

Identifizierung eines Gens von
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*
für die Kolonisation von
Solanum lycopersicum

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie der
Universität Bielefeld

vorgelegt von

Ines Gräfen

aus Minden

Dezember 2005

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	3
2.2	Charakteristika der Isolate aus Israel und den Niederlanden	8
2.3	Charakteristika der Deletionsmutante CMM101/ β 330-18	9
2.4	Die chromosomale <i>chp</i> -Genregion	11
2.5	Ziel dieser Arbeit	15
3	Material und Methoden	16
	Material	16
3.1	Bakterienstämme	16
3.2	Plasmide und Vektoren	18
3.3	Pflanzenmaterial	23
3.4	Enzyme und Chemikalien	23
3.4.1	Enzyme	23
3.4.2	Restriktionsendonukleasen und -puffer	24
3.4.3	Chemikalien und Kits	26
3.5	Oligonukleotidprimer für PCR	27
3.6	Nährmedien	27
3.6.1	Zusätze zu Nährmedien	28
3.6.2	Antibiotika	29
3.7	Puffer und Lösungen	29
3.7.1	Lösungen zur Resuspendierung von Zellen	29

3.7.2	Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung	30
3.7.3	Puffer und Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese	31
3.7.4	Lösungen zur Behandlung von Agarosegelen für Southern Hybridisierungen	32
3.7.5	Puffer und Lösungen für DNA-DNA-Hybridisierungen	32
3.8	Geräte	34
	Methoden	35
3.9	Kultivierung	35
3.9.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	35
3.9.2	Kultivierung von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	35
3.9.3	Titerbestimmung/Messung der optischen Dichte	35
3.9.4	Konservierung von Bakterienkulturen (Glycerinkultur)	36
3.10	DNA-Isolierung	36
3.10.1	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	36
3.10.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	37
3.10.3	CsCl-Ethidiumbromid-Dichtegradient (CsCl-EtBr-Dichtegradient)	39
3.10.4	Plasmidisolierung aus <i>Cmm</i>	40
3.11	DNA-Reinigung und -Konzentration	41
3.11.1	Alkohol-Fällung	41
3.11.2	Phenolisierung	42
3.11.3	Sephadex-Behandlung	42
3.11.4	Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem QIAquick PCR Purification Kit	42
3.12	DNA-Techniken	43
3.12.1	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	43
3.12.2	Agarosegelelektrophorese	44
3.12.3	Bestimmung des Molekulargewichts von DNA	45
3.12.4	Bestimmung der DNA-Konzentration	45
3.13	Klonierung von DNA-Fragmenten	46
3.13.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit	46
3.13.2	5'-Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase	47

3.13.3	Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten	47
3.13.4	α - ω -Komplementation (Blau-Weiß-Selektion)	48
3.13.5	DNA-Sequenzierung und Auswertung	48
3.14	DNA-Transfer	48
3.14.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i> (CaCl ₂ -Methode)	48
3.14.2	Elektroporation von <i>Escherichia coli</i>	49
3.14.3	Elektroporation von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	51
3.15	DNA-DNA-Hybridisierung	53
3.15.1	Markierung der Hybridisierungssonde	53
3.15.2	Überprüfung der Markierungsreaktion	54
3.15.3	Southern-Hybridisierung	54
3.15.4	Koloniehybridisierung	56
3.16	Polymerasekettenreaktion (PCR)	57
3.16.1	PCR mit Gesamt-DNA als Template	57
3.16.2	PCR mit ganzen Zellen als Template	58
3.17	Methoden zur Analyse des Pathogenitätsverhaltens von <i>Cmm</i>	59
3.17.1	Pflanzentests mit der Wirtspflanze <i>Solanum lycopersicum</i>	59
3.17.2	Kolonisationstest	60
3.17.3	Test zur Auslösung der hypersensitiven Reaktion (HR) bei <i>Mirabilis jalapa</i>	61
4	Ergebnisse	62
4.1	Identifizierung von Pat-1 Homologen	62
4.2	Charakterisierung von <i>Cmm</i> -Stämmen mit abweichendem Pathogenitäts-Phänotyp	71
4.3	Erzeugung von Mutanten im Chromosom von <i>Cmm</i> durch Insertionsmutagenese	79
4.4	Phänotypische Analyse der Mutanten von <i>Cmm</i> im Pflanzentest	91
4.5	Kolonisation der Stämme CMM101 $chpC\beta$ und CMM101 β 330-18 im zeitlichen Verlauf	96
4.6	Komplementation der Mutanten CMM101 $chpC\beta$ und Einbringen des <i>chpC</i> -Gens in CMM101 β 330-18 und <i>Cmm</i> NCPPB382	98

4.7	Untersuchung der hypersensitiven Reaktion auf der Nicht-Wirtspflanze <i>Mirabilis jalapa</i>	108
5	Diskussion	112
5.1	Die Pat-1 Proteinfamilie und ihre Funktion in der Pathogenität von <i>Cmm</i> .	112
5.2	Charakterisierung der Isolate aus Israel und den Niederlanden	116
5.3	Mutagenese der Gene <i>chpC</i> , <i>chpG</i> , <i>nagA</i> und <i>pelC</i>	118
5.4	Kolonisation der <i>chpC</i> - und der Deletionsmutante im zeitlichen Verlauf . .	124
5.5	Einbringen der Gene <i>chpC</i> , <i>ppaA</i> und <i>ppaC</i> in verschiedene <i>Cmm</i> -Stämme	125
5.6	Hypersensitive Reaktion auf der Nicht-Wirtspflanze <i>Mirabilis jalapa</i>	126
5.7	Ausblick	128
	Literaturverzeichnis	130
6	Anhang	141
6.1	Tabelle der Feldisolate aus Israel	141
6.2	Tabellen der Kolonisationswerte im zeitlichen Verlauf	143
6.3	Primer	151
6.4	Plasmidkarten	152
6.5	Alignments	159
	Abkürzungsverzeichnis	166

Tabellenverzeichnis

3.1	In dieser Arbeit verwendete <i>Escherichia coli</i> -Stämme	16
3.2	In dieser Arbeit verwendete <i>Clavibacter</i> -Stämme	17
3.3	In dieser Arbeit verwendete Plasmide und Vektoren in <i>E. coli</i>	23
3.4	In dieser Arbeit verwendeter Shuttle-Vektor für <i>E. coli</i> und <i>Cmm</i>	23
3.5	In dieser Arbeit verwendete Pflanzensamen	23
3.6	In dieser Arbeit verwendete Enzyme	24
3.7	In dieser Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen	24
3.8	In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Kits	26
3.9	In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotidprimer	27
3.10	In dieser Arbeit verwendete Antibiotika	29
4.1	Veränderungen im 3'-Bereich von <i>pat-1</i> bei <i>Cmm</i> NCPPB382	64
4.2	Sequenzeigenschaften der Pat-1 Proteinfamilie	69
4.3	Seltene Kodons bei <i>pat-1</i> und den Homologen	70
4.4	Vorhandensein von <i>pat-1</i> , <i>phpA/B</i> , <i>chpA</i> und <i>celA</i> bei <i>BglII</i> -gespaltener Gesamt-DNA und Virulenz der Isolate	72
4.5	Bakterientiter, Größe und Gewichte der mit <i>Cmm</i> -Isolaten infizierten Tomatenpflanzen	74
4.6	Veränderungen im 3'-Bereich von <i>pat-1</i> verschiedener <i>Cmm</i> -Stämme	76
4.7	Ergebnisse der Hybridisierungen <i>BglII</i> - bzw. <i>PstI</i> -gespaltener Gesamt-DNA	78
4.8	Erzeugte Mutanten, deren Resistenz, Namen, Plasmid-Status und Kontrollstämmen	91
4.9	Ergebnisse der Pflanzentests mit den Mutanten	95
4.10	Bakterientiter, Größe und Gewicht am 32. Tag nach Wurzelinfektion	97

4.11	Eigenschaften der <i>Cmm</i> -Stämme	107
4.12	Ergebnisse der hypersensitiven Reaktion	110
6.1	<i>Cmm</i> -Feldisolate aus dem trilateralen Projekt	141
6.2	Analyse der Kolonisation im zeitlichen Verlauf bei CMM101 (Einzelwerte und arithmetische Mittelwerte)	143
6.3	Analyse der Kolonisation im zeitlichen Verlauf bei CMM101 β 3330-18 (Ein- zelwerte und arithmetische Mittelwerte)	145
6.4	Analyse der Kolonisation im zeitlichen Verlauf bei CMM101 $chpC\beta$ (Einzel- werte und arithmetische Mittelwerte)	148

Abbildungsverzeichnis

2.1	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	3
2.2	Typische Symptome der durch <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ausgelösten Welkekrankheit der Tomate	4
2.3	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Xylemgefäßes im Querschnitt, das von <i>Cmm</i> besiedelt ist	5
2.4	Physikalische Karte der <i>chp/tomA</i> -Region	10
4.1	Hydrolyse der Cosmid-DNA 7-72 und 7-82 mit <i>Bam</i> HI und <i>Pst</i> I	63
4.2	Vergleich von <i>pat-1</i> auf DNA- und Protein-Ebene beim Wildtyp	65
4.3	Physikalische Karte der <i>chp</i> -Genregion	67
4.4	Multiples Alignment der Pat-1 Proteinfamilie	68
4.5	Welkeverlaufdiagramm der mit <i>Cmm</i> -Stämmen infizierten Tomatenpflanzen	73
4.6	Der 3'-Bereich der <i>pat-1</i> -Region von verschiedenen <i>Cmm</i> -Stämmen	75
4.7	Physikalische Karte und Hybridisierung der <i>chpC</i> -Mutante	84
4.8	Physikalische Karte und Hybridisierung der <i>chpG</i> -Mutante	86
4.9	Physikalische Karte und Hybridisierung der <i>nagA</i> -Mutante	87
4.10	Physikalische Karte und Hybridisierung der <i>pelC</i> -Mutante	89
4.11	Physikalische Karte der „direct repeats“ DR2a und DR2b	90
4.12	Welkeverlaufdiagramm der mit dem Wildtypstamm <i>Cmm</i> NCPPB382 und der Mutanten infizierten Tomatenpflanzen	92
4.13	Welkesymptome bei mit CMM101 und CMM101 <i>chpC</i> β infizierten Tomatenpflanzen	93
4.14	Kolonisation von Tomatenpflanzen durch <i>Cmm</i> -Mutanten im zeitlichen Verlauf	96

4.15	Plasmidisolierung aus der komplementierten <i>chpC</i> -Mutante	99
4.16	Welkeverlaufdiagramm der mit <i>chpC</i> und den <i>chpC</i> -Komplementanten infizierten Tomatenpflanzen	99
4.17	Welkesymptome bei mit CMM101 <i>chpC</i> β und den Komplementanten CMM101 <i>chpC</i> β -pIG216C β 2 und CMM101 <i>chpC</i> β -pIG216C β 3 infizierten Tomatenpflanzen	100
4.18	Welkeverlaufdiagramm der mit CMM101, CMM101-pIG216C β , CMM101 β 330-18 und CMM101 β 330-18-pIG216C β infizierten Tomatenpflanzen	102
4.19	Welkeverlaufdiagramm der mit CMM101 β 330-18, CMM101 β 330-18-pBA216-13f04 und CMM101 infizierten Tomatenpflanzen	104
4.20	Physikalische Karte des Plasmids pIG216C-13f04 β	105
4.21	Plasmidisolierung aus den Stämmen CMM101 und CMM101 β 330-18-pIG216C-13f04 β sowie CMM101 β 330-18	106
4.22	Welkeverlaufdiagramm der mit CMM101 β 330-18-pIG216C-13f04, CMM101 und CMM101 β 330-18 infizierten Tomatenpflanzen	106
4.23	HR-Ausbildung auf einem <i>Mirabilis jalapa</i> -Blatt nach Infiltration mit verschiedenen <i>Cmm</i> -Stämmen	109

1 Zusammenfassung

Der Wildtypstamm *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 besitzt zwei Plasmide, pCM1 und pCM2, die jeweils eine der Pathogenitätsdeterminanten, *celA* und *pat-1*, tragen. Weitere Homologe zu *pat-1*, die plasmidkodierte Gene *phpA*, *phpB* und das chromosomale *chpA*, wurden durch Kreuzhybridisierung mit einer *pat-1*-Sonde gefunden. Southern Hybridisierungen verschiedener Isolate gegen eine *pat-1*-Sonde zeigten jedoch ein vom Wildtyp *Cmm* NCPPB382 abweichendes Bandenmuster. Aus den avirulenten *Cmm*-Isolaten I-62, I-63, ZUM3036 und ZUM3121 wurde die jeweilige Pathogenitätsdeterminante *pat-1* kloniert und sequenziert. Die offenen Leserahmen wiesen allerdings keinerlei Unterschiede zu *pat-1* aus *Cmm* NCPPB382 auf, jedoch variieren die Poly-G-Region sowie die Anzahl der „direct repeats“ im 3'-Bereich, ohne mit der Virulenz oder Avirulenz der Stämme zu korrelieren. Über partielle Sequenzierung des Cosmids 7-72, der Transposonmutante CMM101/β370-45 und aus Daten des *Cmm*-Genomprojektes wurden benachbart zu *chpA* sechs weitere homologe Gene identifiziert (*chpB*-*chpG*), die in der 80 kb großen sogenannten *chp*-Region liegen. In Southern Hybridisierungen mit spezifischen Sonden für jedes einzelne *chp*-Gen konnten bei den avirulenten Stämmen I-62, ZUM3036 und ZUM3121, sowie der Deletionsmutante CMM101/β330-18, die eine 130 kb große chromosomale Deletion trägt, keins bzw. bei I-63 nur eins der *chp*-Gene nachgewiesen werden, während die untersuchten virulenten Stämme alle *chp*-Gene besitzen. Die avirulenten Stämme sind in ihrer Kolonisationsfähigkeit eingeschränkt, es werden nur Titer von bis zu 10^7 cfu/g Pflanzenhomogenat erreicht, während bei virulenten Stämmen ein Titer von 10^9 cfu/g Pflanzenhomogenat auftritt. Somit scheint es eine Korrelation zwischen der hochtiterigen Kolonisation der Tomatenpflanze durch *Cmm* und der Anwesenheit der *chp*-Gene zu geben. In der *chp*-Region sind zudem weitere Gene lokalisiert, die für extrazelluläre Enzyme (die β -N-Acetylglukosaminidase NagA, die Pektat-Lyase PelA und PelC) kodieren, die eine Rolle in der Bakterien-Interaktion spielen könnten, da sie für eine Mazeration der Mittellamelle der Pflanzenzellwand benötigt werden könnten.

Die Pat-1 Proteinfamilie, zu der Pat-1, PhpA, PhpB und ChpA-ChpG zählen, weist Homologien zu Serinproteasen der Subfamilie S1A auf. Sie besitzen die charakteristische katalytische Triade, die aus dem Serin- und Histidinmotiv, sowie einem konservierten Aspartat besteht.

Die gezielte Mutagenese der *chp*-Gene und der Exoenzyme sollte Aufschluss über ihre Funktion bringen. Inaktivierungen der Gene *chpG*, *nagA* und *pelC* führten nicht zu Veränderungen des pathogenen Phänotyps im Pflanzentest mit der Tomate. Dagegen zeigte die *chpC*-Mutante eine Reduzierung des Titers um einen Faktor von etwa 500 und verursachte nur bei 7 von 64 Pflanzen sehr schwache Welkesymptome. Durch Komplementation dieser Mutante mit dem Wildtyp *chpC*-Gen konnte der ursprüngliche pathogene Phänotyp wiederhergestellt werden, wodurch bestätigt wurde, dass die Mutation im *chpC*-Gen für den veränderten Phänotyp verantwortlich ist.

Der avirulenten Deletionsmutante CMM101 β 330-18 fehlt die komplette *chp*-Region. Eine Wiederherstellung des Welke-Phänotyps und eine Erhöhung des Titers in der Tomatenpflanze konnte weder durch das Einbringen der einzelnen Gene *chpC*, *ppaA* und *ppaC*, in die Deletionsmutante CMM101 β 330-18, noch die Kombination aller drei Gene erreicht werden. Die Transposonmutanten der Gene *ppaA* und *ppaC*, die auch für putative Serinproteasen einer anderen Familie kodieren, sind ebenfalls nur zu einer verringerten Kolonisation der Tomatenpflanze befähigt. Es ist daher wahrscheinlich, dass noch weitere Gene in der *chp*-Region eine Rolle in der Besiedlung der Wirtspflanze spielen.

Pflanzentests auf Induktion einer hypersensitiven Reaktion (HR) bei der Nicht-Wirtspflanze *Mirabilis jalapa* zeigten, dass die avirulenten Stämme I-62, I-63, ZUM3036, ZUM3121, CMM101 β 330-18 und der virulente Stamm CMM101 *chpG* β keine Nekrosen auf dem Blattgewebe induzieren können. Offenbar fehlt diesen Stämmen der Elicitor für eine HR.

2 Einleitung

2.1 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*) ist ein Gram-positives, coryneformes, nicht sporenbildendes, phythopathogenes Bakterium, das zur Gruppe der Actinomyceten gehört (Davis et al., 1984).

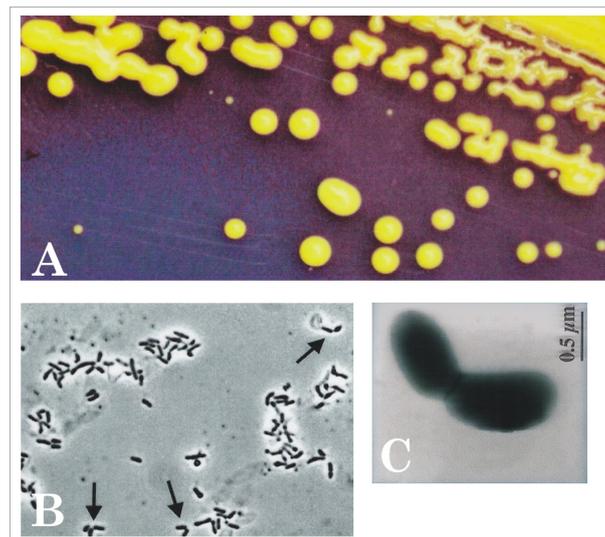


Abbildung 2.1: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), A: Koloniemorphologie von *Cmm* NCPPB382 auf Festmedium, B: lichtmikroskopische, C: transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von *Cmm* („snapping-division“), Fotos: A: J. Dreier, B und C: H. Jahr

Cmm bildet gelbe schleimige Kolonien auf Festmedium (Abb. 2.1, A). Bei der Zellteilung nimmt *Cmm* die typische V-Form an („snapping-division“) (Bryan, 1930), welche in Abb. 2.1 C gut zu erkennen ist. Sie entsteht durch das ungleichmäßige Aufreißen der Zellwand bei der Zellteilung.

Cmm verursacht die bakterielle Welke bei der Tomatenpflanze (*Solanum lycopersicum*) (Spooner et al., 2005). Die natürliche Infektion der Tomatenpflanzen erfolgt u. a. über kontaminiertes Saatgut oder Wunden im Wurzel- und Sprossbereich. *Cmm* dringt in die Xylemgefäße ein und breitet sich dort im Verlauf der Krankheit systemisch aus (Strider, 1969). Ein Titer von etwa 1×10^9 - 1×10^{10} Bakterien pro Gramm Frischgewicht der Pflanze kann erreicht werden (Berpohl, 1990). Die Infektion durch das Pathogen führt im Vergleich zu nicht infizierten Pflanzen zunächst zu einer Wachstumsretardierung, gefolgt von der unifacialen Fiederblattwelke und Sprossläsionen und letztlich dem Tod der Pflanze. Die typischen Symptome der unifacialen Fiederblattwelke (Abb. 2.2, A) zeichnen sich dadurch aus, dass sich die Fiederblätter der einen Seite von den Rändern her nach oben einrollen, ihre Turgeszenz verlieren und verwelken, während die Blätter auf der anderen Seite zunächst noch turgeszent bleiben (Strider, 1969). Im weiteren Krankheitsverlauf nimmt die Intensität der Welke zu und es bilden sich im Sprossbereich gelbe Streifen aus. An diesen Stellen kann der Spross einseitig aufreißen und charakteristische Sprossläsionen (Abb. 2.2, B) ausbilden (Wallis, 1977), wodurch die Standfestigkeit der Pflanze beeinträchtigt wird, was zum Abknicken der Pflanze führen kann.

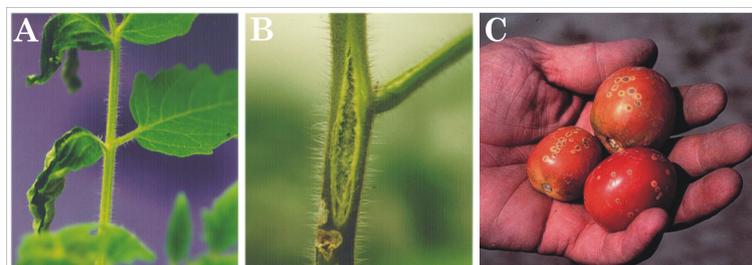


Abbildung 2.2: Typische Symptome der durch *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ausgelösten Welkekrankheit der Tomate, A: ein Beispiel der unifacialen Fiederblattwelke, B: eine Sprossläsion, C: durch *Cmm* verursachte Fruchtflecken („bird's eyes“) (Fotos: A und B: H. Jahr, C: Mississippi State University)

Es kommt durch die Ausbildung der Krankheitssymptome zu einer Reduzierung der Biomasse (Meletzus et al., 1993) und die Photosyntheseleistung der Fiederblätter ist durch die Welke beeinträchtigt. Das Ausmaß der Symptomausprägung hängt zusätzlich von verschiedenen Faktoren ab, wie z.B. Umwelt, pflanzliche Prädisposition, Infektionsart (Wurzel- oder Petiolusinfektion) und Pflanzenalter zum Zeitpunkt der Infektion (Gleason et al., 1993).

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* besiedelt das Xylem und nutzt die Gefäße zur Ausbreitung in der Pflanze. Das Xylem umfasst Gefäßbahnen, die die ganze Pflanze durchziehen und hauptsächlich für den Wassertransport verantwortlich sind. Abb. 2.3 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Xylemgefäße im Querschnitt, die von *Cmm* besiedelt sind.

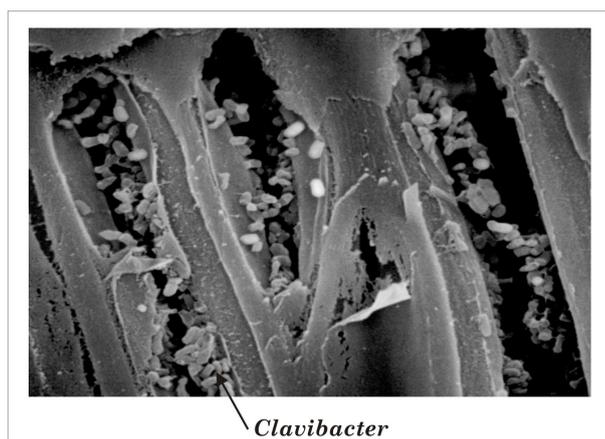


Abbildung 2.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Xylemgefäßes im Querschnitt, das von *Cmm* besiedelt ist (Foto: H. Jahr und R. Eichenlaub)

Der Wildtypstamm *Cmm* NCPPB382, 1956 von R. A. Lelliott in England isoliert, besitzt zwei endogene, für die Pathogenität relevante Plasmide, pCM1 und pCM2. Das 27,5 kb große Plasmid pCM1 trägt unter anderem das Gen *celA*, das für eine β -1,4-Endoglukanase kodiert. Die Endocellulase, ein Protein mit einem Molekulargewicht von 78 kDa, setzt sich aus drei Domänen zusammen. Die katalytische Domäne und die Cellulosebindedomäne zeigen Homologien zu anderen bakteriellen Cellulasen, während die dritte C-terminale Domäne zu pflanzlichen α -Expansinen homolog ist. Für das gereinigte Enzym ist eine Beteiligung an der Zersetzung pflanzlicher Cellulose gezeigt, womit es für die Ausbildung der Krankheitssymptome der infizierten Pflanzen von entscheidender Bedeutung ist (Jahr et al., 2000).

Auf dem 72 kb großen Plasmid pCM2 ist das Gen *pat-1* lokalisiert, das als zweite Pathogenitätsdeterminante identifiziert worden ist (Dreier, 1992). Das *pat-1*-Gen kodiert ein aus 280 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 29,7 kDa. Die genaue Funktion des Proteins ist noch unbekannt, allerdings sind Übereinstimmungen zu Serinproteasen von *Lysobacter enzymogenes* (Epstein and Wensink, 1988), *Streptomyces gri-*

seus (Henderson et al., 1987) und *Enterococcus faecalis* (GenBank AcNR S25140) vorhanden. Proteine, die das Histidinmotiv [LIVM][ST]A[STAG]HC und das Serinmotiv [(DNS-TAGC)[GSTAPIMVQH]_x(2)G[DE]SG[GS][SAPHV][LIVMFYWH][LIVMFYSTANQH] besitzen, sind der Serinproteasefamilie des Trypsins-Typs zugehörig (Brenner, 1988). Diese Motive sind in dieser Familie konserviert. Beim Pat-1 Protein konnte jedoch nur das Serinmotiv identifiziert werden (Dreier, 1995). Allerdings sind in der Swiss-Prot-Datenbank Serinproteasen gelistet gewesen, die lediglich das Serinmotiv aufwiesen und auch zur Serinproteasefamilie des Trypsin-Typs gehörten, die eventuell aber nicht funktionell sind, wie z. B. die Komponenten des menschlichen Komplementsystems (Kusumoto et al., 1988). Deshalb wurde Pat-1 der Serinproteasefamilie des Trypsin-Typs zugeordnet, obwohl das Histidinmotiv nicht identifiziert werden konnte. Die katalytische Aktivität der Serinproteasen der Trypsinfamilie wird durch eine Ladungsverschiebung zwischen einem Aspartat-, Histidin- und Serin-Rest vermittelt (Kraut, 1977). Eine proteolytische Aktivität konnte bei *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* mit herkömmlichen Serinprotease-Substraten wie Casein, Azocasein und Azocoll nicht gezeigt werden (Dreier, 1995). Eine eingefügte „+1“-Rasterschubmutation in *pat-1* hatte eine Deletion von 79 Aminosäuren inklusive des Serinmotivs zur Folge und führte zum Ausfall des virulenten Phänotyps (Dreier, 1995). Der Austausch des Serins (TCG) im konservierten Motiv gegen ein Threonin (ACG) zeigte im Pflanzentest, dass das Serin eine entscheidende Rolle spielt, da die Virulenz des Stammes *Cmm* NCPPB382 eingeschränkt ist. Es wurden keine Welkesymptome mehr ausgebildet (Niermann, 1997).

Das am N-Terminus gelegene Leaderpeptid deutet darauf hin, dass das Protein in einem Signalpeptid-vermittelten Transport sekretiert wird (Dreier et al., 1997). Im 3'-Bereich von *pat-1* wurde eine Poly-G-Region gefolgt von einer Abfolge von direkten Repetitionen identifiziert, wobei die Anzahl der Guanosin-Reste der Poly-G-Region (14 bei *Cmm* NCPPB382) und die Anzahl der Repetitionen (19 bei *Cmm* NCPPB382) bei verschiedenen *Cmm*-Stämmen variieren, allerdings die Abfolge bei den virulenten *Cmm*-Stämmen gleich war (Dreier, 1992). Der „direct repeat“ TTGCCGG dominiert in dieser Repeat-Region. Eine direkte Beteiligung der Repeats an der Symptomausprägung bei infizierten Tomatenpflanzen wird ausgeschlossen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Deletion des Terminators der *pat-1* mRNA nicht zu einer signifikanten Verkürzung der Halbwertszeit führt, wenn die durch die „direct repeat“ gebildete Haarnadelstruktur vorhanden ist. Dies deutet auf eine Beteiligung der Repetitionen an der Termination der Transkription hin. Im

Gegensatz dazu führte eine vollständige Deletion der Repetitionen zur Instabilisierung des Transkriptes und zu einer Abschwächung der Virulenz von *Cmm*. Die Krankheitssymptome treten verzögert auf (Dreier, 1995).

Die beiden endogenen Plasmide pCM1 und pCM2 von *Cmm* NCPPB382 bleiben auf Festmedium oder in Flüssigkultur bei Temperaturen von 26-28°C stabil erhalten, können aber durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf 32°C verloren gehen. Die Curing-Derivate CMM102, CMM101 und CMM100 des Wildtypstamms *Cmm* NCPPB382 wurden auf diese Weise erzeugt. In Bezug auf ihre Kolonisationsfähigkeit sind die Curing-Derivate identisch, sie unterscheiden sich allerdings in der Virulenz (Meletzus and Eichenlaub, 1991; Meletzus et al., 1993). Der Stamm CMM101 besitzt nur das Plasmid pCM1 und zeigt eine leicht reduzierte Virulenz (Verzögerung der Welke um etwa sechs Tage) im Vergleich zum Wildtypstamm *Cmm* NCPPB382. Der Stamm CMM102, der nur das Plasmid pCM2 besitzt, zeigt eine um etwa vier Tage verzögerte Welke. Die Infektion von Tomatenpflanzen mit dem plasmidfreien Stamm CMM100 führt dagegen nicht mehr zur Ausbildung von Krankheitssymptomen, obwohl der Stamm die Tomatenpflanze als Endophyt hochtitrig besiedeln kann (Meletzus and Eichenlaub, 1991; Meletzus et al., 1993). Alle Gene, die für die erfolgreiche Kolonisation in der Tomatenpflanze notwendig sind, also die Besiedlung der Pflanze als Endophyt (z. B. CMM100) ermöglichen, müssen auf dem Chromosom lokalisiert sein. Die geringere Biomassenreduzierung der infizierten Pflanzen ist neben der abgeschwächten Virulenz ein weiteres Merkmal der Curing-Derivate. Als Grund dafür ist das verzögerte Auftreten bzw. Ausbleiben der Welke denkbar (Berpohl et al., 1996).

Durch Southern Hybridisierungen *Bgl*II-gespaltener Gesamt-DNA von *Cmm* NCPPB382 und dem Curing-Derivat CMM100 gegen eine *pat-1*-Sonde konnten für den Wildtypstamm drei Signale und für CMM100 nur ein Signal nachgewiesen werden (Melkonyan, 1993; Pieper, 2001; Burger et al., 2005). Ein 3,75 kb *Bgl*II-Fragment des Plasmids pCM2 trägt die Pathogenitätsdeterminante *pat-1*. Auf einem 4,9 kb *Bgl*II-Fragment konnten die Gene *phpA* und *phpB* (**p**lasmidal **h**omology of *pat-1*) identifiziert werden, die ebenso wie *pat-1* auf dem Plasmid pCM2 lokalisiert sind (Pieper, 2001). Die Gene *phpA* und *phpB* liegen gegenläufig zueinander auf dem 4,9 kb *Bgl*II-Fragment, das direkt an das 3,75 kb *Bgl*II-Fragment angrenzt. Das *phpA*-Gen kodiert ein Protein von 277 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 29,6 kDa und *phpB* ein 284 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von 29,6 kDa. Die abgeleiteten Genprodukte sind homolog zu Pat-1 und weisen die Charakteristika der Serinproteasenfamilie des Trypsin-Typs auf. Sie besitzen das

Histidin- und Serinmotiv und das konservierte Aspartat der katalytischen Triade. Der GC-Gehalt von *phpA* und *phpB* ist mit 56,8% bzw. 58,8% niedriger als im übrigen Genom (72,8%, (Engemann, 2001)). Das Plasmid pMP6, das die intakten Gene *phpA* und *phpB* im Shuttlevektor pDM302 trägt, wurde in das Curing-Derivat CMM100, das plasmidfrei und avirulent ist, transformiert. Jedoch wurde dadurch der Welke-Phänotyp nicht wieder hergestellt (Pieper, 2001). Die genaue Funktion der putativen Serinproteasen PhpA und PhpB ist noch unbekannt. Das dritte hybridisierende 12,5 kb *Bgl*II-Fragment enthält das *chpA*-Gen (**chromosomal homology of *pat-1***), welches ein Pseudogen darstellt, da in der DNA Sequenz zwei Leserasterschübe und ein Stoppkodon identifiziert worden sind, wodurch nur ein verkürztes Protein von 97 Aminosäuren gebildet werden kann (Melkonyan, 1993; Gräfen, 2001; Burger et al., 2005).

2.2 Charakteristika der Isolate aus Israel und den Niederlanden

Im Rahmen des trilateralen Projekts „The Molecular Basis for Pathogenicity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* und *E. herbicola* pv. *betae*“ mit Israel und Palästina erhielt unsere Arbeitsgruppe zweiunddreißig *Cmm*-Feldisolate, die an verschiedenen Orten in Israel (siehe Anhang) isoliert worden waren. Southern Hybridisierungen gegen eine *pat-1*-Sonde zeigten, dass bei dem avirulenten Stamm I-62 *phpA*, *phpB* und *chpA* fehlen, der avirulente Stamm I-63 *chpA* nicht besitzt, allerdings alle avirulenten Stämme die Pathogenitätsdeterminanten *pat-1* und *celA* besitzen (Zellermann, persönliche Mitteilung). Mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) mit *Vsp*I-hydrolysiertes Gesamt-DNA wurde festgestellt, dass die Feldisolate I-62, I-63 und die *Cmm*-Isolate aus den Niederlanden ZUM3036 und ZUM3121 ein zum Wildtyp *Cmm* NCPPB382 abweichendes Bandenmuster aufweisen (Gartemann, persönliche Mitteilung). Bei den Stämmen ZUM3036 und ZUM3121 konnten ebenfalls die Pathogenitätsdeterminanten *celA* und *pat-1* durch Southern Hybridisierungen nachgewiesen werden, jedoch fehlen *phpA*, *phpB* und *chpA* (Zellermann, persönliche Mitteilung). In ersten Pflanzentests zeigten die Stämme I-62, I-63, ZUM3036 und ZUM3121 keine Welkesymptome, obwohl bei diesen Stämmen die notwendigen Pathogenitätsdeterminanten *celA* und *pat-1* vorhanden sind. Damit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* die bakterielle Welke bei der

Wirtspflanze *Solanum lycopersicum* auslösen kann, muss eine effektive Kolonisation der Tomatenpflanze als Voraussetzung für die Ausbildung von Krankheitssymptomen erfolgen. Da die Pathogenitätsdeterminanten in diesen avirulenten Stämmen vorhanden sind, ist eine Störung in der Kolonisation als Ursache für die Avirulenz zu vermuten.

2.3 Charakteristika der Deletionsmutante

CMM101 β 330-18

Mit Hilfe von Virulenz- und Kolonisationstests bei verschiedenen Transposonmutanten wurde die Mutante CMM101 β 330-18 identifiziert, die das Pathogenitätsplasmid pCM1 besitzt, aber keine Welkesymptome ausbildet und die Tomatenpflanze nicht effektiv kolonisieren kann (Kirchner, 2003). Das zur Mutagenese verwendete Transposon Tn1409 β ist in einen offenen Leserahmen (ORF)(Genomprojekt: CMM0135) inseriert, der einen geringen GC-Gehalt aufweist und dessen Genprodukt N-terminal schwache Ähnlichkeit zu einer GTP-Pyrophosphokinase von *Pseudomonas aeruginosa*, einem Gram-negativen Bakterium, das Lungeninfektionen hervorrufen kann, zeigt (Kirchner, 2003). Jedoch scheint es sich nicht um das *relA*-Gen, das für eine ppGpp-Synthetase kodiert, zu handeln, dessen Genprodukt bei Aminosäuremangel eine Pyrophosphatgruppe von ATP auf die Ribose-3'-Hydroxygruppe von GTP unter Bildung von pppGpp überträgt und an der stringenten Kontrolle beteiligt ist (Chakraborty and Bibb, 1997; Christensen et al., 2001). Die Komplementation dieser Mutante mit den Plasmiden pBA-30-18 α und pBA-30-18 β , welche den ORF CMM0135 als intaktes Gen im Shuttlevektor pDM302 tragen, führte nicht zur Wiederherstellung von Virulenz und Kolonisationsfähigkeit. Dementsprechend ist nicht die Insertion des Transposons Tn1409 β im offenen Leserahmen des ORFs CMM0135 für die Avirulenz und die nicht effektive Kolonisation der Mutante verantwortlich, sondern es muss mindestens eine weitere Mutation vorliegen (Abt, 2003). Über Pulsfeldgelelektrophorese mit *VspI*-gespaltener Gesamt-DNA wurde nachgewiesen, dass CMM101 β 330-18 eine Deletion von ca. 130 kb enthält (Gartemann, persönliche Mitteilung; Schott, 2004). Diese Deletion umfasst die *chp*-Region und die angrenzende *tomA*-Region (Abb. 2.4, Seite 10), allerdings nicht den Insertionsort des Transposons, der ~ 77 kb von der *chp*-Region bzw. ~ 25 kb von der *tomA*-Region entfernt liegt.

Mit Daten aus dem *Cmm*-Genomprojekt konnten in der *chp*-Region vierzehn putative

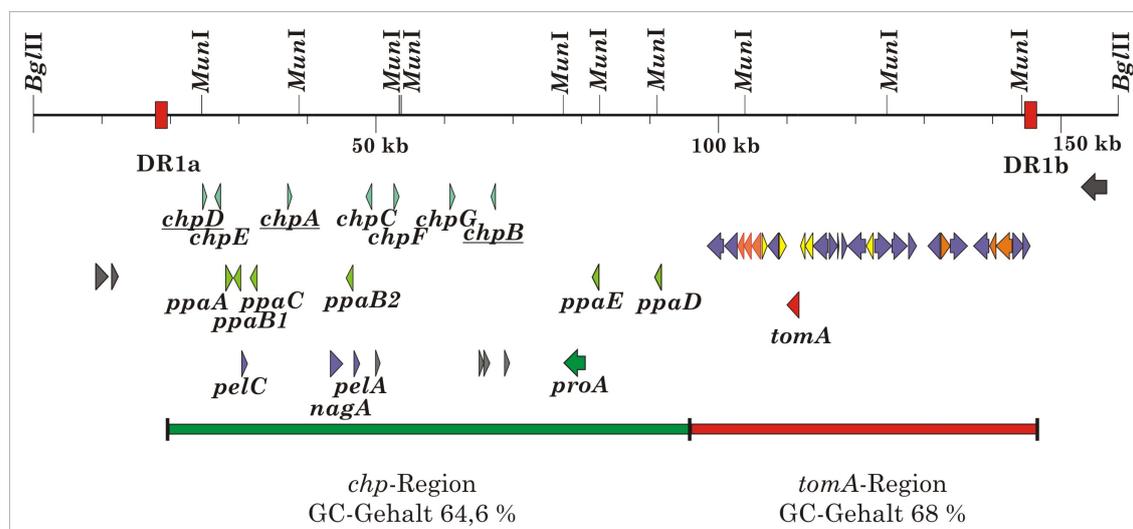


Abbildung 2.4: Physikalische Karte der *chp/tomA*-Region. unterstrichen: Pseudogene, Chp-Region: Gene für Proteasen und extrazelluläre Enzyme, *tomA*-Region: Gene für Glykosidasen, Transporter und Regulatoren, DR: „direct repeat“, nur ausgewählte Restriktionsschnittstellen sind gezeigt

Proteasen, mehrere extrazelluläre Enzyme identifiziert werden. Der GC-Gehalt von nur durchschnittlich $\sim 64,6\%$ weicht vom durchschnittlichen GC-Gehalt von $\sim 73\%$ des *Cmm*-Genoms (Engemann, 2001) ab. Die angrenzende *tomA*-Region hat einen GC-Gehalt von $\sim 68\%$ und trägt Gene, die für Glykosidasen, Zuckertransporter und Regulatoren kodieren. Durch die Analyse der Sequenzdaten aus dem Genomprojekt konnten zwei „direct repeats“ (DR) DR1a und DR1b, die nahe an den Grenzen der *chp/tomA*-Region liegen, identifiziert werden. Southern Hybridisierungen gegen Sonden aus der *chp/tomA*-Region mit *Mun*I-gespaltener Gesamt-DNA zeigten, dass alle *Mun*I-Fragmente zwischen dem DR1a und DR1b in CMM101 β 330-18 fehlen (Schott, 2004). Mittels PCR wurde nachgewiesen, dass die gesamte Region zwischen den DR1a zum DR1b in der Deletionsmutante CMM101 β 330-18 deletiert ist. Mit Gesamt-DNA der Mutante wurde per PCR ein Amplifikat von nur 2,7 kb erhalten, während beim Wildtypstamm ein Produkt mit einer theoretischen Größe von ca. 130 kb zu erwarten gewesen wäre, das aber nicht amplifiziert werden kann. Nach Sequenzierung des klonierten PCR-Produkts und Vergleich der Sequenzen der Deletionsmutante CMM101 β 330-18 und des Stamms *Cmm* NCPPB382 konnten die beiden Enden der Deletion auf einen Bereich von 300 bp eingeschränkt werden (Schott, 2004). Die

Ergebnisse lassen vermuten, dass die Deletion der *chp/tomA*-Region durch homologe Rekombination zwischen den „direct repeats“ unabhängig von der Insertion des Transposons entstanden ist und die Gene, die in der *chp/tomA*-Region kodiert sind, für die effektive Kolonisation verantwortlich sind, da der Titer der Deletionsmutante nur einen Wert von 10^3 bis 10^4 cfu/g Pflanze erreicht.

2.4 Die chromosomale *chp*-Genregion

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* produziert verschiedene extrazelluläre Enzyme, die zum Abbau pflanzlicher Zuckerpolymere benötigt werden, zu denen eine Cellulase (Meletzus et al., 1993), eine Xylanase (Beimen et al., 1992), eine Pektinmethylesterase (Strider, 1969) und eine Polygalakturonase (Hildebrandt, 1971; Beimen et al., 1992) gehören. Diese Enzyme könnten eine Rolle in der pathogenen Interaktion mit der Wirtspflanze spielen und an der beobachteten Zellwanddegradation bei Tomatenpflanzen beteiligt sein. Die sekretierten Exoenzyme Cellulase und Pektinase werden für die Gewebemazeration verantwortlich gemacht. Exoenzyme ermöglichen dem Bakterium weiterhin, diese Pflanzenstoffe als Energie- und Nährstoffquelle zu erschließen. Die Cellulase alleine vermag die Pflanzenzellwand nur bedingt abzubauen. Durch pektinolytische Enzyme wird dieser Prozess beschleunigt und vervollständigt.

Sowohl in der *tomA*- als auch der *chp*-Region sind verschiedene extrazelluläre Enzyme identifiziert worden, die möglicherweise für die Pathogenität relevant sind. Zu diesen gehören eine β -N-Acetylglukosaminidase (NagA), Pektat-Lyasen (PelA und PelC) und die zu der Pathogenitätsdeterminate Pat-1 homologen putativen Serinproteasen ChpA-ChpG. Da sieben der zehn Pat-1 Homologen in dieser Subregion lokalisiert sind, wurde sie *chp*-Genregion genannt.

Das chromosomale *nagA*-Gen kodiert für eine putative β -N-Acetylglukosaminidase. Das Polymer Chitin, das bei Pilzen und Insekten vorkommt, besteht aus verknüpften β -1,4-N-Acetylglukosaminen. Dieses Polymer wird durch Chitinasen in Chitinoligomere (vorwiegend Chitobiose oder -triose) gespalten und die Chitobiase zerlegt diese Oligomere in das Monomer N-Acetylglukosamin. Die effiziente Degradation durch Mikroorganismen wird durch das Zusammenwirken von Chitinasen und β -1,4-N-Acetylglukosaminidasen erreicht (Soto-Gil and Zyskind, 1989; Shaikh and Deshpande, 1993). Es gibt β -N-Acetylglukosaminidasen, die am chitinolytischen System beteiligt sind (Tsujibo et al., 1998). Viele dieser

Enzyme haben eine Lysozym-artige Nebenaktivität, so hydrolysiert z. B. die β -N-Acetylglukosaminidase von *Escherichia coli* K-12 die β -1,4-glykosidische Bindung zwischen N-Acetylglukosamin und N-Acetylmuraminsäure.

Das chromosomale *pelA*-Gen kodiert eine Pektat-Lyase. In der *chp*-Genregion liegt ein weiteres Gen, *pelC*, das eine Pektat-Lyase kodiert, vor. Auf DNA-Ebene sind diese Pektat-Lyasen zu 90 % und auf Protein-Ebene zu 95 % identisch. Die Pektat-Lyase ist ein weiteres Exoenzym, das Pflanzenzellwand-degradierend und bei manchen Bakterien essentiell für die Infektion von Pflanzen ist (Hayashi et al., 1997).

In der Pflanzenzellwand werden benachbarte Zellen von der Mittellamelle, deren Hauptbestandteil Pektin ist, voneinander getrennt (Collmer et al., 1988). Enzyme, die pektinolytisch wirken (Pektinasen), sind die Pektat-Lyase (Polygalakturonsäure-Lyase), die spezifisch für Polygalakturonsäure-Reste ist, und die Pektin-Lyase (Polymethylgalakturonsäure-Lyase), die Methylgalakturonsäure-Reste bevorzugt (Hayashi et al., 1997). Sie degradieren die Pektinfraktion und erleichtern dem Pathogen die Penetration und Kolonisation in der Pflanze. Diese Enzyme können Pflanzengewebs-Mazeration und Zell-Lyse verursachen und modifizieren die Zellwandstruktur (Collmer et al., 1988).

Ein Zusammenhang zwischen Pektat-Lyasen und Hrp-Proteinen konnte bei *Erwinia amylovora* gezeigt werden (Kim and Beer, 1998). Das HrpW-Protein besteht aus einer N-terminalen Harpin-ähnlichen- und einer C-terminalen Pektat-Lyase-ähnlichen-Domäne, die durch eine prolin- und serinreiche Sequenz verbunden sind. Ein Harpin ist ein saures, hitzestabiles, extrazelluläres glycin- und serinreiches Protein, das einen Mangel an Cysteinen aufweist und bei der Nicht-Wirtspflanze die hypersensitive Reaktion auslösen kann (Kim et al., 2004). Die hypersensitive Reaktion (**hypersensitive reaction, HR**) ist ein Abwehrmechanismus der Pflanzen gegen Pathogene. Es handelt sich bei der Abwehr um einen schnellen, aktiven Zelltod des infizierten Blattgewebes oder Zellen. Die Auslösung der HR kann zwischen phytopathogenen Bakterien, Viren oder Pilzen und verschiedensten Pflanzenarten erfolgen. Eine Infiltration des Pflanzengewebes mit einem hohen Bakterientiter ($\geq 10^6$ Bakterien/ml) kann bereits nach ca. 24 Stunden zur Ausbildung der HR (Nekrosenbildung) führen (Klement, 1963).

Die N-terminale Domäne des HrpW-Proteins, die keine Homologie zur Pektat-Lyase aufweist, reicht zur Ausbildung einer HR aus. In physiologischen Tests konnte keine Pektat-Lyase-Aktivität nachgewiesen werden, obwohl der C-Terminus Homologien zu einer Pektat-Lyase des Pilzes *Fusarium solani* f. sp. *lisi* und *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* zeigt.

Das *hrpW*-Gen liegt in mehreren *Erwinia* spp. konserviert vor. Sequenzvergleiche zeigten, dass der C-Terminus von HrpW aus *Erwinia amylovora* dem HrpW von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ähnelt (Kim and Beer, 1998). Das *hrpW*-Gen von *Pseudomonas syringae* DC3000 wurde angrenzend an das *hrp*-Cluster lokalisiert und dessen Genprodukt wird ebenfalls, wie HrpW von *Erwinia* (Kim and Beer, 1998), über den Typ-III-Sekretionsweg nach außen transportiert. Das HrpW von *Pseudomonas syringae* besitzt alle Schlüsselmerkmale eines Harpin. Die HrpW-Harpin-Domäne besteht aus sechs glycinreichen "Repeats", die in HrpZ, einem weiteren Hrp-Protein von *Pseudomonas syringae*, gefunden wurden, und gereinigt HR-Elicitor-Aktivität besitzen. Die HrpW-Pektat-Lyase-Domäne von *Pseudomonas syringae* zeigt Ähnlichkeiten zu Pektat-Lyasen von z. B. *Erwinia carotovora* und *Erwinia chrysanthemi*, kann jedoch in gereinigter Form keine hypersensitive Reaktion hervorrufen. HrpW könnte an der Interaktion mit der Pflanzenzellwand beteiligt sein (Charkowski et al., 1998).

Die Pektat-Lyasen von *Cmm* zeigen jedoch nicht den 2-Domänenaufbau eines Harpin und könnten daher funktionelle Pektat-Lyasen sein.

In der *chp*-Genregion sind vierzehn ORFs (*chpA*, *chpB*, *chpC*, *chpD*, *chpE*, *chpF*, *chpG*; *ppaA*, *ppaB1*, *ppaB2*, *ppaC*, *ppaD*, *ppaE*; *proA*) identifiziert worden, die für mögliche Serinproteasen aus drei unterschiedlichen Subfamilien kodieren (Abb. 2.4, Seite 10). Die Gene *chpA*, *chpB* und *chpD* sind jedoch Pseudogene, da innerhalb der ORFs Leserasterschübe und/oder in-frame Stoppkodons vorliegen. Die Gene *ppaA-ppaE* (**protease pathogenicity**) sind unter anderem homolog zu Proteasen des phytopathogenen Gram-negativen Bakterium *Xylella fastidiosa*, das bei Citrus-Pflanzen die „citrus variegated chlorosis“ (CVC) hervorruft. Es konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung der Gene *ppaA* und *ppaC* durch Transposonmutagenese zu einer Reduzierung der Welkesymptome und des Titers *in planta* führt (Abt, persönliche Mitteilung). Die *chp*-Gene (*chpA-chpG*) sind homolog zur Pathogenitätsdeterminante *pat-1* und kodieren für putative Serinproteasen des Trypsin-Typs S1A. Das *proA*-Gen kodiert eine Subtilisin-artige Serinprotease der Peptidase-Familie S8.

Proteasen von Mikroorganismen sind meist sekretierte Enzyme und können anhand der katalytischen Aminosäure im aktiven Zentrum klassifiziert werden. Es wird unter anderem zwischen Aspartat-, Cystein-, Metallo- und Serinproteasen unterschieden. Diese Enzyme können eine wichtige Rolle in der Pathogenität von Bakterienstämmen spielen. Bei dem phytopathogenen Pilz *Fusarium eumartii*, der die Kartoffelfäulnis auslöst, konnte gezeigt werden, dass eine Serinprotease bei der Kolonisation der Kartoffelknolle involviert ist (Oli-

vieri et al., 2002). Bei *Enterococcus faecalis*, einem Gram-positiven Darmbakterium, sind als Virulenzfaktoren die Gelatinase und die Serinprotease SprE an der Infektion beteiligt (Qin et al., 2000). Diese Enzyme werden durch Zell-Zell-Kommunikations-Signale über Quorum-sensing exprimiert. Diese Kommunikationssignale werden von sich teilenden Zellen sekretiert und akkumulieren ausserhalb der Zelle. Wenn die Konzentration dieser Signale einen Schwellenwert erreicht, wird ein Sensor der Bakterien angeschaltet und es werden zum Beispiel Gene, die für die Virulenz verantwortlich sind, exprimiert (Hardman et al., 1998).

2.5 Ziel dieser Arbeit

Um die Bedeutung der chromosomalen *chp*-Region, in der Gene lokalisiert sind, die zum Virulenzfaktor Pat-1 homolog sind, zu analysieren, sollte eine vergleichende Charakterisierung von *Cmm* NCPPB382 und avirulenten *Cmm*-Isolaten durchgeführt werden. Dabei ist die Virulenz bzw. Kolonisationsfähigkeit der Stämme bei der Tomatenpflanze *Solanum lycopersicum* zu untersuchen und die Anwesenheit von Pat-1 Homologen durch Southern Hybridisierung gegen spezifische *chp*-Sonden zu überprüfen. Eine eventuelle Korrelation zwischen An- bzw. Abwesenheit der *chp*-Gene und der Virulenz würde die Bedeutung der *chp*-Serinproteasen für die pathogene Interaktion unterstützen. Zum anderen sollte die Pathogenitätsdeterminante *pat-1* der avirulenten Stämme im Vergleich zu *Cmm* NCPPB382 bezüglich der Sequenz analysiert werden.

Die Rolle einzelner Gene für die Virulenz sollte durch gezielte Mutagenese getestet werden. Dazu wurden die intakten Gene *chpC*, *chpE*, *chpF*, *chpG*, die für Pat-1 homologe Serinproteasen kodieren, und dementsprechend eine Rolle bei der Ausbildung von Krankheitssymptomen spielen könnten, ausgewählt. Weiterhin war vorgesehen, die Gene *nagA*, *pelA* und *pelC*, die die Exoenzyme β -N-Acetylglukosaminidase und zwei Pektat-Lyasen kodieren, zu inaktivieren und eventuelle Auswirkungen auf die Virulenz zu bestimmen. Die anzuwendende Methode des ‘gene replacement‘ ermöglicht, definierte Mutanten des Bakteriums *Cmm* zu konstruieren. Es erfolgt *in vivo* ein Austausch des Wildtyp-Gens gegen ein inaktives Gens, welches durch die Insertion einer Antibiotikaresistenzkassette unterbrochen ist.

Die Deletionsmutante CMM101 β 330-18, der die ca. 130 kb große chromosomale *chp/tomA*-Region fehlt, ist mit verschiedenen fehlenden Genen zu transformieren, um zu überprüfen, ob im Pflanzentest der Welke-Phänotyp wieder hergestellt werden kann.

3 Material und Methoden

Material

3.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp, wichtige Eigenschaften	Referenz
JM109	F ['] <i>traD36 lacI^q, proAB, recA1, endA1, hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺), <i>thi-1, gyrA96</i> (Na ^r), <i>supE44, Δ(lac-proAB), Δ(lacZ)</i> M15, <i>relA1</i>	Yanisch-Perron et al., 1985
DH5αMCR	F ⁻ , <i>endA1, supE44, thi-1, λ⁻recA1, gyrA1, gyrA96, deoR, relA1, mcrA, Δ(mrr hsdMS mcrBC), Δ(lacXYA-argF)-U169Φ80dlacZΔM15</i>	Grant et al., 1990
GM119	F ⁻ , <i>dcm-6, dam-3, metβ1, galK2, galT22, lacY1, tsx-78, supE44</i>	Marinus and Morris, 1973

Tabelle 3.1: In dieser Arbeit verwendete *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Genotyp, wichtige Eigenschaften	Referenz
<i>Cmm</i> NCPPB382	Wildtyp, virulent, <i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate), pCM1 und pCM2	NCPPB
CMM100	Curing-Derivat von <i>Cmm</i> NCPPB382, avirulent, plasmidfrei	Meletzus and Eichenlaub 1991
CMM101	Curing-Derivat von <i>Cmm</i> NCPPB382, virulent, pCM1	Meletzus and Eichenlaub 1991

Stamm	Genotyp, wichtige Eigenschaften	Referenz
ZUM3036	<i>pat-1</i> und <i>celA</i> vorhanden, avirulent	Firma Syngenta Seeds, Enkhuizen, Niederlande
ZUM3121	<i>pat-1</i> und <i>celA</i> vorhanden, avirulent	Firma Syngenta Seeds, Enkhuizen, Niederlande
I-62	<i>pat-1</i> und <i>celA</i> vorhanden, avirulent, Feldisolat	Trilaterales Projekt
I-63	<i>pat-1</i> und <i>celA</i> vorhanden, avirulent, Feldisolat	Trilaterales Projekt
CMM101 β 330-18	Cm ^R , Transposonmutante, pCM1	Kirchner, 2003
CMM101 <i>chpC</i> β	Cm ^R , <i>chpC::cmx</i> , pCM1	diese Arbeit
CMM101 <i>chpG</i> β	Cm ^R , <i>chpG::cmx</i> , pCM1	diese Arbeit
<i>Cmm</i> NCPPB382 <i>nagA</i> β	Cm ^R , <i>nagA::cmx</i> , pCM1, pCM2	diese Arbeit
CMM101 <i>pelC</i> β	Cm ^R , <i>pelC::cmx</i> , pCM1	diese Arbeit
CMM101 <i>chpC</i> β - pIG216C β 2	Cm ^R , Neo ^R , <i>chpC::cmx</i> , pCM1, pIG216C	diese Arbeit
CMM101 <i>chpC</i> β - pIG216C β 3	Cm ^R , Neo ^R , <i>chpC::cmx</i> , pCM1, pIG216C	diese Arbeit
CMM101 β 330-18- pIG216C β	Cm ^R , Neo ^R , Transposonmutante, pCM1, pIG216C	diese Arbeit
CMM101- pIG216C	Neo ^R , CMM101, pCM1, pIG216C	diese Arbeit
CMM101 β 330-18- pBA216-13f04	Cm ^R , Neo ^R , Transposonmutante, pCM1, pBA216-13f04	diese Arbeit
CMM101 β 330-18- pIG216C-13f04 β	Cm ^R , Neo ^R , Transposonmutante, pCM1, pIG216C-13f04	diese Arbeit

Tabelle 3.2: In dieser Arbeit verwendete *Clavibacter*-Stämme, Wirtspflanze: Tomate (*Solanum lycopersicum*)

3.2 Plasmide und Vektoren

Vektor/Plasmid	Genotyp, wichtige Eigenschaften	Referenz
pUC13	lacZ α -Komplementationssystem, Ap ^R	Vieira and Messing, 1982
pUC18	lacZ α -Komplementationssystem, Ap ^R	Yanisch-Perron et al., 1985
pOKPF-Cmb α	pK18PolyF2:: <i>PmlI</i> / <i>BsaWI</i> - <i>cmx</i> -Fragment aus pKGT452C β , Ap ^R , Cm ^R	Kirchner, 2003
pEC70	pK18mob mit 3,1 kb <i>HpaI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment von pTP10 aus <i>Corynebacterium striatum</i> , Cm ^R , Km ^R	Tauch et al., 1998
pS19mob2	Spc ^R , Ap ^R	Kirchner, unveröffentlicht
pJE18K2	pK18mob, Δ 17 bp <i>HincII</i> - <i>SmaI</i> -Fragment (<i>Bam</i> HI fehlt in der mcs), Km ^R	Engemann, unveröffentlicht
pJE1802	pUC18, Δ 17 bp <i>HincII</i> - <i>SmaI</i> -Fragment (<i>Bam</i> HI fehlt in der mcs), Ap ^R	Engemann, unveröffentlicht
pSVB30:B7 α	3,75 kb <i>BglII</i> -Fragment aus <i>Cmm</i> NCPPB382, Ap ^R , <i>pat-1</i>	Dreier et al., 1997
pSVB30:B1 α	3,2 kb <i>BglII</i> -Fragment aus <i>Cmm</i> NCPPB382, Ap ^R , <i>celA</i>	Jahr et al., 2000
SuperCos1	7939 bp, Promotor T3 und T7, cos-sites, Ap ^R , Km ^R	Stratagene, 1999
Cosmid 7-72	etwa 32 kb groß, Ap ^R , Km ^R	Gräfen, 2001
Cosmid 7-82	etwa 37 kb groß, Ap ^R , Km ^R	Gräfen, 2001
7-72-9	pUC13::6,3 kb <i>PstI</i> -Fragment des Cosmids 7-72, Ap ^R	diese Arbeit
7-72-1	pUC13::1,5 kb <i>Bam</i> HI-Fragment des Cosmids 7-72, Ap ^R	diese Arbeit

Vektor/Plasmid	Genotyp, wichtige Eigenschaften	Referenz
7-72-2 bis 7-72-13	pUC13::xy kb große <i>Pst</i> I-Fragmente des Cosmids 7-72, Ap ^R	diese Arbeit
7-82-1	pUC13::1,5 kb <i>Bam</i> HI-Fragment des Cosmids 7-82, Ap ^R	diese Arbeit
Lambda-EMBL3-Phage-1	~ 16 kb chromosomale Region von CMM100 in Lambda EMBL3	Dreier, unveröffentlicht
pIGN	pUC13::2,8 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus Lambda EMBL3-Phage 1 von CMM100, Ap ^R	Gräfen, 2001
pBA216-13f04	pHN216::6,5 kb <i>Eco</i> RI-Fragment aus cmis3p0013f04, Neo ^R	Abt, unveröffentlicht
cmis2p0456d03	geschertes 2,5 kb Fragment aus <i>Cmm</i> NCPPB382, kloniert in pSMART, flankiert von <i>Eco</i> RI-Schnittstellen, <i>chpC</i> , Ap ^R	Sequenzierprojekt <i>Cmm</i> NCPPB382, IIT Bielefeld
cmis2p0163a01	geschertes 2,5 kb Fragment aus <i>Cmm</i> NCPPB382, kloniert in pSMART, flankiert von <i>Eco</i> RI-Schnittstellen, <i>chpE</i> , Ap ^R	Sequenzierprojekt <i>Cmm</i> NCPPB382, IIT Bielefeld
cmis2p0407d03	geschertes 2,8 kb Fragment aus <i>Cmm</i> NCPPB382, kloniert in pSMART, flankiert von <i>Eco</i> RI-Schnittstellen, <i>chpF</i> , Ap ^R	Sequenzierprojekt <i>Cmm</i> NCPPB382, IIT Bielefeld
cmis2p0456h08	geschertes 2,3 kb Fragment aus <i>Cmm</i> NCPPB382, kloniert in pSMART, flankiert von <i>Eco</i> RI-Schnittstellen, <i>chpG</i> , Ap ^R	Sequenzierprojekt <i>Cmm</i> NCPPB382, IIT Bielefeld
cmis3p0013f04	geschertes 6,5 kb Fragment aus <i>Cmm</i> NCPPB382, kloniert in pSMART, flankiert von <i>Eco</i> RI-Schnittstellen, <i>ppaA</i> , <i>ppaB1</i> , <i>ppaC</i> , <i>pelC</i> , Ap ^R	Sequenzierprojekt <i>Cmm</i> NCPPB382, IIT Bielefeld

Vektor/Plasmid	Genotyp, wichtige Eigenschaften	Referenz
pIG62	pUC13::3,75 kb <i>Bgl</i> II-Fragment aus I-62, <i>pat-1</i> , Ap ^R	diese Arbeit
pIG63	pUC13::3,75 kb <i>Bgl</i> II-Fragment aus I-63, <i>pat-1</i> , Ap ^R	diese Arbeit
pIG3036	pUC13::3,75 kb <i>Bgl</i> II-Fragment aus ZUM3036, <i>pat-1</i> , Ap ^R	diese Arbeit
pIG3121	pUC13::3,75 kb <i>Bgl</i> II-Fragment aus ZUM3121, <i>pat-1</i> , Ap ^R	diese Arbeit
pIG382	pUC13::3,75 kb <i>Bgl</i> II-Fragment aus <i>Cmm</i> NCPPB382, <i>pat-1</i> , Ap ^R	diese Arbeit
pIGC α	cmis2p0456d03:: <i>cmx</i> (1,9 kb <i>Bsa</i> AI-Fragment aus pEC70), <i>cmx</i> in gleicher Orientierung wie <i>chpC</i> , Ap ^R , Cm ^R	diese Arbeit
pIGC β	cmis2p0456d03:: <i>cmx</i> (1,9 kb <i>Bsa</i> AI-Fragment aus pEC70), <i>cmx</i> in entgegengesetzter Orientierung wie <i>chpC</i> , Ap ^R , Cm ^R	diese Arbeit
pIGE α	cmis2p0456d03:: <i>cmx</i> (1,9 kb <i>Sph</i> I-PCR-Produkt aus pEC70), <i>cmx</i> in gleicher Orientierung wie <i>chpE</i> , Ap ^R , Cm ^R	diese Arbeit
pIGE β	cmis2p0456d03:: <i>cmx</i> (1,9 kb <i>Sph</i> I-PCR-Produkt aus pEC70), <i>cmx</i> in entgegengesetzter Orientierung wie <i>chpE</i> , Ap ^R , Cm ^R	diese Arbeit
pIGF α	cmis2p0456d03:: <i>cmx</i> (1,9 kb <i>Bsa</i> AI-Fragment aus pEC70), Δ 435 bp <i>Pml</i> I-Fragment, <i>cmx</i> in gleicher Orientierung wie <i>chpF</i> , Ap ^R , Cm ^R	diese Arbeit

Vektor/Plasmid	Genotyp, wichtige Eigenschaften	Referenz
pIGF β	cmis2p0456d03:: <i>cmx</i> (1,9 kb <i>Bsa</i> AI-Fragment aus pEC70), Δ 435 bp <i>Pml</i> I-Fragment, <i>cmx</i> in entgegengesetzter Orientierung wie <i>chpF</i> , Ap ^R , Cm ^R	diese Arbeit
pIGG β	cmis2p0456d03:: <i>cmx</i> (1,9 kb <i>Bsa</i> AI-Fragment aus pEC70), Δ 640 bp <i>Eco</i> 47III-Fragment, <i>cmx</i> in entgegengesetzter Orientierung wie <i>chpG</i> , Ap ^R , Cm ^R	diese Arbeit
pIGN α	pIGN:: <i>cmx</i> (1,5 kb <i>Bam</i> HI-Fragment (aufgefüllt) aus pOKPF-cmb α), <i>cmx</i> in gleicher Orientierung wie <i>nagA</i> , Ap ^R , Cm ^R	diese Arbeit
pIGN β	pIGN:: <i>cmx</i> (1,5 kb <i>Bam</i> HI-Fragment (aufgefüllt) aus pOKPF-cmb α), <i>cmx</i> in entgegengesetzter Orientierung wie <i>nagA</i> , Ap ^R , Cm ^R	diese Arbeit
pIG1,5	pUC13::1,5 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus Lambda EMBL3-Phage 1 von CMM100, Ap ^R	Gräfen, 2001
pIGPA	pJE18K2::1,9 kb <i>Sac</i> I-Fragment aus Lambda EMBL3-Phage von CMM100, Km ^R	diese Arbeit
pIGPC	pJE1802::1,9 kb <i>Sac</i> I-Fragment aus dem Cosmid 7-72, Ap ^R	diese Arbeit
pIGPA α	pIGPA:: <i>cmx</i> (1,5 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pOKPFcmb α), <i>cmx</i> in gleicher Orientierung wie <i>pelA</i> , Km ^R , Cm ^R	diese Arbeit

Vektor/Plasmid	Genotyp, wichtige Eigenschaften	Referenz
pIGPA β	pIGPA:: <i>cmx</i> (1,5 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pOKPFcmb α), <i>cmx</i> in entgegengesetzter Orientierung wie <i>pelA</i> , Km ^R , Cm ^R	diese Arbeit
pIGPC α	pIGPC:: <i>cmx</i> (1,5 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pOKPFcmb α), <i>cmx</i> in gleicher Orientierung wie <i>pelC</i> , Ap ^R , Cm ^R	diese Arbeit
pIGPC β	pIGPC:: <i>cmx</i> (1,5 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus pOKPFcmb α), <i>cmx</i> in entgegengesetzter Orientierung wie <i>pelC</i> , Ap ^R , Cm ^R	diese Arbeit
pIGPAS α	pIGPA:: <i>spc</i> (1,2 kb <i>Bgl</i> II-Fragment aus pKS19 <i>mob2</i>), <i>spc</i> in gleicher Orientierung wie <i>pelA</i> , Km ^R , Spc ^R	diese Arbeit
pIGPAS β	pIGPA:: <i>spc</i> (1,2 kb <i>Bgl</i> II-Fragment aus pKS19 <i>mob2</i>), <i>spc</i> in entgegengesetzter Orientierung wie <i>pelA</i> , Km ^R , Spc ^R	diese Arbeit
pIGPCS α	pIGPC:: <i>spc</i> (1,2 kb <i>Bgl</i> II-Fragment aus pKS19 <i>mob2</i>), <i>spc</i> in gleicher Orientierung wie <i>pelC</i> , Ap ^R , Spc ^R	diese Arbeit
pIGPCS β	pIGPC:: <i>spc</i> (1,2 kb <i>Bgl</i> II-Fragment aus pKS19 <i>mob2</i>), <i>spc</i> in entgegengesetzter Orientierung wie <i>pelC</i> , Ap ^R , Spc ^R	diese Arbeit
pIGPCR	pUC18:: <i>2,2 kb Sph</i> I-Fragment aus CMM101 <i>pelC</i> α , Ap ^R	diese Arbeit
pHN216C β	pHN216:: <i>2,5 kb Eco</i> RV-Fragment aus cmis2p0456d03, Neo ^R	diese Arbeit
pIGC-13f04 α	cmis3p0013f04:: <i>2,5 kb Eco</i> RV-Fragment aus cmis2p0456d03, Ap ^R	diese Arbeit
pIGC-13f04 β	cmis3p0013f04:: <i>2,5 kb Eco</i> RV-Fragment aus cmis2p0456d03, Ap ^R	diese Arbeit

Vektor/Plasmid	Genotyp, wichtige Eigenschaften	Referenz
pHN216C-13f04 β	pHN216::9,0 kb <i>EcoRV</i> -Fragment aus pIGC-13f04 β , Neo ^R	diese Arbeit

Tabelle 3.3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide und Vektoren in *E. coli*

Vektor/Plasmid	Genotyp, wichtige Eigenschaften	Referenz
pHN216	<i>E. coli</i> - <i>Clavibacter</i> -Shuttlevektor, Neo ^R , Gm ^R , Replikon von pCM2	Nakhei, 1993; Laine et al., 1996

Tabelle 3.4: In dieser Arbeit verwendeter Shuttle-Vektor für *E. coli* und *Cmm*

3.3 Pflanzenmaterial

Pflanzensamen	Herkunft
<i>Lycopersicon esculentum</i> (Mill.) (Tomate) cv. „Moneymaker“	Erfurter Saatgut, N.L. Chrestensen, Erfurter Samen- und Pflanzenzucht GmbH
<i>Mirabilis jalapa</i> , gelbe Naturform	Gärtnerei Universität Bielefeld

Tabelle 3.5: In dieser Arbeit verwendete Pflanzensamen

3.4 Enzyme und Chemikalien

3.4.1 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	Boehringer
Lysozym	Sigma
Proof Start Polymerase	Qiagen
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Fermentas MBI

Enzym	Bezugsquelle
RNase A	Serva
Taq-Polymerase	Qiagen, Gartemann (selbst isoliert)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs

Tabelle 3.6: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

3.4.2 Restriktionsendonukleasen und -puffer

Enzym	Erkennungsequenz 5'→ 3'	Reaktionspuffer
textitBamHI	G/GATCC	NEBuffer 2
<i>BglII</i>	A/GATCT	NEBuffer 3
<i>BsaAI</i>	PyAC/GTPu	NEBuffer 2
<i>EcoRI</i>	G/AATTC	NEBuffer 1-4
<i>Eco47III</i>	AGC/GCT	NEBuffer 3
<i>HindIII</i>	A/AGCTT	NEBuffer 2
<i>KpnI</i>	GGTAC/C	NEBuffer 1
<i>NcoI</i>	C/CATGG	NEBuffer 4
<i>MscI</i>	TGG/CCA	NEBuffer 4
<i>PmlI</i>	CAC/GTG	NEBuffer 1
<i>PaeI</i>	GCATG/C	<i>PaeI</i> -Puffer
<i>PstI</i>	CTGCA/G	NEBuffer 3
<i>SacI</i>	GAGCT/C	NEBuffer 1
<i>SphI</i>	GCATG/C	NEBuffer 2

Tabelle 3.7: In dieser Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen; /: gibt die Position der Schnittstelle an, Pu: Purin, Py: Pyrimidin

Enzymreaktionspuffer (10 × konzentriert)

NEBuffer 1	10 mM	Bis Tris Propan-HCl
	10 mM	MgCl ₂
	1 mM	Dithiothreitol
		pH 7,0
NEBuffer 2	10 mM	Tris-HCl
	10 mM	MgCl ₂
	50 mM	NaCl
	1 mM	Dithiothreitol
		pH 7,9
NEBuffer 3	50 mM	Tris-HCl
	10 mM	MgCl ₂
	100 mM	NaCl
	1 mM	Dithiothreitol
		pH 7,9
NEBuffer 4	20 mM	Tris-Acetat
	10 mM	Mg-Acetat
	50 mM	K-Acetat
	1 mM	Dithiothreitol
		pH 7,9
Ligase-Puffer (Firma New England Biolabs)		
1 × T4-DNA-Ligase-Buffer	50 mM	Tris-HCl
	10 mM	MgCl ₂

10 mM	Dithiothreitol
1 mM	ATP
25 mg/ml	BSA
	pH 7,5

3.4.3 Chemikalien und Kits

Bezugsquelle	Chemikalien/Material
Amersham	Hybond N-Filter, Sephadex
Biozym	Agarose Seakem LE
Eurogentec, Equibio	Elektroporationsküvetten (2mm Elektrodenabstand)
GibcoBRL	Select Agar, Select Peptone 140, Select Yeast Extract
Macherey & Nagel	Porablot NY
Merck	alle hier nicht aufgeführten Chemikalien und Materialien
Qiagen	QIAprep Spin Miniprep, QIAquick Gel Extraction Kit, Taq PCR Core Kit, QIAquick PCR-Purification Kit
Roche	NBT/BCIP Stock Solution, Blocking Reagenz, DIG DNA Labeling and Detection Kit
Roth	Ampicillin, Glasperlen, Glucose, Glycerin, Glycin, Natriumchlorid, Tween80, X-Gal
Serva	Bromphenolblau, N-Laurylsarkosyl, Silicone solution, Visking-Dialyseschlauch
Sigma	Chloramphenicol, Dimethylformamid, EDTA, EGTA, Kanamycin, Mineralöl, Natriumhydroxid, Neomycin, Sorbitol, Tris-HCl, Triton-X-100
Whatman	3 MM Papier

Tabelle 3.8: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Kits

3.5 Oligonukleotidprimer für PCR

Amplifikat	Annealingtemperatur	Größe (bp)	Primer
<i>chpA</i>	62°C	580	chpA-1, chpA-2
<i>chpB</i>	54°C	532	chpB-1, chpB-2
<i>chpC</i>	64°C	465	chpC-1, chpC-2
<i>chpD</i>	62°C	540	chpD-1, chpD-2
<i>chpE</i>	54°C	786	chpE-1, chpE-2
<i>chpF</i>	60°C	712	chpF-1, chpF-2
<i>chpG</i>	62°C	445	chpG-1, chpG-2
<i>pat-1</i>	55°C	608	P 5, P 6
<i>celA</i>	55°C	502	PRC 3, PFC 1
<i>cmx-SphI</i>	62°C	1905	cmx-SphI-a, cmx-SphI-b

Tabelle 3.9: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotidprimer, die jeweiligen Nukleotidsequenzen sind im Anhang aufgeführt

3.6 Nährmedien

Die Mengen der einzuwiegenden Substanzen beziehen sich auf 1000 ml deionisiertes H₂O

TBY-Medium	10 g	Trypton
	5 g	Hefe-Extrakt
	5 g	NaCl
		pH 7,5

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

3.6.1 Zusätze zu Nährmedien

Festmedium	16 g	Agar pro 1000 ml Medium
Weichmedium	7 g	Agar pro 1000 ml Medium

3.7.2 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung

Gesamt-DNA-Isolierung

AK I	6,7%	Sucrose (w/v)
	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA

Plasmidisolierung

P1	50 mM	Tris
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
		pH 8,0

P2	200 mM	NaOH
	1%	SDS

P3	3 M	K-Acetat
		pH 5,5

Plasmidisolierung nach Birnboim-Doly

(Sambrook et al., 1989)

BD I	50 mM	Glucose
	10 mM	EDTA
	25 mM	Tris-HCl, pH 7,5

BD II	0,2 M 10 mM 1%	NaOH EDTA SDS (w/v)
CsCl-gesättigtes Isopropanol	37 g	CsCl in 41 ml Millipore 100 ml Isopropanol zugeben
neutrales Phenol		von Roth verwendet
Chloroform-Isoamylalkohol		Chloroform und Isoamylalkohol Verhältnis 24:1 (v/v)

3.7.3 Puffer und Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Lösung	0,8 - 2%	Agarose (w/v) in TBE (1 ×) aufkochen
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml	in H ₂ O
Gel-Lade-Puffer	0,03% 40% 117 mM	Bromphenolblau (w/v) Glycerin EDTA

TBE (10 ×)	108 g	Tris-Base
	9,3 g	EDTA
	55 g	Borsäure
		mit H ₂ O bidest. auf 1000 ml auffüllen

3.7.4 Lösungen zur Behandlung von Agarosegelen für Southern Hybridisierungen

Depurinierungslösung (Blot I)	0,25 M	HCl
----------------------------------	--------	-----

Denaturierungslösung (Blot II)	1,5 M	NaCl
	0,5 M	NaOH

Neutralisierungslösung (Blot III)	1 M	NH ₄ -Acetat
	0,02 M	NaOH

3.7.5 Puffer und Lösungen für DNA-DNA-Hybridisierungen

DIG-Färbelösung	80 µl	NBT/BCIP Stock-Solution add. 20 ml DIG-Puffer 3
-----------------	-------	--

DIG-Hybridisierungslösung	7 ml	DIG-Prähybridisierungslösung mit DIG-markierter DNA-Probe
---------------------------	------	--

DIG-Blocking-Stammlösung	10% (w/v)	Blocking-Reagenz in DIG-Puffer 1
DIG-Prähybridisierungslösung	5 × 0,5% (v/v) 0,1% (v/v) 0,02% (w/v)	SSC Blocking-Stammlösung N-Laurylsarkosyl SDS
DIG-Puffer 1	0,1 M 0,15 M	Maleinsäure NaCl pH 7,5
DIG-Puffer 2	2%	DIG-Blocking-Stammlösung (w/v) in DIG-Puffer 1
DIG-Puffer 3	100 mM 100 mM 50 mM	Tris-HCl, pH 9,5 NaCl MgCl ₂
DIG-Waschpuffer	0,3%	Tween80 (v/v) in DIG-Puffer 1

20 × SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Na-Citrat
		pH 7,0
Waschpuffer I	2 ×	SSC
	0,1%	SDS
Waschpuffer II	0,1 ×	SSC
	0,1%	SDS

3.8 Geräte

Biofuge pico	Heraeus
Brutschrank	Memmert
Feinwaage	Sartorius
Gene Pulser	Bio-RAD
Hybridisierungsöfen	Bachofer
Kühlzentrifuge Centrikon H-401	Kontron
Magnetrührer MR202	Heidolph
Megafuge 10	Heraeus Sepatech
RoboCycler Gradient 96	Firma Stratagene
Schüttler (37°C) Series 25D	Scientific Co., Inc.
Transilluminator VL	Vilber Lourmat
Tischzentrifuge	Firma Eppendorf
Ultrazentrifuge	Beckmann & Coulter
Vortex	Bender & Hobein AG
Wasserbad GFL	Gebr. Rettberg

Methoden

3.9 Kultivierung

3.9.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* Stämmen erfolgt auf festem oder in flüssigem TBY-Medium unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika bei 37°C über Nacht. Größere Volumina werden im Erlenmeyer-Kolben bei 37°C und 180 U/min im Luftschüttler inkubiert. Die Inkubation von elektroporierten *E. coli*-Zellen erfolgt zur Regeneration in SOC-Medium.

3.9.2 Kultivierung von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*-Stämme werden bei 25-28°C in C- oder TBY-Selektionsmedium über 3-4 Tage im Brutschrank angezogen. Die Anzucht kann sowohl auf festem Medium, als auch in Flüssigkultur erfolgen. Die Kultivierung größerer Volumina erfolgt im Erlenmeyer-Kolben bei 180 U/min im Luftschüttler. *Clavibacter*-Zellen werden nach der Elektroporation auf SB-Selektionsmedium inkubiert und angezogen.

3.9.3 Titerbestimmung/Messung der optischen Dichte

Das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur kann durch eine Messung der optischen Dichte (o.D.) bei einer Wellenlänge von 580 nm mittels Photometer verfolgt werden. Als Referenz dient das jeweilige sterile Nährmedium, in dem die Bakterien kultiviert wurden. Bis zu einer $\text{o.D.}_{580} \leq 1,0$ entspricht hierbei eine o.D. von 0,1 einem Titer von $\sim 2 \times 10^7$ Zellen/ml bei *Escherichia coli* und $\sim 1 \times 10^8$ Zellen/ml bei *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

3.9.4 Konservierung von Bakterienkulturen (Glycerinkultur)

- Bakterien von Agar-Platte in ein Eppendorfgesäß überführen
- add. 400 μ l PS-Puffer, vortexen
- ggf. Antibiotika hinzufügen
- add. 600 μ l 87% Glycerin, vortexen
- Lagerung bei -20°C

3.10 DNA-Isolierung

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

(Altenbuchner and Cullum, 1984)

- Bakterien von der Agar-Platte in ein Eppendorfgesäß überführen
- Zellen in 500 μ l AKI-Lösung mit 10 mg/ml Lysozym gut resuspendieren
- 45-60 min bei 37°C inkubieren (gelegentlich invertieren)
- add. 200 μ l 5% SDS, mischen
- 10 min bei 70°C inkubieren
- langsam auf RT abkühlen
- add. 200 μ l Phenol/Chloroform 1:1 (neutral), mischen bis die Lösung homogen ist
- 30 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand in neues Eppendorfgesäß überführen
- Phenolisierungsschritt wiederholen, wenn der Überstand trüb bleibt
- add. 1 Vol. Isopropanol und 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat (pH 8,0)
- Eppendorfgesäß vorsichtig invertieren, bis DNA ausfällt
- präzipitierte DNA in neues Eppendorfgesäß überführen
- DNA 2 \times in 500 μ l 70% (v/v) Ethanol waschen

- DNA in neues Eppendorfgefäß überführen
- add. x μl H₂O (Volumen abhängig von isolierter DNA-Menge)
- 30 min bei 37°C oder ü/N bei RT inkubieren
- Lagerung bei 4°C

3.10.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Isolierung von Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit

(nach Qiagen Handbuch 2001)

- Bakterien von der Agar-Platte in ein Eppendorfgefäß überführen
- Zellen in 250 μl P1-Puffer resuspendieren
- add. 250 μl P2-Puffer, 4-6 \times invertieren, 5 min bei RT inkubieren
- add. 350 μl N3-Puffer, 4-6 \times invertieren
- 15 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- QIAprep-Säule in ein 2 ml Sammelgefäß einsetzen
- Überstand auf QIAprep-Säule geben
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Durchlauf verwerfen
- 500 μl PB-Puffer auf die QIAprep-Säule geben
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Durchlauf verwerfen
- 750 μl PE-Puffer auf die QIAprep-Säule geben
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Durchlauf verwerfen
- Zentrifugation wiederholen, um Waschpuffer vollständig zu entfernen
- Durchlauf verwerfen
- QIAprep-Säule in neues Eppendorfgefäß überführen

- 50 μ l H₂O bidest. oder EB-Puffer in die Mitte der QIAprep-Säule geben
- 60 s bei RT inkubieren
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- DNA-Lagerung bei 4°C

Plasmidisolierung nach Birnboim-Doly

(Sambrook et al., 1989)

- 100 ml TBXY-Selektionsmedium mit *Escherichia coli* animpfen, ü/N bei 37°C im Luftschüttler inkubieren
- 38 ml in 40 ml Zentrifugationsröhrchen überführen
- 5 min bei 5000 rpm zentrifugieren (Kühlzentrifuge, Firma Kontron, Rotor A8.24)
- Überstand abgießen und mit weiteren 38 ml den Vorgang wiederholen
- Pellet in 8 ml BDI resuspendieren (vortexen)
- add. 16 ml BDII (frisch ansetzen)
- 10 min bei RT inkubieren
- add. 12 ml 3 M Na-Acetat (pH 4,8), invertieren
- 10 min bei 0°C inkubieren
- 10 min bei 20000 rpm und 4°C zentrifugieren (Kühlzentrifuge, Firma Kontron, Rotor A8.24)
- Überstand auf zwei 40 ml Zentrifugenröhrchen verteilen
- add. 1 Vol. Isopropanol, invertieren
- 30 min bei 10000 rpm zentrifugieren (Kühlzentrifuge, Firma Kontron, Rotor A8.24)
- Pellet trocknen und in insgesamt 5 ml 1 × TE (pH 8,0) lösen
- 4,3 ml für CsCl-EtBr-Dichtgradientenzentrifugation verwenden

3.10.3 CsCl-Ethidiumbromid-Dichtegradient (CsCl-EtBr-Dichtegradient)

- 4,65 g CsCl in Corex-Röhrchen abwiegen
- add. 4,3 ml Birnboim-Doly-DNA-Lösung, invertieren
- add. 300 μ l EtBr (2-3 mg/ml), mit Pasteurpipette mischen
- Lösung luftblasenfrei in Quickseal-Röhrchen überführen
- Gradient: 15 °C, 50000 rpm, mind. 8 h oder ü/N (Ultrazentrifuge, Beckman Coulter)
- unter UV-Licht ($\lambda = 302$ nm) untere Bande (= Plasmidbande) mit einer Spritze abziehen und in ein Eppendorfgefäß überführen
- add. 300 μ l CsCl-Isopropanol (37 g in 41 ml H₂O lösen, add. 100 ml Isopropanol), mischen
- obere Phase abziehen, Vorgang wiederholen, bis untere Phase farblos ist
- Dialyse zweimal 4 h gegen 1 \times TE (pH 8,0)

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

- Bakterien-Kultur in ein Eppendorfgefäß überführen
- Zellen mit 200 μ l P1-Puffer mit 100 mg/ml RNase A resuspendieren
- add. 200 μ l P2-Puffer, 4-6 \times invertieren, 5 min bei RT inkubieren
- add. 200 μ l 4°C kalten P3-Puffer, sofort 4-6 \times invertieren, 5 min auf Eis inkubieren
- 20 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- 600 μ l des Überstandes in neues Eppendorfgefäß überführen
- add. 600 μ l Isopropanol, mischen
- 30 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand entfernen
- mit 500 μ l 70% (v/v) Ethanol waschen
- 5 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand abziehen

- DNA-Pellet bei 70°C trocknen
- DNA in 20 μ l H₂O bidest. oder 1 \times TE-Puffer (pH 8,0) resuspendieren

3.10.4 Plasmidisolierung aus *Cmm*

- 10 ml TBY-Selektionsmedium mit *Cmm* animpfen und ca. 2 Tage bei 25°C im Schüttler inkubieren
- 10 min bei 5500 rpm (Rotor A8.24) und 4°C in Greinerröhrchen zentrifugieren
- Pellet mit 2 ml 10% (v/v) Glycerin waschen
- ü/N bei -20°C einfrieren
- Pellet in 300 μ l P1 mit 7 mg/ml Lysozym resuspendieren und in Eppendorfgefäß überführen
- 20 min bei 37°C inkubieren
- 300 μ l P2 zugeben, 6 \times invertieren
- 8 min bei RT inkubieren 300 μ l P3 zugeben, 6 \times invertieren
- 10 min bei 0°C inkubieren
- 15 min bei 13200 rpm zentrifugieren
- Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen
- 700 μ l neutrales Phenol/Chloroform zugeben, durch Invertieren homogenisieren
- 5 min bei 0°C inkubieren
- 15 min bei 13200 rpm zentrifugieren
- Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen
- 700 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (1:24) zugeben, invertieren
- 20 min bei 13200 rpm zentrifugieren
- Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen
- 1/10 Vol. Na-Acetat (pH 8,0) zugeben, 6 \times invertieren
- 20 min bei -20°C inkubieren
- 20 min bei 13200 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen

- Pellet mit 500 μ l 70% (v/v) Ethanol waschen
- 10 min bei 13200 rpm zentrifugieren
- Überstand und Rücklauf vollständig abziehen
- Pellet bei 37°C trocknen
- DNA in 50 μ l TE-Puffer resuspendieren

3.11 DNA-Reinigung und -Konzentration

3.11.1 Alkohol-Fällung

Ethanol-Fällung

- 1 Vol. DNA-Lösung
- add. 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat, pH 8,0
- add. 2 Vol. Ethanol, invertieren
- 30 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand entfernen
- Pellet mit 70% (v/v) Ethanol waschen
- 5 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Pellet trocknen und in H₂O bidest. oder TE-Puffer (pH 8,0) resuspendieren

Isopropanol-Fällung

- 1 Vol. DNA-Lösung
- add. 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat, pH 8,0
- add. 1 Vol. Isopropanol, invertieren
- 30 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand entfernen
- Pellet mit 70% (v/v) Ethanol waschen
- 5 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)

- Pellet trocknen und in H₂O bidest. oder TE (pH 8,0) resuspendieren

3.11.2 Phenolisierung

- 1 Vol. DNA-Lösung
- add. 1/2 Vol. Phenol/Chloroform 1:1 (neutral), mischen
- 30 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- obere Phase in neues Eppendorfgefäß überführen
- add. 1 Vol. Phenol/Chloroform (neutral), mischen
- Vorgang ggf. wiederholen
- anschließend Isopropanol-Fällung des Überstandes

3.11.3 Sephadex-Behandlung

- Sephadex G50 Pulver (Amersham) in H₂O bidest. quellen lassen, autoklavieren
- silikonisiertes Glaskügelchen (∅ ca. 2,5 mm) in blaue Pipettenspitze geben, Silikonisierung: Glaskügelchen in Silikonisierungslösung für 1 h bei 100°C backen
- Pipettenspitze in Weichagar-Röhrchen stellen
- 800 µl Sephadex G50 Lösung in die Pipettenspitze füllen
- 15 min bei 3000 × g zentrifugieren (Megafuge, Heraeus Sepatech)
- Pipettenspitze in neues Weichagar-Röhrchen stellen
- DNA auf die Sephadex-Säule auftragen
- Röhrchen 15 min bei 3000 × g zentrifugieren (Megafuge, Heraeus Sepatech)
- entsalztes DNA-Eluat weiter verwenden

3.11.4 Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem QIAquick PCR Purification Kit

(nach Qiagen Handbuch 2001)

- add. 5 Vol. PB-Puffer zu 1 Vol. PCR-Reaktionsansatz

- Säule in ein Sammelgefäß stellen
- Ansatz auf Säule pipettieren
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Durchlauf verwerfen
- 750 μl PE-Puffer auf die Säule geben
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Durchlauf verwerfen
- Zentrifugation wiederholen, um den restlichen Puffer vollständig zu entfernen
- Durchlauf verwerfen
- Säule in ein neues Eppendorfggefäß setzen
- 30 bis 50 μl EB-Puffer oder H_2O bidest. auf die Mitte der Säule geben
- 60 s bei RT inkubieren
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf), um DNA zu eluieren
- DNA-Lagerung bei -20°C

3.12 DNA-Techniken

3.12.1 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Hydrolyse von Plasmid-DNA

15 μl Ansatz

- 1-5 μl DNA (0,2 - 0,5 μg)
- add. 1,5 μl 10 \times Restriktionspuffer
- add. 1 μl (2-4 u) Restriktionsendonuklease
- y μl H_2O bidest. (auf 15 μl Reaktionsvolumen auffüllen)
- ü/N bei Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms inkubieren
- 20 min durch 70°C

Hydrolyse von Gesamt-DNA

100 μl Ansatz

- 10 μl DNA
- add. 10 μl 10 \times Restriktionspuffer
- add. 1-2 μl (2-4 u) Restriktionsendonuklease
- 78-79 μl H₂O bidest.

- ü/N bei Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms inkubieren
- 20 min durch 70°C bzw. durch Phenolisierung inaktivieren

3.12.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird zur Charakterisierung von DNA-Molekülen nach Amplifikation, Isolierung oder Restriktion verwendet. DNA weist auf Grund der Phosphatreste eine negative Ladung auf, kann somit im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Das Agarosegel bildet das Netzwerk, durch das sich die DNA-Moleküle bewegen. Die Agarosekonzentration bestimmt die Dichte des Gelnetzwerks. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Größe und der Konformation (ccc, oc, ds, ss, linear) der DNA-Moleküle. Die Agarose-Konzentration des Gels wird entsprechend der Größe der erwarteten DNA-Moleküle gewählt. In der vorliegenden Arbeit wurden Agarose-Konzentrationen von 0,8 bis 1,5% verwendet.

- Agarose in TBE-Puffer unter Rühren aufkochen
- auf ca. 60°C abkühlen lassen
- in einen Gelträger gießen und Kamm einsetzen
- nach Auspolymerisieren des Gels (ca. 20 min) in eine mit 1 \times TBE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer einsetzen und den Kamm entfernen
- DNA-Proben mit Gel-Lade-Puffer (1/5 Vol.) vermischen
- Geltaschen mit Proben und Marker beladen
- Elektrophoresekammer an Spannungsgeber anschließen, Laufbedingungen: 90-120 Volt

- Gel nach Beendigung der Elektrophorese 5-15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung färben
- Gel wässern und unter UV-Licht ($\lambda = 302$ nm) fotografieren
- bei zu starker Färbung das Gel in $1 \times$ TBE-Puffer entfärben

3.12.3 Bestimmung des Molekulargewichts von DNA

Die Wanderungstrecke von linearen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten in der Gelelektrophorese ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Durch den Vergleich der Wanderungstrecken der im gleichen Gel aufgetrennten Größenstandards, können die Größen der unbekanntenen DNA-Fragmente ermittelt werden. Als Größenstandards wurden in dieser Arbeit *EcoRI/HindIII*-hydrolysierte λ -Phagen-DNA mit den Fragmentgrößen 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3550, 4268, 4973, 5148 und 21226 bp und die 1 kb-Leiter der Firma Roche mit den Fragmentgrößen 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000 und 10000 bp verwendet. Bei Hybridisierungsgelen wurde Digoxigeninmarkierte *EcoRI/HindIII*-hydrolysierte λ -Phagen-DNA eingesetzt.

3.12.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

- 50 μ l DNA-Lösung mit H₂O 1:20 verdünnen
- DNA-Konzentration durch o.D.-Messungen bestimmen
- DNA bei 260 nm, Protein bei 280 nm
- o.D.₂₆₀ = 1 entspricht 50 μ g dsDNA/ml
- o.D.₂₆₀ = 1 entspricht 33 μ g ssDNA/ml
- Die Reinheit der DNA wird über den Quotienten o.D.₂₆₀/o.D.₂₈₀ bestimmt
- o.D.₂₆₀/o.D.₂₈₀ sollte 1,8-2,0 sein

3.13 Klonierung von DNA-Fragmenten

3.13.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit

(nach Qiagen Handbuch 2001)

- DNA-Restriktionsfragmente aus dem Agarosegel ausschneiden
- add. 300 μl QG-Puffer pro 100 μg Gel, mischen
- 15 min bei 50°C inkubieren, alle 3 min vortexen
- add. 100 μl Isopropanol pro 100 μg Gel, mischen
- Säule in 2 ml-Sammelgefäß stecken
- Lösung auf die Säule geben
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Durchlauf verwerfen
- add. 500 μl QG-Puffer
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Durchlauf verwerfen
- add. 500 μl PB-Puffer
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Durchlauf verwerfen
- add. 750 μl PE-Puffer
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Durchlauf verwerfen
- nochmal 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Durchlauf verwerfen
- Säule in neues Eppendorfgefäß überführen
- 30 bis 50 μl EB-Puffer oder H₂O in die Mitte der QIAprep-Säule geben

- 1 min inkubieren
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren, um DNA zu eluieren
- DNA-Lagerung bei 4°C

3.13.2 5'-Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase

- 98 μl linearisierter Vektor (Spaltungsansatz)
- add. 12 μl 10 \times Phosphatase-Puffer
- add. 3 μl alkalische Phosphatase
- add. 7 μl H₂O bidest.
- 30 min bei 37°C inkubieren
- Inaktivierung: add. 6 μl 100 mM EGTA (pH 7,0) und 10 min bei 70°C inkubieren
- Phenolisierung
- Isopropanolfällung
- DNA in 80 μl H₂O bidest. resuspendieren

3.13.3 Ligation von DNA-Restriktionsfragmenten

Die Klonierung eines Restriktionsfragmentes erfolgt nach der Restriktion des Vektors und der Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen, indem Vektor und Insert in einem geeigneten Verhältnis gemischt werden und in einer Ligasereaktion miteinander verbunden werden. Das Verhältnis von Vektor-DNA zu Insert-DNA sollte etwa 1:5 betragen.

- 2 μl hydrolysierte Vektor-DNA
- add. 10 μl hydrolysierte Insert-DNA
- add. 3 μl 10 \times T4-Ligasepuffer
- add. 1 μl T4-Ligase zugeben
- add. 14 μl H₂O bidest.
- 3 h bei RT oder ü/N bei 16°C inkubieren

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

Mit der Komplementation ist es möglich, den Erfolg einer Klonierung in *E. coli* ohne großen Aufwand zu überprüfen. Die hierfür verwendeten Klonierungsvektoren enthalten einen Teil des β -Galactosidase kodierenden *lacZ*-Gens, in dem die „multiple cloning site“ (mcs) des jeweiligen Vektors vorliegt. Die β -Galactosidase setzt bei der Spaltung des, dem Medium zugesetzten, farblosen Substrats X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid) das blaue 5-Brom-4-chlor-indigo frei. Durch den Einbau des Inserts in die mcs des Vektors, wird das *lacZ*-Fragment unterbrochen, das im Medium vorhandene X-Gal kann nicht gespalten werden und die entstehenden Kolonien bleiben weiß. Die blauen Kolonien enthalten den Vektor ohne Insert.

3.13.5 DNA-Sequenzierung und Auswertung

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Sequenzen wurden vom „IIT-Biotech/Bioservice“-Sequenzierservice in der Universität Bielefeld ermittelt. Die mit dem Programm „Lasergene“ (DNA-Star Inc., Madison, Wisconsin, USA) zusammengestellten Sequenzkontigs wurden für Sequenzabfragen verwendet. Ein Sequenzvergleich auf DNA- und Proteinebene wurde mittels der BLAST-Programme *blastn*, *blastp* und *blastx* (Altschul et al., 1997) durchgeführt. Hierfür wurde der Server des NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) verwendet. Für die Auswertung der Sequenzen sind die Programme Chromas, ClustalX (Thompson et al., 1994), Genedoc (Nicholas et al., 1997) und SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) (Nielson et al., 1997) verwendet worden.

3.14 DNA-Transfer

3.14.1 Transformation von *Escherichia coli* (CaCl₂-Methode)

Herstellung kompetenter Zellen

- *E. coli* ü/N-Flüssigkultur in TBY animpfen
- *E. coli* ü/N-Flüssigkultur 1:100 in TBY überimpfen
- Inkubation bei 37°C im Luftschüttler bis zu einer o.D.₅₈₀ = 0,5-0,75
- alle weiteren Schritte werden auf Eis durchgeführt

- 5 min bei $6000 \times g$ zentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor 8.24, Firma Kontron)
- Pellet in 5 ml 100 mM CaCl_2 (eiskalt) resuspendieren
- 30 min auf Eis inkubieren
- 5 min bei $6000 \times g$ zentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor 8.24, Firma Kontron)
- Pellet in 1 ml 100 mM CaCl_2 mit 20% Glycerin (eiskalt) resuspendieren
- Zellen zu 200 μl Aliquots in vorgekühlten Eppendorfgefäßen portionieren
- Lagerung bei -80°C

Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

- 200 μl kompetente Zellen auf Eis auftauen
- add. 10 μl des Ligationsansatzes bzw. 5 μl der zu transformierenden Plasmid-DNA
- Transformationsansatz kurz mischen
- 30 min auf Eis inkubieren
- 2 min bei 42°C (Hitzeschock)
- 1 min auf Eis inkubieren
- add. 0,7 ml TBX-Medium, invertieren
- 30 min bei 37°C inkubieren
- Zellen 1 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Pellet im Rücklauf resuspendieren
- Zellsuspension auf entsprechendem Selektionsmedium ü/N bei 37°C inkubieren

3.14.2 Elektroporation von *Escherichia coli*

Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

- *E. coli* ü/N-Flüssigkultur 1:100 in TBX verdünnen
- Inkubation bei 37°C im Luftschüttler bis zu einer o.D.₅₈₀ von 0,5-0,75
- Zellen 15 min in Eiswasser abkühlen
- alle weiteren Schritte werden auf Eis durchgeführt, Lösungen auf 0°C vorkühlen

- 250 ml Kultur 15 min bei $6000 \times g$ zentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor 6.9, Firma Kontron)
- Überstand vollständig entfernen
- Pellet zweimal mit ca. 20 ml H₂O (Millipore) vorsichtig ausschütteln, ohne das Pellet zu lösen
- Pellet vorsichtig in 5 ml H₂O (Millipore) resuspendieren
- add. 250 ml H₂O (Millipore), mischen
- 15 min bei $6000 \times g$ zentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor 6.9, Firma Kontron)
- Überstand sofort abgießen, Pellet im Rücklauf resuspendieren
- Zellsuspension auf zwei 40 ml-Zentrifugenröhrchen aufteilen
- add. 25 ml eiskaltes 15% Glycerin, mischen
- 15 min bei $6000 \times g$ zentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor 8.24, Firma Kontron)
- Überstand abziehen
- Pellet in 0,5-1 ml 15% Glycerin resuspendieren
- kompetente Zellen à 100 μ l in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotieren
- Lagerung bei -80°C

Elektroporation kompetenter *E.coli*-Zellen

Einstellungen des Gene Pulser (Firma Bio-RAD)

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

- kompetente Zellen auf Eis auftauen
- DNA und Küvetten auf Eis stellen
- 100 μ l kompetente Zellen mit bis zu 1/20 Vol. salzfreier DNA vermischen

- Zell-DNA-Suspension in die Küvette geben
- Küvette sorgfältig abtrocknen, in die Apparatur stellen und Puls auslösen
- sofort nach dem Puls 1 ml SOC-Medium in die Küvette geben, mischen
- Zellen in ein Eppendorfgefäß überführen
- Zellen 1 h bei 37°C inkubieren (Regeneration der Zellen)
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand sofort abgießen, Pellet im Rücklauf resuspendieren
- Zellen auf entsprechendem TBY-Selektionsmedium ausplattieren
- Inkubation ü/N bei 37°C

3.14.3 Elektroporation von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Herstellung kompetenter *Cmm*-Elektroporationszellen

(Kirchner, 2003)

- 250 ml TBY-Kultur mit *Cmm* animpfen
- Inkubation im Luftschüttler bei 28°C ü/N bis zu einer o.D.₅₈₀ = 1,0-1,2
- mit TBY auf eine o.D.₅₈₀ = 0,3 verdünnen
- von dieser Verdünnung 218,5 ml in neuem Kolben im Luftschüttler bei 28°C bis zu einer o.D.₅₈₀ = 0,6 anziehen (2-2,5 h)
- add. 31,5 ml 20% Glycin (entspricht Endkonzentration von 2,5% Glycin)
- Inkubation für 2 h im Luftschüttler bei 28°C
- alle weiteren Schritte auf Eis durchführen, alle Lösungen auf 0°C vorkühlen
- Zellsuspension in 500 ml-Zentrifugenbecher überführen
- 10 min bei 7000 × g zentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor 6.9, Firma Kontron)
- Überstand komplett entfernen
- Pellet in 5 ml eiskaltem H₂O (Millipore) resuspendieren

- Suspension in 40 ml-Zentrifugenröhrchen überführen
- add. 25 ml eiskaltes H₂O (Millipore), mischen
- 10 min bei 4°C mit 8000 × g zentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor 8.24, Firma Kontron)
- Überstand komplett entfernen
- Pellet in 1 ml eiskaltem H₂O (Millipore) resuspendieren, vortexen
- add. 25 ml eiskaltes H₂O (Millipore), vortexen
- 10 min bei 4°C mit 8000 × g zentrifugieren (Centrikon H-401, Rotor 8.24, Firma Kontron)
- Waschvorgang zweimal mit 10% Glycerin wiederholen
- add. 1 ml 15% eiskaltes Glycerin, resuspendieren
- Zellen à 100 µl in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotieren
- kompetente Zellen sofort verwenden oder Lagerung bei -80°C

(Bei eingefrorenen Zellen wird die Effektivität auf bis zu 50% reduziert)

Elektroporation kompetenter *Cmm*-Zellen

(Kirchner, 2003)

Einstellungen des Gene Pulser (Firma Bio-RAD)

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

- kompetente Zellen auf Eis auftauen
- DNA und Küvetten auf Eis stellen
- 400 µl SB-Medium in ein Eppendorfgefäß pipettieren
- 100 µl kompetente Zellen mit 1-5 µl salzfreier DNA vermischen

- Zell-DNA-Suspension in die Küvette geben
- Küvette sorgfältig abtrocknen, in die Apparatur stellen und Puls auslösen
- sofort nach dem Puls 150 μl SB-Medium in die Küvette geben, mischen
- Zellsuspension zu den restlichen 250 μl in das Eppendorfgefäß pipettieren
- Zellen 3 h bei 28°C inkubieren (Regeneration der Zellen)
- 60 s bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand sofort abgießen, Pellet im Rücklauf resuspendieren
- Zellen auf entsprechendem SB-Selektionsmedium
- Inkubation 3-6 Tage bei 28°C

3.15 DNA-DNA-Hybridisierung

3.15.1 Markierung der Hybridisierungssonde

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

- 1 μg Proben-DNA (linear oder supercoiled) mit H_2O bidest. auf 16 μl auffüllen
- 10 min bei 100°C inkubieren
- sofort im Eis/Ethanolbad schnell abkühlen
- auf Eis: 2 μl Hexanucleotid Mix (10 \times)
- 2 μl dNTP Labeling Mixture
- 1 μl Klenow-Polymerase
- mischen und kurz zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- 1-20 h bei 37°C inkubieren
- Reaktion durch Zugabe von 2 μl 0,2 M EDTA (pH 8,0) und/oder 10 min bei 65°C stoppen

3.15.2 Überprüfung der Markierungsreaktion

(Dot-Blot)

- 1 μl markierte Proben-DNA und 2 μl nicht-markierte Kontroll-DNA (Dig-DNA Labeling Kit) auf eine Nylonmembran auftragen
- bei RT trocknen, anschließend 3 min unter UV-Licht quervernetzen ($\lambda = 302 \text{ nm}$)
- 1 min in DIG-Puffer 1 waschen
- 30 min in DIG-Puffer 2 inkubieren (Schüttler)
- 30 min in DIG-Puffer 2 mit Antikörperkonjugat (2 μl /20 ml) inkubieren (Schüttler)
- zweimal 15 min mit DIG-Waschpuffer waschen (Schüttler)
- 2 min mit DIG-Puffer 3 äquilibrieren
- Nylonmembran in DIG-Färbelösung im Dunkeln färben
- Färbereaktion mit H_2O stoppen

3.15.3 Southern-Hybridisierung

DNA-Transfer auf eine Nylonmembran durch Kapillarblot

(Smith and Summers, 1980)

- restringierte DNA-Proben durch Agarosegelelektrophorese auftrennen
- DNA mit Ethidiumbromid-Lösung anfärben, unter UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) fotografieren, Gel entfärben
- Gel 5 min in Depurinierungslösung (Blot I) inkubieren, Lösung abgießen
- 2 \times 15 min in Denaturierungslösung (Blot II) inkubieren, Lösung abgießen
- 2 \times 15 min in Neutralisierungslösung (Blot III) inkubieren, Lösung abgießen
- Blot-Aufbau: Frapan faltenfrei auf der Unterlage befestigen
- Gel mit der Oberseite nach unten blasenfrei aufs Frapan legen
- Nylonmembran (Porablot NY, Macherey & Nagel) luftblasenfrei auf das Gel legen
- 5 Lagen mit Blotpuffer III getränktes Whatman-Papier luftblasenfrei auf die Membran auflegen

- ca. 10 cm dicken Stapel Einmal-Papierhandtücher auf das Whatman-Papier legen
- Brett/Glasplatte auf den Stapel legen und mit einem Gewicht beschweren
- DNA-Transfer über Nacht bei RT
- DNA auf der Nylonmembran 3 min unter UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) quervernetzen
- Membran zur Hybridisierung einsetzen

Prähybridisierung und Hybridisierung unter stringenten Bedingungen

- Hybridisierungszylinder mit H_2O bidest. füllen
- Nylonmembran mit der DNA-Seite nach innen in den Hybridisierungszylinder überführen
- H_2O bidest. durch 20 ml DIG-Prähybridisierungslösung/100 cm^2 ersetzen
- mindestens 2 h bei 68°C im Hybridisierungsofen inkubieren (Rollervorrichtung)
- Digoxigenin-markierte DNA-Probe (Sonde) zu 7 ml DIG-Prähybridisierungslösung geben und 20 min bei 100°C denaturieren
- Prähybridisierungslösung abgießen und Hybridisierungssonde zugeben
- ü/N bei 68°C im Hybridisierungsofen inkubieren (Rollervorrichtung)

Immunologische Nachweisreaktion unter stringenten Bedingungen

- Hybridisierungssonde abgießen und für eine Wiederverwendung bei -20°C lagern
- Membran 2×5 min mit jeweils 100 ml Waschpuffer I bei RT waschen (Rollervorrichtung), Lösung abgießen
- Membran 2×15 min mit je 100 ml Waschpuffer II bei 68°C waschen (Rollervorrichtung), Lösung abgießen
- Membran in eine Hybridisierungsschale überführen (während der Inkubation mit den folgenden Lösungen wird die Schale auf einen Schüttler gestellt)
- 1 min mit 50 ml DIG-Puffer 1 bei RT inkubieren, Lösung abgießen
- 30 min mit 100 ml DIG-Puffer 2 bei RT inkubieren, Lösung abgießen
- 1 min mit 50 ml DIG-Puffer 1 bei RT inkubieren, Lösung abgießen

- 30 min mit 20 ml DIG-Puffer 2 und 2 μ l Antikörperkonjugat (1:10000) bei RT inkubieren, Lösung abgießen
- 2 \times 15 min in jeweils 100 ml DIG-Waschpuffer bei RT inkubieren, Lösung abgießen
- Nylonmembran für 2 min in 50 ml DIG-Puffer 3 äquilibrieren
- Nylonmembran in 15 ml DIG-Färbelösung im Dunkeln färben
- Färbereaktion durch H₂O stoppen
- Membran trocknen und im Dunkeln aufbewahren

3.15.4 Koloniehybridisierung

- Cosmidhaltige Kolonien auf geeignete Selektions-Agar-Platten stochern und ü/N bei 37°C inkubieren
- Nylonmembran (Hybond N-Filter, Amersham) auf die Kolonien legen und 1-2 h bei 37°C inkubieren
- Nylonmembran mit der DNA-Seite nach oben auf 5 Lagen Whatman-Papier legen, das jeweils in den folgenden Lösungen getränkt ist:
 - 2-3 min 0,5 M NaOH
 - 4-5 min 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
 - 7 min 1 M Tris-HCl pH 7,5
 - 7 min 1 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl pH 7,5
 - 5 min 1 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl pH 7,5
 - zweimal 10 min 2 \times SSC
 - verbleibende Kolonien ablösen
 - 3-5 min unter UV-Licht ($\lambda = 302$ nm) quervernetzen
 - Filter zur Hybridisierung einsetzen

3.16 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.16.1 PCR mit Gesamt-DNA als Template

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für Temperaturgradient (225 μl)

22,5 μl 10 \times PCR-Reaktionspuffer

27 μl 10 mM MgCl_2

18 μl dNTPs

8,5 μl Primer 1

8,5 μl Primer 2

14,4 μl DMSO

2 μl Gesamt-DNA

119,6 μl H_2O bidest.

4,5 μl Taq-Polymerase

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

Zyklen	Dauer (min)	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)
1	10	94
35	1 - 1,5	94
	1 - 1,5	Annealingtemperatur
	1 - 2	72
1	10	72

- Lagerung der PCR-Produkte bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung
- Überprüfung der PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese

Die für die einzelnen PCRs ermittelten Annealingtemperaturen sind in Tabelle 3.9 aufgeführt.

3.16.2 PCR mit ganzen Zellen als Template

Präparation der Template-DNA

- Zellen mit einer gelben Pipettenspitze von der Agar-Platte abnehmen und in ein Eppendorfggefäß überführen
- add. 500 μl H₂O bidest., resuspendieren
- 5 min bei 13200 rpm zentrifugieren (Tischzentrifuge, Firma Eppendorf)
- Überstand verwerfen
- Zellen im Rücklauf resuspendieren
- 1 μl für PCR verwenden

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (50 μl)

- 5 μl 10 \times PCR-Reaktionspuffer
- 3 μl 10 mM MgCl₂ bzw. 10 μl 5 \times Q-Solution
- 2 μl bzw. 1,5 μl dNTPs
- 1 μl Primer 1
- 1 μl Primer 2
- 1,6 μl bzw. 0 μl DMSO
- 1 μl Zellsuspension
- 34,9 μl bzw. 29,5 μl H₂O bidest.
- 0,5 μl Taq- bzw. 1 μl Proof-Start-Polymerase

- jeden Ansatz mit 25 μl PCR-Öl beschichten, um ein Verdampfen zu verhindern
- Reaktionsansätze in den RoboCycler Gradient 96 (Firma Stratagene) stellen

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

3.17 Methoden zur Analyse des Pathogenitätsverhaltens von *Cmm*

3.17.1 Pflanzentests mit der Wirtspflanze *Solanum lycopersicum*

Wurzelinfektion

- Aussaat und Anzucht der Tomatenpflanzen in steriler Erde
- Pflanzen im 1-Blatt-Stadium (ca. zwei Wochen nach der Aussaat) entnehmen und anhaftende Erde entfernen (jeweils 2×32 Pflanzen)
- *Cmm* in sterilem Leitungswasser in einem Greiner-Röhrchen resuspendieren und eine o.D.₅₈₀ von 8-9 einstellen
- 1 ml dieser Suspension in ein Eppendorfgefäß füllen
- Pflanzen 15 min in *Cmm*-Bakteriensuspension inkubieren (3-4 Pflanzen pro Eppendorfgefäß)
- Pflanzen in vorbereitete Pflanztöpfe mit steriler Erde einsetzen
- Anzucht der Pflanzen im Pflanzenraum bei 50-60% relativer Luftfeuchtigkeit im Tag-Nacht-Rhythmus bei 25°C (Tag: 16h bei 12000 Lux, Nacht: 8 h im Dunkeln)
- täglich Welkesymptome protokollieren

Ermittlung des Welkeindex und Welkeverlaufs

Für die Ermittlung des Welkeindex wird eine Serieninfektion an den Tomatenpflanzen durchgeführt (n=32-64). Der Welkeindex des jeweils untersuchten Stamms beschreibt den Zeitraum, nach dem 50% der infizierten Tomatenpflanzen Welkesymptome bzw. Sprossläsionen aufweisen. Die infizierten Pflanzen werden täglich auf Welkesymptome untersucht und der Welkeverlauf wird nach einem vierstufigen Schema protokolliert:

„(+)" leichte/beginnende Welke

„+" deutliche Welke (mindestens ein deutlich welkendes Blatt)

„++" starke Welke (2/3 der Blätter welken)

„tot" so starke Welke, dass keine Photosynthese mehr möglich ist

Gewichts- und Größenbestimmung der Pflanzen

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

3.17.2 Kolonisationstest

Reisolation von *Cmm* aus Pflanzenhomogenat

- Mörser und Pistill mit 70% Ethanol sterilisieren
- Pflanze mit steriler Schere direkt oberhalb der Erde im Topf abschneiden, wiegen, in kleinere Stücke zerschneiden und in den Mörser geben
- den Mörser mit flüssigem Stickstoff befüllen, so dass alle Pflanzenteile bedeckt sind und mit dem Pistill sorgfältig zerkleinert werden können (Schutzbrille tragen)
- PS-Puffer hinzugeben (1 ml PS-Puffer/1 g Frischgewicht)
- solange mörsern, bis eine homogene Suspension entstanden ist
- eine Verdünnungsreihe anlegen und 100 μ l der ausgewählten Verdünnungstufen ausplattieren
- 3-5 Tage bei 25°C inkubieren
- Anzahl der colony forming units (cfu) und gewichtetes Mittel bestimmen

Berechnung des gewichteten Mittelwertes

Um den Bakterientiter einer Bakteriensuspension zu ermitteln, wird eine Verdünnungsreihe der Suspension angelegt. Von geeigneten Verdünnungsstufen werden 100 μ l auf den jeweiligen Agar-Platten ausplattiert. Nach Bebrütung der Bakterien wurde die Koloniezahl bestimmt. Die Ergebnisse der verschiedenen Verdünnungsstufen wurden nicht zum arithmetischen Mittel, sondern zu einem gewichteten Mittel zusammengefasst. Verdünnungsreihen sind immer mit Fehlern, die zum größten Teil aus Pipettierungenauigkeiten resultieren und sich von Verdünnungsstufe zu Verdünnungsstufe vervielfachen, behaftet. Am geringsten ist der Fehler also bei der geringsten Verdünnungsstufe, die sich noch problemlos auszählen lässt. Deshalb wird diese zu 100%, die folgenden Verdünnungsstufen nur noch

zu 10%, 1% und 0,1% gewertet. Mathematisch wird dies dadurch realisiert, dass die ausgezählten Koloniezahlen der einzelnen Verdünnungsstufen addiert werden und diese Zahl je nach Anzahl der Verdünnungsstufen durch 1,1 (2 Verdünnungsstufen), durch 1,11 (3 Verdünnungsstufen), 1,111 (4 Verdünnungsstufen) dividiert wird.

3.17.3 Test zur Auslösung der hypersensitiven Reaktion (HR) bei *Mirabilis jalapa*

- *Mirabilis jalapa* bis zu einer Größe von 30-60 cm anziehen
- Bakterien in sterilem PS-Puffer, pH 7,0, in einem Reagenzglas resuspendieren
- o.D₅₈₀ von 8,0-9,0 einstellen
- Bakteriensuspension mit einer Spritze aufziehen
- Spritze (Durchmesser der Spritzenöffnung: 3mm) an die Hinterseite eines Blattes fest ansetzen und mit dem Finger von der Vorderseite des Blattes leicht dagegen drücken (Spritze nicht in unmittelbarer Nähe eines Leitbündels ansetzen!)
- mit mittlerem Druck die Bakteriensuspension aus der Spritze drücken, so dass die Suspension in das Blattgewebe (Interzellularraum) aufgenommen wird
- Pflanzen 2-3 Tage in den Pflanzenraum, 50-60% relative Luftfeuchtigkeit im Tag-Nacht-Rhythmus bei 25°C (Tag 16 h bei 12.000 Lux, Nacht 8 h im Dunkeln), stellen und in diesem Zeitraum Änderungen des Blattgewebes im Bereich des Spritzenansatzes (Nekrosenbildung) verfolgen

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung von Pat-1 Homologen

Wie in früheren Arbeiten gezeigt, ergibt eine Hybridisierung von *Bgl*II-gespaltener GesamtdNA des Curing-Derivates CMM100 mit einer *pat-1*-Sonde ein Signal, das darauf schließen lässt, dass im Genom von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* eine DNA-Sequenz vorliegt, die Homologie zu *pat-1* besitzt (Burger et al., 2005). Um diese Region identifizieren und charakterisieren zu können, wurde eine Phagenbibliothek des Curing-Derivates CMM100 durch Hybridisierung mit der *pat-1*-Sonde untersucht und dabei festgestellt, dass der Phage EMBL3-Phage-1 die entsprechende chromosomale Region enthält. Durch Subklonierung und Sequenzierung der hybridisierenden Region konnte ein Gen identifiziert werden, das Homologien zu *pat-1* aufweist. Dieses Gen wurde *chpA* (**ch**romosomal **h**omology of **p**at-1) genannt (Melkonyan, 1993; Gräfen, 2001). Die Sequenzanalysen von Subklonen zeigten, dass es sich bei *chpA* um ein Pseudogen handelt, da die DNA-Sequenz zwei Leserasterschübe und ein Stoppkodon aufweist. Außerdem konnten zwei ORFs identifiziert werden, die für eine putative Pektat-Lyase (*pelA*) und eine β -N-Acetylglucosaminidase (*nagA*) kodieren (Gräfen, 2001). Da diese Region Gene trägt, die vermutlich für die Pathogenität relevant sind, sollte ein Cosmid identifiziert werden, das eine größere chromosomale Region als das ~ 16 kb große Insert des Phagen enthält. Die Cosmide 7-72 und 7-82 wurden durch Kolonihybridisierung mit einer *pelA*-Sonde (1,5 kb *Bam*HI-Fragment des Plasmids pIG1,5) identifiziert. Die Cosmide 7-72 und 7-82 weisen ein unterschiedliches Spaltungsmuster im Agarosegel auf, liegen aber in der gleichen chromosomalen Region (Abb. 4.1, Seite 63). Da der verwendete Cosmidvektor SuperCos1 eine singuläre *Bam*HI-Schnittstelle besitzt, wird der Vektor bei *Bam*HI-Spaltung linearisiert. Nach *Pst*I-Spaltung des Cosmidvektors werden vier Fragmente von einer Größe von 884 bp, 923 bp, 2357 bp und 3775 bp erhalten. In der mcs des Cosmidvektors gibt es keine *Pst*I-Schnittstelle. Da die 3775 bp große *Pst*I-Bande des Cosmidvektors bei den *Pst*I-gespaltenen Cosmiden 7-72 und 7-82 je-

doch nicht vorhanden ist, wird dieses Fragment auch Insert-DNA besitzen, die nicht durch die *PstI*-Spaltung vom Cosmidvektor getrennt werden konnte (Abb. 4.1).

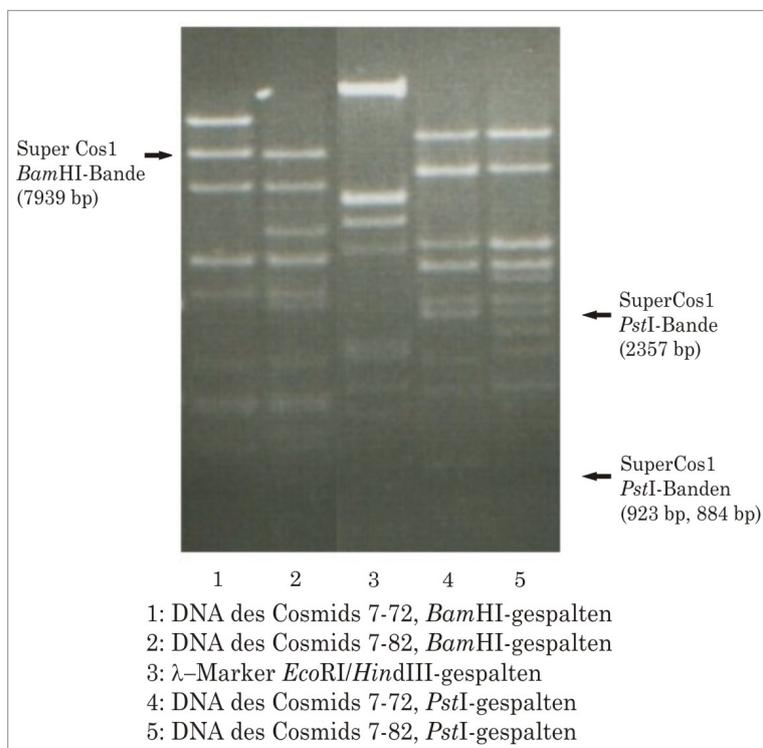


Abbildung 4.1: Hydrolyse der Cosmid-DNA 7-72 und 7-82 mit *Bam*HI und *Pst*I

Die *Pst*I-Fragmente von 7-72 wurden in pUC13 kloniert und die erhaltenen Klone ansequenziert. Die Sequenzauswertung zeigte bei dem Plasmid 7-72-9, das ein 6,3 kb großes *Pst*I-Fragment enthält, einen ORF, dessen Genprodukt Homologie zu Pat-1 hat. Es wurde als weiteres Pat-1 Homolog, ChpC, identifiziert. Das *chpC*-Gen ist allerdings nur unvollständig auf dem Plasmid 7-72-9 enthalten, der 5'-Bereich des Gens fehlt und konnte auf keinem weiteren Subklon des Cosmids 7-72 identifiziert werden.

Ein weiteres Pat-1 Homolog war bereits bei Sequenzanalysen der Transposonmutante CMM101 β 370-45 identifiziert worden. Hierbei handelt es sich um ChpE, das den Namen ChpB trug (Kirchner, 2003). Vier weitere Pat-1 Homologe, ChpB, ChpD, ChpF und ChpG, wurden nach Analysen der Sequenzdaten des Genom-Projekts des Wildtyps *Cmm* NCPPB382 gefunden. Die insgesamt sechs *chp*-Gene, *chpB*-*chpG*, liegen benachbart zu *chpA* innerhalb der *chp*-Region. Mehr als diese *chp*-Gene wurden im Genom von *Clavi-*

bacter michiganensis subsp. *michiganensis* nicht gefunden. Die Gene *chpB* und *chpD* sind wie *chpA* Pseudogene, da die DNA-Sequenz Leserasterschübe und Stoppkodons aufweist. Die im 3'-Bereich von *pat-1* identifizierten Repetitionen konnten bei keinem der *chp*-Gene identifiziert werden.

Revision der *pat-1* Sequenz

Im Rahmen der Charakterisierung der Isolate von *Cmm* (Seite 71) wurde das 3,75 kb, *pat-1* tragende, *Bgl*III-Fragment der Gesamt-DNA des Stammes *Cmm* NCPPB382 mittels Shotgun-Klonierung in *Bam*HI-gespaltene pUC13 Vektor kloniert und erneut sequenziert. Ein Vergleich zur vor 13 Jahren ermittelten DNA-Sequenz (Dreier, 1992) zeigte Unterschiede im Bereich des Histidinmotivs und der Repeat-Region (Abb. 4.2, Seite 65).

Mit synthetisierten Primern, die an Positionen der DNA gelegt wurden, die den ORF, die Poly-G-Region und die Repeats in beide Richtungen abdecken, wurde das Gen inklusive der Repeats komplett neu sequenziert und anschließend mit der vor 13 Jahren erstellten Sequenz (Dreier, 1992) verglichen. Die Sequenzen zeigten, dass das zuvor nicht erkannte Histidinmotiv in *Pat-1* doch vorhanden ist. Darauf hin wurden die alten Sequenzgele überprüft und es zeigte sich, dass vor 13 Jahren das Histidinmotiv durch einen Lesefehler übersehen wurde (Dreier, 1992) und sich somit die alte *Pat-1* Sequenz zu der neuen *Pat-1* Sequenz um 14 Aminosäuren unterscheidet. Somit kann aufgrund der katalytischen Triade *Pat-1* eindeutig den Serinproteasen der Trypsinfamilie zugeordnet werden. Im 3'-Bereich von *pat-1* liegen eine Poly-G-Region und Repetitionen. Die Anzahl der Guanosin-Reste der Poly-G-Region in der alten *pat-1* Sequenz betrug 14 und in der heutigen sind es 15.

3'-Bereich von <i>pat-1</i>	<i>Cmm</i> NCPPB382-alt	<i>Cmm</i> NCPPB382-neu
Poly-G	14	15
Repeat TTGCTCGG	3	3
Repeat TTGCCGG	12	8
Repeat GTGCCCGG	2	2
Repeat ACACGGGC	2	0

Tabelle 4.1: Veränderungen im 3'-Bereich von *pat-1* bei *Cmm* NCPPB382

Dreier (1995) postuliert eine Repetitionenanzahl von 19, jedoch sind in der jetzt vorliegenden Sequenz nur noch 13 Repeats vorhanden. Die Unterschiede der alten und neuen Sequenz sind in Tab. 4.1 (Seite 64) und in Abb. 4.2 (Seite 65) dargestellt. Diese Veränderungen der *pat-1* Sequenz können im Laufe der letzten 13 Jahren durch Fehler bei der Replikation oder Rekombinationen entstanden sein. Die Sequenzveränderungen haben allerdings keinen messbaren Einfluss auf die Pathogenität des Wildtypstamms *Cmm* NCPPB382. Eine Deletion aller Repetitionen führte jedoch zu einer Verzögerung bei der Ausbildung von Krankheitssymptomen (Dreier, 1995). Die mRNA wird offenbar instabil, da keine stem-loop-Strukturen mehr ausgebildet werden können. Der Repeat **ACACGGGC** konnte in der neuen Sequenz nur einmal identifiziert werden, da der zweite Adenin-Rest (fett) in der neuen Sequenz gegen einen Guanosin-Rest ausgetauscht ist. Diesen Repeat gibt es folglich in der aktuellen *pat-1* Sequenz nicht. Hier und beim Sequenzunterschied stromabwärts des Histidinmotivs liegt ebenfalls ein Lesefehler in der alten Sequenz vor. Der „inverted repeat“ stromabwärts der Repeat-Region fungiert als Transkriptionsterminator (Dreier, 1995).

Vergleich der Pat-1 Homologen Gene

Aufgrund der Sequenzanalysen des Subklons 7-72-9 des Cosmids 7-72, der Transposonmutante CMM101/370-45 und der Sequenzen des Genomprojektes sind zusätzlich zu *chpA* die chromosomalen Pat-1 Homologen *chpB*-*chpG* identifiziert worden. Die Gene *chpA*-*chpG* sind in einer ~ 80 kb großen chromosomalen Region lokalisiert (Abb. 4.3).

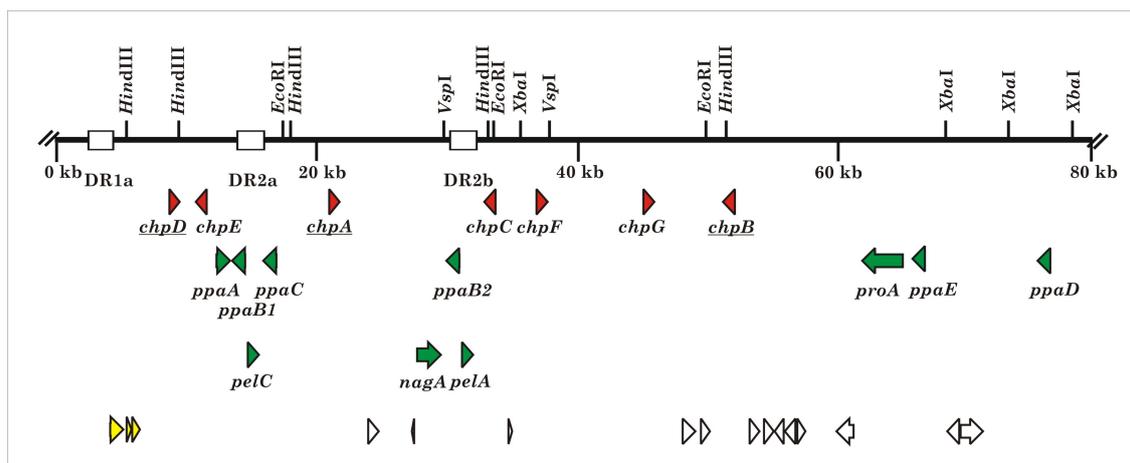


Abbildung 4.3: Physikalische Karte der *chp*-Genregion. unterstrichen: Pseudogene, erste Reihe (rot): putative Serinproteasen, zweite Reihe (grün): weitere Serinproteasen, dritte Reihe (grün): extrazelluläre Enzyme, vierte Reihe (gelb): Regulatoren und (weiß): sonstige ORFs, DR: „direct repeat“

Für das multiple Alignment (Abb. 4.4, Seite 68) der Pat-1 Proteinfamilie wurde ein „X“ an die passenden Positionen im Leseraster eingefügt, damit die offenen Leseraster der Pseudogene *chpA*, *chpB* und *chpD* wieder hergestellt werden konnten. Außerdem wurde für Pat-1 die neue Proteinsequenz verwendet. Alle Pat-1 Homologen besitzen zwei charakteristische Motive für Serinproteasen des Trypsin-Typs (PROSITE, PDOC00124: [LIVM][ST]A[STAG]HC und [(DNSTAGC)[GSTAPIMVQH]_x(2)G[DE]SG[GS][SAPHV][LIVMFYWH][LIVMFYSTANQH]). Das Histidin und Serin, die hervorgehoben sind, sind an der Katalyse beteiligt. Das Aspartat der katalytischen Triade ist ebenfalls in allen Pat-1 Homologen konserviert. Außerdem sind sechs Cysteine konserviert, außer bei ChpC, wo nur vier Cysteine konserviert sind. In Analysen mit dem Programm SignalP konnten für die Mitglieder der Pat-1 Proteinfamilie eine putative Prozessierungsstelle ermittelt werden, die auf eine Aus-

schleusung der Proteine hindeutet. Kennzeichnend für sekretierte Proteine ist die Ausschleusung als unreifes Präprotein aus der Zelle, wobei eine N-terminale Region als Signalpeptid an der Membran verankert bleibt, während das reife Protein an einer Spaltstelle durch Signalpeptidasen abgespalten wird. Diese Spaltung erfolgt vorzugsweise hinter Alanin (in Prokaryoten fast ausschließlich), Glycin oder Serin (Ray et al., 1986). Die Proteine der Pat-1 Proteinfamilie bestehen aus 263 bis 288 Aminosäuren mit Molekulargewichten zwischen 27,5 kDa und 36,7 kDa. Der GC-Gehalt der Gene der Pat-1 Proteinfamilie ist wesentlich geringer als der durchschnittliche des *Cmm*-Chromosoms ($\sim 73\%$) (Engemann, 2001) und liegt zwischen 51,9% und 65,5% (Tabelle 4.2). Aus dem GC-Gehalt ergibt sich, dass die *chp*-Gene eine abweichende Kodon-Usage haben.

	Pat-1	PhpA	PhpB	ChpA*	ChpB*	ChpC	ChpD*	ChpE	ChpF	ChpG
Anzahl der AS	280	277	284	266	288	286	261	277	284	277
identische AS [%] \diamond	—	78	51	79	39	32	37	36	34	33
ähnliche AS [%] \diamond	—	85	66	84	51	45	48	48	50	52
Molekulargewicht [kDa]	29,7	29,6	29,6	—	—	31,4	—	35,8	30,3	29,0
GC-Gehalt [%]	57,1	56,8	58,8	57,9	56,7	51,9	55,6	61,4	59,3	65,5
Repetitionen am 3'-Ende	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabelle 4.2: Sequenzeigenschaften der Pat-1 Proteinfamilie. \diamond : identische und ähnliche Aminosäuren bezogen auf Pat-1, AS: Aminosäuren, *: Pseudogene, —: kein Molekulargewicht zu ermitteln, da es Pseudogene sind, +: Repetitionen vorhanden, —: keine ähnlichen Repetitionen zu *pat-1* vorhanden

Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde von zufällig ansequenzierten Klonen des *Cmm*-Genoms eine Kodon-Tabelle berechnet und erstellt, in der Kodons aufgelistet sind, die bei *Cmm* NCPPB382 selten verwendet werden. Die Kodongesamtzahl des „Genom“, die für die Berechnungen verwendet worden sind, beträgt 12986 Kodons (Engemann, 2001).

Kodon	AS	„Genom“	Pat-1	PhpA	PhpB	ChpA*	ChpB*	ChpC	ChpD*	ChpE	ChpF	ChpG
UUU	Phe	2	1	4	1	2	3	5	2	2	2	0
UUA	Leu	0	1	1	2	1	0	1	0	0	1	0
CUU	Leu	4	3	2	6	0	5	2	3	2	5	2
AUU	Ile	4	5	5	6	6	5	3	2	0	5	1
AUA	Ile	1	8	2	6	7	5	3	4	2	1	1
ACU	Thr	5	4	6	2	4	5	5	8	1	1	0
UAU	Tyr	5	5	5	3	3	2	3	2	2	6	2
CAA	Gln	4	6	2	3	4	0	4	3	2	7	1
AAA	Lys	5	2	1	2	1	1	3	2	5	0	0
GAA	Glu	20	2	9	4	5	3	3	2	3	3	1
UGU	Cys	0	4	5	1	3	1	2	1	0	3	0
AGU	Ser	5	4	4	1	5	4	3	6	2	3	0
Anzahl der Ko- dons		55	45	49	37	41	34	37	35	21	37	8
GC- Gehalt in %		72,8	57,1	57,0	58,8	57,5	56,6	51,7	55,7	61,4	59,3	64,9

Tabelle 4.3: Seltene Kodons bei *pat-1* und den Homologen. *: Pseudogene, „Genom“ : 12986 Kodons (Engemann, 2001)

Kodons, die bei *Cmm* sehr selten verwendet werden, treten in *pat-1* und *chpA* gehäuft auf (Burger et al., 2005). Dies gilt auch für alle weiteren Mitglieder der Pat-1 Homologen (Tab. 4.3). Aufgrund der Anzahl seltener Kodons kann auf eine schlechte Expression geschlossen werden, da nicht genügend passende mRNAs von *Cmm* zu Verfügung gestellt werden können oder diese schlecht binden. Es besteht die Möglichkeit, dass diese Gene durch horizontalen Gentransfer erworben worden sind, da der GC-Gehalt wesentlich niedriger ist als im übrigen Genom von *Cmm* NCPPB382. Dies ist eins der Merkmale, die eine Pathogenitätsinsel auszeichnen können (Hacker et al., 1997).

Die genaue Funktion der putativen Serinproteasen ist noch unklar. Die bereits erwähnten Repetitionen im 3'-Bereich von *pat-1*, die die Stabilität der mRNA verbessern, sind bei kei-

nem weiteren Mitglied der Pat-1 Proteinfamilie identifiziert worden. In der Proteinsequenz von Pat-1 und ChpA (Pseudogen) befindet sich nahe des C-Terminus das Motiv LPGSG (Abb. 4.4, Seite 68), das ein potentiell Sortase-Motiv darstellt. *Staphylococcus aureus* hat das Sortase-Motiv LPXTG, das für die Verankerung extrazellulärer Proteine in der bakteriellen Zellwand durch die Sortase A notwendig ist (Mazmanian et al., 2001). Somit besteht die Möglichkeit, dass die Pathogenitätsdeterminante Pat-1 an der Zelloberfläche verankert ist, wohingegen die anderen Pat-1 Homologen frei im Sekretom vorliegen. Diese Vermutung konnte aber bisher noch nicht bestätigt werden.

4.2 Charakterisierung von *Cmm*-Stämmen mit abweichendem Pathogenitäts-Phänotyp

Cmm-Stämme, die über die Pathogenitätsfaktoren *pat-1* und *celA* verfügen, sind in der Regel auch in der Lage bei der Tomate *Solanum lycopersicum* die Welkekrankheit zu erzeugen. Es scheint allerdings auch vorzukommen, dass solche Stämme avirulent sind. Entsprechende Isolate erhielten wir aus einer Kooperation mit Gruppen aus Israel im Rahmen des trilateralen Projektes „The Molecular Basis for Pathogenicity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* and *E. herbicola* pv. *betae*“ und von der Firma Syngenta aus den Niederlanden.

Bei der Southern Hybridisierung von *Bgl*III-gespaltener Gesamt-DNA der Isolate aus Israel und den Niederlanden mit der *pat-1*-Sonde wurde ein sich vom Wildtyp *Cmm* NCPPB382 unterscheidendes Bandenmuster festgestellt. Es fehlen den Stämmen I-62, ZUM3036 und ZUM3121 *phpA*, *phpB* und *chpA* und dem Stamm I-63 fehlt *chpA*, jedoch besitzen alle die Pathogenitätsdeterminante *pat-1*. Mit den gleichen Stämmen wurde auch eine Southern Hybridisierung mit der zweiten Pathogenitätsdeterminante *celA* durchgeführt. Bei allen Isolaten konnte *celA* identifiziert werden (Zellermann, persönliche Mitteilung). In der Tabelle 4.4 (Seite 72) sind die Ergebnisse der Southern Hybridisierungen mit den Sonden der bekannten Virulenzgene (*pat-1*, *celA*) für die untersuchten Isolate und die in den Vorversuchen ermittelte Virulenz der Isolate dargestellt. Anhand der Hybridisierungen der gespaltenen Gesamt-DNA kann die Lokalisation der Pathogenitätsdeterminanten nicht bestimmt werden. Diese können wie beim Wildtypstamm *Cmm* NCPPB382 plasmidkodiert sein oder chromosomal kodiert vorliegen. Es lässt sich auch nicht entscheiden, ob eine

Clusterung der *chp*-Gene wie beim Wildtyp *Cmm* NCPPB382 vorliegt.

In einem 28-tägigen Pflanzentest mit der Wirtspflanze *Solanum lycopersicum* wurden die Stämme I-62, I-63, ZUM3036 und ZUM3121 auf ihr Pathogenitätsverhalten und die Kolonisationsfähigkeit untersucht. Im Verlauf des Pflanzentests wurden je 64 infizierte Pflanzen täglich auf Welkesymptome überprüft und nach einem vierstufigen Schema bonitiert.

Stamm	<i>pat-1</i>	<i>phpA/B</i>	<i>chpA</i>	<i>celA</i>	Virulenz
<i>Cmm</i> NCPPB382	+	+	+	+	+
CMM101	—	—	+	+	+
I-62	+	—	—	+	—
I-63	+	+	—	+	—
ZUM3036	+	—	—	+	—
ZUM3121	+	—	—	+	—

Tabelle 4.4: Vorhandensein von *pat-1*, *phpA/B*, *chpA* und *celA* bei *Bgl*II-gespaltener Gesamt-DNA und Virulenz der Isolate +: *Cmm* NCPPB382 entsprechende Hybridisierungsbande, —: keine Hybridisierungsbande vorhanden

Pflanzen mit einer sich leicht einkrümmenden Blattspitze werden mit „(+)\", eindeutige Welkesymptome (mindestens ein deutlich welkes Blatt) mit „+“ gekennzeichnet. Sehr starke Welke, bei der mehr als 2/3 der Blätter einer Pflanze welken, wird mit „++“ bewertet. Als „tot“ wird eine Pflanze bezeichnet, bei der alle Blätter so stark welken, dass keine Photosynthese mehr möglich sein sollte. Diese Bestimmung des Welkeverlaufs gibt Aufschluss über den genauen Welkestatus aller Testpflanzen. Viele der Pflanzen zeigten nur Welkesymptome, andere wiederum sowohl Welkesymptome als auch Sprossläsionen, während einzelne Pflanzen symptomfrei blieben. Außerdem wurde der Welkeindex (der Tag, an dem 50% der infizierten Pflanzen Welkesymptome aufweisen (Berpohl, 1990)) des jeweiligen Stamms ermittelt. Die Welkeverläufe der untersuchten *Cmm*-Stämme sind in Abbildung 4.5 (Seite 73) dargestellt.

Die Kontrollstämme *Cmm* NCPPB382 und die Curing-Derivate CMM101 und CMM100 zeigten in diesem Pflanzentest das für sie charakteristische Verhalten. Der Welkeindex wurde für den Stamm *Cmm* NCPPB382 nach 12-13 Tagen und für den Stamm CMM101 nach 15-16 Tagen erreicht (Tab. 4.5, Seite 74). Für CMM100 konnte kein Welkeindex ermittelt werden, da dieser als Endophyt in der Pflanze lebt und keine Krankheitssymptome erzeugt

(Meletzus et al., 1993). Für die Stämme I-62, I-63, ZUM3036 und ZUM3121 konnte ebenfalls kein Welkeindex ermittelt werden, da diese Stämme keine Welke bei der Tomatenpflanze verursachen. Diese Stämme sind avirulent, obwohl die essentiellen Pathogenitätsdeterminanten *pat-1* und *celA* vorhanden sind.

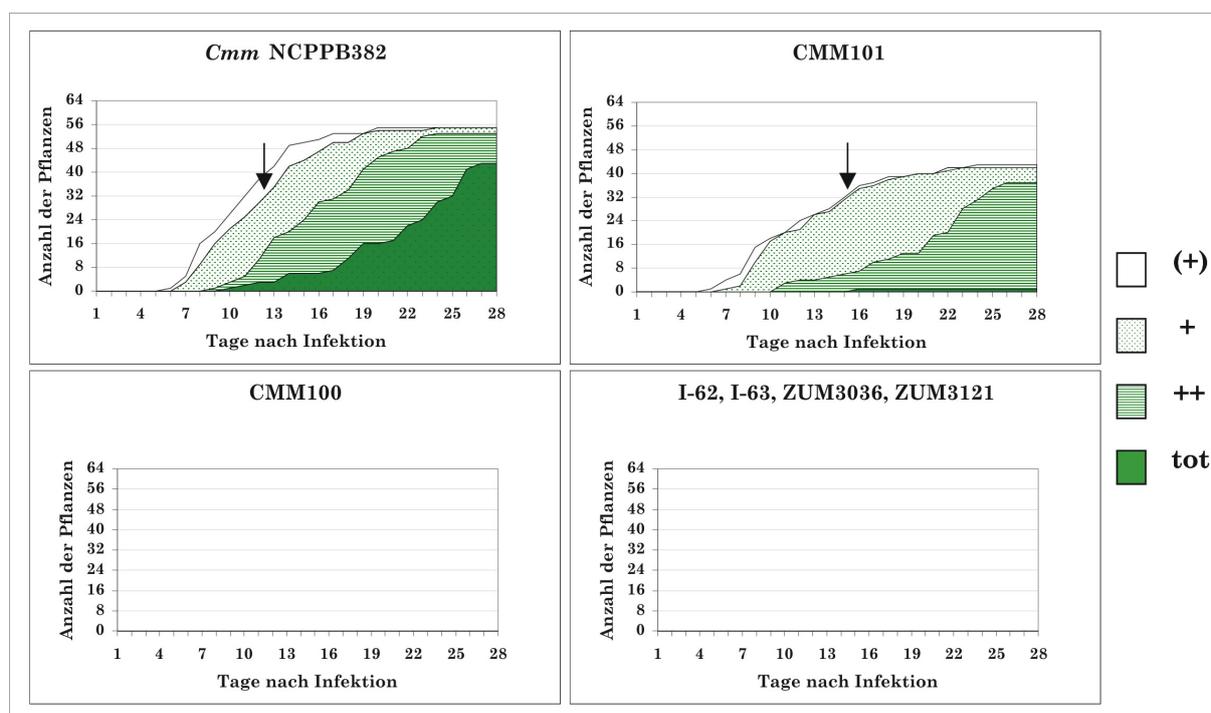


Abbildung 4.5: Welkeverlaufdiagramm der mit *Cmm*-Stämmen infizierten Tomatenpflanzen, der Pfeil markiert den Welkeindex

Am 28. Tag wurde bei allen Pflanzen der Spross direkt über der Erde abgeschnitten und die Größe und das Gewicht gemessen. Einzelne Pflanzen wurden homogenisiert und der Bakterientiter bestimmt. Die Bakterientiter der avirulenten Stämme liegen zwischen $1,7 \times 10^6$ und $3,5 \times 10^7$ cfu/g Pflanze. Die Kolonisationsfähigkeit der Stämme ist offenbar eingeschränkt. Die Pflanzen, die mit den avirulenten Stämmen infiziert wurden, sind wesentlich größer und schwerer als die mit den Kontrollstämmen infizierten (Tab.4.5, Seite 74). Die geringere Biomassenreduzierung der infizierten Pflanzen ist ebenfalls ein Merkmal der Curing-Derivate.

Stamm	Titer (cfu/g Pflanze)	Größe (cm)	Gewicht (g)
<i>Cmm</i> NCPPB382	$7,4 \times 10^9 \pm 7,3 \times 10^9$ (n=10)	7,4 \pm 4,0	0,9 \pm 1,2
CMM101	$9,9 \times 10^9 \pm 4,1 \times 10^9$ (n=10)	10,4 \pm 3,0	1,8 \pm 1,0
I-62	$3,5 \times 10^7 \pm 4,4 \times 10^7$ (n=10)	32,2 \pm9,5	6,7 \pm2,3
I-63	$2,4 \times 10^6 \pm 7,6 \times 10^6$ (n=6)	34,6 \pm11,8	7,6 \pm3,3
ZUM3036	$4,2 \times 10^6 \pm 8,0 \times 10^6$ (n=5)	24,6 \pm9,0	4,5 \pm1,7
ZUM3121	$1,7 \times 10^6 \pm 4,8 \times 10^6$ (n=3)	26,5 \pm5,6	7,1 \pm1,2

Tabelle 4.5: Bakterientiter, Größe und Gewichte der mit *Cmm*-Isolaten infizierten Tomatenpflanzen, fett hervorgehoben: avirulente Stämme, n: Anzahl der Pflanzen, die in die Berechnung eingegangen sind

Da die avirulenten Stämme I-62, I-63, ZUM3036 und ZUM3121 in ihrer Kolonisationsfähigkeit eingeschränkt sind, könnten bei diesen Stämmen Gene, die für die Pathogenität bzw. Kolonisation notwendig sind, mutiert sein oder fehlen.

Sequenzanalyse der Pathogenitätsdeterminante *pat-1* verschiedener *Cmm*-Stämme

Da bei den avirulenten Stämmen I-62, I-63, ZUM3036 und ZUM3121 die essentielle Pathogenitätsdeterminante *pat-1* nachgewiesen werden konnte, und bei den Hybridisierungen mit der *pat-1*-Sonde ein *Cmm* NCPPB382 vergleichbares $\sim 3,75$ kb großes *Bgl*II-Fragment auftrat, könnten Mutationen (Deletion, Punktmutation, Insertion) im offenen Leserahmen von *pat-1* erfolgt sein und deshalb kein aktives oder nur ein verkürztes oder verändertes Protein exprimiert werden. Es wurde von den Stämmen I-62, I-63, ZUM3036, ZUM3121 und dem aktuellen Wildtypstamm *Cmm* NCPPB382 das 3,75 kb *Bgl*II-Fragment, welches *pat-1* trägt, in den *Bam*HI-gespaltenen pUC13-Vektor ligiert. Da jedoch die Lokalisation des Fragments unklar war (Plasmid oder Chromosom), wurden Klonierungen mit Plasmid-DNA und Gesamt-DNA parallel durchgeführt. Beim Stamm I-63 und dem aktuellen Wildtyp *Cmm* NCPPB382 war die Ligation mit gespalteener Gesamt-DNA und für die Stämme I-62, ZUM3036, ZUM3121 mit gespalteener Plasmid-DNA erfolgreich. Bei dem Stamm I-63 wurde das Fragment aus dem Gel eluiert und für die Ligation eingesetzt. Die konstruierten

Plasmide pIG62, pIG63, pIG3036, pIG3121 und pIG382 wurden ansequenziert, um zu bestätigen, dass das *pat-1*-Gen dieser *Cmm*-Stämme kloniert wurde. Alle Plasmide enthielten die Pathogenitätsdeterminate *pat-1*. Um detaillierte Informationen über die Pathogenitätsdeterminate dieser *Cmm*-Stämme zu erhalten, wurde das gesamte Gen und der 3'-Bereich durch Primer-Walking sequenziert.

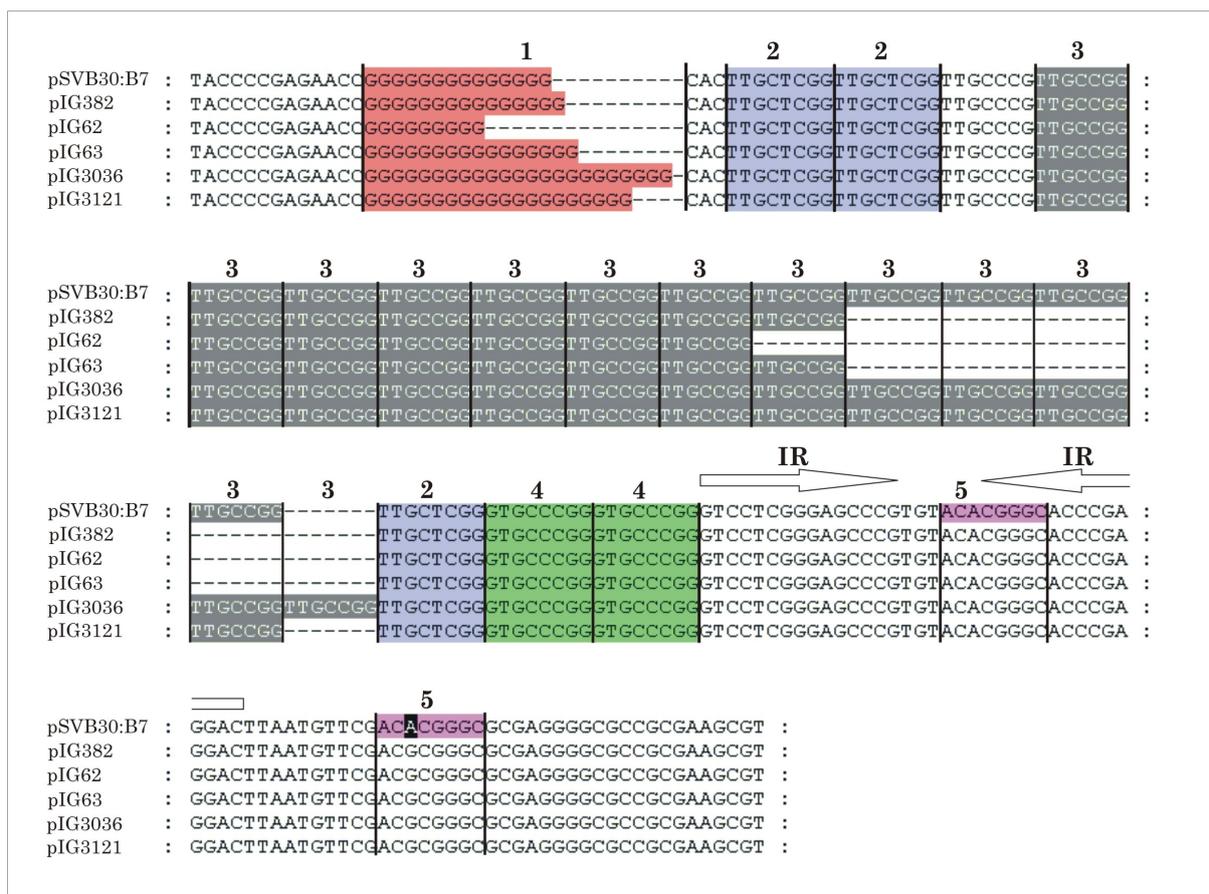


Abbildung 4.6: 3'-Bereich beginnend an Position 1366 der DNA-Sequenz des 3,75 kb *Bgl*II-Fragments der *pat-1*-Region von verschiedenen *Cmm*-Stämmen, schwarz gekennzeichnet: Unterschiede zu den anderen Sequenzen, Poly-G-Region: 1 (9-23 ×), Repeat TTGCTCGG: 2 (2 ×), Repeat TTGCCGG: 3 (7-13 ×), Repeat GTGCCCGG: 4 (2 ×), Repeat ACACGGGC: 5 (1-2 ×), IR: „inverted repeat“, pSVB30:B7: alte *pat-1* Sequenz, pIG382: neue *pat-1* Sequenz, die jeweiligen Zahlen hinter pIG stehen für das entsprechende Isolat

Der Vergleich der Sequenzdaten des *pat-1*-Gens der Stämme I-62, I-63, ZUM3036, ZUM3121 und des aktuellen Wildtypstamms *Cmm* NCPPB382 mit den vor 13 Jahren ermittelten Sequenzdaten zeigte, dass im Kodierbereich des Proteins keine Veränderung auf DNA- und Protein-Ebene festzustellen ist. Allerdings gibt es erhebliche Schwankungen in der Anzahl der Guanosin-Reste in der Poly-G-Region (9-23×) und der Anzahl des „direct repeats“ des Typs TTGCCGG (7-13 ×) stromabwärts von *pat-1* (Abb. 4.6, Seite 75). Der aktuelle Stamm *Cmm* NCPPB382 und I-63 besitzen die gleiche Anzahl des Repeats TTGCCGG (8) (Abb. 4.6: pIG382, pIG63 auf Seite 75), haben aber ein unterschiedliches Verhalten in ihrer Virulenz. Der Stamm *Cmm* NCPPB382 ist virulent, wohingegen der Stamm I-63 avirulent ist. Außerdem weicht die Anzahl der Guanosin-Reste der Poly-G-Region dieser Stämme um 1 ab. Selbst die Unterschiede in der Anzahl des Repeats TTGCCGG von 7-13 hat keinen Einfluss auf die Pathogenität, da der aktuelle Wildtypstamm, der nur 7 Repeats dieses Typs besitzt, virulent ist und der vor 13 Jahren analysierte Stamm, der 12 Repeats aufweist, auch virulent war.

Plasmid	Poly-G	Repeat	Repeat	Repeat
		TTGCTCGG	TTGCCGG	GTGCCCGG
pSVB30:B7	14	3	12	2
pIG382	15	3	8	2
pIG62	9	3	7	2
pIG63	16	3	8	2
pIG3036	23	3	13	2
pIG3121	20	3	12	2

Tabelle 4.6: Veränderungen im 3'-Bereich von *pat-1* verschiedener *Cmm*-Stämme, pSVB30:B7: *pat-1* alt, pIG382: *pat-1* neu, die jeweiligen Zahlen hinter pIG stehen für das entsprechende Isolat

Die Stämme ZUM3036 und ZUM3121 sind avirulent, weisen jedoch 13 bzw. 12 Repeats des Typs TTGCCGG auf (Abb. 4.6: pIG3036, pIG3121 auf Seite 75). Die Poly-G-Region dieser avirulenten Stämme weicht in der Anzahl der Guanosin-Reste von dem virulenten Wildtypstamm ab. Sie besitzen weniger bzw. mehr Guanosin-Reste als der Wildtypstamm auf. Somit ist die Anzahl der Repeats sowie die Anzahl der Guanosin-Reste nicht für die Virulenz bzw. Avirulenz der einzelnen Stämme verantwortlich.

Der „inverted repeat“, der beim *pat-1*-Gen des Wildtypstamms *Cmm* NCPPB382 als Transkriptionsterminator fungiert (Dreier, 1995), ist in allen Isolaten vorhanden.

Test auf Vorhandensein der *chp*-Gene bei den Isolaten

Da das chromosomale *chpA* bei keinem der avirulenten Stämme (I-62, I-63, ZUM3036, ZUM3121) durch die Kreuzhybridisierung mit der *pat-1*-Sonde nachgewiesen werden konnte, wird vermutet, dass die chromosomalen *pat-1* homologen Gene (*chpB*-*chpG*) eventuell auch eine Rolle in der Virulenz von *Cmm* NCPPB382 spielen. Bei den avirulenten Isolaten erfolgte die Identifizierung der *chp*-Gene mittels Southern Hybridisierung mit spezifischen Sonden für jedes einzelne Gen. Zur Herstellung der spezifischen Sonden wurden anhand der bereits vorhandenen Sequenzdaten und der im Rahmen des Genomprojekts ermittelten Sequenzen Primer für die Amplifikation des jeweiligen *chp*-Gens synthetisiert. Die Primer für die *chp*-Gene tragen die Bezeichnung *chpX*-1 und *chpX*-2 (X = A bis G). Die Primerbindestellen liegen jeweils innerhalb der einzelnen *chp*-Gene. Die optimale Annealingtemperatur für die einzelnen Primerpaare wurde mittels Gradienten-PCR (Temperaturgradient: 54-68°C in 2°C Intervallen) ermittelt. Zur Amplifikation der *chp*-Gene mittels PCR wurde Gesamt-DNA verwendet. Bei der optimalen Annealingtemperatur wiesen die erhaltenen Amplifikate, die aus den Sequenzdaten errechneten Fragmentgrößen auf und wurden direkt aufgereinigt oder, bei Auftreten von unerwünschten Nebenbanden, aus dem Agarosegel eluiert. Zum Nachweis, dass die Amplifikate korrekt synthetisiert worden waren, wurden sie sequenziert. Die PCR-Produkte wurden mit Digoxigenin markiert und als spezifische Sonden für die Southern Hybridisierung eingesetzt. Die Hydrolyse der Gesamt-DNA der Isolate erfolgte mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Pst*I, da diese theoretisch ermittelte Fragmentgrößen liefern, bei denen die spezifischen Sonden einen Vergleich der einzelnen Gene ermöglicht. Da die *chp*-Gene *chpA* bis *chpG* nur auf Proteinebene gute Übereinstimmungen besitzen, sollten bei den spezifischen *chp*-Sonden keine Kreuzhybridisierungen auftreten, was durch die Southern Hybridisierungen bestätigt wurde. Durch Hybridisierungen mit *Pst*I-hydrolysiertes Gesamt-DNA sollten bereits ermittelte Daten verifiziert und überprüft werden (Steingröver, 2003). Die Hybridisierung zeigte, dass den avirulenten Stämmen die Gene *chpA* bis *chpG* fehlen, außer beim Stamm I-63, der mit der *chpB*-Sonde (Pseudogen) ein Signal zeigte. Jedoch entsprach die Fragmentgröße mit der *chpB*-Sonde nicht der des Wildtyps *Cmm* NCPPB382.

Gene	<i>Cmm</i> NCPPB382	I-62	I-63	ZUM3036	ZUM3121
<i>pat-1</i>	+	+	+	+	+
<i>phpA/B</i>	+	—	+	—	—
<i>chpA</i>	+	—	—	—	—
<i>chpB</i>	+	—	(+)	—	—
<i>chpC</i>	+	—	—	—	—
<i>chpD</i>	+	—	—	—	—
<i>chpE</i>	+	—	—	—	—
<i>chpF</i>	+	—	—	—	—
<i>chpG</i>	+	—	—	—	—
<i>ppaA</i>	+	—	—	—	—
<i>ppaB1</i>	+	—	—	—	—
<i>ppaC</i>	+	—	—	—	—

Tabelle 4.7: Ergebnisse der Hybridisierungen *Bgl*II- bzw. *Pst*I-gespaltener Gesamt-DNA mit spezifischen Sonden der *chp*-Gene sowie der Gene *ppaA*, *ppaB1* und *ppaC*, außerdem der *pat-1*-Sonde, +: *Cmm* NCPPB382 entsprechende Hybridisierungsbande, (+): Hybridisierungsbande mit anderer Größe als beim Wildtyp, —: keine Hybridisierungsbande vorhanden

Die Stämme I-62, ZUM3036 und ZUM3121 zeigten mit der *chpA*-Sonde nur *pat-1* als Signal, beim Stamm I-63 konnten *pat-1* und *phpA/B* über Kreuzhybridisierung nachgewiesen werden (Tab. 4.7). Aus diesen Ergebnissen resultiert die Vermutung, dass ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein der *chp*-Gene bzw. der *chp*-Genregion und der Virulenz eines Stamms besteht.

In der *chp*-Genregion sind sechs ORFs lokalisiert (*ppaA*, *ppaB1*, *ppaB2*, *ppaC*, *ppaD*, *ppaE*), die ebenfalls für putative Serinproteasen, allerdings einer anderen Unterfamilie als die *chp*-Gene, kodieren. In den Transposonmutanten CMM101 β 324-50 und CMM101 β 370-45 liegen die Gene *ppaC* und *ppaA* inaktiviert vor und die Kolonisationsfähigkeit dieser Mutanten in Tomatenpflanzen ist eingeschränkt. Dahin gegen führte die gezielte Inaktivierung von *ppaB1* zu keiner Reduzierung der Kolonisationsfähigkeit, wahrscheinlich da dieses Gen im Chromosom dupliziert vorliegt (Schott, 2004). Um herauszufinden, ob in den Isolaten diese Gene vorhanden sind, wurden Hybridisierungen mit den Sonden *ppaA*, *ppaB1* und *ppaC*

durchgeführt. Als *ppaA*-Sonde wurde ein 1550 bp großes *Bam*HI-Fragment und als *ppaC*-Sonde ein 2,1 kb großes *Eco*RI/*Bam*HI-Fragment des Plasmids cmis3p0013f04, das zur Sequenzierung im Rahmen des Genomprojekts verwendet wurde, durch random priming mit Digoxigenin markiert (Abt, persönliche Mitteilung). Für die *ppaB1*-Sonde wurde ein 878 bp großes *Bam*HI/*Nru*I-Fragment des Plasmids pK19::13f04 mit Digoxigenin markiert (Schott, 2004).

Die Hybridisierungen *Bam*HI-gespaltener Gesamt-DNA zeigten, dass die avirulenten Stämme I-62, I-63, ZUM3036 und ZUM3121 keines der drei Gene besitzen, während in dem virulenten Wildtypstamm alle Gene (*ppaA*, *ppaB1* und *ppaC*) vorhanden sind (Tab. 4.7, Seite 78).

Da der Deletionsmutante CMM101 β 330-18 und den Stämmen I-62, ZUM3036, ZUM3121 die Gene *chpA*-*chpG* fehlen und bei I-63 nur ein *chpB*-Homolog nachgewiesen werden konnte, diese Stämme avirulent sind und zusätzlich die Tomatenpflanze nicht effektiv kolonisieren können, war es von Interesse, gezielte Mutanten der *chp*-Gene und weiterer Gene der *chp*-Genregion, die vermutlich eine Funktion bei der Pathogenität von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* übernehmen, im Wildtyp *Cmm* NCPPB382 zu erzeugen. Zu diesen Genen gehören *nagA*, das eine putative β -1,4-N-Acetylglukosaminidase kodiert, und *pelA* und *pelC*, die beide putative Pektat-Lyasen kodieren, die auf Protein-Ebene zu 95% und auf DNA-Ebene zu 90% identisch sind. Die putativen Pektat-Lyasen *pelA* und *pelC* tragen inzwischen die Bezeichnung *pelA1* und *pelA2* (aktuelle Annotation des Genoms von *Cmm*), werden in dieser Arbeit aber weiterhin als *pelA* und *pelC* bezeichnet. Die Konstruktion von Insertionsmutanten mittels „gene replacement“ und die anschließenden Pflanzentests sollen näheren Aufschluss über die Funktion dieser Gene in der Pathogenität liefern.

4.3 Erzeugung von Mutanten im Chromosom von *Cmm* durch Insertionsmutagenese

Um zu demonstrieren, ob eines der chromosomalen Gene *chpC*, *chpE*, *chpF*, *chpG*, *nagA*, *pelA* und *pelC* für die Kolonisation der Tomatenpflanze durch *Cmm* notwendig ist, wurden die Gene durch gezielte Mutagenese inaktiviert, entsprechende Mutanten konstruiert und der daraus resultierende Phänotyp analysiert.

Für die Gene *chpC*, *chpE*, *chpF* und *chpG* wurden zur Sequenzierung im Rahmen des Genomprojekts verwendete Plasmide benutzt. Zur Mutagenese von *nagA* wurde das Plasmid pIGN, für *pelA* das Plasmid pIGPA und bei *pelC* das Plasmid pIGPC verwendet (siehe Material und Methoden).

Die Mutagenese erfolgte bei allen Mutanten nach demselben Prinzip. Zur Inaktivierung wurden die Plasmide, die in *Cmm* nicht replizieren können, entweder mit Restriktionsendonukleasen hydrolysiert, die singuläre Schnittstellen erzeugten, in die eine Antibiotika-Resistenzkassette inseriert wurde, oder es wurden Fragmente, die einen Teil des nativen Gens enthielten, gegen die Antibiotika-Resistenzkassette ausgetauscht. Die auf diese Weise erhaltenen Mutageneseplasmide tragen kein intaktes Gen mehr und wurden zur Inaktivierung des jeweiligen chromosomalen Wildtypgens verwendet. Da aus früheren Arbeiten bekannt war, dass die Stabilität von artfremder, aus *E. coli* stammender DNA in *Cmm* in unmethylierter Form größer ist, wurden die in *E. coli* JM109 (*dam*⁺, *dcm*⁺) vorliegenden Mutageneseplasmide in den *E. coli* Stamm GM119 (*dam*⁻, *dcm*⁻) transformiert (Kaup, 2002; Dickhut, 2003). Für die Elektroporation in kompetente Zellen von *Cmm* NCPPB382 wurde unmethylierte und denaturierte Plasmid-DNA verwendet (Kaup, 2002; Dickhut, 2003). Sowohl der pSMART-Vektor als auch die pUC- bzw. pK-Vektoren sind in *Cmm* „Suicide“-Plasmide, die nicht replizieren und somit auch nicht auf die nächste Generation übertragen werden können. Nach der Elektroporation der DNA in kompetente *Cmm* NCPPB382 Zellen erfolgte eine Selektion auf die Chloramphenicol- (Cm^R) bzw. die Spectinomycin-Resistenz (Spc^R). Der korrekte Austausch des Wildtypgens gegen das inaktivierte Gen durch ein Doppelcrossover (‘gene replacement’) wurde durch Southern Hybridisierung von gespaltener Gesamt-DNA der Antibiotika-resistenten Kolonien überprüft. Die genetische Überprüfung der Mutanten ist unerlässlich, da die Cm^R bzw. Spc^R auch durch Integration des gesamten Plasmids oder eines Teils davon über Singlecrossover ins Chromosom entstehen kann. In diesen Fällen liegt das inaktivierte, vom Plasmid stammende Gen neben dem intakten Wildtypgen vor. Eine weitere Möglichkeit für das Auftreten von Cm^R bzw. Spc^R -Kolonien ist die illegitime Rekombination, die im Gegensatz zu homologer Rekombination auf einem nicht-ortsspezifischen Crossover-Ereignis basiert. Die Verwendung alkalisch denaturierter Mutageneseplasmid-DNA steigert die Wahrscheinlichkeit eines Doppelcrossovers, da einzelsträngige DNA die DNA-Reparatursysteme stimuliert und somit die homologe Rekombination fördert (Dickhut, 2003; Kaup, 2002). Die Cm^R - bzw. Spc^R -Klone, bei denen durch Singlecrossover das gesamte Plasmid integriert vorlag,

wurden durch Hybridisierung mit einer pUC18-Sonde identifiziert. Alle Kolonien, die bei der Hybridisierung gegen pUC18 kein Signal zeigen, können potentiell korrekte Mutanten sein. Für die Identifizierung einer korrekten Mutante wird ein Doppelcrossover von anderen Crossover-Ereignissen unterschieden, indem eine spezifische Sonde des jeweiligen Gens für die Hybridisierung verwendet wurde. Dafür wird die Gesamt-DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen hydrolysiert, die sowohl für die Mutante als auch für den Wildtyp ein spezifisches Bandenmuster erzeugen. Bei einem Singlecrossover treten zusätzlich zu den Banden des ortsspezifischen Doppelcrossover noch die dem Wildtyp entsprechenden Banden auf. Bei der illegitimen Rekombination geben neben den Wildtypbanden noch weitere Banden ein Hybridisierungssignal, die aufgrund der unterschiedlichen Plasmidintegrationsstellen eine beliebige Größe besitzen können. Die spezifischen Sonden wurden mittels Random-Priming hergestellt. Als Template dienten PCR-Produkte bzw. Fragmente gespaltenen Plasmid-DNA, die aus dem Gel eluiert wurden.

Kompetente Zellen des Wildtypstamms *Cmm* NCPPB382 besitzen die beiden endogenen Plasmide pCM1 und pCM2, die für die Pathogenität relevant sind. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass bei der Elektroporation die Plasmide, einzeln oder gemeinsam, verloren gehen können. Der Verlust des größeren Plasmids pCM2 ist jedoch wahrscheinlicher. Zum Nachweis der Pathogenitätsdeterminanten wurde zum einen eine PCR mit einem Primermix aus den beiden *celA*- und *pat-1*-Primern und zum anderen eine Southern Hybridisierung durchgeführt. Für *celA* wurde ein PCR-Produkt von 502 bp und für *pat-1* ein PCR-Produkt von 618 bp erwartet. Bei der Southern Hybridisierung mit *Bgl*II-gespaltener Gesamt-DNA wurde das 3,75 kb *Eco*RI/*Hind*III-Fragment aus pSVB30:B7 als spezifische *pat-1*-Sonde und das 3,2 kb *Eco*RI/*Hind*III-Fragment aus pSVB30:B1 als spezifische *celA*-Sonde verwendet. Alle Mutanten wurden auf das Vorhandensein von *celA* und *pat-1* überprüft. Als positive Kontrollen wurden der Wildtypstamm *Cmm* NCPPB382 und das Curing-Derivat CMM101 verwendet. Sobald pCM2 bei einer Mutante verloren gegangen ist, muss diese bei der phänotypischen Analyse mittels Pflanzentests mit dem Curing-Derivat CMM101 als Kontrollstamm verglichen werden.

Konstruktion von Mutageneseplasmiden der Gene *chpC*, *chpE*, *chpF*, *chpG*, *nagA*, *pelA* und *pelC* für 'gene replacement'

Zur Inaktivierung des *chpC*-Gens wurde das Plasmid cmis2p0456d03 (Karte, siehe Anhang), das ein 2,5 kb geschertes Fragment aus dem Genom von *Cmm* NCPPB382 enthält und auf dem das *chpC*-Gen nativ vorliegt, verwendet. Das 2,5 kb große Fragment trägt eine singuläre *MscI*-Schnittstelle innerhalb des offenen Leserahmens von *chpC*, die zur Inaktivierung genutzt werden konnte. Zur Inaktivierung wurde aus dem Plasmid pEC70 (Tauch et al., 1998) (Karte, siehe Anhang) das 1,9 kb große *BsaAI*-Fragment mit der Chloramphenicol-Resistenz (*cmx*, Chloramphenicolexporter) verwendet. Das mit der Restriktionsendonuklease *MscI* hydrolysierte Plasmid cmis2p0456d03 wurde mit dem 1,9 kb *BsaAI*-Fragment ligiert. Die auf diese Weise erhaltenen Mutageneseplasmide pIGC α und pIGC β enthielten das Chloramphenicol-Resistenzgen in gleicher (α) oder in entgegengesetzter Orientierung (β) wie das Zielgen (Karte, siehe Anhang). Diese Mutageneseplasmide trugen kein intaktes *chpC*-Gen mehr und konnten zur Erzeugung von *chpC*-Mutanten eingesetzt werden.

Für die Konstruktion der *chpE*-Mutante wurde das Plasmid cmis2p0163a01, das ein 2,5 kb geschertes natives Insert aus dem *Cmm* NCPPB382 Genom trägt, verwendet (Karte, siehe Anhang). Die Plasmid-DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease *SphI* hydrolysiert. Aus dem Vektor pEC70 wurde mittels PCR mit den Primern cmx-SphI-a und cmx-SphI-b ein 1,9 kb großes PCR-Amplifikat erzeugt, das an den Produktenden *SphI*-Schnittstellen besitzt. Dieses 1,9 kb große *SphI*-hydrolysierte Fragment wurde mit dem *SphI*-gespaltenen Plasmid cmis2p0163a01 ligiert. Die erhaltenen Mutageneseplasmide pIGE α und pIGE β (Karte, siehe Anhang) enthalten die Chloramphenicolresistenz-Kassette in gleicher (α) oder entgegengesetzter (β) Richtung und wurden zur Inaktivierung des *chpE*-Gens verwendet.

Das Plasmid cmis2p0407d03, das ein 2,8 kb geschertes Fragment des *Cmm*-Genoms enthält, wurde für die Inaktivierung des *chpF*-Gens verwendet (Karte, siehe Anhang). Das Plasmid enthält zwei *PmlI*-Schnittstellen innerhalb des *chpF*-Gens. Das 435 bp große *PmlI*-Fragment, das das 5'-Ende von *chpF* enthält, wurde gegen das 1,9 kb große *BsaAI*-Fragment des pEC70, das das *cmx*-Gen trägt, ausgetauscht. Auf diesem Wege entstanden die Mutageneseplasmide pIGF α und pIGF β (Karte, siehe Anhang), die die *cmx*-Kassette in gleicher (α) oder entgegengesetzter Richtung (β) wie das Zielgen enthalten.

Die *chpG*-Mutante wurde mit Hilfe des Plasmids cmis2p0456h08, das ein geschertes chro-

mosomales 2,3 kb großes Fragment von *Cmm* enthält, erzeugt (Karte, siehe Anhang). Das Plasmid enthält zwei *Eco47III*-Schnittstellen. Das 640 bp große *Eco47III*-Fragment beinhaltet die Promotorregion und den Anfang des offenen Leserahmens von *chpG*. Der Austausch des 640 bp großen *Eco47III*-Fragments erfolgte gegen die 1,9 kb große *BsaAI-cmx*-Kassette aus pEC70. Das auf diesem Wege konstruierte Mutageneseplasmid pIGG β (Karte, siehe Anhang) enthielt den Chloramphenicolexporter in entgegengesetzter Richtung.

Das Plasmid pIGN (Gräfen, 2001) wurde für die Erzeugung der *nagA*-Mutante verwendet. Das Plasmid besteht aus einem 2,8 kb *BamHI*-Fragment aus *Cmm*, auf dem das *nagA*-Gen vollständig vorliegt, und dem pUC13-Vektor. Es enthält eine singuläre *PmlI*-Schnittstelle, in die die *cmx*-Kassette inseriert wurde. Dafür wurde das Plasmid pOKPF-cmb α *BamHI* hydrolysiert. Das 1,5 kb große eluierte *BamHI*-Fragment, auf dem das *cmx*-Gen liegt, wurde mit dNTPs aufgefüllt, damit zu *PmlI* kompatible „blunt ends“ erzeugt werden konnten. Die erhaltenen Mutageneseplasmide pIGN α und pIGN β (Karte, siehe Anhang) wurden für die Inaktivierung der β -N-Acetylglukosaminidase in *Cmm* verwendet.

Durch Sequenzanalyse der *BamHI*-Subklone 7-72-1 und 7-82-1, die beide ein 1,5 kb großes *BamHI*-Fragment im pUC13 tragen, konnte eine zweite Pektat-Lyase (*pelC*) identifiziert werden. Für die Erzeugung der Mutageneseplasmide wurde die DNA des Cosmids 7-72 und die DNA des EMBL3-Phagens-1 mit *SacI* verdaut und die Ligation der gespaltenen DNAs erfolgte mit den *SacI*-gespaltenen Vektoren pJE1802 (Amp^R) bzw. pJE18K2 (Km^R). Die Vektoren pJE18K2 und pJE1802 besitzen keine *BamHI*-Schnittstelle in der multiple cloning site (mcs), somit konnte die singuläre *BamHI*-Schnittstelle in den Genen *pelA* und *pelC* für die Insertion der Antibiotika-Resistenzkassette verwendet werden. Die Insertion der 1,5 kb großen *BamHI-cmx*-Kassette des Plasmids pOKPF-Cmb α erfolgte bei den Plasmiden pIGPA und pIGPC, die das 1,9 kb große *SacI*-Fragment enthielten, das das jeweilige *pel*-Gen trägt, in der singulären *BamHI*-Schnittstelle. Die Mutageneseplasmide pIGPA α , pIGPA β , pIGPC α und pIGPC β (Karte, siehe Anhang) wurden für die Inaktivierung des jeweiligen Pektat-Lyase-Gens im Chromosom von *Cmm* verwendet, um zuerst eine Einzelmutante herzustellen. Da eventuell die Funktion der inaktivierten Pektat-Lyase durch die zweite intakte Pektat-Lyase übernommen bzw. ausgeglichen werden könnte, und im Pflanzentest vermutlich keine Veränderung in der Virulenz festzustellen wäre, lag ein besonderes Interesse an einer Doppelmutante dieser beiden Pektat-Lyasen. Um diese Doppelmutante zu erzeugen, wurde für die Konstruktion der benötigten Mutageneseplasmide eine Spectinomycin-Resistenzkassette aus dem Vektor pS19mob2 verwendet.

Dieser Vektor wurde *Bgl*II gespalten und das 1,2 kb große *Bgl*II-Fragment wurde, wie zuvor die Chloramphenicol-Kassette, in die singuläre *Bam*HI-Schnittstelle inseriert. Die entstandenen Mutageneseplasmide pIGPAS α und pIGPAS β wurden für die Konstruktion der Doppelmutante verwendet.

Die Inaktivierung des *chpC*-Gens durch Insertionsmutagenese

Nach Elektroporation der Mutageneseplasmide pIGC α und pIGC β , die in *Cmm* nicht replizieren können, in kompetente *Cmm* NCPPB382 Zellen erfolgte Selektion auf Chloramphenicol-Resistenz (Cm^R). Von den analysierten Klonen zeigte nur eine keinen Vektoranteil. Für die Identifizierung einer korrekten *chpC*-Mutante wurde ein internes 465 bp großes PCR-Produkt von *chpC* als *chpC*-spezifische Sonde für die Hybridisierung verwendet.

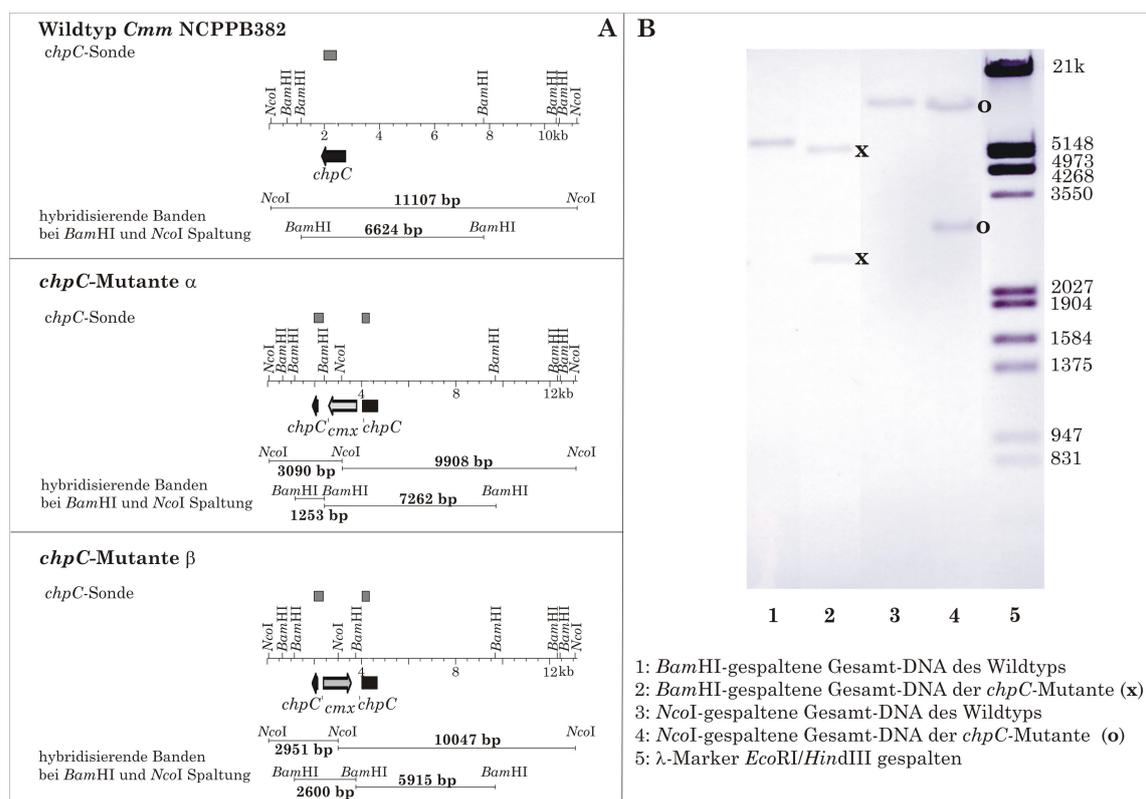


Abbildung 4.7: **A:** Physikalische Karte und Bandenmuster für die Hybridisierung bei *Bam*HI- und *Nco*I-gespaltener Gesamt-DNA der *chpC*-Mutante **B:** Southern Hybridisierung der *Bam*HI- (x) und *Nco*I-gespaltene (o) Gesamt-DNA mit der *chpC*-Sonde

Bei der Hybridisierung der *Bam*HI- und *Nco*I-gespaltenen Gesamt-DNA sollte bei korrekt erfolgtem Doppelcrossover das in Abb. 4.7 (Seite 84) dargestellte Bandenmuster auftreten. Die tatsächlich erhaltenen Fragmentgrößen der hybridisierenden Banden von 2.9 kb und 10 kb (*Nco*I, o) und 2.6 kb und 5.9 kb (*Bam*HI, x) des einzigen potentiell korrekten Klons stimmen mit den rechnerisch ermittelten Werten überein (Abb. 4.7, Seite 84). Nach dem Hybridisierungsmuster handelt es sich um eine Mutante, bei der die *cmx*-Kassette in entgegengesetzter Orientierung zum Zielgen *chpC* enthalten ist. Durch die Hybridisierung der *chpC*-Mutante mit der *cmx*-Sonde wurde die Anwesenheit der Kassette bestätigt. Die *cmx*-Sonde weist die in das Gen inserierte *cmx*-Kassette nach und bei der Hybridisierung der gespaltenen Gesamt-DNA mit der *cmx*-Sonde waren die gleichen Fragmentgrößen wie mit der *chpC*-Sonde zu erwarten. Die Übereinstimmung der Fragmentgrößen mit denen der *chpC*-Mutante bestätigt, dass die *cmx*-Kassette an der richtigen Position im Gen inseriert ist und es sich um die gesuchte *chpC*-Mutante handelt (CMM101*chpC* β). Bei der Überprüfung des Plasmid-Status konnte nur *celA*, das auf pCM1 lokalisiert ist, nachgewiesen werden. Im späteren Pflanzentest wurde daher CMM101 als Kontrollstamm verwendet (Tab. 4.8, Seite 91).

Die Inaktivierung der Gene *chpE* und *chpF* durch Insertionsmutagenese

Die DNA der Mutageneseplasmide pIGE α , pIGE β , pIGF α und pIGF β wurde durch Elektroporation in kompetente *Cmm* NCPPB382 Zellen eingebracht. Die Selektion erfolgte auf Cm-haltigem SB-Medium. Eine große Anzahl erhaltener Cm^R Kolonien wurde über Southern Hybridisierung mit den beiden Sonden *cmx* und pUC18 untersucht. Durch die Hybridisierungen mit den zwei spezifischen Sonden konnten für die Gene *chpE* und *chpF* keine korrekten Mutanten identifiziert werden. In beiden Fällen wurden nur Singlecrossover und illegitime Rekombination erhalten. Die umgebende DNA-Sequenz auf den Mutageneseplasmiden, die für das Doppelcrossover benötigt wird, sollte jedoch von der Anzahl an Basenpaaren ausreichend gewesen sein (ca. 800-1700 bp).

Die Inaktivierung des *chpG*-Gens durch Insertionsmutagenese

Um zu untersuchen, ob das *chpG*-Gen an der Pathogenität von *Cmm* beteiligt ist, wurde das Gen durch gezielte Mutagenese inaktiviert, indem die DNA des konstruierten Mutagen-

neseplasmids pIGG β durch Elektroporation in *Cmm* gebracht wurde. Die Selektion erfolgte auf SB-Medium mit Chloramphenicol als Zusatz. Die erhaltenen Cm^R Kolonien wurden auf den korrekten Austausch des Wildtypgens gegen das inaktivierte *chpG*-Gen durch Southern Hybridisierung überprüft. Nur eine Kolonie enthielt keinen pUC-Anteil. Über Hybridisierung *Bam*HI- und *Nco*I-gespaltener Gesamt-DNA dieser Kolonie mit der *cmx*-Sonde und der *chpG*-Sonde, dem 2,3 kb großen *Eco*RV-Fragment des Plasmids cmis2p0456h08, konnte die Mutante als korrekt identifiziert werden. Es sollte das folgende Bandenmuster bei der Hybridisierung mit der *chpG*-Sonde entstehen (Abb. 4.8).

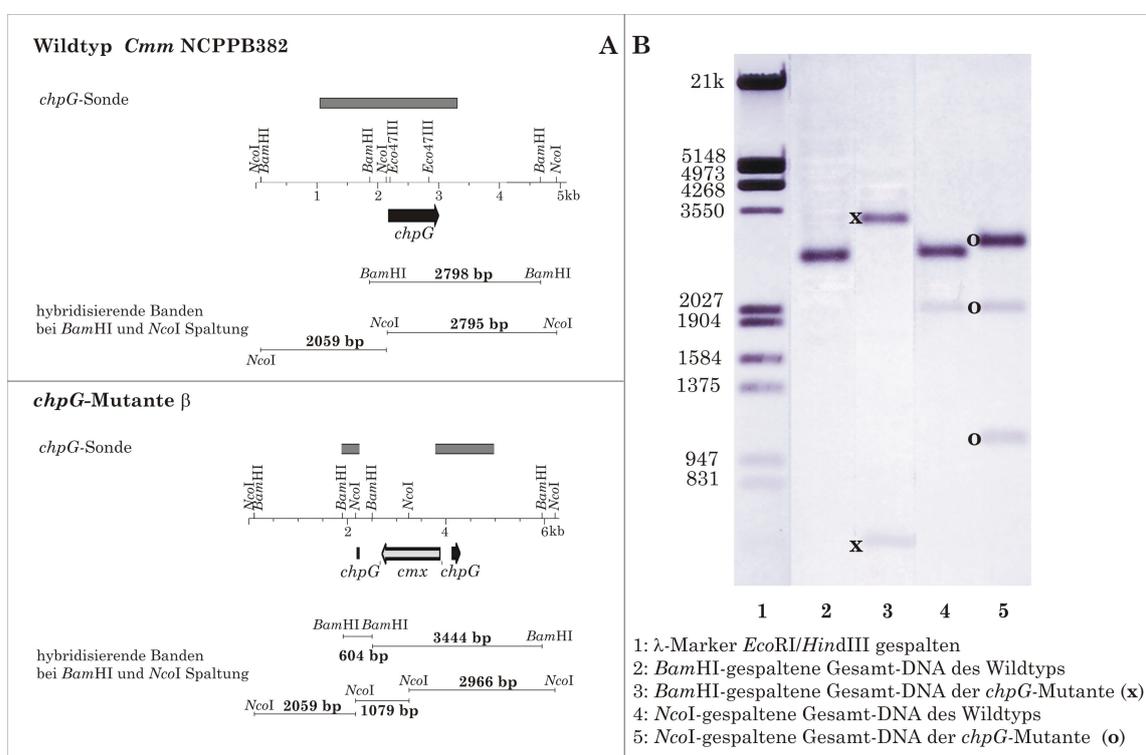


Abbildung 4.8: **A:** Physikalische Karte und Bandenmuster für die Hybridisierung bei *Bam*HI- und *Nco*I-gespaltener Gesamt-DNA der *chpG*-Mutante **B:** Southern Hybridisierung der *Bam*HI- (x) und *Nco*I-gespaltenen (o) Gesamt-DNA mit der *chpG*-Sonde

Anhand der Signale von 0,6 kb und 3,4 kb für *Bam*HI-gespaltene Gesamt-DNA (x) und 1,1 kb, 2,0 kb und 2,9 kb für *Nco*I-gespaltene Gesamt-DNA (o) mit der *chpG*-Sonde (Abb. 4.8, B) konnte eine korrekte *chpG*-Mutante identifiziert werden, die die *cmx*-Kassette in entgegengesetzter Orientierung wie das Zielgen trägt. Die gewünschte Inaktivierung des *chpG*-

Gens ist somit erreicht worden. Es zeigte sich, dass die *chpG*-Mutante (CMM101*chpG* β) nur im Besitz des endogenen Plasmids pCM1 ist und somit im späteren Pflanzentest der Stamm CMM101 als Kontrolle dient (Tab. 4.8, Seite 91).

Die Inaktivierung des *nagA*-Gens durch Insertionsmutagenese

Zur Untersuchung, ob das *nagA*-Gen an der Pathogenität von *Cmm* beteiligt ist, wurde die DNA der Mutageneseplasmide pIGN α und pIGN β durch Elektroporation in kompetente Zellen des Wildtypstammes *Cmm* NCPPB382 transformiert. Die Selektion fand auf SB-Medium mit Zusatz von Chloramphenicol statt.

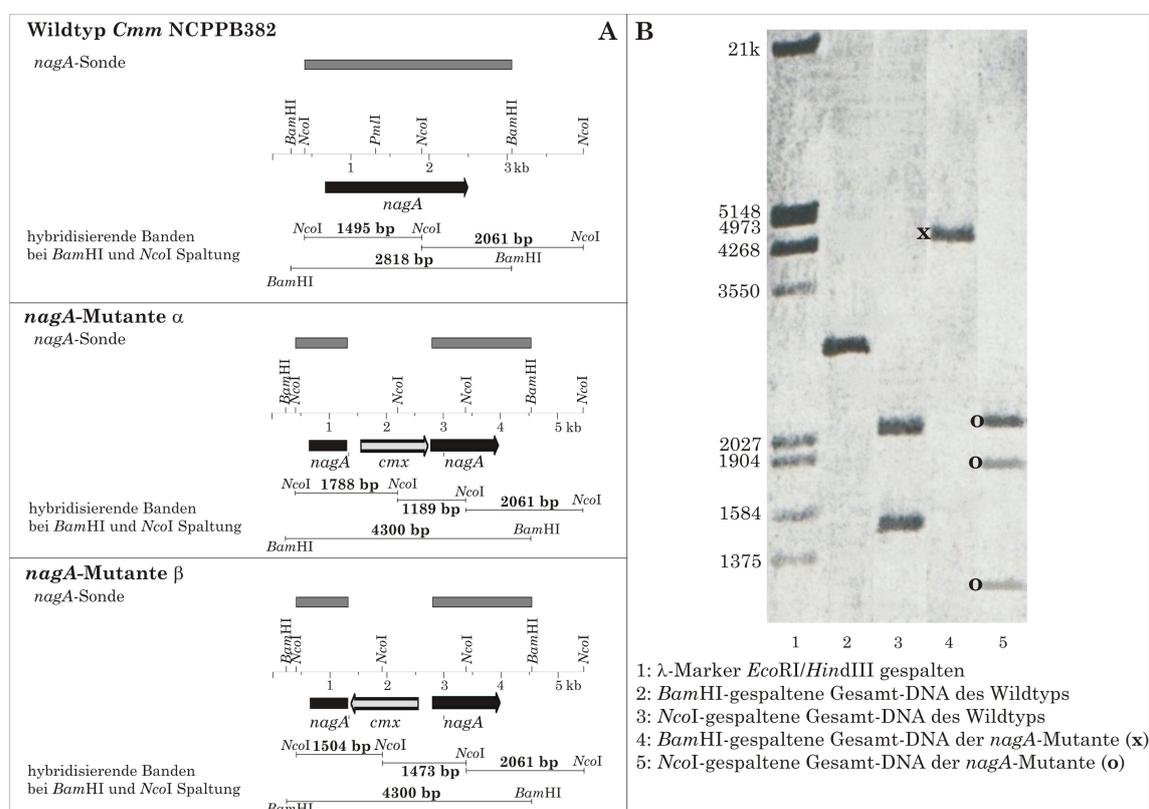


Abbildung 4.9: **A:** Physikalische Karte und Bandenmuster für die Hybridisierung bei *Bam*HI- und *Nco*I-gespaltener Gesamt-DNA der *nagA*-Mutante **B:** Southern Hybridisierung der *Bam*HI- und *Nco*I-gespaltenen Gesamt-DNA der *nagA*-Mutante mit der *nagA*-Sonde ((x): *Bam*HI-Fragmente der *nagA*-Mutante; (o): *Nco*I-Fragmente der *nagA*-Mutante)

Die resistenten Kolonien wurden auf den korrekten Austausch des Wildtypgens gegen das inaktivierte *nagA*-Gen durch Southern-Hybridisierung überprüft. Bei der Hybridisierung mit der pUC18-Sonde konnten drei Kolonien identifiziert werden, die kein Signal aufwiesen. Nur eine dieser drei Kolonien zeigte auch bei den Hybridisierungen mit der *cmx*-Sonde und der spezifischen *nagA*-Sonde das richtige Hybridisierungsmuster (Abb. 4.9, B, Seite 87). Als *nagA*-Sonde wurden zwei *Bam*HI/*Nco*I Fragmente aus dem Plasmid pIGN, die zusammen eine Größe von 2,6 kb ergaben, verwendet. Die Gesamt-DNA der zu testenden Kolonien wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Nco*I hydrolysiert (Abb. 4.9, Seite 87). Bei der Überprüfung des Plasmid-Status von pCM1 und pCM2 wurde festgestellt, dass die *nagA*-Mutante (*Cmm* NCPPB382*nagA* α) noch im Besitz beider endogener Plasmide ist (Tab. 4.8, Seite 91).

Die Inaktivierung der Gene *pelA* und *pelC* durch Insertionsmutagenese

Zur Inaktivierung der Gene *pelA* und *pelC* wurde Plasmid-DNA der Mutageneseplasmide pIGPA α , pIGPA β , pIGPC α und pIGPC β verwendet. Die Gesamt-DNA der resistenten Kolonien wurde mit *Sph*I hydrolysiert, damit das Bandenmuster eindeutig der jeweiligen Pektat-Lyase zugeordnet werden konnte. Mittels Hybridisierung gegen die pUC-, *cmx*- und eine *pelC*-Sonde erfolgte die Überprüfung. Es wurde nur eine *pelC*-Sonde hergestellt, da die Pektat-Lyasen auf DNA Ebene zu 90% identisch sind und somit durch Kreuzhybridisierung *pelA* und *pelC* mit der *pelC*-Sonde zu detektieren sind. Für die *pelC*-Sonde wurde das Plasmid pIGPC *Sac*I hydrolysiert, das 1,9 kb große *Sac*I-Fragment aus dem Agarosegel eluiert und nach Markierung als Sonde verwendet. Bei der Inaktivierung des *pelC*-Gens ist das Plasmid pIGPC β verwendet worden. Bei der Hybridisierung *Sph*I-gespaltener Gesamt-DNA mit der pUC-Sonde konnten drei Kolonien identifiziert werden, die kein Signal zeigten. Der Austausch des Wildtypgens gegen das inaktivierte Gen konnte bei zwei von den drei Kolonien durch Southern Hybridisierung gegen die *cmx*- und *pelC*-Sonde nachgewiesen werden. Bei der Hybridisierung trat das Bandenmuster des inaktivierten *pelC*-Gens auf und zusätzlich schwache Banden für das *pelA*-Gen (Abb. 4.10). Die in Spur 2 der Abbildung 4.10 B mit o gekennzeichneten Hybridisierungsbanden sind dem intakten *pelA*-Gen zuzuordnen. Die mit x gekennzeichneten Banden weisen die Größen des inaktivierten *pelC*-Gens auf. Bei der Kontroll-DNA sind die kleinen Banden von 752 bp und 949 bp sowie die 949 bp

große Bande der *pelC*-Mutante nicht mit dargestellt, da diese zu schwach ausgeprägt waren (Abb. 4.10, B). In Spur 3 sind die *SphI*-Fragmente mit einer Größe von 2047 bp für das intakte *pelA*-Gen und das *SphI*-Fragment mit einer Größe von 3735 bp für das intakte *pelC*-Gen zu erkennen. Die restlichen theoretischen Banden sind nicht abgebildet, da die Signale nur sehr schwach zu sehen gewesen sind.

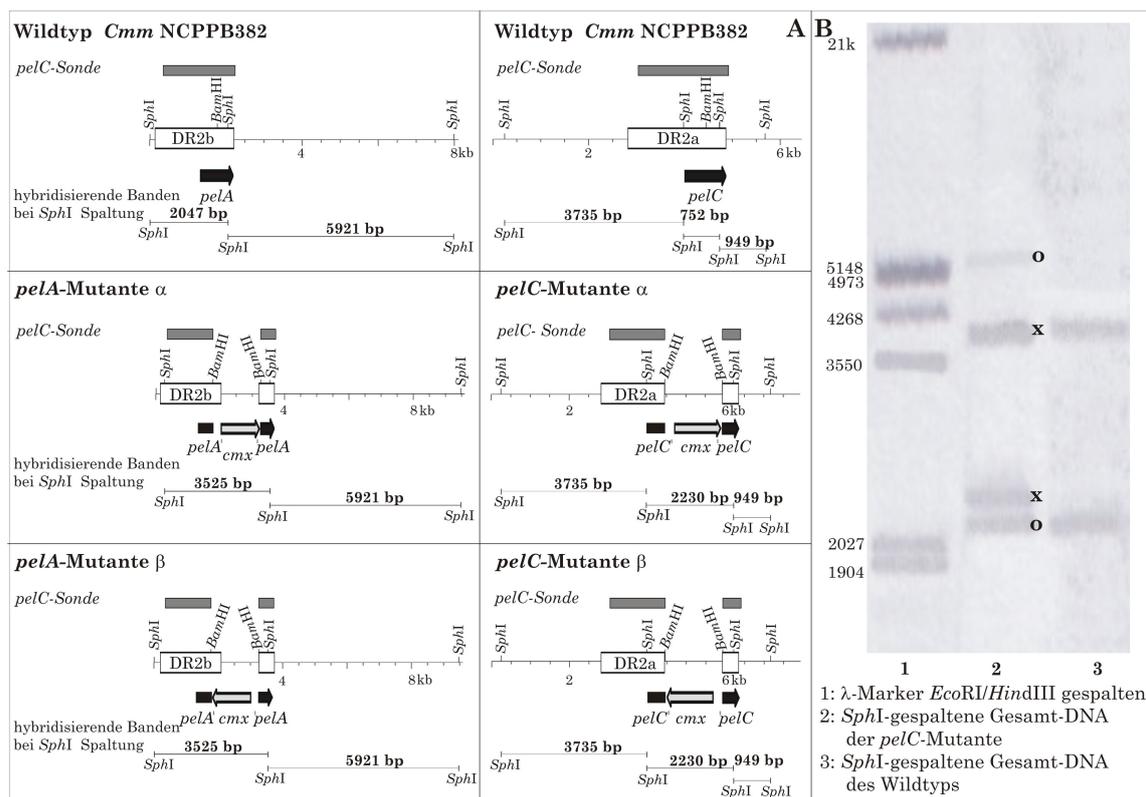


Abbildung 4.10: A: Physikalische Karte und Bandenmuster für die Hybridisierung bei *SphI*-gespaltener Gesamt-DNA der *pelA*- und *pelC*-Mutante **B:** Southern Hybridisierung der *SphI*-gespaltenen Gesamt-DNA der *pelC*-Mutante mit der *pelC*-Sonde ((**x**): *SphI*-Fragmente der *pelC*-Mutante; (**o**): *SphI*-Fragmente des intakten *pelA*-Gens), angrenzende ORFs der *pel*-Gene wurden in den Regionen nicht berücksichtigt, DR: „direct repeat“. Das 949 bp *SphI*-Fragment der *pelC*-Mutante ist nicht dargestellt, da die Bande nur sehr schwach zu erkennen gewesen ist.

Um zu bestätigen, dass *pelC* inaktiviert vorliegt, wurde die Gesamt-DNA der Mutante *SphI* gespalten und für eine Shotgun-Ligation mit einem *SphI*-gespaltenen pUC18 Vektor ver-

wendet. Aus Ampicillin- und Chloramphenicol-resistenten Kolonien wurde Plasmid-DNA isoliert, mit *SphI* gespalten und im Agarosegel analysiert. Ein Plasmid wies die richtigen Größen von 2230 bp und 2686 bp auf (pIGPCR). Durch partielle Sequenzierung konnte das Ergebnis der Southern Hybridisierung, dass es sich um die Inaktivierung des *pelC*-Gens handelt, bestätigt werden. Die *pelC*-Mutante (CMM101*pelC* α) zeigte bei der Überprüfung des Plasmid-Status, dass pCM2 verloren gegangen ist (Tab. 4.8, Seite 91).

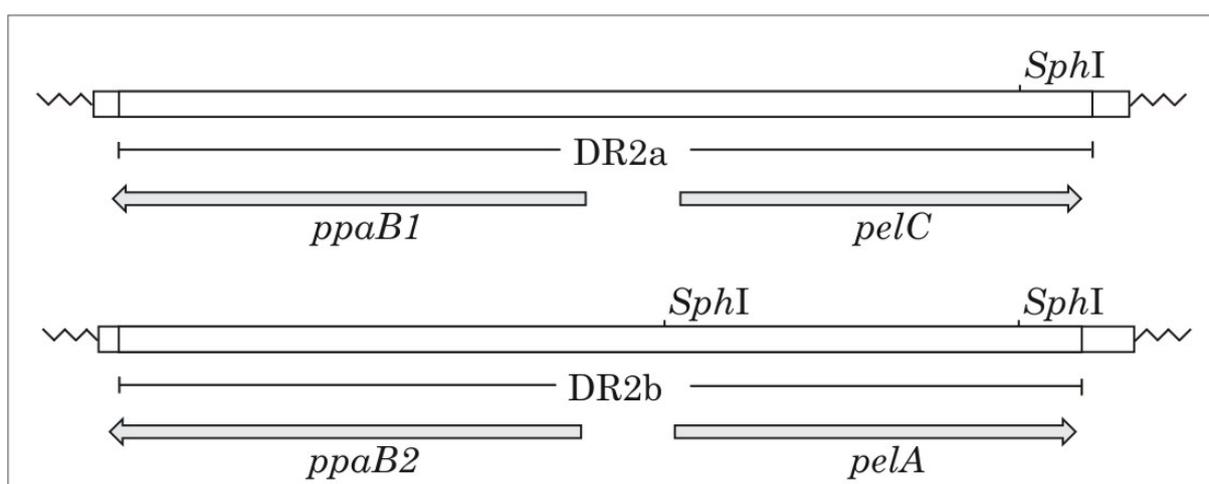


Abbildung 4.11: Physikalische Karte der „direct repeats“ DR2a und DR2b, *ppaB1*/*ppaB2* kodieren Serinproteasen, *pelC*/*pelA* kodieren Pektat-Lyasen

Wie in Abbildung 4.10 (Seite 89) zu erkennen ist, liegen die Gene *pelA* und *pelC* innerhalb der „direct repeats“ DR2a und DR2b. Zusätzlich befinden sich die Gene *ppaB1* und *ppaB2* in diesen „direct repeats“. Die physikalische Karte der „direct repeats“ ist in Abbildung 4.11 dargestellt. Die Pektat-Lyasen *pelA* und *pelC* sind zu 90% auf DNA-Ebene und zu 95% auf Protein-Ebene identisch. Bei den Serinproteasen *ppaB1* und *ppaB2* ist die Identität auf DNA-Ebene bei 98% und auf Protein-Ebene bei 99% (Alignments, siehe Anhang). Der intergenische Bereich von *pelA* und *ppaB2* unterscheidet sich zu dem intergenischen Bereich zwischen *pelC* und *ppaB1*. In dem DR2b liegt zwischen *ppaB2* und *pelA* eine *SphI*-Schnittstelle, die im DR2a zwischen *pelC* und *ppaB1* nicht vorkommt (Abb. 4.11). Da die verwendeten Mutageneseplasmide pIGPA α , pIGPA β , pIGPC α und pIGPC β einen Bereich der „direct repeats“ DR2a und DR2b abdecken, der jeweils 218 bp nach DR-Beginn anfängt, und den intergenischen Bereich von *pelC* und *ppaB1* sowie *pelA* und *ppaB1* mit enthalten, kann zwischen einer *pelA*- und *pelC*-Mutante gut unterschieden werden. Da

zu erwarten war, dass die *pelC*-Mutante aufgrund der Duplizierung des Gens keinen sich vom Wildtyp unterscheidenden Phänotyp haben würde, wurde versucht, die Doppelmutante zu konstruieren. Dass es sich um eine Duplizierung der Pektat-Lyase handelt, ist jedoch erst durch die Sequenzdaten des Genomprojektes von *Cmm* NCPPB382 geklärt worden, denn zuvor lagen nur Sequenzdaten des EMBL-Phagen-1 und des Cosmidsubklons 7-72-1 vor. Diese Sequenzdaten ließen jedoch keinen eindeutigen Schluss auf eine Duplizierung zu. Für die Konstruktion der Doppelmutante wurde die DNA der Mutageneseplasmide pIGPAS α und pIGPAS β durch Elektroporation in kompetente CMM101*pelC* α Zellen transformiert. Cm^R und Sp^R resistente Kolonien wurden mittels Southern Hybridisierung gegen eine pUC-Sonde und *spec*-Sonde untersucht. Für die *spec*-Sonde wurde das 1,2 kb große *Bgl*III-Fragment des Vektors pS19mob2 verwendet. Bei keiner der vielen getesteten Kolonien konnten die richtigen Fragmentgrößen nachgewiesen werden. Die Erzeugung einer Doppelmutante war nicht erfolgreich.

Genname	Resistenz	Stammname	Plasmidstatus	Kontrollstamm
<i>chpC</i>	Cm ^R	CMM101 <i>chpC</i> β	pCM1	CMM101
<i>chpG</i>	Cm ^R	CMM101 <i>chpG</i> β	pCM1	CMM101
<i>nagA</i>	Cm ^R	CMM101 <i>nagA</i> α	pCM1, pCM2	<i>Cmm</i> NCPPB382
<i>pelC</i>	Cm ^R	CMM101 <i>pelC</i> α	pCM1	CMM101

Tabelle 4.8: Erzeugte Mutanten, deren Resistenz, Namen, Plasmid-Status und Kontrollstämme

4.4 Phänotypische Analyse der Mutanten von *Cmm* im Pflanzentest

Die plasmidkodierte Pathogenitätsfaktoren *pat-1* und *celA* sind für die Ausprägung von Krankheitssymptomen notwendig, da die jeweiligen Genprodukte direkt an der Bakterien-Pflanzen-Interaktion beteiligt sind. Die Produkte anderer Gene sind möglicherweise nur indirekt an der Pathogenität beteiligt, indem sie die Infektions- oder Kolonisationsfähigkeit der Bakterien gewährleisten. Durch Mutationen in solchen Genen kann es indirekt über eine verminderte Kolonisation der Tomate ebenfalls zur Abschwächung oder zum Verlust der Virulenz kommen. Durch Pflanzentests sollte aufgeklärt werden, ob die jeweilige Mu-

tation eine Auswirkung auf die Ausprägung der Krankheitssymptome hat oder nicht. Es wurden jeweils 64 Pflanzen mit den Stämmen *Cmm* NCPPB382, CMM101, CMM100 und den Mutanten der Gene *chpC*, *chpG*, *nagA* und *pelC* durch Wurzelinfektion infiziert. In einem 28-tägigen Pflanzentest wurden die Virulenz sowie die Kolonisationsfähigkeit der Mutanten untersucht, um Hinweise auf die Funktionen dieser Gene zu bekommen. Täglich wurden die Pflanzen auf Ausbildung der Welkesymptome überprüft. Das Spektrum der Welkesymptome reichte von symptomfrei bis hin zu starken Welkesymptomen mit Sprossläsionen. Um über den Verlauf der Krankheit genauere Aussagen treffen zu können, wurde neben der Bestimmung und dem Vergleich der Welkeindices, ein detaillierter Welkeverlauf

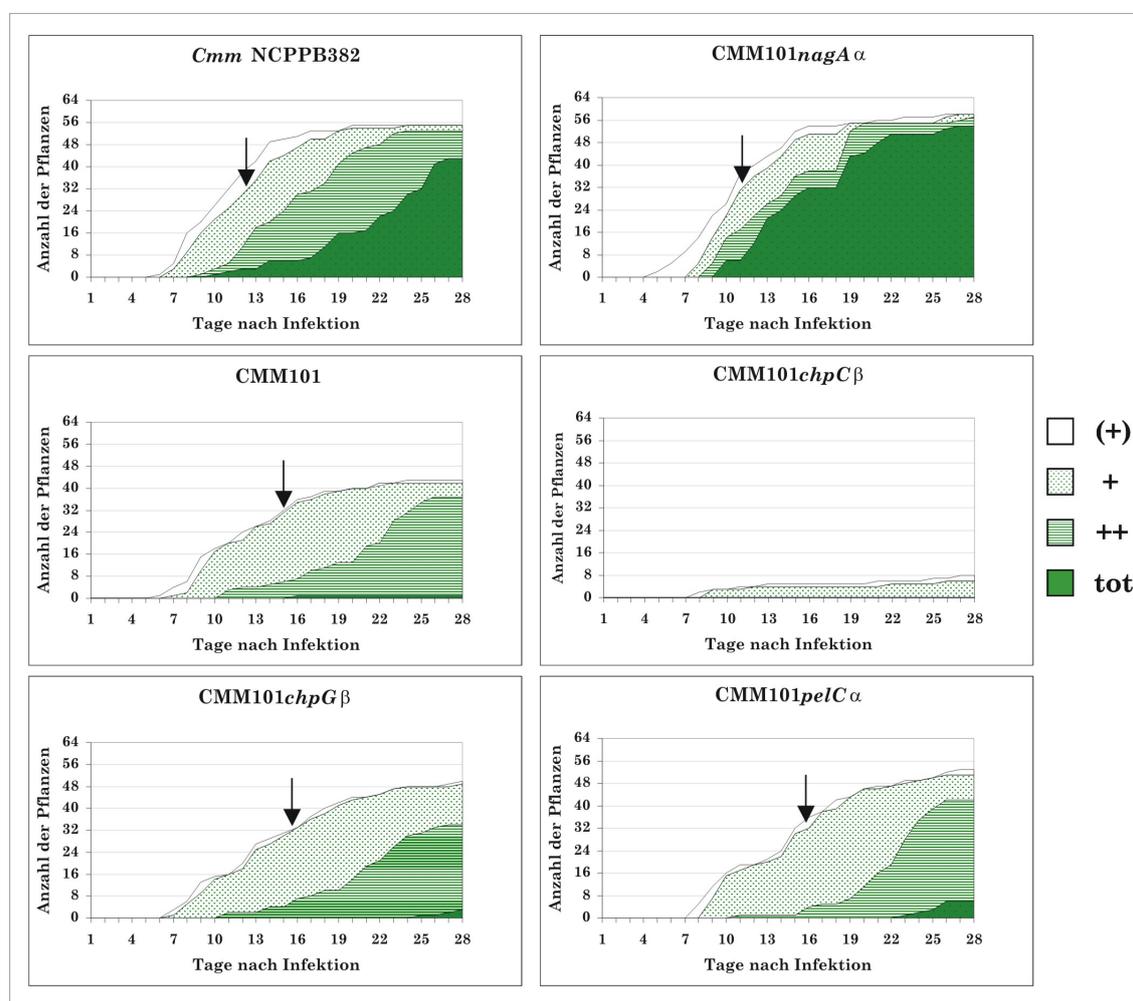


Abbildung 4.12: Welkeverlaufsdigramm der mit dem Wildtypstamm *Cmm* NCPPB382 und der Mutanten infizierten Tomatenpflanzen, der Pfeil markiert den Welkeindex

für die Kontrollstämme und jede Mutante aufgestellt (Abb. 4.12, Seite 92). Am 28. Tag wurde bei allen Pflanzen der Spross direkt über der Erde abgeschnitten und die Größe und das Gewicht bestimmt und ein Pflanzenhomogenat hergestellt mit dem der Bakterientiter bestimmt wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.9 (Seite 95) dargestellt. Die Welkeverläufe der Kontrollstämme *Cmm*NCPPB382 und CMM101 zeigten ein typisches Verhalten mit Welkeindices von 12 bzw. 15-16 Tagen. Die ersten charakteristischen Welkesymptome treten 6-7 Tage nach der Wurzelinfektion auf. Der weitere Krankheitsverlauf ist bei *Cmm*NCPPB382 wesentlich intensiver als beim Curing-Derivat CMM101.



Abbildung 4.13: Welkesymptome nach 28 Tagen bei mit CMM101 und CMM101 $chpC\beta$ mit Wurzelinfektion infizierten Tomatenpflanzen, A: Aufsicht, B: Seitenansicht

Die stärkere Virulenz zeigt sich u. a. in der höheren Anzahl an abgestorbenen Pflanzen am Ende des Pflanzentests (Abb. 4.12, Seite 92). Bei der Mutante CMM101*chpC* β , die hinsichtlich der Pathogenitätsdeterminante dem Kontrollstamm CMM101 entspricht, konnte eine drastische Verminderung der Virulenz festgestellt werden. Beim Vergleich ist erkennbar, dass die Welkeintensität sehr stark eingeschränkt ist. Nur 7 von 64 Pflanzen zeigten die mildesten Welkesymptome, so dass kein Welkeindex bestimmt werden konnte (Abb. 4.12, Seite 92). In Abbildung 4.13 (Seite 93) ist die verminderte Virulenz dargestellt. Die infizierten Pflanzen wiesen ein verstärktes Wachstum auf, das sich in ihrer Größe und dem Gewicht zeigte (Tab. 4.9, Seite 95). Diese Mutante erreicht in der Tomatenpflanze nur einen Bakterientiter von $2,0 \times 10^7$ cfu/g Pflanzenhomogenat, gegenüber einem Titer von $7,4 \times 10^9$ cfu/g Pflanzenhomogenat des Wildtyps (Tab. 4.9, Seite 95). Die Mutanten CMM101*chpG* β und CMM101*pelC* α besitzen nur das Plasmid pCM1 und wurden bezüglich des Pathogenitätsverhalten (Welkeverlauf, Welkeindex, Größe, Gewicht) mit dem Kontrollstamm CMM101 verglichen. Durch die Inaktivierung der Gene *chpG* und *pelC* ist keine Veränderung des Phänotyps erkennbar gewesen. Der Welkeindex, die Krankheits-symptome, die durchschnittlichen Pflanzengrößen der Mutanten entsprechen denen des Kontrollstammes CMM101 (Abb. 4.12, Seite 92). Die Pflanzen sind im Mittel allerdings schwerer, als die mit dem Kontrollstamm infizierten Pflanzen (Tab. 4.9, Seite 95). Die Bakterientiter der Mutanten liegen mit $1,8 \times 10^9$ cfu/g Pflanze (*chpG*) und $6,7 \times 10^9$ cfu/g Pflanze (*pelC*) in der Größenordnung des Kontrollstammes CMM101 ($9,9 \times 10^9$ cfu/g Pflanze). Da es wahrscheinlich ist, dass die zweite Pektat-Lyase (*pelA*) die Aufgaben der ersten Pektat-Lyase (*pelC*) übernimmt, sollte eine Doppelmutante der Pektat-Lyasen hergestellt werden. Die Inaktivierung des *pelA*-Gens war jedoch nicht erfolgreich. Die Mutante *Cmm* NCPPB382*nagA* α , die als einzige Mutante beide Plasmide enthält, zeigt einen um einen Tag früher eintretenden Welkeindex als der Kontrollstamm *Cmm* NCPPB382 (Abb. 4.12, Seite 92). Bei der Mutante erreichen 54 Pflanzen den Status „tot“ und bei *Cmm* NCPPB382 sind es 43 Pflanzen. Die mit der Mutante infizierten Pflanzen sind kleiner und leichter als die Pflanzen des Kontrollstamms (Tab. 4.9). Der Bakterientiter von $1,1 \times 10^{10}$ cfu/g Pflanze ist etwas höher als beim Wildtyp *Cmm* NCPPB382 ($7,4 \times 10^9$ cfu/g Pflanze). Jedoch sind in die Berechnung des Bakterientiters nur 4 Pflanzen eingegangen, weshalb kein eindeutiger Vergleich gezogen werden kann.

Stamm	Plasmide	WI n=64	Größe n=64	Gewicht n=64	Titer (cfu/g Pflanze)
CMM101	pCM1	15- 16	10,4 ±3,0	1,8 ±1,0	9,9 × 10 ⁹ [±4,1 × 10 ⁹] (n=10)
CMM101 <i>chpC</i> β	pCM1	—	14,3 ±3,6	4,8 ±2,3	2,0 × 10⁷ [±3,2 × 10⁷] (n=20)
CMM101 <i>chpG</i> β	pCM1	15- 16	11,7 ±4,0	3,2 ±2,6	1,8 × 10 ⁹ [±2,4 × 10 ⁹] (n=10)
CMM101 <i>pelC</i> α	pCM1	15- 16	11,5 ±4,7	3,8 ±3,4	6,7 × 10 ⁹ [±6,0 × 10 ⁹] (n=10)
<i>Cmm</i> NCPPB382	pCM1, pCM2	12	7,4 ±4,0	0,9 ±1,2	7,4 × 10 ⁹ [±7,3 × 10 ⁹] (n=10)
<i>Cmm</i> NCPPB382 <i>nagA</i> α	pCM1, pCM2	11	4,5 ±3,1	0,5 ±1,2	1,1 × 10 ¹⁰ [±8,9 × 10 ⁹] (n=4)

Tabelle 4.9: Ergebnisse der Pflanzentests mit den Mutanten, WI: Welkeindex (in Tagen angegeben), []: jeweilige Standardabweichungen, n: Anzahl der Pflanzen, die in die Berechnung eingegangen sind, Größe in cm und Gewicht in g angegeben

Die Ergebnisse dieser Pflanzentests zeigen, dass die Inaktivierung der Gene *chpG*, *nagA* und *pelC* keine Veränderung der Virulenz zur Folge haben. Allerdings zeigt die Inaktivierung des *chpC*-Gens eine drastische Reduzierung der Virulenz (7 von 64 Pflanzen haben die mildesten Welkesymptome) und eine Reduzierung des Bakterientiters um den Faktor 495.

4.5 Kolonisation der Stämme CMM101*chpC* β und CMM101 β 330-18 im zeitlichen Verlauf

Die Inaktivierung des *chpC*-Gens und der Verlust einer ca. 130 kb großen Region bei der Deletionsmutante CMM101 β 330-18 haben einen Einfluss auf die Ausprägung der Welkesymptome, der sich in verringerter Kolonisation nach 28 Tagen ausdrückt. Die Mutanten wurden im zeitlichen Verlauf auf die Kolonisation der Tomatenpflanze untersucht, um zu überprüfen, ob bereits nach der Infektion eine Pflanzenabwehr erfolgt oder ob die Mutanten nicht mehr in der Lage sind, die Pflanze effektiv zu kolonisieren. Es wurden zwei Wochen alte Tomatenpflanzen über Wurzelinfektion mit den Stämmen CMM101, CMM101*chpC* β und CMM101 β 330-18 infiziert und täglich wurden jeweils drei Pflanzen pro Stamm zu einem Pflanzenhomogenat in einem Mörser zerkleinert. Anschließend wurde der Bakterientiter durch Anlegen einer Verdünnungsreihe und Ausplattieren auf C-Medium mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz bestimmt. Von den ermittelten Einzelwerten für die jeweiligen Tage wurde der Mittelwert bestimmt und die Titer der untersuchten Stämme sind im zeit-

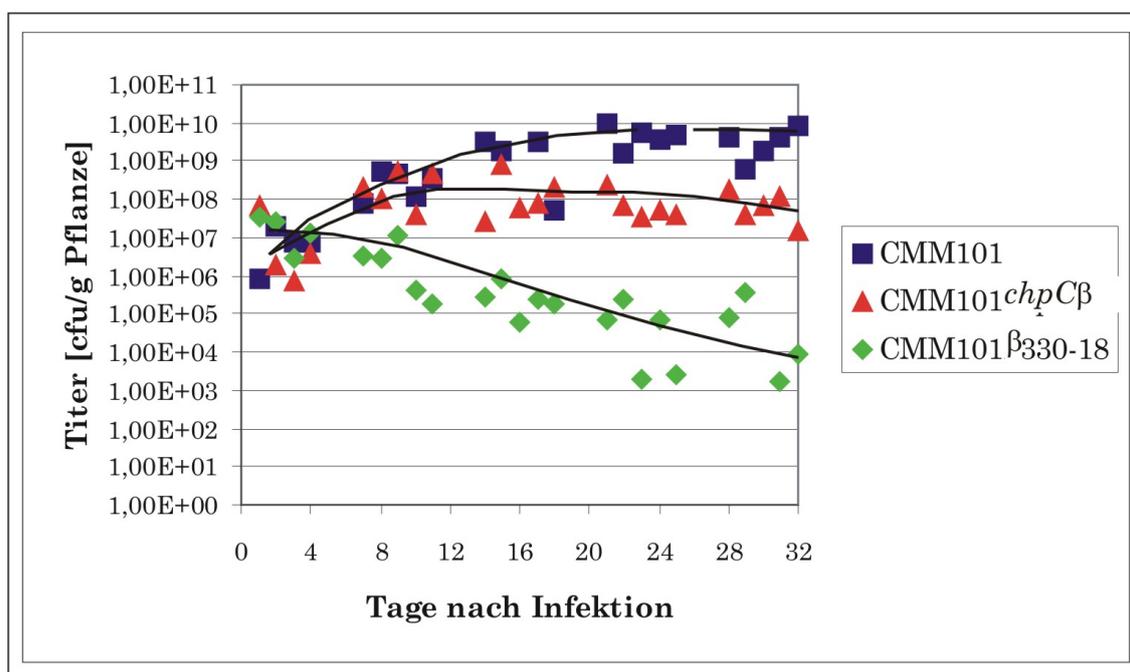


Abbildung 4.14: Kolonisation von Tomatenpflanzen durch die Stämme CMM101*chpC* β und CMM101 β 330-18 im Vergleich zum Curing-Derivat CMM101 im zeitlichen Verlauf

lichen Verlauf in Abb. 4.14 (Seite 96) dargestellt. Zu Beginn des Pflanzentests schwanken die Werte der Titer zwischen ca. 8×10^5 und 5×10^7 Bakterien pro Gramm Pflanze. Am vierten Tag nach der Infektion gleichen sich die Werte an und liegen bei ca. 7×10^6 Bakterien pro Gramm Pflanze. Danach ist deutlich zu erkennen, dass der Stamm CMM101 *chpC* β einen Titer von über 1×10^9 Bakterien pro Gramm Pflanze nie erreicht und der Titer im Mittel bei 5×10^7 Bakterien pro Gramm Pflanze liegt. Beim Stamm CMM101 β 330-18 reduziert sich der Titer über die Zeit bis auf 10^3 - 10^4 Bakterien pro Gramm Pflanze. Die hohen Schwankungen innerhalb der Titerbestimmungen sind wahrscheinlich durch die niedrige Anzahl untersuchter Pflanzen begründet. Zusätzlich gab es Pflanzen, die von Beginn an nicht erfolgreich infiziert worden sind, und bei denen eine Bestimmung des Titers nicht erfolgen konnte. Die während des zeitlichen Verlaufes ermittelten Einzelwerte sind im Anhang aufgeführt. Die untersuchten Stämme weisen nach 32 Tagen einen unterschiedlichen Titer auf, der in Tabelle 4.10 dargestellt ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es einen signifikanten Unterschied von den Mutanten CMM101 *chpC* β und CMM101 β 330-18 im Vergleich zum Kontrollstamm CMM101 gibt. Der Kolonisationsverlauf zeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Kolonisation und der Welkeintensität der mit den Mutanten infizierten Pflanzen vorhanden ist.

Stamm	Titer (cfu/g Pflanze)	Pflanzengröße (cm)	Pflanzengewicht (g)
CMM101	$8,3 \times 10^9 \pm 7,3 \times 10^9$	$6 \pm 3,5$	$0,7 \pm 0,6$
CMM101 <i>chpC</i> β	$1,4 \times 10^7 \pm 8,4 \times 10^6$	$19,8 \pm 2,6$	$4,1 \pm 0,8$
CMM101 β 330-18	$8,5 \times 10^3 \pm 1,6 \times 10^3$	$14,3 \pm 3,0$	$3,7 \pm 0,8$

Tabelle 4.10: Bakterientiter, Größe und Gewicht am 32. Tag nach Wurzelinfektion, \pm : jeweilige Standardabweichung

Um zu überprüfen, ob der festgestellte Einfluss der Mutation im *chpC*-Gen bzw. die Deletion von ca. 130 kb (*chp/tomA*-Region) der Deletionsmutante CMM101 β 330-18 auf die Kolonisation auf einem allgemein verschlechterten Wachstum der jeweiligen Stämme beruht, wurde das Wachstumverhalten in Vollmedium untersucht. Dafür wurden jeweils 10 ml TBY-Flüssigmedium mit Antibiotika-Zusatz mit den entsprechenden Stämmen angeimpft, so dass alle die gleiche Start-o.D. haben. Anschließend wurde das Wachstumsverhalten über mehrere Tage durch Messung der optischen Dichte bei 580 nm verfolgt. Die Wachstum-

verläufe zeigen, dass die Mutationen keinen Einfluss auf das Wachstum in Flüssigmedium haben. Eine mögliche Interpretation dieser Ergebnisse wäre, dass die Mutationen es der Tomatenpflanze ermöglichen, eine erfolgreiche Abwehr einzuleiten, die bei der Deletionsmutante eine größere Auswirkung hat als bei der *chpC*-Mutante, da diese immer noch einen Titer von 10^6 bis 10^7 cfu/g Pflanze erreicht.

4.6 Komplementation der Mutanten CMM101*chpC* β und Einbringen des *chpC*-Gens in CMM101 β 330-18 und *Cmm* NCPPB382

Die Komplementation der *chpC*-Mutante soll zeigen, dass der zum CMM101 unterschiedliche Phänotyp der Mutante nur auf die Inaktivierung von *chpC* und nicht auf eventuell aufgetretene sekundäre Mutationen zurückzuführen ist.

Komplementation der *chpC*-Mutante

Für die Komplementation wurde zunächst das 2,5 kb große *EcoRV*-Fragment aus dem Plasmid cmis2p0456d03, das das native intakte *chpC*-Gen trägt, in den *EcoRV*-gespaltenen, dephosphorylierten *Clavibacter*-Shuttlevektor pHN216 kloniert. Der Vektor pHN216 wurde verwendet, um eine Inkompatibilität mit pCM1 zu vermeiden. Er vermittelt bei *Clavibacter* eine Neomycinresistenz (75 μ g/ml) und in *E. coli* auch eine Kanamycinresistenz (50 μ g/ml). Die aus dem *E. coli* Stamm DH5 α stammende DNA der konstruierten Plasmide pIG216C α und pIG216C β wurde durch Elektroporation in den Stamm CMM101*chpC* β transformiert. Zur Überprüfung der erhaltenen Chloramphenicol- und Neomycinresistenzen Kolonien wurde eine Plasmidisolierung durchgeführt, die eindeutige Aussagen über eine Integration oder das freie Vorliegen des Komplementationsplasmids in der Zelle zulässt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit *NcoI* gespalten und mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Da bei der Plasmidisolierung das Plasmid pCM1 mitisoliert wurde, dienten als Kontrollstämme CMM101 und die *chpC*-Mutante. In Abbildung 4.15 (Seite 99) sind die Bandenmuster *NcoI*-gespaltener Plasmid-DNA von CMM101*chpC* β , CMM101 und der Komplementanten CMM101*chpC* β -pIG216C β 2 und CMM101*chpC* β -pIG216C β 3 dargestellt.

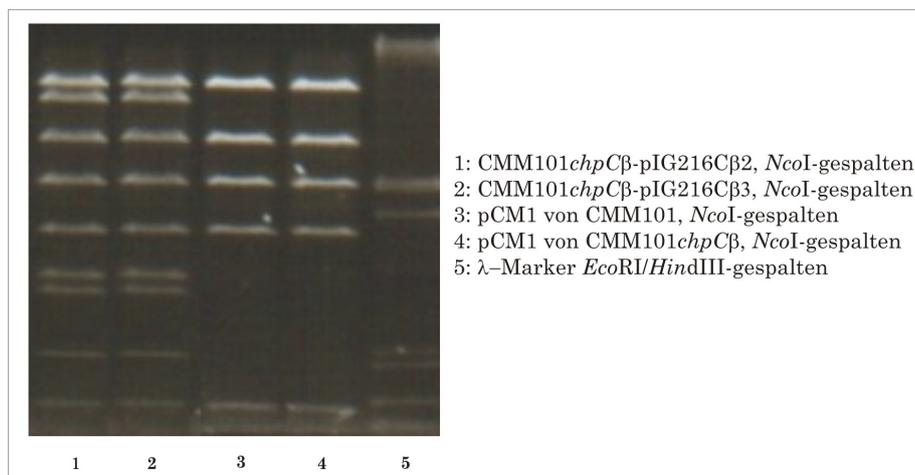


Abbildung 4.15: Plasmidisolierung aus der komplementierten *chpC*-Mutante und den Kontrollstämmen CMM101 und CMM101*chpC*β

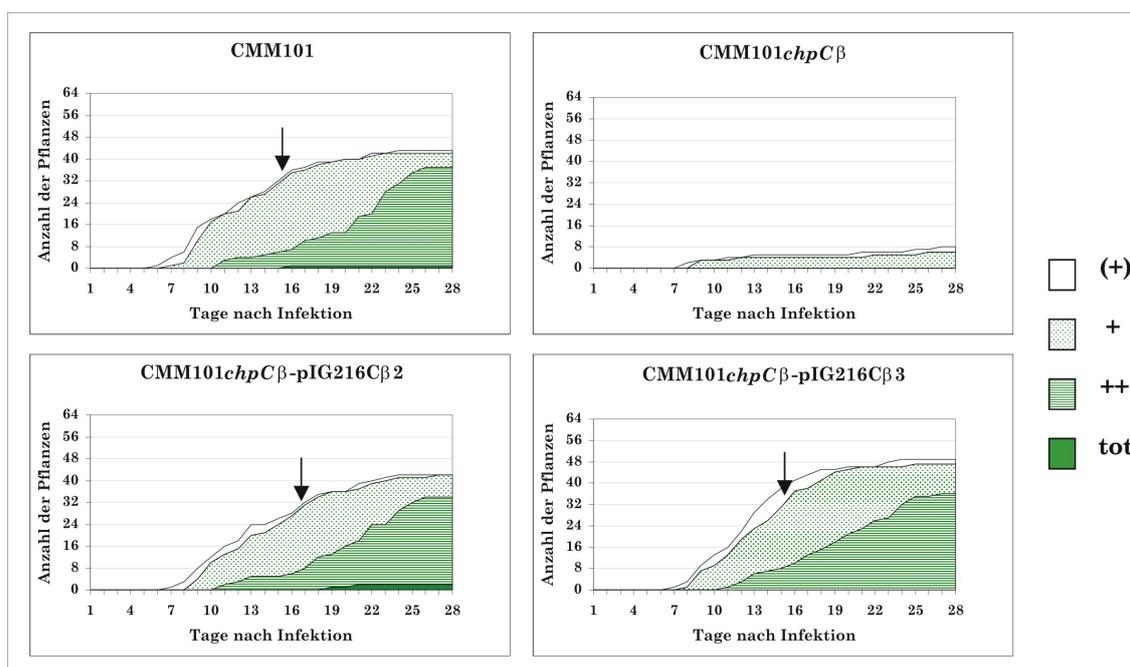


Abbildung 4.16: Welkeverlaufdiagramm der komplementierten *chpC*-Mutante und der Kontrollstämmen CMM101 und CMM101*chpC*β, der Pfeil markiert den Welkeindex

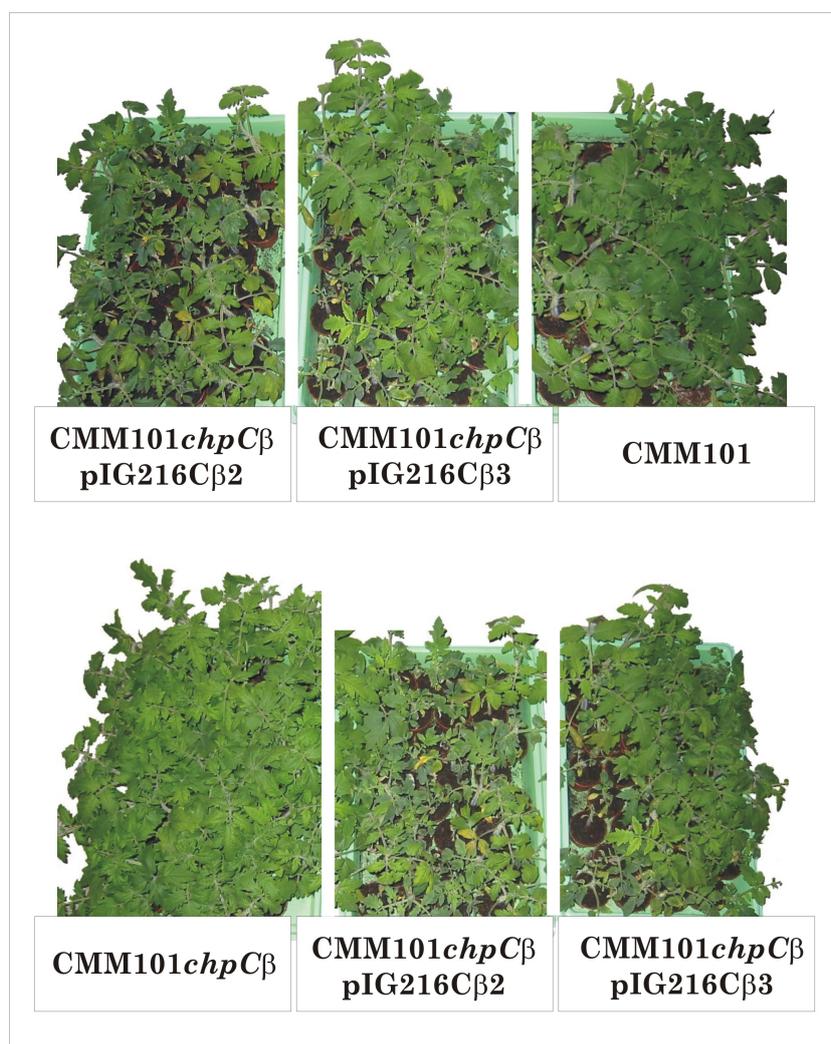


Abbildung 4.17: Welkesymptome nach 28 Tagen bei mit *CMM101chpC β* und den Komplementanten *CMM101chpC β -pIG216C β 2* und *CMM101chpC β -pIG216C β 3* infizierten Tomatenpflanzen

Das Bandenmuster der Komplementanten *CMM101chpC β -pIG216C β* setzt sich aus den Banden des pCM1 (9698 bp, 6550 bp, 5120 bp, 3897 bp, 1526 bp, 554 bp) und pIG216C (8325 bp, 3200 bp, 2800 bp, 2500 bp) zusammen, womit gezeigt wurde, dass das Plasmid pIG216C frei in der Zelle vorliegt. Anschließend wurde im Pflanzentest überprüft, ob der veränderte Phänotyp der Mutante *CMM101chpC β* durch die Komplementation aufgehoben wurde. Durch Wurzelinfektion wurden jeweils 64 Pflanzen mit den Stämmen *CMM101*, *CMM101chpC β* und den komplementierten Mutanten, *CMM101chpC β -pIG216C β 2* und

CMM101 *chpC* β -pIG216C β 3, infiziert. Die komplementierten Mutanten CMM101 *chpC* β -pIG216C β 2 und CMM101 *chpC* β -pIG216C β 3 sind zwei unabhängig voneinander ausgewählte Kolonien nach der Komplementation. Bei dem 28-tägigen Pflanzentest wurden täglich die Welkesymptome protokolliert und am Ende des Tests das Gewicht, die Größe der Pflanzen und der Bakterientiter (cfu/g Pflanze) bestimmt. Die für die Infektion der Tomatenpflanze angeimpften Bakterienstämme und die am Ende des Pflanzentests reisolierten Bakterien wurden per PCR auf ihren Plasmidstatus (pCM1) überprüft. Alle Stämme wiesen jeweils das Plasmid pCM1 auf. Die Abbildung 4.16 (Seite 99) zeigt für den Kontrollstamm CMM101 einen typischen Welkeverlauf, mit einem Welkeindex von 15-16 Tagen. Die Welkeverläufe und die Ausprägung der Welkesymptome der Komplementanten CMM101 *chpC* β -pIG216C β 2 und CMM101 *chpC* β -pIG216C β 3 zeigten eindeutig, dass der Phänotyp des Curing-Derivats CMM101 wiederhergestellt werden konnte, da etwa gleich starke Welkesymptome wie bei CMM101 hervorgerufen wurden (Abb. 4.17, Seite 100). Die Komplementanten CMM101 *chpC* β -pIG216C β 2 und CMM101 *chpC* β -pIG216C β 3 erreichten eine Bakterientiter von $1,9 \times 10^9$ bzw. $9,5 \times 10^8$ cfu/g Pflanze, der dem Titer des Kontrollstamms CMM101 von $9,9 \times 10^9$ cfu/g Pflanze entspricht (Tab. 4.11, Seite 107). Dementsprechend sollte die Inaktivierung des *chpC*-Gens den veränderten Phänotyp verursacht haben.

Einbringen des *chpC*-Gens (pIG216C β) in die Deletionsmutante CMM101 β 330-18 und den Wildtyp *Cmm* NCPPB382

Da durch Inaktivierung des *chpC*-Gens gezeigt werden konnte, dass das *chpC* eine wichtige Funktion in der Kolonisation besitzt, besteht die Möglichkeit den virulenten Phänotyp der Deletionsmutante CMM101 β 330-18 durch *chpC* wiederherzustellen. Außerdem wurde überprüft, welche Auswirkungen eine Verdopplung des *chpC*-Gens im Wildtyp *Cmm* NCPPB382 bezüglich der Pathogenität hat (Gen-Dosis-Effekt).

Durch Elektroporation wurde das Plasmid pIG216C β in die Deletionsmutante CMM101 β 330-18 und den Wildtypstamm *Cmm* NCPPB382 transformiert und auf Neomycin-haltigem C-Medium plattiert. Bei beiden Stämmen wurden resistente Kolonien durch Plasmidisolierung und Spaltung der isolierten DNA mit dem Restriktionsenzym *Hind*III im Agarosegel überprüft. Bei der Überprüfung des Plasmid-Status von pCM1 und pCM2 wurde per PCR festgestellt, dass die Mutante sowie der Wildtypstamm *Cmm* NCPPB382 pCM1

besitzen, dem Wildtypstamm *Cmm* NCPPB382 jedoch pCM2 verloren gegangen ist. Als Kontrollstamm dient somit das Curing-Derivat CMM101. Die Stämme CMM101/β330-18-pIG216Cβ und CMM101-pIG216Cβ zeigten das richtige Bandenmuster und wurden für den Pflanzentest verwendet. Bei dem Pflanzentest wurden jeweils 64 Pflanzen mit den Stämmen CMM101, CMM101/β330-18, CMM101/β330-18-pIG216Cβ und CMM101-pIG216Cβ durch Wurzelinfektion infiziert. Täglich wurden die Welkesymptome nach dem vierstufigen Schema protokolliert. Die dazugehörigen Welkeverläufe sind in Abbildung 4.18 dargestellt.

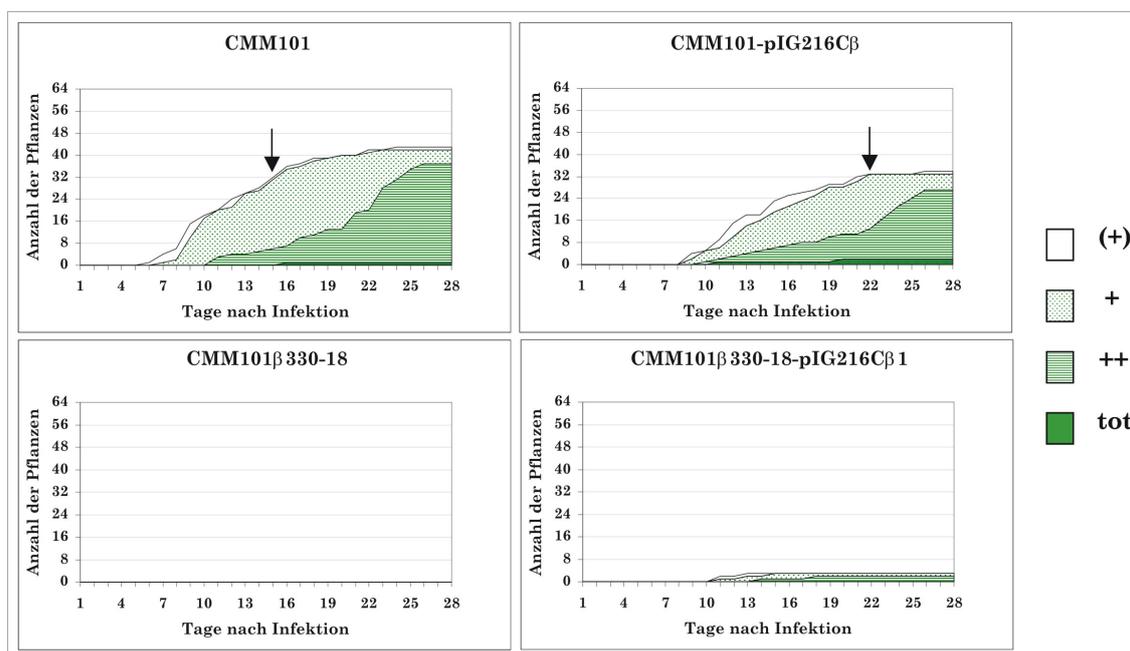


Abbildung 4.18: Welkeverlaufsdigramm der mit CMM101, CMM101-pIG216Cβ, CMM101/β330-18 und CMM101/β330-18-pIG216Cβ infizierten Tomatenpflanzen, der Pfeil markiert den Welkeindex

Das zweifache Vorhandensein des *chpC*-Gens hat in Bezug auf die Virulenz nur eine leichte Auswirkung und der Titer *in planta* ist jedoch unverändert, da CMM101 $9,9 \times 10^9$ und CMM101-pIG216Cβ bei $2,7 \times 10^9$ Bakterien pro Gramm Pflanze erreichen. Beim Stamm CMM101-pIG216Cβ welken weniger Pflanzen als beim Kontrollstamm. Der Welkeindex wird erst nach 22 Tagen, beim Kontrollstamm jedoch schon nach 15-16 Tagen erreicht (Abb. 4.18). Es könnte auf einen Gen-Dosis-Effekt hindeuten, der eine Reduzierung der Welkesymptome mit sich zieht, dies muss aber in weiteren Pflanzentests statistisch abge-

sichert werden.

Beim Stamm CMM101 β 330-18-pIG216C β konnte keine Ausbildung von Welkesymptomen beobachtet werden. Die drei welkenden Pflanzen des Stamms CMM101 β 330-18-pIG216C β sind nicht als signifikante Veränderung zu betrachten, da auch in manchen Pflanzentests mit der Deletionsmutante CMM101 β 330-18 einige wenige Pflanzen welken (Siehe Abb. 4.19, Seite 104). Die Anwesenheit des *chpC*-Gens bewirkt keine Veränderung des Phänotyps der avirulenten Deletionsmutante CMM101 β 330-18. Der Kontrollstamm CMM101 zeigte ein typisches Krankheitsbild. Die Deletionsmutante CMM101 β 330-18 erreicht einen Bakterientiter von $2,8 \times 10^4$ und CMM101 β 330-18-pIG216C β einen von $8,0 \times 10^3$ Bakterien pro Gramm Pflanze. Es ist zu vermuten, dass auf dem fehlendem ca. 130 kb großem chromosomalen Fragment weitere Gene lokalisiert sind, die nur im Zusammenspiel mit *chpC* Pathogenität erzeugen.

Einbringen des Plasmids pBA216-13f04 in die Deletionsmutante CMM101 β 330-18

In einer parallel verlaufenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Inaktivierung der beiden ebenfalls in der *chp*-Genregion lokalisierten putativen sekretierten Serinproteasen PpaA und PpaC, einer anderen Subfamilie als die *chp*-Gene angehörend, ebenfalls eine Reduzierung des Titers und der Welkesymptome hervorrufen (Abt, 2003; Kirchner, 2003).

Es sollte überprüft werden, ob diese beiden Serinproteasen in der Mutante CMM101 β 330-18 den Welke-Phänotyp wiederherstellen können. Dafür ist das Plasmid pBA216-13f04, bestehend aus dem Shuttlevektor pHN216 und einem 6,5 kb großem Insert, das die Gene *ppaA*, *ppaB1*, *ppaC* und *pelC* trägt, verwendet worden. Die *ppa*-Gene kodieren Serinproteasen und *pelC* eine der beiden Pektat-Lyasen. Die Gene *ppaB1* und *pelC* liegen innerhalb des DR2a, der bereits in Abb. 4.11 auf Seite 90 gezeigt wurde. Nach Elektroporation der Plasmid-DNA in kompetente Zellen der Deletionsmutante CMM101 β 330-18 wurden Neo^R-Kolonien durch Southern Hybridisierung mit einer *ppaA*-Sonde, einem 1,5 kb großen *Bam*HI-Fragment aus dem Vektor pBA216-13f04, überprüft. In *Bgl*II-gespaltener GesamtdNA der Deletionsmutante CMM101 β 330-18 konnte das zu erwartende Fragment, des frei vorliegenden Plasmids, von ca. 7 kb bei der Hybridisierung mit der *ppaA*-Sonde nachgewiesen werden. Beim Pflanzentest wurden jeweils 64 Tomatenpflanzen mit den Stämmen CMM101, CMM101 β 330-18 und CMM101 β 330-18-pBA216-13f04 infiziert.

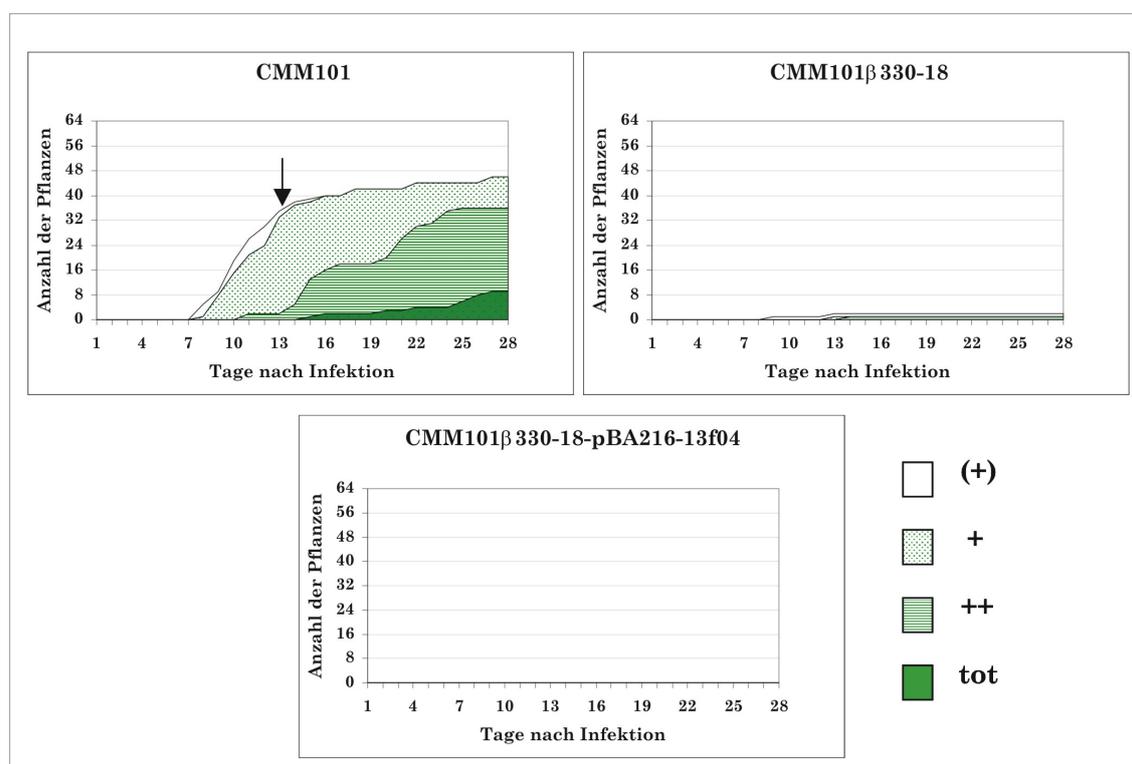


Abbildung 4.19: Welkeverlaufsdigramm der mit CMM101/β330-18, CMM101/β330-18-pBA216-13f04 und CMM101 infizierten Tomatenpflanzen, der Pfeil markiert den Welkeindegang

Der Stamm CMM101/β330-18-pBA216-13f04 zeigte im 28-tägigen Pflanzentest mit täglicher Protokollierung keine Welkesymptome und keine Erhöhung des Titters gegenüber CMM101/β330-18 (siehe Tab. 4.11, Seite 107). Die Kontrollstämme CMM101 und CMM101/β330-18 zeigten ihr normales Krankheitsbild. Die zum Pflanzentest gehörenden Welkeverläufe sind in Abbildung 4.19 dargestellt. Da das Einbringen der drei *ppa*-Gene und des *chpC*-Gens in die Deletionsmutante CMM101/β330-18 einzeln keine Verbesserung der Kolonisationsfähigkeit und keine Ausbildung der Welkesymptome bewirkte, sollten diese Gene kombiniert in einem Plasmid für eine weitere Einbringung in die Deletionsmutante verwendet werden. Da das *chpC*-Gen sowie die *ppa*-Gene für Serinproteasen aus unterschiedlichen Familien kodieren, könnten diese Proteasen in einer Reaktionskaskade eingebunden sein. Bei solch einem synergetischen Effekt müssten mehrere Faktoren gleichzeitig vorhanden sein, um den Welke-Phänotyp zu erzeugen.

Einbringen des Plasmids pIG216C-13f04 in die Deletionsmutante CMM101 β 330-18

Zur Überprüfung, ob die Gene *chpC* und die drei *ppa*-Gene einen additiven Effekt hervorrufen oder eine Signalkette schließen könnten, wurde zunächst das aus dem Genomprojekt stammende, die *ppa*-Gene tragende, Plasmid cmis3p0013f04 mit der Restriktionsendonuklease *StuI* hydrolysiert und dephosphoryliert. Das Plasmid cmis2p0456d03, das das *chpC*-Gen trägt, wurde mit *EcoRV* gespalten und das 2,5 kb *EcoRV*-Fragment, *chpC* tragend, aus dem Agarosegel eluiert und mit dem *StuI*-gespaltenen Plasmid cmis3p0013f04 ligiert. Die daraus resultierenden Plasmide pIGC-13f04 α und pIGC-13f04 β wurden mit *EcoRV* hydrolysiert und mit dem *EcoRV* gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pHN216 ligiert. Das daraus resultierende Plasmid pIG216C-13f04 β (Abb. 4.20) wurde durch Elektroporation in kompetente Zellen der Deletionsmutante CMM101 β 330-18 transformiert. Die auf Chloramphenicol-/Neomycinhaltigem SB-Medium wachsenden Kolonien wurden auf ihren Plasmidgehalt überprüft. Der plasmidhaltige Klon CMM101 β 330-18-pIG216C-13f04 β wurde für den Pflanzentest verwendet (Abb. 4.21, Seite 106).

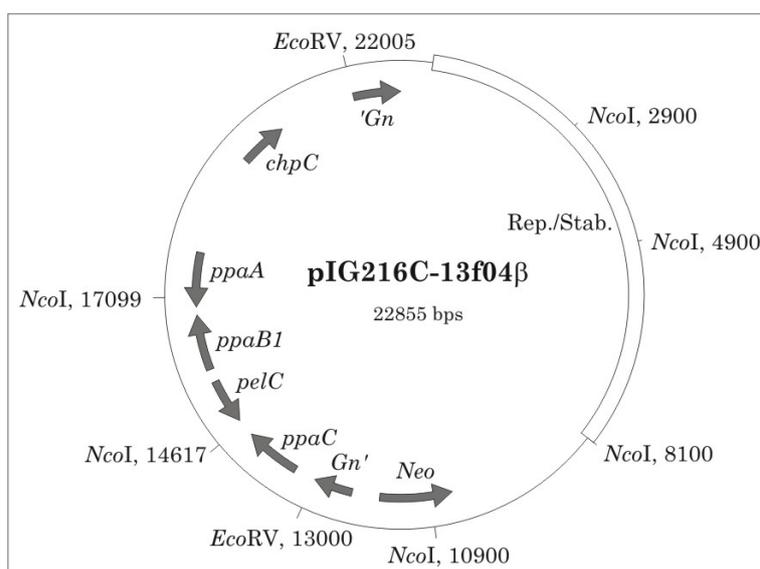


Abbildung 4.20: Physikalische Karte des Plasmids pIG216C-13f04 β , Rep./Stab.: Replikation und Stabilitätsregion von pCM2, Neo: Neomycin-Resistenzgen, Gn: Gentamycin-Resistenzgen, *chpC*, *ppaA*, *ppaB1*, *ppaC*: putative Serinproteasen, *pelC*: putative Pektat-Lyase

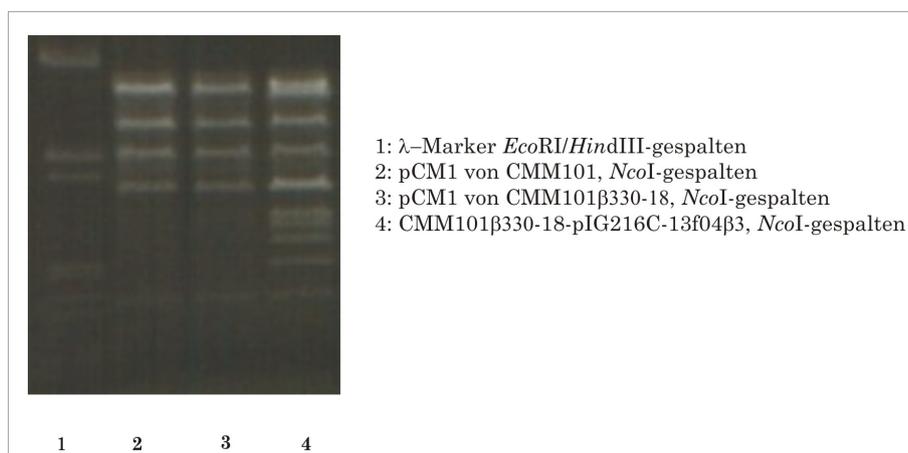


Abbildung 4.21: Plasmidisolierung der Stämme CMM101/ β 330-18, CMM101 und CMM101/ β 330-18-pIG216C-13f04 β

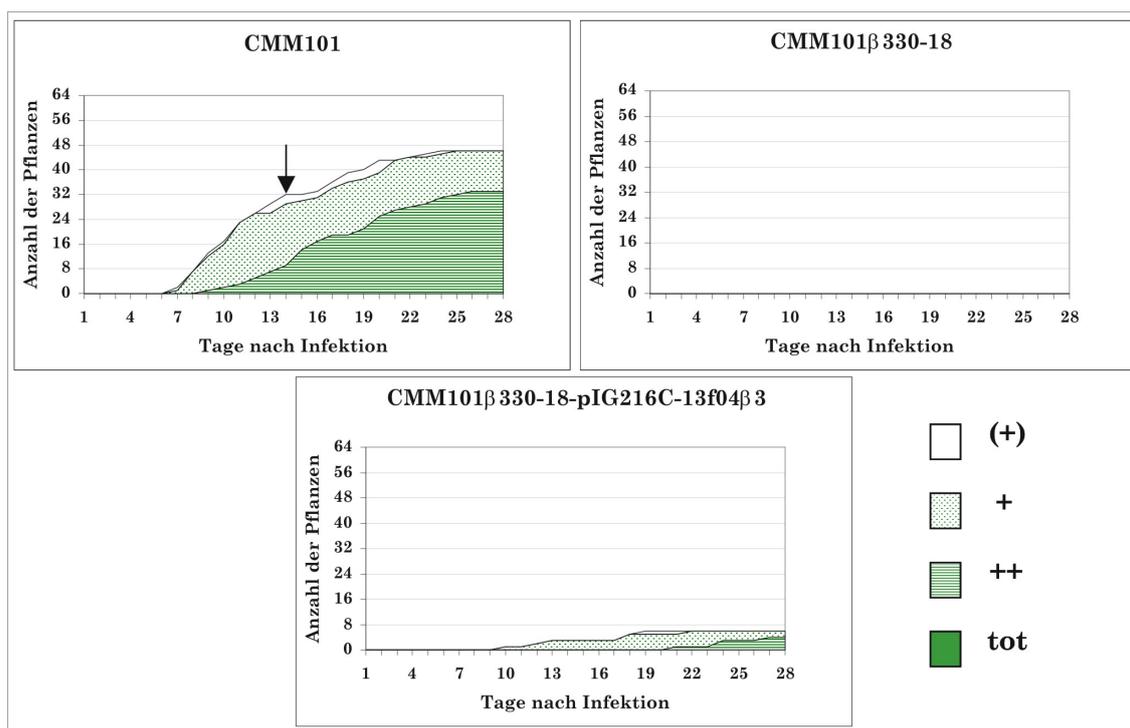


Abbildung 4.22: Welkeverlaufdiagramm der mit CMM101, CMM101/ β 330-18 und CMM101/ β 330-18-pIG216C-13f04 infizierten Tomatenpflanzen, der Pfeil markiert den Welkeindex

Stamm	Plasmidstatus	WI n=64	Virulenz	Titer (cfu/g Pflanze)
<i>Cmm</i> NCPPB382	pCM1 pCM2	12	+	$7,4 \times 10^9 \pm 7,3 \times 10^9$ (n=10)
CMM101	pCM1	15-16	+	$9,9 \times 10^9 \pm 4,1 \times 10^9$ (n=10)
CMM101- pIG216C β	pCM1 pIG216C β	22	+	$2,7 \times 10^9 \pm 3,1 \times 10^9$ (n=5)
CMM101 <i>chpC</i> β	pCM1	—	—	$2,0 \times 10^7 \pm 3,2 \times 10^7$ (n=20)
CMM101 <i>chpC</i> β - pIG216C β 2	pCM1 pIG216C β	17	+	$1,9 \times 10^9 \pm 1,7 \times 10^9$ (n=20)
CMM101 <i>chpC</i> β - pIG216C β 3	pCM1 pIG216C β	15	+	$9,5 \times 10^8 \pm 5,4 \times 10^8$ (n=20)
CMM101 β -330-18	pCM1	—	—	$2,8 \times 10^4 \pm 6,5 \times 10^4$ (n=10)
CMM101 β -330-18- pIG216C β	pCM1 pIG216C β	—	—	$8,0 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^4$ (n=5)
CMM101 β -330-18- pBA216-13f04	pCM1 pBA216-13f04	—	—	$1,5 \times 10^4 \pm 3,6 \times 10^4$ (n=5)
CMM101 β -330-18- pIG216C β -13f04 β	pCM1 pIG216C β -13f04 β	—	—	$9,1 \times 10^6 \pm 2,0 \times 10^7$ (n=8)

Tabelle 4.11: Eigenschaften der *Cmm*-Stämme, WI: Welkeindex (in Tagen angegeben), —: keinen Welkeindex bzw. avirulent, +: virulent, n= Anzahl der Pflanzen, die in die Berechnung eingegangen sind, \pm : jeweilige Standardabweichung

Jeweils 64 Pflanzen wurden im Pflanzentest mit der Deletionsmutante CMM101 β 330-18, CMM101 und CMM101 β 330-18-pIG216C-13f04 β infiziert. Täglich wurde die Ausbildung der Welkesymptome protokolliert. Der Kontrollstamm CMM101 wies seinen typischen Welke-Phänotyp auf. Bei der Deletionsmutante und den Stämmen mit dem Plasmid pIG216C-13f04 wurden bei dem Stamm CMM101 β 330-18-pIG216C-13f04 β sechs Pflanzen mit Krankheitssymptomen beobachtet, wohingegen bei CMM101 β 330-18 keine Welkesym-

ptome auftraten (Abb. 4.22, Seite 106). Da sechs von 64 Pflanzen keine deutliche Veränderung darstellt, reicht somit auch die gemeinsame Anwesenheit der Gene *chpC*, *ppaA*, *ppaB1* und *ppaC* nicht für eine Rekonstitution des Wildtyp-Phänotyps aus. Auch der Titer von 10^6 cfu/g Pflanze des Stamms mit dem Plasmid pIG216C-13f04 erreichte nicht das Niveau des Kontrollstamms von 10^9 cfu/g Pflanze (Tab. 4.11, Seite 107). Für die Wiederherstellung des Welke-Phänotyps bei der Deletionsmutante müssen weitere Gene aus der *chp/tomA*-Region erforderlich sein. Die Gene *chpC*, *ppaA*, *ppaB1* und *ppaC* reichen nicht aus, um die vermutete Signalkette, die für eine effektive Kolonisation und die Ausbildung der Welkesymptome benötigt wird, zu schließen.

Alle im Pflanzentest überprüften Stämme sind in der Tabelle 4.11 auf Seite 107 aufgeführt. Bei allen Pflanzentests wurden die Bakterienkulturen der jeweiligen Stämme auf den endogenen Plasmid-Status durch Southern Hybridisierungen mit einer *pat-1*- bzw. *celA*-Sonde oder durch PCR mit den spezifischen *pat-1*- und *celA*-Primern überprüft (Tab. 4.11, Seite 107).

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

Phytopathogene Bakterien können mit Pflanzen in einer kompatiblen oder inkompatiblen Interaktion stehen. Bei der kompatiblen Reaktion werden physiologische Antworten induziert, die für die Entwicklung von Krankheitssymptomen notwendig sind. Ein lokales schnelles Absterben von Pflanzenzellen in der Umgebung der Infektionsstelle, die eine Ausbreitung des Pathogens verhindert, wird hypersensitive Reaktion (HR) genannt und tritt als inkompatible Reaktion auf. Bei dieser Abwehrreaktion werden Nekrosen gebildet, die durch Austrocknung, schnellen Zelltod, Ausbleichen und Abflachen der betroffenen Pflanzenzellen entstehen. Der Schutz des umliegenden Gewebes wird durch das Zurückhalten der Bakterien erreicht. Für die HR-Induktion werden Elicitoren benötigt. Elicitoren die eine HR auslösen können, sind z. B. Harpins, die in die Interzellularräume der Pflanzenzellen gelangen, oder Avr-Effektor-Proteine, die in die Pflanzenzelle eindringen (Galán and Collmer, 1999). Die allgemeine Pflanzenabwehr erfolgt durch ein Zusammenwirken verschiedener Mechanismen. Ein entscheidender Virulenzfaktor ist die Kolonisationsfähigkeit der phytopathogenen Bakterien. Die erfolgreiche Besiedelung der Pflanzen ist eine notwendige

Vorraussetzung für die in späteren Stadien auftretende Symptomausbildung. Bei *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* besteht eine Korrelation zwischen der Kolonisationsfähigkeit/Virulenz der Tomate und der Induktion der HR auf Nicht-Wirtspflanzen. Die Stämme *Cmm* NCPPB382, CMM101, CMM102, CMM100 lösten eine hypersensitive Reaktion bei der Infektion des Blattgewebes der Nicht-Wirtspflanze *Mirabilis jalapa* aus (Bermpohl et al., 1996). Die Ausbildung einer Nekrose am Infiltrationsort ist nach 48-72 Stunden zu erkennen (Abb. 4.23).

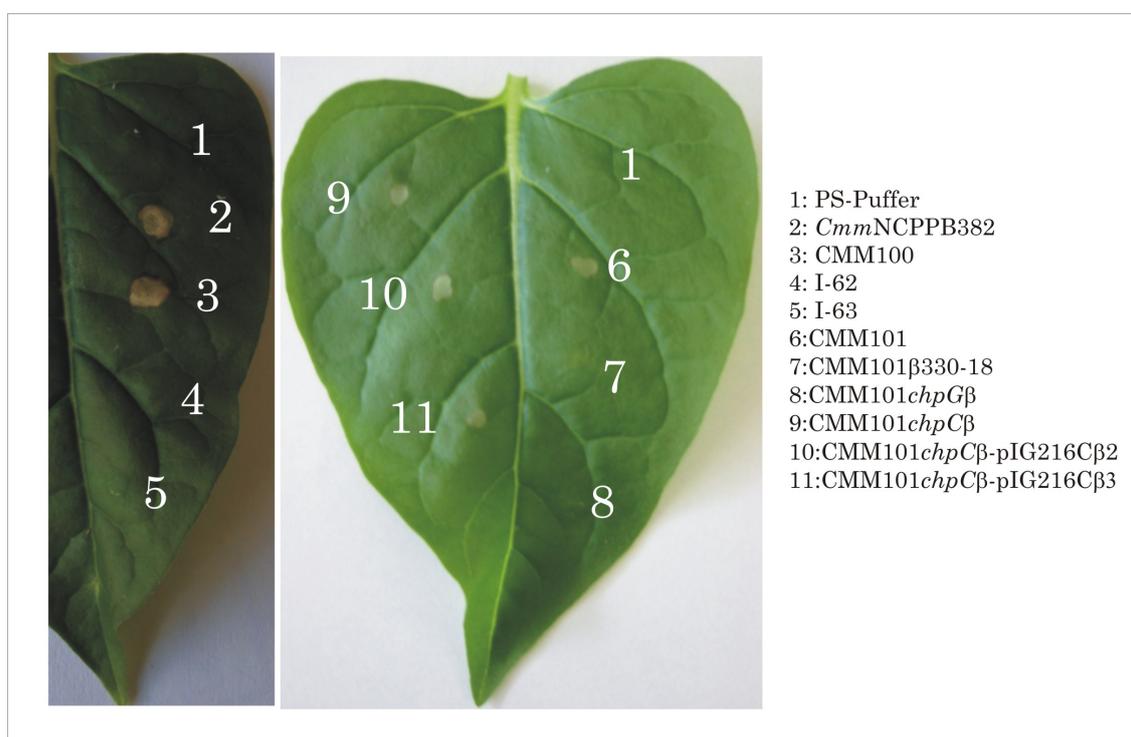


Abbildung 4.23: HR-Ausbildung auf einem *Mirabilis jalapa*-Blatt nach Infiltration mit verschiedenen *Cmm*-Stämmen

Für die Untersuchung der HR auf *Mirabilis jalapa* wurden als positive Kontrollen die Stämme *Cmm* NCPPB382 und CMM100 verwendet. Als Negativkontrolle wurde der PS-Puffer, in dem die Stämme resuspendiert wurden, verwendet, um die Möglichkeit auszuschließen, dass PS-Puffer an der Auslösung der HR beteiligt sein könnte. Für die Untersuchung der HR wurden die Bakteriensuspensionen der Israel-Isolate I-62, I-63 und der Stämme ZUM3036 und ZUM3121, aus den Niederlanden, getestet. Außerdem wurden die Mutanten der Gene *chpC*, *chpG*, *nagA*, *pelC*, die Deletionsmutante CMM101 β 330-18 und die Komplementan-

ten der *chpC*-Mutante (CMM101*chpC* β -pIG216C β 2 und CMM101*chpC* β -pIG216C β 3) in das Blattgewebe der *Mirabilis jalapa* infiltriert. Die Ergebnisse der Infiltration sind in Abb. 4.23 (Seite 109) dargestellt und in der Tabelle 4.12 zusammengefasst.

Stamm	HR	Titer (cfu/g Pflanze)	Welke
<i>Cmm</i> NCPPB382	+	$7,4 \times 10^9 \pm 7,3 \times 10^9$ (n=10)	+
CMM101	+	$9,9 \times 10^9 \pm 4,1 \times 10^9$ (n=10)	+
I-62	—	$3,5 \times 10^7 \pm 4,4 \times 10^7$ (n=10)	—
I-63	—	$2,4 \times 10^6 \pm 7,6 \times 10^6$ (n=6)	—
ZUM3036	—	$4,2 \times 10^6 \pm 8,0 \times 10^6$ (n=5)	—
ZUM3121	—	$1,7 \times 10^6 \pm 4,8 \times 10^6$ (n=3)	—
CMM101 <i>chpC</i> β	+	$2,0 \times 10^7 \pm 3,2 \times 10^7$ (n=20)	(—)
CMM101 <i>chpC</i> β -pIG216C β 2	+	$1,9 \times 10^9 \pm 1,7 \times 10^9$ (n=20)	+
CMM101 <i>chpC</i> β -pIG216C β 3	+	$9,5 \times 10^8 \pm 5,4 \times 10^8$ (n=20)	+
CMM101 β -330-18	—	$2,8 \times 10^4 \pm 6,5 \times 10^4$ (n=10)	—
CMM101 <i>chpG</i> β	—	$1,8 \times 10^9 \pm 2,4 \times 10^9$ (n=10)	+
<i>Cmm</i> NCPPB382 <i>nagA</i> α	+	$1,1 \times 10^{10} \pm 8,9 \times 10^9$ (n=4)	+
CMM101 <i>pelC</i> α	+	$6,7 \times 10^9 \pm 6,0 \times 10^9$ (n=10)	+
PS-Puffer	—	0	—

Tabelle 4.12: Ergebnisse der hypersensitiven Reaktion, nt: nicht getestet, +: HR auslösend bzw. virulent, —: nicht HR auslösend bzw. avirulent, (—): schwach virulent, \pm : Standardabweichung, Titer: Bakterientiter der Tomatenpflanze

Die Überprüfung der hypersensitiven Reaktion mit der Nicht-Wirtspflanze *Mirabilis jalapa* zeigte, dass die avirulenten Isolate I-62, I-63, ZUM3036 und ZUM3121 und die avirulente Deletionsmutante CMM101 β -330-18 keine HR auslösen können. Diesen Stämmen fehlt offenbar der Elicitor für die HR. Die Mutanten CMM101*chpC* β , CMM101*pelC* α , *Cmm* NCPPB382*nagA* α lösten eine HR bei der Nicht-Wirtspflanze aus. Die Mutante CMM101*chpG* β , die im Pflanzentest mit der Tomate virulent ist, zeigte jedoch keine Nekrosenbildung auf dem Blatt der *Mirabilis jalapa*. Es scheint, dass möglicherweise *chpG* selbst als Elicitor oder in der Bildung des Elicitors eine Rolle spielt. Die Tabelle 4.12 zeigt die Ergebnisse aller getesteten Stämme im Pflanzentest mit *Solanum lycopersicum* und *Mi-*

rabilis jalapa. Die *chpC*-Mutante ist in der Kolonisationsfähigkeit eingeschränkt, erreicht aber einen Titer bis zu 10^7 cfu/g Pflanze und erzeugt eine HR. Die Deletionsmutante CMM101 β -330-18 ruft keine HR hervor und erreicht in der Tomatenpflanze nur einen Titer von 10^3 cfu/g Pflanze. Es hat den Anschein, dass die hypersensitive Reaktion bei der Nichtwirtspflanze *Mirabilis jalapa* erst ausgelöst wird, wenn der Stamm auch in der Lage ist, die Wirtspflanze *Solanum lycopersicum* effektiv zu kolonisieren.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung des *chpC*-Gens eine Auswirkung auf die Kolonisationsfähigkeit und auf die Virulenz hat. Als avirulent kann die Mutante CMM101*chpC* β eingestuft werden, da nur 7 von 64 Pflanzen die mildesten Welkesymptome aufweisen, und eine effektive Kolonisation der Tomatenpflanze nicht möglich ist, was durch einen Bakterientiter *in planta* von $2,0 \times 10^7$ cfu/g Pflanze gezeigt werden konnte. Der Wildtyp weist hingegen einen Welkeindex von 12 Tagen auf und erreicht einen Titer von $7,4 \times 10^9$ cfu/g Pflanze. Durch Komplementation des *chpC*-Gens konnte der Wildtyp-Phänotyp wieder hergestellt werden.

Die Inaktivierung des *chpG*-Gens hat keine Auswirkung auf die Ausbildung der Krankheitssymptome bei *Solanum lycopersicum*, jedoch kann bei der Nicht-Wirtspflanze *Mirabilis jalapa* keine Nekrosenbildung beobachtet werden. Vermutlich ist *chpG* ein Elicitor oder spielt eine Rolle bei der Bildung des Elicitors, der bei der Nicht-Wirtspflanze für die HR-Ausbildung benötigt wird.

Die Isolate I-62, I-63, ZUM3036 und ZUM3121 sind ebenfalls avirulent und ihnen fehlen alle *chp*-Gene, außer bei I-63, bei dem durch Southern Hybridisierung *chpB* nachgewiesen werden konnte.

Die „direct repeats“ des *pat-1*-Gens zeigten bei den Isolaten und bei dem aktuellen Wildtypstamm Veränderungen in der Anzahl. Ebenso verhielt es sich mit der Poly-G-Region stromaufwärts der „direct repeats“. Jedoch haben diese Veränderungen keinen Einfluss auf die Pathogenität.

Durch Einbringen der Gene *chpC*, *ppaA* und *ppaC* in den Stamm CMM101 β -330-18 konnte keine Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps erreicht werden.

Es scheint eine Korrelation zwischen der Anwesenheit der *chp*-Gene und der Virulenz bzw. HR-Auslösung zu geben.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Verbreitung der *chp*-Gene in verschiedenen *Cmm*-Isolaten über Southern Hybridisierungen und ihr Einfluss auf die Virulenz untersucht. Weiterhin wurden durch Inaktivierung chromosomal kodierter Gene Hinweise darauf gewonnen, ob deren Genprodukte an der Interaktion von *Cmm* mit der Wirtspflanze *Solanum lycopersicum* beteiligt sind, so dass z. B. die Kolonisation der Tomatenpflanze beeinträchtigt wird. Außerdem wurde bei der avirulenten Deletionsmutante CMM101 β 330-18 durch Einbringung verschiedener Gene versucht, den virulenten Wildtyp-Phänotyp wiederherzustellen.

5.1 Die Pat-1 Proteinfamilie und ihre Funktion in der Pathogenität von *Cmm*

Einer der beiden Virulenz-Faktoren des Wildtyps *Cmm* NCPPB382 ist die Pathogenitätsdeterminante *pat-1*, die auf dem endogenen Plasmid pCM2 lokalisiert ist (Dreier et al., 1997) und dessen Genprodukt Übereinstimmungen zu Serinproteasen von *Lysobacter enzymogenes*, *Streptomyces griseus* und *Staphylococcus* sp. aufweist. Allerdings konnte bisher keine proteolytische Aktivität von *Cmm* mit klassischen Proteasesubstraten (Casein, Azocasein und Azocoll) festgestellt werden (Burger et al., 2005). Die genaue Funktion von *pat-1* ist daher noch unklar.

Die Pat-1 Homologen, *phpA* und *phpB*, die auf dem Plasmid pCM2 lokalisiert sind, und *chpA*, das auf dem Chromosom liegt, sind zunächst über Southern Hybridisierung mit einer *pat-1*-Sonde identifiziert worden (Burger et al., 2005). Durch Sequenzierungen des Cosmidsubklons 7-72-9, der Transposonmutante CMM101 β 370-45 und auf der Basis der Sequenzinformation des *Cmm* Genomprojektes konnten sechs weitere Pat-1 Homologe (ChpB-ChpG), die in einer \sim 80 kb umfassenden chromosomalen Region geclustert sind (*chp*-Region), identifiziert werden. Alle weisen wie Pat-1 die typischen Eigenschaften der

Serinproteasen des Trypsin-Typs auf.

Im Genom von *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ATCC33113 (*Cms*), das am Sanger-Centre sequenziert wird, sind mindestens elf *chp*-Gene (*chpS1*-*chpS11*) identifiziert worden (Gartemann, persönliche Mitteilung). *Cms* ist nah mit *Cmm* verwandt und stellt den Erreger der Ringfäule bei der Kartoffel dar. Eventuell könnten *chp*-Gene auch bei anderen Subspezies von *Clavibacter michiganensis* an der Ausbildung von Krankheitssymptomen beteiligt sein und somit eine Rolle in deren Pathogenität spielen.

Proteasen von Mikroorganismen sind meist sekretierte Enzyme und werden anhand der katalytischen Aminosäure im aktiven Zentrum klassifiziert. Es wird unter anderem zwischen Aspartat-, Cystein-, Metallo- und Serinproteasen unterschieden. Die Chp-Proteine gehören zu einer Familie von Serinproteasen, die in die Chymotrypsin-Subfamilie S1A eingeordnet wird. Sie besitzen eine katalytische Domäne, die aus einem Serinmotiv [DNS-TAGC][GSTAPIMVQH]_x(2)G[DE]SG[GS][SAPHV][LIVMFYWH][LIVMFYSTANQH], einem konservierten Aspartat und einem Histidinmotiv [LIVM][ST]A[STAG]HC, besteht. Zusätzlich sind sechs Cysteine, außer bei ChpC, das nur vier Cysteine besitzt, konserviert. Die konservierten Cysteine der Chp-Proteine kommen teilweise auch in anderen Serinproteasen der Subfamilie S1A vor. Diese Cysteine könnten Disulfidbrücken im reifen Protein bilden. Alle Pat-1 Homologe haben am N-Terminus ein Leaderpeptid, das impliziert, dass die Sekretion dieser Serinproteasen über einen Signalpeptid vermittelten Transport verläuft. Die Abspaltung des Signalpeptids erfolgt bei Prokaryoten vorzugsweise hinter einem Alanin, kann aber auch hinter einem Glycin oder Serin erfolgen (Ray et al., 1986). In der DNA-Sequenz der Gene *chpA*, *chpB* und *chpD* konnten Leserasterschübe sowie „in-frame“ Stoppkodons identifiziert werden. Diese führen zu verkürzten und wahrscheinlich funktionslosen Proteinen. Es handelt sich hier also um sogenannte Pseudogene. Die anderen Gene, *chpC*, *chpE*, *chpF* und *chpG*, scheinen intakt und es besteht die Möglichkeit der Expression aktiver Serinproteasen.

In den Proteinsequenzen von Pat-1 und ChpA konnte nah des C-Terminus ein mögliches Sortase-Motiv identifiziert werden, jedoch fehlen die Trans-Membran-Helix und der polare C-Terminus. Bei *Staphylococcus aureus* ist das Sortase-Motiv LPXTG dafür verantwortlich, dass ein Protein kovalent an die bakterielle Zellwand gebunden wird (Mazmanian et al., 2001). Die Sortase A von *Staphylococcus aureus* spaltet das Oberflächenprotein zwischen dem Threonin- (T) und dem Glycinrest (G) des LPXTG-Motivs und katalysiert die Bildung einer Amidbindung zwischen der Carboxylgruppe des Threonins am C-terminalen

Ende des Polypeptids und der Aminogruppe der Pentaglycinquervernetzung des Zellwandpeptidoglycans (Marraffini et al., 2004; Mazmanian et al., 2001; Navarre and Schneewind, 1999). Da die Aminosäuren Threonin und Serin zu den neutralen Aminosäuren gehören und eine OH-Gruppe besitzen und anstelle des „X“ irgendeine Aminosäure vorkommen kann, könnte postuliert werden, dass das LPGSG-Motiv von *Cmm* ein Sortase-Motiv darstellt. Bisher gibt es allerdings keine experimentellen Hinweise dafür, dass die Pathogenitätsdeterminate Pat-1 an der Zelloberfläche verankert ist. Da ChpA ein Pseudogen darstellt und der C-terminale Bereich nicht exprimiert wird, hat das „Sortase-Motiv“ bei ChpA keine Bedeutung. Die anderen Mitglieder der Pat-1 Proteinfamilie haben kein Sortase-Motiv und sollten deshalb frei im Sekretom vorliegen.

Die Gene aller Mitglieder der Pat-1 Proteinfamilie enthalten viele in *Cmm* selten verwendete Kodons. Auf der Basis von 12986 Kodons aus dem Genom von *Cmm*, wurden 12 Kodons ermittelt, die im Genom von *Cmm* nur 55 mal auftraten (Engemann, 2001). In *pat-1* werden diese 45 mal, in *chpC* 37 mal und in *chpG* 8 mal verwendet. Dies scheint aber für die Expression kein Problem zu sein, da die Gene *pat-1*, *chpC* und *chpG* einen Phänotyp besitzen und somit ausreichend exprimiert werden. Jedoch kann keine Aussage über die Stärke der Expression dieser Gene getroffen werden. Ob die restlichen Mitglieder der Pat-1 Proteinfamilie exprimiert werden, ist zur Zeit noch unklar.

Die erneute Klonierung und Sequenzierung der *pat-1*-Region von *Cmm* (3,75 kb *Bgl*III-Fragment) zeigte, dass im abgeleiteten Protein die katalytische Triade der Serinproteasen, die aus einem Serin- und Histidinmotiv und einem konservierten Aspartat besteht, vollständig vorhanden ist. In der *pat-1*-Sequenz, die vor 13 Jahren erstmals erstellt wurde, trat das Histidin-Motiv aufgrund eines Lesefehlers nicht auf, zeigte jedoch ein Serinmotiv und das konservierte Aspartat (Dreier, 1992). Da in der Swiss-Prot-Datenbank Serinproteasen beschrieben wurden, die lediglich ein Serinmotiv aufwiesen und trotzdem zur Serinproteasefamilie des Trypsin-Typs gehörten, wurde *pat-1* als putative Serinprotease eingestuft (Dreier, 1992). Stromabwärts des Histidinmotivs und im Repeat ACACGGGC, der zwischen den „inverted repeats“ liegt, liegen weitere Lesefehler vor. Außer den Lesefehlern sind keine Sequenzunterschiede auf DNA- und Protein-Ebene im offenen Leserahmen, gegenüber der vor 13 Jahren erstellten Sequenz, festzustellen. Weiterhin gibt es noch reale Sequenzveränderungen im 3'-Bereich von *pat-1*. Die aktuelle Sequenz besitzt nur 13 anstatt 19 Repeats und die Poly-G-Region besteht aus 15 anstelle von 14 Guanosin-Resten. Es ist möglich, dass diese Veränderungen während der Replikation oder durch Rekombi-

nation entstanden sind. Diese Veränderungen in der Sequenz haben jedoch offenbar keinen Einfluss auf die Virulenz des Wildtypstamms *Cmm* NCPPB382. Laut Dreier (1995) führt jedoch eine vollständige Deletion der Repetitionen zu einer Abschwächung der Virulenz, aber eine direkte Beteiligung an der Symptomausprägung bei infizierten Tomatenpflanzen konnte ausgeschlossen werden. Dreier (1995) postuliert, dass diese Region im 3'-Bereich von *pat-1* zur Stabilisierung der mRNA dient, da am 3'-Ende die Repetitionen des *pat-1*-Transkripts eine stabile Sekundärstruktur ausbilden können. Eine lange Halbwertszeit für die *pat-1* mRNA ist möglicherweise deshalb notwendig, um bei der Verwendung seltener Kodons in der Translation eine ausreichende Konzentration von Pat-1 Protein zu erreichen. Den anderen *pat-1* Homologen fehlt diese Sekundärstruktur im 3'-Bereich.

Weitere Sequenzanalysen zeigten, dass die Gene der Pat-1 Proteinfamilie einen zu *Cmm* differenzierten GC-Gehalt aufweisen, der wesentlich geringer als der durchschnittliche des *Cmm*-Genoms (73%) (Engemann, 2001) ist und zwischen 51,9% und 65,5% liegt. Die *chp*-Region, in der die *chp*-Gene lokalisiert sind, weist insgesamt einen niedrigen GC-Gehalt von durchschnittlich $\sim 64,6\%$ auf. Die benachbarte *tomA*-Region weist ebenfalls einen geringen GC-Gehalt von insgesamt durchschnittlich $\sim 68\%$ auf. Der geringe GC-Gehalt und die Anwesenheit mindestens zweier Pathogenitätsgene, *chpC* und *chpG*, könnten auf eine Pathogenitätsinsel (Pai) hindeuten, die über horizontalen Gentransfer erworben wurde. Pathogenitätsinseln sind für verschiedene Gram-negative und Gram-positive Bakterien beschrieben worden (Hacker and Kaper, 2000; Hacker et al., 1997). Bei Gram-negativen Bakterien werden die Pais nach folgenden Kriterien definiert (Hacker et al., 1997):

- große chromosomale DNA-Regionen (oft > 30 kb)
- DNA-Regionen tragen mehr als ein Virulenzgen (z.B. der α -Haemolysin-Gen-Cluster bei *E. coli*, bei *Salmonella typhimurium* die Typ-III-Sekretions- und Zwei-Komponenten-Gene)
- kommen generell bei Pathogenen vor, bei Nicht-Pathogenen einer Spezies oder verwandter Spezies fehlend oder nur sporadisch vorhanden
- hohe Mobilität durch kryptische „Mobilitäts“-Gene (IS-Elemente, Integrasen, Transposasen und Origins der Plasmid-Replikation)
- assoziiert mit tRNA-Genen und/oder IS-Elementen an ihren Enden
- kompakte, selbstständige genetische Einheiten, häufig von „direct repeats“ (DRs) flankiert

- unterschiedlicher GC-Gehalt im Vergleich zum übrigen Chromosom

In *Cmm* sind zwei „direct repeats“ DR1a und DR1b identifiziert worden, die die 130 kb große *chp/tomA*-Region flankieren. Andere Merkmale für Pais wie tRNA, IS-Elemente oder auch Mobilitätsgene fehlen in der *chp/tomA*-Region.

Bei *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*), dem Erreger der „ratoon stunting disease“ , ist das *pat-1*-Gen von *Cmm* in zweifacher Kopienzahl identifiziert worden ist, wobei eine Kopie ein Pseudogen darstellt. Die intakte Kopie des *pat-1*-Gens liegt auf einer sogenannten „pathogenicity island“ , daher wird vermutet, dass ein gemeinsamer Ursprung dieser Gene für *Lxx* und *Cmm* besteht (Monteiro-Vitorello et al., 2004). *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* und *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) sind taxonomisch nah mit *Clavibacter* verwandt. Bei *Cms*, dem Erreger der Ringfäule bei der Kartoffel *Solanum tuberosum*, sind jedoch elf *chp*-Gene identifiziert worden, die zu *pat-1* von *Cmm* homolog sind (Gartemann, persönliche Mitteilung). Eine Inaktivierung der Pat-1 Homologen von *Cms* könnte zeigen, ob z. B. das ChpC-Homologe (ChpS11) bei *Cms* sich ebenfalls auf die Pathogenität auswirkt.

5.2 Charakterisierung der Isolate aus Israel und den Niederlanden

In dem Wildtypstamm *Cmm* NCPPB382 sind die essentiellen Pathogenitätsdeterminanten *pat-1* und *celA* auf den Plasmiden pCM2 bzw. pCM1 lokalisiert. Verlust des einen oder anderen Plasmids und somit das Fehlen von *pat-1* oder *celA*, führt zu einer Abschwächung der Virulenz. Solche Stämme verursachen immer noch Welke und das Absterben der Tomatenpflanze, es dauert nur etwas länger als beim Wildtyp. Allerdings kann das plasmidfreie Curing-Derivat CMM100 keine Welkesymptome bei der Tomate auslösen, ist aber trotzdem in der Lage, als Endophyt die Wirtspflanze im gleichen Maße wie der Wildtyp zu kolonisieren (Meletzus et al., 1993).

Im Rahmen eines trilateralen Forschungsprojektes „The Molecular Basis for Pathogenicity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* and *E. herbicola* pv. *betae*“ mit Israel und Palästina wurden *Cmm*-Feldisolate aus Israel und avirulente Isolate aus den Niederlanden verfügbar, die in Southern Hybridisierungen von *Bgl*II-gespaltener Gesamt-DNA mit der *pat-1*-Sonde ein sich vom Wildtyp *Cmm*

NCPPB382 unterscheidendes Bandenmuster aufwiesen. Den Stämmen I-62, ZUM3036 und ZUM3121 fehlen *phpA*, *phpB* und *chpA* und dem Stamm I-63 fehlt *chpA*. Jedoch besitzen alle die Pathogenitätsdeterminante *pat-1*. Die Southern Hybridisierung mit der zweiten Pathogenitätsdeterminante *celA* als Sonde zeigte, dass alle Stämme auch *celA* besitzen (Zellermann, persönliche Mitteilung). Somit müssten diese Stämme virulent sein, jedoch konnte im Pflanzentest gezeigt werden, dass sie die Tomatenpflanze nicht effektiv kolonisieren können und avirulent sind. Die Isolate erreichen einen Titer von bis zu $3,5 \times 10^7$ cfu/g Pflanze, im Vergleich dazu liegt der Titer des Wildtypstamms bei etwa $7,4 \times 10^9$ cfu/g Pflanze. Die Kolonisationsfähigkeit der avirulenten Stämme ist schwächer als beim Wildtyp. Außerdem sind die Pflanzen nach Infektion mit den avirulenten Stämmen wesentlich größer und schwerer als nach Infektion mit den virulenten Stämmen.

Da es möglich ist, dass die Pathogenitätsdeterminante *pat-1* der avirulenten Stämme Mutationen im offenen Leserahmen besitzt und deshalb keine Welke ausgelöst wird, wurde das 3,75 kb *BglII*-Fragment von *pat-1* der avirulenten Stämme analysiert. Es zeigte sich, dass keine Sequenzveränderungen im offenen Leserahmen vorhanden sind, allerdings im 3'-Bereich die Anzahl der Guanosin-Reste und der Repeats variiert. Bei den Isolaten aus Israel und den Niederlanden ließ sich nicht klären, ob und die Anzahl an Guanosin-Resten bzw. Repeats mit Virulenz bzw. Avirulenz korreliert, da der aktuelle Wildtypstamm *Cmm* NCPPB382 und der Stamm I-63, die die gleiche Anzahl des Repeats TTGCCGG (8) besitzen, eine unterschiedliche Virulenz aufweisen. Der aktuelle *Cmm* NCPPB382 ist virulent, wohingegen der Stamm I-63 avirulent ist. Die Zahl der Guanosin-Reste der Poly-G Region dieser Stämme liegt bei 15 bzw. 16. Die Stämme ZUM3036 und ZUM3121 sind avirulent, weisen jedoch 13 bzw. 12 Repeats des Typs TTGCCGG und 23 bzw. 20 Guanosin-Reste auf.

Da den Stämmen I-62, I-63, ZUM3036 und ZUM3121 das *chpA*-Gen fehlt und sie im Pflanzentest mit der Tomate avirulent sind, sollte die An- bzw. Abwesenheit der *chp*-Gene bei den Isolaten durch Southern Hybridisierungen überprüft werden. Es wurde ein Zusammenhang zwischen Existenz der *chp*-Gene und der Avirulenz dieser Stämme festgestellt. Bei den avirulenten Stämmen I-62, ZUM3036 und ZUM3121 konnte kein *chp*-Gen nachgewiesen werden und der avirulente Stamm I-63 zeigte nur mit der spezifischen *chpB*-Sonde ein Signal. Es müssen bei diesen Stämmen weitere essentielle Virulenzfaktoren deletiert bzw. aufgrund von Mutationen ohne Funktion sein. Da die *chp*-Gene in der *chp*-Region lokalisiert sind, besteht die Möglichkeit, dass die physikalische Karte der *chp*-Region des

Wildtypstamms *Cmm* NCPPB382 in den Isolaten nicht existent ist bzw. einen anderen physikalischen Aufbau hat. Es scheint jedoch eine Korrelation zwischen der Virulenz, der Kolonisation, der Größe und des Gewichts der Tomatenpflanzen und der Anwesenheit der *chp*-Gene zu geben.

Um zu überprüfen, ob die Genome der Isolate unterschiedlich zum Wildtyp *Cmm* NCPPB 382 sind, wurden Pulsfeldgelelektrophoresen (PFGE) der Isolate mit *VspI*-gespaltener Gesamt-DNA durchgeführt, die zeigten, dass die Bandenmuster aller Isolate von dem des Wildtypstamms *Cmm* NCPPB382 unterschiedlich waren. Es konnten die Isolate aufgrund ihrer PFGE-Bandenmuster in Gruppen eingeteilt werden. Die Stämme ZUM3036 und ZUM3121 sind identisch, die Feldisolate I-62 und I-63 sind zu allen anderen unterschiedlich (Gartemann, persönliche Mitteilung).

Anhand dieser Ergebnisse ist zu überlegen, ob es weiterhin ausreicht, die Diagnostik allein mit *celA*- und *pat-1*-Primern durchzuführen, da bei Stämmen, die nicht virulent sind, die Pathogenitätsdeterminanten *pat-1* und/oder *celA* nachgewiesen werden konnten. Hier ist eine diagnostische Lücke, die durch eine alternative Nachweismöglichkeit mit den spezifischen Primern für die *chp*-Gene geschlossen werden kann. Die spezifischen Primer der *chp*-Gene liegen alle innerhalb der jeweiligen Gensequenz und könnten bei der Überprüfung des Saatguts per PCR helfen, die Stämme in avirulent oder virulent einzuordnen. Diese Einordnung würde für verschiedene nicht europäische Länder sicherlich reichen, jedoch wird *Cmm* in Deutschland als ein Quarantänestamm geführt und das Saatgut, das in Deutschland verwendet werden darf, muss absolut frei von *Cmm* sein.

5.3 Mutagenese der Gene *chpC*, *chpG*, *nagA* und *pelC*

Die Gene *chpC* und *chpG*

Die Inaktivierung durch Kassettenmutagenese und ein Austausch des aktiven Wildtypgens durch ein inaktiviertes Gen war nur im Fall von *chpC* und *chpG* erfolgreich, während für *chpE* und *chpF* keine Mutanten erhalten wurden. Die Inaktivierung von *chpG* zeigt keine Auswirkung auf die Ausbildung der Welkesymptome und die Kolonisation bei der Tomatenpflanze durch *Cmm*. Allerdings resultiert die Inaktivierung von *chpC* in einer drastischen Reduzierung der Virulenz und des bakteriellen Wachstums *in planta*. 28 Tage nach Infektion liegt der Titer der Mutante CMM101*chpC* β *in planta* nur bei 10^7 cfu/g Pflanze

und nur bei 7 von 64 Pflanzen konnte eine sich leicht einkrümmende Blattspitze beobachtet werden. Die sich leicht einkrümmende Blattspitze stellt das mildeste Symptom der Krankheit dar. Für eine weitere Bewertung der Ausbildung der Krankheit dient der Welkeindex (Bermpohl, 1990). Der Welkeindex des jeweiligen Stamms ist der Zeitraum, nach dem 50% der infizierten Pflanzen eindeutige Welkesymptome aufweisen. Für die *chpC*-Mutante konnte kein Welkeindex ermittelt werden, da nie 50% der infizierten Pflanzen Krankheitssymptome zeigen. Der Kontrollstamm CMM101 erreicht *in planta* einen Titer von 10^9 cfu/g Pflanze, erzeugt sehr starke Welkesymptome mit vereinzelt toten Pflanzen und hat einen Welkeindex, der zwischen dem 15 und 16 Tag nach Infektion liegt. Pflanzentests mit anderen Transposonmutanten zeigten ebenfalls, dass nur dann, wenn *Cmm* einen Titer von mindestens 10^8 cfu/g Pflanze in den infizierten Pflanzen erreicht, Welkesymptome ausgebildet werden (Abt, persönliche Mitteilung). Bei diesen Mutanten waren die Gene *ppaA* bzw. *ppaC* inaktiviert. Die Gene *ppaA* und *ppaC* kodieren Serinproteasen, die zu einer anderen Familie als die *chp*-Gene gehören. Es scheint also eine Korrelation zwischen der Höhe des Titers *in planta* und der Ausbildung der Welkesymptome zu geben. Wird der Schwellenwert von mindestens 10^8 cfu/g Pflanze erreicht, so können Welkesymptome ausgebildet werden, liegt der Titer jedoch unter diesem Wert, bleiben die Pflanzen symptomlos.

Möglicherweise erfolgt eine Proteaseexpression in der Wirtspflanze erst zu einem definierten Zeitpunkt nach der Infektion. So ist die Proteaseproduktion von *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* und *raphani* (leaf spotting disease) nur *in planta* und in einer späten Phase der Infektion nachweisbar, wenn die Wirtspflanze effektiv kolonisiert worden ist (Dow et al., 1993). Ähnliche Verhältnisse könnten auch bei Interaktion von *Cmm* mit der Tomatenpflanze vorliegen. Zunächst erfolgt eine biotrophe Vermehrung im Xylem, welche vermutlich nach hochtitriger Kolonisation der Wirtspflanze ($\geq 10^9$ cfu/g Pflanze) auf eine nekrotrophe Lebensweise wechselt. Erst im späten Infektionsstadium kommt es zur Erzeugung typischer Krankheitssymptome. Solch eine wuchsphasen- bzw. infektionsphasenabhängige Expression welkeinduzierender Gene könnte auch bei *Cmm* vorliegen.

Ein limitierender Faktor für das Wachstum von *Cmm* könnten auch fehlende Nährstoffe sein, da *Cmm* das Xylem besiedelt und dieses die geringste Konzentration an organischen Komponenten aller Pflanzengewebe aufweist. Die Expression zellwanddegradierender extrazellulärer Enzyme könnte zur Versorgung des Pathogens mit Nährstoffen beitragen. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die Pflanzen unter bestimmten Bedingungen keine

Nährstoffe mehr nachliefern, die *Cmm* fürs Wachstum benötigt und dann die Mazeration der Pflanzenzellwand durch *Cmm* nicht erfolgen kann. Hier könnten ChpC und auch andere Pat-1 Homologe eine Rolle spielen. Durch eine Degradation oder die Prozessierung spezifischer Proteine, entweder pflanzlichen oder bakteriellen Ursprungs, könnte ein Signal für die Interaktion mit der Wirtspflanze Tomate erzeugt werden. Mögliche Ziele für das ChpC Protein sind Signalkaskaden, die eine Rolle in der Pflanzenabwehr spielen oder die Nährstoffzufuhr ins Xylem kontrollieren. Bei der Blutgerinnung konnte gezeigt werden, dass aus inaktiven Zymogenen aktive Serinproteasen entstehen, und diese autokatalytisch oder andere Serinproteasen bzw. Proteine proteolytisch spalten. Mehrere der Gerinnungsfaktoren sind Serinproteasen (Davie et al., 1991).

Während der Penetration und der Kolonisation des Pflanzengewebes sekretieren filamentöse Pilze eine große Anzahl an proteolytischen Enzymen. Beim phytopathogenen Pilz *Fusarium eumartii*, der die Kartoffelfäulnis bei der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) auslöst, konnte gezeigt werden, dass die Infektion der Kartoffelknolle von der Akkumulation der Serinproteaseaktivität abhängt (Olivieri et al., 1998). Diese Hypothese wird durch den Vergleich der Serinproteaseaktivität des pathogenen Pilzes *Fusarium eumartii* mit der des nicht-pathogenen Pilzisolates *Fusarium solani* 1402 unterstützt, da weder bei gesunden Knollen noch im Kulturfiltrat des nicht-pathogenen Pilzes Serinproteaseaktivität nachgewiesen werden konnte (Olivieri et al., 2002). Die Anwesenheit im Kulturfiltrat des pathogenen Pilzes und die Abwesenheit in dem nicht pathogenen *Fusarium solani* 1402 deutet darauf hin, dass die Serinproteaseaktivität in die Kolonisation der Wirtspflanze involviert sein könnte. Bei der extrazellulären Serinprotease des Pilzes *Fusarium eumartii*, die zu der Subtilase-Subfamilie der Serinproteasen gehört, ist gezeigt, dass diese Pathogenitäts-verwandte Proteine (PR) genauso gut wie spezifische Polypeptide der interzellularen Waschflüssigkeitextrakte und Zellwandproteine der Kartoffelknolle degradieren kann (Olivieri et al., 2002). Die Rolle von ChpC in der Interaktion zwischen *Cmm* und der Tomate als Wirtspflanze könnte ähnlich sein. Es ist möglich, dass ChpC ebenfalls PR-Proteine der Tomate, spezifische Polypeptide oder Zellwandproteine der Tomate degradieren, und so die Pflanzenabwehr mildern kann.

ChpC könnte auch einen Inhibitor, der von der Tomatenpflanze produziert wird, degradieren, mit der Folge, dass eine Pflanzenabwehr keinen Einfluss auf die Kolonisation von *Cmm* bei der Tomatenpflanze hat. Proteinaseinhibitoren können als ein Teil eines spezifischen Pflanzenabwehrmechanismus agieren, wie Mosolov et al. (1976) für *Fusarium solani*

zeigten. In diesem Fall, wurde eine Trypsin-ähnliche Exoprotease, die *F. solani* produziert, durch einen spezifischen Proteaseinhibitor der Pflanze gehemmt. ChpC könnte derartige Proteinaseinhibitoren inaktivieren bzw. austitrieren und somit zum Schutz essentieller Pathogenitätsfaktoren wie z. B. Pat-1 dienen.

Eine weitere mögliche Funktion für ChpC beruht auf der Tatsache, dass Gram-positive Bakterien oft kleine Peptide, auch „peptide pheromone“ genannt, zur Zell-Zell-Kommunikation verwenden, unter anderem um eine zelldichte-abhängige Genexpression zu ermöglichen (Dunny and Leonhard, 1997). Diese Kommunikationssignale werden von sich teilenden Zellen sekretiert und akkumulieren außerhalb der Zelle. Wenn die Konzentration dieser Signalmoleküle einen Schwellenwert erreicht, werden über einen Sensor der Bakterien bestimmte Gene, z. B. solche, die für die Virulenz verantwortlich sind, exprimiert (Hardman et al., 1998). Qin et al. (2000) zeigten, dass die Expression von Virulenzfaktoren bei *Enterococcus faecalis* durch ein Quorum Sensing System, die *fsr*-Gene, reguliert wird. Die Virulenzfaktoren, die durch die *fsr*-Gene reguliert werden, sind eine Gelatinase und eine Serinprotease (SprE). Die Zell-Zell-Kommunikation wird durch ein Peptidsignal, das Gelatinase Biosynthese-aktivierte Pheromon GBAP (Nakayama et al., 2001) vermittelt, das durch die Sensorkinase FsrC eines Zwei-Komponenten Systems detektiert wird. Das Signal wird durch den Response Regulator FsrA übertragen. Inaktivierung des *sprE*-Gens führt zu einem verzögertem Tod im Maus-Modellsystem, wodurch gezeigt wird, dass die Serinprotease für die enterococcale Infektion von Bedeutung ist. Die *fsr*-Gene scheinen autoreguliert zu werden (Qin et al., 2000).

Es wäre daher denkbar, dass ChpC eine Funktion in einem Quorum Sensing System wahrnimmt, z. B. könnte ChpC durch Spaltung eines Pheromons die eigene Expression sowie die Expression anderer Gene, die Virulenzfaktoren darstellen, induzieren.

Die Bedeutung von Proteasen als Virulenzfaktoren ist relativ unklar, denn in vielen Fällen ist eine Inaktivierung der Proteasen durch Mutation ohne Auswirkung auf die Pathogenität (Jaton-Ogay et al., 1994). Dieses scheint auch der Fall bei ChpG zu sein, da die Inaktivierung dieses Gens keine Veränderung in der Ausbildung der Krankheitssymptome bei der Tomatenpflanze durch *Cmm* erkennen lässt. Allerdings konnte für die putative Serinprotease ChpC klar gezeigt werden, dass diese eine Rolle in der Interaktion von *Cmm* mit der Tomatenpflanze spielt.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Aufklärung der genauen Funktion der Pat-1 Proteinfamilie ist eine Identifikation der Substrate dieser putativen Serinproteasen.

Das *nagA*-Gen

Da extrazellulären Enzymen eine Bedeutung in der Pathogenität zugeordnet wird, erfolgte die Inaktivierung der putativen β -1,4-N-Acetylglukosaminidase (*nagA*) der *chp*-Region. Jedoch hatte die Erzeugung der Mutante keine Auswirkung auf die Ausbildung der Welkesymptome bei der Tomatenpflanze.

Da die β -1,4-N-Acetylglukosaminidase ähnlich wie Lysozym die glykosidische Bindungen des Mureins der Bakterienzellwand hydrolysieren kann, wurden Platten-Überschichtungstest mit *E. coli* und *Micrococcus luteus* durchgeführt, bei denen sich zeigte, dass die Mutante *Cmm* NCPPB382*nagA* α weiterhin eine Hemmung von *M. luteus* ATCC4698 hervorruft (Daten nicht gezeigt). *E. coli* JM109 wurde sowohl von *Cmm* NCPPB382 sowie der Mutante nicht gehemmt. Weitere Überschichtungstests mit Gram-positiven könnten Aufschluss darüber geben, ob *Cmm* nur Gram-positive Bakterien hemmt. Die Hemmung von *M. luteus* ATCC4698 ist jedoch nicht der β -1,4-N-Acetylglukosaminidase zu zuschreiben. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass *Cmm* ein Bacteriocin oder Antibiotikum erzeugt.

Die Gene *pelA* und *pelC*

Neben anderen extrazellulären Enzymen werden Pektat-Lyasen wie bei *Erwinia chrysanthemi*, eine Funktion als Virulenzfaktor zugeschrieben (Herron et al., 2000). Pektat-Lyasen degradieren Pektin, das in der Pflanzenzellwand vorliegt und ein Heteropolysaccharid aus α -1,4-verknüpften Galakturonat-Ketten darstellt, welche mit Methylgruppen verestert sind. Die Degradation erfolgt durch β -Elimination der glykosidischen Bindungen und nicht durch Hydrolyse (Soriano et al., 2005). Zu den Virulenzfaktoren des Gram-negativen Bakteriums *Pseudomonas syringae* gehören zum Beispiel die *hrp*-Gene, die das Typ-III-Sekretions System (TTSS) verwendet, um seine Virulenzfaktoren in die Wirtszelle einzuschleusen (Collmer et al., 2000). Die HrpW-Pektat-Lyase-Domäne von *Pseudomonas syringae* zeigt Ähnlichkeiten zu Pektat-Lyasen von z.B. *Erwinia carotovora* und *Erwinia chrysanthemi*, kann jedoch in gereinigter Form keine HR hervorrufen. Auch dieser Harpin ist in anderen *Pseudomonas*-Pathovaren zu finden. Daraus wurde geschlossen, dass HrpW an der Interaktion mit der Pflanzenzellwand beteiligt sein könnte (Charkowski et al., 1998). Da *Cmm* zwei Pektat-Lyasen, *pelA* und *pelC*, in der *chp*-Region besitzt, die allerdings keine Hrp-Domäne wie HrpW aufweisen, wurde untersucht, ob auch diese beiden Pektat-Lyasen

eine Funktion in der Bakterien-Pflanzen-Interaktion besitzen. Die Pektat-Lyasen PelA und PelC weisen Homologien zu den Pektat-Lyasen der Bakterien *Frankia* sp. EAN1pec (Acc. Nr. ZP 00572934, EAN12818), *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bentley et al., 2002) und *Bacillus* sp. BP-23 (Soriano et al., 2000a) auf. PelA ist auf Proteinebene zu 41% zu *Frankia* sp., zu 37% zu *S. coelicolor* und zu 45% zu *Bacillus* sp. identisch. PelC zeigt zu *Frankia* sp. 41%, zu *S. coelicolor* 36% und zu *Bacillus* sp. 45% Identität auf Proteinebene. Die Ähnlichkeiten von PelA und PelC zu diesen Pektat-Lyasen liegen auf Proteinebene zwischen 52%-55%. PelA und PelC sind Mitglieder der Pektat-Lyase-Familie 3 (Pfam 03211). Die Pektat-Lyase des Bakteriums *Bacillus* sp. BP-23 gehört auch zu dieser Familie (Soriano et al., 2000b). Pektat-Lyasen, die zur Familie 3 gehören, sind gewöhnlich an der Degradation von Pektin, und nur in geringem Maße an der Degradation von Polygalakturonat beteiligt (Soriano et al., 2000b). Es ist im Genom von *Cmm* eine putative Polygalakturonase identifiziert worden (Gartemann, persönliche Mitteilung), die vermutlich die Degradation von Polygalakturonat übernehmen könnte (Beimen et al., 1992; Hildebrandt, 1971).

Die Pektat-Lyase PelA von *Bacillus* sp. BP-23 besitzt nur zwei Cysteine, wobei für Klasse 3 Pektat-Lyasen ein hoher Cystein-Gehalt (10-14) beschrieben wird (Soriano et al., 2000b). Bei PelA und PelC von *Cmm* besitzt die Aminosäuresequenz jeweils sechs Cysteine.

Für die Pektat-Lyasen PelC und PelE von *Erwinia chrysanthemi* EC16 konnte gezeigt werden, dass sie an der Mazeration des Pflanzengewebes beteiligt sind und Elicitor-Aktivität aufweisen, die die Bildung eines Phytoalexins ermöglicht. PelE ist bei der Mazeration 10-fach effizienter als PelC, allerdings weisen beide die gleiche Elicitoraktivität auf (Kita et al., 1996). Um zu zeigen, ob die Pektat-Lyasen von *Cmm* dieselben oder ähnliche Funktionen besitzen, sollten die Mutanten im Pflanzentest überprüft werden. Jedoch zeigte die Inaktivierung des *pelC*-Gens im Pflanzentest keine Veränderung der Krankheitssymptome. Die Welkesymptome und der Titer entsprachen dem Kontrollstamm CMM101. Die Konstruktion der Doppelmutante von *pelA* und *pelC* sollte zeigen, ob eine Pektat-Lyase die Funktion der anderen übernehmen kann und ob diese Pektat-Lyasen überhaupt einen Einfluss auf die Ausbildung der Krankheitssymptome haben. Da die Konstruktion jedoch nicht erfolgreich war, kann keine Aussage dazu getroffen werden. Die Pektat-Lyasen sind auf DNA-Ebene zu 90% und auf Protein-Ebene zu 95% identisch und sind auf den „direct repeats“ DR2a und DR2b lokalisiert, auf denen ebenfalls die Serinproteasen PpaB1 bzw. PpaB2 liegen. Im Chromosom von *Cmm* hat eine Duplizierung dieser Gene stattgefunden. In weiteren Arbeiten könnten Enzymtests mit den Pektat-Lyasen durchgeführt werden, um zu unter-

suchen, ob sie eine klassische Funktion bei der Degradation der Mittellamelle übernehmen (Collmer et al., 1988).

5.4 Kolonisation der *chpC*- und der Deletionsmutante im zeitlichen Verlauf

Bei den Untersuchungen des zeitlichen Verlaufs der Kolonisation mit den Stämmen CMM101, CMM101*chpC* β und CMM101 β 330-18 konnte eindeutig gezeigt werden, dass die beiden Stämme, CMM101*chpC* β und CMM101 β 330-18, den Titer des Kontrollstamms CMM101 von 10^9 cfu/g Pflanze nie erreichen. Es besteht die Möglichkeit, dass die Tomatenpflanze das Pathogen *Cmm* erkennt und mit einer Abwehrreaktion seine Vermehrung verhindert bzw. eine Wuchshemmung von *Cmm* erzeugt. *Cmm* ist eventuell nicht mehr in der Lage Nährstoffe, die von der Tomatenpflanze nachgeliefert werden, aufzunehmen oder zu verwerten.

Zu den Abwehrmechanismen der Pflanze gehören z. B. die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS, „oxidative burst“), eine Strukturveränderung der Pflanzenzellwand in Verbindung mit „oxidative burst“ und der Synthese von Phenolen (Phenylpropan-Stoffwechsel) oder die Synthese von Phytoalexinen (Ebel and Mithöfer, 1998). In der Tat weisen mit *Cmm* infizierte Tomatenpflanzen eine Zunahme zellwandgebundener Phenole auf (Beimen et al., 1992). Die Abwehrreaktion der Pflanze kann außerdem durch Jasmonate, Ethylen bzw. Salizylsäure induziert werden (Thaler et al., 2004; Pieterse and van Loon, 1999). Jasmonate und Ethylen werden schnell nach der Infektion mit einem Pathogen produziert und lösen systemische Pflanzenabwehr (systemic acquired resistance, SAR) aus (Pieterse and van Loon, 1999). Salizylsäure ist eine wichtige Signal-Komponente bei der Auslösung von SAR und der lokalen Pflanzenabwehr (Pieterse and van Loon, 1999). Eine weitere Pflanzenabwehr gegen ein Pathogen ist die Akkumulation von PR-Proteinen (pathogen-related proteins, PR), z. B. Glukanasen oder Chitinasen, die antimikrobiell wirken und zur Resistenz der Pflanze beitragen (Pieterse and van Loon, 1999).

5.5 Einbringen der Gene *chpC*, *ppaA* und *ppaC* in verschiedene *Cmm*-Stämme

Da gezeigt werden konnte, dass *chpC* eine Rolle in der Kolonisation der Tomate durch *Cmm* spielt, wurde in den Wildtyp-Stamm *Cmm* NCPPB382 sowie in die Deletionsmutante CMM101 β 330-18 das *chpC*-Gen eingebracht, um zu untersuchen, ob *chpC* beim Wildtyp in doppelter Ausführung einen Effekt auf die Virulenz hat oder ob bei der Deletionsmutante CMM101 β 330-18 der Virulenz-Phänotyp des Wildtyps wieder hergestellt wird. In beiden Fällen wurde keine Veränderung in der Virulenz beobachtet. Der Wildtyp *Cmm* NCPPB382 hat, vermutlich durch die Elektroporation, das große Plasmid pCM2 verloren und als Kontrollstamm dient daher CMM101, der ebenfalls nur pCM1 besitzt. Im Welkeverlauf ist zu erkennen, dass der Grad der Krankheit beim Kontrollstamm stärker ausgeprägt ist als beim Stamm CMM101-pIG216C β . Eine doppelte Gendosis für *chpC* scheint, wenn überhaupt, eher eine Reduzierung der Welkesymptome hervorzurufen.

Das Einbringen des *chpC*-Gens in die Deletionsmutante CMM101 β 330-18, der eine ca. 130 kb große Region fehlt, die nahezu die komplette *chp/tomA*-Region umfasst, führt zu keiner Wiederherstellung der Virulenz. Somit scheinen der Deletionsmutante CMM101 β 330-18 mehr Gene als nur das *chpC*-Gen zu fehlen, die für eine Vermehrung von *Cmm* in der Wirtspflanze notwendig sind. Auf der *chp/tomA*-Region sind weitere Gene lokalisiert, die eventuell für die Pathogenität von *Cmm* verantwortlich sein könnten. Dazu gehören zum Beispiel die Gene, *ppaA* bis *ppaE*, die ebenfalls für Serinproteasen kodieren, sowie die Gene der Pektat-Lyasen *pelA* und *pelC* und Gene die für die Nährstoffversorgung von *Cmm* benötigt werden, wie z. B. verschiedene Glukosidasen.

Da bereits in parallel laufenden Arbeiten gezeigt werden konnte, dass die putativen Serinproteasen *ppaA* und *ppaC* einen ähnlichen Phänotyp mit Reduzierung des Titers in der Tomatenpflanze bewirken, allerdings nur um den Faktor 10 (Abt, persönliche Mitteilung), sollten die Gene *ppaA* und *ppaC* in die Deletionsmutante CMM101 β 330-18 gebracht werden. Die Serinproteasen PpaA und PpaC gehören allerdings zu einer anderen Familie von Serinproteasen als die Chp-Serinproteasen.

Im Pflanzentest zeigte sich, dass die Anwesenheit der Gene *ppaA* und *ppaC* in der Deletionsmutante CMM101 β 330-18 ebenfalls nicht ausreicht, um den Welke-Phänotyp wieder herzustellen.

Um die Möglichkeit zu überprüfen, ob die Gene *chpC*, *ppaA* und *ppaC* vielleicht einen addi-

tiven Effekt haben, wurden diese Gene in die Deletionsmutante CMM101/ β 330-18 gebracht und im Pflanzentest untersucht. Auch hier zeigte sich, dass die Deletionsmutante keinen Welke-Phänotyp auslösen kann, also mit *chpC*, *ppaA* und *ppaC* nicht komplementiert werden kann. Das Plasmid pIG216C-13f04 β , das in die Deletionsmutante transformiert wurde, trägt zusätzlich noch die Gene für die Pektat-Lyase *pelC* und die putative Serinprotease *ppaB1*. Somit sind fünf Gene der ca. 130 kb großen fehlenden Region in die Deletionsmutante gebracht worden. Keines dieser Gene bewirkt jedoch eine Komplementation, die den Wildtyp-Phänotyp bezüglich der Virulenz wiederherstellt. Daher muss es noch weitere Gene in der *chp/tomA*-Region geben, die für eine erfolgreiche hochtitrige Besiedlung der Tomate und die Entfaltung der vollen Virulenz benötigt werden.

5.6 Hypersensitive Reaktion auf der Nicht-Wirtspflanze *Mirabilis jalapa*

Bei der hypersensitiven Reaktion (hypersensitive reaction, HR) handelt es sich um einen schnellen lokalen Zelltod von Zellen des Blattgewebes. Es ist die auffälligste Form der Pflanzenabwehr, die durch ein Pathogen induziert werden kann und stellt eine spezielle Form des programmierten Zelltods (programmed cell death, PCD) dar. Eine Infiltration mit $\geq 10^6$ Bakterien/ml führt innerhalb von ca. 24 Stunden zum sichtbaren Absterben (Nekrosenbildung) des gesamten infizierten Bereichs (Klement, 1963). *Cmm* ruft diese Reaktion unter anderem bei der Nicht-Wirtspflanze *Mirabilis jalapa* (jap. Wunderblume) hervor (Gitaitis, 1990; Bempohl et al., 1996). Die Versuche ergaben, dass es sich bei der Reaktion von *Mirabilis jalapa* auf *Cmm* um einen aktiven Prozess der Pflanze handelt. Bempohl et al. (1996) zeigte, dass die HR von *Mirabilis jalapa* auf *Cmm* von lebenden Bakterien abhängig ist.

Bei *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) reicht zellfreier, ankonzentrierter Kulturüberstand aus, um eine HR auf Tabakblättern zu induzieren. Bei dem Elicitor (Auslöser der Resistenzreaktionen) von *Cms* soll es sich um mindestens ein hitzestabiles Protein handeln (Nissinen et al., 1997). Die Fähigkeit eine HR zu induzieren, ist bei *Cms* und *Cmm* nicht von lebenden Zellen abhängig. Bei *Cmm*-Stämmen, die die Wirtspflanze *Solanum lycopersicum* kolonisieren können und in der Lage sind, eine HR zu induzieren (Dreier, 1995), kann der 15- bis 20-fach ankonzentrierte Kulturüberstand eine HR bei *Mi-*

rabilis jalapa induzieren (Ahlemeyer, 1999). Die Ankonzentrierung des Kulturüberstandes von *Cmm*-Stämmen, deren Zellen keine HR bei *Mirabilis jalapa* auslösen und die Tomate nicht kolonisieren, reichte nicht zur Auslösung einer HR aus (Ahlemeyer, 1999). Beim avirulenten Stamm CMM623 reicht schon der sterile Überstand stationärer Kulturen ohne Anreicherung aus um eine HR auszulösen (Alarcón et al., 1998). Beim Elicitor von *Cmm* handelt es sich um ein oder mehrere hitzestabile Protein(e) mit einer Größe zwischen 10 und 100 kDa (Ahlemeyer, 1999). Es kann sich beim Elicitor nicht um einen Harpin (relativ kleines, Glycin-reiches, Cystein-reiches, hydrophiles Protein) handeln, wie es für Gram-negative Phytopathogene beschrieben wurde (Hueck, 1998), da diese nur in Minimalmedium induziert werden, jedoch der/die Elicitor(en) bei *Cmm* und *Cms* auch in Vollmedium gebildet werden.

Die Untersuchung der hypersensitiven Reaktion auf der Nicht-Wirtspflanze *Mirabilis jalapa* mit den Isolaten zeigte, dass die avirulenten Nicht-Kolonisierer I-62, I-63, ZUM3036, ZUM3121 keine HR induzieren können. Diesen Stämmen fehlt entweder das entscheidene Gen, dessen Produkt die Funktion eines Elicitors hat oder das einen Elicitor z.B. enzymatisch erzeugt, oder aber die HR kann nur ausgelöst werden, wenn eine bestimmte Signalkette funktionell ist.

Die *chpG*-Mutante induziert ebenfalls keine HR bei der Nicht-Wirtspflanze, allerdings kann sie die Tomatenpflanze effektiv hochtitrig kolonisieren ($1,8 \times 10^9$ cfu/g Pflanze). Da bei den bisher überprüften Mutanten gezeigt werden konnte, dass durch die Methode des „gene-replacement“ nur das zu inaktivierende Gen ausgetauscht wurde und keine weitere Mutation in den Mutanten vorhanden gewesen ist, kann vermutet werden, dass auch die *chpG*-Mutante keine weiteren Mutationen ausweist. Jedoch muss in zukünftigen Arbeiten durch Komplementation des inaktivierten *chpG*-Gens gezeigt werden, dass keine weitere Mutation in dem Stamm vorliegt.

Es scheint, dass ChpG der Elicitor ist oder an der Bildung des Elicitors beteiligt ist. Dieses Protein weist eine Größe von 29 kDa auf und liegt damit in der bereits postulierten Größe für den Elicitor zwischen 10 kDa und 100 kDa (Ahlemeyer, 1999). Eventuell kann die Nicht-Wirtspflanze *Cmm* nicht mehr erkennen und somit keine Pflanzenabwehr einschalten. In der Literatur wurde bisher keine Serinprotease des Trypsin-Typs beschrieben, die die Funktion eines Elicitors hat. Die putative Serinprotease besitzt ein Signalpeptid, das auf einen Signal-vermittelten Transport schließen lässt. *Cmm* besitzt das Typ-II- und wahrscheinlich das Typ-V System, das einen Signal-vermittelten Transport der Proteine

vermittelt. Im Genom von *Cmm* ist kein Typ-III-Sekretions-System identifiziert worden (Gartemann, unveröffentlicht). Somit kann der Transport des Elicitors nicht über das Typ-III-Sekretions-System (type III secretion system, TTSS) erfolgen, wie es für Gram-negative Phytopathogene beschrieben wird (Hueck, 1998).

Bei den Gattungen *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas* und *Ralstonia* sind Gene des *hrp*-Gencluster (hypersensitive reaction and pathogenicity), das ca. 25-30 kb groß ist und 20-27 chromosomal- oder megaplasmidkodierte Gene trägt (He, 1998; Alfano and Collmer, 1997), für die Auslösung der HR bei den Nicht-Wirtspflanzen und für die Pathogenität bei den Wirtspflanzen verantwortlich (Brencic and Winans, 2005; Hueck, 1998). Diese *hrp*-Genprodukte werden jedoch über das TTSS transportiert.

Nach dem Gen-für-Gen-Konzept (Flor, 1971) steht dem Elicitor, der durch *avr*-Gene (avirulence) kodiert wird, die indirekt oder direkt fungieren können, ein Resistenz-Gen (R-Gen) der Pflanze gegenüber. Die *avr*-Genprodukte werden ebenfalls über das TTSS transportiert. Die R-Gene der Pflanzen erkennen das Pathogen anhand des Elicitors und es erfolgt die Induktion einer Reihe von Abwehrmechanismen, die zur Resistenz der Pflanzen führt. Die Resistenz der Pflanze kann z. B. durch Verdickung oder Lignifizierung der Zellwände am Ort der Penetration durch das Pathogen oder durch die Induktion von PR-Proteinen erfolgen.

Da es bisher keine Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum*) gibt, die resistent gegen *Cmm* sind, scheint in der *Cmm*-Tomaten-Interaktion das Gen-für-Gen Konzept keine Gültigkeit zu haben.

5.7 Ausblick

In zukünftigen Untersuchungen wird sich zeigen, mit welchen andersartigen Mechanismen *Cmm* die Pflanze als Lebensraum erobert und letztlich letal schädigt.

Zum Beispiel kann die Expression und Reinigung von ChpC und ChpG Aufschluss über die Aktivität geben, indem verschiedene Enzymtests mit unterschiedlichen Substraten getestet werden. Die Überexpression kann wiederum zur Antikörpergewinnung genutzt werden. Die Antikörper gegen ChpC und ChpG könnten z. B. in der Pflanze durch Antigen-Antikörper-Komplexe zeigen, wo die Proteine lokalisiert sind und welche Funktion sie einnehmen. Die Expression der Gene *chpC* und *chpG* kann auch in 2D-Gelen des Sekretoms untersucht werden. Hier besteht die Möglichkeit, zu überprüfen, ob diese Proteine wirklich sekre-

tiert werden oder ob das putative Signalpeptid diesen Transport nicht vermitteln kann. In ersten Experimenten, bei denen *Cmm* in Vollmedium kultiviert wurde, konnten bereits die putativen Serinproteasen PpaF und PpaG, die außerhalb der *chp*-Region lokalisiert sind, und PpaB1 bzw. PpaB2, aus der *chp*-Region, identifiziert werden. Natürlich sollten verschiedene Kultivierungsbedingungen getestet werden, da eventuell die Proteine ChpC und ChpG nur durch Pflanzenstoffe induziert werden oder erst in der spät-logarithmischen Wachstumsphase zur Expression kommen.

Mit Hilfe von Transkriptomanalysen können Expressionsunterschiede von Genen in unterschiedlich behandelten Zellen direkt miteinander verglichen werden. Für *Cmm* könnte ein Mikro-Array z. B. Aufschluss darüber geben, unter welchen Bedingungen die Gene der Pat-1 Proteinfamilie transkribiert werden. Erste RNA-Analysen zeigen, dass *chpC* in der spät-logarithmischen Wachstumsphase transkribiert wird (Flügel, persönliche Mitteilung). Außerdem kann der Xylemsaft der Tomate analysiert werden. Erste Analysen zeigten, dass mit *Cmm* infizierte Pflanzen ein anderes Metabolit-Profil des Xylemsafts aufweisen, als nicht infizierte Kontrollpflanzen.

Um zu zeigen, dass in der *chpG*-Mutante nur das *chpG*-Gen inaktiviert vorliegt, müsste diese Mutante mit dem intakten *chpG*-Gen komplementiert werden und ein erneuter Test auf HR bei der Nicht-Wirtspflanze erfolgen. Somit könnte gezeigt werden, ob das *chpG*-Genprodukt die Funktion eines Elicitors hat oder an der Bildung eines Elicitors beteiligt ist.

Literaturverzeichnis

- Abt, B. (2003). Etablierung eines Systems zur Komplementation von Transposonmutanten von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.*
- Ahlemeyer, J. (1999). Untersuchungen zur Auslösung der hypersensitiven Reaktion durch *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* bei *Mirabilis jalapa*. *Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.*
- Alarcón, C., Castro, J., Muñoz, F., Arce-Johnson, P., and Delgado, J. (1998). Protein(s) from gram-positive bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* induces a hypersensitive response in plants. *Phytopath.*, 88:306–310.
- Alfano, J. R. and Collmer, A. (1997). The type III (hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. *J. Bacteriol.*, 179:5655–5662.
- Altenbuchner, J. and Cullum, J. (1984). DNA amplification and an unstable arginine gene in streptomyces lividans 66. *Mol. Gen. Genet.*, 195:134–138.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25:3389–3402.
- Beimen, A., Bempohl, A., Meletzus, D., Eichenlaub, R., and 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.

- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C. H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M. A., a. R. K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J., and Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* a3(2). *Nature*, 417:141–147.
- Bermopohl, A. (1990). Untersuchungen der pathogenen Wechselwirkungen zwischen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und der Tomate (*Lycopersicon esculentum*). *Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld*.
- Bermopohl, A., Dreier, J., Bahro, R., and Eichenlaub, R. (1996). Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. *Microbiol. Res.*, 151:1–9.
- Brencic, A. and Winans, S. C. (2005). Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 69:155–194.
- Brenner, S. (1988). The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature*, 334:528–530.
- Bryan, M. (1930). Studies on bacterial canker of tomato. *J. Agric. Res.*, 41:825–851.
- Burger, A., Gräfen, I., Engemann, J., Niermann, E., Pieper, M., Kirchner, O., Gartemann, K.-H., and Eichenlaub, R. (2005). Identification of homologues to the pathogenicity factor Pat-1, a putative serine protease of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Microbiol. Res.*, 160:417–427.
- Chakraborty, R. and Bibb, M. (1997). The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* a3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J. Bacteriol.*, 179:5854–5861.

- Charkowski, A. O., Alfano, J. R., Preston, G., Yuan, J., He, S. H., and Collmer, A. (1998). The *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate. *J. Bacteriol.*, 180:5211–5217.
- Christensen, S. K., Mikkelsen, M., Pederson, K., and Gerdes, K. (2001). RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *PNAS*, 98:14328–14333.
- Collmer, A., Badel, J. L., Charkowski, A. O., Deng, W.-L., Fouts, D. E., Ramos, A. R., Rehm, A. H., Anderson, D. M., Schneewind, O., van Dijk, K., and Alfano, J. R. (2000). *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *PNAS*, 97:8770–8777.
- Collmer, A., Ried, J., and Mount, M. (1988). Assay methods for pectic enzymes. *Methods in Enzymology*, 161:329–336.
- Davie, E. W., Fujikawa, K., and Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochem.*, 30:10363–10370.
- Davis, M. J., Gillaspie, A. G., Vidaver, A. K., and Harris, R. W. (1984). *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov. pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34:107–117.
- Dickhut, A. (2003). Erzeugung von Insertionsmutanten der gene *bipA* und *oppDF* von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Charakterisierung der Mutanten. *Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.*
- Dow, J. M., Fan, M. J., Newman, M. A., and Daniels, M. J. (1993). Differential expression of conserved protease genes in crucifer-attacking pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:3996–4003.
- Dreier, J. (1992). Identifikation pathogener Determinanten des *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* Plasmids pCM2. *Diplomarbeit am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.*

- Dreier, J. (1995). Molekulargenetische Analyse der *pat-1* Region des Plasmids pCM2 von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Entwicklung diagnostischer Nachweisverfahren. *Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie und Gentechnologie, Universität Bielefeld*.
- Dreier, J., Meletzus, D., and Eichenlaub, R. (1997). Characterization of the plasmid encoded virulence region *pat-1* of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *MPMI*, 10:195–206.
- Dunny, G. M. and Leonhard, B. A. (1997). Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 51:527–564.
- Ebel, J. and Mithöfer, A. (1998). Early events in the elicitation of plant defence. *Planta*, 206:335–348.
- Engemann, J. (2001). Partielle Charakterisierung des Genoms von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* über Shotgun-Sequenzierung. *Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld*.
- Epstein, D. M. and Wensink, P. C. (1988). The alpha-lytic protease gene of *Lysobacter enzymogenes*. *J. Biol. Chem.*, 263:16586–16590.
- Flor, H.-H. (1971). Current status of the gene-for-gene-concept. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 9:275–296.
- Galán, J. E. and Collmer, A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, 284:1322–1328.
- Gitaitis, R. D. (1990). Induction of a hypersensitive reaction in four-o'clock by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Disease*, 74:58–60.
- Gleason, M. L., Gitaitis, R. D., and Ricker, M. D. (1993). Recent progress in understanding and controlling bacterial cancer of tomato in Eastern North America. *Plant Disease*, 79:313–315.
- Grant, S. G. N., Jessee, J., Bloom, F. R., and Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *PNAS*, 87:4645–4649.

- Gräfen, I. (2001). Herstellung einer Cosmid-Genbank von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* und Analyse der *chp-1*-Genregion. *Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld*.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., and Tschäpe, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.*, 23:1089–1097.
- Hacker, J. and Kaper, J. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54:641–679.
- Hardman, A. M., Stewart, G. S. A. B., and Williams, P. (1998). Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 74:199–210.
- Hayashi, K., Inoue, Y., Shiga, M., Sato, S. I., Takano, R., Hirayae, K., Hibi, T., and Hara, S. (1997). Pectinolytic enzymes from *Pseudomonas marginalis*. *Phytochem.*, 45:1359–1363.
- He, S. (1998). Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36:363–392.
- Henderson, G., Krygsman, P., Liu, C. J., Davey, C. C., and Malek, L. T. (1987). Characterization and structure of genes for protease A and B from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.*, 169:3778–3784.
- Herron, S. R., Benen, J. A. E., Scavetta, R. D., Visser, J., and Jurnak, F. (2000). Structure and function of pectic enzymes: Virulence factors of plant pathogens. *PNAS*, 97:8762–8769.
- Hildebrandt, D. (1971). Pectate and pectin gels for differentiation of *Pseudomonas* sp. and other bacterial plant pathogens. *Phytopathol.*, 61:1430–1436.
- Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Mol. Biol. Rev.*, 62:379–433.
- Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R., and 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. *MPMI*, 13:703–714.

- Jaton-Ogay, K., Paris, S., Huerre, M., Quadroni, M., Falchetto, R., Togni, G., Latgé, J.-P., and Monod, M. (1994). Cloning and disruption of the gene encoding an extracellular metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.*, 14:917–928.
- Kaup, O. (2002). Erzeugung von Insertionsmutanten in den Genen *tomA* und *regB* von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.*
- Kim, J. and Beer, S. (1998). HrpW of *Erwinia amylovora*, a new Harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class. *J. Bacteriol.*, 180:5203–5210.
- Kim, J. G., Jeon, E. J., Oh, J., Moon, J. S., and Hwang, I. (2004). Mutational analysis of *Xanthomonas* harpin HpaG identifies a key functional region that elicits the hypersensitive response in nonhost plants. *J. Bacteriol.*, 186:6239–6247.
- 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.*
- Kita, N., Boyd, C. M., Garrett, M. R., Journak, F., and Keen, N. T. (1996). Differential effect of site-directed mutations in *pelC* on pectate-lyase activity, plant tissue maceration, and elicitor activity. *J. Biol. Chem.*, 271:26529–26535.
- Klement, Z. (1963). Rapid detection of pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature*, 199:299–300.
- Kraut, J. (1977). Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Ann. Rev. Biochem.*, 46:331–358.
- Kusumoto, H., Hirose, S., Salier, J. P., Hagen, F. S., and Kurachi, K. (1988). Human genes for complements C1r and C1s in a close tail-to-tail arrangement. *PNAS*, 85:7307–7311.
- Laine, M. J., Nakhei, H., Dreier, J., L. K., Meletzus, D., Eichenlaub, R., and Metzler, M. C. (1996). Stable transformation of the gram-positive phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* with several cloning vectors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:1500–1506.

- Marinus, M. G. and Morris, N. R. (1973). Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 114:1143–1150.
- Marraffini, L. A., Ton-That, H., Zong, Y., Narayana, S. V. L., and Schneewind, O. (2004). Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, 279:37763–37770.
- Mazmanian, S. K., Ton-That, H., and Schneewind, O. (2001). Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.*, 40:1049–1057.
- Meletzus, D., BERPohl, A., Dreier, J., and Eichenlaub, R. (1993). Evidence for plasmid encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *J. Bacteriol.*, 175:2131–2136.
- Meletzus, D. and Eichenlaub, R. (1991). Transformation of the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by electroporation and development of a cloning vector. *J. Bacteriol.*, 173:184–190.
- Melkonyan, H. (1993). Klonierung und Charakterisierung des chromosomalen *pat-1*-Locus. *Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.*
- Monteiro-Vitorello, C. B., Camargo, L. E. A., Van Sluys, M. A., Kitajima, J. P., Truffi, D., do Amaral, A. M., Harakava, R., de Oliveira, J. C. F., Wood, D., de Oliveira, M. C., Miyaki, C., Takita, M. A., da Silva, A. C. R., Furlan, L. R., Carraro, D. M., Camarotte, G., Almeida, N. F. J., Carrer, H., Coutinho, L. L., El-Dorry, H. A., Ferro, M. I. T., Gagliardi, P. R., Giglioti, E., Goldman, M. H. S., Goldman, G. H., Kimura, E. T., Ferro, E. S., Kuramae, E. E., Lemos, E. G. M., Lemos, M. V. F., Mauro, S. M. Z., Machado, M. A., Marino, C. L., Menck, C. F., Nunes, L. R., Oliveira, R. C., Pereira, G. G., Siqueira, W., de Souza, A. A., Tsai, S. M., Zanca, A. S., Simpson, A. J. G., Brumbley, S. M., and Setúbal, J. C. (2004). The genome sequence of the Gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *MPMI*, 17:827–836.
- Mosolov, V. V., Loginova, A. V., Fedurkina, N. V., and Benken, I. I. (1976). The biological significance of proteinase inhibitors in plants. *Plant Science Lett.*, 7:77–80.

- Nakayama, J., Cao, Y., Horii, T., Sakuda, S., Akkermans, A., de Vos, W. M., and Nagasawa, H. (2001). Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.*, 41:145–154.
- Nakhei, H. (1993). Entwicklung eines Vektorsystems für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* auf Basis des Plasmides pCM2. *Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld*.
- Navarre, W. W. and Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63:174–229.
- Nicholas, K. B., Nicholas, H. B. J., and Deerfield, D. W. I. (1997). Genedoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnew. News*, 4:14.
- Nielson, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage site. *Protein Eng.*, 10:1–6.
- Niermann, E. T. (1997). Ortsspezifische Mutagenese der *pat-1* Region des Plasmids pCM2 von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld*.
- Nissinen, R., Lai, F. M., Laine, M. J., Bauer, P. J., Reilley, A. A., Li, X., De Boer, S. H., Ishimaru, C. A., and Metzler, M. C. (1997). *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* elicits a hypersensitive response in tobacco and secretes hypersensitive response-inducing protein(s). *Phytopath.*, 87:678–684.
- Olivieri, F., Godoy, A. V., Escande, A., and Casalongué, C. (1998). Analysis of intercellular washing fluids of potato tubers and detection of increased proteolytic activity upon fungal infection. *Physiologica Plantarum*, 104:232–238.
- Olivieri, F., Zanetti, M. E., Oliva, C. R., Covarrubias, A. A., and Casalongué, C. A. (2002). Characterization of an extracellular serine protease of *Fusarium eumartii* and its action on pathogenesis related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.*, 108:63–72.
- Pieper, M. (2001). Untersuchungen am Plasmid pCM2 von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: Identifizierung der *pat-1*-homologen Gene *phpA* und *phpB* und

- Nachweis der Konjugation. *Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.*
- Pieterse, C. M. J. and van Loon, L. C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.*, 4:52–58.
- Qin, X., Singh, K. V., Weinstock, G. M., and Murray, B. E. (2000). Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect. Immun.*, 68:2579–2586.
- Ray, P., Dev, I., MacGregor, C., and Bassford, P. J. (1986). Signalpeptidases. *Curr. Topic Microbiol. Immunol.*, 125:75–102.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold-Spring Harbor Laboratory, New York.*
- Schott, S. (2004). Charakterisierung von Transposonmutanten von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* mit veränderter Virulenz. *Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld.*
- Shaikh, S. A. and Deshpande, M. V. (1993). Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 9:468–475.
- Smith, G. E. and Summers, M. D. (1980). A bidirectional transfer of DNA and RNA to nitrocellulose or diazobenzyloxymethyl-paper. *Anal. Biochem.*, 109:123–129.
- Soriano, M., Blanco, A., Díaz, P., and Pastor, F. (2000a). An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp. with high activity on pectin: cloning and characterization. *Microbiol.*, 146:89–95.
- Soriano, M., Blanco, A., Díaz, P., and Pastor, F. I. J. (2000b). An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp. with high activity on pectin: cloning and characterization. *Microbiol.*, 146:89–95.
- Soriano, M., Díaz, P., and Pastor, F. I. J. (2005). Pectinolytic systems of two aerobic sporogenous bacterial strains with high activity on pectin. *Curr. Microbiol.*, 50:114–118.
- Soto-Gil, R. W. and Zyskind, J. W. (1989). N',N'-Diacetylchitobiase of *Vibrio harveyi*. *J. Biol. Chem.*, 264:14778–14783.

- Spooner, D. M., Peralta, I. E., and Knapp, S. (2005). Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. *Taxon*, 54:43–61.
- Steingröver, M. (2003). Charakterisierung der *chp*-Region von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Diplomarbeit, angefertigt am Lehrstuhl für Gentechnologie und Mikrobiologie, Universität Bielefeld*.
- Strider, D. L. (1969). Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. A literature review and bibliography. *North Carolina Agricultural Experiment Station Tech. Bull.*, 193.
- Tauch, A., Zheng, Z., Pühler, A., and Kalinowski, J. (1998). The *Corynebacterium striatum* resistance transposon Tn5564: genetic organization and transposition in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, 40:126–139.
- Thaler, J. S., Owen, B., and Higgins, V. J. (2004). The role of jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with range of lifestyles. *Plant Physiol.*, 135:530–538.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22:4673–4680.
- Tsujibo, H., Hatano, N., Mikami, T., Hirasawa, A., Miyamoto, K., and Inamori, Y. (1998). A novel β -N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520: Gene cloning, expression and assignment to family 3 of the glycosyl hydrolases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:2920–2924.
- Vieira, J. and Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, 19:259–268.
- Wallis, F. M. (1977). Ultrastructural histopathology of tomato plants infected with *Corynebacterium michiganense*. *Physiol. Plant Pathol.*, 11:333–338.

-
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33:103–119.

6 Anhang

6.1 Tabelle der Feldisolate aus Israel

Tabelle 6.1: *Cmm*-Feldisolate aus dem trilateralen Projekt „The Molecular Basis for Pathogenicity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* and *E. herbicola* pv. *betae*“

Nr.	Stamm	Isolierungsort	Isolierungsjahr	Wirt/Kultivar	Quelle
I-10	4yathed	Moshav Yathed	1998	Tomatenpflanze	E. Hadar
I-11	6yathed	Moshav Yathed	1998	Tomatenpflanze	E. Hadar
I-15	CBM-3	Hevel Besor	2000	Tomatenpflanze	E. Hadar
I-16	CBM-7	Hevel Besor	2000	Tomatenpflanze	E. Hadar
I-17	CBM-8	Hevel Besor	2000	Tomatenpflanze	E. Hadar
I-18	Z-1	Zipori	1997	Tomatenpflanze	D. Zutra
I-19	Z-2	Zipori	1997	Tomatenpflanze	D. Zutra
I-24	Z-7	Zipori	1997	Tomatenpflanze	D. Zutra
I-25	Z-8	Zipori	1997	Tomatenfrucht	D. Zutra
I-29	CMM-34	Gush Katif	1994	Tomatensamen	R. Hadas
I-30	CMM-602/8	Ahitov	1996	Tomatenfrucht	R. Hadas
I-31	CMM-3699/2	P. Rafiha	2000	Tomatenpflanze	S. Manulis
I-32	CMM-189/1-1	M. Talmi Eliyho	2001	Tomate 189	S. Manulis
I-33	CMM-189/1-2	M. Talmi Eliyho	2001	Tomate 189	S. Manulis
I-34	CMM-189/2-2	M. Talmi Eliyho	2001	Tomate 189	S. Manulis
I-38	Cmm-189/5-1	M. Talmi Eliyho	2001	Tomate 189	S. Manulis
I-39	CMM-189/5-2	M. Talmi Eliyho	2001	Tomate 189	S. Manulis

Nr.	Stamm	Isolierungsort	Isolierungs- jahr	Wirt/Kultivar	Quelle
I-40	Cmm-189/3-1	M. Talmi Eliyho	2001	Tomate 189	S. Manulis
I-42	CMM-189/6-1	Prigan	2001	Tomate 189	S. Manulis
I-44	CMM-189/7-1	Prigan	2001	Tomate 189	S. Manulis
I-46	CMM-189/8-1	Emi Oz	2001	Tomate 1402	S. Manulis
I-48	CMM-189/9-1	Prigan	2001	Tomate 189	S. Manulis
I-50	CMM-189/10-1	Prigan	2001	Tomate 189	S. Manulis
I-52	CMM-189/11-1	Prigan	2001	Tomate 189	S. Manulis
I-54	CMM-13-1	Yesha	2001	Tomate 189	S. Manulis
I-56	CMM-1309/14-1	Gani Tal	2001	Kirschtomate 1309	S. Manulis
I-56.2	Einzelkolonie von I-56				
I-58	CMM-189-12-1	Prigan	2001	Tomate 189	S. Manulis
I-62	CMM-31	Gush Katif	1994	Tomatenpflanze	R. Hadas
I-63	CMM-43	Bikat Hayarden	1996	Tomatenpflanze	R. Hadas
I-63.2	Einzelkolonie von I-63				
I-63.3	Einzelkolonie von I-63				
I-63.4	Einzelkolonie von I-63				
I-64	CMM-3700/2	Mishor Hahouf- South	2000	Tomatenpflanze	R. Hadas
I-65	CMM3713/2	M. Gan Oz	2000	Tomatenpflanze	R. Hadas
I-65.1	Einzelkolonie von I-65				

6.2 Tabellen der Kolonisationswerte im zeitlichen Verlauf

Tabelle 6.2: Analyse der Kolonisation im zeitlichen Verlauf bei CMM101 (Einzelwerte und arithmetische Mittelwerte), „(+):“: leichte/beginnende Welke, „+“: deutliche Welke (mindestens ein deutlich welkendes Blatt), „++“: starke Welke (2/3 der Blätter welken), „tot“: so starke Welke, dass keine Photosynthese mehr möglich ist, nicht infizierte Pflanzen gehen nicht in die Berechnung des Mittelwertes der Bakterientiter ein

Stamm	Tag	Welke	Bakterientiter (cfu/g Pflanze)	Mittelwert der Bakterientiter (cfu/g Pflanze)
CMM101	1	—	$3,8 \times 10^5$	$8,1 \times 10^5$
CMM101	1	—	$1,8 \times 10^6$	
CMM101	1	—	$3,0 \times 10^5$	
CMM101	2	—	$2,0 \times 10^4$	$2,1 \times 10^7$
CMM101	2	—	$1,6 \times 10^7$	
CMM101	2	—	$4,7 \times 10^7$	
CMM101	3	—	$3,3 \times 10^4$	$7,9 \times 10^6$
CMM101	3	—	$2,4 \times 10^7$	
CMM101	3	—	$1,2 \times 10^5$	
CMM101	4	—	$6,9 \times 10^6$	$7,1 \times 10^6$
CMM101	4	—	$7,9 \times 10^6$	
CMM101	4	—	$6,5 \times 10^6$	
CMM101	7	—	$2,2 \times 10^8$	$7,7 \times 10^6$
CMM101	7	—	$8,1 \times 10^6$	
CMM101	7	—	$3,8 \times 10^6$	
CMM101	8	—	$6,0 \times 10^5$	$5,2 \times 10^8$
CMM101	8	—	$1,0 \times 10^9$	
CMM101	8	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101	9	—	$5,1 \times 10^7$	$4,8 \times 10^8$
CMM101	9	—	$1,5 \times 10^8$	
CMM101	9	—	$1,2 \times 10^9$	
CMM101	10	—	$4,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^8$
CMM101	10	—	$3,6 \times 10^8$	

Stamm	Tag	Welke	Bakterientiter (cfu/g Pflanze)	Mittelwert der Bakterientiter (cfu/g Pflanze)
CMM101	10	—	$1,1 \times 10^6$	
CMM101	11	—	$9,0 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$
CMM101	11	—	$1,3 \times 10^8$	
CMM101	11	—	$2,4 \times 10^6$	
CMM101	14	+	$3,4 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$
CMM101	14	+	$3,0 \times 10^9$	
CMM101	14	+	$3,7 \times 10^9$	
CMM101	15	—	$2,7 \times 10^5$	$1,98 \times 10^9$
CMM101	15	++	$5,4 \times 10^9$	
CMM101	15	+	$2,2 \times 10^8$	
CMM101	16	—	$0,0 \times 10^0$	$0,0 \times 10^0$
CMM101	16	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101	16	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101	17	+++	$4,5 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$
CMM101	17	+	$2,5 \times 10^9$	
CMM101	17	+	$3,3 \times 10^9$	
CMM101	18	—	$1,4 \times 10^8$	$4,9 \times 10^7$
CMM101	18	—	$6,0 \times 10^6$	
CMM101	18	—	$3,0 \times 10^6$	
CMM101	21	+++	$1,0 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^{10}$
CMM101	21	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101	21	(+)	$1,0 \times 10^{10}$	
CMM101	22	+	$2,7 \times 10^8$	$1,7 \times 10^9$
CMM101	22	—	$1,2 \times 10^8$	
CMM101	22	+	$4,7 \times 10^9$	
CMM101	23	—	$0,0 \times 10^0$	$5,7 \times 10^9$
CMM101	23	+	$5,1 \times 10^9$	
CMM101	23	++	$6,3 \times 10^9$	
CMM101	24	+	$2,5 \times 10^9$	$3,8 \times 10^9$
CMM101	24	—	$2,9 \times 10^8$	
CMM101	24	++	$8,6 \times 10^9$	
CMM101	25	—	$0,0 \times 10^0$	$5,0 \times 10^9$
CMM101	25	+	$6,1 \times 10^9$	

Stamm	Tag	Welke	Bakterientiter (cfu/g Pflanze)	Mittelwert der Bakterientiter (cfu/g Pflanze)
CMM101	25	+	$3,8 \times 10^9$	
CMM101	28	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101	28	++	$4,1 \times 10^9$	$4,1 \times 10^9$
CMM101	28	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101	29	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101	29	tot	$1,1 \times 10^9$	$6,4 \times 10^8$
CMM101	29	tot	$1,5 \times 10^8$	
CMM101	30	—	$3,9 \times 10^9$	
CMM101	30	—	$9,0 \times 10^6$	$1,9 \times 10^9$
CMM101	30	tot	$1,7 \times 10^9$	
CMM101	31	++	$4,0 \times 10^9$	
CMM101	31	+	$4,3 \times 10^9$	$4,4 \times 10^9$
CMM101	31	+	$4,9 \times 10^9$	
CMM101	32	++	$1,4 \times 10^{10}$	
CMM101	32	++	$1,1 \times 10^{10}$	$8,3 \times 10^9$
CMM101	32	tot	$6,0 \times 10^7$	

Tabelle 6.3: Analyse der Kolonisation im zeitlichen Verlauf bei CMM101/β330-18 (Einzelwerte und arithmetische Mittelwerte), „(+):“ leichte/beginnende Welke, „+“: deutliche Welke (mindestens ein deutlich welkendes Blatt), „++“: starke Welke (2/3 der Blätter welken), „tot“: so starke Welke, dass keine Photosynthese mehr möglich ist, nicht infizierte Pflanzen gehen nicht in die Berechnung des Mittelwertes der Bakterientiter ein

Stamm	Tag	Welke	Bakterientiter (cfu/g Pflanze)	Mittelwert der Bakterientiter (cfu/g Pflanze)
CMM101/β330-18	1	—	$1,0 \times 10^8$	
CMM101/β330-18	1	—	$6,6 \times 10^5$	$3,5 \times 10^7$
CMM101/β330-18	1	—	$1,6 \times 10^4$	
CMM101/β330-18	2	—	$2,4 \times 10^5$	

Stamm	Tag	Welke	Bakterientiter (cfu/g Pflanze)	Mittelwert der Bakterientiter (cfu/g Pflanze)
CMM101 β 3330-18	2	—	$7,4 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$
CMM101 β 3330-18	2	—	$4,8 \times 10^6$	
CMM101 β 3330-18	3	—	$5,0 \times 10^4$	$2,8 \times 10^6$
CMM101 β 3330-18	3	—	$5,5 \times 10^4$	
CMM101 β 3330-18	3	—	$8,1 \times 10^6$	
CMM101 β 3330-18	4	—	$3,3 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$
CMM101 β 3330-18	4	—	$3,3 \times 10^7$	
CMM101 β 3330-18	4	—	$2,3 \times 10^6$	
CMM101 β 3330-18	7	—	$2,4 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$
CMM101 β 3330-18	7	—	$6,4 \times 10^6$	
CMM101 β 3330-18	7	—	$9,0 \times 10^5$	
CMM101 β 3330-18	8	—	$1,4 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$
CMM101 β 3330-18	8	—	$2,5 \times 10^6$	
CMM101 β 3330-18	8	—	$5,2 \times 10^6$	
CMM101 β 3330-18	9	—	$1,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$
CMM101 β 3330-18	9	—	$3,3 \times 10^7$	
CMM101 β 3330-18	9	—	$1,4 \times 10^5$	
CMM101 β 3330-18	10	—	$0,0 \times 10^0$	$4,0 \times 10^5$
CMM101 β 3330-18	10	—	$2,6 \times 10^5$	
CMM101 β 3330-18	10	—	$5,3 \times 10^5$	
CMM101 β 3330-18	11	—	$9,6 \times 10^4$	$1,9 \times 10^5$
CMM101 β 3330-18	11	—	$2,4 \times 10^5$	
CMM101 β 3330-18	11	—	$2,4 \times 10^5$	
CMM101 β 3330-18	14	—	$1,3 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$
CMM101 β 3330-18	14	—	$1,1 \times 10^4$	
CMM101 β 3330-18	14	—	$6,6 \times 10^5$	
CMM101 β 3330-18	15	—	$9,0 \times 10^4$	$7,8 \times 10^5$
CMM101 β 3330-18	15	—	$5,1 \times 10^5$	
CMM101 β 3330-18	15	—	$1,7 \times 10^6$	
CMM101 β 3330-18	16	—	$0,0 \times 10^0$	$6,5 \times 10^4$
CMM101 β 3330-18	16	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 β 3330-18	16	—	$6,5 \times 10^4$	
CMM101 β 3330-18	17	—	$6,5 \times 10^5$	

Stamm	Tag	Welke	Bakterientiter (cfu/g Pflanze)	Mittelwert der Bakterientiter (cfu/g Pflanze)
CMM101 β 3330-18	17	—	$1,2 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$
CMM101 β 3330-18	17	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 β 3330-18	18	—	$0,0 \times 10^0$	$1,9 \times 10^5$
CMM101 β 3330-18	18	—	$5,8 \times 10^5$	
CMM101 β 3330-18	18	—	$2,7 \times 10^3$	
CMM101 β 3330-18	21	—	$1,1 \times 10^5$	$7,0 \times 10^4$
CMM101 β 3330-18	21	—	$9,5 \times 10^4$	
CMM101 β 3330-18	21	—	$6,3 \times 10^3$	
CMM101 β 3330-18	22	—	$0,0 \times 10^0$	$2,4 \times 10^5$
CMM101 β 3330-18	22	—	$2,4 \times 10^5$	
CMM101 β 3330-18	22	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 β 3330-18	23	—	$0,0 \times 10^0$	$1,9 \times 10^3$
CMM101 β 3330-18	23	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 β 3330-18	23	—	$1,9 \times 10^3$	
CMM101 β 3330-18	24	—	$1,8 \times 10^5$	$6,9 \times 10^4$
CMM101 β 3330-18	24	—	$2,6 \times 10^4$	
CMM101 β 3330-18	24	—	$8,2 \times 10^2$	
CMM101 β 3330-18	25	—	$4,4 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$
CMM101 β 3330-18	25	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 β 3330-18	25	—	$6,0 \times 10^2$	
CMM101 β 3330-18	28	—	$0,0 \times 10^0$	$7,7 \times 10^4$
CMM101 β 3330-18	28	—	$1,5 \times 10^5$	
CMM101 β 3330-18	28	—	$8,0 \times 10^3$	
CMM101 β 3330-18	29	—	$3,7 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$
CMM101 β 3330-18	29	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 β 3330-18	29	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 β 3330-18	30	—	$0,0 \times 10^0$	$0,0 \times 10^0$
CMM101 β 3330-18	30	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 β 3330-18	30	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 β 3330-18	31	—	$0,0 \times 10^0$	$1,8 \times 10^3$
CMM101 β 3330-18	31	—	$1,8 \times 10^3$	
CMM101 β 3330-18	31	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 β 3330-18	32	—	$0,0 \times 10^0$	

Stamm	Tag	Welke	Bakterientiter (cfu/g Pflanze)	Mittelwert der Bakterientiter (cfu/g Pflanze)
CMM101 β 3330-18	32	—	$7,4 \times 10^3$	$8,5 \times 10^3$
CMM101 β 3330-18	32	—	$9,6 \times 10^3$	

Tabelle 6.4: Analyse der Kolonisation im zeitlichen Verlauf bei CMM101*chpC β* (Einzelwerte und arithmetische Mittelwerte), „(+):“: leichte/beginnende Welke, „+“: deutliche Welke (mindestens ein deutlich welkendes Blatt), „++“: starke Welke (2/3 der Blätter welken), „tot“: so starke Welke, dass keine Photosynthese mehr möglich ist, nicht infizierte Pflanzen gehen nicht in die Berechnung des Mittelwertes der Bakterientiter ein

Stamm	Tag	Welke	Bakterientiter (cfu/g Pflanze)	Mittelwert der Bakterientiter (cfu/g Pflanze)
CMM101 <i>chpCβ</i>	1	—	$1,1 \times 10^4$	$6,8 \times 10^7$
CMM101 <i>chpCβ</i>	1	—	$1,4 \times 10^8$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	1	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	2	—	$4,4 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$
CMM101 <i>chpCβ</i>	2	—	$3,8 \times 10^6$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	2	—	$1,1 \times 10^6$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	3	—	$5,5 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$
CMM101 <i>chpCβ</i>	3	—	$8,5 \times 10^5$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	3	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	4	—	$4,4 \times 10^6$	$3,7 \times 10^6$
CMM101 <i>chpCβ</i>	4	—	$6,3 \times 10^6$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	4	—	$5,2 \times 10^5$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	7	—	$3,2 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$
CMM101 <i>chpCβ</i>	7	—	$3,2 \times 10^8$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	7	—	$6,0 \times 10^5$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	8	—	$6,0 \times 10^5$	$1,7 \times 10^8$
CMM101 <i>chpCβ</i>	8	—	$3,0 \times 10^5$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	8	—	$3,2 \times 10^8$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	9	—	$1,0 \times 10^9$	

Stamm	Tag	Welke	Bakterientiter (cfu/g Pflanze)	Mittelwert der Bakterientiter (cfu/g Pflanze)
CMM101 <i>chpCβ</i>	9	—	$5,8 \times 10^8$	$5,3 \times 10^8$
CMM101 <i>chpCβ</i>	9	—	$3,0 \times 10^6$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	10	—	$0,0 \times 10^0$	$4,0 \times 10^7$
CMM101 <i>chpCβ</i>	10	—	$2,5 \times 10^6$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	10	—	$7,7 \times 10^7$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	11	—	$0,0 \times 10^0$	$4,9 \times 10^8$
CMM101 <i>chpCβ</i>	11	+	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	11	—	$4,9 \times 10^8$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	14	—	$0,0 \times 10^0$	$2,7 \times 10^7$
CMM101 <i>chpCβ</i>	14	—	$6,3 \times 10^6$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	14	—	$7,4 \times 10^7$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	15	—	$2,0 \times 10^8$	$8,4 \times 10^8$
CMM101 <i>chpCβ</i>	15	—	$8,6 \times 10^7$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	15	—	$2,2 \times 10^9$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	16	—	$5,3 \times 10^7$	$5,8 \times 10^7$
CMM101 <i>chpCβ</i>	16	(+)	$6,2 \times 10^7$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	16	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	17	—	$1,3 \times 10^7$	$8,2 \times 10^7$
CMM101 <i>chpCβ</i>	17	—	$7,8 \times 10^7$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	17	(+)	$1,5 \times 10^8$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	18	—	$7,1 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$
CMM101 <i>chpCβ</i>	18	+	$3,2 \times 10^8$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	18	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	21	+	$2,2 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$
CMM101 <i>chpCβ</i>	21	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	21	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	22	—	$8,9 \times 10^7$	$6,5 \times 10^7$
CMM101 <i>chpCβ</i>	22	—	$4,1 \times 10^7$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	22	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	23	—	$6,0 \times 10^4$	$3,2 \times 10^7$
CMM101 <i>chpCβ</i>	23	(+)	$9,6 \times 10^7$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	23	—	$1,1 \times 10^6$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	24	—	$6,9 \times 10^7$	

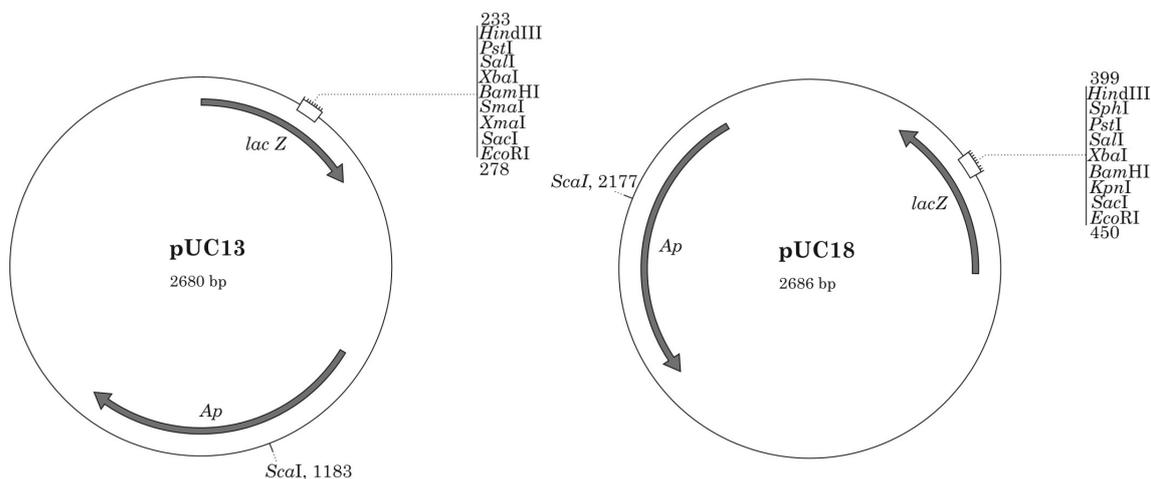
Stamm	Tag	Welke	Bakterientiter (cfu/g Pflanze)	Mittelwert der Bakterientiter (cfu/g Pflanze)
CMM101 <i>chpCβ</i>	24	—	$3,9 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7$
CMM101 <i>chpCβ</i>	24	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	25	—	$5,5 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$
CMM101 <i>chpCβ</i>	25	—	$2,1 \times 10^7$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	25	—	$3,6 \times 10^7$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	28	(+)	$5,3 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
CMM101 <i>chpCβ</i>	28	—	$5,6 \times 10^6$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	28	—	$1,4 \times 10^7$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	29	—	$0,0 \times 10^0$	$3,8 \times 10^7$
CMM101 <i>chpCβ</i>	29	—	$2,1 \times 10^7$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	29	—	$5,5 \times 10^7$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	30	—	$6,1 \times 10^7$	$6,7 \times 10^7$
CMM101 <i>chpCβ</i>	30	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	30	+	$7,4 \times 10^7$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	31	—	$9,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^8$
CMM101 <i>chpCβ</i>	31	—	$3,2 \times 10^8$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	31	—	$2,7 \times 10^7$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	32	—	$8,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$
CMM101 <i>chpCβ</i>	32	—	$0,0 \times 10^0$	
CMM101 <i>chpCβ</i>	32	—	$2,0 \times 10^7$	

6.3 Primer

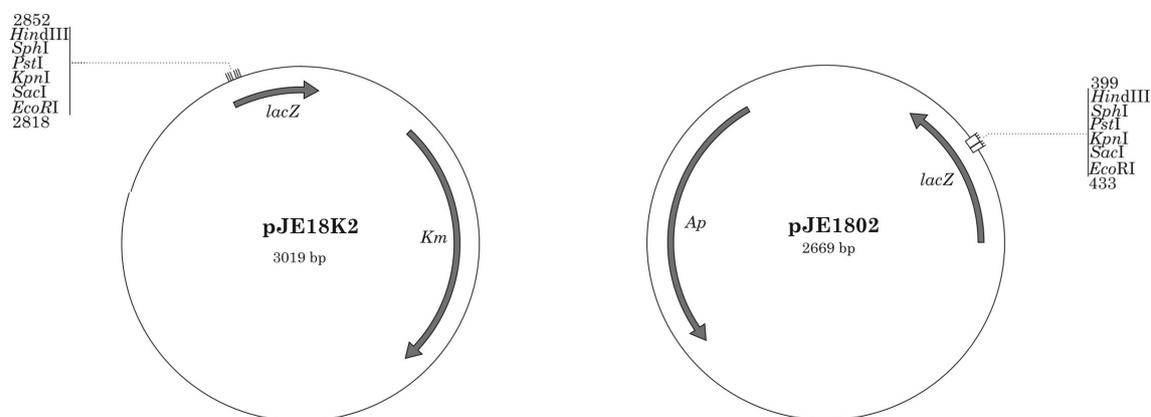
Name	Sequenz 5' → 3'
chpA-1	GTA GCT CGT GCT TCG TTG CC
chpA-2	CTC CTT GCC TCG TTG CAG CTG
chpB-1	GAG CAC GAC TCT GTA CTC G
chpB-2	GGT GAA TGC CGA ACA GTA CG
chpC-1	CCC CAT CGG AAC GGT TTA TTG G
chpC-2	GCT CTG CTC TGT GAG ACG ATG
chpD-1	GCA CTG CCG GTG CAG TTG TTG
chpD-2	GCT ATA CCG TAT ATC CGA GCG TC
chpE-1	CTA TAG CAC TCG CAC TCA TGG C
chpE-2	CTT GCT GGT GCC ATG TGG TAT C
chpF-1	CTC AAC TAT GCC ACG CCA GC
chpF-2	GAT AGC ACC TGC GAC ATT GG
chpG-1	CAA TAG GGG CTG CTC TTC TCG
chpG-2	CAT GAA GAC TTG GCC GTT GGC TC
P 5	GCG AAT CAG CCC ATA TCA A
P 6	CGT CAG GAG GTC GCT AAT A
PRC 3	TCG TCT CGA ACT TCG TAC CG
PFC 1	GTC TGA GCT CTG GTA CAC AT
cmx-SphI-a	ACA TGC ATG CAT GTG TGA AAT ACT TAA CGA ACT A
cmx-SphI-b	ACA TGC ATG CAT GTG TAA CGA TGT CCA CCG CCG T
pat627	CGT CAA TGA CTA CGA GCC TCG
pat710	GCT ACC TGC ACG GAT GAC TC
pat1114	GGT CTC AGG AGT TCT GGG ACA G
pat1291	CAC CTG ACG TCA CGA AAC GGT TC
pat2124	CTG ATT CGG CTC CAC ACT CCA G
Rand rechtsN	CTC GAT ACC ATC TCG CCA TAG
Rand links	TTC GTA GGA GTG CCA CGT C

6.4 Plasmidkarten

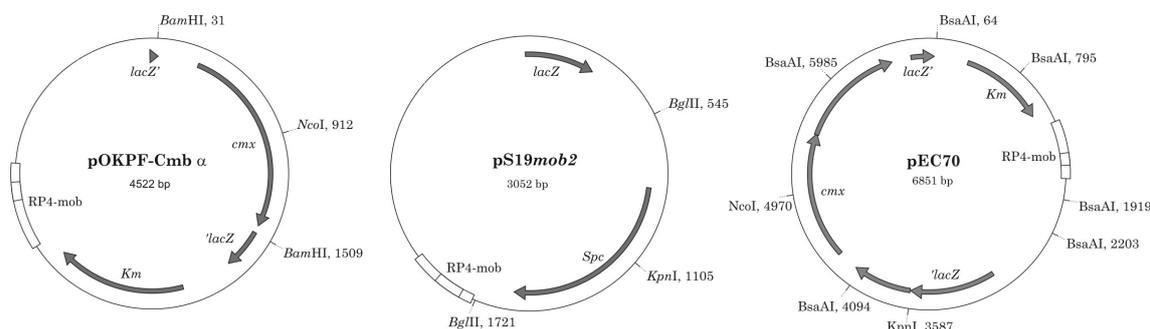
In den folgenden Plasmidkarten sind nur ausgewählte Restriktionsschnittstellen eingezeichnet.



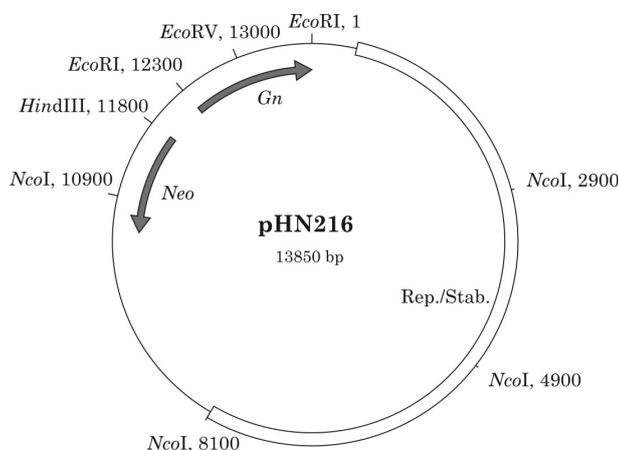
Physikalische Karten der *E. coli*-Klonierungsvektoren pUC13 und pUC18 (*Ap*: Ampicillin-Resistenzgen, *lacZ* α : α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation).



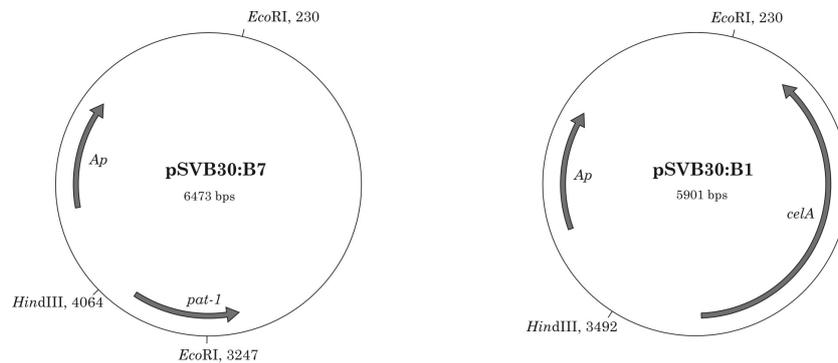
Physikalische Karten der Plasmide, die für die Klonierung der Gene *pelA* und *pelC* verwendet wurden [pJE18K2: pK18mob, Δ 17 bp-*HincII*-*SmaI*-Fragment (*BamHI* fehlt in der *mcs*), *Km*: Kanamycin-Resistenzgen; pJE1802: pUC18, Δ 17 bp-*HincII*-*SmaI*-Fragment (*BamHI* fehlt in der *mcs*), *Ap*: Ampicillin-Resistenzgen, *lacZ* α : α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation].



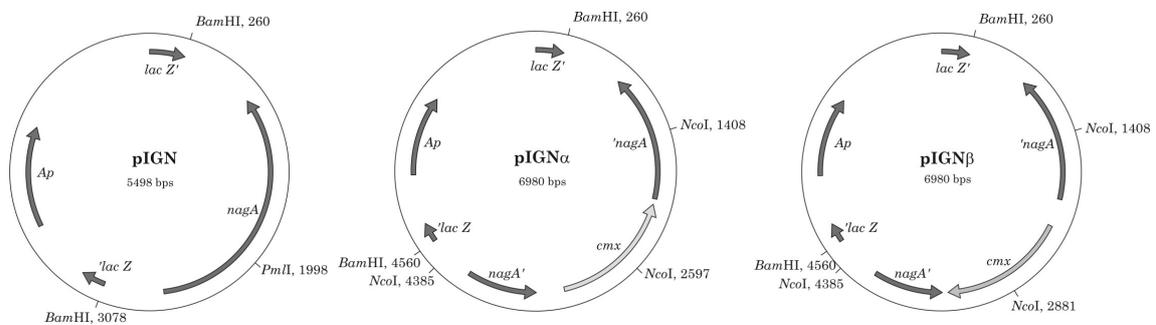
Physikalische Karten der Plasmide, die die Resistenzgene *cmx* und *spc* für die Erzeugung der Mutageneseplasmide tragen [pOKPF-cmb α : 1,5 kb *Bam*HI-*cmx*-Fragment, *Ap*: Ampicillin-Resistenzgen, *cmx*: Chloramphenicol-Resistenzgen; pS19mob2: 1,2 kb *Bgl*III-*spc*-Fragment, *Spc*: Spectinomycin-Resistenzgen, *Ap*: Ampicillin-Resistenzgen; pEC70: 1,9 kb *Bsa*AI-*cmx*-Fragment, *cmx*: Chloramphenicol-Resistenzgen, *Km*: Kanamycin-Resistenzgen, *lacZ* α : α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation, RP4mob: *mob*-Region des Plasmids RP4].



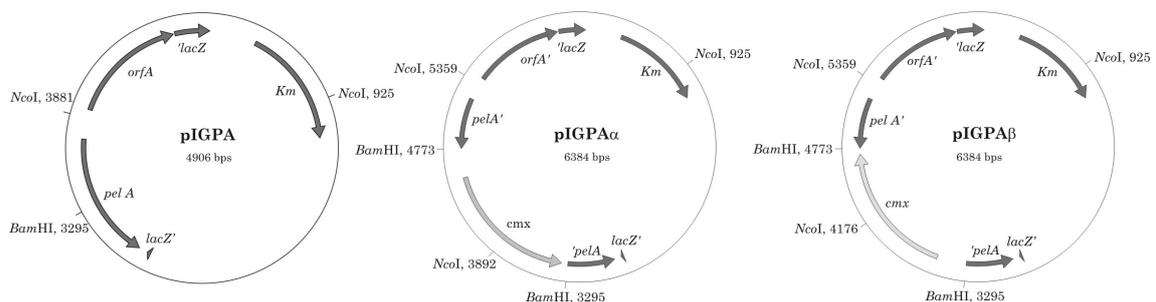
Physikalische Karte des *E. coli*-*Cmm*-Shuttle-Vektors pHN216 (Replikon von pCM2, Rep./Stab.: Replikations-/Stabilitätsregion, *Gn*: Gentamycin-Resistenzgen, *Neo*: Neomycin-Resistenzgen).



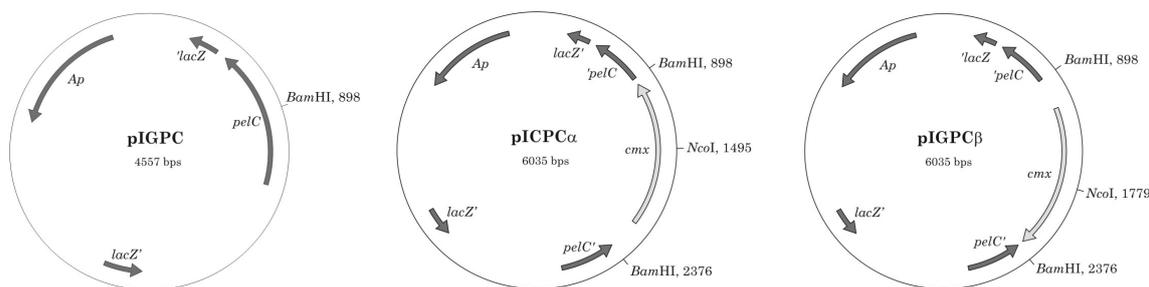
Physikalische Karten der Pathogenitätsdeterminanten tragenden Plasmide (pSVB30:B7 α : *pat-1*, *Ap*^R; pSVB30:B1 α : *celA*, *Ap*: Ampicillin-Resistenzgen).



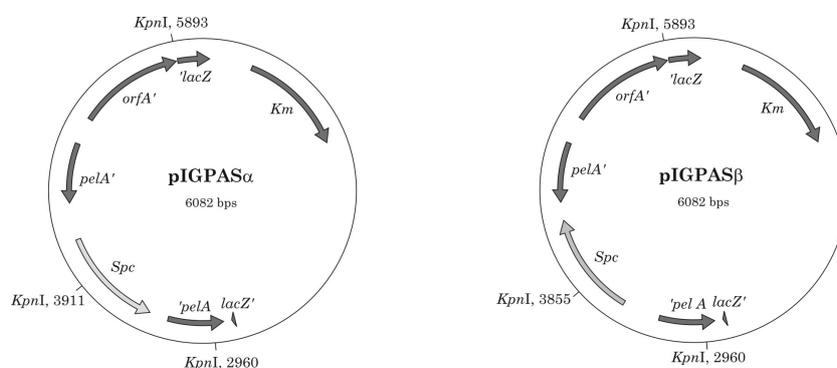
Physikalische Karten des Plasmids pIGN und der Mutageneseplasmide pIGN α und pIGN β (*nagA*: β -1,4-N-Acetylglucosaminidase, *cmx*: Chloramphenicol-Resistenzgen, *Ap*: Ampicillin-Resistenzgen, *lacZ* α : α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation).



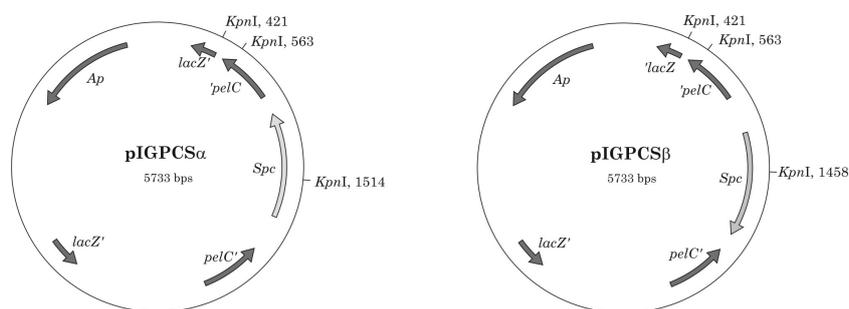
Physikalische Karten des Plasmids pIGPA und der Mutageneseplasmide pIGPA α und pIGPA β (*pelA*: Pektat-Lyase, *cmx*: Chloramphenicol-Resistenzgen, *Km*: Kanamycin-Resistenzgen, *lacZ* α : α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation).



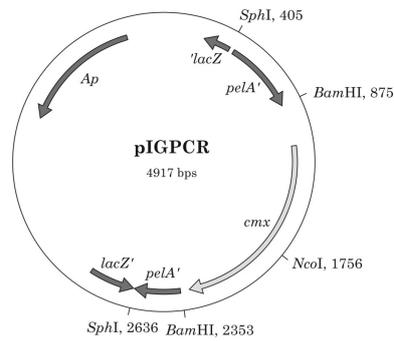
Physikalische Karten des Plasmids pIGPC und der Mutageneseplasmide pIGPC α und pIGPC β (*pelC*: Pektat-Lyase, *cmx*: Chloramphenicol-Resistenzgen, *Ap*: Ampicillin-Resistenzgen, *lacZ α* : α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation).



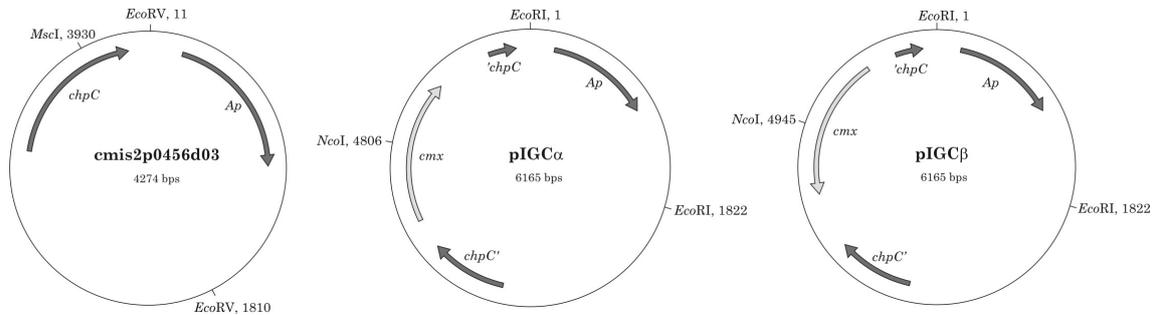
Physikalische Karten der Mutageneseplasmide pIGPAS α und pIGPAS β (*pelA*: Pektat-Lyase, *spc*: Spectinomycin-Resistenzgen, *Km*: Kanamycin-Resistenzgen, *lacZ α* : α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation).



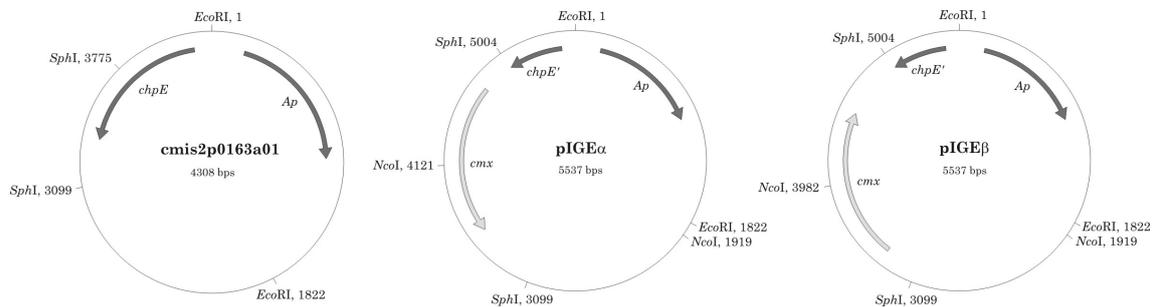
Physikalische Karten der Mutageneseplasmide pIGPCS α und pIGPCS β (*pelC*: Pektat-Lyase, *spc*: Spectinomycin-Resistenzgen, *Ap*: Ampicillin-Resistenzgen, *lacZ α* : α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation).



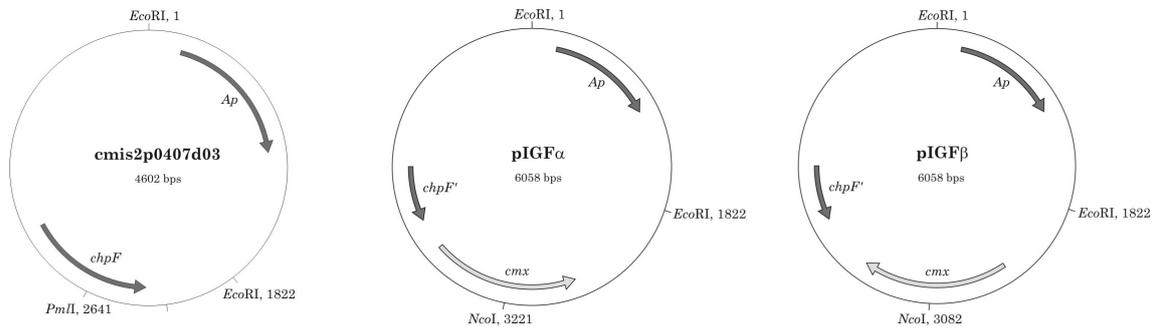
Physikalische Karte des reisolierten inaktivierten *pelC*-Gens (*pelC*: Pektat-Lyase, *cmx*: Chloramphenicol-Resistenzgen, *Ap*: Ampicillin-Resistenzgen, *lacZ α* : α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation).



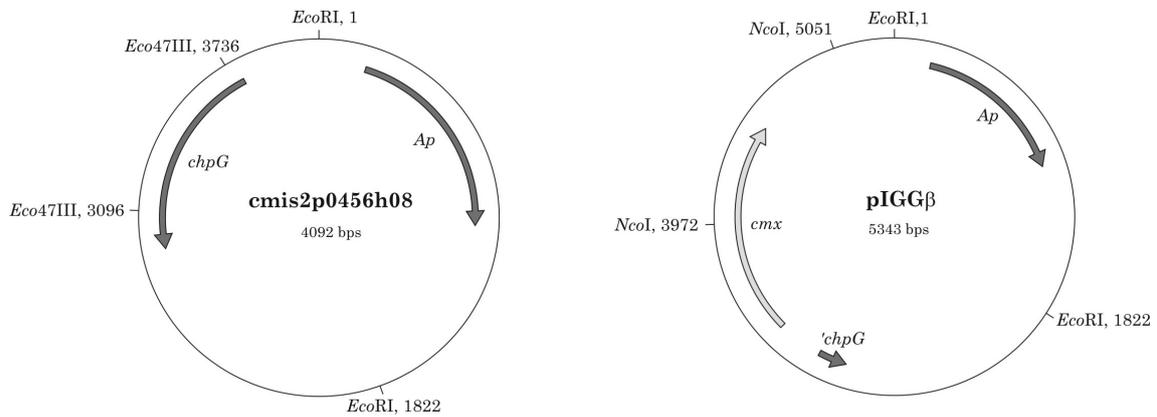
Physikalische Karten des Plasmids *cmis2p0456d03* und der Mutageneseplasmide *pIGC α* und *pIGC β* (*chpC*: Serinprotease, *cmx*: Chloramphenicol-Resistenzgen, *Ap*: Ampicillin-Resistenzgen).



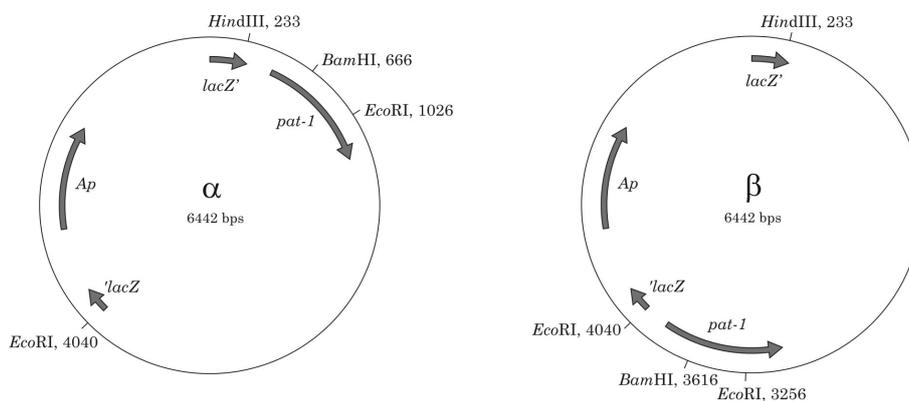
Physikalische Karten des Plasmids *cmis2p0163a01* und der Mutageneseplasmide *pIGE α* und *pIGE β* (*chpE*: Serinprotease, *cmx*: Chloramphenicol-Resistenzgen, *Ap*: Ampicillin-Resistenzgen).



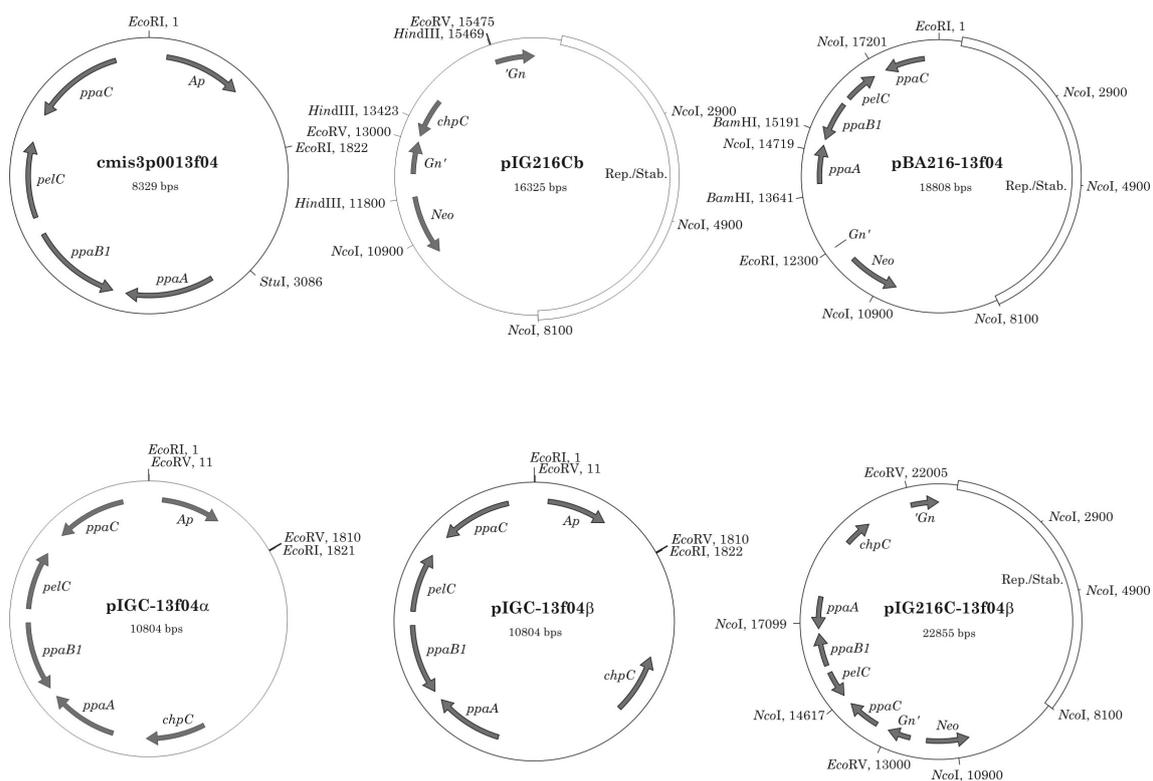
Physikalische Karten des Plasmids **cmis2p0407d03** und der Mutageneseplasmide **pIGF α** und **pIGF β** (*chpF*: Serinprotease, *cmx*: Chloramphenicol-Resistenzgen, *Ap*: Ampicillin-Resistenzgen).



Physikalische Karten des Plasmids **cmis2p0456h08** und des Mutageneseplasmides **pIGG β** (*chpG*: Serinprotease, *cmx*: Chloramphenicol-Resistenzgen, *Ap*: Ampicillin-Resistenzgen).



Physikalische Karten der Plasmide, die das 3,75 kb *Bgl*II-Fragment der Isolate tragen. Exemplarisch in α - und β -Orientierung dargestellt (*Ap*: Ampicillin-Resistenzgen, *lacZ* α : α -Fragment des *lacZ*-Gens für α - ω -Komplementation).



Physikalische Karten der Plasmide, die die Gene *chpC* und/oder *ppaA*, *ppaB1* und *ppaC* besitzen (*chpC*: Serinprotease, *ppa*: Serinproteasen, *Neo*: Neomycin-Resistenzgen, *Gn*: Gentamycin-Resistenzgen, *Ap*: Ampicillin-Resistenzgen, Rep./Stab.: Replikations-/Stabilitätsregion).

6.5 Alignments

Bei allen Alignments zeigt die Farbe des Hintergrundes der Aminosäuren an, ob die Aminosäuren zu 100% identisch (schwarz), zu 80% identisch (dunkelgrau) oder zu 60% identisch (hellgrau) sind (hellgrau).

Protein-Alignment der Pat-1 Homologen von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (ChpA-ChpG), von *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (ChpS1-ChpS11) und *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx)

		*	20	*	40	*	60	*	80	*			
Pat-1	:		-----MQFMSRINR-----		-----ILFVAVVSLLSVLGCCVAAAPQAV-----		-----DRIARVSLPVRAGTHL-IFS-DSQG	:	57				
ChpA*	:		-----MWRIDR-----		-----PLFVAVISVLSVLCGVAAAPQAV-----		-----DRVARSLPVRAGTHL-IFG-DRQV	:	54				
PhpA	:		-----VTFGRVCGERASPCFVAIVRFMSHISR-----		-----SLIVICVTIASALGCCVVAAPQAV-----		-----DRVARNSLPVRAGTRL-VFS-DSQG	:	76				
ChpS2	:		-----VSTSVRIPHK-----		-----SIFALLAFATVAGCCVAAAPQAV-----		-----DRIARSLPVRAGTHL-IFS-ESDG	:	58				
ChpS3	:		-----LPR-----		-----FWGVAPSPRPPARPPARPPARAV-----		-----DRLARNSLPVRAGTHL-IFS-ESHG	:	49				
PhpB	:		-----MNTSTNSHHP-----		-----ATIKLVIAVIVIGICLLDSAPARAV-----		-----DVAARTSLPVRAGSELRIVA-TPSG	:	59				
ChpS4	:		-----MMRGATHDRDVARP-PRAGAGSRWRAVRGRASS-----		-----LIAVAV-----VVIASLTVAAAPARAV-----		-----DFEARSETPIRAGSVITFYGGSGSG	:	79				
ChpS5p	:		-----MPALLVFLHRRRLSGPYTNSPVTGSQRARRRRSSGPTRSLPLLAIVGLVVAVSLVDPAPQAV-----		-----DRWARSQLEPVHAGSALVIAG-AQSG	:	91						
ChpB*	:		-----MPPTTSERKKPLMPKGSYDPSHRIPASDRMPQRRRQYRFRFLFVLSLLSVTPAVTTAIPAQAV-----		-----GSN-RTSLPIVXRIGTYVVFTHPTP	:	89						
ChpS6	:		-----LLRTHSLTSRS-----		-----ARLLIACAAVTLTCLTPLIVAPSSAPQAV-----		-----GAV-RTSLPIV-AGTKLTFSEPS	:	62				
ChpD*	:		-----MLNPH-----		-----LAAVAAITCLCAVILPAAAPSAI-----		-----DRQ-RIVLPIVX-----ALALSYSSP	:	48				
ChpS7	:		-----MRLPLHHPRP-----		-----RRRLGLVLTALAAAALVLTGAAPASAV-----		-----SPL-RLATPVMA-----GSQIRNA	:	56				
ChpS10	:		-----MIPARSK-----		-----RLALAMLTAFTVTPSVVGGAAASDASQI-----		-----SPL-RLQRPVMA-----GTKIRSA	:	53				
ChpS8	:		-----VIDGLRRVLP-----		-----SVQLRFALATLAGAALLLPLGATPASAV-----		-----DAV-RLQAPVMA-----GSQIRNS	:	56				
ChpF	:		-----VAVQASHAAQARHTRGVLRRQAA-----		-----ILLTVVAVLTGLNYATPAQAVTIPSNPDRIREPVVAG-----		-----SKVNTP	:	67				
ChpG	:		-----LPAHHHTIQRK-----		-----RSIGAALLALPATLVLTCAAGTPEAYANGL-SNPDRGNPPIIAG-----		-----SEVGV	:	59				
ChpS9	:		-----VLLAAVSALILSSPVSAAPAP-PLNPDRIIRLPIVAG-----		-----TKLNGD	:	42						
ChpE	:		-----MKHFKILTSAAVMGATLALMAPSAPAR-----		-----TSPERSVVPVVG-----TEVWVK	:	48						
ChpC	:		-----MSKTHFR-----		-----GIYFIVIPIALGLMAASSTVWSAPF-----		-----TEGARQTRPVVAG-----S	:	46				
ChpS11	:		-----MTKTPSR-----		-----RLYFLIIEITLGLAAVSTGSSAPF-----		-----TEGARQTRPVVAG-----S	:	46				
Lxx_pat1	:		-----MFSFRWRVLR-----		-----RASIAGLVVALVAGLVATTPASA-----		-----VQPIRSGPMVVG-----T	:	50				
ChpS1	:		-----MSPTFVSSISVALRGYARRRF-----		-----RTWRHRAAVVLVTAALVASATPASA-----		-----VDYERTQYVVG-----T	:	61				
			100	*	120	*	140	*	160	*	180	*	
Pat-1	:		PAR-SADYDCTAGAVLTGSGILSRISF		YQRAVRYVATAKHCG		GRGAHVGVGDVQ				VGSVTESSDAD	:	122
ChpA*	:		PAR-SPDYDCTAGAVLTGSGILSRITP		XYQRAVGYAVTAKHCG		GRSAHVGVGDVQ				VGSVTESSDAD	:	120
PhpA	:		PAR-SPDYECTAGAVLTGSGILSRISF		YQRAVRYVATAKHCG		GRGAHVGVGDVQ				VGSVTESSDAD	:	141
ChpS2	:		PTY-TRDYDCTAGAVLTGSGILSRITP		YQRAVRYVATAKHCG		GRGAHVGVGDVQ				VGSVTESSDAD	:	123
ChpS3	:		STY-TRDYDCTAGAVLTGSGILSRITP		YQRAVRYVATAKHCG		GRGAHVGVGDVQ				VGSVTESSDAD	:	114
PhpB	:		PFFY-SRDVRCCTAGAVLRATGLLANLTS		YQRAVRYVATAKHCG		TLGQKRYGNTE				VGSVTESSDAD	:	124
ChpS4	:		FAH-PVDHHCCTAGAVLVARGIISNFTS		YQRAVRYVATAKHCG		VQGGKAYAGDVE				VGSVTESSDAD	:	144
ChpS5p	:		FAH-GTDQDCTAGAVLVKGTGLIANLST		YQRAVRYVATAKHCG		VQGGKAYAGDVE				VGSVTESSDAD	:	156
ChpB*	:		PGTYSADVRCCTAGAVLKSTITLYSRILP		FAAARKRYLATAKHCG		DLNADVYAGDTN				VGSVTESSDAD	:	155
ChpS6	:		PGTYTADSYCTAGAVLKSTITLYSRILP		FSAARKRYLATAKHCG		SLGATVYGEDN				VGSVTESSDAD	:	128
ChpD*	:		HGN-----CTAGAVVVRTGIFRNLSA		YQRAVRYVATAKHCG		TLNSVSVGGRR				VGSVTESSDAD	:	108
ChpS7	:		SGY-----KCTAGAVLKIDRWITTFNS		WEGATRYVATAKHCG		DLNENVTLGSSV				VGSVTESSDAD	:	117
ChpS10	:		SGA-----NCTAGAVMKYSGICTATLST		FAAARKRYLATAKHCG		KKGEKFTLGSV				VGSVTESSDAD	:	114
ChpS8	:		DGS-----FCTAGAVLDYHSVASYLPL		AQRAVRYVATAKHCG		PLHAALVLSGSV				VGSVTESSDAD	:	117
ChpF	:		TG-----SCVAGAVLIPRSTYSRITP		YQRAVRYVATAKHCG		MYAPDVGTSI				VGSVTESSDAD	:	127
ChpG	:		NG-----YCSVAGAVLVPSSIFQRIIP		YQRAVRYVATAKHCG		LNSPIYFAQD				VGSVTESSDAD	:	119
ChpS9	:		AG-----SCVAGAVLQ-YDFYQLTPAGFAAKATRYVATAKHCG		VGEIVRGGVP						VGSVTESSDAD	:	103
ChpE	:		WSG-----QNCVGVVVLQKSGLWAAISP		SERGARVYVATAKHCG		VRRTTEPEVORTANG				VGSVTESSDAD	:	116
ChpC	:		QLEFEFGGDCCTAGAVVQKNSWVAVFFA		KERATRYVATAKHCG		VARTGERVVR				VGSVTESSDAD	:	122
ChpS11	:		QLEFEFGGDCCTAGAVVQKNSWVAVFFA		KERATRYVATAKHCG		VARTGERVVR				VGSVTESSDAD	:	122
Lxx_pat1	:		ELQFPNGTECTAGAVVWNTLRWNTLTA		YQRAVRYVATAKHCG		NVDIGVSWKPGPPDP				VGSVTESSDAD	:	142
ChpS1	:		ALQMRG-GYCTAGAVVKKDGLANLSA		ASRAVRYVATAKHCG		PVGTDSVQ				VGSVTESSDAD	:	126

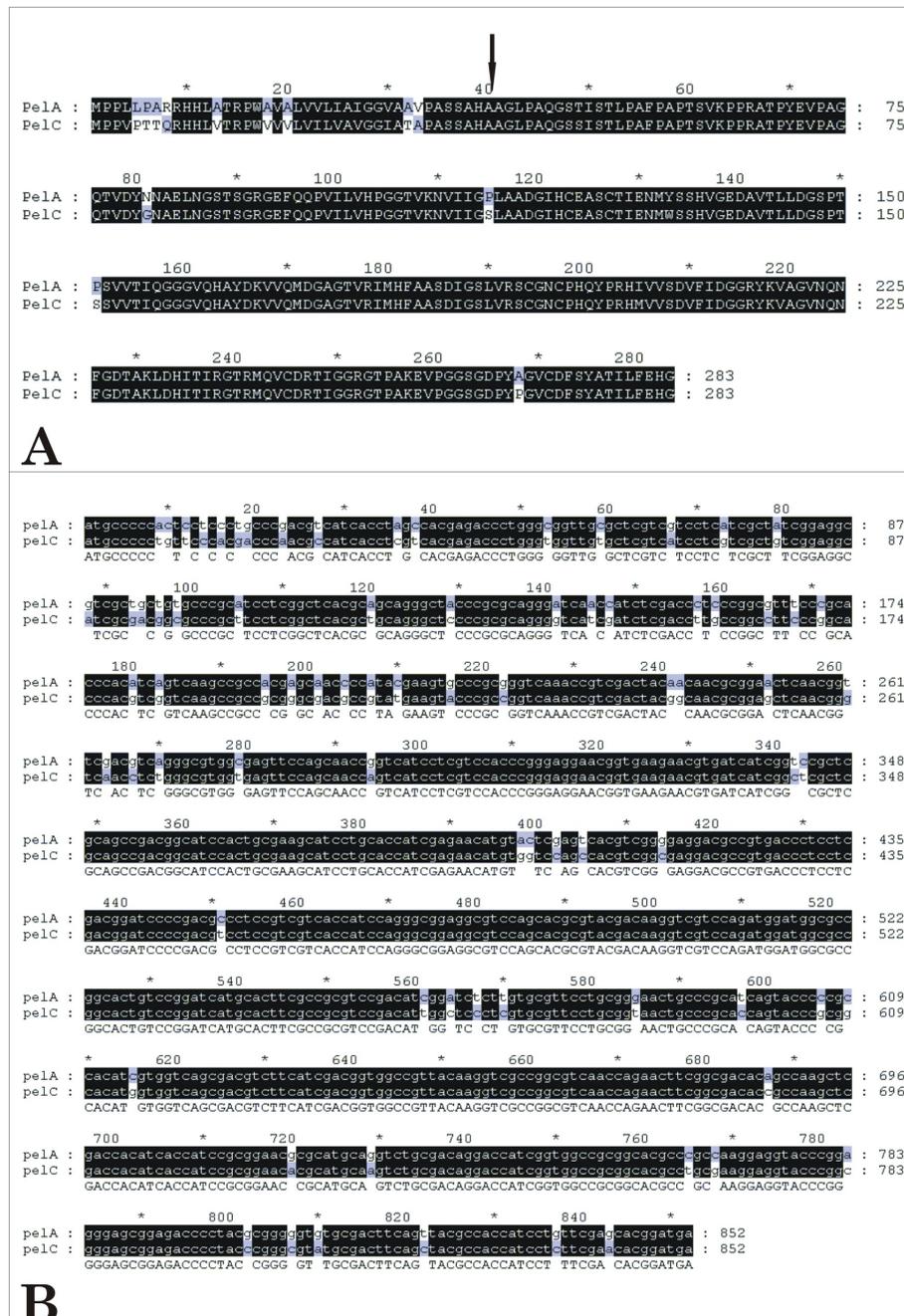
```

                200          *          220          *          240          *          260          *          280
Pat-1 : LSTVREDELLQTRRS--CYPTSAG--IRCTLVNDYEPRA SGEVFGAR--NRSQQESSVQVAGTKVADREIFCTSGAITGILQNVASAPPPR--G : 209
ChpA* : LSTVREDELLTTRIXS--CYPTSAG--MRCTLVKDDERTSGEVSAAW--NRSQQESAVQVGTETIRAD-EI FCTSGAITGILQNVASAPPPR--G : 206
PhpA : LSTVREDESSQTRRS--CYPTSAG--IRCTLVNDYEPRA SGEVFGAR--NRSQQESSVPVAGTKVDSEREI FCTSGIITGILQNVASIPPLR--G : 228
ChpS2 : LSTVREDELLQTRRS--CYPTSAG--IRCTL TSDYEPRA SGEVFAVR--NRSQQESSVVPVAGTKVADREI FCTSGYITGERLQNVASTNRPP--G : 210
ChpS3 : LSTVREDELLQTRRS--CYPTSAG--IRCTL TSDYEPRA SGEVLAVR--NRSQQESSVVPVAGTKVADREI FCTSGYITGERLQNVASVASPP--G : 201
PhpB : LALVREDETTSRSQY--CYPISAG--HRCEIVLTYEPRA VGEVFLGR--NRSQQESSIPVITGTGIDSDREI FCTSGASTGILQNVSTQTSPPA--G : 211
ChpS4 : LAVVREDESAVRSVQ--CYHTSSG--PRCTIVTHYTERA VGEVFAV--NRRGQELPLRAGAKVDSREVFCSGAMVTKVCTTTTPEPP--G : 231
ChpS5p : LALVREDERTTTPV--CHTGSWA--SGCSLVSHNEQRA SGEVFIAT--NRRGQELALPVGTKTDSREVFCTSGSKS GARCTHENVARPP--L : 243
ChpB* : LBLVREDEWVSRSTH--CSGTPSGA--PRCSIVQSYA PRA VGEVKLLNLPFSNFER--AVPLAGTGDENSTQICISGYVTGVNCTKLVTLPPTEE : 245
ChpS6 : LBLVREDESHRNTQ--CGPTHSGA--ARCSLIQS ETPRA IGEVFLHLPYSNFER--AIPVAGMGEVSATQIIC TSGYRTGPNCTERLVTLPNAE : 218
ChpD* : LBLVKIDDEIHGQP--ICAPTSAG--FHCSGTQYTERA VGERLMLSTLYRSIQ--STP VAGTGA VGDNEI FCTSGKSSGXSCEFTSTPWLPFRD : 197
ChpS7 : LBLVREDEWVSRSTH--CSHTSAG--EYCRIVLTYHQA VGERLITRD--DNTWREQRTPVATGEP--DDRVP CVSAIRAQVAGLVRTTTTAAIA : 205
ChpS10 : LBLVREDETSRISRY--CGPSHSGT--LFCQNVTTTYPQADGRVLSA--LNTGSPITPIVNR TGS GDEESVCRSGAVGVVDTLMLTHIPSPVL : 204
ChpS8 : VBLITVAFLAQRQ--ICSYTSYG--PYCHVIVAVEPRA VGSVLA PAYS RDRYRPMVTPVGVGSVTPREQ FCTSGRTTGLICGVVPGQLPRTWF : 208
ChpF : LBLVREDESRDPSP--LICVAHPKHPAVCSPPQTETARAAGQVEMTA--RGHVARLPV TGS GAADD--R FCTSGWSTGVQCTHGVSPPTPT : 216
ChpG : LBLVREDESRDNT--LHCAGHS--TPATCSPIQTEPRA VGEVEMTA--PPSPVGRRA VAGTGI V SATGT FCTSGHVTGVICDQPTSLPVGVL : 209
ChpS9 : LBLVREDAKLDPSAGLHCATHG--SHPAPC--AHNYVYVPRATGEVITNS--GGHPRRMPVEGHTEAPA--GRFCTSGYFTGVQCDVTSFRGPEPQV : 191
ChpE : LALVREDEGSPHGAR--TCSATS--GHFICMPSTVYSQVFNRFPLG--FAPGHETTLPVTRQGVGPRET FCTSGAVTRSLCEWSTSNVPPAWV : 205
ChpC : LALVKIDDEIVHVS--YTCGSSSHGAPH--CLPVTITVTPNALPRLTASLRMRSTIYAQPVIGYDN--DGLNEA VATS GSTTGVQVNRRLSVRAWPP : 212
ChpS11 : LALVKIDDEIVHVS--YTCGSSSHGAPH--CLPVTITVTPNALPRLTASLRMRSTIYGQPVIGYGD--DGLNEA VATS GSTTGVQVNRRLSVRAWPP : 212
Lxx_pat1 : MAVVQKPVNTTTFH--CHNE--RSGFH--CLPIYMSA PRA VGRUITYQPRLRQF GAVPVETWQDDVVDNVNWF--CTSGISTDFTGLPEKY--QQLPP : 230
ChpS1 : LGMREVAENVRRIIP--HCCSRSTG--ISCVITSTYD PRA VGERLLASLRTRSTSTVPVTFGFDGAGSGD TDVCTSGAITGLSCLWTAH---ELT : 213

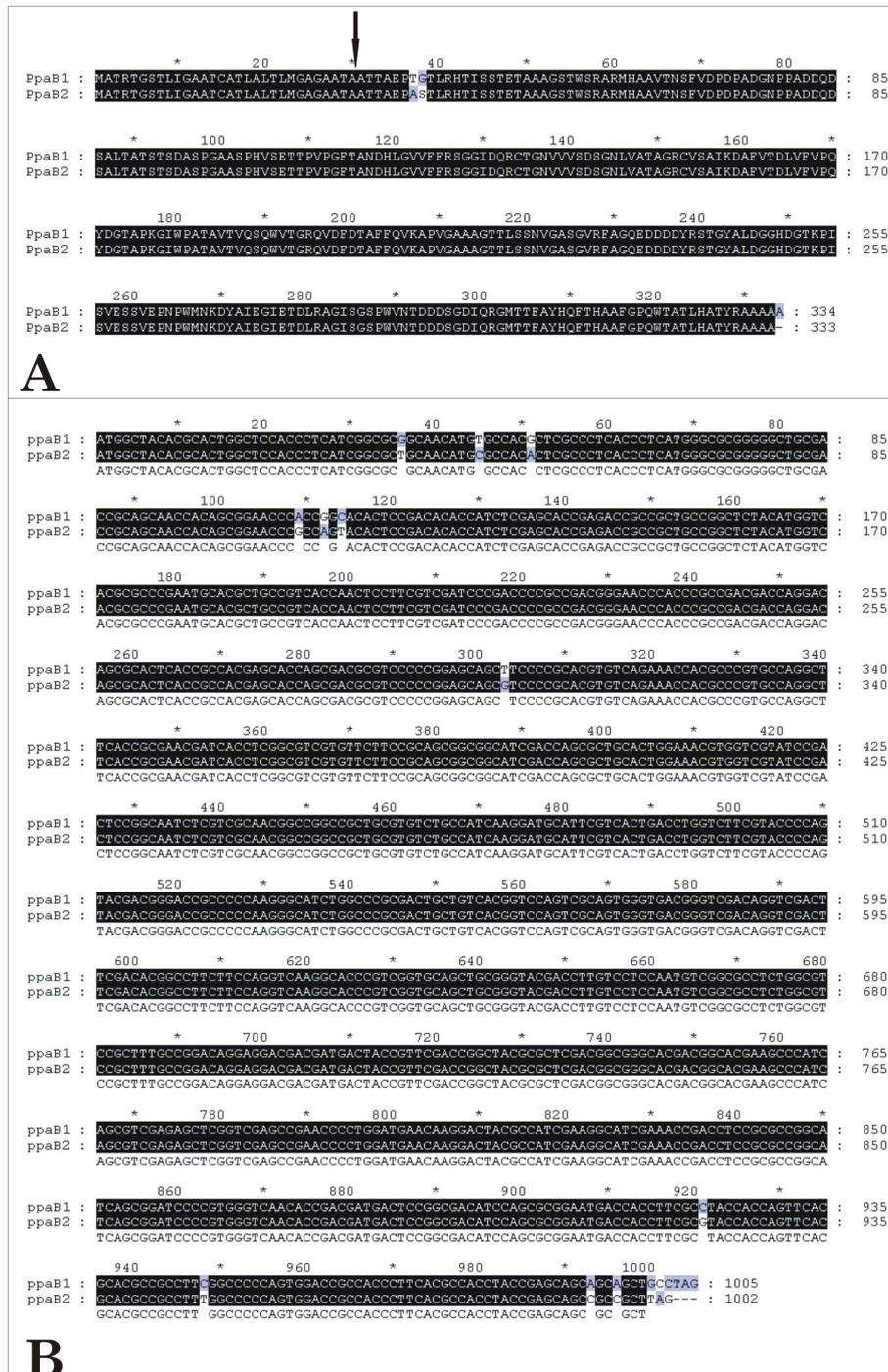
                *          300          *          320          *          340          *          360          *
Pat-1 : LE--IGSHQVVAETFSAAATRGDSCGPPVSRDM-----KII GVICDGG--LPGAGDDTYMSLPI SVLFR EQPY--YILATS--- : 280
ChpA* : LE--VGS HQVVAETFSAAATRGDSCG--XSRDI-----KIVGII CGGS--LPGSGDDTYMSLLI SMRE----- : 264
PhpA : TH--RGPEEVAETFSAGVLP GDSCGPPVSRDM-----KII GIMRKRK--NPGTAAETVMTYPI DALFRREPY--YVLATS--- : 299
ChpS2 : LI--VENQQLAETFSATATRGDSCGPPVSRDM-----KII GII GAGG--LPGSGDETYSIPI LAVLFR EQPY--YVLAT--- : 280
ChpS3 : LE--VENQEVVAETFSATATRGDSCGPPVGRDM-----KII GII GAAG--LPGSGRETYSIPI MAVLFR EQPY--YALAM--- : 271
PhpB : IH--IGPHQVTSRTSGANTXP GDSCGPPVGRSG-----TL YG DMSAGGGATNGQFADG--ESVPIGVLLRERPT--PAVVTGR--- : 284
ChpS4 : WRP--TGPHELIARTSGGNVLNGDSCAPVVSQDA-----KII GIVVGS--DDDGPYRTEMTYPI SYILQERSA--PALATS--- : 303
ChpS5p : FR--VGSHELVAETYRGNLAHGDSCAPVVEGRDR-----KII GVAIGVG--EENEDFATYTAIPI GYVLAEQPY--YAVATD--- : 314
ChpB* : AQA--RSRQKQVIRSGRSGESGDSCGPPVSSSG-----VIFGDHHS A--DPTREKWSIITPI SEFFREQPN--YALAPSS--- : 317
ChpS6 : AEA--RARGQVIRSVAGTDGDSCGPPVSPGG-----VIFGDHHS A--DPEHYSNVIITPI SEFFREQPN--YALAPSS--- : 290
ChpD* : DQH--R--GEVAVRGDTLIFP--GDSCAPVSSPDA-----RIYGTAGETS--TGPST--IMKTRIIQFEEDAGT--YALAPSS--- : 264
ChpS7 : AVH--PGIRA AEDRS--LDVQP--GDSCGPPVMSRSG-----TL YG FVSGGG--IYGGVR--KIDMPWSVFAHLQPN--YVLA PAG--- : 274
ChpS10 : AGL--PGVASASPTRRASED--GDSCAPVTS GSGGFTN---VALYGDLYGGG--WYGGVW--KNHITTAKFFFEETSG--YSLAPAL--- : 279
ChpS8 : VSD--P--ILHTGDIAGNIFD--GDSCGPPVMSVDG-----KII GII VGYG--RYAGVD--KMTL PFAVIQQQLPS--YGLAPA--- : 276
ChpF : LS--YEHLVAGESGQLLNDP GDSCGPPVNYSA-----BLGIISSV--LPRTTLMLTPMSQVLSLHD--YQLASGD--- : 284
ChpG : RA--YEHLAAGQSAAVGALRP GDSCGPPVSKDR-----RLGIIISGD-----VPNTHFLVTPMAQVHLHLS--YK LAPAN--- : 277
ChpS9 : SHGD IHSKAAESPVLGTTDGDSCGPPVYTYDR-----ELGIDNSQS--AYFGSILFVVPF SFVSNFPG--YSLATNR--- : 261
ChpE : QH---HVYAAARSTGANLLKGDSCGAVSR TG-----DFYGTATDSGLYSDHSNIDIMG--TDAARVLSDFRG--YHMAPAS--- : 277
ChpC : GFRDPRS GDQAASSTDFLLP GDSCGPPVFN--PDTG-----MLYGDMDQVPHR--LTEQSTMVYIKLSQFFHEQRE--YNVTR--- : 286
ChpS11 : GFRNPHSGDQAASSTDFLLP GDSCGPPVFN--PDTG-----MLYGDMDQVPRR--PTEQSTMVYIKLSEFFKEQRE--YNVTR--- : 286
Lxx_pat1 : GVDIG--PYRKAARSLSTAPP GDSCGPPVSDPNAGNANPNGVAFYVLRGFAF--PAPENAMYLPAGVFTQEWGQA VAVAPA--- : 313
ChpS1 : TEQVKYAGEHGATISGTGLLGDSCGPPVVS--TSG-----LLYGVHSAVFRS-----DPSLMTYISAGQFFLERPG--YSLAPS--- : 283

```

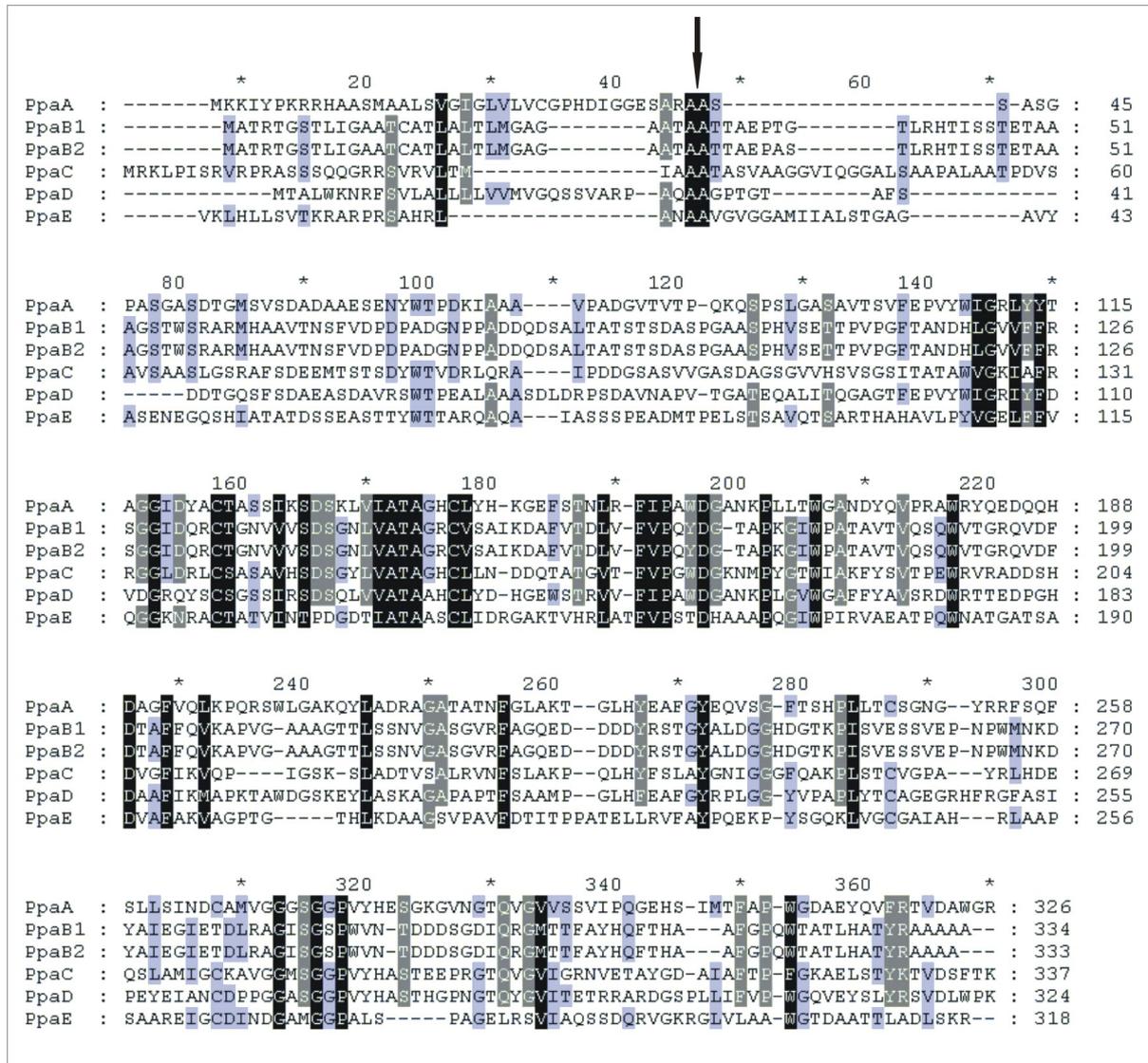
A: Protein-Alignment von PelA und PelC von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*,
 B: DNA-Alignment der Gene *pelA* und *pelC* von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*
 Der Pfeil in Abb. A zeigt die putative Prozessierungstelle von PelA und PelC (AHA-AGL).



A: Protein-Alignment von PpaB1 und PpaB2 von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*,
 B: DNA-Alignment der Gene *ppaB1* und *ppaB2* von *Cmm*. Der Pfeil in Abb. A zeigt die putative
 Prozessierungsstelle.



Protein-Alignment der Serinproteasen PpaA, PpaB1, PpaB2, PpaC, PpaD und PpaE. Der Pfeil zeigt die putative Prozessierungsstelle.



Abkürzungen

% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Acc. Nr.	Accession Nummer
add.	addieren (dazu geben)
Ap	Ampicillin
Ap ^R	Ampicillin-resistent
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylpyrophosphat
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa (ungefähr)
CaCl ₂	Calciumchlorid
cfu	colony forming units
Cm	Chloramphenicol
Cm ^R	Chloramphenicol-resistent
cm ²	Quadratzentimeter
<i>Cmm</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
<i>Cms</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>
<i>cmx</i>	Chloramphenicolexportergen
CsCl	Cäsiumchlorid
cv.	cultivar
d	Tag
d. h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -Aminoethylether)-tetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
et al.	et alii (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Farad
g	Gramm
HR	hypersensitive Reaktion
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
k	Kilo
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
K _m	Kanamycin
K _m ^R	Kanamycin-resistent
l	Liter
<i>lacZ</i>	Gen für β -Galactosidase
M	Molar
mcs	Multiple cloning site
mA	Milliampere
μ	mikro
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Millipore	entionisiertes Wasser aus der Millipore-Anlage
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MW	Molekulargewicht
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
NCPPB	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria
Neo	Neomycin
Neo ^R	Neomycin-resistent

nm	Nanometer
Ω	Ohm
o.D.	optische Dichte
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PS	Puffersaline
Pu	Purin
pv.	pathovar
Py	Pyrimidin
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per million (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecylsulfat (Natrium-Dodecylsulfat)
SSC	Sodium-Saline-Citrat (Natrium-Saline Citrat)
subsp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
TBY	Trypton-Broth-Yeast
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)Aminoethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
ü/N	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen
WI	Welkeindex
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

Eigene Publikationen

Kaup, O., Gräfen, I., Zellermann, E.-M., Eichenlaub, R., Gartemann, K. H. (2005)

Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382

MPMI, 18:1090-1098

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

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

Microbiol. Res., 160:417-427

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

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

J. Biotechnol., 106:179-191

In Bearbeitung:

A Family of Serine Proteases of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: ChpC plays a Role in Colonization of the Host Plant Tomato

Gräfen, I., Burger, A., Eichenlaub, R.

Danksagung

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

Dr. Karl-Heinz Gartemann möchte ich herzlich für die Bereitschaft, wissenschaftliche Fragen und Probleme jederzeit engagiert zu erörtern, und für die kritischen und konstruktiven Anmerkungen zu dieser Arbeit danken.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei der „Clavibacter“-Arbeitsgruppe für die tolle Zeit, das großartige Arbeitsklima und die Unterstützung in schwierigen Phasen der Arbeit.

Meiner Familie bin ich zu ganz besonderem Dank verpflichtet, da sie zu jedem Zeitpunkt für mich da gewesen ist und ich immer auf sie zählen konnte. Besonders Björn danke ich für seine Geduld und liebevolle Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Erklärung

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

Bielefeld, Dezember 2005

.....

Ines Gräfen