101	NCPB382
CMM	CMM_0042/0050	PpaB1/B2, extrazelluläre Serinprotease	34322	4,5		17	16	15
	CMM_0049	NagA, β -N-Acetylglucosaminidase	63188	6			8	7
	CMM_0338	konserviert hypothetisches Protein	43974	5,3			21	19
	CMM_1948	PpaI, extrazelluläre Serinprotease	33643	4,3			20	18
	CMM_2185	Peptid- ABC Transporter, Substratbindeprotein	66351	4,2			19	17
	CMM_2536	SbtC, Subtilisin-ähnliche Serinprotease, Familie S8	119837	5,2		4	2	2
Tomate	A8W7B5	Heat shock protein 70	74244	5,3	1	1		
	O04678	P69B, putative subtilisin-like serine protease	78881	6,3		9	7	6
	P15003	Suberization-associated anionic peroxidase 1	38725	4,8	8	10	9	8
	P27322	Heat shock cognate 70 kDa protein 2	70663	4,9	3	3		
	Q05539	Acidic 26 kDa endochitinase	27614	5,9	16	19	18	16
	Q05540	Acidic 27 kDa endochitinase	26567	4,5	14	16	15	14
	Q40151	Hsc70 OS=Solanum lycopersicum	71470	5	2	2	1	1
	Q41340	Small GTP-binding protein	22604	5,1	6	7	5	4
	Q42896	Fructokinase-2	34741	5,7	13	15	14	13
	Q43497	Monodehydroascorbate reductase	47006	5,7	10	12	11	10
	Q645N1	Malate dehydrogenase	36129	9,6	12	14	13	12
	Q76MS4	LEXYL2 protein (Fragment)	68869	8,9	7	8	6	5
	Q84XW6	Vacuolar H ⁺ ATPase A1 subunit isoform	68527	5,1	5	6	4	
	Q9LWA2	Peroxidase	34918	4,4	9	11	10	9
	Q9M5A8	Chaperonin 21	26546	7,6	15	18	17	
Q9ZR46	P69C, putative subtilisin-like serine protease	70636	5,2	4	5	3	3	

Unter den identifizierten Tomatenproteinen befinden sich 3 Hitzeschockproteine, zwei Peroxidasen, und 4 PR-Proteine, die P69B und P69C Subtilasen und die 26 kDa und 27 kDa Endochitinasen, die mit der Abwehr der Pflanze assoziiert sein könnten. Allerdings zeigte der Vergleich des Xylemsafts *mock*-inokulierter und *Cmm*-infizierter Pflanzen außer bei der Tomatenpeptidase P69B keinen Unterschied in der Intensität und der Anzahl dieser Proteine. Daher scheinen diese Proteine konstitutiv exprimiert zu sein. Das Protein P69B scheint dagegen durch die Interaktion induziert zu sein und konnte im Xylemsaft aller *Cmm*-infizierter Pflanzen nachgewiesen werden, wobei seine Menge im Xylemsaft CMM100-

infizierter Pflanzen im Vergleich zu dem CMM101, NCPPB382-infizierter Pflanzen deutlich geringer ausfällt. Beide P69-Proteine sind Serinpeptidasen der Subtilasefamilie und zu den NCPPB-Subtilasen SbtA, B und C homolog.

Auch beim Vergleich der Xylemsaftproteome NCPPB382- und CMM101-infizierter Pflanzen konnten weder unter den *Cmm*- noch den Tomatenproteinen signifikante Unterschiede festgestellt werden. Diese Befunde könnten mit dem späten Zeitpunkt der Probennahme (nach 2-3 Wochen) zusammenhängen, an dem bereits deutliche Symptome vorhanden sind. In Zukunft sollten auch frühere Zeitpunkte untersucht werden, auch wenn eine Induktion von *Cmm*-Proteinen in der ersten Woche aufgrund des zu geringen bakteriellen Titers wahrscheinlich nicht nachweisbar ist. So kann die Reaktion der Tomate (eventuelle Induktion von Tomatenproteinen) auf *Cmm* in einem Zeitkurs mit Probennahmen alle 2 bis 3 Tage nach der Infektion verfolgt werden.

F. Diskussion

1. Zellwand-degradierende Enzyme von *Cmm* und ihre Rolle in der Pathogenese

Im Rahmen des Sequenzierungsprojektes von *Cmm* NCPPB382 wurden 11 extrazelluläre Enzyme im Chromosom und den beiden Plasmiden annotiert, die wahrscheinlich am Abbau von pflanzlichen Zellwandpolymeren beteiligt sind. Da zum einen extrazelluläre Enzyme in phytopathogenen Bakterien häufig als Virulenzdeterminanten diskutiert werden und für die plasmidkodierte Cellulase CelA bereits gezeigt war, dass es ein für die Symptomausprägung essentielles Protein ist, wurden weitere Exoenzyme (die zwei putativen Xylanasen (XysA und B), die beiden putativen Endoglukanasen (EndX und Y), eine Polygalakturonase (PgaA) und die chromosomal kodierte Cellulase (CelB) von *Cmm*), die alle ein Signalpeptid tragen und daher sekretiert werden sollten, ausgewählt und hinsichtlich ihrer biologischen Funktion und ihrer Rolle in der Interaktion mit der Tomate näher untersucht.

Um zu klären, ob die Zellwand-degradierenden Enzyme von *Cmm* zur Pathogenese beitragen, wurden die sie kodierenden Gene mittels Insertionsmutagenese inaktiviert, und anschließend das Pathogenitätsverhalten der Mutanten in Pflanzentests untersucht und mit dem des Wildtyps verglichen. Im Fall der Endoglukanase EndY konnte aufgrund des Fehlens geeigneter Restriktionsschnittstellen nur eine Doppelmutante konstruiert werden, in der sowohl das *endX*- als auch das *endY*-Gen nicht mehr intakt sind.

Die *in planta*-Analyse der Mutanten, in denen jeweils eines der Gene, die eine putative extrazelluläre Polygalakturonase (PgaA), Cellulase (CelB) oder eine der beiden Xylanasen (XysA oder XysB) kodieren, inaktiviert waren, zeigten einen im Vergleich zum Wildtyp unveränderten Phänotyp. Die Mutanten waren in der Lage die Pflanzen hochtitrig zu kolonisieren und die für *Cmm* typischen Krankheitssymptome wie Welke und Sprossläsionen hervorzurufen. Lediglich bei den beiden Endoglukanase-Mutanten, in denen entweder das *endX*-Gen oder gleichzeitig die beiden für Endoglukanasen kodierenden Gene *endX* und *endY* inaktiviert waren, trat eine im Vergleich zum Wildtyp um 4-5 Tage verzögerte Welke auf, während der Kolonisationstiter genauso hoch lag wie beim Wildtyp, ein Phänotyp wie er auch bei den Curing-Derivaten CMM101 bzw. CMM102, die nur jeweils eins der beiden Plasmide enthalten, auftritt (Meletzus *et al.*, 1993). Dieser veränderte Phänotyp wurde in beiden Mutanten beobachtet und könnte auch nur auf der Inaktivierung des *endX*-Gens basieren. Ob und in welchem Maße die Mutation des *endY*-Gens zu diesem Phänotyp beiträgt, kann nur mit einer *endY*-Mutante geklärt werden. Die Ergebnisse der Pflanzentests lassen erkennen, dass obwohl die untersuchten extrazellulären Enzyme in die Degradierung der pflanzlichen Zellwand involviert zu sein scheinen, sie keine essentiellen Pathogenitätsfaktoren darstellen und weder für die Kolonisation noch Ausbildung von Symptomen von Bedeutung sind.

Sowohl die chromosomal kodierte Cellulase B als auch die beiden durch die Gene *endX* und *endY* kodierten Endoglukanasen sind extrazelluläre Hydrolasen, die an der Umsetzung von Cellulose beteiligt sein könnten. Die Cellulase B enthält im Gegensatz zu der plasmidkodierten Virulenzdeterminante Cella, zu der sie homolog ist (76/64 % Übereinstimmung bzw. Identität), nur zwei Domänen, die die Bindung und den Abbau von Cellulose katalysieren könnten, während die dritte C-terminale Expansin-Domäne von Cella fehlt. Die beiden Endoglukanasen EndX und EndY bestehen jeweils nur aus einer katalytischen Domäne, die Ähnlichkeit zu den Glykosylhydrolasen der Familie 26 zeigt. Zu dieser Familie gehören unter anderem neben Cellulasen auch Mannanasen (Halstead *et al.*, 1999), die Mannan, ein Homopolymer aus β -1,4-verknüpften Mannoseeinheiten, das neben Xylan ein häufiger Bestandteil der Hemicellulosen ist, hydrolysieren. Obwohl das genaue Substrat und die genaue biologische Funktion der beiden Endoglukanasen von *Cmm* unklar bleiben, scheint die Expression zu mindestens einer der Endoglukanasen (eventuell EndX) wichtig für die Symptomausprägung, wenn auch nicht essentiell für die Pathogenität zu sein. Das um 4-5 Tage verzögerte Auftreten der Welkesymptome könnte ein Indiz dafür sein, dass die Endoglukanasen vor allem in der frühen Phase der Infektion eine Rolle spielen könnten. Ein ähnlicher Phänotyp wurde für die beiden Endoglukanasen von *Dickeya chrysanthemi* 3937 beschrieben, das zwei Endoglukanasen, eine periplasmatische und eine extrazelluläre, kodiert und deren Inaktivierung sowohl einzeln als auch in Kombination die Pathogenität in *Saintpaulia ionantha* (Usambaraveilchen) in keiner Weise beeinträchtigt (Boccarda *et al.*, 1994). Die Inaktivierung der periplasmatischen Endoglukanase führte lediglich zu einer leichten Verzögerung in der Entwicklung der Symptome, so dass das Protein eventuell zu Beginn der Infektion wichtig sein könnte. Die fehlende Relevanz der beiden Endoglukanasen für die Pathogenität von *D. chrysanthemi* in *Saintpaulia ionantha* führte zu der Annahme dass die Endoglukanasen vor allem eine Rolle spielen, wenn *D. chrysanthemi* in necrophiler Interaktion saprophytisch lebt, wo die z.B. von Pilzen bereits vorverdaute Cellulose aus totem Pflanzengewebe ein besseres Substrat für die bakteriellen Cellulasen und eine gute Nahrungsquelle für das Bakterium darstellen könnte (Boccarda *et al.*, 1994).

Obwohl die Cellulase A essentiell für die Virulenz von *Cmm* ist, scheidet die Cellulase B als ein wichtiger Pathogenitätsfaktor aus. Die Cellulase A unterscheidet sich von Cellulase B durch das Vorhandensein einer dritten Domäne, die Homologie zu pflanzlichen Expansinen zeigt und wahrscheinlich an der Auflockerung der pflanzlichen Zellwand beteiligt ist (Cosgrove, 2005). Das Fehlen einer solchen Expansin-Domäne macht es der Cellulase B wahrscheinlich unmöglich, kristalline Cellulose abzubauen. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Cellulase B erst später in der Infektion z.B. an der Erschließung von Nährstoffen beteiligt ist. Im Genom von *Cmm* ist ein weiteres Expansin (ExpA, CMM_1480) kodiert, das zur dritten Domäne von Cella homolog ist und daher eine ähnliche Funktion übernehmen

könnte. Allerdings wurde es im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, so dass seine Rolle in der Pathogenität oder für die Funktion von CelB unklar bleibt. In den Exoproteomuntersuchungen wurde ExpA allerdings, wenn auch in geringer Menge, nachgewiesen.

Die Polygalakturonase von *Cmm* ist eine putative Endo-Polygalakturonase, die Sequenzhomologie zu Polygalakturonasen der Gattungen *Leifsonia* und *Xanthomonas* zeigt. Endo-Polygalakturonasen spalten Pektinpolymere in große Fragmente, so dass eine rasche Abnahme der Viskosität einer Pektinlösung zu beobachten ist (Cooper, 1983). Die enzymatische Aktivität einer *Cmm*-Polygalakturonase konnte auf Agarplattentests mit Pektin/Polygalakturonsäure als Substrat bereits bestätigt werden (Dreier, 1992). Neben der beschriebenen Polygalakturonase sind in *Cmm* noch eine Pektinmethylesterase (Strider, 1969) und die beiden putativen Pektatlyasen PehA1 und PehA2 (CMM_0043 und 0051, Genomprojekt *Cmm* NCPPB382, Gartemann *et al.*, 2008) identifiziert worden, die am Abbau von Pektin beteiligt und daher mit der Virulenz assoziiert sein könnten. Die Rolle pektinolytischer Enzyme ist vor allem in *Erwinia* und verwandten Bakterien, die an verschiedenen Pflanzen Weichfäulen („soft rot disease“) auslösen, gut untersucht. Während in *Pectobacterium carotovorum* neben einer Pektatlyase und einer Polygalakturonase auch eine Cellulase zur Pathogenität beitragen (Barras, 1994), sind in *Dickeya chrysanthemi* hauptsächlich die Pektatlyasen für die Gewebemazeration und die Symptomentwicklung verantwortlich (Perombelon, 2002). In anderen phytopathogenen Bakterien wie *Pseudomonas viridiflava* führt die Mutation eines Pektatlyase-Gens, das nur einmal vorliegt, zum kompletten Verlust der Fähigkeit Weichfäule auszulösen (Liao *et al.*, 1988). Die Inaktivierung des einzigen Polygalakturonase-Gens in *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 eliminiert die Fähigkeit Polygalakturonat abzubauen und führt zu einer signifikanten Abschwächung der Virulenz (Rodriguez-Palenzuela *et al.*, 1991). Es gibt aber auch Untersuchungen, die mit Pektinase-defekten Mutanten verschiedener Pilze durchgeführt wurden und zeigen, dass die Pektinasen bei *Fusarium* und *Verticillium* wenig und bei *Sclerotinia* und *Alternaria* gar nicht zur Virulenz dieser filamentösen Pilze beitragen (Walton, 1994). In *Ralstonia solanacearum*, einem ebenfalls bakterielle Welke auslösenden Bakterium, das eine Endo-Polygalakturonase (PehA) und zwei Exo-Polygalakturonasen (PehB und PehC) kodiert, konnte gezeigt werden, dass ein Defekt der Endo-Polygalakturonase PehA zwar zur Reduktion der Virulenz führt, die Entwicklung von Krankheitssymptomen aber nicht komplett unterdrückt und das Protein demnach nicht essentiell für die Auslösung der Welke ist (Schell *et al.*, 1988). Die Inaktivierung einer einzelnen Exo-Polygalakturonase (PehB) hat ebenfalls nur einen geringen Effekt auf die Pathogenität, während die gleichzeitige Inaktivierung beider Endo- und Exo-Polygalakturonasen PehA und PehB die Virulenz des Stammes signifikant reduziert und auf den synergistischen Effekt dieser Enzyme

während der Krankheitsentwicklung hinweist (Huang *et al.*, 1997). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass der hauptsächliche Pathogenitätsmechanismus der Polygalakturonasen in *Ralstonia solanacearum* in der schnellen Degradierung pektinischer Polymere und der dadurch ermöglichten oder erleichterten Invasion und Ausbreitung des Pathogens basiert. Aus den *in planta*-Experimenten mit der Polygalakturonase-defekten *Cmm*-Mutante geht hervor, dass dieses Enzym alleine weder für die Kolonisation noch für die Ausbildung von Welke von Bedeutung ist. Wie für *Ralstonia solanacearum* angenommen, könnte auch die Polygalakturonase von *Cmm* eine Rolle in der Penetration und Invasion übernehmen. Allerdings eignet sich die in dieser Arbeit verwendete Infektion über Petiolus nicht um die Rolle der Polygalakturonase während des natürlichen Eintritts zu untersuchen, da bei dieser Methode die Bakterien auf eine Wunde aufgetragen werden und keine Infektion von intaktem Gewebe erfolgt.

Die Xylanasen (XysA und XysB) von *Cmm* sind beide putative Endo- β -1,4-Xylanasen, die Xylan, eines der wichtigsten Polymere der Hemicellulose abbauen könnten. Die mit dem Wildtypstamm NCPPB382 und den beiden Mutanten durchgeführten Xylanase-Aktivitätstests bestätigen, dass *Cmm* in der Lage ist, zwei aktive Xylanasen zu synthetisieren, zu sekretieren und das in den Tests eingesetzte Xylan (aus Hafer, „oat spelts“) für sein Wachstum zu nutzen. Die *in planta*-Experimente zeigten jedoch, dass die Mutation einer einzelnen Xylanase XysA oder XysB sich weder auf die Kolonisationsfähigkeit noch die Symptomausprägung auswirkte. Die Mutanten behielten ihre volle Virulenz. Trotz des unveränderten Phänotyps der beiden Mutanten, bleibt die Rolle der Xylanasen aufgrund der Redundanz der sie kodierenden Gene unklar. Solange eins dieser Gene intakt ist, könnte *Cmm* eine funktionsfähige Xylanase bilden. Die Rolle von Xylanasen in der Pathogenität verschiedener phytopathogener Bakterien ist sehr unterschiedlich. Eine wichtige Rolle in der Pathogenität wurde der Xylanase XynB von *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* zugeschrieben, einem phytopathogenen Bakterium, das den Bakterienbrand an Reis („leaf blight“) auslöst (Rajeshwari *et al.*, 2005), eine Tatsache, die gut zu der Polysaccharidzusammensetzung der Zellwände von Reis passt, die bis zu 60 % aus Xylan bestehen (Takeuchi *et al.*, 1994). Eine Xylanase-defekte Mutante von *D. chrysanthemi* dagegen ist auf Getreide voll virulent (Keen *et al.*, 1996). Insgesamt scheint die Inaktivierung einzelner Xylanasen, vor allem wenn im Genom des jeweiligen Pathogens mehrere Xylanasen kodierende Gene identifiziert wurden, meistens keinen Effekt auf die Virulenz zu haben. Die Inaktivierung von zwei Xylanasen des Reis-pathogenen Pilzes *Magnaporthe grisea*, der mindestens fünf verschiedene Xylanasen produziert, hat keinen nachteiligen Effekt auf die Pathogenität (Wu *et al.*, 1997).

Dies gilt auch allgemein für die meisten Exoenzyme, es sind nur wenige Fälle bekannt, in denen ein einzelnes Enzym entscheidend für die Ausprägung von Symptomen ist. In den meisten Fällen sind mehrere Enzyme beteiligt, und die Inaktivierung einzelner Gene führt

bestenfalls zu einer leichten Abschwächung der Virulenz (Barras, 1994; Rajeshwari *et al.*, 2005). Einer der Gründe ist sicherlich die hohe Redundanz von Genen, deren Genprodukte Isozyme darstellen, die gleiche oder ähnliche Substrate abbauen. Dieses Phänomen ist vor allem bei *D. chrysanthemi* beobachtet worden, das mehrere Pektinasen kodiert, die kleine Unterschiede in der Art der Spaltung, Substratspezifität und Regulation aufweisen und nicht gleich wichtig für die Virulenz sind (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996). Die Bedeutung weiterer Proteine wird erst durch ihr Zusammenwirken mit anderen Proteinen deutlich, so wie bei der Xylanase XynB und der Lipase/Esterase LipA von *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, die unterschiedliche Komponenten der Zellwand abbauen und sich so in ihrer Aktivität ergänzen, dass die Inaktivierung eines der Enzyme nur einen schwachen Effekt auf die Virulenz hat, während die gleichzeitige Inaktivierung beider Enzyme die Virulenz signifikant reduziert (Rajeshwari *et al.*, 2005). Einen ähnlichen Synergismus zeigt eine Xylanase von *D. chrysanthemi* mit einer Pektatlyase, deren Aktivität zum Zelltod und Gewebemazeration in Getreide und Hafer führt (Braun *et al.*, 1993).

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die genaue Rolle vieler extrazellulärer Enzyme erst durch die gleichzeitige Inaktivierung mehrerer sie kodierender Gene aufgeklärt werden kann. Wobei nicht nur funktional redundante Gene in Frage kommen, sondern auch solche, deren Genprodukte verschiedene Bindungen eines Substrats lösen können. Für *Cmm* könnte die Rolle der Pektinasen vielleicht durch die gleichzeitige Inaktivierung der Polygalakturonase und der Pektinmethylesterase (oder der Pektatlyasen), die das Pektin demethyliert und für die Spaltung durch die Polygalakturonase zugänglich macht, aufgeklärt werden. Für die Bedeutung der Xylanasen könnte eine *xysA**xysB*-Doppelmutante Aufklärung bringen, obwohl es unklar bleibt, ob nicht noch weitere Enzyme existieren, die zumindest partiell am Abbau von Xylan beteiligt sein und daher die Aktivität der Xylanasen ersetzen könnten.

1.1 Nachweis der Xylanase-Aktivität in *Cmm*

Die beiden durch die Gene *xysA* und *xysB* kodierten Xylanasen von *Cmm* sind putative Endo- β -1,4-Xylanasen, die in der Familie 10 der Glykosylhydrolasen zusammengefasst sind. Die enzymatische Aktivität dieser beiden Enzyme auf Xylan (Haferspelzen) als Substrat konnte in dieser Arbeit mittels Agarplattentests und Zymogrammen nachgewiesen werden. Die mit Hilfe von Kongorot detektierte Degradierung von Xylan auf mit dem Wildtypstamm NCPPB382 und den beiden Mutanten inokuliertem Medium, zeigte deutlich, dass alle drei Stämme in der Lage sind, enzymatisch aktive Xylanasen zu synthetisieren und nach außen zu sekretieren. Allerdings war die Xylanaseaktivität der *xysB*-Mutante nur sehr gering. Um die Anzahl und die Größe der sekretierten Xylanasen zu bestimmen, wurden Zymogramme

hergestellt, in denen Proteinrohextrakte aus dem Überstand der drei Stämme analysiert wurden. Die im Zymogram detektierte Aktivität konnte hauptsächlich zwei Proteinen zugeordnet werden, die mit ca. 47 kDa und 71 kDa den Produkten der *xysA*- und *xysB*-Gene entsprachen.

Zuvor durchgeführte Wachstumstests in mit verschiedenen Substraten (Xylan, Glukose, Hefe) supplementierten Flüssigmedien zeigten, dass die *xysB*-Mutante, die noch ein intaktes *xysA*-Gen enthält, auf mit Xylan als einziger C-Quelle supplementiertem M9-Minimalmedium kein Wachstum und auf mit Xylan, Glukose und Hefe supplementiertem M9-Minimalmedium ein im Vergleich zu der *xysA*-Mutante schlechteres Wachstum zeigte, während die *xysA*-Mutante auf beiden Medien relativ gleich wuchs und im Vergleich zum Wildtyp nur ein geringes Wachstumsdefizit aufwies. Dieses Ergebnis führt zu der Schlussfolgerung, dass die Inaktivierung der Xylanase B sich stärker auf das Wachstum mit Xylan auswirkt als die Inaktivierung der Xylanase A. Alternativ kann die Xylanase B das in den Tests eingesetzte Xylan besser spalten und als Nährstoffquelle zur Verfügung stellen. Der Grund dafür könnte in dem unterschiedlichen strukturellen Aufbau beider Xylanasen liegen. Während für beide Xylanasen die Glykosylhydrolaseaktivität vorhergesagt wurde, enthält nur die Xylanase B zusätzlich eine Kohlenhydrat-Bindedomäne und noch eine weitere bisher nicht näher charakterisierte HYR-Domäne, die in mehreren eukaryotischen Proteinen identifiziert wurde und an der zellulären Adhäsion beteiligt sein könnte (Callebaut *et al.*, 2000). Die Bindung der Xylanase B an das Xylan über die Kohlenhydrat-Bindedomäne könnte den Zugang zum Substrat erleichtern und die Effektivität des Abbaus des schlecht wasserlöslichen Produkts steigern.

2. Analyse des Exoproteoms von *Cmm*

Insgesamt konnten im Exoproteom unter den verschiedenen untersuchten Bedingungen 150 Proteine identifiziert werden, von denen für etwa die Hälfte ein Signalpeptid vorhergesagt wurde.

In der logarithmischen Phase wurden bei Anzucht von *Cmm* NCPPB382 in Minimalmedium mehrere extrazelluläre Proteine, unter denen sich bekannte und putative Virulenzfaktoren befinden, identifiziert. Zu den bekannten Virulenzfaktoren zählen die beiden in großen Mengen sekretierten für die Virulenz essentiellen plasmidkodierten Pathogenitätsdeterminanten CeiA und Pat-1, sowie ein Vertreter der Ppa-Familie, die Serinpeptidase PpaC, für die eine Beteiligung an der Kolonisation nachgewiesen werden konnte (Schott, 2004). Die putativen Virulenzfaktoren sind in der Gruppe der potentiell für die phytopathogene Interaktion relevanter Proteine zusammengefasst. 23 % aller in M9-Minimalmedium sekretierten Proteine stammen aus dieser Gruppe und sind entweder am Transport von

Nährstoffen oder dem Abbau biologischen Materials beteiligt. Vor allem bei den extrazellulären Enzymen mit Aktivitäten gegen Bestandteile der pflanzlichen Zellwände, aber auch den Serinpeptidasen, die in den Ppa- und Chp-Familien zusammengefasst sind, wird eine Beteiligung an der *Cmm*-Tomate-Interaktion angenommen. Für mehrere Proteine dieser Familien (PpaA und C, ChpE, F und G) wurde der Nachweis über Beteiligung an der Pathogenität bereits erbracht (Eichenlaub *et al.*, 2011). Während die am Abbau pflanzlicher Zellwandpolymere beteiligten extrazellulären Enzyme in relativ geringen Mengen nachweisbar waren, erschienen die Serinpeptidasen in sehr großen Mengen. Insbesondere 8 Serinpeptidasen der Ppa-Familie (PpaB1/B2, C, E, F, G, I, J), eine Serinpeptidase der Chp-Familie (ChpE) und eine Subtilase (SbtC) wurden in hohen Mengen bereits in M9-Minimalmedium von *Cmm* sekretiert. In der stationären Phase (92h) waren diese Proteine nicht mehr nachweisbar (außer PpaB und SbtC).

Es ist anzunehmen, dass diese Proteine erst während der Infektion oder der Ausbreitung von *Cmm* in der Tomate ihre Funktion erfüllen können und wirklich benötigt werden, so dass der Grund ihrer konstitutiven Expression und Sekretion bereits im Minimalmedium, das alle zum Wachstum nötigen Nährstoffe in ausreichender Konzentration enthält, unerklärlich bleibt. Allerdings ist auch für die das Typ III-Sekretionssystem kodierenden *hrp*-Gene sowie einige *avr*-Gene, die in Proteobakterien für die Pathogenität wichtig sind, gezeigt, dass sie z.B. in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ebenfalls bereits in Minimalmedium (z.B. mit Fructose oder Mannitol als C-Quelle) induziert werden, während sie in Vollmedium keine oder nur basale Expression zeigten (Hu *et al.*, 2001; Innes *et al.*, 1993).

Trotz der Tatsache, dass alle bekannten und viele der vermuteten Virulenzfaktoren bereits im M9-Minimalmedium exprimiert werden, wurde untersucht, ob die Expression eines Teils dieser Proteine induzierbar ist. Die Zugabe von Xylemsaft oder Tomatenblatthomogenat aus nicht infizierten Tomaten zum M9-Minimalmedium sollte die natürliche Umgebung von *Cmm* simulieren und zur Induktion der für die pathogene Interaktion wichtiger Proteine führen. Die Zugabe weiterer Zuckerpolymere wie Xylan, Polygalakturonat und Cellulose sollte vor allem zur Synthese und Sekretion der diese Zucker abbauenden extrazellulären Enzyme führen.

Sowohl die Zugabe von Xylemsaft als auch von Tomatenblatthomogenat zeigten einen sehr geringen Einfluss auf das Wachstum von NCPPB382. Während Tomatenblatthomogenat zu einer im Vergleich zum M9-Minimalmedium etwas schnelleren Wachstumsgeschwindigkeit und einer leichten Erhöhung des maximalen Bakterientiters führte, blieb das Wachstum nach Zugabe von Xylemsaft in den ersten 24h mit dem im M9-Minimalmedium vergleichbar, nahm aber anschließend schneller ab. Für die Untersuchung des Exoproteoms war dieser Rückgang unerheblich, da die Proteinisolierung bereits nach 24h stattfand.

Sowohl die Supplementierung mit Xylemsaft als auch mit Tomatenblatthomogenat führte zu einem differentiellen Auftreten mehrerer Substratbindeproteine verschiedener ABC-Transporter, die extrazellulär in nur sehr geringen Mengen detektiert werden konnten. Da sie als Lipoproteine membrangebunden sind und nicht extrazellulär auftauchen sollten, ist ihr differentielles Auftreten nicht signifikant und ist lediglich ein Indiz, dass ihre Expression wahrscheinlich als Reaktion auf die veränderte Nährstoffsituation und in Abhängigkeit der Aufnahme/Verstoffwechslung bevorzugter Verbindungen entweder reprimiert oder induziert wird. Zusätzlich zu den ABC-Transportern bewirkte die Zugabe von Xylemsaft nur eine leichte mengenmäßige Zunahme einiger Proteine der Ppa-Familie (PpaC, E, F, J) sowie der beiden Virulenzfaktoren *CelA* und *Pat-1*. Xylemsaft scheint also nur eine schwache zusätzliche Induktion einiger potentieller Virulenzfaktoren, ausgehend von einem hohen Basislevel, hervorzurufen.

Die Zugabe von Tomatenblatthomogenat hatte hingegen eine deutliche Reduktion der Virulenzfaktoren und fast aller Serinpeptidasen der Ppa- und Chp-Familien zur Folge. Die Expression mehrerer für die phytopathogene Interaktion wichtiger Proteine, die hauptsächlich in die Gruppe IV (Potentiell relevant für die phytopathogene Interaktion) einzuordnen sind, war reprimiert.

Diese Effekte auf Proteinebene werden durch Microarrayanalysen der Expressionsprofile von NCPPB382 nach Anzucht in mit Xylemsaft bzw. Tomatenblatthomogenat supplementiertem M9-Minimalmedium bestätigt. Während die Zugabe von 10% Xylemsaft vor allem zur Repression von Siderophorbiosynthesegenen führte, aber keinen Einfluss auf die Transkription der potentiellen Virulenzfaktoren hatte, bewirkte die Zugabe von 5% Tomatenblatthomogenat die Repression von 21 extrazelluläre Enzyme kodierenden Genen, darunter 9 Gene der Chp-/Ppa-Familien aus der *chp*-Region, die *pat-1* Homologen *phpA/B* sowie die auf pCM1 lokalisierten Gene *celA* und *ppaJ* (Flügel *et al.*, 2012). Obwohl unterschiedliche Kultivierungszeiten (25h für Proteinisolierung/12h für mRNA-Isolierung) und auch unterschiedliche Konzentrationen des Xylemsafts (2,4% für Proteinisolierung/ 10 % für mRNA-Messung)/ Tomatenblatthomogenats (1% bzw. 5%) eingesetzt wurden, korrelieren die Ergebnisse auf der Proteinebene gut mit den Daten aus den Expressionsstudien und zeigen, dass weder Xylemsaft noch Tomatenextrakt zur Synthese und Sekretion weiterer im M9-Überstand noch nicht identifizierter, für die pathogene Interaktion von *Cmm* und Tomate wichtiger Proteine führt. Der Grund für die Repression extrazelluläre Enzyme kodierender Gene durch die Zugabe von Tomatenblatthomogenat bleibt unklar, aber man kann annehmen, dass die durch seine Zugabe ausgelöste Anreicherung des degradierten Pflanzenmaterials eine späte Phase der Infektion mit bereits ausgedehnter Gewebemazeration simuliert, in der die extrazellulären Enzyme weder für die

Erschließung von Nährstoffen noch für die Etablierung im Wirt gebraucht werden und daher reprimiert werden.

Auch die Synthese weiterer neben den bereits im M9-Überstand detektierten, pflanzliche Zellwandpolymere-abbauenden Enzyme konnte durch die Zugabe verschiedener Zuckerpolymerer, die Bestandteile der pflanzlichen Zellwand darstellen, nicht induziert werden. Ein Grund für die fehlende Induktion, könnte die Anwesenheit von Glukose im Minimalmedium sein, die eine Katabolitrepession auslösen könnte. Ob und wie Katabolitrepession in Actinomyceten auftritt/vermittelt wird, ist bisher schlecht, für *Clavibacter* überhaupt nicht untersucht. Obwohl die Menge der eingesetzten Glukose im Vergleich zum ursprünglichen M9-Minimalmedium auf 1 g/L reduziert wurde, scheint sie zum Wachstum vor allem in der exponentiellen Phase, aus der die Überstände für die Exoproteomanalysen gewonnen wurden, auszureichen. Da aus dem verwendeten M9-Minimalmedium die Glukose nur schlecht entfernt werden kann (*Cmm* wächst auf M9-Minimalmedium mit anderen C-Quellen wie z.B. Succinat viel schlechter, so dass die Isolierung sekretierter Proteine in einer ausreichenden Menge erschwert ist), wurde ein potentieller Effekt von Glukose durch den Vergleich der Exoproteome von Zellen, die auf zwei verschiedenen Vollmedien (TBY und C-Medium) gewachsen waren, untersucht.

TBY und C-Medium basieren auf Fleischextrakt, enthalten hauptsächlich Aminosäuren als C-Quelle und unterscheiden sich nur im Glukosegehalt (TBY ist frei von Glukose, C-Medium enthält 5 g/L). Im Gegensatz zu M9-Minimalmedium zeigte sich bei Anzucht auf Vollmedium eine deutlich verringerte Sekretion oder das vollständige Fehlen der meisten Proteine der Gruppe „Potentiell relevant für die phytopathogene Interaktion“. Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Vollmedien trat nicht auf. Dieses Ergebnis stützte die Vermutung, dass die Expression der diese Proteine kodierenden Gene in M9-Minimalmedium konstitutiv ist und von der Glukose nicht beeinflusst wird. Es besteht die Möglichkeit, dass der geringe Nährstoffgehalt von M9-Minimalmedium gut die Nährstoffsituation im Xylemsaft der Pflanze widerspiegelt, so dass die erhöhte Sekretion von Virulenzfaktoren eine Reaktion von *Cmm* ist, die Pflanze anzuregen mehr Nährstoffe z.B. Aminosäuren ins Xylem zu sekretieren. Warum auf Vollmedium keine Expression der entsprechenden Proteine mehr stattfindet, bleibt unklar.

Die Exoproteomanalysen des virulenten Stammes NCPPB382 in verschiedenen Medien und zu verschiedenen Zeitpunkten bestätigen die Theorie, dass die sekretierten Proteine, unter denen mehrere bekannte Virulenzfaktoren sind, aufgrund ihrer extrazellulären Lokalisation an der *Cmm*-Tomaten-Interaktion beteiligt sind/sein könnten. Die beiden pCM1- und pCM2-kodierten Pathogenitätsdeterminanten sind vor allem für die Symptomausprägung notwendig, während für die z.B. in der *chp/tomA*-Region kodierten Serinpeptidasen der Ppa-

bzw. der Chp-Familie eine Beteiligung an der Kolonisation nachgewiesen wurde. Um differenzieren zu können, welche der identifizierten extrazellulären Proteine der Ppa/Chp-Familien oder auch andere Proteine neben der Suppression/Umgehung der pflanzlichen Abwehr vor allem für die Kolonisation wichtig sind, wurde das Exoproteom des avirulenten, plasmidfreien NCPPB382-Derivats CMM100 untersucht. Die vergleichenden Analysen erfolgten in mit Xylemsaft bzw. Tomatenblatthomogenat supplementiertem M9-Minimalmedium und resultierten in einer dem NCPPB382 sehr ähnlichen Zusammensetzung des Exoproteoms, ausgenommen die beiden fehlenden plasmidkodierte Pathogenitätsdeterminanten. Auch der reprimierende Effekt des Tomatenblatthomogenats bzw. der leicht induzierende Effekt des Xylemsafts, auf die Expression der *ppa/chp*-Gene konnte im CMM100 Exoproteom beobachtet werden.

Ein wechselseitiger Einfluss der Plasmide und der *chp/tomA*-Region, von Chalupowicz *et al.* (2010) aufgrund von RNA-Expressionsanalysen postuliert, konnte hingegen auf der Proteinebene nicht bestätigt werden. Die in der *chp/tomA*-Region kodierten Proteine PpaB1/B2, C, E, ChpE sowie NagA erschienen im CMM100 Expressionsprofil in Vergleich zu NCPPB382 mengenmäßig unverändert, so dass die Abwesenheit der Plasmide zu mindestens auf der Proteinebene keinen messbaren Einfluss auf die Synthese oder Sekretion dieser Proteine zeigte. Der Stamm CMM30-18 hingegen, dem durch eine spontane Deletion die komplette *chp/tomA*-Region und auch das pCM2 Plasmid fehlen, zeigte in M9-Minimalmedium eine geringere Sekretion der pCM1-kodierten Pathogenitätsdeterminante CelA, die möglicherweise auf der Abwesenheit der *chp/tomA*-Region und/oder auch pCM2 basiert und deren schwächere Transkription in Transkriptomstudien in der Pflanze bereits bestätigt wurde (Chalupowicz *et al.*, 2010). Sowohl in CMM100- als auch in CMM30-18-Exoproteomen wurden zwei bis dahin nicht nachgewiesene Proteine, ein Substratbindeprotein eines ABC-Transporters (CMM_0976) und das Protein CMM_1921, dessen Funktion unbekannt ist, in relativ hohen Mengen detektiert. Beide Proteine enthalten ein Signalpeptid und werden Sec-abhängig sekretiert. Das CMM_1921 erscheint in mehreren Spots unterschiedlicher pI 's und scheint prozessiert zu werden. Seine Rolle für die Lebensweise von CMM100 oder CMM30-18 als Endophyt bleibt unklar, aber es scheint nur in Abwesenheit beider Pathogenitätsdeterminanten oder der *chp/tomA*-Region induziert zu sein.

3. Sekretionswege in *Cmm*

Gegenüber der bioinformatischen Vorhersage von etwa 450 Proteinen mit Signalpeptid im *Cmm*-Genom resultierte die Analyse des Exoproteoms von *Cmm* unter den verschiedenen untersuchten Bedingungen in der experimentellen Identifizierung von rund 150 extrazellulär

lokalisierten Proteinen. Die An- bzw. Abwesenheit eines N-terminalen Signalpeptides in diesen 150 Proteinen sowie ihre subzelluläre Lokalisation wurden mittels verschiedener Programme (SignalP, TatFIND1.4, LocateP) überprüft. Demnach enthalten lediglich 78 Proteine ein Signalpeptid und sollten daher sekretiert werden (über das Sec- oder Tat-Sekretionssystem). Unter diesen sind vor allem extrazelluläre Enzyme (23) wie die Serinpeptidasen der Ppa-, Chp-, Sbt-Familien oder die am Abbau von Zellwandpolymeren beteiligten Hydrolasen (Cellulase, Xylanase, Polygalakturonase), aber auch Substratbindeproteine der ABC-Transporter (20), 11 Proteine, die in den Zellwandmetabolismus involviert sind, sowie 18 Proteine, deren Funktion unbekannt ist. Auf der Basis der Signalpeptid-Vorhersageprogramme, in denen verschiedene Algorithmen zum Einsatz kamen, wurde postuliert, dass die meisten der von *Cmm* sekretierten Proteine über das Sec-System ausgeschleust werden sollten.

3.1 Das Sec-Sekretionssystem

Um die Funktion des Sec-Sekretionssystems in *Cmm* zu charakterisieren, sollten die beiden Komponenten SecG und SecY der SecYEG-Translokase durch die Insertion einer Antibiotikaresistenzkassette inaktiviert und der Effekt dieser Inaktivierung auf das Wachstum, die Proteinsekretion und die Virulenz untersucht werden. Für SecY konnte allerdings keine Mutante konstruiert werden, es könnte sich also um ein essentielles Gen in *Cmm* handeln. Die *secG*-Mutante wies sowohl auf M9-Minimalmedium als auch auf Vollmedium ein Wachstumsdefizit auf, das vermuten lässt, dass die Abwesenheit einer intakten SecG-Komponente den Translokationsprozess von Proteinen beeinflusst, die für die Erschließung und Aufnahme von Nährstoffen in die Zelle notwendig sind.

Die vergleichende Analyse der Profile sekretierter Proteine des Wildtyps NCPPB382 und der *secG*-Mutante zeigte eine deutliche Reduktion der Menge einiger extrazellulären Proteine in der *secG*-Mutante, während die Zusammensetzung des extrazellulären Proteoms in beiden Stämmen gleich blieb. SecG ist also nicht essentiell für den Sec-Sekretionsweg, scheint aber einen Einfluss auf die Menge an sekretiertem Protein zu haben.

Eine besonders hohe Reduktion konnte bei den Serinpeptidasen der Ppa-Familie (PpaB1/B2, C, E, F, G, I, J) und den beiden Vertretern der Chp-Familie ChpE und der pCM2-kodierten Pathogenitätsdeterminante Pat-1 beobachtet werden. Aber auch die Spots der pCM1-kodierten Pathogenitätsdeterminante CelA, der Xylanase A, des Substratbindeproteins eines putativen α -Glukosid ABC-Transporters (CMM_0866), einer putativen Membran-gebundenen Metalloprotease (CMM_0839), eines sekretierten Proteins der NPL/P60-Familie sowie eines konservierten, sekretierten Proteins unbekannter Funktion (CMM_0144) waren in ihrer Intensität im Vergleich zum Wildtyp NCPPB382 deutlich schwächer. Für jedes dieser

Proteine wurde mittels Computer-gestützter Vorhersageprogramme eine Sec-Signalpeptid abhängige Sekretion vorhergesagt, die anhand dieser Ergebnisse experimentell bestätigt werden konnte.

Insgesamt wurden bei Anzucht des Wildtyps NCPPB382 in M9-Minimalmedium 53 extrazelluläre Proteine identifiziert. Nur für eines dieser Proteine (NagA) wurde ein Tat-Signalpeptid vorhergesagt. Für 5 weitere Proteine (CMM_0338, 0429, 0631, 1480, 2177) lautete die Vorhersage, dass sie entweder das Sec- oder das Tat-Signalpeptid enthalten. Das bedeutet, dass von den 53 extrazellulären Proteinen, die im M9-Kulturüberstand von *Cmm* nachgewiesen werden konnten, mindestens 47 Proteine ein Sec-Signalpeptid enthalten. Berücksichtigt man die 16 Proteine für die bereits der Nachweis der Sec-abhängigen Sekretion erbracht wurde, so bleiben noch 31 Proteine, deren Sec-abhängige Sekretion trotz vorhergesagtem Signalpeptid nicht so offensichtlich war. Viele dieser Proteine wurden sowohl von der Mutante als auch dem Wildtyp in ähnlich hohen/niedrigen Mengen sekretiert, so dass die geringen Unterschiede in den Intensitäten der Spots und die rein visuelle Beurteilung dieser keine zuverlässigen Aussagen über den Einfluss der *secG*-Mutation auf den Translokationsprozess dieser Proteine erlaubten.

Da die Inaktivierung der SecG-Komponente die Proteinsekretion lediglich verringert und nicht vollständig blockiert, könnte ihre Rolle in der Steigerung der Translokationsgeschwindigkeit oder auch der Effizienz des Translokationsprozesses liegen. Die Beobachtung, dass die Proteinsekretion der *secG*-Mutante nach 48h im Vergleich zu der nach 31h zunimmt, könnte die unterschiedliche Geschwindigkeiten des Translokationsprozesses in An- und Abwesenheit der SecG-Komponente reflektieren und die Annahme einer SecG-abhängigen Steigerung der Translokationsgeschwindigkeit untermauern. Ein ähnlicher Effekt wurde in der *secG*-Mutante von *Streptomyces lividans* beobachtet, in der über Westernblotanalyse ein im Vergleich zum Wildtyp verzögertes extrazelluläres Auftreten einer überexprimierten Amylase beobachtet wurde und die unterschiedliche Geschwindigkeit der Sekretion mit und ohne einer intakten SecG-Komponente widerspiegelte (Palomino *et al.*, 2008).

Die Exoproteomvergleiche des Wildtyps NCPPB382 und der SecG-Mutante lassen den Schluss zu, dass das SecG-Protein von *Cmm* eine für die Funktionsfähigkeit der SecYEG-Translokase wichtige, jedoch nicht essentielle Komponente darstellt. Auch SecG von *E. coli* und sein Gegenstück YvaL von *Bacillus subtilis* stellen nicht essentielle Komponenten der Sec-Translokasen dar (Nishiyama *et al.*, 1994; van Wely *et al.*, 1999). Unter normalen Temperaturen beeinflusst ihre Inaktivierung die Proteintranslokation nur geringfügig. Während in *E. coli* keine genauen Analysen der von der *secG*-Nullmutante sekretierten Proteine durchgeführt wurden, resultierte die Inaktivierung von *yvaL* in *B. subtilis* in der Abwesenheit nur einiger weniger Proteine im Exoproteom (van Wely *et al.*, 1999).

Die *secG*-Mutante zeigt in der Tomate einen avirulenten Phänotyp, sie ist weder in der Lage die Pflanzen effektiv zu kolonisieren noch Welkesymptome auszulösen. Obwohl die Pflanzentests aufgrund der geringen Anzahl eingesetzter Pflanzen nicht signifikant sind, scheint es unwahrscheinlich, dass die Infektion bei allen 30 Pflanzen gleichzeitig nicht erfolgreich war, so dass der veränderte Phänotyp der Mutante auf den Sekretions- und/oder den dadurch hervorgerufenen Wachstumsdefekt zurückzuführen sein muss. Es ist möglich, dass der Verlust der Kolonisationsfähigkeit auf die signifikant verringerte Sekretion mehrerer Serinpeptidasen der Ppa- und der Chp-Familien zurückzuführen ist, da für diese bereits bekannt ist, dass die Inaktivierung einzelner Gene (*ppaA*, *ppaC*, *chpC*) eine mäßige Reduktion des Kolonisationstitors und der Virulenz bewirken, während die Inaktivierung gleichzeitig mehrerer Serinpeptidasen wie in dem Stamm CMM30-18, dem durch eine spontane Deletion die komplette *chp/tomA*-Region verloren gegangen ist, zur Avirulenz des Stammes führt, der nicht mehr in der Lage ist, die Pflanze effizient zu kolonisieren. Im Gegensatz zu CMM30-18 betrifft der Sekretionsdefekt der *secG*-Mutante neben den Serinpeptidasen der *chp/tomA*-Region (PpaB1, B2, C, E), auch die auf dem Chromosom außerhalb der *chp/tomA*-Region kodierten Serinpeptidasen PpaF, G, I und die von pCM1-kodierte Serinpeptidase PpaJ, sowie ChpE und Pat-1. Somit zeigen mit Ausnahme von PpaA und PpaD, die im Exoproteom unabhängig von den Bedingungen überhaupt nicht nachweisbar waren, und PpaH, das schon vom Wildtyp nur in geringen Mengen sekretiert wurde, fast alle Vertreter der Ppa-Familie eine deutlich verringerte Sekretion. Obwohl die Substrate der Serinpeptidasen noch unbekannt sind, wird angenommen, dass sie sich in ihren Substratspezifitäten überlappen und synergistisch agieren (Eichenlaub *et al.*, 2011). Daher ist vorstellbar, dass die drastisch reduzierte Menge fast aller Peptidasen einer Familie außerhalb der Zelle nicht mehr ausreicht, um sich in der Pflanze zu etablieren und/oder diese ernsthaft zu schädigen.

Allerdings lässt sich der Wachstumsdefekt der *secG*-Mutante *in vitro* durch die verringerte Menge der Serinpeptidasen kaum erklären, hier ist eher ein Effekt des verminderten Exports der Substratbindeproteine von ABC-Transportern anzunehmen, der zu einer schlechteren Nährstoffversorgung allgemein oder zum Auftreten einer Hemmung, dadurch dass einzelne Verbindungen nicht genügend aufgenommen werden können, führen könnte. Eine entsprechende verminderte Sekretion konnte jedoch nicht gesichert nachgewiesen werden, da die meisten Substratbindeproteine Zellhüllen-assoziiert sind und nicht im Exoproteom auftauchen sollten. Sie waren dementsprechend im Wildtyp bereits nur in geringer Menge vorhanden.

Der avirulente Phänotyp der *secG*-Mutante scheint anzudeuten, dass das Sec-System von *Cmm* essentiell ist für den Transport von Virulenzfaktoren und anderer für die Erhaltung des Energiestoffwechsels, Umgehung/Unterdrückung der Wirtsabwehr wichtiger Proteine, deren

Sekretion eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Kolonisation des Wirts darstellt. Allerdings kann dieser Phänotyp auch (zu mindestens teilweise) durch den Wachstumsdefekt der Mutante hervorgerufen sein. Die Konstruktion weiterer Mutanten z.B. in den Genen *secY*, *secE* oder *secA* und ihre Untersuchung auf der Exoproteomebene könnte möglicherweise zur Identifizierung weiterer über dieses System sekretierter Proteine führen. Allerdings sind die SecY- und SecE-Komponenten in *E. coli* essentiell, so dass ihre Inaktivierung in *Cmm* letal sein kann. Gelingt die Konstruktion dieser Mutanten, so ist vor allem der Effekt auf die Proteine interessant, die in der *secG*-Mutante nur wenig in ihrer Sekretion beeinflusst wurden wie z. B. die pCM1-kodierte Pathogenitätsdeterminante CeiA. Da es sich um die Hauptkomponenten des Translokons handelt, könnte der Sekretionsdefekt dieser Mutanten deutlicher als bei der *secG*-Mutante ausfallen und den endgültigen Nachweis über den Sekretionsweg vieler Proteine erbringen, deren Sekretion von der Mutation des *secG*-Gens kaum beeinflusst wurde.

Falls die Inaktivierung weiterer Bestandteile des Sec-Systems unmöglich ist, bietet sich eine Untersuchung von Subproteomen an, die durch die Konstruktion weiterer Mutanten z.B. in den Sortasegenen (für Zellwand-gebundene Proteine) oder dem Lgt-System (für Membran-gebundene Lipoproteine), bei intaktem Sec-System zu einer veränderten Lokalisierung Zelloberflächen-gebundener Proteine führen. In den entsprechenden Mutanten sollten diese Proteine frei im Überstand vorliegen, und dementsprechend identifizierbar sein.

3.2 Das Tat-Sekretionssystem

Das Tat-Sekretionssystem ist ein Proteintransportsystem für den Export gefalteter Proteine. Substratproteine werden über das N-terminale Signalpeptid, das das charakteristische „twin arginine“-Motiv enthält, zu der Tat-Translokase dirigiert und nach außen exportiert (Lee *et al.*, 2006). Durch die Kombination mehrerer Vorhersageprogramme wurde für 47 *Cmm*-Proteine die Sekretion über das Tat-System vorhergesagt. Zur Verifizierung der Computervorhersagen wurde die TatB-Komponente des Tat-Translokons durch die Insertion einer Antibiotikaresistenzkassette inaktiviert und die Auswirkung der Mutation auf das Wachstum, den Proteinexport und die Virulenz untersucht. Die Abwesenheit der intakten TatB-Komponente wirkte sich sehr negativ auf das Wachstum der Mutante aus, die sowohl auf der Platte als auch in Flüssigmedium nur sehr langsam wuchs und deutlich geringere OD_{580} -Werte als der Wildtyp NCPPB382 erreichte. Der beobachtete Wachstumsdefekt konnte als eine direkte Folge der verschlechterten/blockierten Proteinsekretion über die unvollständige Translokase angesehen werden und spiegelte zum ersten Mal die Bedeutung des Tat-Systems für den Transport von Proteinen, die für Aufrechterhaltung des normalen Stoffwechsels notwendig waren, in *Cmm* wider. Die Untersuchung des Exoproteoms der

tatB-Mutante und der Vergleich mit dem Exoproteom des Wildtyps NCPPB382 führten anschließend zur Identifizierung zweier Substrate des Tat-Systems, einer β -N-Acetylglucosaminidase (NagA, CMM_0049) und eines Proteins unbekannter Funktion (CMM_0338), die in der Mutante extrazellulär nicht mehr nachweisbar waren. Für beide Proteine war die Tat-Signalpeptid-abhängige Sekretion vorhergesagt. Die β -N-Acetylglucosaminidase ist dem NagA-Protein von *Streptomyces thermoviolaceus* homolog und gehört zu den Glykosylhydrolasen der Klasse 3, in der auch β -D-Glukosidasen eingeordnet werden. NagA-Proteine aus *Streptomyces* werden ebenfalls Tat-abhängig sekretiert und sind wahrscheinlich am Abbau von Chitin oder auch anderen Glukanen beteiligt (Widdick *et al.*, 2006; Tsujibo *et al.*, 1998). Die Funktion des zweiten Tat-Substrats CMM_0338, das im M9-Überstand von *Cmm* in sehr großen Mengen gefunden wurde, bleibt unklar. Es zeigt Homologie zu Penicillin-Bindeproteinen und könnte am Zellwand-Metabolismus beteiligt sein. Da die Sekretion dieser Proteine in der *tatB*-Mutante vollständig blockiert war, ist das TatB-Protein als eine essentielle Komponente der Tat-Translokase von *Cmm* anzusehen. Der drastische Wachstumsdefekt lässt sich wiederum nicht alleine durch den Ausfall dieser beiden Proteine erklären. Womöglich sind auch weitere Zelloberflächen-gebundene Proteine (in der Membran oder Zellwand) betroffen, die aufgrund der Bindung z.B. an die Zellwand im Exoproteom nicht auftauchen.

Die Charakterisierung dieser Mutante im Pflanzentest zeigte ein im Vergleich zum Kontrollstamm NCPPB382 stark verändertes Virulenzverhalten. Die Mutante kolonisierte die Pflanze mit einem um 4-5 Zehnerpotenzen geringeren Titer und löste keine Welkesymptome mehr aus. Das Ausbleiben von Welkesymptomen kann eine direkte Folge einer verringerten Kolonisationsfähigkeit der *tatB*-Mutante sein, da *Cmm* erst ab dem Titer von 10^7 (Bakterien/g Pflanze) die Pflanze ernsthaft schädigt und Welkesymptome hervorruft (Stork *et al.*, 2008). Die deutlich verringerte Kolonisationsfähigkeit der *tatB*-Mutante ist dagegen auf den Sekretionsdefekt zurückzuführen, der sowohl die Sekretion wichtiger Virulenzfaktoren aber auch anderer für das Wachstum und Überleben der Bakterien wichtiger Proteine beeinflussen kann. Laut Computervorhersagen sind mehr als $\frac{1}{4}$ der vorhergesagten Tat-Substrate Substratbindeproteine von ABC-Transportern, die für den Transport von Nährstoffen in die Zelle notwendig sind (z.B. CMM_0108, CMM_0196). Zusätzlich sind unter den putativen Tat-Substraten auch Zelloberflächenproteine, die mit der Pflanzenabwehr interagieren und diese unschädlich machen könnten. Zwar scheint im Gegensatz zum Sec-System die Anzahl der über das Tat-System sekretierter Proteine nicht so hoch zu sein, aber der avirulente Phänotyp der Mutante zeigt, dass das Tat-System für den Transport von Virulenzfaktoren oder Proteinen, die zum Überleben in der Pflanze nötig sind, wichtig sein muss.

In *Streptomyces* ist das Tat-System am Transport einer kleinen Mengen an sekretorischen Proteinen beteiligt und ist hier wichtiger als in *B. subtilis* und *E. coli* (Widdick *et al.*, 2006). In *S. coelicolor* wurde für 27 Proteine die Tat-abhängige Sekretion nachgewiesen, wobei hauptsächlich Zellwand-assoziierten Proteine untersucht wurden. Diese repräsentieren ein breites Spektrum an Funktionen und sind in Phosphat- und Kohlenstoffmetabolismus, sowie Nährstofftransport und Lipidmetabolismus involviert. Überraschenderweise waren vier der 27 Proteine als Lipoproteine annotiert. Dies deutet darauf hin, dass die Signalpeptidasen der Klasse I und II in der Lage sind, das Tat-Signalpeptid zu erkennen und abzuspalten. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass etwa 30% aller exportierten Zellwandproteine, die unter den untersuchten Bedingungen detektiert werden konnten, über das Tat-Sekretionssystem ausgeschleust werden, das neben dem Sec-System ein weiteres bedeutendes System für die Proteintranslokation in *S. coelicolor* darstellt (Widdick *et al.*, 2006). Die Inaktivierung des Tat-Systems in *S. coelicolor* und *S. lividans* ist mit einer Reihe deutlicher phänotypischer Veränderungen wie zerstreutem Wachstum in Flüssigkultur, Verlust der Sporulationsfähigkeit auf Saccharose-haltigem Festmedium und erhöhter Brüchigkeit der Hyphen, die einen Zellwanddefekt reflektiert, assoziiert (Schaerlaekens *et al.*, 2004; Widdick *et al.*, 2006). Eine *tatC*-Mutante in *S. scabies* weist neben dem reduzierten Wachstum, einen Zellwand- sowie Sporulationsdefekt auf und ist in *Arabidopsis* avirulent (Joshi *et al.*, 2010). Von den 47 Proteinen, für die eine Tat-abhängige Sekretion nachgewiesen wurde, sind 7 Virulenzfaktoren (z.B. Glykosylhydrolasen SCAB03871, SCAB10131).

Über das Tat-System können auch Proteine ohne Signalpeptid transloziert werden, wenn diese intrazellulär einen Komplex mit einem Tat-Signalpeptid tragenden Protein bilden, so wie die Tyrosinase von *S. lividans*, deren Aktivierung und Sekretion erst nach der Ausbildung eines Komplexes mit dem Signalpeptid-tragenden Transaktivatorprotein erfolgt (Schaerlaekens *et al.*, 2001).

4. Extrazellulär lokalisierte Proteine ohne ein klassisches Signalpeptid

Insgesamt wurden unter allen untersuchten Bedingungen 72 Proteine im Exoproteom (48 %) von *Cmm* nachgewiesen, für die kein klassisches Signalpeptid vorhergesagt ist. Diese Proteine könnten über Lyse eines Teils der *Cmm*-Zellen während der Kultivierung oder der Aufarbeitung der Kulturen in größeren Mengen nach außen gelangt sein. Dies wird sicherlich für viele der Proteine, die nur in geringen Mengen im Exoproteom auftraten, der Fall sein. In welchem Ausmaß Zellyse in den Experimenten auftrat, kann nicht sicher bewertet werden. Da typische intrazelluläre Proteine wie z.B. ribosomale Proteine und die RNA- und DNA-Polymerasen jedoch nicht in größeren Mengen im „Exoproteom“ gefunden wurden, sollte der Anteil durch Lyse freigesetzter Proteine gering sein. Allerdings finden sich einige wenige

typischerweise cytoplasmatische Proteine unter fast allen Bedingungen in großen Mengen wieder, dazu gehören z.B. der Translationsfaktor EF-Tu, die Chaperone GroEL und DnaK, und die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

Mehrere dieser Proteine wurden allerdings auch im extrazellulären Milieu in verschiedensten Bakterienspezies nachgewiesen (Bendtsen *et al.*, 2005), so dass eventuell eine Sekretion dieser Proteine über einen bisher unbekanntem Weg erfolgt. Diese sogenannte nicht-klassische Sekretion ist nicht Signalpeptid-abhängig und betrifft diverse Proteingruppen. Ein Beispiel ist der oben erwähnte Cotransport eines Proteins ohne Signalpeptid, das in einem Komplex mit einem Signalpeptid-tragenden Protein über das Tat-System ausgeschleust wird. Ein weiteres Beispiel ist die Sekretion von GlnA in *Mycobacterium*, das das Signal für den Export wahrscheinlich innerhalb des Proteins enthält. (Harth *et al.*, 1997).

Von den im *Cmm*-Exoproteom lokalisierten Proteinen ohne ein klassisches Signalpeptid wurden die Proteine KatA, GroEL ebenfalls in *B. subtilis*, die Proteine EF-Tu und DnaK in *Listeria monocytogenes* und die GAPDH, EF-G und mehrere ribosomale Proteine in beiden Gattungen entweder an der Zelloberfläche oder im extrazellulären Raum nachgewiesen (Bendtsen *et al.*, 2005). Die Freisetzung von EF-Tu konnte ebenfalls für *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas fluorescens* und *Dickeya chrysanthemi* nachgewiesen werden (Watt *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2004; Kazemi-Pour *et al.*, 2004). Für die meisten dieser Proteine bleibt ihre extrazelluläre Funktion unklar, während sie für einige schon bestimmt werden konnte. So scheint EF-Tu am Aufbau des Cytoskeletts beteiligt zu sein (Mayer *et al.*, 2003). In der *Arabidopsis*-*Agrobacterium tumefaciens*-Interaktion wirkt EF-Tu als Elicitor, dessen Bindung an einen Rezeptor zur Reduktion der T-DNA-Transformationsrate führt (Zipfel *et al.*, 2006). Für die Katalase von *B. subtilis* wird eine ähnliche Rolle angenommen wie für ihr Ortholog aus *Legionella pneumophila*, das für Redoxreaktionen im Periplasma in der stationären Phase wichtig ist (Bandyopadhyay *et al.*, 2000). Somit ist es möglich, dass die zu mindestens häufig auftretenden Proteine auf noch unbekanntem Weg sekretiert werden und nicht über Zellyse nach außen gelangen.

5. Potentielle Modifizierung von *Cmm*-Proteinen

Mehrere der extrazellulären Proteine von *Cmm* wurden an mehr als einer Stelle im SDS-PAGE detektiert, eine Tatsache, die für posttranslationale Modifikationen dieser Proteine spricht. Die Detektion der meisten dieser Proteine in Reihen von zwei oder mehr Spots gleicher Masse, aber unterschiedlicher isoelektrischer Punkte könnte entweder auf die kovalente Verknüpfung dieser Proteine mit geladenen Gruppen (z.B. Phosphat, Acetat), die hauptsächlich die Ladung des Proteins, aber kaum seine Masse verändern, zurückzuführen

sein, oder aber auch Artefakte der isoelektrischen Fokussierung darstellen (Antelmann *et al.*, 2001).

Eine mögliche Modifikation über proteolytische Prozessierung wurde lediglich für zwei Proteine (SbtC, CelA) beobachtet und ist auf den strukturellen Aufbau dieser Proteine aus mehreren Domänen zurückzuführen. Die potentielle Prozessierung der Subtilase führte zu mindestens 7 und die der Cellulase zu 3 verschiedenen Formen, die sowohl in ihrer Masse als auch isoelektrischen Punkten signifikant von den vorhergesagten Werten abwichen. Obwohl die Rolle posttranslationaler Modifikationen in *Cmm* noch unbekannt ist, könnten sie zu einer veränderten Funktion des Proteins führen und somit neben der Regulation auf der Transkriptionsebene einen weiteren wichtigen Regulationsmechanismus darstellen.

Untersuchungen zum intrazellulären Proteom von *Streptomyces coelicolor* führten zur Identifizierung von 770 Genprodukten, von denen ca. 110 posttranslational modifiziert wurden (Hesketh *et al.*, 2002). Über MALDI-TOF-Analysen konnte für 10 dieser Proteine die genaue Art der Modifikation (z.B. N-Acetylierung, Adenylierung und proteolytische Prozessierung) bestimmt werden. Die Tatsache, dass unter den modifizierten Proteinen sich auch eine Reihe von Enzymen des primären und sekundären Metabolismus befindet, führte zu der Annahme, dass posttranslationale Modifikationen eine Schlüsselrolle in der Regulation dieser Prozesse spielen könnten. In *B. subtilis* konnten 78 Proteine identifiziert werden, die posttranslational phosphoryliert werden. Die detektierten Phosphoproteine umfassen neben mehreren regulatorischen Proteinen wie Proteinkinasen oder mehreren Vertretern der Phosphotransferase-Systeme, vor allem Enzyme, die in die wichtigsten Prozesse der Kohlenhydratverwertung involviert sind. Phosphorylierungsstellen wurden an beinahe allen glykolytischen Enzymen, aber auch zahlreichen Enzymen des Tricarbonsäurezyklus und des Pentose-Phosphat-Weges festgestellt. Die Phosphorylierung scheint die katalytische Aktivität dieser Proteine zu modulieren und somit einen wichtigen Regulationsmechanismus auf posttranslationaler Ebene in Gram-positiven Bakterien darzustellen (Macek *et al.*, 2007).

Ähnliche Untersuchungen sind auf Exoproteomeebene bei Gram-positiven Bakterien bisher nicht durchgeführt worden. Erste Untersuchungen zur Phosphorylierung von PpaE in Zusammenarbeit mit R. Hofrogge (Technische Fakultät, Universität Bielefeld) waren wohl aufgrund der Überlagerung mehrerer Proteine nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). In Zukunft müssen die Mitglieder der Ppa-Familie, die eventuell phosphoryliert werden, und SbtC, das anscheinend proteolytisch modifiziert wird, durch N-terminale Ansequenzierung, genauer untersucht werden.

Während für die aus drei Domänen aufgebaute Cellulase CelA zwei verkürzte Formen nachgewiesen wurden, die einer möglichen proteolytischen Prozessierung an den Domänengrenzen entsprechen (Jahr *et al.*, 2000), wurden für SbtC, das aus mindestens fünf

Domänen besteht, sieben Formen unterschiedlicher Massen im *in vitro*-Exoproteom gefunden. Erste Versuche einer Zuordnung der kleineren, prozessierten Formen (z.B. der 110 kDa Form, in der nur das Propeptid abgespalten ist, und dementsprechend keine Peptide aus den N-terminalen 150 Aa mehr nachweisbar sein sollten) zu den identifizierten tryptischen Peptiden führten nicht zu stimmigen Ergebnissen. Allerdings werden mittels MALDI-TOF-MS nur Peptidmassen bestimmt, und die Wahrscheinlichkeit eines einzelnen Peptids aufgrund seiner Masse falsch zu einem Protein zugeordnet zu werden, besteht, so dass verkürzte Formen eines Proteins eventuell nicht identifiziert werden können. In Zukunft müssen dementsprechend die verkürzten Formen aus dem Gel isoliert werden und anschließend einzeln entweder ansequenziert oder nach tryptischem Verdau erneut durch MALDI-TOF-MS aufgetrennt werden.

6. Analyse des Xylemsaftproteoms

Erste Proteomanalysen des Xylemsaftes von Tomaten, die mit verschiedenen *Cmm*-Stämmen infiziert waren, wurden durchgeführt, um *in vivo* Proteomdaten für *Cmm* zu erhalten und die eventuell vorhandene wechselseitige Induktion/Repression von Proteinen zwischen *Cmm* und der Tomate zu untersuchen. Da nur geringe Mengen an Xylemsaft (und folglich auch nur geringe Proteinmengen) isoliert werden können, können nur Proteine nachgewiesen werden, die in hohen Konzentrationen vorliegen. Zusätzlich ist wahrscheinlich kurz nach der Infektion der *Clavibacter*-Titer zu gering, um überhaupt *Clavibacter*-Proteine nachweisen zu können. Also wurde ein später Zeitpunkt (2-3 Wochen nach Infektion), zu dem bereits Symptome sichtbar waren, gewählt, um Xylemsaft zu isolieren.

Es wurden nur maximal 6 *Cmm*-Proteine und 16 Tomatenproteine identifiziert. Der Xylemsaft *mock*-inokulierter Pflanzen und der Xylemsaft, der aus Pflanzen gewonnen wurde, die mit dem avirulenten Stamm CMM100 infiziert waren, zeigten auf Ebene der Tomatenproteine mit einer Ausnahme keine Unterschiede. Bei CMM100 wurden zwei *Cmm*-Proteine, eine Form der Subtilase C und die PpaB1/B2-Proteine, in relativ geringen Mengen nachgewiesen. Im Xylemsaft mit virulenten und avirulenten *Cmm*-Stämmen infizierter Pflanzen wurden noch vier weitere sekretierte Proteine identifiziert.

Die Interaktion vom Pathogen und Wirt induziert in der Regel eine Reihe von Abwehrmechanismen, zu den z.B. die Synthese von PR-Proteinen oder anderer hydrolytischer Proteine gehört. Dies kann auch in der kompatiblen Reaktion auftreten, so ist für *Cmm* die Induktion einer Reihe von Abwehrmechanismen wie die Synthese von PR-Proteinen, Extensinen und Proteinen, die an der Synthese und Neutralisierung reaktiver Sauerstoffspezies oder Biosynthese der Pflanzenhormone Ethylen und Jasmonsäure beteiligt sind, bekannt (Beimen *et al.*, 1992; Balaji *et al.*, 2008).

Unabhängig von der *Cmm*-Infektion konnten mehrere Tomatenproteine nachgewiesen werden, die zu mindestens zu einem bestimmten Level konstitutiv exprimiert werden, aber mit Abwehrreaktionen verbunden sind (z.B. 2 Endochitinasen und eine Peroxidase). Die beiden identifizierten Endochitinasen gehören zu den PR-Proteinen, die z.B. in Folge eines Pilzbefalles induziert werden. Viele pflanzliche Endochitinasen zeigen zusätzlich eine Lysozymaktivität, die ihnen den Abbau bakterieller Zellwände ermöglicht (Brunner *et al.*, 1998). Die identifizierten pflanzlichen Peroxidasen sind sekretierte Klasse III Peroxidasen mit einer Vielzahl an Isoformen, die u. a. an der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), der Verstärkung der Zellwand und der Bildung von sekundären Metaboliten beteiligt sind. Ihre erhöhte Expression in vielen Pflanzenspezies schränkt Pathogene in ihrer Ausbreitung ein (Passardi *et al.*, 2005).

Die Serinpeptidase P69B, die homolog zu den *Cmm*-Subtilasen SbtA, B und C ist, war das einzige Tomatenprotein, dass durch die Interaktion mit *Cmm* (und zwar auch CMM100) induziert wurde. Die nah verwandte P69C-Peptidase war unabhängig von *Cmm* auch in *mock*-infiziertem Xylemsaft zu finden. Die Proteine P69B und P69C sind zwei relativ nah verwandte Serinproteasen aus der Familie der pflanzlichen Subtilisin-ähnlichen Proteasen, die sowohl während der Entwicklung als auch während der Pathogenese proteolytisch aktiv sind (Jorda *et al.*, 1999). Sie sind mit zellulärer Abwehr und Reaktionen auf Stress assoziiert, die u.a. eine Restrukturierung und Verstärkung der Zellwand bewirken, um das Pathogen in seiner Ausbreitung zu stoppen (Dixon *et al.*, 1990).

Dass nur das P69B Protein als *Cmm*-induziert identifiziert wurde, kann am späten Zeitpunkt der Probenahme liegen, da die meisten Abwehrreaktionen in Pflanzen schnell verlaufen. In der kompatiblen Interaktion konnte aber auch die Induktion verschiedener PR-Proteine zu einem späten Zeitpunkt, wie auch in dieser Arbeit gewählt, beobachtet werden. So konnte im Tomate-*Fusarium*-System die Induktion von mehr als 20 Tomatenproteinen detektiert werden, von denen mehrere PR-Proteine, Glukanasen, Chitinasen Peroxidasen, eine Polygalakturonase und eine Subtilisin-ähnliche Protease als für die Infektion spezifisch eingestuft wurden (Houterman *et al.*, 2007).

In zukünftigen Experimenten können auch Zeitpunkte kurz nach der Infektion untersucht werden, an denen zwar wahrscheinlich keine *Cmm*-Proteine nachgewiesen werden können, aber die eventuelle Induktion von Tomatenproteinen deutlich zu Tage treten sollte.

Um die Interaktion zwischen *Cmm* und Tomate zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion oder im Zeitverlauf zu untersuchen, kann auch eine alternative empfindlichere Methode, die sogenannte MudPIT („multidimensional protein identification technology“), angewandt werden, bei der auf die Auftrennung im Gel verzichtet wird und folglich wesentlich geringere Proteinmengen benötigt werden. Diese Methode ist bereits in der *Cmm*-/Tomaten-Interaktion eingesetzt worden (Savidor *et al.*, 2012). Es wurden *in vitro* unter ähnlichen

Bedingungen in etwa dieselben Proteine identifiziert wie in dieser Arbeit, u.a. alle auch im Rahmen dieser Arbeit identifizierten potentiellen Virulenzfaktoren. Allerdings konnten etwa 80% Proteine mehr gefunden werden. Die deutlich höhere Sensitivität dieser Methode führte vor allem bei Untersuchungen des Tomatenxylemsaftes zu einer wesentlich größeren Anzahl identifizierter Proteine (etwa 2000 Tomatenproteine und etwa 800 *Cmm*-Proteine gegenüber 16 und 6 Proteine mit der 2D-Gelelektrophorese in dieser Arbeit).

Zur Proteom-Analyse verschiedener *Cmm* Stämme unter verschiedenen Bedingungen lässt sich zusammenfassend sagen, dass keine neuen Kandidaten gefunden wurden, die von den Vorhersagen her zur Entwicklung der Virulenz beitragen könnten. Unter den 78 extrazellulären Proteinen sind die bekannten Virulenzfaktoren und viele andere Proteine für die aufgrund ihrer Funktion eine Beteiligung an der *Cmm*-Tomate-Interaktion bereits angenommen wurde. Mit dem Exoproteom wird aber auch nur ein Teil (laut Vorhersagen etwa 30%) der sekretierten Proteine, die wirklich nach außen abgegeben werden, erfasst, während die über kovalente/nicht kovalente Bindungen an Membran oder Zellwand verankerten Proteine in den meisten Fällen bei der Aufarbeitung verloren gehen. Diese Membran- bzw. Zellwand-assoziierten Proteine sind aber auch an dem ersten Kontakt, der Kommunikation zwischen dem Pathogen und dem Wirt beteiligt und können wichtig für die Virulenz sein. Obwohl im Exoproteom teilweise auch Membranproteine, z.B. Substratbindeproteine der ABC-Transporter detektiert wurden, waren Membran- und Zellwandproteome nicht Gegenstand dieser Arbeit und sollten in Zukunft mit geeigneten Methoden näher untersucht werden.

G. Literaturverzeichnis

- Abt B. (2008) Untersuchungen zur Stabilität und Konjugation der Plasmide pCM1 und pCM2 von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Dissertation, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Aderem A, Ulevitch RJ. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406.
- Anonymous (2005) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. OEPP/EPPO Bull. 35, 275-283.
- Antelmann H, Tjalsma H, Voigt B, Ohlmeier S, Bron S, van Dijl JM, Hecker M. (2001) A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. *Genome Research* 11, 1484-1502.
- Balaji V, Sessa G. (2008) Activation and manipulation of host response by a Gram-positive bacterium. *Plant Signal. Behav.* 3, 839-841.
- Bandyopadhyay P, Steinmann HM. (2000) Catalase-peroxidases of *Legionella pneumophila*: cloning of the *katA* gene and studies of KatA function. *J. Bacteriol.* 182, 6679-6686.
- Barras F, van Gijsegem F, Chatterjee AK. (1994) Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 201-234.
- Bauer WD, Talmadge KW, Keegstra K, Albersheim P. (1973) The structure of plant cell walls. The hemicellulose of the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiol.* 51, 174-187.
- Beimen A, BERPohl A, Meletzus D, Eichenlaub R, Barz W. (1992) Accumulation of phenolic compounds in leaves of tomato plants after infection with *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* strains differing in virulence. *Z. Naturforsch.* 47c, 898-909.
- Bendtsen JD, Kiemer L, Fausboll A, Brunak S. (2005) Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol.* 5, 58.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP3.0. *J. Mol. Biol.* 340, 783-795.
- BERPohl A, Dreier J, Bahro R, Eichenlaub R. (1996) Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. *Microbiol. Res.* 151, 391-399.
- Bernstein HD. (2007) Are bacterial 'autotransporters' really transporters? *Trends Microbiol.* 15, 441-447.
- Biely P, Markovic O, Mislovicova D. (1985) Sensitive detection of endo-1,4-beta-glucanases and endo-1,4-beta-xylanases in gels. *Anal. Biochem.* 144, 147-151.
- Biely P. (1985) Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3, 286-290.
- Boccaro M, Aymeric JL, Camus C. (1994) Role of endoglucanases in *Erwinia chrysanthemi* 3937 virulence on *Saintpaulia ionantha*. *J. Bacteriol.* 176, 1524-1526.

- Braun EJ, Rodrigues CA. (1993) Purification and properties of an endoxylanase from a corn stalk rot strain of *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathol.* 83, 332-338.
- Brito N, Espino JJ, Gonzalez C. (2006) The endo- β -1,4-xylanase Xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea*. *MPMI.* 19, 25-32.
- Brunner F, Stinzi A, Fritig B, Lagrand M. (1998) Substrate specificities of tobacco chitinases . *Plant J.* 14, 225-234.
- Buskiewicz I, Kubarenko A, Peske F, Rodnina MV, Wintermeyer W. (2005) Domain rearrangement of SRP protein Ffh upon binding 4.5S RNA and the SRP receptor FtsY. *RNA.* 11, 947-957.
- Büttner D, He SY. (2009) Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol.* 150, 1656-1664.
- Callebaut I, Gilges D, Vigon I, Mornon JP. (2000) HYR, an extracellular module involved in cellular adhesion and related to the immunoglobulin-like fold. *Protein Sci.* 9, 1382-1390.
- Cascales E, Christie PJ. (2003) The versatile bacterial Type IV secretion systems. *Nature Rev.* 1, 137-149.
- Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. (1997) Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14648–14653.
- Chalupowicz L, Cohen-Kandli M, Dror O, Eichenlaub R, Gartemann KH, Sessa G, Barash I, Manulis-Sasson S. (2010) Sequential expression of bacterial virulence and plant defense genes during infection of tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathol.* 100, 252-261.
- Chen I, Prowedi R, Dubnau D. (2006) A macromolecular complex formed by a pilin-like protein in competent *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 31, 21720-21727.
- Cheng LW, Schneewind O. (2000) Type III machines of gram negative bacteria: delivering the goods. *Trends Microbiol.* 8, 214–220.
- Ciancotto NP. (2005) Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol.* 13, 581-588.
- Cohn J, Sessa G, Martin GB. (2001) Innate immunity in plants. *Curr. Opin. Plants* 13, 55-62.
- Collins T, Gerday C, Feller G. (2004) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 3-23.
- Comfort D, Clubb RT. (2004) A comparative genome analysis identifies distinct sorting pathways in gram-positive bacteria. *Infect. Immun.* 72, 2710-2722.
- Cooper RM. (1983) The mechanisms and significance of enzymatic degradation of host cell walls by parasites. *John Wiley and Sons*, New York, N. Y.
- Cosgrove DJ. (2005) Growth of the plant cell wall. *Nature* 6, 850-861.

- Dangl JL, Jones JDG. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411.
- Delepelaire P. (2004) Type I secretion in gram negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1694 (1-3), 149-161.
- Desvaux M, Dumas E, Chafsey I, Hebraud M. (2006) Protein cell surface display in gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiol. Lett.* 256, 1-15.
- Desvaux M, Hebraud M, Talon R, Henderson IR. (2009) Secretion and subcellular localisations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol.* 17, 139-145.
- Desvaux M. (2006) Type III secretion: what's in a name? *Trends Microbiol.* 14, 157-160.
- Ding Z, Christie PJ. (2003) *Agrobacterium tumefaciens* twin-arginine-dependent translocation is important for virulence, flagellation and chemotaxis but not type IV secretion. *J. Bacteriol.* 185, 760-771.
- Dixon RA, Lamb CJ. (1990) Molecular communication interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 339-367.
- Dreier J, Meletzus 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.
- Dreier J. (1992) Identifikation pathogener Determinanten des *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* Plasmids pCM2. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Dubnau D. (1999) DNA uptake in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 217-244.
- Duong F, Wickner W. (1997) Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFYajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *EMBO J.* 16, 2756-2768.
- Eichenlaub R, Gartemann KH. (2011) The *Clavibacter michiganensis* subspecies, molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 7.1-7.20.
- Enkerli J, Felix G, Boller T. (1999) The enzymatic activity of fungal xylanase is not necessary for its elicitor activity. *Plant Physiol.* 121, 391-397.
- Felix G, Boller T. (2003) Molecular sensing of bacteria in plants. *J. Biol. Chem.* 278, 6201-6208.
- Filloux A, Hachani A, Bleves S. (2008) The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiol.* 154, 1570-1583.
- Filloux A. (2004) The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim. Biophys. Acta.* 1694, 163-179.
- Flor HH. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275-296.

- Flower AM. (2001) SecG function and phospholipid metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 2006-2012.
- Flügel M. (2010) Transkriptomanalysen zur Interaktion von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* mit seiner Wirtspflanze. Dissertation, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Flügel M, Becker A, Gartemann KH, Eichenlaub R. (2012) Analysis of the interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with its host plant tomato by genome-wide expression profiling. *J. Bacteriol.* 2012
- Galan JE, Collmer A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Sci.* 284, 1322-1328.
- Gartemann KH, Abt B, Bekel T, Burger A, Engemann B, Flügel M, Gaigalat L, Goesmann A, Gräfen I, Kalinowski B, Kaup O, Kirchner O, Krause L, Linke B, McHardy A, Meyer F, Pohle S, Rückert C, Schneiker S, Zellermann EM, Pühler A, Eichenlaub R, Kaiser O, Bartels D. (2008) The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J. Bacteriol.* 190, 2138-2149.
- Ghosh P. (2004) Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 771-795.
- Gough CL, Dow MJ, Barber CE, Daniels MJ. (1988) Cloning of two endoglucanase genes of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: analysis of the role of the major endoglucanase in pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1, 275-281.
- Grant S, Jessee J, Bloom F, Hanahan D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4645-4649.
- Grant M, Mansfield J. (1999) Early events in host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 312-319.
- Halstead JR, Vercoe PE, Gilbert HJ, Davidson K, Hazlewood GP. (1999) A family 26 mannanase produced by *Clostridium thermocellum* is a component of the cellulosome contains a domain which is conserved in mannanases from anaerobic fungi. *Microbiol.* 145, 3101-3108.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8, 1773-1791.
- Harth G, Horwitz MA. (1997) Expression and efficient export of enzymatically active *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase in *Mycobacterium smegmatis* and evidence that the information for export is contained within the protein. *J. Biol. Chem.* 272, 22728-22735.
- Heath M. (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 315-319.

- Hedge RS, Bernstein HD. (2006) The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem. Sci.* 31, 563-571.
- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez C, Ala'Aldeen D. (2004) Type V secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 692-744.
- Hesketh AR, Chandra G, Shaw AD, Rowland JJ, Kell DB, Bibb MJ, Chater KF. (2002) Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 46, 917-932.
- Hofreuter D, Odenbreit S, Puls J, Schwan D, Haas R. (2000) Genetic competence in *Helicobacter pylori*: mechanisms and biological implications. *Res. Microbiol.* 151, 487-491.
- Houterman PM, Speijer D, Dekker HL, de Koster CG, Cornelissen BJC, Rep M. (2007) The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Mol. Plant Pathol.* 8, 215-221.
- Hu W, Yuan J, Jin QL, Hart P, He SY. (2001) Immunogold labeling of Hrp pili of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* assembled in minimal medium and in planta. *MPMI* 14, 234-241.
- Huang Q, Allen C. (1997) An exo-poly- α -D-galacturonase, PehB, is required for wild-type virulence of *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.* 179, 7369-7378.
- Hueck CJ. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 379-433.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Condemine G, Nasser W, and Reverchon S. (1996) Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 213-57.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Shevchik VE, Nasser W. (2002) PehN, a polygalacturonase homologue with low hydrolase activity, is coregulated with other *Erwinia chrysanthemi* polygalacturonases. *J. Bacteriol.* 184, 2664-2673.
- Hutchings MI, Palmer T, Harrington DJ, Sutcliffe IC. (2008) Lipoprotein biogenesis in gram-positive bacteria: knowing when to hold 'em, knowing when to fold 'em. *Trends in Microbiol.* 17, 13-21
- Innes RW, Bent AF, Kunkel BN, Bisgrove SR, Staskawicz BJ. (1993) Molecular analysis of avirulence gene *avrRpt2* and identification of a putative regulatory sequence common to all known *Pseudomonas syringae* avirulence genes. *J. Bacteriol.* 175, 4859-4869.
- 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.
- Jahr H. (2000) Characterization of the endo- β -1,4-glucanase CelA, a phytopathogenic determinant secreted by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and its role in symptom development. Dissertation, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.

- Janzik I, Macheroux P, Amrhein N, Schaller A. (2000) LeSBT1, a subtilase from tomato plants. *J. Biol. Chem.* 275, 5193-5199.
- Jenewein S, Holland IB, Schmitt L. (2009) Bacterial secreted proteins. Secretory mechanisms and role in pathogenesis.
- Jones JDG, Dangl JL. (2006) The plant immune system. *Nature* 444.
- Jongbloed JD, van der Ploeg R, van Dijk JM. (2005) Bifunctional TatA subunits in minimal Tat protein translokases. *Trends Microbiol.* 14, 2-4.
- Jonson AB, Normark S, Rhen M. (2005) Fimbriae, pili, flagella and bacterial virulence. *Contrib. Microbiol.* 12, 67-89.
- Jorda 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(4), 2360-2365.
- Joshi MV, Mann SG, Antelmann H, Widdick DA, Fyans JK, Chandra G, Hutchings MI, Toth I, Hecker M, Loria R, Palmer T. (2010) The twin arginine protein transport pathway exports multiple virulence proteins in the plant pathogen *Streptomyces scabies*. *Mol. Microbiol.* 77, 252-271.
- Kaup O. (2009) Die Tomatinase von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Dissertation, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Kaup O, Gräfen I, Zellermann E, Eichenlaub R, Gartemann KH. (2005) Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18, 1090-1098.
- Kazemi-Pour N, Condemine G, Hugouvieux-Cotte-Pattat N. (2004) The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Proteomics* 4, 3177-3186.
- Keen NT, Boyd C, Henrissat B. (1996) Cloning and characterization of a xylanase gene from corn strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9, 651-657.
- Kirchner O. (2003) Etablierung genetischer Methoden für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Charakterisierung von Mutanten mit veränderter Morphologie, Physiologie und Virulenz. Dissertation, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Kolattukudy PE. (1984) Biochemistry and function of cutin and suberin. *Can. J. Bot.* 62, 2918-2933.
- Lee PA, Tullman-Ercek D, Georgiou G. (2006) The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu Rev. Microbiol.* 60, 373-395.
- Liao CH, Hung HY, Chatterjee AK. (1988) An extracellular pectate lyase is the pathogenicity factor of the soft-rotting bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1, 199-206.
- Lotan T, Fluhr R. (1990) Xylanase, a novel elicitor of pathogenesis-related proteins in tobacco, uses a non-ethylene pathway for induction. *Plant Physiol.* 93, 811-817.

- Macek B, Mijakovic I, Olsen JV, Gnad F, Kumar C, Jensen PR, Mann M. (2007) Phosphoproteome of *B. subtilis*. *MCP* 6.4, 697-707.
- Mackman N, Holland IB. (1984) Functional characterization of a cloned haemolysin determinant from *E. coli* of human origin, encoding information for the secretion of a 107K polypeptide. *Mol. Gen Genet.* 196, 129-134.
- Madden JC, Ruiz N, Caparon M. (2001) Cytolysin-mediated translocation (CMT): A functional equivalent of type III secretion in gram-positive bacteria. *Cell* 104, 143-152.
- Mayer F. (2003) Cytoskeletons in prokaryotes. *Cell Biol. Internat.* 27, 429-438.
- 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.
- Mota LJ, Journet L, Sorg I, Agrain C, Cornelis GR. (2005) Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Sci.* 307, 1278.
- Nimchuk Z, Rohmer L, Chang J, Dangl JL. (2001) Knowing the dancer from the dance: R-gene products and their interactions with other proteins from host and pathogen. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 288-294.
- Nishiyama K, Hanada M, Tokuda H. (1994) Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J.* 13, 3272-3277.
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L. (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immun. Rev.* 198, 249-266.
- Nürnberg T, Scheel D. (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.* 6, 372-379.
- Ochsner UA, Snyder A, Vasil AI, Vasil ML. (2002) Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 8312-8317.
- Pallen MJ. (2002) The ESAT-6/WXG100 superfamily-and a new grampositive secretion system? *Trends Microbiol.* 10, 209-212.
- Palomino C, Mellado RP. (2008) Influence of a *Streptomyces lividans* SecG funktional analogue on protein secretion. *Internat. Microbiol.* 11, 25-31.
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C. (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* 24, 255-265.
- Perombelon MCM. (2002) Potato diseases caused by soft rot *erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathol.* 51, 1-12.

- Pogliano JA, Beckwith J. (1994) SecD and SecE facilitate protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 13, 554–561.
- Power SD, Adams RM, Wells JA. (1986) Secretion and autoproteolytic maturation of subtilisin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3096-3100.
- Pugsley AP. (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 57, 50-108.
- Rai PV, Strobel GA. (1969) Phytotoxic glycopeptides produced by *Corynebacterium michiganense*. II. Biological properties. *Phytopathol.* 59, 53-57.
- Rajeshwari R, Jha G, Sonti RV. (2005) Role of an in planta-expressed xylanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in promoting virulence on rice. *MPMI.* 18, 830-837.
- Reddy JD, Reddy SL, Hopkins DL, Gabriel DW. (2007) ToIC is required for pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in *Vitis vinifera* grapevines. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 403-410.
- Roberts DP, Denny TP, Schell MA. (1988) Cloning of *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in pathogenicity. *J. Bacteriol.* 170, 1445-1451.
- Rodriguez-Palenzuela P, Burr TJ, Collmer A. (1991) Polygalacturonase is a virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *J. Bacteriol.* 73, 6547-6552.
- Rogers LM, Kim YK, Guo W, Gonzalez-Candelas L, Li D, Kolattukudy PE. (2000) Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9813-9818.
- Rose RW, Brüser T, Kissinger JC, Pohlschröder M. (2002) Adaptation of protein secretion to extremely high salt concentrations by extensive use of the twin arginine translocation pathway. *Mol. Microbiol.* 5, 943-950.
- Sandkvist M. (2001) Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol.* 40, 271–283.
- Savidor A, Teper D, Gartemann KH, Eichenlaub R, Chalupowicz L, Manulis-Sasson S, Barash I, Tews H, Mayer K, Giannone RJ, Hettich RL, Sessa G. (2012) The *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-tomato interactome reveals the perception of pathogen by the host and suggests mechanisms of infection. *J. Proteome Res.* 11, 736-750.
- Schaerlaekens K, Schierova M, Lammertyn E, Geukens N, Anne J, van Mellaert L. (2001) Twin-arginine translocation pathway in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 183, 6727-6732.
- Schaerlaekens K, van Mellaert L, Lammertyn E, Geukens N, Anne J. (2004) The importance of the Tat-dependence protein secretion pathway in *Streptomyces* as revealed by phenotypic changes in tat deletion mutants and genome analysis. *Microbiol.* 150, 21-31.
- Schauer K. (2004) Genetische und biochemische Analyse der Exopolysaccharid-Biosynthese von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Untersuchung ihrer Rolle in der Pathogenität. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.

- Schell M, Roberts DP, Denny TP. (1988) Analysis of the *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonase encoded by *pglA* and its involvement in phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* 170, 4501-4508.
- Schindler T. (1993) Das neue Bild der Zellwand. *Biologie in unserer Zeit* 2, 113-120.
- Schott S. (2004) Charakterisierung von Transposonmutanten von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* mit veränderter Virulenz. Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.
- Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R. (2007) *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *J. Bacteriol.* 189, 8746-8749.
- Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. (1998) How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr. Opin. Immunol.* 10, 581-587.
- Sibbald MJJB, Winter T, van der Kooi-Pol MM, Buist G, Tsompanidou E, Bosma T, Schäfer T, Ohlsen K, Hecker M, Antelmann H, Engelmann S, van Dijl JM. (2010) Synthetic Effects of *secG* and *secY2* mutations on exoproteome biogenesis in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 192, 3788-3800.
- Sibbald MJJB, Ziebandt AK, Engelmann S, Hecker M, de Jong A, Harmsen HJM, Raangs CC, Stokroos I, Arends JP, Dubois JYF, van Dijl JM. (2006) Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 755-788.
- Singh P, Piotrowski M, Kloppstech K, Gau AE. (2004) Investigations on epiphytic living *Pseudomonas* species from *Malus domestica* with an antagonistic effect to *Venturia inaequalis* on isolated plant cuticle membranes. *Environ. Microbiol.* 6, 1149-1158.
- Sørensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. (1995) Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 63, 1710-1717.
- Stork I, Gartemann KH, 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.
- Strider DL. (1969) Bacterial cancer of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. A literature review and bibliography. *N. C. Agric. Exp. Stn. Tech. Bull. No.* 193
- Takeuchi Y, Tohbaru M, Sato A. (1994) Polysaccharides in primary cell walls of rice cells in suspension culture. *Phytochem.* 35, 361-363.
- 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.
- Taylor PD, Toseland CP, Attwood TK, Flower DR. (2006) TATPred: a Bayesian method for the identification of twin arginine translocation pathway signal sequences. *Bioinformatics* 1, 184-187.

- Thompson ET. (1986) The toxicity of a number of different bacteriocides to *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* (Smith 1910) Jensen 1934 comb. nov. basonym *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* (AL) and to the tomato plant, *Lycopersicon esculentum*. *J. Appl. Bacteriol.* 61, 427-436.
- Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JDH, Braun PG, Darmon E, Dorenbos R, Dubois JYF, Westers H, Geeske Z, Quax WJ, Kuipers OP, Bron S, Hecker M, van Dijk JM. (2004) Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the „secrets“ of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 207-233.
- Troisfontaines P, Cornelis G. (2005) Type III secretion: More systems than you think. *Phys.* 20, 326-339.
- Tseng TT, Tyler BM, Setubal JC. (2009) Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol.* 9
- Tsujibo H, Hatano N, Mikami T, Hirasawa A, Miyamoto K, Inamori Y. (1998) A novel β -N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520: gene cloning, expression, and assignment to family 3 of glycosyl hydrolases. *Appl. Env. Microbiol.* 64, 2920-2924.
- Van Steekelenburg NAM. (1985) Resistance to *Corynebacterium michiganense* in tomato genotypes. *Euphytica* 34, 245-250.
- Van Wely KHM, Swaving J, Broekhuizen CP, Rose M, Quax WJ, Driessen AJM. (1999) Functional identification of the product of the *Bacillus subtilis* yvaL gene as a SecG homologue. *J. Bacteriol.* 181, 1786-1792.
- Walton DJ. (1994) Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol.* 104, 1113-1118.
- Watt SA, Wilke A, Patschkowski T, Niehaus K. (2005) Comprehensive analysis of the extracellular proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100. *Proteomics* 5, 153-167.
- White FF, Yang B, Johnson LB. (2000) Prospects for understanding avirulence gene function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 291-298.
- Widdick DA, Dilks K, Chandra G, Bottrill A, Naldrett M, Pohlschröder M, Palmer T. (2006) The twin-arginine translocation pathway is a major route of protein export in *Streptomyces coelicolor*. *PNAS* 103, 17927-17932.
- Willats WGT, Orfilda C, Limberg G, Buchholt HC, van Alebeek G-JWM, Voragen AGJ *et al.* (2001) Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls: implications for pectin methyl esterase action, matrix properties and cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 276, 19404-19413.
- Wong KKY, Tan LUL, Saddler JN. (1988) Multiplicity of beta-1,4-xylanases in microorganisms: functions and applications. *Microbiol. Rev.* 52, 305-317.
- Wong WKR, Gerhard B, Guo ZM, Kilburn DG, Anthony R, Warren J, Miller RC. (1986) Characterization and structure of an endoglucanase gene *cenA* of *Cellulomonas fimi*. *Gene* 44, 315-324.

- Wu SC, Ham KS, Darvill AG, Albersheim P. (1997) Deletion of two endo- β -1,4-xylanase genes reveals additional isozymes secreted by the rice blast fungus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10, 700-708.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
- Zhou M, Boekhorst J, Francke C, Siezen RJ. (2008) LocateP: Genome-scale subcellular-location predictor for bacterial proteins. *BMC Bioinformatics* 9, 173-190.
- Zhu J, Oger PM, Schrammeijer B, Hooykaas PJ, Farrand SK, Winans SC. (2000) The bases of crown gall tumorigenesis. *J. Bacteriol.* 182 (14), 3885-3895.
- Zierler MK, Galan JE. (1995) Contact with cultured epithelial cells stimulates secretion of *Salmonella typhimurium* invasion protein InvJ. *Infect. Immun.* 63, 4024-4028.
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T, Felix G. (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125,749-760.

H. Anhang

1. Plasmidkarten

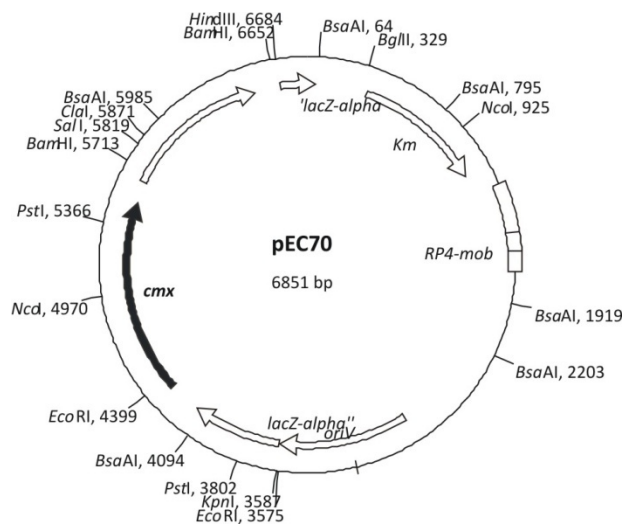


Abb. 1. Karte des Plasmides pEC70.

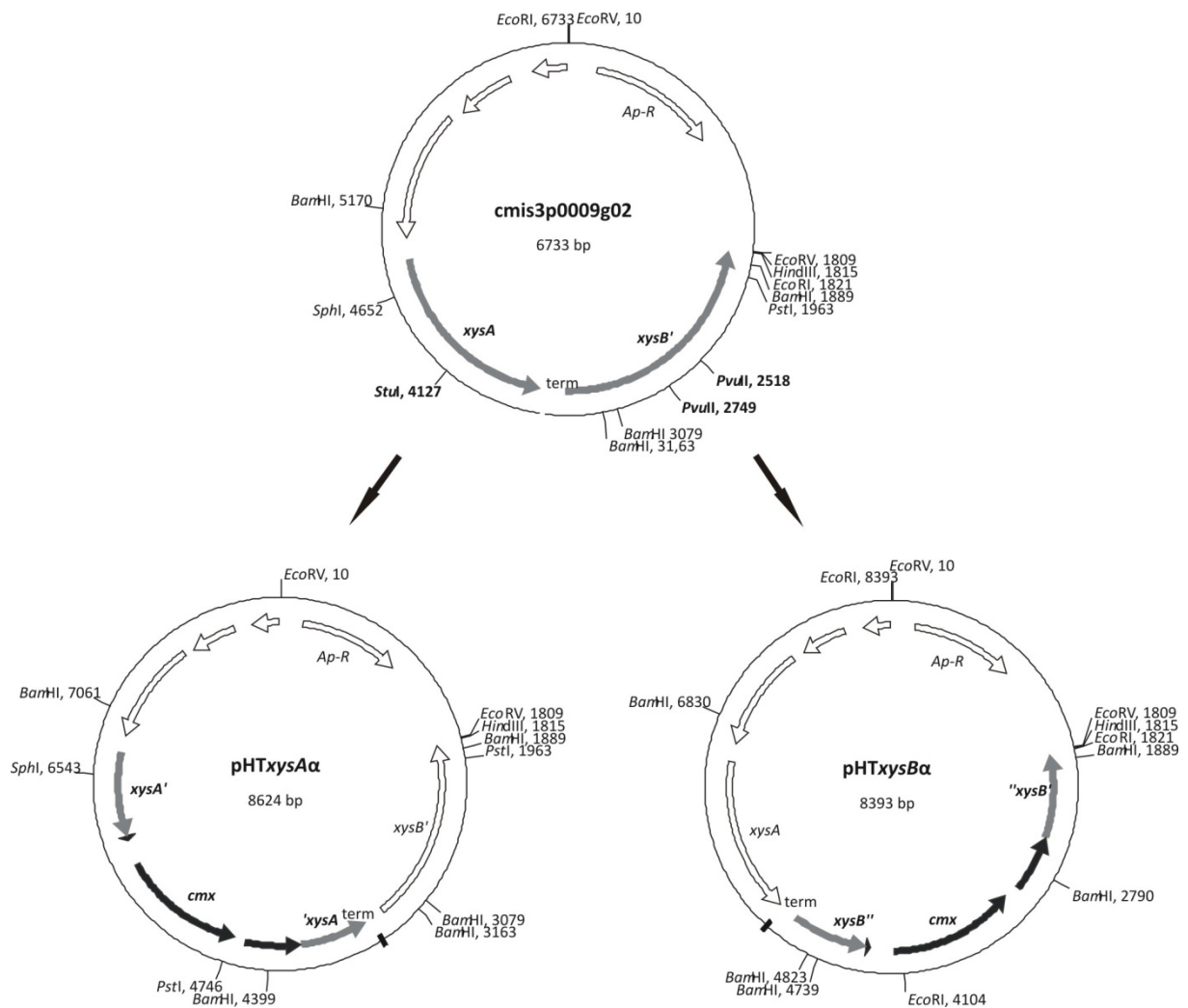


Abb. 2. Karten der Plasmide cmis3p0009g02, pHTxysA, pHTxysB.

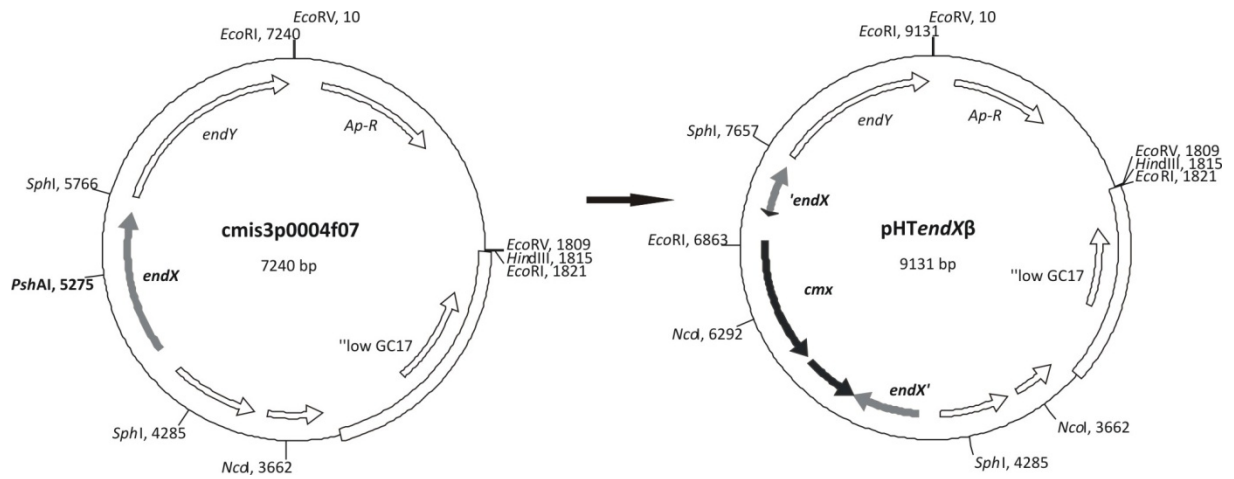


Abb. 3. Karten der Plasmide *cmis3p0004f07*, *pHendXβ*.

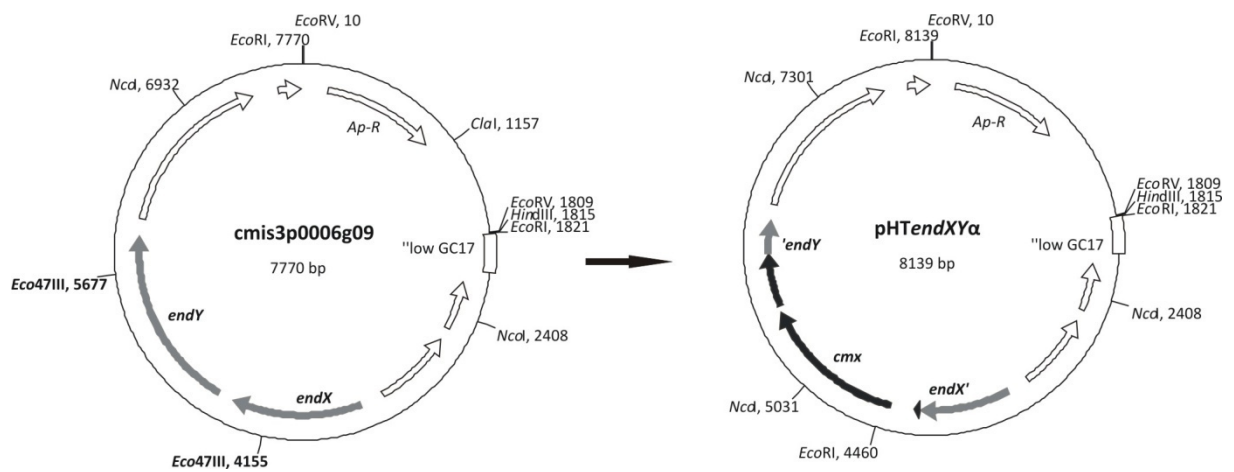


Abb. 4: Karten der Plasmide *cmis3p0006g09*, *pHendXYα*.

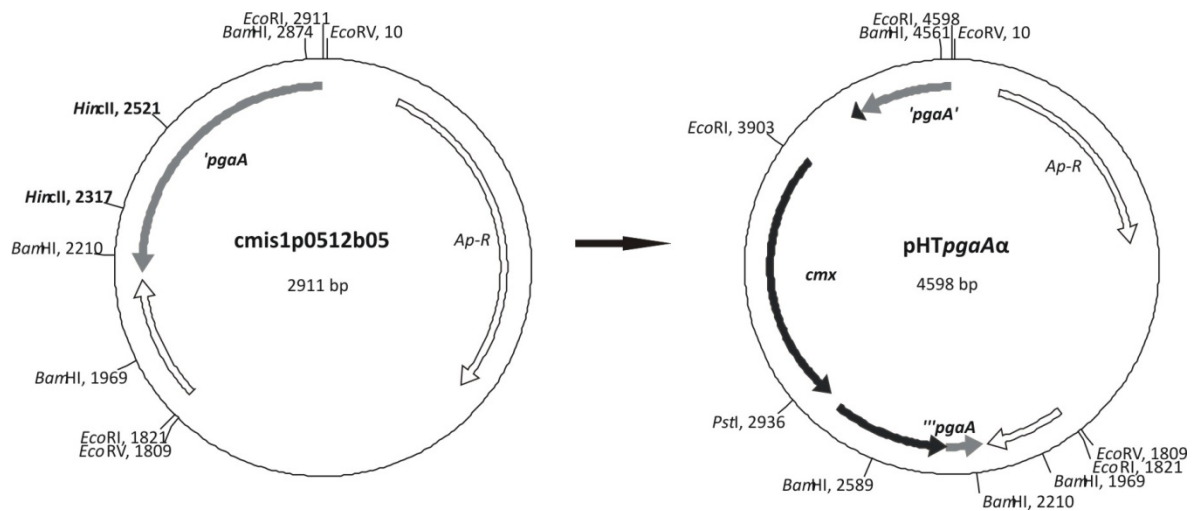


Abb. 5. Karten der Plasmide *cmis1p0512b05*, *pHtpgaAα*.

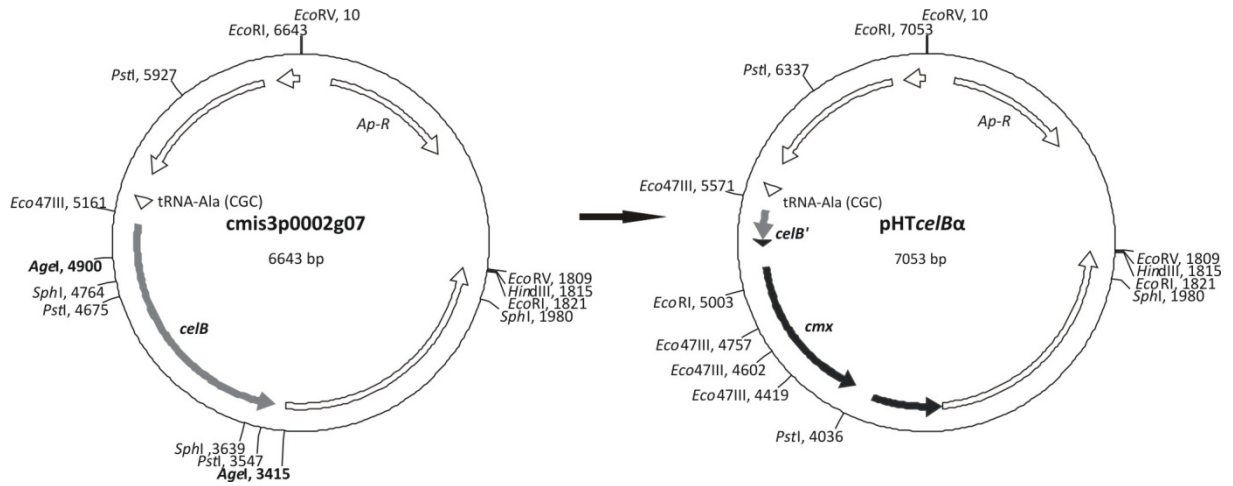


Abb. 6. Karten der Plasmide *cmis3p0002g07*, *pHTcelB α* .

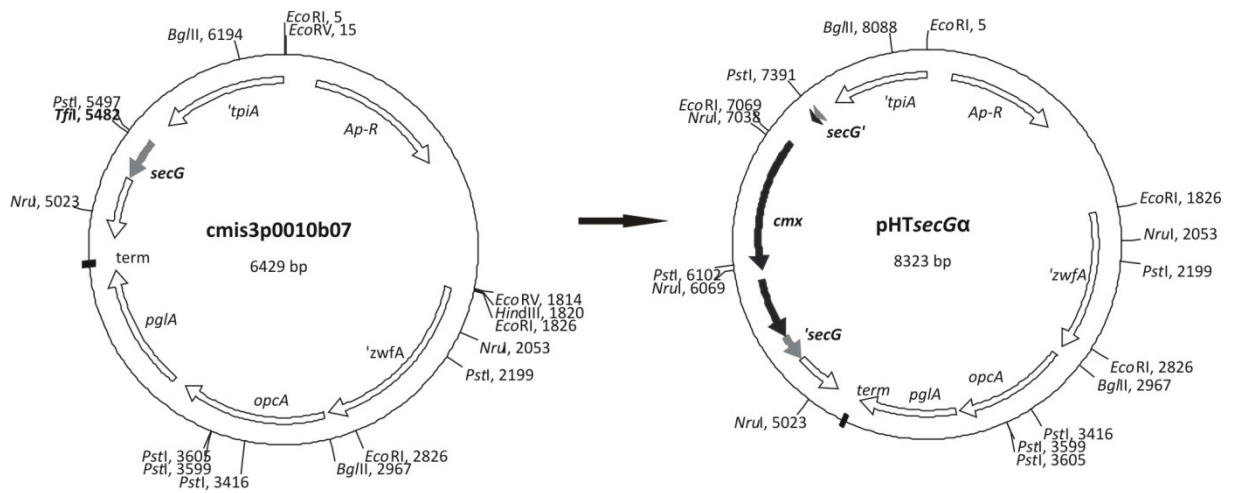


Abb. 7. Karten der Plasmide *3p0010b07*, *pHTsecG α* .

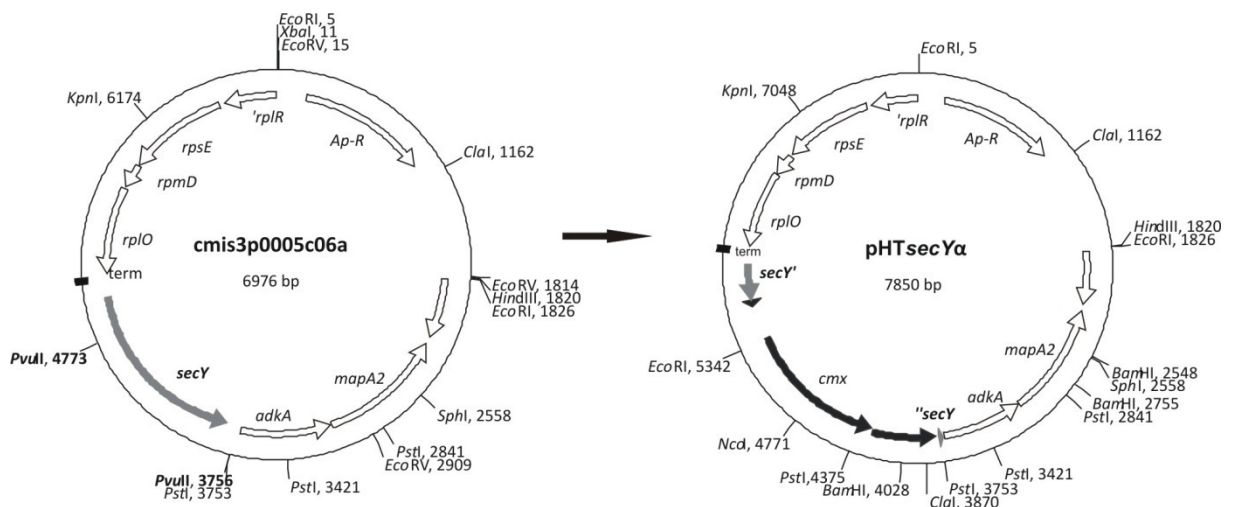


Abb. 8. Karten der Plasmide *cmis3p0005c06a*, *pHTsecY α* .

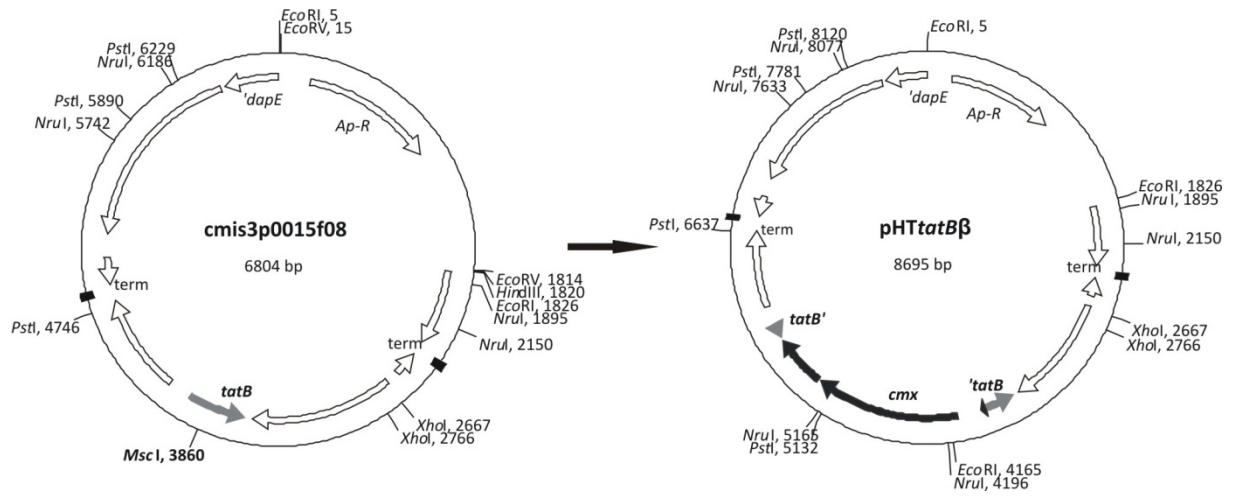


Abb. 9. Karten der Plasmide *cmis3p0015f08*, *pHTtatBβ*.

2. Auftrennung von *Cmm*-Proteinen, die unter verschiedenen Kulturbedingungen isoliert wurden, in 2D-SDS-Gelen:

Für alle untersuchten Bedingungen ist hier exemplarisch je ein Gel gezeigt. Die jeweils identifizierten Proteine sind in der nachfolgenden Tabelle im Anhang (S. 163) aufgelistet.

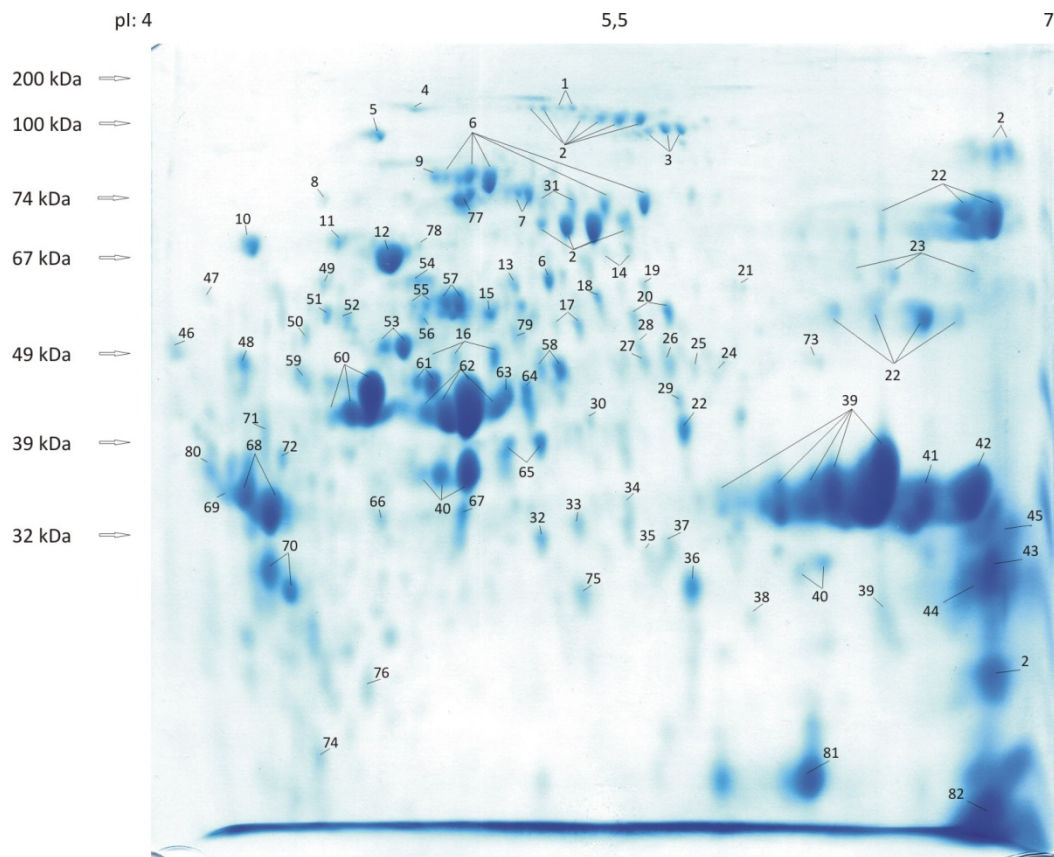


Abb. 10. Das Exoproteom von *Cmm* NCPPB382 nach 24h Anzucht in $M9_{2,4\%}\text{-}xy$. Die Proteine wurden im pH-Bereich 4-7 isoelektrisch fokussiert, im 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und mit CBB G-250 gefärbt. Mittels MALDI-TOF-MS und MASCOT wurden 82 verschiedene Proteine identifiziert.

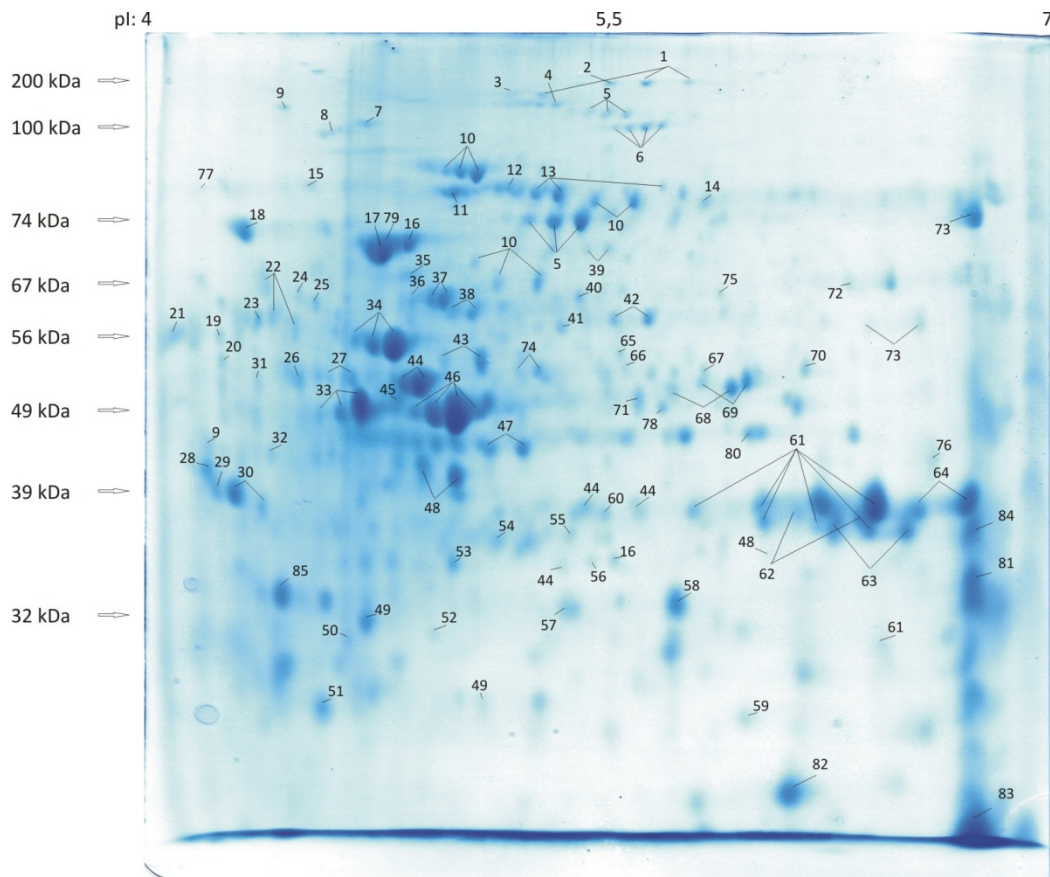


Abb. 11. Das Exoproteom von *Cmm* NCPPB382 nach 23h Anzucht in $M9_{1\%T-Hom}$. Die Proteine wurden im pH-Bereich 4-7 isoelektrisch fokussiert, im 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und mit CBB G-250 gefärbt. Mittels MALDI-TOF-MS und MASCOT wurden 85 verschiedene Proteine identifiziert.

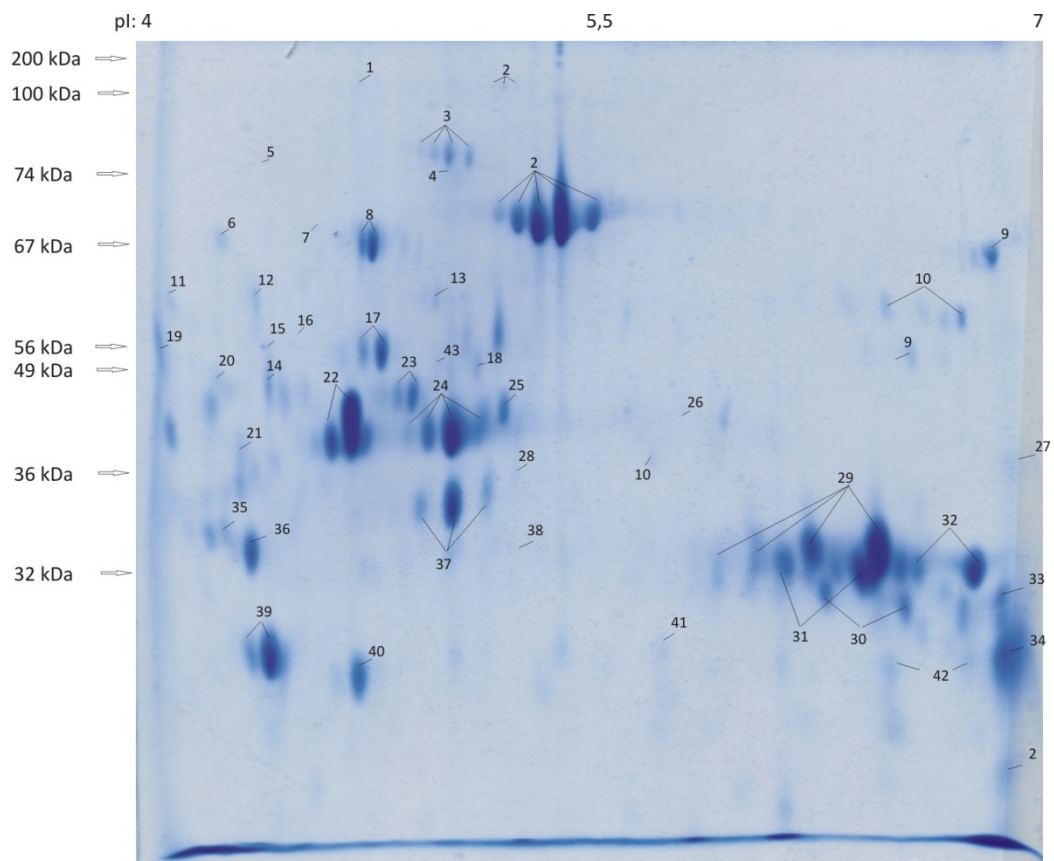


Abb. 12. Das Exoproteom von *Cmm* NCPPB382 nach 50h Anzucht in $M9_{0,1\%Xylan,0,1\%PG,0,1\%CMC}$. Die Proteine wurden im pH-Bereich 4-7 isoelektrisch fokussiert, im 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und mit CBB G-250 gefärbt. Mittels MALDI-TOF-MS und MASCOT wurden 44 verschiedene Proteine identifiziert.

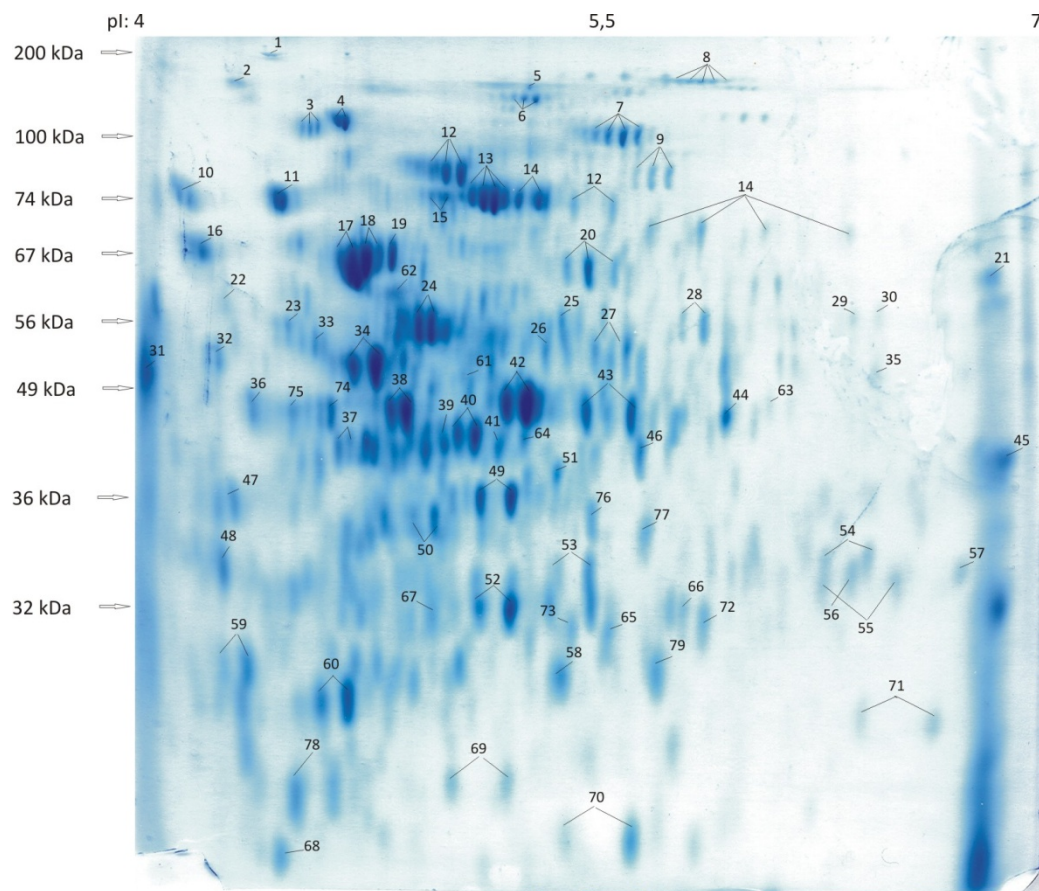


Abb. 13. Das Exoproteom von *Cmm* NCPPB382 nach 24h Anzucht in TBY. Die Proteine wurden im pH-Bereich 4-7 isoelektrisch fokussiert, im 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und mit CBB G-250 gefärbt. Mittels MALDI-TOF-MS und MASCOT wurden 79 verschiedene Proteine identifiziert.

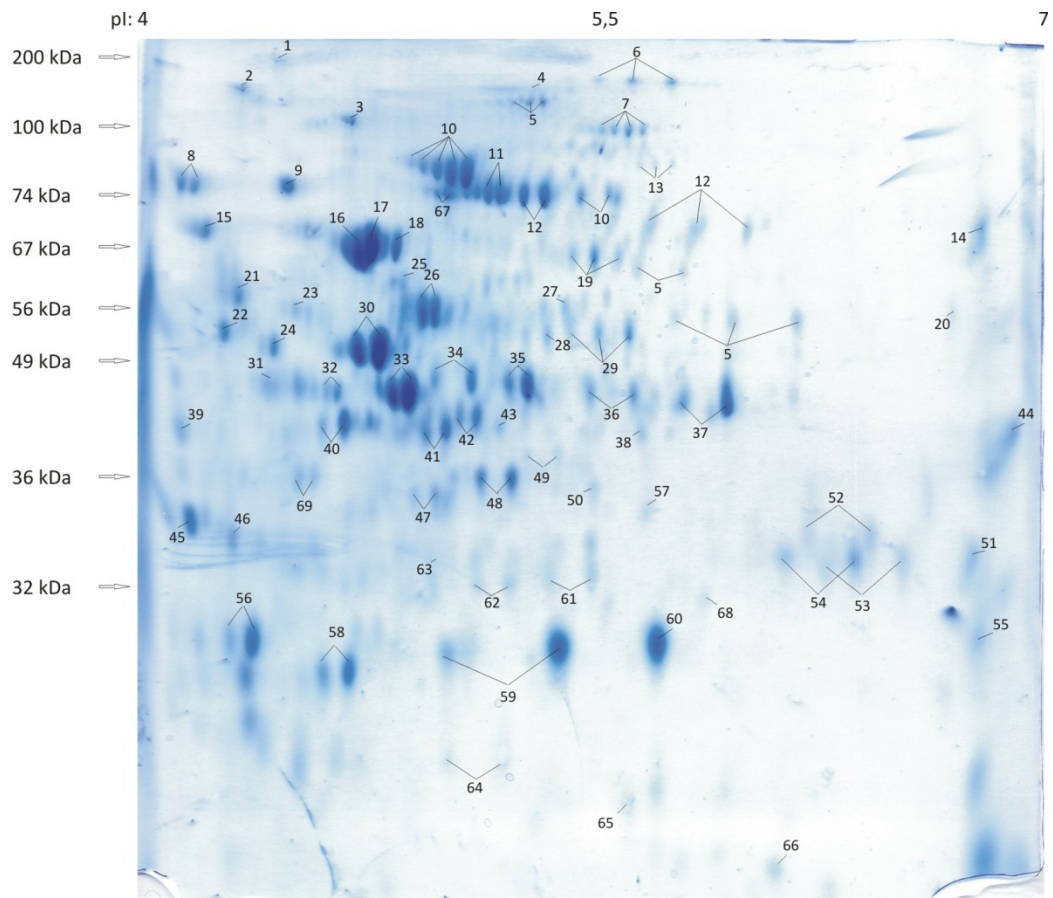


Abb. 14. Das Exoproteom von *Cmm* NCPPB382 nach 24h Anzucht in C-Medium. Die Proteine wurden im pH-Bereich 4-7 isoelektrisch fokussiert, im 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und mit CBB G-250 gefärbt. Mittels MALDI-TOF-MS und MASCOT wurden 69 verschiedene Proteine identifiziert.

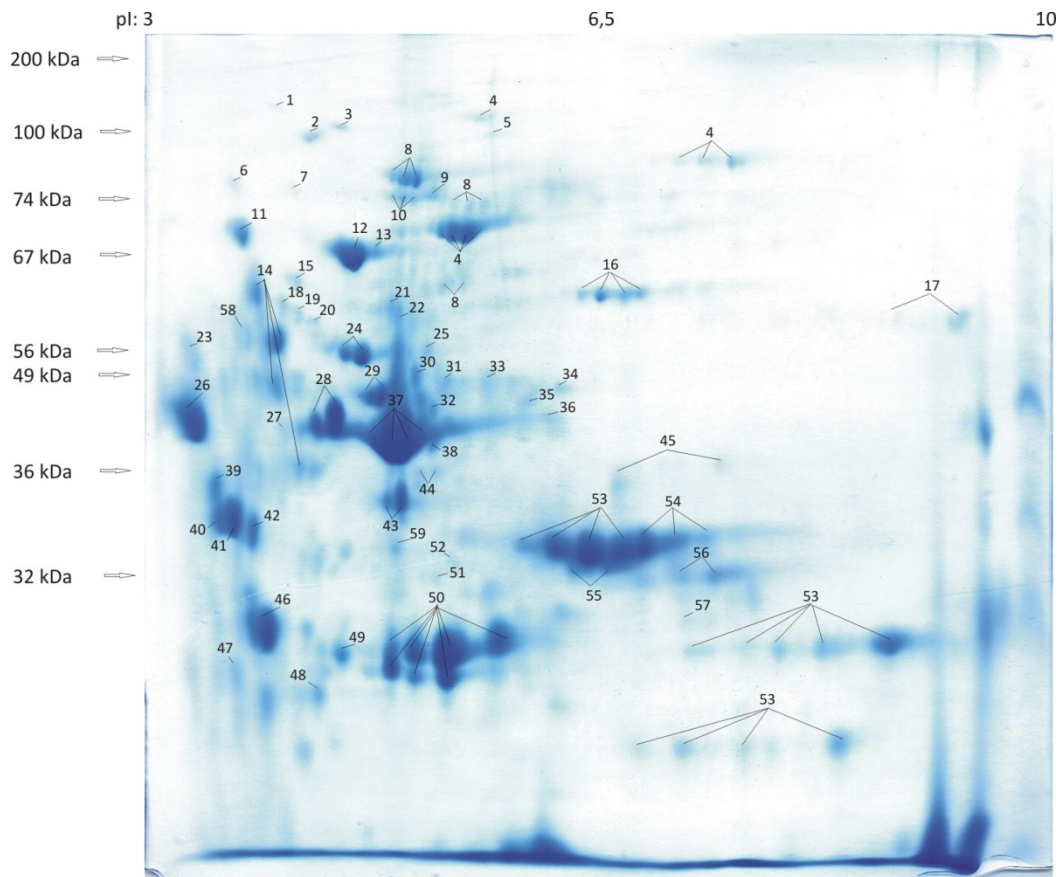


Abb. 15. Das Exoproteom von CMM100 nach 24h Anzucht in $M9_{2,4\% \text{-}Xy}$. Die Proteine wurden im pH-Bereich 3-10 isoelektrisch fokussiert, im 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und mit CBB G-250 gefärbt. Mittels MALDI-TOF-MS und MASCOT wurden 59 verschiedene Proteine identifiziert.

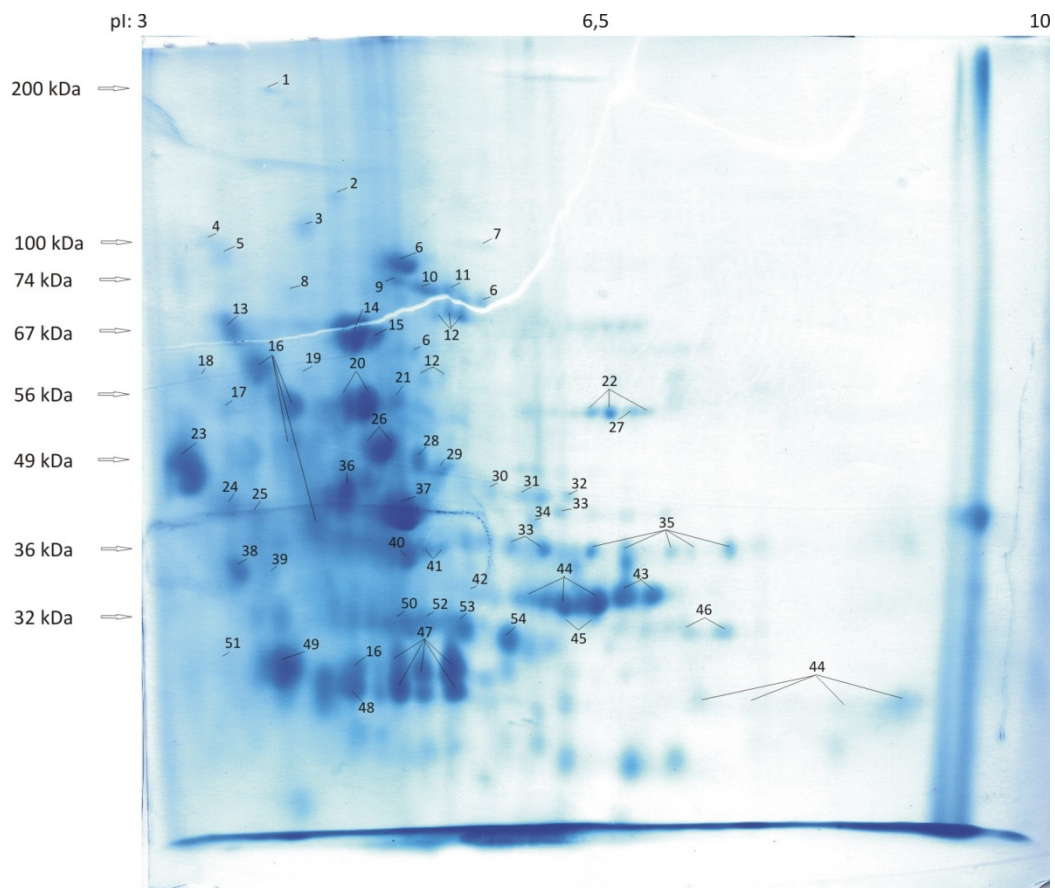


Abb. 16. Das Exoproteom von CMM100 nach 24h Anzucht in $M9_{1\%T-Hom.}$. Die Proteine wurden im pH-Bereich 3-10 isoelektrisch fokussiert, im 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und mit CBB G-250 gefärbt. Mittels MALDI-TOF-MS und MASCOT wurden 54 verschiedene Proteine identifiziert.

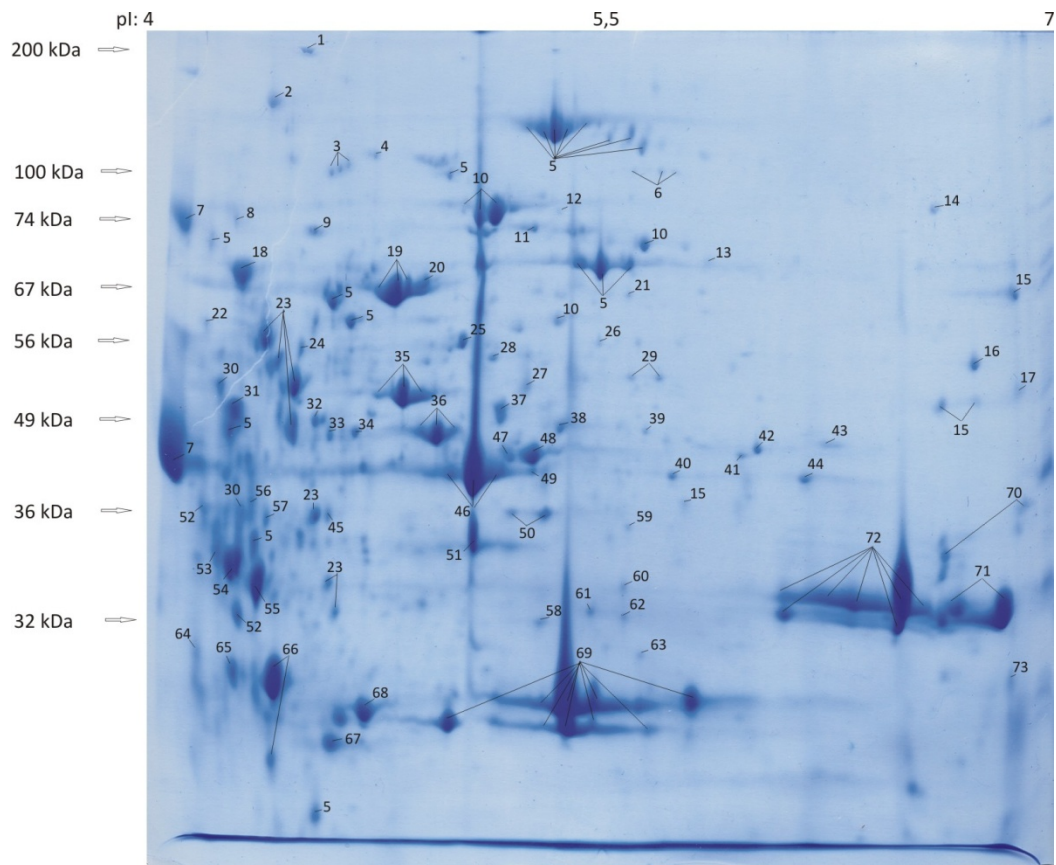


Abb. 17. Das Exoproteom von CMM30-18 nach 24h Anzucht in M9. Die Proteine wurden im pH-Bereich 4-7 isoelektrisch fokussiert, im 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und mit CBB G-250 gefärbt. Mittels MALDI-TOF-MS und MASCOT wurden 73 verschiedene Proteine identifiziert.

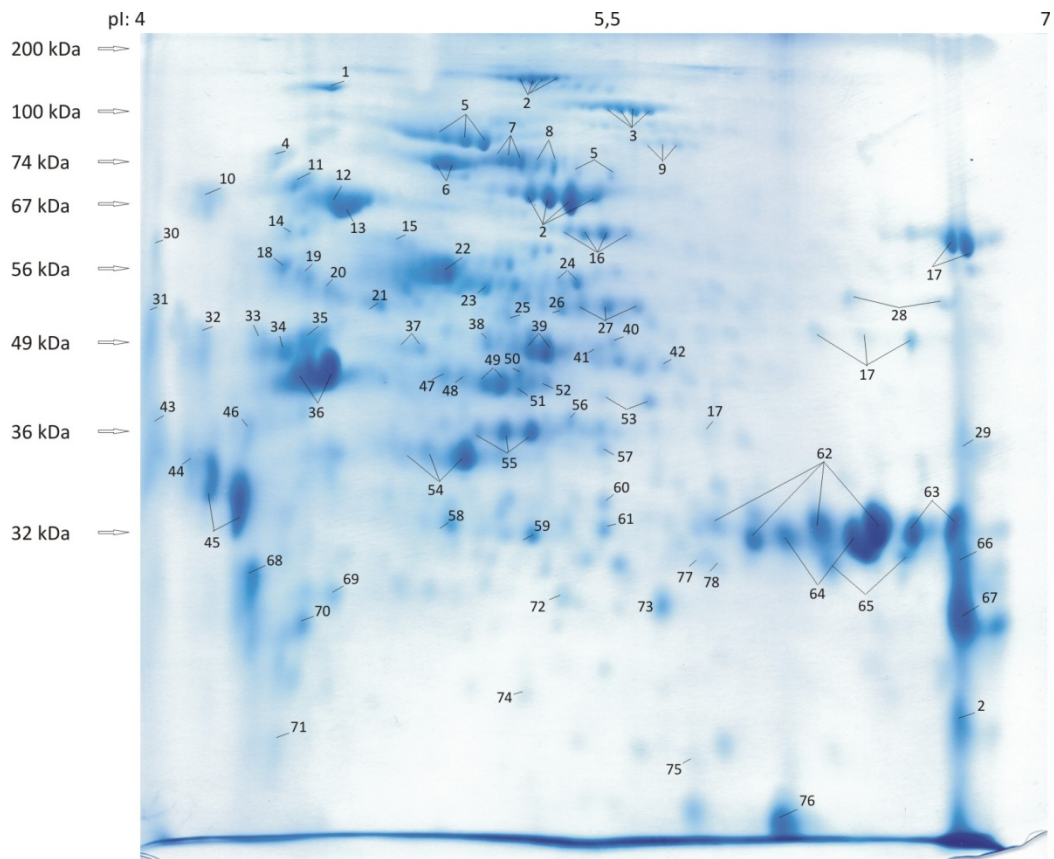


Abb. 18. Das Exoproteom von *CMMtatB* nach 72h Anzucht in M9. Die Proteine wurden im pH-Bereich 4-7 isoelektrisch fokussiert, im 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und mit CBB G-250 gefärbt. Mittels MALDI-TOF-MS und MASCOT wurden 82 verschiedene Proteine identifiziert.

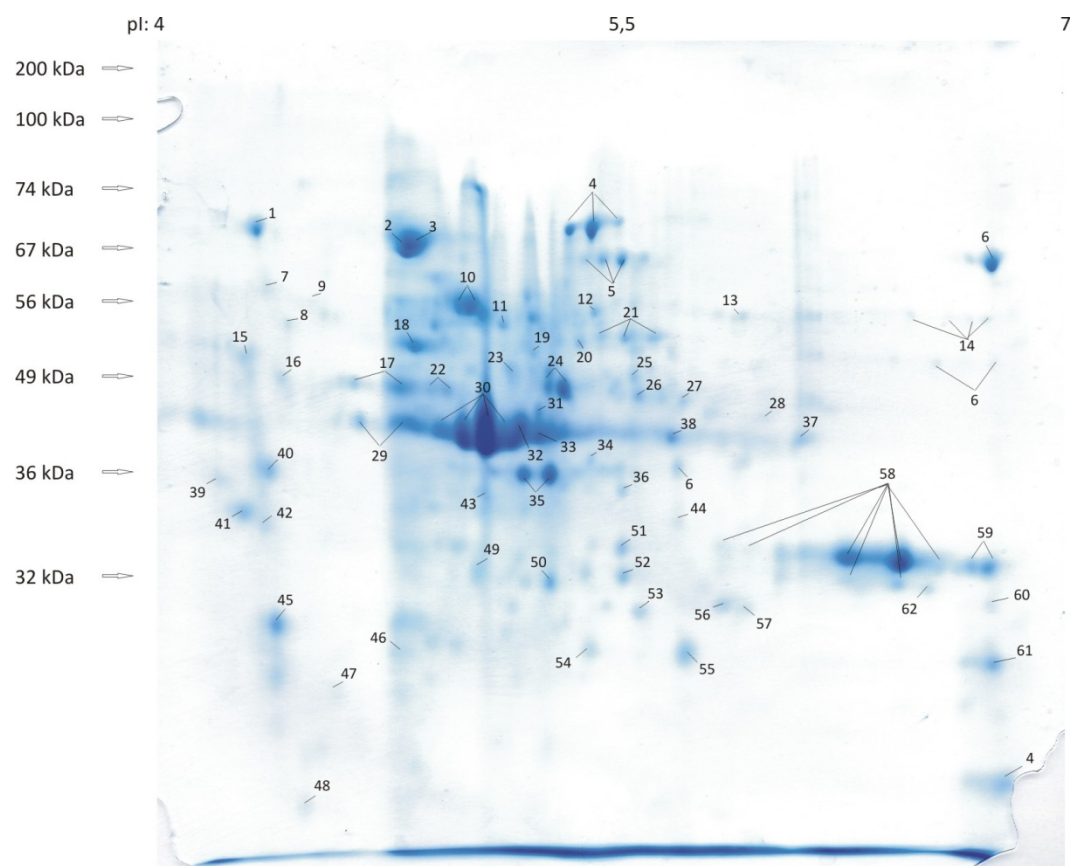


Abb. 19. Das Exoproteom von *CMMsecG* nach 32h Anzucht in M9. Die Proteine wurden im pH-Bereich 4-7 isoelektrisch fokussiert, im 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und mit CBB G-250 gefärbt. Mittels MALDI-TOF-MS und MASCOT wurden 67 verschiedene Proteine identifiziert.

3. Identifizierte Proteine unter verschiedenen Kulturbedingungen

Tab. 1. Zusammenfassung aller im Exoproteom verschiedener *Cmm*-Stämme unter verschiedenen Bedingungen identifizierten Proteine. Angegeben sind die Nummern der Spots in den Abbildungen 10-19 im Anhang und Abb. 14 auf S. 75 im Ergebnisteil. Aufgelistet sind die Proteine, die in mindestens 2 von 3 Gelen identifiziert wurden.

GenDB-ID	Gen-name	mögliche Funktion	Spotnummer in den 2D-Gelen										
			NCPBP382 in M9	NCPBP382 in M9 _{2,4%-Xy}	NCPBP382 in M9 _{1%-T-Hom}	NCPBP382 in M9 _{0,1%Xylan, 0,1% PG,0,1% CMC}	NCPBP382 in TBY	NCPBP382 in C-Med.	CMM100 in M9 _{2,4%-Xy}	CMM100 in M9 _{1%-T-Hom}	CMM30-18 in M9	CMMsecG in M9	CMMtatB in M9
I. Metabolismus													
I. 1 Energie- und Kohlenstoffmetabolismus													
CMM_1034	-	Phosphohexomutase	27	52		16	33		20			19	
CMM_1736	<i>pgiA</i>	Glucose-6-phosphat-Isomerase	26	51	25		23	23	19			9	18
CMM_1742	<i>tpiA</i>	Triosephosphat-Isomerase	78	35			65				63	53	
CMM_1743	<i>pgk</i>	Phosphoglycerat-Kinase			45								
CMM_1744	<i>gapA</i>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	69	65	47	28	49	48	44	41	50	35	55
CMM_1758	<i>pykA</i>	Pyruvat-Kinase	36	17	41		26	28				20	26
CMM_2263	<i>eno</i>	Enolase (2-Phosphoglycerat-Dehydratase)			27		74	32			34	17	35
CMM_0003	<i>gndA1</i>	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	70				67	63					
CMM_1734	<i>tktA</i>	Transketolase	9	77	11	4	15	67	10	9			6
CMM_1735	<i>talA</i>	Transaldolase	39										34
CMM_1737	<i>zwfA2</i>	Glucose-6-Phosphat-1-Dehydrogenase	30	18	40		25	27			26	12	24
CMM_1621	<i>aceE</i>	Pyruvatdehydrogenase E1 Untereinheit	4	3	6		7	7	5	7	6	^b	3
CMM_1642	<i>lpdB</i>	Dihydrolipoyl-Dehydrogenase	37	20	42		27	29			29	21	27
CMM_1659	<i>acnA</i>	Aconitathyratase	5	5	7	1	4	3	3	2	4		1
CMM_2171	<i>gltA2</i>	Citrat-Synthase	49	28	65							25	40
CMM_2537	<i>icdA</i>	Isocitrat-Dehydrogenase	62	63			40	42			47	32	49
CMM_2547	<i>sucD</i>	Succinyl-CoA-Ligase [ADP-bildend], α-Untereinheit	74		51		53	61			62	52	61
CMM_2548	<i>sucC</i>	Succinyl-CoA-Ligase [ADP-bildend], β-Untereinheit					75						
CMM_1842	<i>ctaC</i>	Cytochrome c Oxidase, Untereinheit 2	76		50		78		48		67	47	70
CMM_2380	<i>prpD</i>	2-Methylcitrat-Dehydratase		21	75		28					13	
CMM_2688	-	Acetyl-Xylan-Esterase	75	70	85	39	59	56	46	49	66	45	68
CMM_2109	<i>lacZ</i>	β-Galactosidase		4									
CMM_0049	<i>nagA</i>	β-N-Acetylglucosaminidase	15	23	72	10	30		16	22		14	
CMM_0513	<i>pgmA</i>	Phosphoglucomutase		55	36								
CMM_2446	<i>galU</i>	UTP-Glucose-1-Phosphat-Uridyltransferase	72	34	60					42	60	51	60
I. 2 Aminosäuren													
CMM_1636	<i>glnA1</i>	Glutaminsynthetase I	29	15	38				22		28	11	23

GenDB-ID	Gen-name	mögliche Funktion	Spotnummer in den 2D-Gelen											
			NCPBP382 in M9	NCPBP382 in M9 _{2,4%-Xy}	NCPBP382 in M9 _{1%-T-Hom}	NCPBP382 in M9 _{0,1%Xylan, 0,1% PG,0,1% CMC}	NCPBP382 in TBY	NCPBP382 in C-Med.	CMM100 in M9 _{2,4%-Xy}	CMM100 in M9 _{1%-T-Hom}	CMM30-18 in M9	CMMsecG in M9	CMMtatB in M9	
CMM_2898	<i>aldA</i>	L-Alanindehydrogenase					43	36						
CMM_2469	<i>serC</i>	Phosphoserin-Aminotransferase												48
CMM_2522	<i>glyA</i>	Serin-Hydroxymethyltransferase (Serin-Methylase) (SHMT)	50	27	66					33		39	26	41
CMM_1154	<i>thrC</i>	Threonin-Synthase	59				76	50				59	36	57
CMM_1798	<i>aroC</i>	Chorismat-Synthase (5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphat-Phospholyase)	48											
CMM_1457	<i>pepN</i>	Aminopeptidase N	6											
I. 3 Nukleotide														
CMM_0989	<i>punA</i>	Purin-Nucleosid-Phosphorylase	82				72	68					57	78
CMM_2950	<i>purB</i>	Adenylosuccinat-Lyase	51	26										
I. 4 Lipide														
CMM_0999	<i>accD</i>	Acetyl/Propionyl-CoA Carboxylase, β -Untereinheit		19										
CMM_1616	<i>fabF</i>	3-Oxoacyl-[acyl-carrier-Protein]-Synthase	43				41	43	38			49	33	51
I. 6 Sekundärmetabolismus														
CMM_0841	<i>ipyA</i>	Inorganische Pyrophosphatase		74			68						48	71
II. Zelluläre Prozesse														
II. 2 Zellwand														
CMM_0017	<i>pbpA</i>	Penicillin-Bindeprotein										33		
CMM_0915	<i>pbpC</i>	Penicillin-Bindeprotein	11	83	13		14	12		11	12			8
CMM_0919	<i>pbpD</i>	Penicillin-Bindeprotein	8	6	10	3	12	10	8	6	10	^b		5
CMM_0931	<i>pbpE</i>	D-Alanyl-D-Alanin-Carboxypeptidase	47	16	43	43	61	34	30	28	37	23		38
CMM_1865	<i>ftsI</i>	Peptidoglycan-Glycosyltransferase/Penicillin-Bindeprotein	19	12	17	8	18	17	12	14	19	3		13
CMM_2067	<i>dacB</i>	D-Alanyl-D-Alanin-Carboxypeptidase										32		
CMM_0464	-	Nucleosid-Diphosphat-Zucker-Epimerase			80									
CMM_0430	-	hypothetisches, sekretiertes Protein, Zelloberflächenprotein			14							13		
CMM_1126	-	extrazelluläre 5'-Nucleotidase					10	8	6	5	8			
CMM_2169	-	Oberflächenprotein, RTX Toxin	1		2		1	1		1	1			
pCM2_0035	<i>rhsA</i>	Rhs ähnliches Protein			4		35	5						
CMM_0819	<i>wcoA</i>	Zelloberflächenprotein										14		
CMM_1020	<i>glfA</i>	UDP-Galactopyranose Mutase												47
CMM_1022	<i>wcqK</i>	sekretiertes Protein	16				29	20		27	16			28
CMM_1600	<i>gmdA</i>	GDP-Mannose 4,6-Dehydratase	57	30			51	49					34	56
III. Informationsspeicherung und -prozessierung														
III. 1 Replikation														
CMM_2962	<i>ssb</i>	Einzelstrang-DNA-Bindeprotein					69	64						74

GenDB-ID	Gen-name	mögliche Funktion	Spotnummer in den 2D-Gelen												
			NCPBP382 in M9	NCPBP382 in M9 _{2,4%-Xy}	NCPBP382 in M9 _{1%-T-Hom}	NCPBP382 in M9 _{0,1%:Xylan, 0,1% PG,0,1% CMC}	NCPBP382 in TBY	NCPBP382 in C-Med.	CMM100 in M9 _{2,4%-Xy}	CMM100 in M9 _{1%-T-Hom}	CMM30-18 in M9	CMMsecG in M9	CMMtatB in M9		
CMM_1225	-	ATP-abhängige RNA-Helicase					21								
III. 2 Transkription															
CMM_1156	<i>rhoA</i>	Terminationsfaktor der Transkription		1			6								
CMM_2631	<i>rpoB</i>	DNA-abhängige RNA-Polymerase, β-Untereinheit			3		5	4							
III. 3 Translation															
CMM_1383	<i>rpsB</i>	30S ribosomales Protein S2	45				64								52
CMM_1752	<i>rpsA</i>	30S ribosomales Protein S1	22	54	35		62	25							15
CMM_2583	<i>rplQ</i>	50S ribosomales Protein L17					71								
CMM_1384	<i>tsf</i>	Elongationsfaktor Ts (EF-Ts)	73	32	54		52	62	51	52	58	50			59
CMM_2620	<i>tuf</i>	Elongationsfaktor Tu (EF-Tu)	46	58	74		42	35	31	29	38	24			39
CMM_2621	<i>fusA</i>	Elongationsfaktor G (EF-G)	10	7	12		13	11	9	10	11				7
CMM_1053	-	Ribosom-assoziiertes Protein						39							
CMM_2047	<i>pnp</i>	Polyribonucleotid-Nucleotidyltransferase		9											
CMM_2461	-	konserviert hypothetisches Protein, Translationsfaktor												49	58
IV. Potentiell relevant für die phytopathogene Interaktion															
IV. 1 Transporter															
CMM_1728	-	ABC Transporter, ATP-bindendes Protein					73								
CMM_0799	<i>bldKB</i>	Oligopeptid ABC Transporter, Substrat-bindendes Lipoprotein		49					15	19					14
CMM_0956	-	Peptid ABC Transporter, Substratbindeprotein			24				18		24				
CMM_1478	-	Oligopeptid ABC Transporter, Substratbindeprotein				12	22	21							
CMM_1587	-	Oligopeptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	24	47	77	11						22			30
CMM_1960	-	Peptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	28		22	15		24	14	16	23	7			
CMM_2006	<i>gluB</i>	Glutamat ABC Transporter, Substratbindeprotein											65		
CMM_2185	-	Peptid ABC Transporter, Substratbindeprotein	17	10	18	6	16	15	11	13	18	1			10
CMM_2420	-	Peptid ABC Transporter, Substratbindeprotein		50										8	
CMM_2628	-	polare Aminosäuren ABC Transporter, Substratbindeprotein							47	51	64				
CMM_0866	-	α-Glucosid ABC Transporter, Substratbindeprotein	31	46	21	19	31		23						31
CMM_0879	-	Zucker ABC Transporter, Substratbindeprotein		72	32		47						57	40	46

GenDB-ID	Gen-name	mögliche Funktion	Spotnummer in den 2D-Gelen										
			NCPBP382 in M9	NCPBP382 in M9 _{2,4%-Xy}	NCPBP382 in M9 _{1%-T-Hom}	NCPBP382 in M9 _{0,1%:Xylan, 0,1% PG,0,1% CMC}	NCPBP382 in TBY	NCPBP382 in C-Med.	CMM100 in M9 _{2,4%-Xy}	CMM100 in M9 _{1%-T-Hom}	CMM30-18 in M9	CMMsecG in M9	CMMtatB in M9
CMM_0976	-	ABC Transporter, Substratbindeprotein							26	23	7		
CMM_2485	-	Zucker ABC Transporter, ATP-bindendes Protein	60	29			46	38			40	38	53
CMM_1703	-	Glycin/Betain ABC Transporter, Substratbindeprotein	64	69					40		53		
CMM_0363	-	Fe ³⁺ -Hydroxamat ABC Transporter, Substratbindeprotein	66							25	56		
CMM_0435	<i>fepB</i>	Eisen-Siderophor ABC Transporter, Substratbindeprotein			20								
CMM_1717	<i>modF</i>	Molybdat ABC Transporter, ATP-bindendes Protein			57							54	72
CMM_2283	-	Metall ABC Transporter, Substratbindeprotein	65		29	35		45	41	38	54	41	44
CMM_2941	-	Metall ABC Transporter, Substratbindeprotein									52		
CMM_2176	-	konserviertes, sekretiertes Lipoprotein			19					18	30		
CMM_2177	-	mögliche Fe-abhängige Peroxidase	55	73	70		63		34	32	43		
CMM_1167	<i>atpA</i>	ATP Synthase, α -Untereinheit		13									
CMM_1169	<i>atpD</i>	ATP Synthase, β -Untereinheit		56									
CMM_1831	<i>glpK</i>	Glycerol Kinase	33										20
IV. 3 Regulatoren													
CMM_0560	-	Transkriptionsregulator	38	59	26	14	36	31				16	33
IV. 4 Stress													
CMM_0151	<i>dnaK</i>	Chaperon (Hitzeschockprotein 70)	20		79		17	16				2	12
CMM_2478	<i>groEL</i>	60 kDa Chaperonin (Protein Cpn60) (GroEL Protein)	23	57	37	13	24	26	21	21	25	10	22
CMM_0857	<i>clpC</i>	ATP-abhängig Protease, ATPase Untereinheit (EC 3.4.-.-)					9	13					9
CMM_0010	<i>ppiA</i>	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase (EC 5.2.1.8)					70	65					75
CMM_1463	<i>tig</i>	<i>trigger factor</i> (TF) (Prolyl Isomerase, Chaperon)	7	8	15	5	11	9	7	8	9		4
IV. 5 Resistenz													
CMM_0737	<i>kata</i>	Katalase	12	14	39		20	19			21	5	16
IV. 6 Extrazelluläre Enzyme													
CMM_0039	<i>chpE</i>	extrazelluläre Serin-Protease, S1A-Familie	86	45	84	33			56	46		60	66
CMM_0042/ 0050	<i>ppaB1</i> <i>/B2</i>	extrazelluläre Serin-Protease	40	60	33	22	37	40	28	36		29	36
CMM_0044	<i>ppaC</i>	extrazelluläre Serin-Protease	84	41	63	30	55	53	55	45		62	65

GenDB-ID	Gen-name	mögliche Funktion	Spotnummer in den 2D-Gelen										
			NCPB382 in M9	NCPB382 in M9 _{2,4%-Xy}	NCPB382 in M9 _{1%-T-Horn}	NCPB382 in M9 _{0,1%Xylan, 0,1% PG,0,1% CMC}	NCPB382 in TBY	NCPB382 in C-Med.	CMM100 in M9 _{2,4%-Xy}	CMM100 in M9 _{1%-T-Horn}	CMM30-18 in M9	CMMsecG in M9	CMMtatB in M9
CMM_0338	-	konserviertes, sekretiertes Protein, PBP	42	62	46	24	39	41	37	37	46	30	
CMM_0429	-	konserviertes, sekretiertes Protein, ? Zelloberflächenprotein	80 ^c	36	58	41	79	60		54		- ^b	
CMM_0466	-	konserviertes, sekretiertes Protein	63	80	28				39	24		39	43
CMM_1215	-	konserviertes, sekretiertes Protein, ? Zelloberflächenprotein			1		8	6					
CMM_1277	-	konserviert hypothetisches Protein		33	55				52		61		
CMM_1389	-	konserviertes, sekretiertes Protein	79	75	59		58	59		53			
CMM_1514	-	konserviert hypothetisches Protein		76									
CMM_1553	-	konserviert hypothetisches Protein, Amidohydrolase	52	25	67							27	42
CMM_1807	-	konserviertes hypothetisches Protein, ATPase	53	24									
CMM_1872	-	konserviert hypothetisches Protein, peptidoglycanbindend	90	38	76	27	45	44	45	35	70		79
CMM_2204	-	konserviertes, sekretiertes Protein, Glycosyl-Hydrolase mit Sensor-Domäne			8		3		2	3	3		
CMM_2252	-	konserviertes, sekretiertes Protein			53					50			
CMM_2664	-	konserviert hypothetisches Protein, ? Trehaloseabbau	81				66					56	77
CMM_0631	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	88	81	82			66					76
CMM_1081	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	56		78				36	34	44	37	
CMM_1557	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	77		49	40	60	58	49	48	68	46	69
CMM_1675	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	89	82	83								
CMM_1921	-	hypothetisches, sekretiertes Protein			52				50	47	69		
CMM_2043	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	71	67	56	38			59				
CMM_2250	-	hypothetisches Membranprotein, Zelloberflächenprotein			31								

- ^a: nur im pH-Bereich 6-11, 3-10 sichtbar;

- ^b: Protein vorhanden, aber auf diesem Gel nicht zu sehen

- ^c: Spot 80 wurde in unterschiedlichen Gelen unterschiedlich identifiziert

Tab. 2. Auflistung aller *Cmm*-Proteine, die nach der Vorhersage mit TatFIND1.4 ein Tat-Signalpeptid enthalten.

Gen DB-ID	Gen-name	mögliche Funktion	RR-Motiv	hydrophobe Region	hydroph. Region (AS)	Score
I. Metabolismus						
I. 1 Energie- und Kohlenstoffmetabolismus						
CMM_1835	<i>qcrC</i>	Ubichinol-Cytochrom c Reduktase, Cytochrom c Untereinheit	GRRSPL	SPLTTIALLAIGLLTTG GAYAM	22	4.82
CMM_1345	<i>gpsA</i>	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase	ERRRIV	IVVLGAGSWGTTFA	14	3.38
CMM_0049	<i>nagA</i>	β -N-Acetylglucosaminidase	SRRGFL	GFLTAAASIGA AVAV QAT	18	2.19
I. 2 Aminosäuren						
CMM_0278	-	Chorismat-Mutase	PRRALL	ALLTSAFAVTLAALL GAAAPA	22	2.7
I.5 Coenzyme						
CMM_2314	<i>modA1</i>	Molybdopterinbiosynthese	RRRRTV	AAVSALLAPLAGLPA	15	3.93
II. Zelluläre Prozesse						
II. 2 Zellwand						
CMM_0464	-	Nucleosid-Diphosphat-Zucker-Epimerase	SRRALV	ALVLGGTGAIGGATA	15	0.51
CMM_0430	-	hypothetisches, sekretiertes Protein, Zelloberflächenprotein	PRRRAL	ALIGLLSLVLSAQA GIAGS	21	6.09
CMM_0667	-	sekretierte Phosphoesterase (Tat-System, ? Sortase Signal)	SRRGFL	GFLITSGAAGALGVA GLGGALP	22	0.56
CMM_0129	-	Sortase	ARRAAV	AAVLGALIPLAVLA GCAPA	20	6.7
CMM_0829	<i>wcoK</i>	hypothetisches Protein	SRRTTV	TTVVVIGAASVLAVA AVVGTVV	22	4.22
CMM_1018	<i>wcqH</i>	Glycosyltransferase	NRRELV	TLAALAAQTVPLH	13	2.16
IV. Potentiell relevant für die phytopathogene Interaktion						
IV. 1 Transporter						
CMM_1892	-	Polyamin ABC Transporter, Substratbindeprotein	PRRSLL	SLLALAAAASAVAL AGCAPTT	22	2.75
CMM_0108	-	Zucker ABC Transporter, Permease	RRRRPL	GALTPWMFAAPA IIL FAA	18	5.34
CMM_0109	-	Zucker ABC Transporter, Substratbindeprotein	RRRRPL	PLVLALAAAGALTLSL SACSA	21	4.13
CMM_0196	-	Zucker ABC Transporter, Substratbindeprotein	TRRSLL	SLLSAGVGAAAVGLL AACSGGG	22	0.28
CMM_0270	-	Zucker ABC Transporter, Substratbindeprotein	ARRRLV	LVGAAAALATVPLVL AGCSGG	21	4.12
CMM_2106	-	Zucker ABC Transporter, Substratbindeprotein	SRRQAL	QALGVGAAAAGTLA LASCAPG	22	-0.76
CMM_2238	-	Zucker ABC Transporter, Substratbindeprotein	DRRSVL	LGAVLGGTAMLAAC SGPS	18	2.46
CMM_2438	-	L-Arabinose ABC Transporter, Substratbindeprotein	SRRQIL	QILMGGAAALGGAF LVGGLSGC	22	0.87
CMM_1532	<i>proX</i>	Prolin/Glycin/Betain/Cholin ABC Transporter, Substratbindeprotein	SRRALL	ALLGTVAVGTAMAL AGCASG	20	2.48
CMM_0166	<i>fhuD</i>	Fe ³⁺ -Siderophor ABC Transporter, Substratbindeprotein	TRRRTL	TLAMTALAAATALT TACGTT	21	2.23
CMM_0941	-	MFS-Typ Efflux Transporter	PRRPLL	SFTLIWLAQALSAFG	15	4.54
CMM_2177	-	mögliche Fe-abhängige Peroxidase	SRRGML	GMLGLLGAGALGGG LVGSAGGV	22	0.8

CMM_0238	-	Bicyclomycin Efflux MFS Permease	ARRGPL	GPLLTVALIVGISPFA T	17	5.89
IV. 4 Stress						
CMM_0431	-	Hämagglutinin / Hämolysin- verwandtes Protein, ? Zelloberflächenprotein	ARRRAV	AVVGLLSLALVASAQ VGIASG	21	5.27
IV. 5 Resistenz						
CMM_0569	<i>ccbD</i>	Thioredoxin	SRRSIL	SILAAAASSVLAVAL SGCT	20	2.43
IV. 6 Extrazelluläre Enzyme						
CMM_1480	<i>expA</i>	Expansin	ARRRIL	ILSAALAVLVAVAGP AMAASA	21	7.75
IV. 7 Intrazelluläre Proteasen						
CMM_0146	-	konserviert hypothetisches Protein, sekretierte Metallopeptidase	RRRRTL	TLLVTAIAVTLALAGA GTAYA	21	6.38
V. Schlecht/kaum charakterisiert						
V. 2 Funktion unbekannt						
CMM_0338	-	konserviertes, sekretiertes Protein, PBP	ARRSVL	SVLGGALAAVPVALV A	16	3.09
CMM_0345	-	konserviertes, sekretiertes Protein	DRRRFF	FFSAAGVAGLVGVA AALIPAT	21	1.99
CMM_0429	-	konserviertes, sekretiertes Protein, ? Zelloberflächenprotein	RRRGLV	GLVGLIALALITAAQA GPASPA	22	7
CMM_0511	-	konserviertes, sekretiertes Protein	RRRNIL	NILAAAALVPVTAVL AACT	19	4.82
CMM_0608	-	konserviertes, sekretiertes Protein	KRRRLI	LIAQFSVAGGLVIVIA AIAGG	21	5.88
CMM_0616	-	konserviertes, sekretiertes Protein	PRRRIL	SATALVGGVALAVA VPLA	18	2.41
CMM_0657	-	konserviert hypothetisches Protein	NRRGTF	GTFPGVFALANGL	13	2.12
CMM_0910	-	konserviertes, sekretiertes Protein	TRRRVV	VVTVAGAAIVILVL WIAWVA	21	7.79
CMM_1389	-	konserviertes, sekretiertes Protein	RRRSF	VAAPTIAFGAAAAF MLV	17	2.77
CMM_1902	-	konserviert hypothetisches Protein, Amin-Oxidase	SRRTLL	TLLTASVSGLSLLGLA ACT	19	1.6
CMM_2138	-	konserviertes, sekretiertes Protein	SRRGLL	GLLQTGAVVGAGAA IAALGPAP	22	-0.47
CMM_2252	-	konserviertes, sekretiertes Protein	DRRRFF	FFSAAGIAGLVGAA ALIPAT	21	2.67
CMM_2734	-	konserviert hypothetisches Protein, Esterase/Lipase, Hydrolyse-Familie ab	TRRSLL	LVPPVIALVGGQA	13	4.64
CMM_0631	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	GRRPLL	PLLVISCLTLTGLAAL APATPP	22	6.01
CMM_0951	-	Membranprotein	SRRTTL	TTLVAGLASAGALLL QPGLLG	21	0.52
CMM_1249	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	ARRSPL	AAWLTTGLAAVVV ASLA	18	5.13
CMM_1400	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	DRRRTL	ALVAGGGGLAAVSAV AA	16	1.27
CMM_2315	-	hypothetisches Protein	ERRATV	VAAAIGAVLLAAAIA L	16	5.69
CMM_2387	-	hypothetisches, sekretiertes Protein	TRRRLL	LLTAAGVVVASAAV VAGALAA	21	3.23

4. Abkürzungen

% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent
° C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding-cassette
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
ccc	supercoiled
cfu	colony forming units
Cm	Chloramphenicol
Cm ^R	Chloramphenicol-resistent
<i>Cmm</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
<i>cmx</i>	Chloramphenicolexportergen
cv.	cultivar
DIG	Digoxygenin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpi	days post inoculation
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-Aminoethylether)-tetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EPS	Exopolysaccharid
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
ETI	effector triggered immunity
G	Guanin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
L	Liter
M	Molar
Millipore	entionisiertes Wasser aus der Millipore-Anlage
min	Minute
mM	millimolar
MW	Molekulargewicht
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
NCPPB	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria
oc	open circle
o.D.	optische Dichte
ORF	open reading frame

PAI	Pathogenitätsinsel
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
ss	einzelsträngig
SSC	Sodium-Saline-Citrat
subsp.	Subspezies
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)Aminoethan
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
WI	Welkeindex

Danksagung

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

Herzlich bedanken möchte ich mich zudem bei:

Dr. Karl-Heinz Gartemann für die Betreuung, die zahlreichen Hilfestellungen, Ideen und Ratschläge und vor allem das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Carola Eck und Manuela Meyer für die technische Unterstützung während der MALDI-Messungen.

Stefan Albaum für die schnelle Hilfe zu verschiedensten Fragen im Bereich der Proteindatenbanken.

Auch möchte ich mich bei der „Clavibacter“-Arbeitsgruppe und den anderen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Lehrstuhls für die tolle Zeit im Labor, die großartige Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft ganz herzlich bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für den Rückhalt und die Unterstützung, die sie mir in den letzten Jahren gewährt haben. Alexander danke ich für seine Geduld und sein Verständnis, Tanja für die vielen aufbauenden Gespräche, David für die Hilfe bei technischen Fragen und meinen Eltern für die unzähligen Stunden, in denen sie sich liebevoll und unermüdlich um Lea gekümmert haben.

Erklärung

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

Diese Arbeit wurde auf alterungsbeständigem Papier (DIN EN ISO 9706) gedruckt.

Herford, im März 2012

Helena Tews