

**Die Rolle der Aconitasen als Fe-S-Proteine im Citrat-
und Eisenstoffwechsel des phytopathogenen
Bakteriums
Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

***doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Janine Kirchberg

geb. am: 14.05.1981 in Lutherstadt Eisleben

Gutachter /in

1. Prof. Dr. Gary Sawyer

2. Fr. Dr. Daniela Büttner

3. Prof. Dr. F. Börnke

Halle (Saale), den 15. 04. 2014

Teile dieser Arbeit wurden in einer Fachzeitschrift publiziert:

Kirchberg J., Büttner D., Thiemer B., Sawers R. G. (2012) "Aconitase B is required for optimal growth of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*" *PLoS One*. 7(4):e34941

Zusammenfassung

Das obligat aerob lebende Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) ist der Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit bei Paprika und Tomate. Xcv vermehrt sich ausschließlich im Interzellularraum zwischen Wirtszellen und nutzt ein T3SS, welches essentiell für dessen Pathogenität ist. Eine effektive Kolonisierung des Apoplasten ist außerdem abhängig von der Fähigkeit des Bakteriums, verfügbare Substrate nutzen zu können, sowie Änderungen der Eisen- und O₂-Konzentrationen und den Mengen an ROS zu sensieren. Aconitasen könnten aufgrund ihrer Fähigkeit Änderungen in den Mengen dieser Substrate durch ihr labiles [4Fe-4S]-Cluster zu sensieren, wichtige Proteine für die Anpassung an derartige Bedingungen innerhalb von Wirtspflanzen darstellen. Aconitasen sind bifunktionelle Proteine, welche als Holoenzyme die reversible Umsetzung von Citrat zu Isocitrat im TCA-Zyklus katalysieren. In der Anwesenheit von ROS, hohen Konzentrationen an O₂ oder Eisenlimitierung, disassembliert jedoch das [4Fe-4S]-Cluster, wodurch die Aconitasen als Apo-Proteine zu einer posttranskriptionellen Genregulation bei vielen zellulären Prozessen durch Bindung an spezifische mRNA-Strukturen befähigt sind. Xcv besitzt drei Aconitasen (AcnA, AcnB und AcnA2), wobei die Gene *acnA* und *acnB* benachbart im Genom lokalisiert sind. Das Gen *acnA2* befindet sich jedoch an einer anderen Stelle im Genom. Das *acnB* Gen wird mit den stromaufwärts befindlichen kleinen Genen *roaX* und *roaY* kotranskribiert, welche für ein neues Toxin-Antitoxin-(TA) System kodieren. Eine Deletion von *roaX-roaY* führt zu einer erhöhten Synthese des AcnB-Proteins, was ein verbessertes Wachstum mit Citrat als C-Quelle zur Folge hat. Im Gegensatz dazu zeigt eine *acnB* Mutante ein reduziertes Wachstum, sowohl *in vitro* mit Citrat als C-Quelle, als auch *in planta*. Diese Daten zeigen, dass AcnB die Hauptaconitase von Xcv während des Wachstums im Apoplast der Wirtspflanzen darstellt und die Synthese von einem TA-System kontrolliert wird.

Während eine *acnA* Mutante keinen klaren Phänotyp aufweist, hat eine Deletion von *acnA2* ein reduziertes Wachstum von Xcv *in planta*, allerdings ein verbessertes Wachstum *in vitro* mit Citrat als C-Quelle zur Folge. Weiterhin führt eine Deletion von *acnA2* zu einer erhöhten Expression von *acnA*, *acnB*, *roaY*, XCV1157 (kodiert eine Citratsynthase), *zwf2* (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase), *suH* (Saccharosehydrolase) und des *ohr* Gens (kodiert ein Resistenzprotein gegen organische Hydroperoxide), aber zu einer reduzierten Expression von *fur* (Eisenaufnahmeregulator) und *baf* (Bakterioferritin-assoziiertes Ferredoxin). Daher scheint AcnA2, im Gegensatz zu AcnB, in die Regulation von Genen des Citrat- und Kohlenhydratstoffwechsels, sowie auch der Eisenhomöostase involviert zu sein. Da eine *acnA2* Mutante sich durch erhöhte Sensitivität gegenüber ROS auszeichnet, scheint eine bedeutende Funktion von AcnA2 im Schutz gegenüber oxidativem Stress zu bestehen. Ein weiteres wichtiges Fe-S-Protein von Xcv ist das FNR-ähnliche Protein (FLP). FLP ist der Hauptaktivator der Expression des *cydABX* Operons, welches eine hochaffine Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase kodiert. Neben FLP ist auch AcnA2 in die Anpassung von Xcv an schwankende O₂-Konzentrationen involviert, da AcnA2 ebenfalls eine aktivierende Funktion auf die

cydABX Expression besitzt. Diese Daten veranschaulichen die Bedeutung dieser Fe-S-Proteine für eine erfolgreiche Kolonisierung des pflanzlichen Apoplasten durch *Xcv*.

Summary

The obligate aerobic living bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) is the causal agent of the bacterial spot disease on pepper and tomato plants. *Xcv* grows in the intercellular space between plant cells and a type III secretion system is essential for pathogenicity. Effective colonization of the apoplast by *Xcv* relies upon the bacterium being able to adapt to changing substrate availability, as well as being able to sense and cope with changes in iron- and oxygen-levels along with reactive oxygen species (ROS). Aconitases might be important proteins in adaptation to such an environment because of their ability to sense changes in ROS, O₂ and iron due of a labile [4Fe-4S] cluster. Aconitase are bifunctional proteins that usually catalyze the reversible conversion from citrate to isocitrate as a Holoenzyme in the TCA-cycle. However, in the presence of ROS, high O₂ or low iron their labile [4Fe-4S] cluster disassembles and they assume the role of a posttranscriptional regulator of gene expression in many cellular processes by binding to specific mRNA. *Xcv* possesses 3 aconitases (AcnA, AcnB and AcnA2), whereby the genes *acnA* and *acnB* are located adjacent to each other on the genome. The *acnA2* gene is located elsewhere in the genome. The *acnB* gene is cotranscribed with two small genes *roaX* and *roaY*, which lie upstream and encode a novel toxin-antitoxin (TA) system. A deletion of *roaX-roaY* causes increased synthesis of the AcnB protein leading to enhanced growth with citrate as a carbon source. In contrast, an *acnB* mutant exhibits a reduced growth phenotype *in planta* and *in vitro* with citrate as a carbon source. Together, these data suggest that the TA system controls synthesis of AcnB, which is the main aconitase during growth in the plant apoplast.

While the role of the AcnA protein is still unclear, an *acnA2* mutation causes reduced growth of *Xcv* *in planta*. Moreover, the *acnA2* mutation induces expression of *acnA*, *acnB*, *roaY*, XV1157 (encodes a citrate synthase), *zwf2* (glucose-6-phosphate-dehydrogenase), *suH* (succharose hydrolase) and *ohr* (encodes an organic hydroperoxide resistance protein) but reduces expression of *fur* (regulator of iron uptake) and *baf* (bacterioferritin-associated ferredoxin). Therefore, in contrast to AcnB, AcnA2 appears to be involved in regulation of genes of the citrate and carbohydrate metabolism and also iron homeostasis. Moreover, *acnA2* mutants are more susceptible to ROS suggesting that AcnA2 has an important function in protection against oxidative stress. A further important iron-sulphur protein encoded in the genome of *Xcv* is the FNR-like protein (FLP). FLP is the main activator of the *cydABX* operon expression, which encodes a high-affinity cytochrome *d* ubiquinol oxidase. In addition to FLP, AcnA2 is also involved in adaptation to varying oxygen concentrations because it is also required to activate *cydABX* operon expression. Together, these findings demonstrate the importance of these iron-sulphur proteins in the effective colonization of the plant apoplast by *Xcv*.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Acn	Aconitase
AcnA	Aconitase Typ A
AcnA2	Aconitase Typ A
AcnB	Aconitase Typ B
ad	addiere; auffüllen auf
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
AR	Aktivierungsregion
AS	Aminosäure
<i>A. vinelandii</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>
bp	Basenpaare
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
cAcn	cytoplasmatische Aconitase
cDNA	<i>copy (complementary) DNA</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
CS	Citratsynthase
Ct	<i>threshold cycle</i>
Cyc	Cycloheximid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
dpi	<i>days post inoculation</i>
ϵ	molekularer Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ECW	<i>early california wonder</i> , Kultivar von <i>Capsicum anuum</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
EPS	extrazelluläre Polysaccharide
Fe-S	Eisen-Schwefel
FLP	<i>FNR-like protein</i> , FNR-ähnliches Protein

FNR	Fumarat-Nitrat-Reduktase Regulator
g	Gramm
G	Guanin
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
H ₂ O	Wasser
HR	<i>hypersensitive response</i> , Hypersensitive Reaktion
<i>hrp</i>	<i>hypersensitive response and pathogenicity</i>
HTH	<i>helix turn helix</i>
IRE	<i>iron response element</i>
IRP	<i>iron response protein</i>
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K _M	Michaeliskonstante
LB	<i>lysogeny broth</i>
m	<i>Milli</i>
M	Molar
MA	MinimalA
mAcn	mitochondriale Aconitase
Mb	Megabasen
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Nano
NO	Stickstoffmonoxid
NYG	<i>Nutrient/Yeast/Glycerol</i>
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
O ₂	molekularer Sauerstoff
<i>ori</i>	<i>origin of replikation</i>
p	Pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
pmf	<i>proton motive force</i> ; Protonenmotorische Kraft
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
pv.	Pathovar

Rif	Rifampicin
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
<i>roa</i>	<i>regulator of aconitase</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription</i> PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sc	Spectinomycin
Suc	Sucrose, Saccharose
T	Thymin
TA	Toxin-Antitoxin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Tricarbonsäure Zyklus
T3	Typ III
T3SS	Typ III Sekretionssystem
Tet	Tetracyclin
T _m	Schmelztemperatur
U	<i>Unit</i>
u. a.	unter anderem
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
verd.	verdünnt
Vol.	Volumen
<i>Xac</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
<i>Xoo</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
<i>Xcc</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
<i>Xag</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>gardneri</i>
α	<i>Alpha</i>
β	<i>Beta</i>
γ	<i>Gamma</i>
Δ	<i>Delta</i> ; Deletion
λ	<i>Lambda</i>

Aminosäuren (Ein- und Drei-Buchstaben Code)

A (Ala) Alanin	I (Ile) Isoleucin	R (Arg) Arginin
C (Cys) Cystein	K (Lys) Lysin	S (Ser) Serin
D (Asp) Aspartat	L (Leu) Leucin	T (Thr) Threonin
E (Glu) Glutamat	M (Met) Methionin	V (Val) Valin
F (Phe) Phenylalanin	N (Asn) Asparagin	W (Trp) Tryptophan
G (Gly) Glycin	P (Pro) Prolin	Y (Tyr) Tyrosin
H (His) Histidin	Q (Gln) Glutamin	

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	III
SUMMARY.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
INHALTSVERZEICHNIS	X
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XIV
TABELLENVERZEICHNIS	XVII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das phytopathogene Bakterium <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (Xcv).....	2
1.2 Der Apoplast als Lebensraum von Xcv: Substrate, Kohlenstoffquellen und die Sensierung von Stressbedingungen	6
1.3 Xcv verfügt über drei Aconitase Proteine	12
1.4 Bifunktionalität und weitere Eigenschaften von Aconitase Proteinen	14
1.5 Eigenschaften der Aconitase-Proteine von Xcv	18
1.6 Ein FNR-ähnliches Protein (FLP) aktiviert die Expression des Gens der Cytochrom-d-Ubiquinol-Oxidase in Xcv	19
1.7 Die CRP/ FNR-Superfamilie von Transkriptionsregulatoren	20
1.8 Eigenschaften und Funktionen des FNR Proteins aus <i>E. coli</i>	20
1.9 Strukturelle Domänen des FLP-Proteins aus Xcv	22
1.10 Mitglieder der CRP/FNR-Superfamilie in <i>Xanthomonas</i> spp.	25
1.11 Zielstellung	26
2 MATERIAL UND METHODEN	27
2.1 Nährmedien und Medienzusätze	27
2.2 Organismen und Vektoren.....	30
2.3 Pflanzenmaterial	31
2.4 Zellanzucht und Ernte.....	32
2.5 Messung des Bakterienwachstums <i>in vitro</i>	33
2.6 Analyse des Wachstums von Xcv-Stämmen.....	33
2.6.1 Wachstumsanalyse <i>in vitro</i>	33
2.6.1.1 Wachstum unter Anwesenheit von Menadion (<i>plate sensitivity assay</i>)	33

2.6.2	Wachstumsanalyse <i>in planta</i>	34
2.7	Infiltration von Paprikapflanzen mit <i>Xcv</i>-Stämmen.....	35
2.8	Untersuchung der Freisetzung von ROS <i>in planta</i>.....	35
2.9	Dauerhafte Lagerung von Bakterienstämmen	36
2.10	Molekularbiologische Methoden	36
2.10.1	Isolierung von Nukleinsäuren	36
2.10.1.1	Isolierung von Gesamt-DNA	36
2.10.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA	36
2.10.1.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> Stämmen.....	36
2.10.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	37
2.10.3	PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten	37
2.10.3.1	Standard-PCR	37
2.10.3.2	Kolonie-PCR.....	39
2.10.3.3	Reinigung von PCR-Produkten.....	39
2.10.4	cDNA Synthese	39
2.10.5	RT-PCR.....	40
2.10.6	qRT-PCR (<i>quantitative Real Time-PCR</i>)	40
2.10.7	Transkriptomvergleiche mit Microarray	42
2.10.8	Agarose-Gelelektrophorese	42
2.10.8.1	Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente	43
2.10.8.2	Färbung und Dokumentation von Agarosegelen.....	43
2.10.8.3	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	43
2.10.9	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	44
2.10.9.1	DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	44
2.10.9.2	Ligation von DNA-Fragmenten.....	44
2.10.10	Herstellung kompetenter Zellen	44
2.10.10.1	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen	44
2.10.10.2	Herstellung chemokompenter <i>E. coli</i> Zellen (Sambrook <i>et al.</i> , 2001).....	45
2.10.10.3	Herstellung elektrokompenter <i>Xcv</i> Zellen	45
2.10.11	Transformation von DNA in kompetente Bakterienstämme	46
2.10.11.1	Transfer mittels Elektroporation in <i>E. coli</i> Zellen (Dower <i>et al.</i> , 1988).....	46
2.10.11.2	Transfer mittels Chemotransformation in <i>E. coli</i> Zellen	46
2.10.11.3	Transfer mittels Elektroporation in <i>Xcv</i> Zellen.....	46
2.10.11.4	Transfer mittels triparentaler Konjugation in <i>Xcv</i> Zellen	47
2.10.12	DNA-Sequenzierung	47
2.10.13	Generierung von <i>Xcv</i> -Deletionsmutanten.....	47
2.10.13.1	Herstellung von Deletionskonstrukten	47
2.10.13.2	Deletionsmutagenese in <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> durch triparentale Konjugation.....	49
2.10.13.3	Herstellung von <i>acn</i> -Doppelmutanten.....	51

2.10.14	Konstruktion von Plasmiden zur Komplementation von Deletionen in <i>Xcv</i>	51
2.11	Proteinbiochemische Methoden	52
2.11.1	Zellanzucht, Zellaufschluss und Gewinnung des Rohextraktes	52
2.11.2	Bestimmung der Proteinkonzentration (Lowry <i>et al.</i> , 1951)	52
2.11.3	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
2.11.4	Western-Blot-Analyse	54
2.11.5	Proteindetektion mittels ECL-Reaktion (<i>Enhanced Chemiluminescence</i>)	55
2.12	Geräte	56
3	ERGEBNISSE	57
3.1	Die Anordnung der Gene <i>roaX-roaY</i> und <i>acnB</i> ist bei Vertretern der Familie <i>Xanthomonadaceae</i> konserviert	57
3.2	Die Gene <i>roaX</i> , <i>roaY</i> und <i>acnB</i> werden kotranskribiert	58
3.3	AcnB wird sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Wachstumsphase synthetisiert	59
3.4	Einfluss von AcnB auf das Wachstum von <i>Xcv</i> in <i>planta</i>	60
3.5	Eine Deletion von <i>acnB</i> in <i>Xcv</i> führt zu verringerter HR in resistenten und verringerter Bildung von Krankheitssymptomen in suszeptiblen Pflanzen	62
3.6	Infiltration von <i>Xcv</i> 85-10 führt zur Freisetzung von ROS in <i>planta</i>	64
3.7	Die Ausbildung eines AcnB-Enzyms ist nicht erforderlich für das Wachstum von <i>Xcv</i> in <i>vitro</i> in MA-Medium	65
3.8	Eine Deletion von <i>acnB</i> führt zu verzögertem Wachstum in Minimalmedium mit Citrat als C-Quelle	66
3.9	Die Folgen einer Deletion von <i>acnB</i> auf die Genexpression in <i>Xcv</i> 85-10	67
3.10	Eine Deletion von <i>roaX</i> und <i>roaY</i> erhöht die Synthese von AcnB	68
3.11	Ein erhöhtes Level von RoaY führt zu einem besseren Wachstum in <i>vitro</i> mit Citrat als C-Quelle im Vergleich zum Wildtyp	69
3.12	Einfluss einer Deletion von <i>roaX-roaY</i> auf die Genexpression in <i>Xcv</i> 85-10	70
3.13	Eine Deletion von <i>acnA</i> hat keinen Einfluss auf das Wachstum in <i>vitro</i> von <i>Xcv</i> mit Citrat als C-Quelle	71
3.14	Eine Deletion von <i>acnA</i> in <i>Xcv</i> hat keinen Einfluss auf das Wachstum in <i>planta</i>	72
3.15	Die Deletionsmutante 85-10 Δ <i>acnA</i> zeigt eine dem WT entsprechende HR und wässrigen Läsionen im Infektionsbereich	74
3.16	<i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>acnA2</i> zeigt ebenfalls reduziertes Wachstum in <i>planta</i>	75
3.17	Eine Deletion von <i>acnA2</i> in <i>Xcv</i> hat eine geringere Bildung von HR und wässrigen Läsionen bei Paprikablättern zur Folge	76
3.18	Auswirkungen einer Deletion von <i>acnA2</i> auf die Genexpression in <i>Xcv</i> 85-10	77
3.19	AcnA2 hat einen negativen Einfluss auf die Expression von <i>acnA</i> , <i>acnB</i> , <i>roaY</i> und XCV1157	79
3.20	Die Deletion von <i>acnA2</i> führt zur erhöhten Synthese des AcnB Proteins in <i>Xcv</i>	81
3.21	Die Deletion von <i>acnA2</i> führt zu einer erhöhten Synthese des AcnA Proteins in <i>Xcv</i>	82

3.22	Eine Deletion von <i>acnA2</i> in <i>Xcv</i> führt zu einem verbessertem Wachstum mit Citrat als C-Quelle im Vergleich zum Wildtyp	84
3.23	Eine <i>acnA2</i> Deletion führt auch zu verbessertem Wachstum mit Saccharose als C-Quelle im Vergleich zu <i>Xcv</i> 85-10.....	85
3.24	Die Doppeldeletion von <i>acnA2-acnA</i> und <i>acnA2-acnB</i> in <i>Xcv</i> zeigt ebenfalls die Wichtigkeit von <i>AcnA2</i> in der Citratverwertung und für das Wachstum <i>in planta</i>	87
3.25	Auswirkung der Deletionen von <i>acnA</i> , <i>acnA2</i> und <i>acnB</i> auf die Sensitivität von <i>Xcv</i> gegenüber Menadion	89
3.26	<i>AcnB</i> reguliert die Expression des <i>cit</i> Gens	90
3.27	Einfluss des FLP-Proteins auf die Genexpression in <i>Xcv</i> 85-10	92
3.28	FLP und <i>AcnA2</i> regulieren die Expression von <i>cydA</i>	93
4	DISKUSSION	95
4.1	Die Rolle der Aconitasen von <i>Xcv</i> in der Sensierung von Stressbedingungen und der Nutzung von C-Quellen im Apoplasten von Wirtspflanzen	95
4.1.1	Citrat und andere organische Säuren sowie Aminosäuren als apoplastische Haupt-C-Quellen für <i>Xcv</i> und <i>AcnB</i> als wichtiges metabolisches Enzym	96
4.1.2	<i>AcnA2</i> ist in die Regulation alternativer Stoffwechselwege von <i>Xcv</i> je nach Substratverfügbarkeit involviert	100
4.1.3	Das <i>AcnA</i> -Protein könnte eine Rolle bei reduzierten O ₂ -Bedingungen spielen.....	102
4.1.4	<i>AcnA2</i> dient als möglicher Regulator der Eisenhomöostase und im Schutz gegenüber oxidativem Stress	105
4.2	<i>AcnA2</i> aktiviert die Expression des Gens einer Cytochrom-<i>d</i>-Ubiquinol- Oxidase neben FLP als Hauptaktivator	110
4.3	Die Rolle des möglichen Toxin-Antitoxin-Systems RoaX-RoaY in <i>Xcv</i>	114
4.4	Hypothetisches Modell der komplexen Interaktion der Aconitasen, FLP und des TA-Systems in <i>Xcv</i>	118
5	LITERATURVERZEICHNIS	122
6	ANHANG	141
	DANKSAGUNG	153
	LEBENS LAUF	155
	ERKLÄRUNG	156

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Bakterielle Fleckenkrankheit bei Paprika und Tomate nach Infektion mit <i>Xcv</i> .	3
Abb. 2: Vermehrung von <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> im Apoplasten von Paprikablättern.	8
Abb. 3: Schematische Darstellung der Lokalisation der Aconitase Gene <i>acnA</i> , <i>acnA2</i> und <i>acnB</i> im Genom von <i>Xcv</i> .	12
Abb. 4: Transkriptions-Initiations-Stellen von <i>acnA</i> und <i>roaX-roaY</i> in <i>Xcv</i> .	14
Abb. 5: <i>Iron response elements</i> (IREs) und <i>iron response proteins</i> (IRPs).	16
Abb. 6: Schema des FNR-Zyklus in <i>E. coli</i> .	21
Abb. 7: Partielles <i>alignment</i> der Aminosäuresequenzen von FNR _{<i>E. coli</i>} und FLP _{<i>Xcv</i>} .	23
Abb. 8: Schematische Darstellung der FNR-ähnlichen Bindestelle stromaufwärts des <i>cydA</i> Gens in <i>Xcv</i> 85-10.	23
Abb. 9: λ -Pst-Marker.	43
Abb. 10: Schematische Darstellung der Herstellung von Deletionskonstrukten zur Erzeugung von <i>Xcv</i> - Deletionsmutanten.	48
Abb. 11: Schematische Darstellung der Deletion von Genen in <i>Xcv</i> durch homologe Rekombination mit Hilfe des pOK1 Vektors am Beispiel der Deletion von <i>acnB</i> .	50
Abb. 12: <i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i> (Fermentas, St. Leon-Rot).	54
Abb. 13: Schematischer Überblick des <i>acnA-roaX-roaY-acnB</i> Locus in einigen Mitgliedern der Familie der <i>Xanthomonadaceae</i> und <i>E. coli</i> .	57
Abb. 14: Nachweis der Kotranskription der Gene <i>roaX</i> , <i>roaY</i> und <i>acnB</i> , in <i>Xcv</i> 85-10.	58
Abb. 15: Analyse der Mengen des AcnB Proteins in verschiedenen Wachstumsphasen der <i>Xcv</i> - Stämme 85-10, 85-10 Δ <i>acnB</i> und 85-10 Δ <i>roaX-roaY-acnB</i> .	60
Abb. 16: Wachstumsanalyse <i>in planta</i> der <i>Xcv</i> -Deletionsmutanten 85-10 Δ <i>roaX-roaY-acnB</i> und 85-10 Δ <i>acnB</i> im Vergleich zum Wildtypstamm 85-10.	61
Abb. 17: Wachstumsanalyse der <i>Xcv</i> -Deletionsmutante 85-10 Δ <i>acnB</i> /pLAFR6 und des Komplementationsstammes 85-10 Δ <i>acnB</i> /pL6 <i>acnB</i> im Vergleich zu den <i>Xcv</i> -Stämmen 85-10 und 85-10/pLAFR6 <i>in planta</i> .	62
Abb. 18: Vergleich der Bildung von hypersensitiven Reaktionen und Krankheitssymptomen zwischen 85-10 und <i>acnB</i> Deletionsmutanten.	63
Abb. 19: Färbung eines Paprikablattes des Kultivars ECW mit 0,1%iger DAB-Lösung nach Infiltration mit <i>Xcv</i> 85-10.	64
Abb. 20: Wachstum der <i>Xcv acnB</i> Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp 85-10 in 1 x MA- Medium.	65
Abb. 21: Wachstumsanalyse der <i>Xcv acnB</i> Deletionsmutante mit Citrat als C-Quelle im Vergleich zum Wildtyp.	66
Abb. 22: Vergleich der Synthese von AcnB in den <i>Xcv</i> -Stämmen 85-10 Δ <i>roaX-roaY</i> und 85-10 mittels Western-Blot-Analyse.	68

Abb. 23: Wachstumsanalyse der <i>Xcv roaX-roaY</i> Deletionsmutante und den Komplementationsstämmen 85-10 Δ <i>roaX-roaY</i> /pL6 <i>roaX</i> und 85-10 Δ <i>roaX-roaY</i> /pL6 <i>roaY</i> in MA-Citrat-Medium.	69
Abb. 24: Analyse des <i>in vitro</i> Wachstum der <i>Xcv</i> Stämme 85-10 und 85-10 Δ <i>acnA</i> in MA-Citrat-Medium.	72
Abb. 25: Wachstumanalyse der <i>Xcv</i> -Deletionsmutante 85-10 Δ <i>acnA</i> im Vergleich zum Wildtyp 85-10 <i>in planta</i>	73
Abb. 26: Bildung einer HR und wässrigen Läsionen der <i>Xcv</i> -Deletionsmutante 85-10 Δ <i>acnA</i> bei Paprikapflanzen im Vergleich zum Wildtyp 85-10.....	74
Abb. 27: Untersuchung des Einfluss einer Deletion von <i>acnA2</i> auf Wachstum <i>in planta</i> mit den <i>Xcv</i> -Stämmen 85-10+pLAFR6, 85-10 Δ <i>acnA2</i> +pLAFR6, 85-10 Δ <i>acnA2</i> +pL6 <i>acnA2</i> , 85* Δ <i>hrcN</i> und 85-10	75
Abb. 28: Analyse der <i>Xcv acnA2</i> Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp 85-10 hinsichtlich der Ausbildung einer HR bei resistenten und Krankheitsymptomen bei suszeptiblen Paprikapflanzen.	76
Abb. 29: Quantitativer Vergleich der Expression von <i>acnB</i> , <i>acnA</i> , <i>roaY</i> und XCV1157 in der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase der <i>Xcv</i> -Stämme 85-10 Δ <i>acnA</i> , 85-10 Δ <i>acnA2</i> , 85-10 Δ <i>acnB</i> und dem Wildtyp 85-10 mittels qRT-PCR.....	80
Abb. 30: Autoradiogramm nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Rohextrakte der <i>Xcv</i> -Stämme 85-10, 85-10 Δ <i>acnA</i> , 85-10 Δ <i>acnA2</i> , 85-10 Δ <i>acnA2-acnA</i> und 85-10 Δ <i>acn2-acnB</i> zum Nachweis des AcnB Proteins.	82
Abb. 31: Autoradiogramm nach Western-Blot-Analyse zum Nachweis von AcnA _{<i>Xcv</i>} mit Antikörpern gegen AcnA _{<i>E.coli</i>} in Rohextrakten der <i>Xcv</i> -Stämme 85-10, 85-10 Δ <i>acnB</i> , 85-10 Δ <i>acnA</i> , 85-10 Δ <i>acnA2</i> , 85-10 Δ <i>acnA2-acnA</i> und 85-10 Δ <i>acnA2-acnB</i>	83
Abb. 32: Wachstumsanalyse der <i>Xcv acnA2</i> Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp mit Citrat als C-Quelle.....	85
Abb. 33: Analyse des Wachstums der <i>Xcv</i> -Stämme 85-10, 85-10 Δ <i>acnA2</i> und 85-10 Δ <i>acnB</i> mit Saccharose als C-Quelle.	86
Abb. 34: Wachstumsanalyse der Mutanten 85-10 Δ <i>acnA2-acnA</i> und 85-10 Δ <i>acnA2-acnA</i> im Vergleich zum Wildtyp 85-10 mit Citrat als C-Quelle.....	87
Abb. 35: Wachstumsanalyse der <i>Xcv</i> Deletionsstämmen 85-10 Δ <i>acnA2-acnA</i> und 85-10 Δ <i>acnA2-acnB</i> im Vergleich zum Wildtyp 85-10 in Paprikablättern.	88
Abb. 36: Analyse der Sensitivität der <i>Xcv</i> -Stämme 85-10, 85-10 Δ <i>acnB</i> , 85-10 Δ <i>acnA</i> , 85-10 Δ <i>acnA2</i> , 85-10 Δ <i>acnA2-acnA</i> und 85-10 Δ <i>acnA2-acnB</i> gegenüber Menadion.....	90
Abb. 37: Quantitativer Vergleich der Expression von <i>cit</i> in der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase der <i>Xcv</i> -Stämme 85-10 und 85-10 Δ <i>acnB</i> mittels qRT-PCR.	91
Abb. 38: Quantitativer Vergleich der Expression von <i>cydA</i> in der exponentiellen sowie der stationären Wachstumsphase der <i>Xcv</i> -Stämme 85-10 Δ <i>acnA2</i> , 85-10 Δ <i>acnB</i> und 85-10 Δ <i>acnA</i> und Wildtyp 85-10.	94

Abb. 39: Schematisches Modell zur Funktion von AcnB, AcnA2, AcnA, FLP und eines TA-Systems unter O ₂ -, Eisen- und ROS- Einfluss in <i>Xcv</i> während des Wachstums im Apoplasten von Paprikablättern.	119
Abb. 40: Autoradiogramm zum Nachweis von C-myc-getagten AcnA und AcnA2 aus <i>Xcv</i> mit den Rohextrakten der <i>E. coli</i> -Stämme Rosetta+pBRM/AcnA2 _{<i>Xcv</i>} und XL1+pBRM/AcnA _{<i>Xcv</i>}	148
Abb. 41: Analyse des <i>in vitro</i> Wachstum in 1 x MA-Medium der <i>Xcv</i> -Stämme 85-10Δ <i>acnA</i> und 85-10Δ <i>acnA2</i> im Vergleich zu 85-10 und 85-10Δ <i>acnB</i>	149
Abb. 42: Vergleich der vollständigen AS-Sequenz der AcnB Proteine aus <i>Xcv</i> , <i>Xoo</i> , <i>Xcc</i> und <i>E. coli</i>	152

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Zusätze für NYG - und MA-Medien.....	29
Tab. 2: Übersicht der verwendeten Zusätze für LB-Medium.....	29
Tab. 3: Verwendete Bakterienstämme	30
Tab. 4: Verwendete Plasmide und Vektoren.....	31
Tab. 5: Angabe der Deletionsanfänge <i>upstream</i> des Translations-Initiationscodons und Deletionsenden <i>downstream</i> des Terminationscodons des jeweiligen Gens bzw. Genbereiche der <i>Xcv</i> - Deletionsmutanten	51
Tab. 6: Zur triparentalen Konjugation verwendete Donor-und Rezipientenstämmen zur Erzeugung von <i>Xcv</i> - Doppelmutanten.....	51
Tab. 7.: Komponenten eines SDS-Gels und verwendete Puffer.....	53
Tab. 8: Einige Gene mit veränderter Expression in <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>acnB</i> im Vergleich zum Wildtyp 85-10. ...	67
Tab. 9: Einige differentiell exprimierte Gene einer <i>roaX-roaY</i> Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp <i>Xcv</i> 85-10	71
Tab. 10: Einige Gene mit differentieller Expression in <i>Xc</i> v85-10 Δ <i>acnA2</i> im Vergleich zum Wildtyp 85-10	78
Tab. 11: Einige Gene mit veränderter Expression in <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>flp</i> im Vergleich zum Wildtyp <i>Xcv</i> 85-10	92
Tab. 12: Verwendete Oligonuklotide	141
Tab. 13: Differentiell exprimierte Gene in <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>acnB</i> im Vergleich zum WT 85-10	142
Tab. 14: Differentiell exprimierte Gene in <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>flp</i> im Vergleich zu <i>Xcv</i> 85-10	143
Tab. 15: Differentiell exprimierte Gene in <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>roaX-roaY</i> im Vergleich zu <i>Xcv</i> 85-10	143
Tab. 16: Differentiell exprimierte Gene in <i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>acnA2</i> im Vergleich zu <i>Xcv</i> 85-10	145

1 Einleitung

Bakterien stellen aufgrund ihrer Anpassungsfähigkeit an die verschiedensten Habitate und Umweltbedingungen die vielseitigste Domäne des Lebens dar. Aufgrund dieser Anpassung kam es zur Entwicklung der unterschiedlichsten Lebensweisen, wobei Bakterien neben einer Rolle als Destruenten oder in Symbiosen mit anderen Organismen, auch als Pathogene existieren, welche sich durch die Schädigung des Wirts auszeichnen. Durch die unterschiedlichen Umgebungen bzw. Bedingungen innerhalb der Wirte, sowie durch Koevolution mit ihren spezifischen Wirten haben pathogene Bakterien mannigfaltige Infektionsstrategien entwickelt. Neben Tieren und Menschen stellen auch Pflanzen ein wichtiges Reich an bakteriellen Wirten dar. Aufgrund der vielfältigen Funktionen von Pflanzen als Nahrung, Werkstoffe, Genuss- und Heilmittel, sowie auch als Sauerstoff- und Energielieferanten nimmt die Prävention von Erkrankungen eine zentrale Rolle ein. Neben Vertretern von grampositiven Gattungen wie *Clavibacter*, sind vor allem zahlreiche gramnegative Gattungen, wie *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* und *Xanthomonas* ökonomisch bedeutende Pflanzenpathogene. Gerade in Anbetracht der wachsenden Weltbevölkerung und dem einhergehenden Rückgang landwirtschaftlich nutzbarer Anbauflächen stellt die Identifizierung von molekularen Mechanismen, während einer Interaktion von Pathogenen und nahrungsliefernden Nutz- und Kulturpflanzen, einen wichtigen Aspekt dar. Eine effektive Besiedlung von Wirtspflanzen gelingt jedoch nur spezialisierten Pathogenen, da viele Pflanzen über eine dauerhafte Resistenz verfügen. Die Aufklärung der Strategien derartiger Pathogene und die damit verbundene Erlangung von Kenntnissen über entsprechende Prozesse, sowie die Etablierung effizienter Bekämpfungsmethoden, sind Schwerpunkte vieler Forschungsarbeiten.

Im Fokus dieser Arbeit steht das Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, welches den Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit von Paprika- und Tomatenpflanzen darstellt (Jones *et al.*, 1998). Nach Ausbildung der Krankheit kommt es, durch Blattverlust, chlorotischen nekrotischen Läsionen an Blättern, Stängel, Früchten und Blüten, zwangsläufig zu enormen Einbußen der pflanzlichen Ausbeute (Tamir-Ariel *et al.*, 2007). Im Bereich der Erforschung von essentiellen Mechanismen während derartiger Pathogen-Wirt-Interaktionen sind noch viele Fragen offen, für dessen Klärung *X. campestris* pv. *vesicatoria* als Modellorganismus genutzt wird.

1.1 Das phytopathogene Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv)

Bei dem Mikroorganismus *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) handelt es sich um ein gramnegatives, stäbchenförmiges und polar begeißeltes Gammaproteobakterium, welches der Familie der *Xanthomonadaceae* angehört. Die Vertreter der Gattung *Xanthomonas* zeichnen sich durch eine charakteristische Gelbfärbung, aufgrund membrangebundener Xanthomonadine aus, welche bromhaltige Polyenverbindungen darstellen. Ebenso sind *Xanthomonas* spp. charakterisiert durch die Bildung des extrazellulären Polysaccharides Xanthan, welches aufgrund der hohen Hydratisierung und der anionischen Konsistenz als Biofilm zum Schutz der Zelle fungiert und auch als Verdickungsmittel in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie Anwendung findet (Becker *et al.*, 1998). Die Vertreter der Gattung *Xanthomonas*, bei der es sich um eine der größten Gruppe phytopathogener Bakterien handelt, verursachen zusammen mit Mitgliedern der Gattung *Xylella*, welche ebenfalls der Familie *Xanthomonadaceae* angehören, eine breite Vielfalt an schwerwiegenden Krankheiten bei über 400 agrarwirtschaftlich bedeutenden Pflanzen (Büttner and Bonas, 2009; Naushad and Gupta, 2013). Einige der ökonomisch wichtigsten Pflanzen, welche von Spezies dieser Gattungen befallen werden sind Tomate, Kohl, Paprika, Banane, Zitrone, Weintraube, Reis, Pfirsich, Pflaume, Mandel, Kaffee und Ahorn (Purcell and Hopkins, 1996; Bhattacharyya *et al.*, 2002; Van Sluys *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005; Chatterjee *et al.*, 2008; Salzberg *et al.*, 2008; Ryan *et al.*, 2011). Die Tomate ist hierbei u.a. eine der am weit verbreitetsten und am häufigsten konsumierten Gemüsesorte der Welt und dessen Nachhaltigkeit von ökonomischer Bedeutung, da auch bioaktive Komponenten, wie phenolische Stoffe enthalten sind (Barros *et al.*, 2012). Auch die Paprika ist in der Küche nahezu jedes Landes allgegenwärtig und sogar in der Pharmazie aufgrund des Alkaloids Capsaicin und dessen u.a. durchblutungsfördernden Wirkung nicht mehr wegzudenken (Bortolotti, 2013).

Das sequenzierte Genom von Xcv weist einen GC-Gehalt von 64,75 mol-% auf und beinhaltet ein 5,17 Mb großes Genom, vier Plasmide (p2; p19, p38, p182) und bringt 4726 hypothetische Proteine hervor (Thieme *et al.*, 2005). Xcv ist ein obligat aerob lebendes Bakterium, welches jedoch auch bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen zu Wachstum fähig ist.

Xcv breitet sich durch Schlagregen, Feldarbeiter, Feldmaschinen und Aerosole aus und überlebt auf Wirtspflanzen, Samen und Pflanzenresten, im Boden jedoch maximal einige Wochen. (Agrios, 1997; Agrios, 2005). Es überdauert vermutlich als Epiphyt auf der Oberfläche der Pflanze, bis es über natürliche Öffnungen wie Hydathoden und Spaltöffnungen oder Wunden in die Wirtspflanzen Paprika (*Capsicum anuum*) und Tomate (*Solanum lycopersicum*) eindringt. Xcv vermehrt sich dort interzellulär im Apoplasten (Büttner and Bonas, 2009). Die Abb. 1 zeigt, dass sich die manifestierte, bakterielle Fleckenkrankheit an der Ausbildung schwarz-brauner Läsionen bei Paprika- und Tomatenpflanzen erkennen lässt.

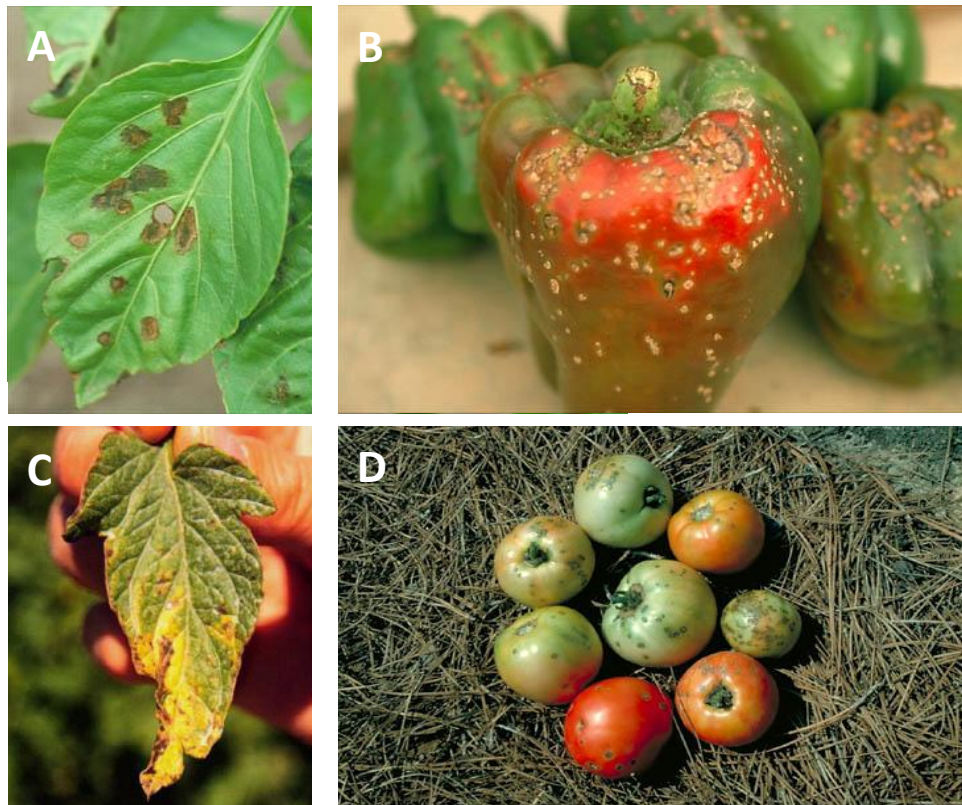


Abb. 1: Bakterielle Fleckenkrankheit bei Paprika und Tomate nach Infektion mit *Xcv*.

A: Merkmale der bakteriellen Fleckenkrankheit eines infizierten Paprikablattes; **B** Krankheitsausbildung einer *Xcv*-infizierten Paprikafrucht (**A+B:** APSnet; www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/Bacterialspt.aspx); **C:** *Xcv*-infiziertes Blatt einer Tomatenpflanze (University of Florida; <http://erec.ifas.ufl.edu/tomato-scouting-guide/images/diseases/bacterial-spot118.JPG>); **D:** Krankheitssymptome bei Tomatenfrüchten (APSnet; www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Article%20Images/BacterialSpot11.jpg).

Die bakterielle Fleckenkrankheit ist ubiquitär verbreitet, jedoch sind Temperaturen von 24-30 °C, sowie eine relativ hohe Luftfeuchtigkeit optimale Bedingungen zum Ausbruch der Krankheit (Tamir-Ariel *et al.*, 2007). Eine erfolgreiche Infektion der Wirtspflanze ist oft abhängig von Proteinsekretionssystemen, durch die Proteine in das extrazelluläre Milieu transportiert oder Proteine und/ oder DNA direkt in die Pflanzenzelle transloziert werden. Derartige, translozierte Proteine werden als Effektorproteine bezeichnet (Büttner and Bonas, 2009). Um eine effiziente Kolonisierung des Wirts und die Ausbildung der Krankheit zu gewährleisten, werden von vielen Pathogenen oft eine Kombination aus verschiedenen Proteinsekretionssystemen verwendet (Preston *et al.*, 2005).

Xanthomonas spp. verfügen über sechs Proteinsekretionssysteme (T1SS, T2SS, T3SS, T4SS, T5SS, T6SS), welche sich maßgeblich in ihrer Zusammensetzung, Funktion und Sekretion von Substraten unterscheiden (Gerlach and Hensel, 2007). Unter den Sekretionssystemen ist jedoch nur das T3SS, T4SS und T6SS mit einem extrazellulären Pilus ausgestattet, der das Bakterium zur extrazellulären Sekretion oder zur Translokation von Effektorproteinen in die Wirtszelle befähigt (Büttner and Bonas, 2009). Eine Translokation konnte jedoch experimentell bislang nur für das T3SS überprüft werden. Das T3SS ist essentiell für die Pathogenität von *Xcv* und stellt den Hauptpathogenitätsfaktor unter

gramnegativen, pflanzen- und tierpathogenen Mikroorganismen dar. In phytopathogenen Bakterien wie *Xcv* wird das T3SS vom chromosomalen *hrp* (*hypersensitive reaction and pathogenicity*) Gencluster kodiert (Bonas, 1991). Das *hrp* Gencluster setzt sich aus mehr als 20 Genen zusammen, welche in mehreren Transkriptionseinheiten organisiert sind (Büttner and Bonas, 2002). Deletionsmutanten der *hrp* Gene sind zum einen unfähig in eine konventionelle Interaktion mit der Wirtspflanze zutreten und zum anderen auch nicht in der Lage sich im pflanzlichen Gewebe zu verbreiten. Die Expression der *hrp* Gene findet hierbei nur in der Pflanze oder in einem synthetischen Minimalmedium (XVM2) statt (Schulte and Bonas, 1992; Wengelnik and Bonas, 1996). Zwei Gene, *hrpG* und *hrpX*, welche außerhalb der *hrp*-Gen-Cluster lokalisiert sind, kodieren regulatorische Proteine dieser *hrp* Gene und sind Bestandteil einer noch nicht aufgeklärten Reaktionskaskade. HrpG ist ein Responseregulator, welcher die Expression eines genomumfassenden Regulons, in den meisten Fällen über den Transkriptionsaktivator HrpX kontrolliert (Wengelnik and Bonas, 1996; Wengelnik *et al.*, 1996b; Noël *et al.*, 2001). Darunter befinden sich neben Genen von Effektorproteinen auch Gene von extrazellulären Abbauenzymen. Da eine erfolgreiche Ausbildung der Krankheit durch *Xcv* abhängig von der Translokation von sogenannten T3-Effektoren ist, zeigen sich jene Bakterien apathogen, denen durch Mutation ein funktionelles T3SS fehlt (Alfano and Collmer, 2004).

Aufgrund von experimentellen und bioinformatischen Analysen konnten in *Xcv* 30 verschiedenen T3-Effektoren identifiziert werden (Büttner and Bonas, 2009 ; <http://www.xanthomonas.org>). Die ersten T3-Effektoren wurden aufgrund der Auslösung einer Abwehrreaktion bei Pflanzen identifiziert, welche über korrespondierende *R* Gene verfügten (White *et al.*, 2000). Solche *R*-Proteine resistenter Pflanzen aktivieren eine Abwehrreaktion, welche als hypersensitive Reaktion (HR) bezeichnet wird. Dies ist die Folge einer Bindung der *R*-Proteine an spezifische, bakterielle Effektorproteine. Aufgrunddessen werden diese Effektorproteine als Avr (*avirulence*) Proteine bezeichnet (Jones and Dangl, 2006). Bei der HR handelt es sich um eine lokale Nekrose, wobei dem Bakterium die Nährstoffe, zur Einschränkung dessen Vermehrung, entzogen werden (Klement, 1982). Allerdings fungieren diese T3-Effektoren in suszeptiblen Pflanzen als Virulenzfaktoren, wodurch es zur Schwächung der basalen Abwehr der Wirtspflanze und zur Freisetzung von Nährstoffen und Wasser in den Apoplasten kommt (Stall, 1995; Bonas *et al.*, 2000; Mudgett, 2005). Dies führt zur Ausbildung von makroskopischen Krankheitssymptomen, die als *water soaked lesions* (wässrige Läsionen) bezeichnet werden und sich später durch nekrotisches Gewebe auszeichnen.

Einige der T3-Effektorproteine benötigen zur effizienten Translokation das T3SS-Chaperon HpaB, das sich durch eine hohe Substratspezifität auszeichnet (Büttner *et al.*, 2004; Büttner *et al.*, 2006). Die größte Gruppe von T3-Effektoren ist die AvrBs3/PthA Familie der *transcription-activator-like* (TAL)-Effektoren, welche eukaryotische Transkriptionsaktivatoren imitieren und die Transkription von Pflanzengenen induzieren, um das Wachstum und die Verbreitung zu fördern (Marois *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2006; Kay *et al.*, 2007; Boch *et al.*, 2009).

Neben dem T3SS besitzt *Xcv* zwei Typen eines T2SS, die als Xcs und Xps bezeichnet werden (Thieme *et al.*, 2005). Hierbei stellt das Xps-T2S-System ebenso einen wichtigen Virulenzfaktor dar (Szczesny *et al.*, 2010). Es unterstützt zum einen die Ausbildung von Krankheitssymptomen und die effiziente Translokation von Effektorproteinen durch das T3SS und zum anderen sekretiert es Proteasen und eine virulenzassoziierte Xylanase.

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden viele Studien durchgeführt und einige molekulare Mechanismen identifiziert, die einer Pathogen-Wirt-Interaktion unterliegen. Neben der Wichtigkeit der Ausbildung eines Sekretionssystems, wie dem T3SS und der Translokation von Effektorproteinen, wachsen jedoch auch die Erkenntnisse über die Wichtigkeit der Etablierung des Pathogens in den Wirtspflanzen und die Fähigkeit eine Krankheit hervorzurufen (Tamir-Ariel *et al.*, 2007). Bei der Infektion mit *Xcv* handelt es sich um einen sehr komplexen Infektionsprozess, welcher die Koordination vieler bakterieller Gene benötigt, deren Identitäten und Funktionsweisen zum größten Teil noch unbekannt sind.

Studien mit besonderen IVET-Systemen (*in vivo* Expressionstechnologie; (Mahan *et al.*, 1993)) identifizierten Promotoren, welche eine spezifisch induzierte oder verbesserte Aktivität unter artifiziellen Wirtsbedingungen aufwiesen (Tamir-Ariel *et al.*, 2007). Sogenannte RIVET Studien (*recombinase-based* -IVET) beruhen auf der Induktion eines promotorlosen Rekombinasegens, wodurch irreversibel aktivierte Promotoren erfasst werden konnten (Camilli and Mekalanos, 1995; Tamir-Ariel *et al.*, 2007). Mit dieser sensitiven Methode gelang es schwach oder transient induzierte Gene, während einer Infektion der Wirtspflanze Tomate zu identifizieren. Es wurde belegt, dass der Krankheitsprozess nicht von Einzelgenen beherrscht wird, sondern eine Genmaschinerie an der Pathogen-Pflanzen-Interaktion beteiligt ist. Dabei handelt es sich um eine große Anzahl von Genen, welche nicht *per se* mit der Virulenz des Organismus assoziiert sind. Diese Genmaschinerie ist wichtig für die verschiedenen Phasen des Infektionsprozesses, wie dem ersten Überleben und der Anpassung an die feindliche Umgebung des Wirts, die Ausbreitung und Überwindung der pflanzlichen Abwehr, sowie letztendlich die Schädigung der Wirtspflanze, um Zugang zu den Nährstoffreservoirs zu erlangen.

Es haben sich zahlreiche regulatorische Systeme in *Xcv* entwickelt, um die Genexpression der Virulenzfaktoren an verschiedene extrazelluläre Stimuli, wie Populationsdichte, Verfügbarkeit von Nährstoffen und auch Sauerstoffkonzentrationen anzupassen (Büttner and Bonas, 2009).

1.2 Der Apoplast als Lebensraum von *Xcv*: Substrate, Kohlenstoffquellen und die Sensierung von Stressbedingungen

Xcv vermehrt sich im Apoplasten der Wirtspflanzen, wobei es sich um ein zentrales und sehr bedeutendes Kompartiment handelt. Die Änderungen von Umweltbedingungen werden in vielen Fällen nicht direkt von den Zellen empfangen, sondern zeigen sich in Änderungen des interzellulären Milieus von Pflanzen (Hoson, 1998). Der Apoplast höherer, terrestrischer Pflanzen ist ein essentieller Speicher- und Reaktionsraum, welcher die Zellgewebe miteinander verbindet und am Transport von Stoffen beteiligt ist (Sattelmacher, 2001). Neben zahlreichen katalytischen Enzymreaktionen und Abwehrprozessen ist er ebenso im Gasaustausch zwischen der Umwelt und den Pflanzenzellen involviert und dient als Speicher von O_2 .

Da der Apoplast pflanzlicher Wirtsgewebe als Lebensraum von *Xcv* dient, ist das Bakterium auch dort mit Mechanismen der pflanzlichen Abwehr konfrontiert. Die Abwehrmechanismen der Wirtspflanzen dienen der Unterbindung der bakteriellen Verbreitung und stellen somit Stressfaktoren für *Xcv* dar. In vielen Pflanzen umfassen derartige Stressbedingungen neben Kalloseablagerungen in Zellwänden und der Expression von *pathogenesis-related* (PR)-Genen auch die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS), wie z.B. H_2O_2 und O_2^- , sowie auch Änderungen des pH-Wertes im Apoplasten der Pflanze (Mehdy, 1996; Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998; Nürnberger and Brunner, 2002; Jittawuttipoka *et al.*, 2010).

Bei vielen Pathogen-Wirt-Interaktionen, vor allem von tierpathogenen Mikroorganismen, sind induzierte Stressfaktoren wie die Limitierung von Eisen und Sauerstoff als Teil der Abwehr des Wirts bekannt (Griffiths, 1987; Somerville *et al.*, 2002; Dietz, 2012). Eisen ist eines der wichtigsten Elemente und stellt für Mikroorganismen einen wachstumslimitierenden Faktor dar und ist essentiell für viele zelluläre Prozesse (Kitphati *et al.*, 2007; Jittawuttipoka *et al.*, 2010). Seine biologische Funktion ist meist abhängig von der Verbindung zu Enzymen bzw. dem Einbau in verschiedene Proteine, entweder als mono- oder binukleare Spezies oder in einer komplexeren Form als Teil von Fe-S-Clustern oder Häm-Gruppen (Andrews *et al.*, 2003). Mehr als 100 Enzyme des primären und sekundären Metabolismus besitzen einen eisenhaltigen Kofaktor, wie ein Fe-S-Cluster oder eine Häm-Gruppe (Miethke and Marahiel, 2007). Eisen ist somit an biologischen Prozessen beteiligt, wie Photosynthese, N_2 -Fixierung, Methanogenese, H_2 -Produktion und -verbrauch, Atmungsketten, dem TCA-Zyklus, Genregulation und DNA-Biosynthese (Becker *et al.*, 1998; Andrews *et al.*, 2003; Bailey *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008; Cox *et al.*, 2010; Xu and Moller, 2011).

Eisen kommt unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich in den Formen des reduzierten zweiwertigen Eisens (Fe^{2+}) und des oxidierten dreiwertigen Eisens (Fe^{3+}) vor. Dieses reversible Fe^{2+}/Fe^{3+} Redoxpaar ist bestens geeignet um ein breites Spektrum an Redoxreaktionen zu katalysieren und eine Funktion als Vermittler in Elektronentransportketten einzunehmen (Miethke and Marahiel, 2007). Jedoch kann Eisen auch die Bildung von toxischen freien Radikalen, in der Anwesenheit von

Sauerstoff, durch die Fenton Reaktion katalysieren, welche Membranen, Proteine und DNA schädigen (Hentze and Kuhn, 1996). Die hohe Reaktivität von Eisen hat zur Folge, dass es in Zellen nie als freies Ion vorkommt. In den meisten mikrobiellen Habitaten kommt es meist zur spontanen Oxidation des löslichen Fe^{2+} oder zur Oxidation durch molekularem Sauerstoff zu dem wenig löslichen Fe^{3+} (Miethke and Marahiel, 2007). Bei einem physiologischen, neutralen pH-Wert ist durch die geringe Löslichkeit wenig freies Fe^{3+} für Bakterien verfügbar (10^{-18} M). Vor allem bei einer Alkalisierung des pH-Wertes sinkt die Löslichkeit von Eisen und es kommt zu einem vorherrschenden Eisenmangel. Bakterien benötigen Eisen im mikromolaren Bereich, wobei eine interne Eisenkonzentration unter 10^{-6} M einen kritischen Wert für mikrobielles Wachstum darstellt. Die geringe Verfügbarkeit von Eisen ist vor allem für pathogene Mikroorganismen ein Problem, da diese es ihrem Wirt entziehen müssen. Daher ist die Synthese von Siderophoren, welche unter eisenlimitierenden Bedingungen induziert wird, von großer Bedeutung und die verbreitetste Form der Eisenerlangung unter Bakterien (Visca *et al.*, 2002). Siderophore zeichnen sich durch ein geringes Molekulargewicht und einer hohen Affinität zu Fe^{3+} aus (Ratledge and Dover, 2000). Die Siderophor- Fe^{3+} -Komplexe werden durch aktiven Transport in die bakterielle Zelle aufgenommen, der durch Proteine von TonB Komplexen (TonB, ExbB und ExbD) energetisiert wird (Postle and Kadner, 2003).

Eisen ist in Pflanzen oft an organische Säuren wie Citrat oder Malat gebunden und wird im Xylem der Leitgefäße transportiert (Expert *et al.*, 1996). Da ein Übermaß an intrazellulärem Eisen toxisch für die Zelle ist, muss die Eisenaufnahme streng kontrolliert erfolgen. Dies geschieht in vielen Bakterien durch den Eisenaufnahmeregulator Fur (Subramoni and Sonti, 2005).

Auch das Genom von *Xcv* kodiert einen putativen Eisenaufnahmeregulator Fur (Xcv1560) und besitzt mehrere Gene für putative Proteine eines TonB-ähnlichen Eisenaufnahmesystems (Thieme *et al.*, 2005). Ebenfalls beinhaltet das Genom von *Xcv* die Gene *feoA* (XCV1900) und *feoB* (XCV1901), welche ein putatives Fe^{2+} -Aufnahmesystem kodieren. Über Feo-Systeme von phytopathogenen Bakterien ist wenig bekannt, jedoch konnte FeoB aus *X.oryzae pv.oryzae* (*Xoo*) in Zusammenhang mit der Eisenaufnahme und Virulenz gebracht werden (Pandey and Sonti, 2010). Fe^{3+} wird oft in Chelatkomplexen mit Citrat aufgenommen, wie es auch in *Xoo* gezeigt werden konnte. Hier ist ein Citrattransporter wichtig für die effiziente Eisenaufnahme (Yokosho *et al.*, 2009).

Die Limitierung von Eisen und Sauerstoff während eines Pathogenbefalls des Apoplasten von Pflanzen ist bislang wenig untersucht. Jedoch existieren Indizien, dass ein Pathogen beim Befall von Pflanzen mit niedrigen Sauerstoffkonzentrationen konfrontiert ist (Allen *et al.*, 2009). Im Fall von Eisen liegt z.B. eine Limitierung in *Arabidopsis* durch die Rückhaltung von Eisen durch Ferritin in dem Bakterium *Erwinia chrysanthemi* vor (Dellagi *et al.*, 2005). Ferritin ist ein eisenspeicherndes Protein und wird in dieser Studie als Bestandteil des Abwehrsystems in *Arabidopsis* angesehen.

Auch im Apoplasten von Paprika- und Tomatenpflanzen ist durch die kontinuierlich steigende Populationsdichte von *Xcv* sowie als Abwehrreaktion der Pflanze eine Sauerstofflimitierung denkbar.

Neben geringen Sauerstoffkonzentrationen könnte *Xcv* dort ebenfalls mit ROS und niedrigen Eisenkonzentrationen, sowie geringer oder sich ändernder Substratverfügbarkeit konfrontiert sein.

Die Abb. 2 zeigt einen Teil einer lichtmikroskopischen Aufnahme eines Blattquerschnittes von Paprika nach Infiltration mit *Xcv*. Im Interzellularraum, welcher die Schwammparenchymzellen miteinander verbindet, befinden sich *Xcv*-Zellen mit umgebenden Xanthan, welche hauptsächlich um bzw. in unmittelbarer Nähe der Parenchymzellen zu finden sind.

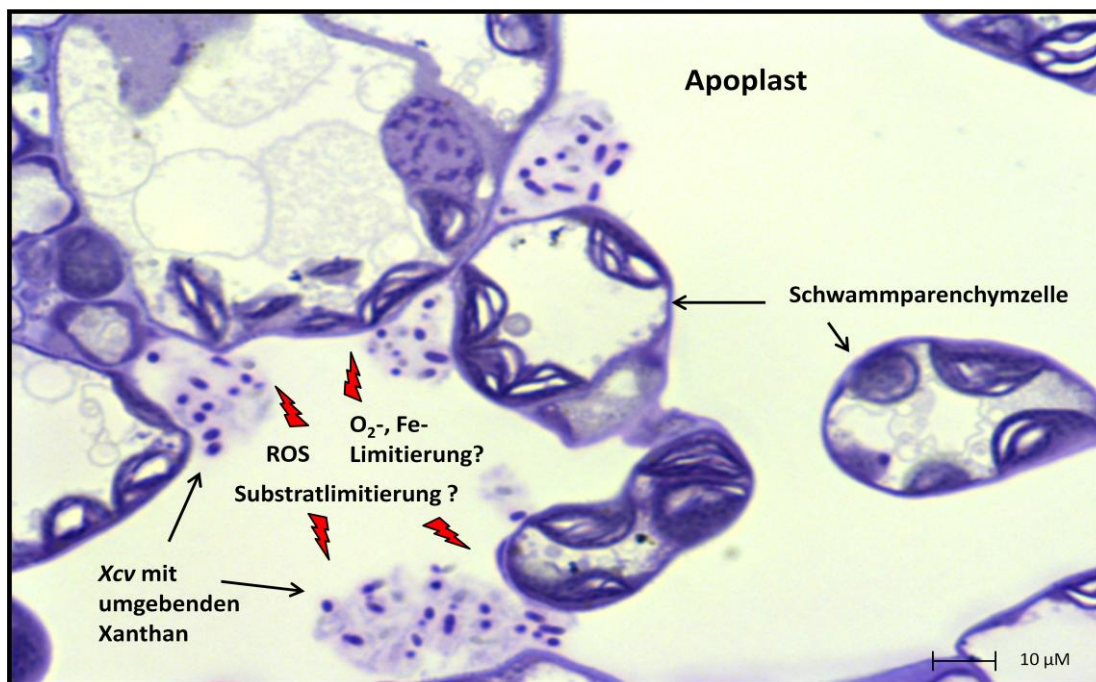


Abb. 2: Vermehrung von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* im Apoplasten von Paprikablättern.

Lichtmikroskopische Aufnahme eines partiellen Blattquerschnittes von Paprikapflanzen nach Infiltration mit *Xcv*. Es wurden Blätter einer 5-6 Wochen alten Paprikapflanze mit einer Zellsuspension von 5×10^4 cfu/ml in 10 mM $MgCl_2$ infiltriert und nach 2 Tagen eine Probe im Form einer Blattscheibe zur Präparation und mikroskopischen Analyse entnommen. Dieser partielle Ausschnitt eines Blattquerschnittes zeigt Schwammparenchymzellen umgeben von interzellulärem Raum (Apoplast), indem *Xcv*-Zellen, eingebettet in Xanthan, zu erkennen sind. Eingezeichnet sind u.a. potentielle Stressfaktoren für *Xcv*, die während des Wachstums im Apoplasten vorherrschen könnten (Aufnahme Dr. Gerd Hause, Universitätsbiozentrum, MLU Halle-Wittenberg).

In der Abbildung wurden schematisch potentielle Stressfaktoren im Apoplasten während der Infektion mit *Xcv* wie ROS, Substratlimitierung, O_2 - und Eisenlimitierung eingezeichnet.

Die Ausbildung eines Biofilms und die Sekretion von extrazellulären Polysacchariden (EPS) dienen zum einen der Anheftung und Kontaktherstellung an die Wirtszelle und zum anderen auch als Verbindung unter den einzelnen Bakterienzellen. Weitere Funktionen von EPS sind die Adsorption von Wasser, die Akkumulation von Nährstoffen und der Schutz vor hydrophoben und toxischen Makromolekülen (Rudolph, 1994; Denny, 1995). Eine kapsuläre Hülle aus EPS stellt auch unter *Xanthomonas* spp. einen essentiellen Virulenzfaktor dar und bildet einen Schutz gegen die Abwehrmechanismen der Wirtspflanze (Katzen *et al.*, 1998). Um die erforderlichen Zelldichten, zur Eroberung des Wirts zu erreichen, muss *Xcv* neben der Sensierung von Stressfaktoren des pflanzlichen

Abwehrsystems ebenso in der Lage sein sich an das interzelluläre Umfeld anzupassen und die verfügbaren Nährstoffe zu nutzen (Tamir-Ariel *et al.*, 2007). Da die Verfügbarkeit von Nährstoffen ausschlaggebend für das Wachstum und die Pathogenität des Bakteriums ist, sind die Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr und die Entziehung von Nährstoffen die wichtigsten initialen Schritte des Pathogenbefalls (Tang *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010). Das Bakterium nutzt mehrere Strategien, um benötigte Nährstoffe innerhalb der Wirtspflanze zu erlangen. Zum einen können alternative metabolische Wege aktiviert werden oder Nährstoffe durch den Abbau von Makromolekülen durch z.B. Cellulasen und Amylasen erlangt werden. Eine dritte Strategie ist eine Anpassung durch Nutzung der Kohlenstoff (C)-Quellen in ihrer verfügbaren Form.

Jede pathogene Spezies nutzt unterschiedliche Metabolite, sowie auch unterschiedliche Mechanismen zur Nährstofferrlangung. Diese Mechanismen und die Nutzung der C-Quellen haben sich durch Koevolution des Pathogens mit seinem spezifischen Wirt entwickelt (Tang *et al.*, 2005).

Der pflanzliche Apoplast stellt als Lebensraum von *Xcv* eine Reihe von Metaboliten, wie Zuckeralkohole, Aminosäuren und organische Säuren zur Verfügung, wobei die Kohlenstoffversorgung von zentraler Bedeutung zu sein scheint (Solomon and Oliver, 2001; Nadwodnik and Lohaus, 2008). Allerdings ist die Zusammensetzung der apoplastischen Flüssigkeit und die Menge an Metaboliten in den verschiedenen Pflanzenarten unterschiedlich.

Über die Regulation des Metabolismus und der Nutzung von Substraten von *Xcv* im Apoplasten der Wirtspflanzen Tomate und Paprika ist wenig bekannt, jedoch wird von einer komplexen Beteiligung von Mechanismen während des Infektionsprozesses ausgegangen (Tamir-Ariel *et al.*, 2007). Der Erkennung nutzbarer Metabolite und die Induktion verschiedener Transportsysteme scheint eine große Bedeutung zu zukommen (Galperin, 2004).

Saccharose stellt vermutlich in den meisten höheren Pflanzen die Haupttransportform von Kohlenstoff dar (Kocal, 2011). In *Xanthomonas* spp. existieren mehrere Gene, welche für eine metabolische Nutzung von Mono- und Dissacchariden sprechen. In *X. campestris* pv. *campestris* B100 (*Xcc* B100) wurden neben den Entner-Doudoroff-Weg und eines Pentosephosphat-Wegs auch der komplette Satz der Gene der Glykolyse identifiziert (Vorhölter *et al.*, 2008). In *Xanthomonas* spp. wird Glukose hauptsächlich über den Entner-Doudoroff-Weg und zu einem geringen Anteil durch den Pentose-Phosphat-Weg verwertet. Weiterhin konnte in *Xcc* für Fruktose ein Phosphoenolpyruvat-abhängiges Phosphotransferase-System beschrieben werden (de Crecy-Lagard *et al.*, 1995). In *X. axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*), dessen Wirtspflanze die Sojabohne ist, wurde die Saccharosehydrolase, kodiert vom Gen *suh*, als Saccharose-spaltendes und- verwertendes Enzym identifiziert (Kim *et al.*, 2004). Auch *Xcv* verfügt über ein *suh* Gen (XCV3618), das für eine putative Saccharosehydrolase kodiert (Thieme *et al.*, 2005; Kocal, 2011). Ebenfalls ist im Genom von *Xcv* ein *sym* Gen (XCV3616) zu finden, welches einen Saccharose-Transporter kodiert. Die *suh*- bzw. *sym*-Genprodukte stellen die Hauptaufnahmesysteme für Saccharose dar, da Deletionsmutanten von *Xcv* nicht auf

saccharosehaltigem Minimalmedium wachsen können (Kocal, 2011). Jedoch spricht ein unverändertes Wachstum dieser Mutanten *in planta* und eine Akkumulation von Saccharose im Apoplasten veränderter Tomatenpflanzen dafür, dass Saccharose vermutlich nicht das Hauptmetabolit von *Xcv* im Apoplasten der Wirtspflanzen darstellt (Kocal, 2011). In diesen Studien mit Tomatenpflanzen lag ein erhöhter Energiebedarf im Wirt bei Pathogenbefall vor und es kam zu einer pathogenvermittelten Veränderung des Gehalts an apoplastischen Hexosen durch eine erhöhte Aktivität einer Zellwand-gebundenen Invertase. Diese spaltet Saccharose in Fruktose und Glukose (Kocal *et al.*, 2008; Kocal, 2011). Es kam ebenfalls zu einem erhöhten Transport dieser Hexosen in das Cytosol der Pflanzenzelle, sowie zu einer Reprimierung von Photosynthesegenen (Koch, 1996). Es wird weiterhin davon ausgegangen, dass die extrazellulären Zuckermengen einen geringen Teil des löslichen Gesamtzucker ausmachen. Obwohl Saccharose im Apoplasten von Tomate aufzufinden ist (Rico and Preston, 2008), konnte in Studien mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 jedoch nur äußerst geringe Mengen während des Wachstums im Apoplasten von Tomate gefunden werden (Laue *et al.*, 2006). Es wird davon ausgegangen, dass die vorhandene Saccharose durch die Sekretion von Levansucrase zum Exopolysaccharid Levan, als Teil des Biofilms, umgebaut wird.

Einige Studien konnten bereits ein Vorkommen von Citrat und anderen organischen Säuren in pflanzlichen Apoplasten belegen (Expert *et al.*, 1996; Lopez-Millan *et al.*, 2000; Tamir-Ariel *et al.*, 2007; Kocal *et al.*, 2008; Rico and Preston, 2008). Analysen des Apoplasten von Tomatenblättern nach Infiltration von *Xcv* identifizierten Citrat als C-Quelle von *Xcv in planta*. Der Citrat:H⁺-Symporter CitH ist hierbei für die Aufnahme von Citrat während des Befalls der Wirtspflanze verantwortlich und dies wiederum für die Virulenz von *Xcv* (Tamir-Ariel, *et al.*, 2007; Tamir-Ariel, *et al.*, 2011). Eine *citH* Mutante von *Xcv* zeichnete sich durch reduziertes Wachstum *in planta* aus. Als weiteres Indiz für eine Citratnutzung von *Xcv* im Apoplasten von Tomate galt eine reduzierte Citratkonzentration im Apoplasten nach Wachstum von Wildtyp und einem *citH*-Komplementationsstamm, jedoch nicht nach Wachstum einer *citH* Mutante. Die Expression von *citH* wird durch ein Zweikomponenten-Responsesystem TctD/TctE reguliert. Im Genom von *Xcv* existiert neben *citH* ein weiteres Gen (*cit*; XCV3602), welches einen putativen Citrat:H⁺-Symporter kodiert (Thieme *et al.*, 2005).

Des Weiteren konnten durch IVET-Studien Gene für Enzyme des TCA-Zyklus identifiziert werden, welche *in vivo* bei phytopathogenen, jedoch nicht bei tierpathogenen Mikroorganismen exprimiert waren (Mahan *et al.*, 1993). Dies spricht für eine spezifische Funktion dieser bakteriellen Enzyme während der Interaktion von Pflanzen und ihren Pathogenen. Zum Beispiel ist beim Wachstum von *Ralstonia solanacearum* im Xylem von Tomatenpflanzen das Gen *fumC* höher exprimiert (Brown and Allen, 2004). Dies kodiert eine Fumarase, welche die Reaktion von Fumarat zu Malat im TCA-Zyklus katalysiert. Neben diesen Erkenntnissen wurde auch bei *P. syringae* pv. *tomato* während des

Wachstums im Apoplasten von Tomatenblättern eine Induktion der Synthese von spezifischen Stoffwechselwegen der Citratverwertung beobachtet (Rico and Preston, 2008). Eine weitere Studie zeigte eine reduzierte Virulenz von *Pectobacterium atrosepticum* in Kartoffelknollen nach der Blockierung eines Citrattransporters (Urbany and Neuhaus, 2008).

Neben der Funktion als C-Quelle ist Citrat auch als ein guter Chelator von Metallionen, v. a. Eisenionen bekannt und erlaubt so einen effizienteren Transport dieser Mikronährstoffe (Lopez-Bucio *et al.*, 2000). Eisen kommt in der Xylem- und Apoplastenflüssigkeit von Zuckerrüben und anderen Pflanzen hauptsächlich gebunden in Form von Eisen-Citrat-Komplexen vor (Expert *et al.*, 1996; Lopez-Millan *et al.*, 2000). Dies deutet daraufhin, dass Citrat wichtig für den Transport von Eisen über eine größere Distanz (Wurzeln-Blätter) und später für die Aufnahme in die Mesophyllzellen ist. Eine erhöhte Menge an Malat und Citrat zur Steigerung der Eisenaufnahme im Apoplasten und im Xylem von Zuckerrüben verdeutlicht die Aufnahme von Eisen durch Komplexbildung mit organischen Säuren.

Auch der pH-Wert im Apoplasten von Wirtspflanzen ist ein wichtiger Parameter für die Verfügbarkeit von essentiellen Substanzen und organischen Molekülen wie u.a. Zucker und Aminosäuren (Felle *et al.*, 2006). Eine reduzierte Sauerstoffversorgung des Apoplasten führt zur Depolarisierung von Membranen, was eine Alkalisierung des pH-Wertes über 6,0 zur Folge hat. Dies führt zu einer Reduktion der pmf (*proton motive force*) von 70 %, wodurch der Protonen-betriebene Transport gestört wird. Daher sollten reduzierte Sauerstoffbedingungen nicht von langer Dauer sein. Eine Eisenlimitierung führt ebenfalls zu einer Alkalisierung des pH-Wertes des Apoplasten (Mengel, 1995). Citrat stellt ein wichtiges Siderophor in pflanzlichen Apoplasten dar und zeichnet sich durch eine hohe Affinität zu Eisen bei einem pH von 5,0 - 6,0 aus, wie er im Apoplasten von Tomate vorliegt (Jia and Davies, 2007; Jones and Wildermuth, 2011). Citrat gilt als favorisierter Eisen-Ligand bei pH-Werten der Apoplasten von Blättern (Von Wiren, 1999; Rellan-Alvarez *et al.*, 2008).

Phytopathogene Mikroorganismen wie *P. syringae* pv. *tomato* nutzen eine Kombination aus konstitutiv synthetisierten und Pflanzen-induzierten Stoffwechselwegen um sich an die Verwertung der im Apoplasten vorkommenden, energetisch günstigen Nährstoffe anzupassen bis diese limitierend werden (Rico and Preston, 2008).

Da *Xcv* möglicherweise neben Citrat eine Reihe von anderen Substraten u.a. Sachharose, Glukose, organische Säuren und AS nutzen kann, könnte ebenfalls eine Kombination von verschiedenen Stoffwechselwegen bzw. eine schnelle Induktion alternativer Wege vorliegen.

Die Sensierung von Stressbedingungen und verfügbaren Substraten im Apoplasten und die Initiation der erforderlichen Genregulation muss hierbei durch spezielle Sensorproteine gewährleistet werden. Bei vielen Mikroorganismen konnte eine Rolle von Fe-S-Proteinen im Zusammenhang mit der Sensierung von ROS und Eisenlimitierung belegt werden (Tang *et al.*, 2002; Rouault, 2006).

Aconitasen sind aufgrund ihres labilen [4Fe-4S]-Clusters geeignete Sensorproteine, die Änderungen im O₂-, ROS- und Eisengehalt detektieren können (Cunningham *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1998; Tang and Guest, 1999). Aconitasen könnten daher auch eine wichtige sensorische Rolle in *Xcv* während der Infektion von Paprika- und Tomatenpflanzen übernehmen.

1.3 *Xcv* verfügt über drei Aconitase Proteine

Anhand der Genomsequenz besitzt *Xcv* drei Gene für Aconitase Proteine, wobei es sich um zwei Aconitasen des Typ A (*acnA*, XCV1924; *acnA*, XCV1158) und eine des Typ B handelt (*acnB*, XCV1927) (Thieme *et al.*, 2005). Um Verwechslungen auszuschließen wird das Gen XCV1158 im weiteren Verlauf der Arbeit als *acnA2* bezeichnet. Während sich *acnA* und *acnB* in divergenter Orientierung zueinander befinden und auf demselben Locus angeordnet sind, befindet sich *acnA2* weiter entfernt im Genom (Abb. 3). Stromaufwärts von *acnB* sind die Gene *roaX* (XCV1925) und *roaY* (XCV1926) lokalisiert, die in Abb. 3A schematisch dargestellt sind.

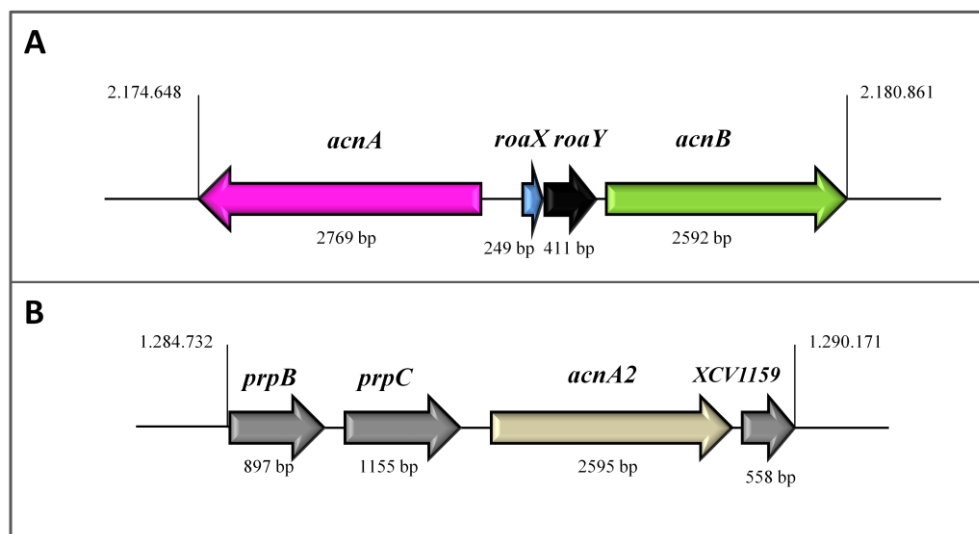


Abb. 3: Schematische Darstellung der Lokalisation der Aconitase Gene *acnA*, *acnA2* und *acnB* im Genom von *Xcv*

(A) Die Gene *acnA* und *acnB* befinden sich in divergenter Orientierung zueinander im Genom von *Xcv* und sind auf einem Locus angeordnet. Stromaufwärts von *acnB* befinden sich die Gene *roaX* (XCV1925) und *roaY* (XCV1926), welche für putative Nukleotid-bindene Proteine der *Toxin-Antitoxin*-Klasse kodieren. (B) Das Gen *acnA2* befindet sich in Nachbarschaft von Genen, welche putative Proteine des Citrat- bzw. Methylcitratmetabolismus kodieren. Während das Genprodukt von *prpC* eine putative Citratsynthase darstellt, kodiert *prpB* für eine hypothetische Methylisocitratlyase. Die Größe der Gene ist in bp angegeben, sowie die Lokalisierung in GenBank: AM039952.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Das Genprodukt RoaX zeigt zum einen Ähnlichkeiten zu AbrB-ähnlichen Transkriptionsfaktoren, welche die Expression zahlreicher Gene während des Eintritts von einer exponentiellen in eine stationäre Wachstumsphase regulieren (Strauch and Hoch, 1993) und zum anderen auch Ähnlichkeiten zu Antitoxin-Proteinen von bekannten Toxin-Antitoxin-(TA) Systemen (Wang and Wood, 2011; Wesolowska, 2012). Das Gen *roaY* kodiert ein Produkt, welches Ähnlichkeiten zu Proteinen mit PIN-

Domänen (*N*-terminale Untereinheit von PilT-Protein-Domänen) aufweist. Hierbei werden Proteine mit PIN-Domänen in Zusammenhang mit dem Nukleinsäurestoffwechsel und damit verbundenen Synthese- und Konvertierungsreaktionen gebracht (Pandey and Gerdes, 2005).

PIN-Domänen sind auch oft Komponenten von Toxin-Proteinen, welche durch ihren Zusammenhang mit der Pathogenität von Mikroorganismen als *virulence associated protein* (Vap) bezeichnet werden. Es wird postuliert, dass RoaX und RoaY aufgrund der Anordnung ihrer Gene im Genom von *Xcv* einen Einfluss auf die Expression von *acnB* besitzen (Wesolowska, 2012). Die Abb. 3 B zeigt schematisch die Lokalisierung des Gens *acnA2* im Genom von *Xcv*. Stromabwärts von *acnA2* befindet sich neben dem Gen *prpC*, welches für eine putative Citratsynthase kodiert, auch das Gen einer hypothetischen Methylisocitratlyase (*prpB*). Die Citratsynthase ist im Stoffwechsel aller aerob lebenden Organismen ein unentbehrliches Enzym des TCA-Zyklus und kondensiert Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat und CoA (Wiegand and Remington, 1986). Da es den initialen Schritt des Zyklus katalysiert, kommt diesem Enzyme eine Kontrollfunktion für die Umsatzrate der eintretenden Substrate zu. Die Methylisocitratlyase (PrpB) ist ein wichtiges Enzym des Methylcitratzyklus und übt eine Funktion in der Verwertung von kurzkettigen Fettsäuren wie Propionat und Acetat aus, indem es beispielsweise in *E. coli* den letzten Schritt des Methylcitratzyklus, die Spaltung von Methylcitrat in Pyruvat und Succinat, katalysiert (Grimm *et al.*, 2003). Für viele pathogene Mikroorganismen konnte die Wichtigkeit der Nutzung von Fettsäuren während einer Infektion gezeigt werden (Boshoff and Barry, 2005; Munoz-Elias and McKinney, 2006).

Anhand von Sequenzierungen ließen sich für *acnA* und für *roaX-roaY* die Transkriptions-Initiations-Stellen (+1) bestimmen (Schmidtke *et al.*, 2012). In Abb. 4 sind diese Positionen schematisch dargestellt. Für *acnB* und *acnA2* konnten jedoch keine Transkriptions-Initiations-Stellen ermittelt werden. Ob die Transkription von *acnB* an gleicher Position wie die von *roaX-roaY* initiiert wird ist unklar, jedoch ist eine Kotranskription der Gene *roaX-roaY-acnB* nicht auszuschließen.

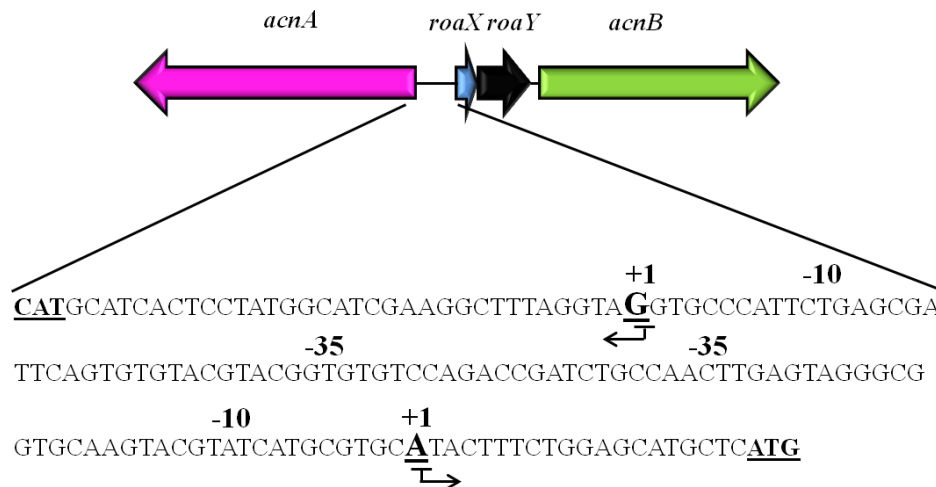


Abb. 4: Transkriptions-Initiations-Stellen von *acnA* und *roaX-roaY* in *Xcv*.

Die schematische Darstellung des *acn*-Genclusters zeigt den intergenen Bereich zwischen *acnA* und *roaX*. Basierend auf den Daten von (Schmidtke *et al.*, 2012) wurden die dort ermittelten Transkriptions-Initiations-Stellen (+1) von *acnA* und *roaX-roaY* eingezeichnet. Eine Transkriptions-Initiations-Stelle für *acnB* konnte nicht identifiziert werden. Desweiteren sind ebenfalls die Positionen -10 und -35 als entscheidende Regulationssequenzen für die Initiation der Transkription eingezeichnet. Die Translationsinitiationscodons von *acnA* und *roaY* sind unterstrichen.

1.4 Bifunktionalität und weitere Eigenschaften von Aconitase Proteinen

Aconitasen (Acn) besitzen neben anderen Enzymen eine bedeutende katalytische Funktion im TCA- und Glyoxylatzyklus. Es handelt sich hierbei um weit verbreitete große monomerische, gelegentlich auch homodimerische Proteine, die die reversible Reaktion von Citrat zu Isocitrat über *cis*-Aconitat katalysieren (Beinert *et al.*, 1996; Tsuchiya *et al.*, 2009). Der TCA-Zyklus stellt für die meisten Bakterien einen zentralen und bedeutenden Stoffwechselweg dar. In seiner katabolischen Funktion wird Acetyl-CoA, ein Produkt des Abbaus von Zucker, Fettsäuren, Aminosäuren und anderen C-Quellen zu CO₂ oxidiert, wobei Reduktionsäquivalente (NADH und reduzierte Quinone) für die Atmungskette und ATP durch Substratphosphorylierung entstehen (Baumgart *et al.*, 2011). Neben Succinyl-CoA sind 2-Oxoglutarat und Oxalacetat als Vorläufer der Glutamat- und Aspartat-Familie der Aminosäuren wichtige Intermediate des TCA-Zyklus.

Aconitasen zeichnen sich durch den Besitz eines labilen [4Fe-4S]-Cluster aus, welches wichtig für die enzymatische Aktivität ist und weisen meist eine molekulare Masse von 90-100 kDa auf. Die Aconitase-Protein-Superfamilie wird in 5 phylogenetische Gruppen unterteilt (Rouault, 2006; Walden *et al.*, 2006). Neben mitochondrialen Aconitasen höherer Organismen (mAcn, Gruppe 1) zählen die cytoplasmatischen Aconitasen (cAcn), IRP1 und IRP2 (*iron regulatory proteins*), sowie die bakteriellen Aconitasen vom Typ A (AcnA) zur Gruppe 2 der Familie. Die Gruppe 3 stellen die Homoaconitasen dar. Die Isopropylmalat-Isomerasen (IPMI) aus Bakterien und Pilzen bilden die 4.

Gruppe. Eine weitere Gruppe beinhaltet die bakteriellen Aconitasen vom Typ B (AcnB). Anhand des Aufbaus und der Struktur existieren zwei verschiedene Formen bzw. Typen von Aconitasen, Typ A und Typ B (Williams *et al.*, 2002). Aconitasen des Typ A zeichnen sich durch einen Aufbau aus vier Domänen aus, wie es bei den cAcn, den mAcn und den bakteriellen AcnA Enzymen zu finden ist. Hierbei sind die Domänen 1-3 durch einen Linker mit der vierten Domäne verbunden (1, 2, 3 linker 4), welche für die Ausbildung des aktiven Zentrums verantwortlich ist (Robbins and Stout, 1989). Die Domäne 3 beinhaltet drei konservierte Cysteine, welche die Ausbildung des [4Fe-4S]-Clusters koordinieren, während sich die Domänen 1 und 2 um die prosthetische Gruppe winden (Tang *et al.*, 2005). Während drei der vier Eisenatome des Fe-S-Clusters durch konservierte Cysteinreste der Domäne 3 koordiniert werden, stellt das vierte Eisenatom die Bindestelle für Substrate dar (Beinert *et al.*, 1996). Die Aconitasen des Typ B verfügen jedoch zusätzlich über eine fünfte Domäne, welche als HEAT-Domäne bezeichnet wird und die N-terminalen AS 1-160 einnimmt (5, 4 linker 1, 2, 3). Dieser Bereich ist in 10 α -Helices organisiert, wobei α 1 und α 10 mit Domäne 4 interagieren und α 2-9 eine Struktur aus vier *repeat*-Einheiten bilden, wobei jede Einheit aus einem Paar antiparalleler α -Helices besteht. HEAT-Proteine scheinen eine allgemeine Funktion in Protein-Protein-Interaktionen bei vielen zellulären Prozessen zu besitzen (Groves *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2001). Daher besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass auch die HEAT-Domänen der AcnB Proteinen eine derartige Funktion besitzen könnten (Williams *et al.*, 2002). Durch Interaktion mit der vierten Domäne kommt es zur Ausbildung einer trichterartigen Struktur wodurch Substrate wie durch einen Tunnel direkt zum aktiven Zentrum geführt werden.

Bakterielle AcnA- und AcnB-Proteine zeichnen sich zusammen mit den cAcn über eine gemeinsame Bifunktionalität aus, welche bei mAcns nicht vorkommt. Bei Bedingungen wie Eisenlimitierung, oxidativem Stress oder auch Stickstoffmonoxid-Stress disassembliert das labile [4Fe-4S]-Cluster des katalytisch aktiven Holoenzym und das entstandene Apo-Protein nimmt eine alternative Konformation ein (Gardner and Fridovich, 1991; Hentze and Kuhn, 1996; Han *et al.*, 2005). Durch diese Konformationsänderung ist das Protein befähigt spezifisch an bestimmte mRNA-Strukturen zu binden und so eine posttranskriptionelle Funktion auszuüben (Beinert *et al.*, 1996; Alen and Sonenshein, 1999; Tang and Guest, 1999). Da diese nicht-enzymatische Funktion abhängig von der Verfügbarkeit von Eisen ist, werden solche Proteine auch als *iron response proteins* (IRP) und die gebundenen, spezifischen mRNA-Strukturen als *iron response elements* bezeichnet (IREs) (Hentze and Kuhn, 1996; Rouault, 2006). Die IREs stellen *stem-loop*-Strukturen dar und befinden sich meist in der 5'- oder 3'-untranslatierten Region (UTR) einer mRNA des zu regulierenden Gens. Durch die spezifische Bindung der Apo-Acn bzw. IRP kommt es entweder zur Erhöhung der Transkriptstabilität und -effizienz oder zu einer Blockierung der Translation. Die Abb. 5 zeigt die spezifische Bindung von IRPs an 5'-UTRs zur Blockierung der Translation und an 3'-UTRs zur Stabilisierung der mRNA.

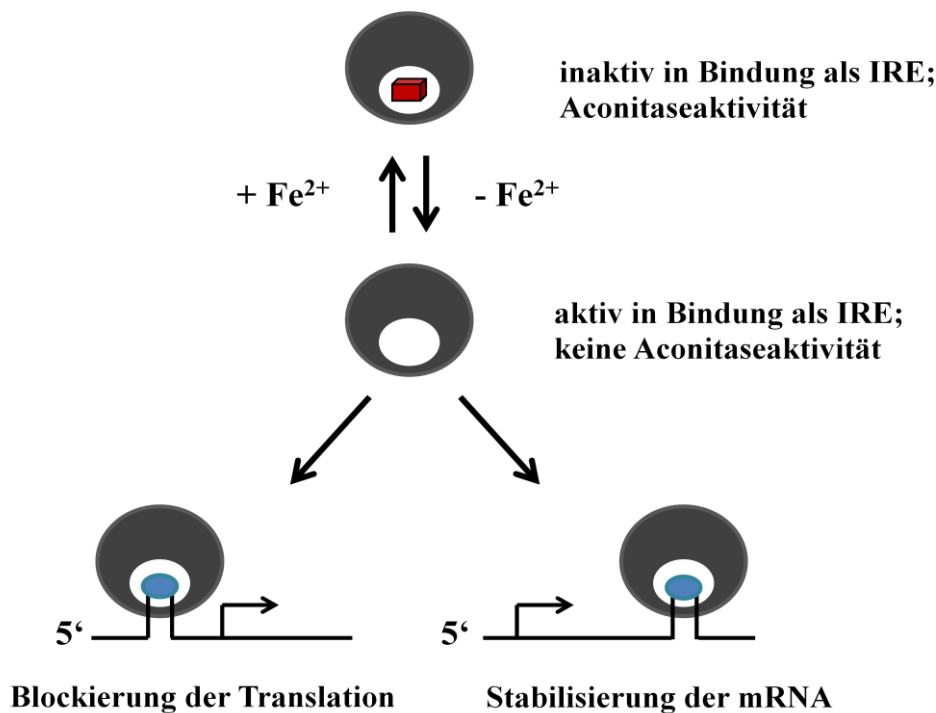


Abb. 5: Iron response elements (IREs) und iron response proteins (IRPs).

Schematische Darstellung der Bindung des IRP an ein IRE. IREs sind *stem-loop*-Strukturen in 5'- oder 3'-UTRs von mRNA meist von Genen, die Proteine kodieren, welche in den Eisenmetabolismus involviert sind. Befindet sich das IRE in der 5'-UTR, führt die Bindung des IRP zur Inhibierung der Translationsinitiation und zur Abnahme der Synthese des Proteins. Bindet das IRP jedoch in der 3'-UTR wird die mRNA vor Abbau geschützt und die Synthese des Proteins gesteigert. Bei der Anwesenheit von Eisen wird IRP zu einer Form konvertiert, welche inaktiv für die RNA-Bindung ist, aber über eine enzymatische Aconitaseaktivität verfügt. Der Würfel (rot) stellt das [4Fe-4S]-Cluster dar, welches essentiell für die katalytische Aktivität der Aconitaseenzyme ist (Hentze and Kuhn, 1996; Alen and Sonenshein, 1999).

Es ist bekannt, dass Aconitasen bei vielen Mikroorganismen zahlreiche zelluläre Prozesse posttranskriptionell regulieren. Einige Beispiele sind die Antwort auf oxidativen Stress bei *E. coli* (Varghese *et al.*, 2003), die Sporulation von *Bacillus subtilis* (Craig *et al.*, 1997), die Beweglichkeit bzw. Flagellensynthese von *Salmonell enterica* (Tang *et al.*, 2004) und das Überleben in der stationären Wachstumsphase von *Staphylococcus aureus* (Somerville *et al.*, 2002).

Aconitasen sind auch an der Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase beteiligt, welches auch bei Säugerzellen ein wichtiger Faktor ist. Hier spielen die cAcs/IRP1-Proteine eine wichtige Rolle in der Regulation von Genen des Eisenmetabolismus (Rouault, 2006).

Eukaryotische Aconitasen besitzen kein vollständiges Fe-S-Cluster. Ein [3Fe-4S]-Cluster der Enzyme kann z.B. ein Substrat binden, aber keine enzymatische Modifikation katalysieren (Beinert and Kennedy, 1993). Dies führte zu der Spekulation, dass ein inaktives Aconitase-Enzym auch als Eisen-Citrat-Carrier fungieren kann und einen Eisensensor darstellt (Henderson, 1996; Rouault and Klausner, 1996). Somit könnte auch bei bakteriellen Aconitasen eine Eisen-Citrat-Carrier-Funktion durch Konformationsänderung bestehen.

Auch in Pflanzen besitzen Aconitase-Proteine wichtige Funktionen. Die Inaktivierung des Gens einer Aconitase in *Nicotiana benthamiana* führte zu einer reduzierten Resistenz gegenüber Paraquat,

welches eine reaktive Sauerstoffspezies darstellt (Briat *et al.*, 2007). Die Aconitase vermittelt auch hier die Antwort auf oxidativen Stress und zeigt die Wichtigkeit der Eisenhomöostase für den pflanzlichen Metabolismus. Das wird vor allem durch bedeutende Fe-S-Proteine z.B. der Photosynthese deutlich.

Der Regulation der Eisenhomöostase kommt auch in Bakterien eine große intrazelluläre Rolle zu, da eine erhöhte Menge an freiem Fe^{2+} in einem aerob lebenden Organismus vermieden werden muss. Durch freies Fe^{2+} und H_2O_2 des aeroben Metabolismus entstehen toxische, zellschädigende Radikale durch die benannte Fenton Reaktion (Pantopoulos and Hentze, 1995; Hentze and Kuhn, 1996). Die Kontrolle der intrazellulären Eisenkonzentration und die Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase sind daher von zentraler Bedeutung und werden meist durch Aconitasen bzw IRPs reguliert.

Neben strukturellen Unterschieden der AcnA- und AcnB-Proteine zeichnen sich diese z.B. in *E. coli* auch durch eine unterschiedliche Synthese, funktionelle Spezialisierung und kinetische Eigenschaften aus (Jordan *et al.*, 1999). AcnA verfügt über eine höhere Stabilität, eine höhere Affinität zu Citrat und Isocitrat und ist in einem breiteren pH-Bereich aktiv. Während AcnB die enzymatische Hauptaconitase des TCA-Zyklus darstellt und als Stoffwechselenzym der exponentiellen Phase fungiert, ist AcnA ein stress-induziertes Enzym der stationären Phase und dient als Regulator zum Überleben des Bakteriums bei oxidativem Stress und Nährstoffmangel (Cunningham *et al.*, 1997; Tang and Guest, 1999). Da es sich bei beiden um bifunktionale Proteine handelt, kann auch AcnB aus *E. coli* bei enzymatischer Inaktivierung durch erhöhte ROS-Konzentrationen als posttranskriptioneller Regulator des Energiemetabolismus fungieren.

Das *acnA* Gen wird in *E. coli* sowohl von einem σ^{38} -abhängigen als auch von einem σ^{70} -abhängigen Promotor exprimiert (Gruer and Guest, 1994; Cunningham *et al.*, 1997). Es findet hier eine Repression der σ^{70} -abhängigen Expression durch die Transkriptionsregulatoren FNR (Fumarat-Nitrat-Reduktase-Regulator) und ArcA (Kontrollregulator der aeroben Atmung) und eine direkte oder indirekte Aktivierung durch CRP (cyclisches AMP Rezeptorprotein), Fur (Eisenaufnahmeregulator), FruR (Regulator der Gluconeogenese), SoxRS (Superoxid-Stress-Regulator) und auch durch Eisen statt. Der σ^{38} ist ein alternativer Sigmafaktor, welcher zur Aktivierung von Genen unter Stressbedingungen fungiert und eine Bedeutung für das Überleben in der stationären Wachstumsphase hat (Hengge-Aronis, 1996). Die Expression von *acnB* erfolgt σ^{70} -abhängig durch Repression von ArcA und FruR und Aktivierung durch CRP.

1.5 Eigenschaften der Aconitase-Proteine von *Xcv*

Da die AS-Sequenzen der Aconitasen unter den verschiedenen Organismen hoch konserviert sind, wird angenommen, dass auch die Bedingungen, welche zu einer reduzierten Aconitaseaktivität führen in den jeweiligen Organismen sehr ähnlich sind (Prodromou *et al.*, 1992; Gruer *et al.*, 1997). Die Anwesenheit von oxidativem Stress und eine Limitierung von Eisen, denen Pathogene oft gegenüberstehen, scheinen generell mit einer Reduktion der Aconitaseaktivität assoziiert zu sein, was oft zur Regulation von Virulenzfaktoren durch Apo-Acns führt. Es hat den Anschein als ob stimulierende Effekte einiger AS und TCA-Intermediate auf die Virulenzfaktorsynthese durch Apo-Acns weit mehr verbreitet sind als bisher angenommen (Somerville *et al.*, 1999).

Bei *Xcc* ist eine Abhängigkeit der Eisenhomöostase von der Hauptaconitase RpfA bekannt (Wilson *et al.*, 1998). Die AS-Sequenz von RpfA aus *Xcc* weist eine 95%ige Identität zu AcnA aus *Xcv* auf. Eine *rpfA* Mutante hat Einfluss auf die Transkription und Aktivität einiger extrazellulärer Enzyme wie eine Serinprotease und eine Endogluconase und zeichnet sich durch reduzierte Synthese von EPS aus. Dies deutet auf eine bifunktionelle Rolle der Aconitasen in *Xanthomonas* spp. hin. Da eine Limitierung von Eisen, die Anwesenheit von oxidativem Stress und Stickstoffmonoxid gezeigte Stressfaktoren der pflanzlichen Abwehr sind (Delledonne *et al.*, 1998; Jittawuttipoka *et al.*, 2010), könnten auch die Aconitasen als Sensor derartiger Bedingungen während der Infektion durch *Xcv* eine Rolle spielen. Die Aconitase RpfA aus *Xcc* wird von einem Gen kodiert, welches dem *rpf* Gencluster (*rpfA-G*) angehört, das eine Assoziation zur Synthese von Pathogenitätsfaktoren dieses Bakteriums aufweist (Tang *et al.*, 1991; Barber *et al.*, 1997).

Interessanterweise befindet sich das *acn*- Gencluster aus *Xcv* in enger Nachbarschaft zu einem *rpf*-Cluster (*rpfGHCFB*) (Thieme *et al.*, 2005). In einigen *Xanthomonas* spp., wie *Xoo* und *Xcc* ist das Produkt des *rpfF* Gens, welches für die Bildung eines diffusionsfähigen Signalmoleküls (*diffusible signal factor*, DSF) nötig ist, verbunden mit der Eisenhomöostase. In einer *rpfF* Mutante von *Xoo* liegt eine erhöhte Sekretion von Siderophoren vor und eine erhöhte Sensibilität gegenüber Eisenmangel (Chatterjee and Sonti, 2002). Bei erhöhter bakterieller Zelldichte kommt es zu Akkumulation der DSF und zur Regulation der Genexpression (Miller and Bassler, 2001). Dies wird als *Quorum Sensing* bezeichnet und dient zur Erfassung der äußeren Bedingungen und dem Informationsaustausch zwischen den Zellen. Die Synthese von DSF wird in *Xanthomonas* spp. neben der putativen Enoyl-CoA-Hydratase RpfF auch durch die Fettsäure-Acyl-CoA-Ligase RpfB gesteuert, deren Gene Bestandteil des *rpf*-Genclusters sind, das einen Pathogenitätsfaktor darstellt (Tang *et al.*, 1991). DSF wird vermutlich von einem Zweikomponenten-Signaltransduktionssystem wahrgenommen, welches aus der Sensorkinase RpfC und dem Responseregulator RpfG besteht und spielt eine Rolle bei der Produktion von Virulenzfaktoren wie z.B. der Bildung eines Biofilms (Slater *et al.*, 2000; Dow *et al.*, 2003; Ryan *et al.*, 2007).

Anhand von Vergleichen der AS-Sequenzen besteht eine 56%ige Identität von AcnA_{Xcv} zu AcnA_{E. coli}. Während AcnB_{Xcv} eine Identität von 72 % zu AcnB_{E. coli} aufweist, besitzen AcnA_{Xcv} und AcnA2_{Xcv} eine 43%ige Identität zueinander. Die Abb. 42 (Anhang) zeigt das AS-Alignment der AcnB-Proteine aus *E. coli*, *Xcv*, *Xoo* und *Xcc*. Es ist bei jedem dieser AcnB-Proteine ein sehr ähnlicher Aufbau aus fünf Domänen zu erkennen, sowie konservierte Cysteine und AS des aktiven Zentrums. Aufgrund der Zusammensetzung der AS ist die vorhergesagte Größe von AcnB_{Xcv} ca. 92,8 kDa, von AcnA2_{Xcv} ca. 92 kDa und von AcnA_{Xcv} ca. 99 kDa.

1.6 Ein FNR-ähnliches Protein (FLP) aktiviert die Expression des Gens der Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase in *Xcv*

Im Genom von *Xcv* 85-10 befindet sich ein Gen (XCV1871), dessen Produkt ein putatives Mitglied der CRP/FNR Familie von Transkriptionsregulatoren darstellt und Ähnlichkeiten zu FNR aus *E. coli* aufweist (FNR_{E. coli}) (Thieme *et al.*, 2005; Heinz, 2011). FNR-Proteine gehören als Mitglieder der CRP (cAMP-Rezeptorprotein)-FNR (Fumarat-Nitrat-Reduktase-Regulator)-Superfamilie zu den bedeutendsten, globalen Transkriptionsfaktoren vieler Mikroorganismen (Körner *et al.*, 2003). Erste Indizien für die Funktion des Genproduktes von XCV1871 konnten durch Komplementationsstudien mit einer *E. coli fnr* Mutante und plasmidkodierten XCV1871 erzielt werden. Das Genprodukt von XCV1871 konnte hierbei partiell die Funktion des Transkriptionsregulators FNR_{E. coli} in einer *fnr* Mutante ersetzen (Heinz, 2011). Das Genprodukt von XCV1871 wurde anschließend als FNR-ähnliches Protein deklariert und als FLP bezeichnet, da *Xcv* weder eine Nitrat-Atmung noch eine Fumarat-Atmung durchführen kann. Durch Analysen einer *flp* Deletionsmutante von *Xcv* konnte FLP als Aktivator der Transkription von *cydA* identifiziert werden (Heinz, 2011; Hoppe, 2011). Das Gen *cydA* kodiert für eine putative Untereinheit der terminalen hochaffinen Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase. Die Genexpression von *cydA* scheint vor allem bei O₂-reduzierten Bedingungen induziert zu sein, da unter diesen Bedingungen eine höhere Transkription als bei einer Anzucht mit optimaler O₂-Versorgung vorlag. Obwohl eine *flp* Mutante kein verändertes Wachstum *in planta* und *in vitro* zeigte und auch keine veränderte Ausbildung einer HR oder Krankheitssymptome bei Paprikapflanzen, ist trotzdem anzunehmen, dass FLP durch die Regulation von *cydA* eine Rolle während des Wachstums von *Xcv* einnimmt.

1.7 Die CRP/ FNR-Superfamilie von Transkriptionsregulatoren

Dies CRP/FNR-Superfamilie beinhaltet Proteine, welche direkt oder indirekt auf ein breites Spektrum an intrazellulären oder externen Signalen (cAMP, O₂-oder Redoxstatus, oxidativer oder nitrosativer Stress, Kohlenmonoxid, 2-Oxoglutarat oder Temperatur) reagieren (Körner *et al.*, 2003). Alle Mitglieder dieser Familie sind vorraussichtlich strukturell verwandte Proteine des CRP. Diese bestehen aus vier funktionell verschiedenen Domänen: einer Sensordomäne, einer Reihe von β -Faltblattstrukturen, welche eine *loop*-ähnliche Struktur zur Kontaktbildung mit der RNA-Polymerase bilden, eine lange α -Helix als Dimerisierungsfläche und ein C-terminales *helix-turn-helix*-Motiv zur DNA-Bindung.

Das CRP Protein reguliert die Gentranskription vieler physiologisch bedeutender Prozesse, die den Metabolismus vom Zuckerstoffwechsel, Toxin-Produktion, Aminosäurestoffwechsel, Pilus-Synthese und Proteinfaltung umfassen. Es ist bekannt, dass CRP in *E. coli* die Transkription von mehr als 200 Genen beeinflusst (Zheng *et al.*, 2004; Shimada *et al.*, 2011). CRP bindet hierbei, in Anwesenheit des allosterischen Effektors cAMP, an spezifische DNA-Konsensussequenzen (TGTGA-N6-TCACA) von zu regulierenden Genen und verbessert die Bindungsfähigkeit der RNA-Polymerase (RNAP) an die DNA, sowie die Transkriptionsinitiation. Während die Struktur des Transkriptionsregulators CRP bereits bekannt ist (Weber and Steitz, 1987), konnte die Kristallstruktur von FNR bisher noch nicht aufgeklärt werden. Im Gegensatz zu CRP besitzt FNR vier konservierte Cysteine in der N-terminalen Domäne, die die Bindung eines [4Fe-4S]²⁺-Clusters als Kofaktor koordinieren (Spiro and Guest, 1990; Tolla and Savageau, 2010). Aufgrund dessen sensiert FNR die Veränderungen des zellulären O₂-Gehalts in *E. coli* und anderen Bakterien, während CRP im Gegensatz auf endogenes cAMP als Aktivierungssignal bei Glukosemangel reagiert. Die erforderlichen AS zur Bindung von cAMP sind in FNR nicht konserviert (Shaw *et al.*, 1983; Fischer, 1994).

1.8 Eigenschaften und Funktionen des FNR Proteins aus *E. coli*

In vielen fakultativ aerob lebenden Mikroorganismen, wie beispielsweise *E. coli* ist molekularer O₂ der bevorzugte Elektronenakzeptor, der die Expression aller Gene verhindert, die für Proteine der anaeroben Atmung und Fermentation kodieren (Tolla and Savageau, 2010). In der Abwesenheit von O₂ wird meist Nitrat als Elektronenakzeptor präferiert. FNR liegt in *E. coli* unter anaeroben Bedingungen als aktives Homodimer vor, welches ein durch vier Cysteine gebundenes [4Fe-4S]²⁺-Cluster je Monomer enthält. Aufgrund des O₂-labilen [4Fe-4S]-Cluster ist FNR in der Lage Veränderungen an zellulären O₂, ROS oder auch eine Limitierung von Eisen wahrzunehmen (Kim *et al.*, 1999). Unter anhaltender Abwesenheit von Sauerstoff und ROS (Wu *et al.*, 2000) kann das aktive FNR-Protein die Transkription von hunderten Genen regulieren und so den Stoffwechsel an die

anaeroben Bedingungen anpassen (Salmon *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2005). Hierbei werden u.a. Gene der anaeroben Atmung (*narGHJI*, *nirBCD*, *frdABC*) und des Gärungsstoffwechsels (*focA-pflB*, *fdnGHI*, *adhE*) induziert (Jones and Gunsalus, 1985; Sawers and Bock, 1988; Sawers and Bock, 1989; Spiro and Guest, 1990; Kessler *et al.*, 1991; Tyson *et al.*, 1994). Desweiteren agiert FNR als Repressor der Expression von Genen der Cytochrom-*d*-und *o*-Ubiquinol-Oxidase der aeroben Atmung (Tseng *et al.*, 1996; Constantinidou *et al.*, 2006). FNR wird in *E. coli* unter anaeroben Bedingungen negativ autoregulierte (Spiro and Guest, 1987). Durch die $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster des FNR-Proteins wird die zelluläre Sauerstoffkonzentration bis in den mikromolaren Bereich sensiert (Unden *et al.*, 2002). Bei der Anwesenheit von O_2 zerfallen die $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster sowie das Homodimer in 2 inaktive Monomere (Crack *et al.*, 2008) (Abb. 6).

Hierbei führt der Kontakt von O_2 mit dem $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster zur Übertragung eines Elektrons auf das Cluster zur Bildung eines $[3\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Intermediates, welches anschließend spontan zur inaktiven $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Form pro Monomer zerfällt. Unter anhaltenden aeroben Bedingungen bildet sich daraus die Apo-FNR-Form mit reduzierten Schwefelresten (Thiolen), das eine *in vivo* Halbwertszeit von ca. 45 min aufweist ($t_{1/2} \approx 45 \text{ min}$).

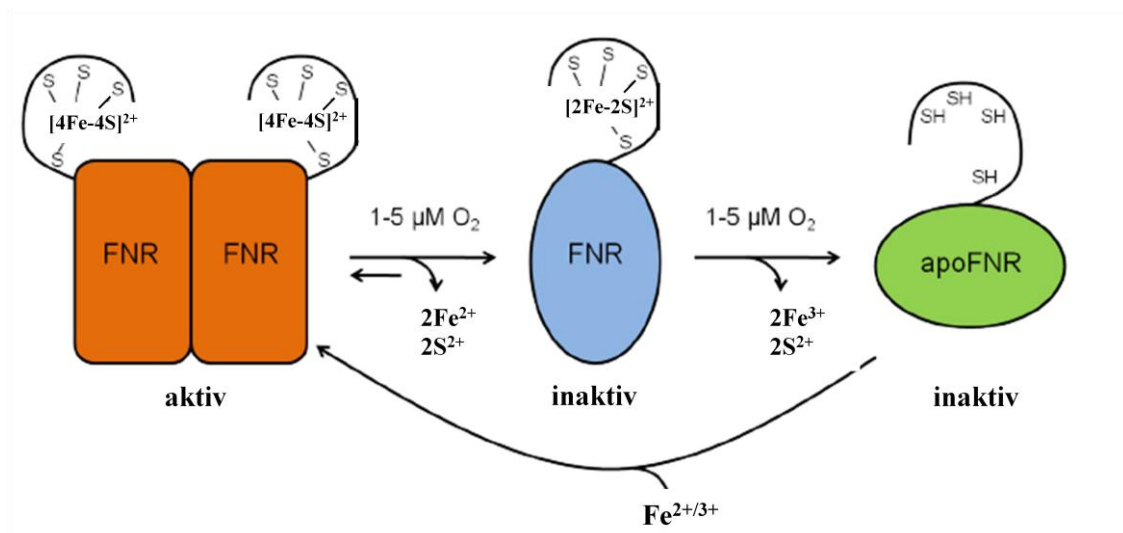


Abb. 6: Schema des FNR-Zyklus in *E. coli*

Das Schema zeigt die verschiedenen, in *E. coli* identifizierten Formen des FNR Proteins bei der Anwesenheit von Sauerstoff. Hierbei kommt es zur reversiblen Umwandlung des aktiven FNR-Homodimers mit $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Clustern in FNR-Monomere mit $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Clustern. Bei anhaltenden aeroben Bedingungen wird das FNR-Monomer zum Apo-FNR mit freien Thiolen konvertiert. (nach http://www.biospektrum.de/blatt/d_bs_pdf&_id=932337; Uni Mainz, AG Gottfried Unden).

FNR bleibt unter aeroben Bedingungen als Transkriptionsregulator weitestgehend inaktiv, da nur das FNR-Homodimer in der Lage ist, an spezifische DNA-Sequenzen zu binden. Beginnt die Sauerstoffkonzentration abzusinken, kommt es zu einer Erhöhung der Halbwertszeit des stabilen FNR-

Homodimers, welches daraufhin die Expression von Genen durch DNA-Bindung aktivieren oder reprimieren kann.

1.9 Strukturelle Domänen des FLP-Proteins aus *Xcv*

Aufgrund der AS-Sequenz besitzt das FLP-Protein aus *Xcv* (FLP_{Xcv}) eine theoretische Molekularmasse von ca. 27,4 kDa. Obwohl FLP lediglich eine Identität von 31% zum FNR-Protein aus *E. coli* (FNR_{E. coli}) aufweist, sind jedoch wichtige Cysteine der N-terminalen Domäne zur Bindung eines [4Fe-4S]-Clusters konserviert, was für die Funktion eines FNR-ähnlichen Proteins spricht. Die Abb. 7 zeigt ein partielles AS-alignment von FNR_{E. coli} und FLP_{Xcv}. Die Koordinierung des [4Fe-4S]-Clusters in FNR_{E. coli} erfolgt über die Cysteine C20, C23 und C29 und das zentrale C122 der Sensordomäne (Spiro and Guest, 1988; Crack *et al.*, 2008). Bei FLP_{Xcv} sind drei Cysteine konserviert, wobei sich zwei in der N-terminalen Domäne an Position C28 und C31 befinden, während das dritte zentral an Position C129 lokalisiert ist. Wie im Fall von FNR_{E. coli} befindet sich auch bei FLP_{Xcv} ein drittes Cystein in der N-terminalen Domäne, hier an Position C39, welches sich aber in einem größeren Abstand zu dem benachbarten Cystein befindet. Diese konservierten Cysteine sprechen für die Koordinierung eines [4Fe-4S]-Clusters im FLP-Protein aus *Xcv* (Heinz, 2011). Neben den konservierten Cysteinen ist auch eine sehr ähnliche DNA-Bindedomäne (rot markiert) des FNR in dem FLP Protein zu finden.

Diese C-terminale DNA-Bindedomäne besitzt ein *helix-turn-helix* (HTH)-Motiv, wodurch das Protein in der Lage ist spezifisch an die DNA binden zu können. Das HTH-Motiv in FNR_{E. coli} bindet an eine palindromische Sequenz (TTGAT-(N)₄-ATCAA) stromaufwärts von FNR-regulierten Genen, die auch als FNR-Box bezeichnet wird (Spiro, 1994; Körner *et al.*, 2003). Die Wechselwirkung zwischen dem FNR-Regulator und der DNA wird in *E. coli* über die essentielle Aminosäuresequenz ExxSR (E209, S212, R213) im HTH Motiv gewährleistet (Ebright *et al.*, 1987; Guest, 1996).

Auch in der AS-Sequenz von FLP lassen sich diese konservierten AS (E214, S217, R218) der DNA-Bindedomäne erkennen, die vermutlich ebenso für die Bindung von FLP an die DNA essentiell sind. Durch Untersuchung des Genoms von *Xcv* 85-10 nach der palindromischen Sequenz TTGAT-N₄-ATCAA, an die FNR_{E. coli} zur Genregulation bindet, konnte eine 100 % identische Sequenz stromaufwärts des Gens *cydA* identifiziert werden (Heinz, 2011). Dieses Gen kodiert für die Untereinheit I der Cytochrom-*d*-Ubiquinol Oxidase.

FLP _{Xcv}	21	SGTPNSD	CALCAVRGRAIC	CAALSAQEMD	ALDQVTH-AAAYAPGSTLV	RAGEPRHN	VYTVT	
		SG	C C++ I L+ E+D LD +		G TL +AG+ ++Y +			
FNR _{E. coli}	13	SGGCAIH	QDCSISQLC	IPFTLNEHELD	QLDNI	IERKKPIQKGQTL	FAGDELKSL	YAIR
FLP _{Xcv}	80	SGALRMV	RTLADGRRQIT	GFVLP	PGDYVGL--TETAQ	HRHDIEAIV	DSRV	CRT
		SG ++	G QITGF L GD VG		+ H +A+ S VC P + L			
FNR _{E. coli}	73	SGTIKSY	TITEQGDEQIT	GFHLAGDL	VGFDAIGSGH	HPSFAQALET	SMVCE	IPFETLDDL
FLP _{Xcv}	138	RERYPQ	LERKLLQ	RASMELAAAQ	DTGLLLARLQ	PSERLAHF	LLRLAAR	STQPGASGDTVA
		+ P L +++++ S E+	QD LLL++	ERLA F+ L+ R Q G S				
FNR _{E. coli}	133	SGKMPN	LQQMMRL	MSGEIKGDQ	DMILLSSK	NAEERLAA	FIYNLSRR	FAQRGFS
FLP _{Xcv}	198	LPM	RGDIADH	LGLTVETV	SRTFTK	L	RQQQLIV	LPQLQLVQILDY
		L M+RGDI ++LGLTVET+SR						
FNR _{E. coli}	193	LTMT	RGDIGNYL	LGLTVETI	SRL	LGRFQKSG	MLAVKG-KYITI	ENNDALAGHT

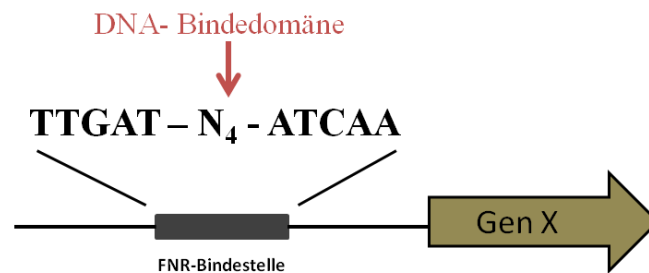


Abb. 7: Partielles alignment der Aminosäuresequenzen von FNR_{E. coli} und FLP_{Xcv}.

Gezeigt ist ein Ausschnitt des alignments der Aminosäuresequenzen von FNR_{E. coli} und FLP_{Xcv}. Die Cysteine C20, C23 und C122 der N-terminalen Domäne zur Bindung des [4Fe-4S]-Clusters sind in FLP konserviert (gelb und grün markiert). Hohe Ähnlichkeiten sind auch bei der rot markierten DNA-Bindedomäne des FNR Proteins zu finden. Die C-terminale DNA-Bindedomäne besitzt ein *helix-turn-helix* (HTH)-Motiv, das eine spezifische DNA-Bindung ermöglicht. Das HTH-Motiv in FNR_{E. coli} bindet an eine palindromische Sequenz (TTGAT-(N)₄-ATCAA) stromaufwärts von FNR-regulierten Genen, die auch als FNR-Box bzw. FNR-Bindestelle bezeichnet wird. Die zur Bindung essentiellen Aminosäuren ExxSR der DNA-Bindedomäne sind in FLP_{Xcv} konserviert. (Spiro and Guest, 1988; Guest, 1996; Heinz, 2011).

Die Abb. 8 zeigt schematisch die Organisation der Gene der Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase in *Xcv* und die stromaufwärts befindliche FLP-Bindestelle.

Stromabwärts des *cydA* Gens befindet sich neben dem *cydB* Gen, welches auch für eine putative Untereinheit der Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase kodiert, das Gen *cydX*.

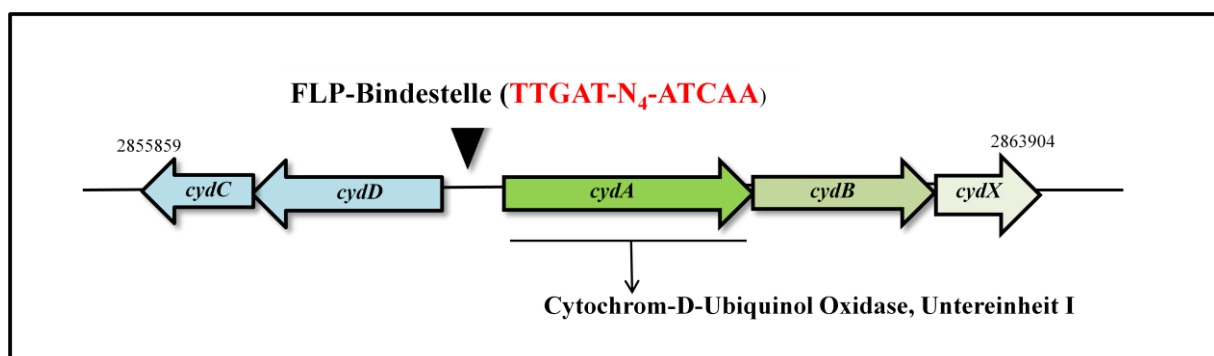


Abb. 8: Schematische Darstellung der FNR-ähnlichen Bindestelle stromaufwärts des *cydA* Gens in *Xcv* 85-10.

Die Abbildung zeigt die schematische Organisation der Gene *cydC*, *cydD*, *cydA*, *cydB* und *cydX* in *Xcv* 85-10. Die Gene *cydABX* kodieren hierbei für die Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase. Eingezeichnet ist die identifizierte FLP-Bindestelle, welche eine 100%ige Identität zur FNR-Bindestelle (TTGAT-N₄-ATCAA) vor FNR-regulierten Genen in *E. coli* aufweist. (Hoppe, 2013)

Während *cydX* für ein putatives Membranprotein kodiert, sind die Genprodukte von *cydC* und *cydD* vorhergesagte ABC-Transporter-Permeasen bzw. ATP-bindende Proteine (Thieme *et al.*, 2005).

Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidasen (*cyd*) zeichnen sich generell durch eine hohe Affinität für Sauerstoff aus (Wu *et al.*, 2000; Mason *et al.*, 2009). Da sich obligat und fakultativ aerob lebende Mikroorganismen meist durch den Besitz mehrerer terminaler Oxidasen zur Reduktion von O₂ als Elektronenakzeptor auszeichnen, um eine energetisch effiziente Anpassung an schwankende O₂-Bedingungen zu erzielen (Poole and Cook, 2000), wird vermutet, dass *Xcv* die Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase nutzt, um sich optimal an die niedrige Sauerstoffkonzentration im Apoplasten der Wirtspflanzen während der Dunkelphase bzw. bei der Etablierung des Wachstums anzupassen.

Im Genom von *Xcv* befinden sich neben Genen einer putative Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase (*cyd*) auch Gene einer Cytochrom-*o*-Ubiquinol-Oxidase (*cyo*) (Thieme *et al.*, 2005). Obwohl *Xcv* als ein oxidase-negatives Bakterium deklariert ist, sind auch Gene einer Cytochrom-*c*-Oxidase (*cta*) vorhanden (Anraku, 1988; Thieme *et al.*, 2005). Es wird postuliert, dass es sich bei dieser Cytochrom-*c*-Oxidase, aufgrund der Häm-Gruppen, um eine Cytochrom-*aa*₃-Oxidase handelt und diese prädominant bei hohen O₂-Konzentrationen ist (Hoppe, 2013).

Die terminalen Oxidasen verschiedener Mikroorganismen werden der Superfamilie der Häm-Kupfer-Oxidasen zugeordnet und innerhalb dieser in Chinol- und Cytochrom-Oxidasen unterschieden (Garcia-Horsman *et al.*, 1994). Während Chinol-Oxidasen das lipidlösliche Ubiquinol oxidieren, erlangen Cytochrom-Oxidasen die Elektronen von Cytochrom *c* (Poole, 1983). Die Cytochrom-*o*-Oxidase (*cyo*) als auch die Cytochrom-*d*-Oxidase (*cyd*) sind Chinol-Oxidasen, während die Cytochrom-*c*-Oxidasen (*cta*) zur Gruppe der Cytochrom-Oxidasen zugeordnet werden.

In *E. coli* sind mittlerweile drei membranständige Chinol-Oxidasen bekannt, durch die die zelluläre Atmung mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor gewährleistet wird (Anraku, 1988; Bekker, 2009). Diese unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Hämgruppen sowie im Vorhandensein von Kupfer-Ionen (Salerno *et al.*, 1989). Es handelt sich bei den Oxidasen um die Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase (*cydAB*; auch Cytochrom *bd-I* genannt) mit einer hohen Affinität ($K_m = 0,27 \mu\text{M}$) zu Sauerstoff und um die Cytochrom-*o*-Ubiquinol-Oxidase (*cyoABCDE*; auch Cytochrom *bo* genannt), welche eine geringere Affinität ($K_m = 6,05 \mu\text{M}$) zu Sauerstoff besitzt (Mason *et al.*, 2009). Bei Kohlenstoff- und Phosphatmangel kommt es zur Induktion der dritten respiratorischen O₂-Reduktase, die Cytochrom *bd-II*, welche von den Genen *appBC* kodiert wird (Dassa *et al.*, 1991; Atlung and Brondsted, 1994). Es wird vermutet, dass AppBC die Akkumulation von Elektronen im Quinon-Pool durch elektroneutrale Oxidation von Ubiquinol während respiratorischen Stresses verringert (Shepherd *et al.*, 2010).

1.10 Mitglieder der CRP/FNR-Superfamilie in *Xanthomonas* spp.

Wie im Fall von *E. coli* konnte bislang auch in anderen Organismen nur eine Reprimierung der Expression der *cydAB* Gene durch FNR-Proteine identifiziert werden. In dem fakultativ anaeroben Bakterium *B. subtilis* wird die Transkription von *cydABCD* unter anaeroben Bedingung ebenfalls von FNR reprimiert (Reents *et al.*, 2006). Weiterhin reprimiert ein FNR-Homolog namens CydR im obligat aeroben Bakterium *Azotobacter vinelandii* die Synthese der Cytochrom-*d*-Oxidase (*cydAB*), welche bei der aerotoleranten Stickstofffixierung dieses Organismus benötigt wird (Wu *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2000). Das CydR Protein ist empfindlich gegenüber ROS und NO und wird hierbei durch deren Anwesenheit inaktiviert. Die Cytochrom-*d*-Oxidase von *A. vinelandii* bietet respiratorischen Schutz für die sauerstoffempfindliche Nitrogenase (Poole and Hill, 1997). Ein Beispiel einer Aktivierung der Genexpression von *cydAB* durch ein FNR-ähnliches Protein, wie in *Xcv* gezeigt wurde, ist bisher nicht bekannt.

In *Xcc* konnte ein Gen identifiziert werden, dass einen Transkriptionsregulator, der CRP-FNR-Familie kodiert, dessen Funktion sich abhängig von zyklischem di-Guanosin-Monophosphat (cdGMP) zeigt (Lu *et al.*, 2012). Dieses Protein wurde aufgrund seiner Funktion als CLP (CRP-like protein) benannt und stellt sowohl einen Aktivator, sowie auch einen Repressor der Transkription von verschiedenen Genen dar, deren Produkte Einfluss auf die Biofilmbildung besitzen.

Beim Blast der AS-Sequenz des FLP Protein aus *Xcv* zeigt sich eine weite Verbreitung und hohe Identitäten von Homologen in *Xanthomonas* spp. Ein Transkriptionsregulator der CRP/FNR-Familie aus *X. axonopodis* pv. *citrumelo* F1 weist eine 99%ige ID, aus *X. fuscans* subsp. *fuscans* eine 97%ige ID und aus *X. axonopodis* pv. *citri* eine Identität von 96 % zum FLP Protein aus *Xcv* auf. Die Funktionen bzw. die regulierten Gene und die Rolle der Genprodukte während des aeroben Metabolismus dieser Spezies sind unbekannt.

1.11 Zielstellung

Aufgrund der aufgeführten bisherigen Erkenntnisse und der Bedeutung von Aconitase-Proteinen bei vielen wichtigen zellulären Prozessen galt es als Ziel dieser Arbeit die Rolle der Aconitase-Proteine AcnB, AcnA und AcnA2 von *Xcv* zu identifizieren. Hierfür wurden die folgenden Analysen durchgeführt.

- Die Untersuchung von Einzel- und Doppel-*acn*-Deletionsmutanten sollten hinsichtlich ihres Wachstums *in vitro* und *in planta* und der Fähigkeit der Ausbildung einer HR in resistenten und Krankheitssymptomen in suszeptiblen Paprikapflanzen durchgeführt werden.
- Die Analyse der Auswirkung einer *roaX-roaY* Deletion in *Xcv* auf die Synthese des AcnB- und AcnA-Proteins sollte untersucht werden.
- Es werden die Folgen der Deletionen der *acn* Gene hinsichtlich der Sensitivität von *Xcv* gegenüber ROS und des Wachstums mit Citrat als einziger C-Quelle analysiert.
- Es wird die Identifizierung von FLP- und Acn-regulierten Genen durch Transkriptomvergleiche des Wildtyp 85-10 und Deletionsmutanten, sowie quantitative Transkriptionsvergleiche der Kandidatengene mittels qRT-PCR vorgenommen.
- Schließlich soll der Nachweis der AcnA- und AcnB Proteine in *Xcv*-Wildtyp und -Deletionsmutanten mit Antikörpern gegen AcnA und AcnB aus *E. coli* durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Nährmedien und Medienzusätze

NYG-Medium (Daniels *et al.*, 1984)

Die Anzucht der aufgeführten *X. campestris* pv. *vesicatoria* Stämme erfolgte in der Regel in Nutrient-Yeast-Glycerol-Medium (NYG, (Daniels *et al.*, 1984)).

Zusammensetzung:

Pepton (aus Casein)	5 g
Hefeextrakt	3 g
Glycerin (v/v)	20 ml
H ₂ O bidest	ad 1000 ml

Zur Herstellung von NYG-Agar wurden dem Flüssigmedium 1 bzw. 1,5 % Agar-Agar (Merck, Darmstadt) zugegeben. Alle Medien wurden vor Benutzung 20 min bei 121°C autoklaviert. In Tab. 1 sind die Zusätze u.a. für NYG-Medium aufgeführt.

MA-Medium (Minimalmedium A; (Ausubel, 1995))

Neben NYG-Medium wurde zur Anzucht von *Xcv* auch 1 x MA-Medium eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein Minimalmedium, welches ein Minimum der Nährstoffe enthält, die für das Wachstum nötig sind. Es wurde vor allem zur phänotypischen Analyse, sowie zur nachfolgenden RNA-Isolierung von erstellten Mutanten verwendet.

Zusammensetzung:

10x MA

0,6 M K ₂ HPO ₄
0,33 M KH ₂ PO ₄
0,076 M (NH ₄) ₂ SO ₄
0,017 M Natriumcitrat-Dihydrat
ad 1000 ml

1x MA

10 mM Saccharose
0,3 % Casaminoacids
1 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
100 ml 10 x MA
ad 1000 ml

MA-Citrat

Neben 1 x MA-Medium wurde auch modifiziertes MA-Medium eingesetzt, welches weder Saccharose noch Casaminoacids enthält. Als Kohlenstoffquelle wurde dagegen Na-Citrat zugegeben.

Zusammensetzung

1 mM MgSO_4
15 mM Na-Citrat
100 ml 10 x MA
ad 1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

MA-Saccharose

Neben dem MA-Citrat-Medium wurde auch ein anderes modifiziertes MA-Medium eingesetzt, welches ebenfalls keine Casaminoacids enthält. Als Kohlenstoffquelle wurde dagegen Saccharose zugegeben.

Zusammensetzung

1 mM MgSO_4
15 mM Saccharose
100 ml 10 x MA
ad 1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Zusätze für NYG - und MA-Medien

Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Rifampicin	100 mg/ml in 100 % DMSO	100 µg/µl
Tetracyclin	5 mg/ml in 70 % EtOH bei <i>Xcv</i> 12,5 mg/ml in 70 % EtOH bei <i>E. coli</i>	5 µg/µl 12,5 µg/µl
Spectinomycin	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	100 µg/µl
Cycloheximid	50 mg/ml in 96 % EtOH	50 µg/µl
Saccharose	20 %	5 %
Milchpulver		1 %

Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert. Die Saccharosestammlösung wurde bei RT aufbewahrt.

LB-Medium (Sambrook, 1989)

Alle verwendeten *E. coli* Stämme wurden in Lysogeny-Broth-Medium (LB (Sambrook, 1989) kultiviert. Die Inkubation von Flüssigkulturen erfolgte in der Regel über Nacht bei 37 °C.

Zusammensetzung:

Pepton (aus Casein)	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

Zur Herstellung von LB-Agar wurde dem Medium 1,5 % Agar-Agar, Kobi I (Roth, Karlsruhe) zu gegeben. Alle Medien wurden vor Verwendung 20 min bei 121°C autoklaviert. Die jeweiligen Medienzusätze sind in Tab. 2 aufgeführt und wurden den abgekühlten Fest- und Flüssigmedien zugegeben. Die Stammlösungen der Medienzusätze wurden bei -20°C aufbewahrt.

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Zusätze für LB-Medium

Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	125 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	125 µg/ml
5-Brom-4-chlor-3-Indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)	80 mg/ml in DMF	80 µg/ml
Isopropyl- β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	0,5 M in H ₂ O _{bidest}	0,5 mM
Gentamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	50 µg/ml
Spectinomycin	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	100 µg/ml
Tetracyclin	12,5 mg/ml in 70 % EtOH	12,5 mg/ml in 70 % EtOH

2.2 Organismen und Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Organismen, sowie deren Referenz und Charakteristika sind in Tab. 3 und Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 3: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstämme	Resistenz	Genotyp/Phänotyp	Referenz/Herkunft
Xcv Stämme			
85-10	Rif ^R	Paprika-Tomatenrasse 2, Gruppe A; Wildtyp (WT)	Bonas <i>et al.</i> , 1989
85*Δ <i>hrcN</i>	Rif ^R	Derivat von 85*; Deletion der Codons 13- 432 von <i>hrcN</i>	Lorenz C. und Büttner D.; 2009
85-10Δ <i>acnB</i>	Rif ^R	85-10 Derivat; Deletion von <i>acnB</i>	Kirchberg <i>et al.</i> ; 2012
85-10Δ <i>acnA</i>	Rif ^R	85-10 Derivat; Deletion von <i>acnA</i>	Kirchberg <i>et al.</i> ; 2012
85-10Δ <i>acnA2</i>	Rif ^R	85-10 Derivat; Deletion von <i>acnA2</i>	Kirchberg <i>et al.</i> ; 2012
85-10Δ <i>acnA2-acnA</i>	Rif ^R	85-10 Derivat; Deletion von <i>acnA2</i> ; <i>acnA</i>	diese Arbeit
85-10Δ <i>acnA2-acnB</i>	Rif ^R	85-10 Derivat; Deletion von <i>acnA2</i> , <i>acnB</i>	diese Arbeit
85-10Δ <i>hrpG</i>	Rif ^R	85-10 Derivat, Deletion von <i>hrpG</i>	Wengelnik <i>et al.</i> , 1999
85-10Δ <i>hrpX</i>	Rif ^R	85-10 Derivat, Deletion von <i>hrpX</i>	Noël <i>et al.</i> , 2001
85-10Δ <i>roaX-roaY</i>	Rif ^R	85-10 Derivat; Deletion von <i>roaX</i> , <i>roaY</i>	Kirchberg <i>et al.</i> ; 2012
85-10 Δ <i>roaX-roaY-acnB</i>	Rif ^R	85-10 Derivat; Deletion von <i>roaX</i> , <i>roaY</i> , <i>acnB</i>	Kirchberg <i>et al.</i> ; 2012
85-10Δ <i>flp</i>	Rif ^R	85-10 Derivat; Deletion von <i>flp</i> (XCV1871)	diese Arbeit
85-10Δ <i>acnB</i> /pL6 <i>acnB</i>	Rif ^R ; Tet ^R	85-10Δ <i>acnB</i> + pLAFR6 mit <i>acnB</i> aus Xcv	diese Arbeit
85-10Δ <i>roaX-roaY</i> /pL6 <i>roaX</i>	Rif ^R ; Tet ^R	85-10Δ <i>roaX-roaY</i> + pLAFR6 mit <i>roaX</i> aus Xcv	Wesolowska, 2012
85-10Δ <i>roaX-roaY</i> /pL6 <i>roaY</i>	Rif ^R ; Tet ^R	85-10Δ <i>roaX-roaY</i> + pLAFR6 mit <i>roaY</i> aus Xcv	Wesolowska, 2012
85-10Δ <i>acnA2</i> /pL6 <i>acnA2</i>	Rif ^R ; Tet ^R	85-10Δ <i>acnA2</i> + pLAFR6 mit <i>acnA2</i> aus Xcv	diese Arbeit
E.coli Stämme			
W3110	-	prototroph	Laborkollektion
DH5αpir	-	F ⁻ <i>recA</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) Φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i>	Ménard <i>et al.</i> , 1993
XL 1 blue	Tet ^R	<i>recA1</i> , <i>endA</i> , <i>gyrA9,6</i> <i>thi1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE4</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F ⁻ <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q Z Δ <i>M15</i> Tn10]	Stratagene
MM294 (pRK2013)	Kan ^R	F ⁻ <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (rK ⁻ mK ⁺) <i>glnV44</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> <i>RfbD1</i> <i>SpoT1</i> ; Helferstamm für die Konjugation; pRK2013 trägt <i>tra</i> -Gene für den Aufbau des Konjugationsapparates	Berlyn <i>et al.</i> , 1996

Bakterienstämme	Resistenz	Genotyp/Phänotyp	Referenz/Herkunft
<i>E. coli</i> Stämme			
Rosetta	Kan ^R	BL21-Derivat, F- <i>ompThsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm</i> pRARE	Stratagene, Amsterdam, NL

Tab. 4: Verwendete Plasmide und Vektoren

Vektor/Plasmid	Resistenz	Charakteristika	Referenz/Herkunft
pBlueskript(II)KS	Ap ^R	Phagemid, pUC Derivat	Stratagene
pOK1	Sc ^R	Suizidvektor, <i>sacB</i> , <i>sacQ</i> , <i>mobRK2</i> , <i>ori6K</i>	Huguet <i>et al.</i> , 1998
pOK:: <i>acnB</i>	Sc ^R		Kirchberg <i>et al.</i> ; 2012
pOK:: <i>acnA</i>	Sc ^R		diese Arbeit
pLAFR6	Tet ^R	RK2 <i>Replicon</i> , Mob ⁺ , Tra ⁻ , multiple cloning site flankiert durch Transkriptions-terminatoren	Bonas <i>et al.</i> , 1989
pL6 <i>acnB</i>	Tet ^R	pLAFR6 Derivat, <i>acnB</i> ⁺ aus <i>Xcv</i>	Kirchberg <i>et al.</i> , 2012
pL6 <i>acnB-roaX-roaY</i>	Tet ^R	pLAFR6 Derivat, <i>acnB-roaX-roaY</i> ⁺ aus <i>Xcv</i>	Kirchberg <i>et al.</i> , 2012
pL6 <i>flp</i>	Tet ^R	pLAFR6 Derivat, <i>flp</i> ⁺ aus <i>Xcv</i>	diese Arbeit
pL6 <i>roaX</i>	Tet ^R	pLAFR6 Derivat, <i>roaX</i> ⁺ aus <i>Xcv</i>	Wesolowska, 2012
pL6 <i>roaY</i>	Tet ^R	pLAFR6 Derivat, <i>roaY</i> ⁺ aus <i>Xcv</i>	Wesolowska, 2012
pL6 <i>acnA2</i>	Tet ^R	pLAFR6 Derivat, <i>acnA2</i> ⁺ aus <i>Xcv</i>	diese Arbeit
pBRM	Gent ^R	Klonierungsvektor; <i>bla</i> , Golden-Gate kompatibles Derivat von pBRM1, MCS-5, <i>lacPOZ</i> ⁺	Szczesny <i>et al.</i> , 2010
pBRMacnA	Gent ^R	pBRM Derivat, <i>acnA</i> ⁺ aus <i>Xcv</i>	diese Arbeit
pBRMacnA2	Gent ^R	pBRM Derivat, <i>acnA2</i> ⁺ aus <i>Xcv</i>	diese Arbeit

2.3 Pflanzenmaterial

Es wurden Paprikapflanzen (*Capsicum annuum*) der Kultivare ECW ("Early California Wonder") und ECW-10R für Infiltrationsanalysen mit *Xcv*-Stämmen verwendet. Bei dem Kultivar ECW-10R handelt es sich, durch das Vorhandensein und die Expression des Resistensgens *Bs1* (Minsavage *et al.*, 1990), um resistente Pflanzen. In diesem Fall kommt es zur Ausbildung einer hypersensitiven Reaktion (HR) nach der Erkennung des Effektorproteins AvrBs1 aus *Xcv* durch das Resistenzprotein Bs1 der Paprikapflanzen.

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus unter folgenden Standardbedingungen: 26 °C, relative Luftfeuchtigkeit von 65 % und 16 h Photoperiode.

2.4 Zellanzucht und Ernte

Kultivierung von *X. campestris* pv. *vesicatoria*

Zur Kultivierung von *X. campestris* pv. *vesicatoria* Stämmen wurde NYG-, MA-, MA-Citrat- oder MA-Saccharose-Medium unter Verwendung entsprechender Antibiotikazusätze kultiviert. Durch Verwendung einer Vorkultur wurde eine Hauptkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,1 schüttelnd bei 150-200 rpm und 30 °C inkubiert. Die Generationszeit beträgt ca. 2 h. Beim Erreichen der gewünschten OD₆₀₀ wurden die Zellen durch 10minütige Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm geerntet. Beimpfte NYG- oder MA-Agar-Platten wurden 1-2 Tage bei 30 °C inkubiert und konnten anschließend ca. 2 Tage bei Raumtemperatur gelagert werden. Xcv-Kulturen wurden für nachfolgende Experimente immer frisch von DMSO-Stammkulturen angefertigt.

Kultivierung von *X. campestris* pv. *vesicatoria* unter reduzierten O₂-Bedingungen

Zur Anzucht unter O₂-reduzierten Bedingungen erfolgte die Kultivierung der Hauptkulturen in Serumflaschen. Hierfür wurden 100 ml 1 x MA-Medium in Serumflaschen mit einem Volumen von 320 ml gefüllt. Der verbleibende Luftraum betrug demzufolge 220 ml. Um dem Medium den O₂ zu entziehen wurde es einige Minuten aufgeköcht, die Flasche anschließend verschlossen und es folgte eine N₂-Begasung bis zur Abkühlung des Mediums. Nach dem Autoklavieren der Serumflasche wurde das Gasvolumen von 220 ml in der Flasche auf 21 % Luftsauerstoff gesetzt und mit einer Spritze ein steriles Luftvolumen von 104,7 ml in den Luftraum der Serumflasche gegeben. Dies entspricht einer Konzentration von ca. 10 % O₂ im Gasraum. Hierbei handelt es sich nicht um eine genaue Angabe der O₂-Konzentration, sondern lediglich um die Erzeugung von O₂-reduzierten Bedingungen.

Kultivierung von *E. coli*

Die in Tab. 3 aufgeführten Stämme wurden in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikazusätzen kultiviert. Die Anzucht erfolgte mit Hilfe von LB-Glycerin Stammkulturen oder mit Einzelkolonien von LB-Agar-Platten. Die Inkubation wurde schüttelnd bei 150-200 rpm und 37 °C über Nacht durchgeführt. Nach dem Erreichen der, für die jeweiligen anschließenden Experimente, gewünschten OD₆₀₀ wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm gewonnen. Es erfolgte eine

direkte Verarbeitung oder eine Lagerung der Zellen bei -20 °C. LB-Agar-Platten wurden ebenfalls bei 37 °C inkubiert und konnten anschließend bei 4 °C gelagert werden.

2.5 Messung des Bakterienwachstums *in vitro*

Das Wachstum der Bakterien wurde photometrisch durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Die Messung erfolgte mit Hilfe des *Ultrospec 10 Cell density meter* (Amersham Biosciences, Freiburg) direkt in Klettkolben oder in Hungate-Röhrchen. Bei jeder Messung diente entsprechendes unbeimpftes Medium als Leerwert. Bei einer OD_{600} über 2,0 wurde der Messansatz mit Medium verdünnt und in Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen.

2.6 Analyse des Wachstums von *Xcv*-Stämmen

2.6.1 Wachstumsanalyse *in vitro*

Um das Wachstum der *Xcv*-Stämme bzw. den Einfluss von genspezifischen Deletionen auf das Wachstum zu untersuchen, wurden Wachstumsanalysen durchgeführt. Damit eventuelle Wachstumsdefizite nicht durch einen Überfluss an Nährstoffen kompensiert werden, wurde 1 x MA Medium für die Untersuchungen eingesetzt. Zur Vereinfachung wurden Hungateröhrchen verwendet und je Stamm eine 3-4-fach Bestimmung durchgeführt.

Es wurden 4 ml MA-Medium mit einer Vorkultur auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft und das Wachstum für mindestens 48 h aufgezeichnet.

Neben MA-Medium und aufgrund der Tatsache, dass Citrat als mögliche Kohlenstoffquelle für *Xcv* diskutiert wird, wurden Wachstumsanalysen auch mit MA-Citrat-Medium angefertigt. So konnte der Einfluss der einzelnen Gendeletionen auf die Citratverfügbarkeit untersucht werden. Auch hier wurden 4 ml des Mediums in Hungateröhrchen in 3-4-fach Bestimmung eingesetzt und das Wachstum bei 600 nm für mindestens 48 h dokumentiert.

2.6.1.1 Wachstum unter Anwesenheit von Menadion (*plate sensitivity assay*)

Menadion ist ein Superoxid-bildendes Reagenz, welches im *plate sensitivity assay* modifiziert nach Jittawuttipoka *et al.* (2009) eingesetzt wurde. Hierfür wurden Verdünnungen von 10^{-6} und 10^{-7} von Kulturen der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,6$) der zu testenden *Xcv*-Stämme auf MA-Agar-Platten ohne und mit 15 μ M Menadion (Sigma, München) plattiert. Nach einer Inkubation bei 30 °C wurden die koloniebildenden Einheiten cfu (*colony forming units* = cfu) nach 2-3 Tagen gezählt. Zur Ermittlung der *surviving fraction* wurden die cfu der Platten mit Menadion durch die cfu

der Platten ohne Menadion dividiert. Dabei wurden die überlebenden Bakterienkolonien der eingesetzten Stämme ohne Menadionbehandlung auf 100 % gesetzt.

2.6.2 Wachstumsanalyse *in planta*

Hierbei wurden eventuelle Effekte der Deletionen in *Xcv* 85-10 auf das *in planta* Wachstum untersucht. Es wurden je 3 Paprikapflanzen (*C. annuum*) des Kultivars ECW pro Durchführung verwendet. Die Wachstumsanalyse erfolgte jeweils durch Inokulation der Blätter mit den zu untersuchenden *Xcv*-Deletionsstämmen, dem Wildtyp 85-10 und dem Kontrollstamm 85* $\Delta hrcN$ (modifiziert nach Bonas *et al.*, 1991). Die Bakteriensuspensionen wurden in 10 mM $MgCl_2$ auf eine Zellzahl von 5×10^4 cfu/ml eingestellt und in die Blätter (Blattunterseite) von 5-6 Wochen alten Pflanzen infiltriert. Die inokulierten Pflanzen wurden anschließend in einer Phytokammer (Series 101, Percival Scientific) bei 80 % Luftfeuchtigkeit einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16 h bei 28°C und 8 h bei 26 °C Nachttemperatur ausgesetzt.

Zur Analyse des Wachstums wurde aller 2 Tage (auch am Tag der Infiltration) aus der infiltrierten Fläche ein Bereich von $0,5 \text{ cm}^2$ mit Hilfe eines Korkbohrers gestanzt und in ein Eppendorfgefäß mit 100 μl 10 mM $MgCl_2$ und einer Stahlkugel überführt. Der Aufschluss erfolgte anschließend mit einer Schwingmühle (MM300, Retsch, Haan) für 40 sec bei 30 Schwingungen/sec. Die Bakteriensuspensionen bzw. Verdünnungen wurden auf NYG-Rif-Cyc-Nähragarplatten ausplattiert. Cycloheximid (Cyc) inhibiert die eukaryotische Protein-Biosynthese, wodurch das Wachstum von Pilzen gehemmt werden soll.

Folgende Verdünnungen wurden je Stamm plattiert:

Tag 0: je 50 μl 1:3 verdünnt

Tag 2: je 50 μl 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} verdünnt

Tag 4: je 50 μl 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} und für die *hrcN*-Mutante 10^{-1} und 10^{-2} verdünnt

Tag 6: je 50 μl 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} und für die *hrcN*-Mutante 10^{-2} und 10^{-3} verdünnt

Tag 8: je 50 μl 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} und für die *hrcN*- Mutante 10^{-3} und 10^{-4} verdünnt

Konnte bei Stämmen ein verringertes Wachstum gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden, wurde zum nächsten Zeitpunkt der Probennahme eine entsprechende niedrigere Konzentration ausplattiert. Nach einer Inkubation der Agar-Platten für 2 Tage bei 30 °C wurden die cfu gezählt und die Berechnung und Erstellung der Wachstumskurven mit Microsoft Excel durchgeführt.

2.7 Infiltration von Paprikapflanzen mit *Xcv*-Stämmen

Um die Fähigkeit der Deletionsmutanten wässrige Läsionen und hypersensitive Reaktionen (HR) zu bilden mit denen des Wildtyps zu vergleichen, wurden 5-6 Wochen alte Paprikapflanzen (*C. annuum*) der Kultivare ECW und ECW-10R verwendet. Hierfür wurden Bakteriensuspensionen mit 10 mM MgCl₂ auf eine OD₆₀₀ von 0,2 (entspricht $2,5 \times 10^8$ cfu/ml) eingestellt. Es wurde eine 1:2 (OD₆₀₀ = 0,1), eine 1:10 (OD₆₀₀ = 0,02) und eine 1:5 (OD₆₀₀ = 0,04) Verdünnung zur Infiltration eingesetzt. Die Infiltration erfolgte nach der Beschreibung von Bonas *et al.* (1989) in je 2 Paprikapflanzen der Kultivare ECW und ECW-10R. Mit Hilfe einer Einwegspritze ohne Kanüle wurde eine Blattfläche von ca. 1,5 cm² mit der Bakteriensuspension infiltriert. Dabei diente der Zeigefinger von der Blattoberseite als Stütze und die Inokulation erfolgte an der Unterseite von Blättern gleichen Alters. Um auszuschließen, dass die phänotypischen Effekte durch verschiedene Positionen auf dem Blatt und somit durch unterschiedliche Lichtintensität verursacht worden sind, wurden die Positionen der Stämme pro Blatt verändert. Zum Vergleich der Phänotypen wurden alle Stämme, sowie der Wildtyp *Xcv* 85-10 auf ein Blatt infiltriert. Die Pflanzen wurden wie unter 2.6.2 beschrieben in Phytokammern einem Tag- Nacht-Rhythmus ausgesetzt.

Bleichen von Paprikablättern

Eine längerfristige Aufbewahrung von Paprikablättern und eine verbesserte Visualisierung der HR wurde durch das Bleichen mit absolutem EtOH erreicht, indem den Blättern durch dieses Verfahren das Chlorophyll entzogen wurde. Hierfür wurden 10 x 5 cm große Plastikgefäße mit EtOH gefüllt, die Blätter hineingegeben und eine Inkubation von ca. 12 h bei 60 °C in einem Wasserbad durchgeführt. Die Blätter wurden entnommen, mit Wasser gespült und zwischen Filterpapier und Papiertüchern gepresst und getrocknet.

2.8 Untersuchung der Freisetzung von ROS *in planta*

Zur Detektion von *oxidative burst* bzw. freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies in Paprikablättern, als Reaktion auf die Infiltration von *Xcv*, wurde das Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin ((w/v); Sigma, München) nach Thordal-Christensen *et al.* (1997) verwendet. Bei DAB handelt es sich um eine Peroxidase-gekoppeltes Chromogen. Befindet sich H₂O₂ im Blatt, dient es der Peroxidase als Substrat und das farblose Chromogen wird durch freierwerdende Protonen zu einem braunen Produkt unter Bildung von Wasser oxidiert.

Die DAB-Lösung wies eine Konzentration von 1 mg/ml mit einem pH von 3,8 (mit HCl) auf und wurde vor Verwendung lichtgeschützt für ca. 2 h durchmischt.

Die anzufärbenden Blätter wurden in einem 50 ml Greiner (Roth, Karlsruhe) mit frischer DAB-Lösung für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Blätter zur Entfärbung in 99 % EtOH bei 95 °C im Wasserbad gekocht und daraufhin über Nacht in Chloralhydrat ((w/v); 2,5 mg/ml; Roth, Karlsruhe) verwahrt. Am nächsten Tag konnten die Blätter mit H₂O gespült und zwischen Papiertüchern getrocknet werden.

2.9 Dauerhafte Lagerung von Bakterienstämmen

Flüssigkulturen von *Xcv*-Stämmen wurden mit 7 % (v/v) DMSO versetzt. Dagegen wurde zu Flüssigkulturen von *E. coli* 12,5 % (v/v) Glycerin gegeben. Die dauerhafte Stammlagerung aller Bakterienstämme erfolgte bei -80 °C.

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.10.1.1 Isolierung von Gesamt-DNA

Um Gesamt-DNA aus *Xcv*-Stämmen zu isolieren wurde das *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Hierfür wurden 5 ml Flüssigkultur nach beigefügtem Protokoll des Herstellers präpariert und die Gesamt-DNA aufgearbeitet. Die DNA wurde mit 50 µl Elutionspuffer oder H₂O_{bidest} eluiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.10.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA aus Zellen zu isolieren wurde das *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche, Mannheim) oder das *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Es wurden jeweils 6 ml Flüssigkultur nach Protokollangaben bearbeitet und die Plasmid-DNA in 30 µl Elutionspuffer oder H₂O_{bidest} eluiert. Um die erhaltene Ausbeute zu steigern, wurde das Eluat erneut auf die Säule gegeben und für 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert.

2.10.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* Stämmen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus *Xcv*-Stämmen wurde das *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Es wurde jeweils 10 ml NYG-oder MA-Flüssigkultur der exponentiellen Wachstumsphase (OD₆₀₀ = 0,5 - 0,8) bzw. der stationären Wachstumsphase (OD₆₀₀ = 1,5 - 2,0) präpariert. Die Isolation und Aufarbeitung der RNA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die RNA wurde mit 30 µl

RNase-freiem H₂O_{bidest} eluiert und das erhaltene Eluat, zur Steigerung der Ausbeute, zur erneuten Elution auf die Säule gegeben. Da sich meist nach der Isolation der RNA noch Reste der DNA in der Probe befinden, schloss sich eine zusätzliche DNase-Behandlung mit *DNase I recombinant, RNase-free* (Roche, Mannheim) für 1 h bei 37 °C an.

Die so gewonnene RNA stand nun für *Reverse Transcriptase*-Experimente, sowie für *Real-Time-PCR* zur Verfügung. Die Lagerung der RNA erfolgte für kurze Zeiträume bei -20 °C und für längere Aufbewahrung bei -80 °C.

2.10.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des Nanodrop (Pqclab, Erlangen) bestimmt. Die Konzentration wird hierbei photometrisch durch die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm in 1 µl der Nukleinsäurelösung ermittelt und berechnet (siehe Gleichung 1). Als Leerwert diente H₂O_{bidest} bzw. der Puffer in dem die jeweiligen Nukleinsäuren gelöst vorlagen.

$$\text{Gl. 1} \quad [C_{\text{Nukleinsäure}} \text{ ng/}\mu\text{l} = \text{OD}_{260} \times 50 \text{ ng/}\mu\text{l}]$$

2.10.3 PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten

2.10.3.1 Standard-PCR

Zur Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten wurde die PCR (*polymerase chain reaction*, (Saiki *et al.*, 1985) verwendet. Durch den Einsatz von spezifischen Oligonukleotiden, sowie hitzestabilen Polymerasen ist eine spezifische Vervielfältigung von DNA möglich. Die Reaktionen wurden mit entsprechenden Programmen in Thermocyclern (*Primus 25 advanced*; Pqclab, Erlangen und T3000; Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Je nach Amplifikat und dessen Verwendungszweck kamen verschiedene DNA-Polymerasen zum Einsatz. Für Standard-PCR-Reaktionen wie Kolonie-PCR und PCR mit cDNA wurde hauptsächlich die *Dream-Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten, welche anschließend für Klonierungen bzw. Sequenzierreaktionen eingesetzt wurden, diente eine DNA-Polymerase, welche eine 3'-5' Exonuklease- bzw. *proofreading*-Funktion besitzt. Somit wird die Fehlerrate der Amplifizierung reduziert und die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Sequenzabfolge erhöht. Hierfür diente die *Phusion-High-Fidelity*-DNA-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt).

Folgende Standardansätze wurden verwendet:

Komponenten	PCR mit Dream - Taq - DNA Polymerase	PCR mit Phusion-High- Fidelity-DNA-Polymerase
template DNA (50-200 ng)	1 µl	1 µl
10 x Reaktionspuffer	2 µl	-
5 x Phusion GC puffer	-	10 µl
Primer forward (10 µM)	0,6 µl	1,5 µl
Primer reverse (10 µM)	0,6 µl	1,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,4 µl	1 µl
DMSO (100 %, v/v)	1,4 µl	3,5 µl
Polymerase 1U	0,5 µl	0,5 µl
H ₂ O bidest	13,5 µl	31 µl
Gesamtvolumen	20 µl	50 µl

Die PCR wurden standardmäßig nach folgenden Programmen durchgeführt:

PCR mit *Dream-Taq*-DNA-Polymerase

Denaturierung:	95 °C	5 min	33x
Denaturierung:	95 °C	15 sec	
Anlagerung:	X °C	30 sec	
Elongation:	72 °C	Y min	
Finale Elongation:	72 °C	5 min	
	4 °C	∞	

PCR mit *Phusion-High-Fidelity*-DNA-Polymerase

Denaturierung:	98 °C	2 min	33x
Denaturierung:	98 °C	10 sec	
Anlagerung:	X °C	30 sec	
Elongation:	72 °C	Y min	
Finale Elongation:	72 °C	5 min	
	4 °C	∞	

Die Anlagerungstemperatur X für die jeweiligen Primer wurden 5 °C unter der ermittelten Schmelztemperatur (T_m) des Primers gewählt. Die Berechnung der Schmelztemperatur erfolgte mit der Formel nach Bertram und Gassen (1991).

$$\text{Gl.2} \quad T_m = 2 \times \text{Anzahl der A/T-Paare} + 4 \times \text{Anzahl der G/C-Paare}$$

T_m = Schmelztemperatur

A/T = Adenosin/Thymin

G/C = Guanin/Cytosin

Da sich die Polymerasen in ihrer Syntheseleistung unterscheiden, wurde je nach erwarteter Größe des Amplifikates und der Herstellerangaben eine unterschiedliche Elongationszeit Y gewählt. Die *Dream-*

Taq-DNA-Polymerase weist eine Leistung von 1 kb DNA-Fragment pro 1 min auf, während die *Phusion-High-Fidelity*-DNA-Polymerase dagegen eine Syntheseleistung von 1 kb pro 30 sec besitzt.

2.10.3.2 Kolonie-PCR

Für die Durchführung einer Kolonie-PCR wurden statt extrahierter Gesamt- oder Plasmid-DNA ganze Zellen eingesetzt. Im Fall von *E. coli* Zellen wurde eine Kolonie in dem bestehenden PCR-Ansatz resuspendiert und zur Reaktion eingesetzt. Um einen effizienten Aufschluss der Zellen zu gewährleisten, wurde der initiale Denaturierungsschritt (95 °C) der Standard-PCR auf 10 min erhöht. Bei *Xcv* wurde eine Kolonie in 50 µl H₂O_{bidest} solubilisiert, anschließend bei 95 °C für 10 min aufgeköcht und für 30 min bei -80 °C aufbewahrt, um den Zellaufschluss zu gewährleisten. Es schloss sich eine 5minütige Zentrifugation bei 14000 rpm an. Es wurde 1 µl des Überstandes entnommen und als *template* zur PCR eingesetzt.

2.10.3.3 Reinigung von PCR-Produkten

Um störende Enzyme und Pufferkomponenten für nachfolgende Reaktionen zu entfernen, wurden die erhaltenen PCR-Amplifikate entweder mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche, Mannheim) oder dem *QiaQuick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die Reinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Elution wurde mit 30 µl Elutionspuffer oder H₂O_{bidest} durchgeführt.

2.10.4 cDNA Synthese

Zur Herstellung von cDNA durch reverse Transkription wurde frisch isolierte RNA aus *Xcv*-Stämmen verwendet. Hierfür wurde das *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific, Schwerte) eingesetzt. Für jede cDNA-Synthese wurden je nach Ausbeute 1-2 µg der Gesamt-RNA verwendet und mit Hilfe des *Random Hexamer Primer* [100 µM; 0,2 µg/µl (6 A260 U/ml)] das vorhandene Transkriptom in cDNA nach Angaben des Herstellers umgeschrieben. Die so erhaltene cDNA konnte nun zur RT-PCR, sowie zur quantitativen *Real-Time*-PCR eingesetzt werden. Die zur cDNA-Synthese verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 12 (Anhang) aufgeführt.

2.10.5 RT-PCR

Die RT-PCR (*reverse transcription-PCR*) erlaubt die Analyse der Transkription bestimmter Gene mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide nach erfolgter cDNA aus Gesamt-RNA. Die in der vorangegangenen Reaktion synthetisierte cDNA wurde als *template* zur Reaktion eingesetzt (Reverse Transkription). Durch den Vergleich der entstandenen Amplifikate in verschiedenen Stämmen nach der PCR, läßt sich eine semiquantitative Aussage über die cDNA Konzentration treffen. Diese wiederum erlaubt Rückschlüsse auf die Menge der mRNA des jeweiligen Gens zum Zeitpunkt der RNA-Isolation zu ziehen. Es wurden je 1 µl der synthetisierten, 1:50 verdünnten cDNA zur PCR mit *Dream-Taq*-DNA-Polymerase in einem 20 µl Ansatz eingesetzt.

Als Kontrolle diente die Amplifikation der konstitutiv exprimierten 16S rRNA, genomische DNA des Wildtyp *Xcv* 85-10, sowie H₂O_{bidest.} Die Amplifikate wurden anschließend in einem 1%igem Agarosegel zur vergleichenden Analyse aufgetragen.

2.10.6 qRT-PCR (*quantitative Real Time-PCR*)

Die Methode der quantitativen Echtzeit-PCR erlaubt, nach Herstellung von cDNA aus isolierter RNA, die quantitative Messung der DNA in einer PCR-Reaktion. Hierfür wurden jeweils 1 µg zur cDNA-Synthese mit *random* Primern eingesetzt und zu Beginn die Effizienz der Primer in der qRT-PCR, sowie die optimale Verdünnungen der cDNA ermittelt.

Die Durchführung des Experimentes erfolgte unter Verwendung des *QuantiTect SYBR Green PCR* Kit (Qiagen, Hilden), sowie dem Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Qiagen; Hilden). Bei SYBR-Green handelt es sich um einen Cyanin-Farbstoff der zur Detektion doppelsträngiger DNA eingesetzt wird. Somit wird bei jedem Elongationsschritt der PCR-Zyklen die Zunahme der Fluoreszenz gemessen, welche mit der ansteigenden DNA Menge korreliert. Die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale erfolgte in der exponentiellen Phase der PCR, welche sich durch optimale Reaktionsbedingungen auszeichnet. Anhand von erstellten Schmelzkurven ließen sich unspezifische Produkte identifizieren und von der Auswertung ausschließen. Als Referenz diente die Analyse der Transkriptrate des, in allen Stämmen konstitutiv exprimierten, 16S rRNA Gens, sowie die Amplifikation mit RNase-freien H₂O_{bidest.} Die zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide, welche in einer Konzentration von 1,5 mM eingesetzt wurden, sind in Tab. 12 im Anhang zu finden. Es wurden jeweils Primer mit einer Länge von 18-22 bp, einer Schmelztemperatur von ca. 60 °C und einem GC-Gehalt von 40-60 % ausgewählt.

Die maximale Größe der Amplifikate betrug 200 bp. Die cDNA wurde hierbei 1:50 verdünnt.

Folgender Ansatz wurde verwendet:

SYBR Green PCR Mix	10 µl
1,5mM Primer forward	1,4 µl
1,5mM Primer reverse	1,4 µl
cDNA (1:50)	2 µl
RNase freies Wasser	2 µl
	20 µl

Programm:

94 °C	15 min	
58 °C	30 sec	} 40 x
72 °C	11 sec	
80 °C	7 sec	
4 °C	∞	

Zu Beginn der Durchführung der tatsächlichen qRT-PCR wurde für jedes eingesetzte Primerpaar die Effizienz ermittelt. Hierfür wurde anhand der erhaltenen Ct-Werte (*cycle threshold*) der Reaktionen mit verschiedenen Verdünnungen der cDNA (1:50; 1:250; 1:1250; 1:6250) von Xcv 85-10 eine lineare Funktion erstellt. Die Steigung (m) der Gleichung wurde in folgender Formel zur Errechnung der Primereffizienz (E) eingesetzt:

$$E = 10^{\exp(-1/m)}$$

Um nun die relative Transkriptrate der Gene zu erhalten, wurden die ermittelten Ct-Werte in die jeweilige Geradengleichung eingesetzt ($\log_{10}SQ = (Ct - b)/m$). Anschließend wurden die Unterschiede in der Transkription des Referenzgens der 16S rRNA (*16S difference*) der jeweiligen Stämme als Korrekturfaktor in die Berechnung mit einbezogen, da dieses Gen konstitutiv in allen Stämmen exprimiert wird. Die Transkriptmenge des Wildtyps wurde auf 1,0 gesetzt und die relativen Transkriptraten der Gene in den Mutanten durch Normalisierung mit der *16s difference* berechnet.

Jede qRT-PCR wurde technisch zweimal mit 3 biologischen Replikaten durchgeführt.

Um die mRNA-Expression verschiedener Gene des Wildtyps und der verwendeten Mutanten vergleichen zu können, wurde der Student's-t-Test verwendet. Ein P-value (p) < 0.05 wurde dabei als statistisch signifikant angesehen.

2.10.7 Transkriptomvergleiche mit Microarray

Zur vergleichenden Analyse der Expression von Genen zwischen dem Wildtypstamm Xcv 85-10 und den erstellten Mutanten wurden Microarray-Analysen von der Arbeitsgruppe von Prof. Anke Becker (Synmicro; LOEWE-Zentrum für Synthetische Mikrobiologie; Hans-Meerwein-Straße; 35032 Marburg) durchgeführt. Hierfür wurden je Stamm 10 µg isolierte Gesamt-RNA von 4 biologischen Replikaten bzw 4 x 15 ml geerntete Zellen der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = \text{ca. } 0,6$) versendet. Es wurden Microarrays von Xcv 85-10 zur Hybridisierung eingesetzt, welche 3 Sonden pro Gen aufwiesen (http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/nwt/transcriptomics_facility/). Das nach Microarray-Hybridisierung entstandene Foto wurde mit der Software ImaGene (BioDiscovery) ausgewertet und die erhaltenen Zahlenwerte mit der Software EMMA analysiert. Die so erhaltenen Rohdaten wurden von der Arbeitsgruppe voruntersucht und nur die Gene mit einem M-Wert (= $\log_2$ Veränderung der jeweiligen Transkriptmenge zwischen beiden vergleichenden Stämmen) >1 bzw < -1 , einem p-Wert $< 0,05$ (statistische Wahrscheinlichkeit, dass Werte nicht auf Zufall beruhen) und einem A-Wert (Stärke des Hybridisierungssignals) > 5 selektiert. Die Daten wurden als Microsoft Excel-Dateien erhalten.

2.10.8 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mittels horizontaler Gelelektrophorese in Elektrophoresekammern der Firma Biorad (München) und Peqlab (Erlangen) mit 1 x TAE als Laufpuffer aufgetrennt. Dabei wurden, je nach erwarteter Größe der Fragmente, verschiedene Agarosekonzentrationen (w/v) verwendet (1-2 % in 1 x TAE-Puffer). Die Proben wurden vor der Auftrennung mit 0,2 Vol. 5 x DNA-Ladepuffer versetzt und je nach Größe des Fragmentes bei 70-100 Volt für 1 h aufgetrennt.

50 x TAE-Puffer

EDTA	0,05 M
Tris/HCl	2 M
Essigsäure (v/v)	1 %
pH 8,0	

5 x DNA-Ladepuffer

Glycerol (99 %,v/v)	30 %
Bromphenolblau (w/v)	0,25 %
Xylencyanol (w/v)	0,25 %

2.10.8.1 Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente

Für die Größenbestimmung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde während der elektrophoretischen Auftrennung ein Größenstandard mitgeführt. Hierbei handelt es sich um den λ -Pst-Marker (Abb. 9), welcher durch die vollständige Restriktion von λ -Phagen-DNA (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Fermentas, St. Leon-Rot) mit der Restriktionsendonuklease PstI (Fermentas; St. Leon-Rot) bei 37 °C ü.N. geschnitten und anschließend mit 5 x DNA-Ladepuffer versetzt wurde.

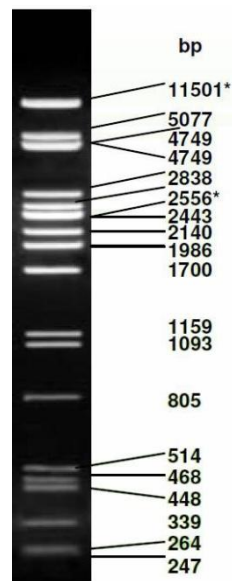


Abb. 9.: λ -Pst-Marker.

Auftrennung von vollständig geschnittener λ -Phagen-DNA (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Fermentas, St. Leon-Rot) mit der Restriktionsendonuklease PstI (Fermentas; St. Leon-Rot) in einem 1%igen Agarosegel.

2.10.8.2 Färbung und Dokumentation von Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von DNA in Agarosegelen erfolgte die Färbung dieser für ca. 30 min in einem Ethidiumbromid-Bad (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Nach der Anfärbung wurde die DNA durch Interkalation des EtBr mit UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert (Gel iX Imager; Intas, Göttingen).

2.10.8.3 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente nach einer Restriktion oder PCR aus einem Agarosegel zu eluieren, wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) oder dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben isoliert.

2.10.9 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

2.10.9.1 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA-Fragmenten erfolgte hinsichtlich Pufferbedingungen, Reaktionstemperatur und Enzymkonzentrationen nach Angaben des Herstellers (Fermentas, St. Leon-Rot) für 3 h oder über Nacht. Vor anschließenden Ligationsreaktionen wurden die eingesetzten Enzyme entsprechend der Herstellerangaben inaktiviert. Die Restriktion und die entstandenen Fragmente wurden in einem 1%igem Agarosegel überprüft.

2.10.9.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Für Ligationsreaktionen mit einem Volumen von 10 µl wurde 1U T4-DNA Ligase und 10 x Ligasepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt. Das Vektor:DNA-Verhältnis betrug meist 1:3 oder die einzusetzende Masse des Inserts (m_I in ng) wurde unter Berücksichtigung der Länge der Insert- und Vektor-DNA (L_I und L_V), sowie der eingesetzten Masse der Vektor-DNA (m_V in ng) wie folgt berechnet.

$$m_I = (5 \times m_V \times L_I) / L_V$$

Zu Beginn wurde die Vektor- und Insert-DNA in einem Eppendorfgefäß zur Freilegung der kohäsiven Enden für 10 min bei 45 °C inkubiert und anschließend die restlichen Komponenten zugegeben. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C. Um die Ligase zu inaktivieren, wurde der Ansatz vor einer Transformation für 10 min bei 65 °C inkubiert. Erfolgte eine Transformation per Elektroporation wurden die störenden Salze aus der Ligationssuspension durch Mikrodialyse entfernt. Hierfür diente ein Membranfilterblättchen mit einer Porengröße von 0,025 µm (Millipore, Eschborn). Der Ansatz wurde auf das Filterblättchen gegeben und nach 45minütiger Dialyse gegen H_2O_{bidest} wieder abgenommen und zur Elektroporation eingesetzt oder bei -20 °C aufbewahrt.

2.10.10 Herstellung kompetenter Zellen

2.10.10.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Es wurden 200 ml LB-Medium mit einer Vorkultur und entsprechendem Antibiotikum in einem Erlenmeyerkolben bei 37 °C kultiviert und bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,8 inkubiert. Nach einer 15minütigen Inkubation der Kultur auf Eis schloss sich eine Zentrifugation von 15 min bei 5000 rpm (Sorvall RC6 Plus, Rotor: F10S) und 4 °C an. Das erhaltene Zellpellet wurde zwei Mal mit 1 Vol.

eiskaltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ und daraufhin mit 30 ml eiskaltem 10%igen Glycerin (v/v) gewaschen und jeweils durch 15 minütige Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm pelletiert. Das gewaschene Zellpellet wurde in 0,6 ml 10%igen Glycerin resuspendiert und anschließend aliquotiert (40 µl). Die nun elektrokompenten Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

2.10.10.2 Herstellung chemokompenter *E. coli* Zellen (Sambrook *et al.*,2001)

Es wurden frische Kolonien zur Kultivierung einer 25 ml Vorkultur mit LB-Medium verwendet. Diese wurde 6-8 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte die Anzucht einer 250 ml Hauptkultur, welche unter den gleichen Bedingungen bis zu einer OD_{600} von 0,55 kultiviert wurde. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis wurde die Kultur für 10 min bei 4 °C und 3900 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde anschließend in 80 ml Transformationspuffer resuspendiert und durch eine wiederholte Zentrifugation pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet nun in 20 ml Transformationspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1,5 ml DMSO (100 %, v/v) und kurzem Mischen verweilte die Suspension für 10 min auf Eis und wurde anschließend aliquotiert (50 µl). Nach kurzem Aufenthalt in flüssigen N_2 erfolgte die Aufbewahrung bei -80 °C.

Transformationspuffer:

$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	55 mM
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	15 mM
KCl	250 mM
PIPES (0,5 M, pH 6,7)	10 mM
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 1000 ml

2.10.10.3 Herstellung elektrokompenter *Xcv* Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter *Xcv* Zellen wurden Kolonien von einer NYG-Agarplatte mit einem sterilen Spatel abgenommen und in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ resuspendiert. Es wurde eine OD_{600} von 1,0 eingestellt und jeweils 1 ml der Suspension in ein Eppendorfgefäß überführt. Hierbei wurden alle Schritte bei 4 °C durchgeführt. Nach einer Zentrifugation bei 14000 rpm wurde der Überstand abgenommen und das entstandene Zellpellet 3 Mal mit sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 50 µl sterilem 10%igen Glycerin (v/v) resuspendiert. Die Zellen wurden direkt zur Elektroporation eingesetzt.

2.10.11 Transformation von DNA in kompetente Bakterienstämme

2.10.11.1 Transfer mittels Elektroporation in *E. coli* Zellen (Dower *et al.*, 1988)

Für die Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompetente *E. coli* Zellen wurden 40 µl Zellen und 5 µl entsalzter Ligationsansatz oder 5 µl Plasmid (200-250 ng) eingesetzt. Die Elektroporation wurde mit Hilfe des *Gene Pulser* (Biorad, München) durchgeführt. Die Zellen wurden dafür auf Eis aufgetaut und die DNA anschließend zugegeben. Nach einer 1minütigen Inkubation der Suspension auf Eis wurde diese in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm Elektrodenabstand; Peqlab, Erlangen) überführt und die Elektroporation bei 25 µF; 2,5 kV und 200 Ω durchgeführt. Für einen erfolgreichen Transfer sollte eine Zeitkonstante von 4,6-4,9 und eine Feldstärke von 12,5 kV/cm erreicht werden sein. Nach dem Impuls wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz für ca. 1 h bei 37 °C bei 200 rpm inkubiert. Die Suspension wurde nach der Inkubation auf selektive Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.10.11.2 Transfer mittels Chemotransformation in *E. coli* Zellen

Für diese Methode der Transformation von DNA wurden chemokompetente *E. coli* Zellen benutzt. Hierfür wurde ein Aliquot (200 µl) der Zellen auf Eis aufgetaut und 10 µl Plasmid-DNA bzw. Ligationsansatz hinzu gegeben. Es schloss sich eine Inkubation von 30 min auf Eis an, worauf ein Hitzeschock bei 42 °C für 1 min erfolgte. Der Ansatz wurde schnell auf Eis abgekühlt und der Zellsuspension 800 µl LB-Medium zugegeben. Zur Erhöhung der Effizienz der Transformation und der weiteren Stressvermeidung der Zellen wurde die Suspension ebenfalls mit 20 µl 20%ige Glukose und 5 µl 2 M MgCl₂ versetzt und der Transformationsansatz 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgte die Plattierung des Ansatzes auf selektive LB-Agar-Platten.

2.10.11.3 Transfer mittels Elektroporation in *Xcv* Zellen

Für den Transfer von Plasmid-DNA in *Xcv* Zellen wurden diesen, nach Erhalt ihrer Kompetenz (2.10.10.3) 50-100 ng Plasmid zugeführt und die Suspension gekühlt in eine Elektroporationsküvette (0,2 cm Elektrodenabstand; Peqlab, Erlangen) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF; 12,5 kV und 200 Ω unter Verwendung des *Gene Pulser* (Biorad, München). Anschließend wurde der Suspension 500 µl NYG-Medium zugegeben und der Ansatz bei 30 °C für 1-2 h schüttelnd inkubiert. Die Plattierung erfolgte auf selektiven NYG-Agar-Platten.

2.10.11.4 Transfer mittels triparentaler Konjugation in Xcv Zellen

Neben dem Transfer durch Elektroporation können Plasmide auch per triparentaler Konjugation (Figurski and Helinski, 1979; Ditta *et al.*, 1980; Huguet *et al.*, 1998) in Xcv Zellen eingeführt werden. Hierfür wurden, der entsprechende Xcv-Rezipientenstamm, der *E. coli* Helferstamm MM294 und der dazugehörige Donorstamm, welcher das zu transferierende Plasmid enthält, im Verhältnis 4:1:1 auf einer 1 % NYG-Agarplatte auf einer Fläche von 1 cm² miteinander vermischt. Nach einer Inkubation von 24 h bei 30 °C wurde das Gemisch abgenommen und in 800 µl NYG-Medium resuspendiert und je 10 µl und 150 µl auf selektiven NYG-Agarplatten ausplattiert. Daraufhin erfolgte eine Inkubation von 2-3 Tagen bei 30 °C.

2.10.12 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung einer DNA-Sequenzabfolge wurde ein 7 µl Ansatz, der 0,6 µg DNA und 20 pmol spezifisches Oligonukleotid enthielt, untersucht. Die Sequenzierreaktion wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) nach dem Prinzip von Sanger *et al.* (1977) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden unter Verwendung des Programms *Serial Cloner 2.5-Serialbasics* bzw. *Chromas Lite 2.1* ausgewertet. Das Programm BLAST (*basic local alignment search tool*) diente zum Vergleich der DNA-Basenabfolge mit einer DNA-Sequenz-Datenbank über das "*National Center for Biotechnological Information*" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.10.13 Generierung von Xcv-Deletionsmutanten

2.10.13.1 Herstellung von Deletionskonstrukten

Die Erzeugung von Deletionskonstrukten erfolgte wie in Abb. 10 schematisch dargestellt. Mittels spezifischer Oligonukleotide (Tab. 12) wurden jeweils 900-1000 kb lange, den zu deletierenden Bereich flankierende, Chromosomenbereiche amplifiziert (Fragment L und Fragment R) und anschließend mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Die PCR-Produkte zur Deletion von *acnB* wurden mit XbaI/HindIII und HindIII/ApaI, zur Deletion von *acnA* mit XbaI/HindIII und HindIII/ApaI, die zur Deletion von *roaX-roaY*, *acnA2*, und *flp* mit XbaI/HindIII und HindIII/BamHI und die zur Deletion von *roaX-roaY-acnB* mit XbaI/HindIII und HindIII/SalI geschnitten.

Da jeweils beide Fragmente die Restriktionsschnittstelle für HindIII gemeinsam haben, erlauben die so entstandenen *sticky ends* eine Ligation der beiden Fragmente L und R. Das so entstandene Fragment L-R konnte nun in den Vektor pBluescript II (pBSK) KS (+/-) subkloniert werden, welcher zuvor mit den entsprechend gleichen Restriktionsenzymen geschnitten wurde (im Fall von Xcv 85-10Δ*acnB* mit XbaI und ApaI, Abb. 10).

Das so entstandene Konstrukt wurde in den Stamm XL1 Blue transformiert und positive Transformanten konnten durch Verwendung des Tests auf α -Komplementation (Blau-Weiß-Screening; Sambrook *et al.*, 1989) auf Ampicillin-X-Gal-IPTG-Platten identifiziert werden.

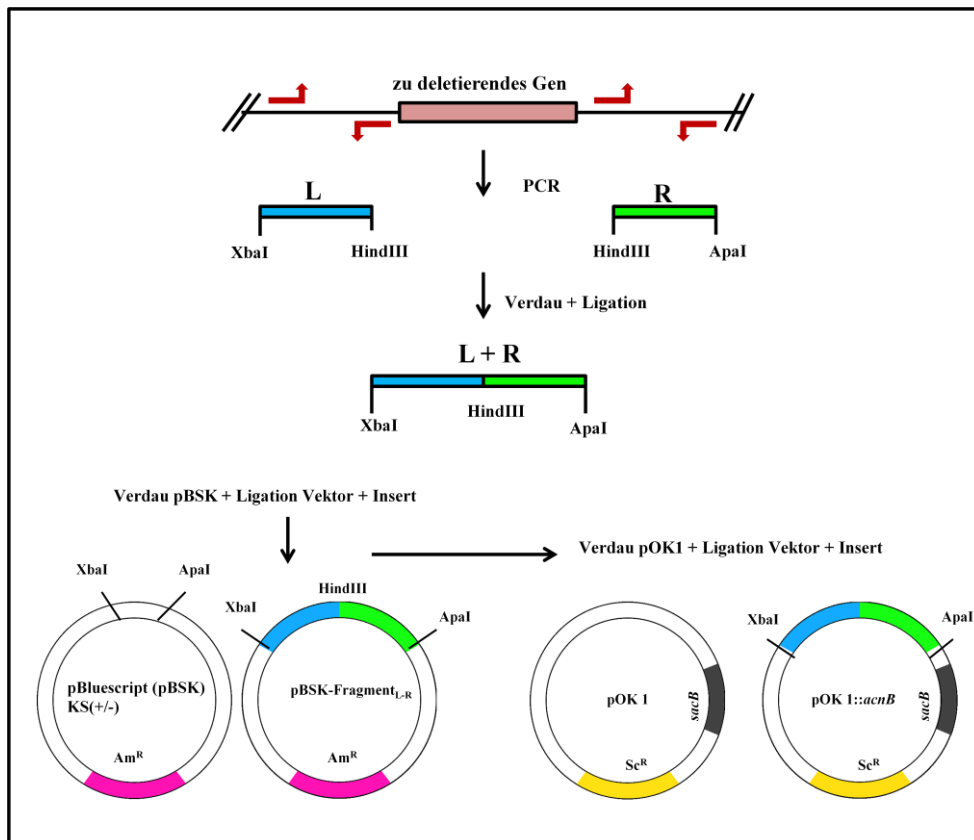


Abb. 10: Schematische Darstellung der Herstellung von Deletionskonstrukten zur Erzeugung von *Xcv*-Deletionsmutanten.

Mit spezifischen Oligonukleotiden (als rote Pfeile dargestellt) wurden jeweils 900-1000 kb lange, den zu deletierenden Bereich flankierende Gensequenzen amplifiziert. Die so entstandenen Fragmente L und R, sowie der pBSK Vektor und der pOK1 Vektor wurden mit spezifischen Restriktionsendonukleasen (XbaI, HindIII und ApaI, hier im Fall von *Xcv* 85-10 Δ *acnB* gezeigt) geschnitten. Anschließend erfolgte eine Ligation der Fragmente an der HindIII-Schnittstelle, sowie eine Klonierung des Fragmentes L-R in den pBSK Vektor. Nach erfolgter Sequenzierung wurden die Fragmente mit dem pOK1 Vektor ligiert. Am: Ampicillin; Sc: Spectinomycin.

Um die korrekte Integration des jeweiligen Inserts L-R in den pBSK-Vektor der positiven Transformanten zu überprüfen, wurde zusätzliche eine Kolonie-PCR mit gen- und vektorspezifischen Primern (UPRN, RPRN, Tab. 12), sowie eine Restriktion der Plasmide mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (bei *Xcv* 85-10 Δ *acnB* mit XbaI und ApaI) durchgeführt.

Nach Restriktion des Plasmid-Inserts aus dem Vektor wurde der Restriktionsverdau per Elektrophorese aufgetrennt, aus dem Agarosegel eluiert und gereinigt. Das so gereinigte Produkt wurde in den, zuvor mit den entsprechend gleichen Enzymen geschnittenen, pOK1-Suizidvektor kloniert und das Konstrukt in kompetente DH5 α pir Zellen transformiert. Die Selektion erfolgte auf Spectinomycin-haltigen LB-Platten. Die erhaltenen Transformanten wurden mit Kolonie-PCR und

Plasmidrestriktion überprüft. Ein positiver Transformant mit korrekter Sequenzabfolge wurde zur weiteren Herstellung von Deletionsmutanten eingesetzt. Die erhaltenen Konstrukte pOK Δ acnB, pOK Δ acnA, pOK Δ acnA2, pOK Δ roaX-roaY-acnB, pOK Δ roaX-roaY sowie pOK Δ flp wurden per triparentaler Konjugation (2.10.11.4) in *Xcv* 85-10 übertragen.

2.10.13.2 Deletionsmutagenese in *X. campestris* pv. *vesicatoria* durch triparentale Konjugation

Der Transfer der erstellten pOK-Deletionskonstrukte in *Xcv* 85-10 erfolgte durch triparentale Konjugation wie in 2.10.11.4 beschrieben. Das Prinzip der Mutagenese ist in Abb. 11 schematisch dargestellt. Nach Inkubation des Konjugationsmix für 1-2 Tage bei 30 °C wurde der Mix abgenommen und in 600 μ l NYG- Medium resuspendiert und je 10 μ l und 150 μ l auf NYG-Rif-Spec-Platten plattiert und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Der Suizidvektor pOK1 trägt das Gen für eine Levansucrase (*sacB*) und dessen *cis*-regulatorischer Sequenz, sowie ein Spectinomycin-Resistenzgen. Befindet sich Saccharose im Medium wird es durch die Levansucrase zu Levan umgewandelt, welches sich intrazellulär anreichert und zum Absterben der Zellen führt.

Der Suizidvektor kann aufgrund des *oriR6K* nicht in *Xcv* repliziert werden, da hierfür das, in *Xcv* nicht vorhandene, Pi Protein benötigt wird, welches vom *pir* Gen kodiert wird. Damit der Vektor durch Zellteilung weitergegeben wird, ist eine Integration ins Genom durch homologe Rekombination zwischen Bereichen des eingebrachten Plasmids und homologen Bereichen des Rezipientenchromosoms notwendig (1. Rekombinationsereignis, Abb. 11). Durch die Integration des Plasmids in das Genom von *Xcv* können nun mit NYG-Agar-Platten (NYG-Rif; NYG-Rif-Spec und NYG-Rif-Spec-Saccharose (5 %, (w/v)) Spectinomycin-resistente (Sc^R) und Saccharose-sensitive (Suc^S) Konjuganden selektiert werden. Die Saccharose-sensitiven Kolonien wurden zur weiteren Analyse von der NYG-Rif-Platte abgenommen. Da hier durch Fehlen von Sc^R und Saccharose kein Selektionsdruck vorlag, bestand eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Excision des pOK-Konstruktes aus dem Genom von *Xcv* durch ein 2. Rekombinationsereignis. Die zuvor erwähnten Kolonien wurden in 1 ml NYG-Medium zusammengebracht und 100 μ l einer 10^{-3} - und 10^{-4} Verdünnung auf NYG-Rif-Saccharose-Platten plattiert und diese für 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert. Die erhaltenen Kolonien wurden anschließend erneut mit Hilfe von Selektionsplatten untersucht. Durch die verschiedenen Möglichkeiten des Rekombinationsereignisses, wie es in Abb. 11 dargestellt ist, lag entweder der chromosomale Zustand des ursprünglichen *Xcv*-Stammes (Abb. 11, Rekombinationsereignis A) oder die gewünschte Gendeletion im Genom (Abb. 11, Rekombinationsereignis B) vor. Zur Überprüfung der Deletion wurden Spectinomycin-sensitive (Sc^S) und Saccharose-resistente (Suc^R) Kolonien zur Kolonie-PCR mit genspezifischen Primern eingesetzt.

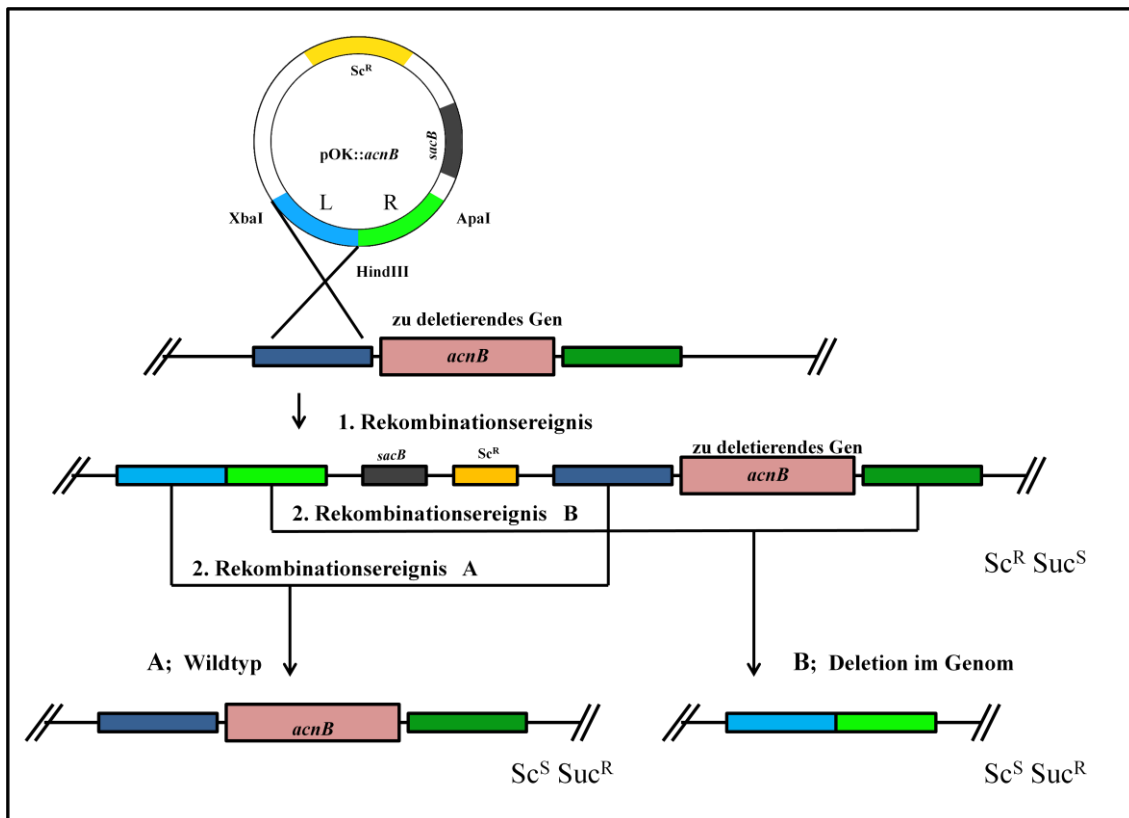


Abb. 11: Schematische Darstellung der Deletion von Genen in *Xcv* durch homologe Rekombination mit Hilfe des pOK1 Vektors am Beispiel der Deletion von *acnB*

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung der Deletionsmutagenese mit Hilfe des pOK1 Vektors, der hier das Fragment L-R zur Deletion im Beispiel von *acnB* trägt (pOKΔ*acnB*). Durch ein 1. Rekombinationsereignis zwischen homologen Bereichen des Vektors und des Genoms kommt es zur Integration des Konstruktes in das Genom von *Xcv*. Die so erhaltenen Konjuganten zeichnen sich durch eine *Sac*-Resistenz und eine *Suc*-Sensitivität aus. Es schließt sich ein 2. Rekombinationsereignis zwischen homologen Bereichen an, welches zur Excision des pOK-Konstruktes mit dem entsprechenden Insert führt. Dadurch liegt anschließend entweder Wildtyp (A) oder die gewünschte Deletion (hier *acnB*) (B) im Genom von *Xcv* vor. Erhaltene Konjuganten mit der gewünschten Deletion im Genom zeichnen sich nun durch eine *Suc*-Resistenz und eine *Sac*-Sensitivität aus. Das *sacB* Gen kodiert die Levansucrase. *Suc^S*, Saccharose-sensitiv; *Suc^R*, Saccharose-resistent; *Sc^S*, Spectinomycin-sensitiv; *Sc^R*, Spectinomycin-resistent. (modifiziert nach Diplomarbeit Steve Schulz, MLU Halle, Institut für Genetik, 2008).

Durch diese beschriebene Deletionsmutagenese entstanden die *Xcv*-Deletionsmutanten 85-10Δ*acnB*, 85-10Δ*acnA*, 85-10Δ*acnA2*, 85-10Δ*roaX-roaY*, 85-10Δ*roaX-roaY-acnB* und 85-10Δ*flp*.

Die Tab. 5 zeigt den Anfang bzw. das Ende der jeweiligen Deletion der einzelnen Genbereiche der verschiedenen *Xcv*-Deletionsmutanten. Angeben sind die Bereiche, die die Deletion umfassen in bp *upstream* des Translationsinitiationscodons (Startcodon), sowie bp *downstream* des Terminationscodons (Stopcodon).

Tab. 5: Angabe der Deletionsanfänge *upstream* des Translations-Initiationscodons und Deletionsenden *downstream* des Terminationscodons des jeweiligen Gens bzw. Genbereiche der *Xcv*-Deletionsmutanten

Deletion in <i>Xcv</i> 85-10	<i>upstream</i> des Translations-initiationscodons	<i>downstream</i> des Terminationscodons
<i>acnB</i>	1 bp	3 bp
<i>roaX-roaY-acnB</i>	5 bp	3 bp
<i>roaX-roaY</i>	5 bp	10 bp
<i>acnA</i>	2 bp	1 bp
<i>acnA2</i>	3 bp	1 bp
<i>flp</i>	6 bp	2 bp

2.10.13.3 Herstellung von *acn*-Doppelmutanten

Zur Untersuchung von Doppeldeletionen der Aconitasegene wurde das pOK-Deletionskonstrukt pOK Δ *acnA2* durch triparentale Konjugation in die Einzelmутanten (*Xcv* 85-10 Δ *acnA* und *Xcv* 85-10 Δ *acnB*) gebracht. Die für triparentale Konjugation verwendeten Donor- und Rezipientenstämme zur Erzeugung von Doppelmutanten sind in Tab. 6 gezeigt.

Tab. 6: Zur triparentalen Konjugation verwendete Donor-und Rezipientenstämme zur Erzeugung von *Xcv*-Doppelmutanten

Deletionsmutante	Donor	Rezipient
<i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>acnA2-acnA</i>	DH5 α pir/pOK:: <i>acnA2</i>	<i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>acnA</i>
<i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>acnA2-acnB</i>	DH5 α pir/pOK:: <i>acnA2</i>	<i>Xcv</i> 85-10 Δ <i>acnB</i>

Die triparentale Konjugation wurde in allen Fällen wie unter 2.10.11.4 beschrieben durchgeführt und die entsprechende Deletion durch Kolonie-PCR überprüft (Oligonukleotide; Tab. 12, Anhang).

2.10.14 Konstruktion von Plasmiden zur Komplementation von Deletionen in *Xcv*

Um zu untersuchen, ob die Auswirkungen der Deletionen im Stamm *Xcv* 85-10 tatsächlich auf die herbeigeführten Deletionen zurückzuführen sind, wurden Komplementationskonstrukte erstellt und in die jeweiligen Deletionsmutanten transferiert. Hierfür wurden die einzelnen Gene mit genomischer DNA aus *Xcv* 85-10 amplifiziert (Oligonukleotide, Tab. 12 im Anhang) und in verschiedene Vektoren kloniert. Die PCR-Produkte wurden mit XbaI/BamHI zur Komplementation von *acnB*, HindIII/XbaI im Fall von *roaX-roaY-acnB*, *roaX-roaY*, *roaX*, *flp* und *acnA2* und EcoRI/XbaI im Fall von *roaY*

geschnitten und in die XbaI/BamHI-, HindIII/XbaI bzw. EcoRI/XbaI Schnittstellen des pLAFR6-Vektors ligiert und die Konstrukte in XL1 Blue *E.coli* Stämme transformiert. Die so erhaltenen Plasmide pL6acnB, pL6roaX-roaY-acnB, pL6roaX-roaY, pL6roaX, pL6roaY, pL6acnA2 und pL6flp (konstruiert von Fr. Lindenstrauß) wurden in die Deletionsmutanten 85-10 Δ acnB, 85-10 Δ roaX-roaY-acnB, 85-10 Δ roaX-roaY (Wesolowska, 2012), 85-10 Δ acnA2 und 85-10 Δ flp (Hoppe, 2011) konjugiert oder nach Erstellung von elektrokompetenten Stämmen der Mutanten (2.10.10.3) diese durch Elektroporation übertragen. Neben pLAFR6 wurden acnB, acnA und acnA2 auch in den Golden-Gate-kompatiblen pBRM Vektor durch entsprechende BsaI Schnittstellen gebracht, wodurch die Genprodukte einen C-terminalen Myc-Tag erhielten (Szczyrny *et al.*, 2010).

2.11 Proteinbiochemische Methoden

2.11.1 Zellanzucht, Zellaufschluss und Gewinnung des Rohextraktes

Die Anzucht von *Xcv* Stämmen erfolgte in 200 ml NYG- oder MA-Medium mit Rifampicin und entsprechend anderen stamm-bzw. plasmidabhängigen, selektiven Antibiotika. Zur Anzucht von *E. coli* Stämmen wurde dagegen LB-Medium verwendet. Mit einer Übernachtskultur wurde eine 200 ml Hauptkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 37 °C (*E. coli*) bzw. 30 °C (*Xcv*) und 200 rpm bis zu einer gewünschten OD₆₀₀ (exponentielle Phase OD₆₀₀ = 0,8-1,0; stationäre Phase OD₆₀₀ = 1,8-2,0) inkubiert. Die Kulturen wurden bei 4 °C und 5000 rpm für 30 min geerntet und direkt um Zellaufschluss eingesetzt oder bei -20 °C gelagert. Das Zellpellet wurde in 1-2 ml 100 mM Tris/HCl Puffer, pH 8,0 resuspendiert und mit 2 µl DNaseI (10 U/µl), 1 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 1 mg Lysozym versetzt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (SONOPLUS Ultraschall-Homogenisator Bandelin, Berlin), wofür folgende Parameter gewählt wurden: Sonotrodentyp KE76, 30 Watt, 3 Zyklen a 2 min, Beschallung in 0,5 s Intervallen.

Die Suspension wurde in 2,5 ml Eppendorfgläser überführt und die Zelltrümmer bei 15000 rpm (Hermle Z160M (Hermle, Wehingen)) und 4 °C für 45 min von dem Zellextrakt getrennt. Das Zellextrakt wurde in ein neues Gefäß überführt und bei -20 °C aufbewahrt.

2.11.2 Bestimmung der Proteinkonzentration (Lowry *et al.*, 1951)

Es wurden 10 µl einer Proteinlösung mit 90 µl 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 in einem Eppendorfglas zusammengebracht, mit 1 ml Lösung C versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 150 µl Lösung D zugegeben und der Ansatz durch mehrmaliges Invertieren des Tubes gemischt. Nach einer 30minütigen Inkubation bei RT im Dunkeln erfolgte die Messung der Extinktion bei 750 nm

(Uvikon 900, Kontron Instruments, Rossdorf). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde parallel eine lineare Eichgerade mit BSA (Gerbü, Heidelberg) in einem Mengenbereich von 5-60 µg durchgeführt.

<u>Lösung A</u>	Na ₂ CO ₃ (w/v)	2 %
	Natriumtartrat (w/v)	0,5 %
	NaOH	1 N
<u>Lösung B</u>	CuSO ₄ x 5H ₂ O (w/v)	0,1 %
<u>Lösung C</u>	Lösung A (v/v) : Lösung B (v/v)	9:1
<u>Lösung D</u>	Folin-Ciocalteu's Phenol Reagenz (Fluka, Steinheim) (v/v)	50 %

2.11.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Untersuchung von Proteinen wurden diese in 10%igen SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970) ihrer molekularen Masse entsprechend aufgetrennt. Nach initialer Denaturierung mit 0,5 Vol 5 x SDS Probenpuffer (10 min, 95 °C) erfolgte die Auftrennung in vertikalen Minigel Apparaturen (Biorad, München). Das Sammel- und Trenngel wurde wie in Tab. 7 angegeben, vorbereitet.

Tab. 7.: Komponenten eines SDS-Gels und verwendete Puffer

Sammelgel	5 % (w/v) Acrylamid (37,5:1) 125 mM Tris/HCl, pH 6,8 0,1 % (w/v) SDS
Trenngel	10 % (w/v) Acrylamid (37,5:1) 376 mM Tris/HCl, pH 8,8 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) APS 0,1 % (v/v) TEMED
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) APS 0,1 % (v/v) TEMED
5 x SDS-Probenpuffer	315 mM Tris/HCl, pH 6,8 10 % (w/v) SDS 50 % Glycerin 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 25 % (v/v) β- Mercaptoethanol

Die Elektrophorese erfolgte bei 12,5 mA, beim Erreichen des Trenngels 25 mA je SDS-Gel unter Verwendung von 1x SDS-Laufpuffer. Als Größenstandard wurde der *PageRuler Prestained Protein*

Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) (Abb. 12) eingesetzt. Es wurden jeweils 40-80 µg Protein eingesetzt.

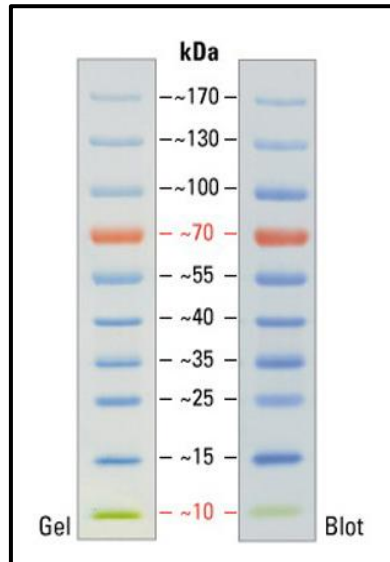


Abb. 12: PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot).

Das Bild repräsentiert den Marker bei der Auftrennung in 4-20 % SDS-Page und anschließendem Transfer auf eine Membran.

2.11.4 Western-Blot-Analyse

Zur Detektion von Proteinen mittels spezifischen Antikörpern wurden diese nach der elektrophoretischen Auftrennung mit Hilfe einer *semi dry* Fastblot B34-Apparatur (Biometra, Göttingen) auf spezielle Membranen überführt. Im Fall der Aconitasen wurden hierfür Nitrocellulosemembranen (Machery & Nagel, Düren) und zum Nachweis von Proteinen mit C-terminalem myc-Tag Parablot PVDF-Membranen (Machery&Nagel, Düren) verwendet. Die Gele, zugeschnittene Whatmanpapiere (Schleicher & Schüll, Dassel) sowie die Nitrocellulosemembranen wurden für 10 min in Towbin-Puffer geschwenkt. Im Fall der Proteine mit C-terminalen myc-Tag wurde die PVDF-Membran für 3-5 Sekunden in 80-100%igen Methanol aktiviert, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gespült und anschließend mit dem SDS-Gel und dem Whatmanpapier für 10 min in Transferpuffer geschwenkt.

Anschließend wurde von der Anode aus folgende Schichtung luftblasenfrei vorgenommen 3 Lagen Towbin bzw. Transfer-Puffer-getränktes Whatman-Papier, Nitrocellulosemembran, Polyacrylamidgel, 3 Lagen getränktes Whatman-Papier. Der Transfer erfolgte für 90 min und 1,2 mA pro cm^2 Membranfläche.

Towbin-Puffer: 25 mM Tris
 0,015 M Glycin
 20 % (v/v) Methanol

Transfer-Puffer: 25 mM Tris
 0,192 M Glycin
 20 % (v/v) Methanol
 pH 8,3

2.11.5 Proteindetektion mittels ECL-Reaktion (*Enhanced Chemiluminescence*)

Nach dem Transfer der Proteine erfolgte eine Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen für Antikörper auf den Membranen. Dies erfolgte mit 1 x PBS-Puffer (4 mM KH_2PO_4 ; 16 mM Na_2HPO_4 ; 115 mM NaCl) und 5 % (w/v) Magermilchpulver (Sucofin, Zeven) und im Fall von PVDF-Membranen mit dem Zusatz von 3 % (w/v) BSA. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min mit 1 x PBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20 gewaschen. Danach schloss sich eine Inkubation mit einem primären proteinspezifischen Antikörper (α -AcnA, 1:5000; α -AcnB, 1:10000 in 1 x PBS + 1,5 % BSA; Jeffrey Green) bzw. Antikörper-Konjugat (Anti-C-myc-Peroxidase 1:1000 in 1 x PBS mit 0,1 % Tween 20 + 1,5 % (w/v) BSA; Roche Diagnostics, Mannheim) im Fall der PVDF-Membranen über Nacht bei 4 °C an. Um anschließend nichtgebundene Antikörper von der Membran zu entfernen, wurden diese wiederum 3 x 5 min mit 1 x PBS + 0,1 % Tween 20 gewaschen. Nach den Waschschritten konnte die PVDF-Membran, welche lediglich mit einem Antikörper-Konjugat behandelt wurde, direkt zur Detektion eingesetzt werden. Die Nitrocellulosemembranen dagegen wurden anschließend für 1 h mit einem 1 x PBS verdünnten Antikörper-Konjugat (*goat anti-rabbit* IgG (H+L)-HRP-Konjugat; 1:5000 in 1 x PBS+1,5 % (w/v) BSA; Biorad, München) inkubiert. Durch die, an den (H+L) HRP- und Anti-C-myc-Konjugat befindliche Meerettichperoxidase erfolgte die Detektion der Proteine indirekt durch die Oxidation von Luminol in Anwesenheit von H_2O_2 zu einem lichtemittierenden Produkt. Für die Reaktion wurden Lösung A (100 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 % (v/v) 250 mM Luminol (Fluka, Steinheim) in DMSO; 0,5 % (w/v) 90 mM *p*-Coumarsäure (Fluka, Steinheim) in DMSO) und Lösung B (100 mM Tris/HCl; pH 8,0; 0,018 % (v/v) H_2O_2) im Dunkeln miteinander vermischt und die Membran für 1 min darin geschwenkt. Nach luftblasenfreier Überführung der Membran in eine Plastikfolie wurde je nach erwarteten Detektionssignal ein Röntgenfilm (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche Diagnostics, Mannheim) exponiert. Der Film wurde für 3-5 min in der Entwicklerlösung (Calbe Fotochemie, Calbe) geschwenkt, anschließend in Wasser gewaschen und zuletzt in die Fixierlösung gegeben (Calbe Fotochemie, Calbe).

2.12 Geräte

In den zuvor beschriebenen Abschnitten wurden einige Geräte und deren Hersteller angegeben. Weiterhin wurden folgende Geräte verwendet:

Thermoblock	Trio-Thermoblock , Nr. 9511386 (Biometra, Göttingen)
Laborwippen	Rocking Platform (Biometra, Göttingen)
Magnetrührer	Magnetmix 2070 (Roth, Karlsruhe)
Laminarbox	LF MRF 06.12 GS (Steag, Pfullingen)
Photometer	Spekol 1200 (Carl Zeiss Technology, Jena)
Inkubationsschüttler	TS1 Thermoshaker (Biometra, Göttingen)
	Infors HT TR-250 (Infors AG, Bottmingen)
	Power Supply EV243 (Peqlab, Erlangen)
	572 (Kern & Sohn, Balingen-Frommern)
Waagen	EK-1200 (A&D, Japan)
	Feinwaage FX-200 (A&D, Japan)
	Sorvall RC6 Plus (SLA-3000, SS34, F10S, Dupont Instruments, USA)
Zentrifugen	Hettich Universal 30 RF (Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen)
	Eppendorf -Zentrifuge, Hermle Z160M (Hermle, Wehingen)

3 Ergebnisse

3.1 Die Anordnung der Gene *roaX-roaY* und *acnB* ist bei Vertretern der Familie *Xanthomonadaceae* konserviert

Aufgrund der Organisation des *acn*-Genclusters in *Xcv*, kann vermutet werden, dass *acnB* mit den Genen *roaX* und *roaY* kotranskribiert wird und diese Gene nur eine Promotorstruktur besitzen. Eine Analyse von Genprodukten, welche Ähnlichkeiten zu AcnB, RoaX, RoaY und AcnA aufwiesen, zeigte eine konservierte Anordnung der kodierenden Gene in Vertretern der Familie der *Xanthomonadaceae*. Die Abb. 13 zeigt eine schematische Anordnung der Gene *acnA*, *roaX*, *roaY* und *acnB* in verschiedenen *Xanthomonas* Spezies, einigen anderen Vertretern der Familie *Xanthomonadaceae* und in *E. coli*.

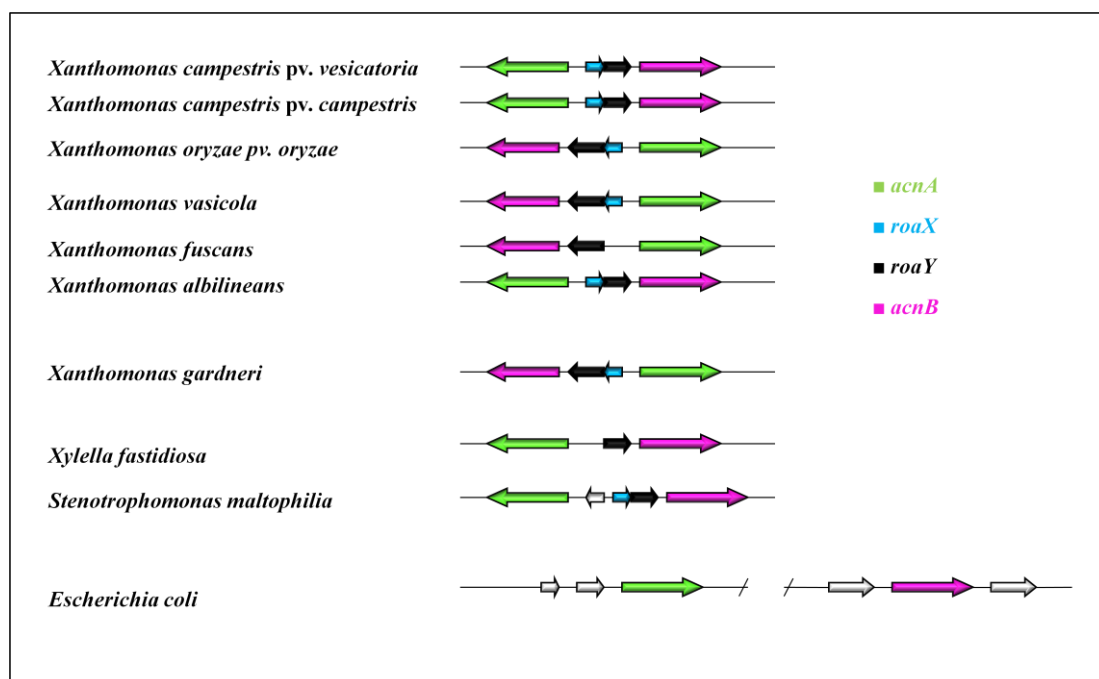


Abb. 13: Schematischer Überblick des *acnA-roaX-roaY-acnB* Locus in einigen Mitgliedern der Familie der *Xanthomonadaceae* und *E. coli*.

Die Abbildung zeigt schematisch die Organisation der *acnA* und *acnB* Gene zusammen mit *roaX* und *roaY* in einigen Vertretern der Familie *Xanthomonadaceae*. Die Gene *roaX* und *roaY* aus *Xcv* kodieren putative Proteine mit unbekannter Funktion. Zum Vergleich wurden auch die *acnA*- und *acnB* Gene von *E. coli* gezeigt, wobei dieses Bakterium keine *acnA*- und *acnB*-benachbarten Gene besitzt, deren Produkte Ähnlichkeiten zu *roaX*- und *roaY* aus *Xcv* aufweisen (weiße Pfeile). Die Schrägstriche im Schema des *E. coli* Genoms stellen eine, voneinander entfernte Lokalisation der Gene im Genom dar. Die Accession Nr. der Stämme sind wie folgt: *Xcv* 85-10, AM039952; *X. campestris* pv. *campestris* str. 8004, CP000050; *X. oryzae* pv. *oryzae* str. KACC10331, AE13598; *X. axonopodis* pv. *citri* str. 306, AE008923; *X. albilineans* str. GPE PC73, FP565176; *X. gardneri* ATCC 19865, AEQX00000000 inkomplette Annotation (Potnis *et al.*, 2001); *Xylella fastidiosa* str. M-23, CP000941; *Stenotrophomonas maltophilia* str. K279a, AM743169; *E. coli*, CP001509.

Die dargestellten Pfeile repräsentieren schematisch Gene, deren Produkte Ähnlichkeiten zu AcnA (grün), AcnB (pink), RoaX (blau) oder RoaY (schwarz) aus *Xcv* aufweisen. Unter den gezeigten

Mitgliedern der *Xanthomonadaceae* ist eine ähnliche Anordnung von Genen zu finden, deren Produkte Ähnlichkeiten zu *AcnA*, *Roax*, *Roay* und *AcnB* aufweisen. Im Genom von *Xanthomonas fuscans* ist jedoch kein Gen dessen Produkt Ähnlichkeit zu *Roay* aus *Xcv* in einem *acn*-Cluster zu finden. Auch bei *Xylella fastidiosa* und *Stenotrophomonas maltophilia* liegt eine ähnliche Genanordnung im Genom vor. Während *X. fastidiosa* ein phytopathogenes Bakterium ist und Krankheiten bei Zitrone und Weintrauben verursacht, lebt *S. maltophilia* symbiontisch in Pflanzen und stellt aber auch ein opportunistisches, nosokomiales Pathogen dar (Cobine *et al.*, 2013) (Alavi *et al.*, 2013). Diese Genanordnung ist bei anderen Gammaproteobakterien, wie beispielsweise *E. coli*, nicht zu finden. Die Konservierung des *acn*-Genclusters in der Gattung *Xanthomonas* und anderen Mitgliedern der *Xanthomonadaceae* lässt somit vermuten, dass die Gene *roax*, *roay* und *acnB*, gerade bei phytopathogenen Bakterien kotranskribiert werden und deren Genprodukte eine funktionelle Gemeinsamkeit besitzen könnten.

3.2 Die Gene *roax*, *roay* und *acnB* werden kotranskribiert

Mit Hilfe von RT-PCR mit vorangegangener cDNA-Synthese sollte überprüft werden, ob *roax*, *roay* und *acnB* kotranskribiert werden und ein Operon bilden (Abb. 14).

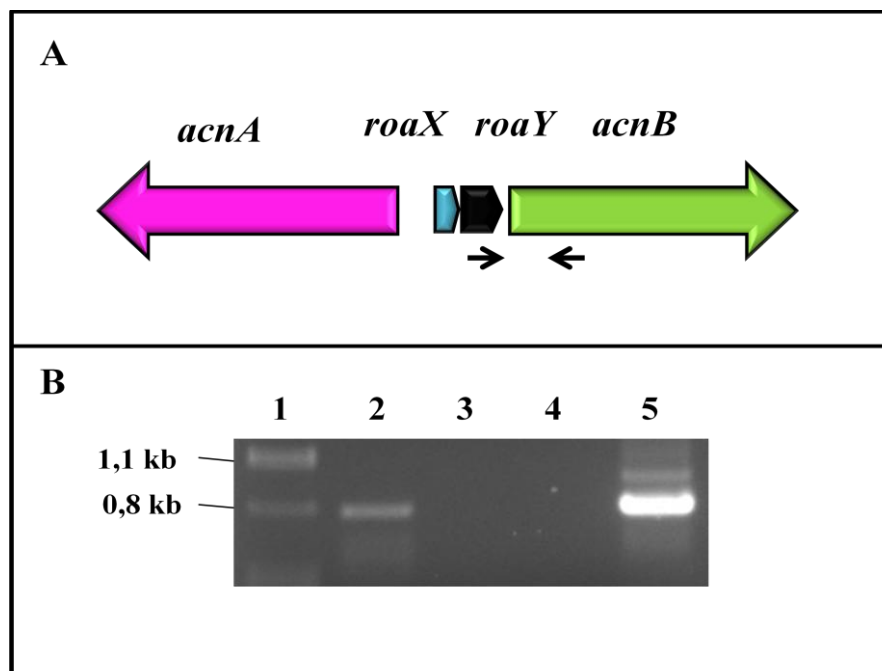


Abb. 14: Nachweis der Kotranskription der Gene *roax*, *roay* und *acnB*, in *Xcv* 85-10.

Analyse der Kotranskription der Gene *roax-roay-acnB* in *Xcv* mit Hilfe von RT-PCR. (A) Zeigt eine schematische Darstellung der Anordnung der Gene *acnA*, *roax*, *roay* und *acnB*, sowie die Bindestellen der *roay*- bzw. *acnB*-spezifischen Primern. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus *Xcv* 85-10 isoliert und zur spezifischen cDNA Synthese eingesetzt. (B) Auftrennung der PCR-Produkte in einem 1%igen Agarosegel nach Amplifizierung mit den Primern *f-seqacnB* und *r-seq3565* (Tab. 12; Anhang). Spur 1: λ -Pst-Marker; Spur 2: PCR mit cDNA; Spur 3: PCR mit H_2O_{bidest} ; Spur 4: PCR mit Gesamt-RNA; Spur 5: PCR mit genomischer DNA aus *Xcv* 85-10 als *template*.

Nach der Isolierung von Gesamt-RNA aus *Xcv*-Wildtyp 85-10 wurde diese zur spezifischen Synthese von cDNA mit dem Oligonukleotid r-acnB-RT verwendet. Die synthetisierte cDNA wurde anschließend als *template* in einer nachfolgenden PCR mit den Primern r-seqacnB und f-seq3565 (Tab. 12; Anhang) eingesetzt. Die Abb. 14 zeigt das Ergebnis der durchgeführten RT-PCR. In der Spur 2 mit cDNA als *template* lässt sich ein eindeutiges Amplifikat mit einer Größe von ca. 800 bp erkennen, welches dem Kontrollprodukt der PCR mit genomischer DNA aus *Xcv* 85-10 entspricht (Spur 5). Die durchgeführten Kontroll-PCR mit H₂O_{bidest} (Spur 3) und Gesamt-RNA als *template* führten zu keinem Produkt. Zur Kontrolle des Experiments wurde die cDNA der einzelnen Stämme auch zur Amplifizierung mit 16S rDNA-spezifischen Primern eingesetzt, wobei jeweils ein spezifisches Produkt detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, dass *roaX*, *roaY* und *acnB* kotranskribiert wurden, diese Gene einem gemeinsamen Operon angehören und dass eine mögliche funktionelle Gemeinsamkeit der Genprodukte besteht. Diese Ergebnisse werden auch von einer Studie von Schmidtke *et al.* (2012) gestützt, wobei durch 454 Sequenzierungen nur eine Transkriptions-Initiations-Stelle stromaufwärts von *roaX* gefunden werden konnte. Dies spricht dafür, dass die Transkription von *acnB* auch an dieser Position initiiert wird.

3.3 AcnB wird sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Wachstumsphase synthetisiert

Die Mengen an AcnB in *Xcv*-Zellen wurden in der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase mit Hilfe von Western-Blot-Analysen untersucht. Das AcnB Protein aus *Xcv* 85-10 (AcnB_{*Xcv*}) besitzt eine 72%ige Identität, sowie eine Ähnlichkeit von 84 % in der Aminosäuresequenz zu AcnB aus *E. coli* (AcnB_{*E. coli*}). Der Einsatz von spezifischen Antikörpern gegen AcnB_{*E. coli*} zeigte in *Xcv*-Zellextrakten eine Kreuzreaktivität mit einem Polypeptid mit einer molekularen Masse von ca. 99 kDa (Abb. 15 A). Diese kreuzreagierende Proteinbande konnte jedoch nicht in Extrakten der Deletionsmutanten *Xcv* 85-10Δ*acnB* und *Xcv* 85-10Δ*roaX-roaY-acnB* detektiert werden. Somit entspricht die kreuzreagierende Proteinbande dem AcnB Protein aus *Xcv* 85-10. Obwohl AcnB_{*Xcv*} eine theoretische, molekulare Masse von 92,659 kDa besitzt, ist durch Untersuchungen von Aconitasen anderer Bakterien Spezies bekannt, dass Aconitase B-Proteine im SDS-Gel ein, ihrer Größe, abweichendes Laufverhalten aufweisen (Bradbury *et al.*, 1996).

Die Abb. 15 A zeigt, dass AcnB auch in der stationären Wachstumsphase nachzuweisen war. Die Intensität der Bande war etwa 2-fach höher als in der exponentiellen Phase.

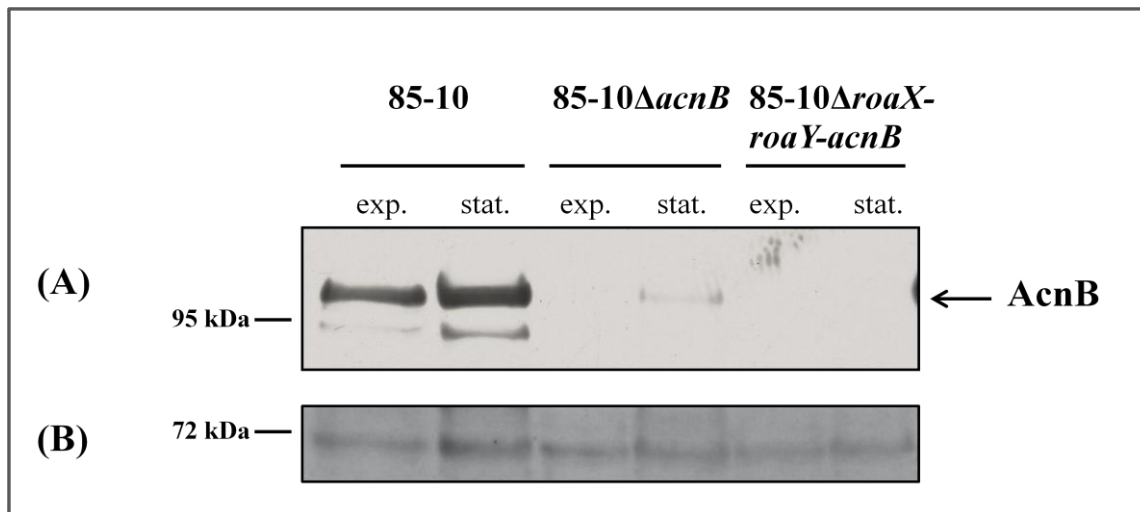


Abb. 15: Analyse der Mengen des AcnB Proteins in verschiedenen Wachstumsphasen der *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10 Δ *acnB* und 85-10 Δ *roaX-roaY-acnB*.

Western-Blot-Analyse mit Extrakten der exponentiellen und stationären Wachstumsphase der *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10 Δ *acnB* und 85-10 Δ *roaX-roaY-acnB*. Es wurden jeweils 25 μ g Protein in einem 8 % SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit Antikörper gegen AcnB aus *E. coli* (1:10000) inkubiert. (A): AcnB Protein; (B): unspezifisches, kreuzreagierendes Protein, welches als Ladungskontrolle dient; Marker: *Prestained Page Ruler Protein Marker*. exp.=exponentielle Wachstumsphase; stat.= stationäre Wachstumsphase

Weiterhin konnte ein zweites kreuzreagierendes Protein in den Extrakten von *Xcv* 85-10 mit einer molekularen Masse von ca. 90 kDa detektiert werden (Abb. 15 A), wobei es sich möglicherweise um ein Abbauprodukt des AcnB-Proteins handelt. Die schwache, kreuzreagierende Bande im Extrakt der stationären Phase der *Xcv*-Mutante 85-10 Δ *acnB*, die eine ähnliche Größe wie AcnB aufweist, konnte nicht identifiziert werden. Da diese Bande nicht in Extrakten der Mutante 85-10 Δ *roaX-roaY-acnB* detektiert werden konnte, wird die Synthese dieses Proteins eventuell direkt oder indirekt von RoaX oder RoaY beeinflusst. Die Intensität der Banden des unspezifischen, kreuzreagierenden Proteins (Abb. 15 B) mit einer molekularen Masse von ca. 70 kDa zeigte, dass in jeder Spur gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

3.4 Einfluss von AcnB auf das Wachstum von *Xcv* in planta

Zur Untersuchung des Einflusses einer Deletion von *acnB* auf das Wachstum von *Xcv* 85-10 in planta, wurde das Wachstum der *Xcv*-Mutanten 85-10 Δ *acnB* und 85-10 Δ *roaX-roaY-acnB* mit dem des Wildtypstammes verglichen (2.6.2). Als Kontrolle diente der Stamm 85* Δ *hrcN*, welcher die ATPase HrcN des TypIII-Sekretionssystems nicht synthetisieren kann und sich durch verringertes Wachstum in planta auszeichnet (Lorenz and Buttner, 2009). Die Abb. 16 zeigt das Wachstum der Stämme. Es ist deutlich zu erkennen, dass beide *acnB* Deletionsmutanten ein deutlich verringertes Wachstum gegenüber dem Wildtyp 85-10 aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass AcnB notwendig für ein optimales Wachstum von *Xcv* in planta ist.

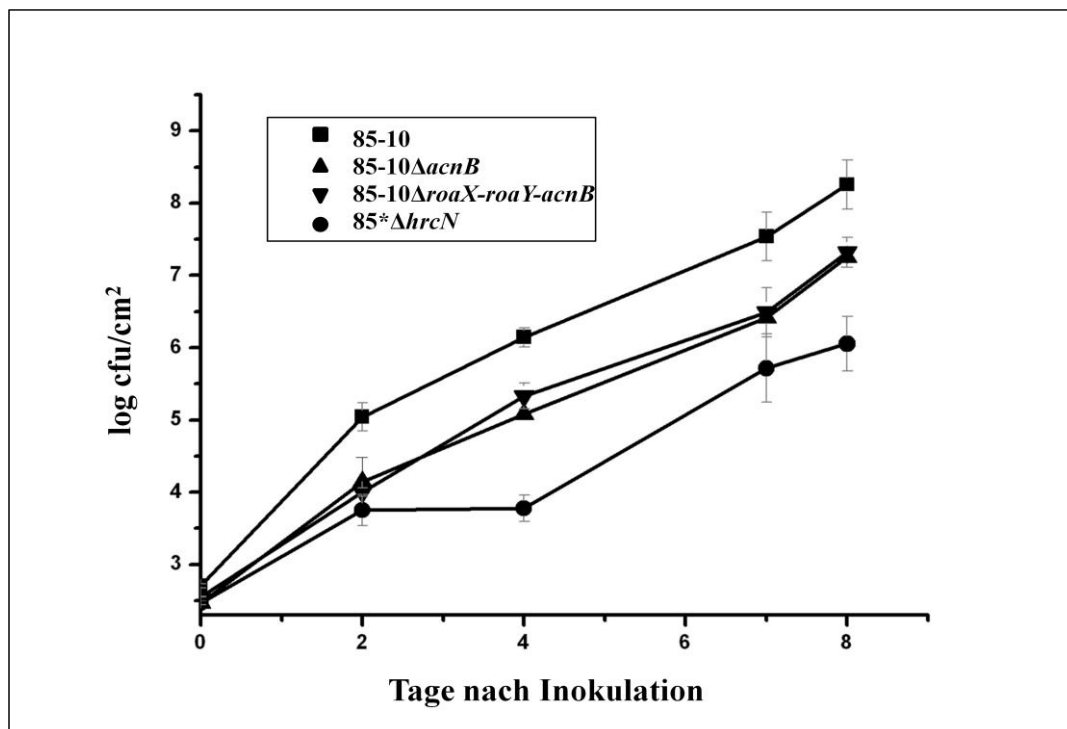


Abb. 16: Wachstumsanalyse *in planta* der *Xcv*-Deletionsmutanten 85-10ΔroaX-roaY-acnB und 85-10ΔacnB im Vergleich zum Wildtypstamm 85-10.

Die *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10ΔacnB, 85-10ΔroaX-roaY-acnB und 85*ΔhrcN wurden mit 10 mM MgCl₂ auf eine OD₆₀₀ von 5×10^4 cfu/ml eingestellt und in Blätter gleicher Größe von 3 verschiedenen Paprikapflanzen infiltriert. Das Wachstum der Stämme wurde 8 Tage verfolgt und dokumentiert. Aus den erhaltenen Werten wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet und eingezeichnet.

Um zu untersuchen, ob das reduzierte Wachstum tatsächlich auf die Deletion von *acnB* zurückzuführen ist, wurde das Wachstum der Mutante nach der Einführung des *acnB* Gens auf dem Konstrukt pL6acnB erneut getestet (hier nur für 85-10ΔacnB gezeigt). Da im Laufe dieser Experimente beobachtet wurde, dass Stämme die ein pLAFR6-Konstrukt trugen, ein leicht verringertes Wachstum aufwiesen, wurden die Kontrollstämme *Xcv* 85-10/pLAFR6 und *Xcv* 85-10ΔacnB/pLAFR6 hergestellt und ebenfalls für die Wachstumsanalyse verwendet. Die Ergebnisse der Wachstumsanalysen *in planta* sind in Abb. 17 zu sehen.

Während dieses Experiments konnte beobachtet werden, dass die *Xcv acnB*-Deletionsmutante mit zusätzlichen pLAFR6 Leerplasmid (85-10ΔacnB/pLAFR6) ein stärker reduziertes Wachstum als die eigentliche Deletionsmutante ohne Plasmid aufwies, ähnlich dem *Xcv*-Stamm 85*ΔhrcN. Der Wildtypstamm 85-10 mit zusätzlichen pLAFR6 (85-10/pLAFR6) wies ein leicht reduzierteres Wachstum im Vergleich zu 85-10 auf. Wie Abb. 17 verdeutlicht, konnte dieses Wachstum ($\log \text{cfu/cm}^2 = 8,0$) am 7. Tag nach der Inokulation vom *Xcv* Komplementationsstamm 85-10ΔacnB/pL6acnB ebenfalls erreicht werden. Demnach führte die Synthese des plasmidkodierten AcnB zu einem ähnlichen Wachstum wie im Fall des *Xcv*-Stammes 85-10/pLAFR6.

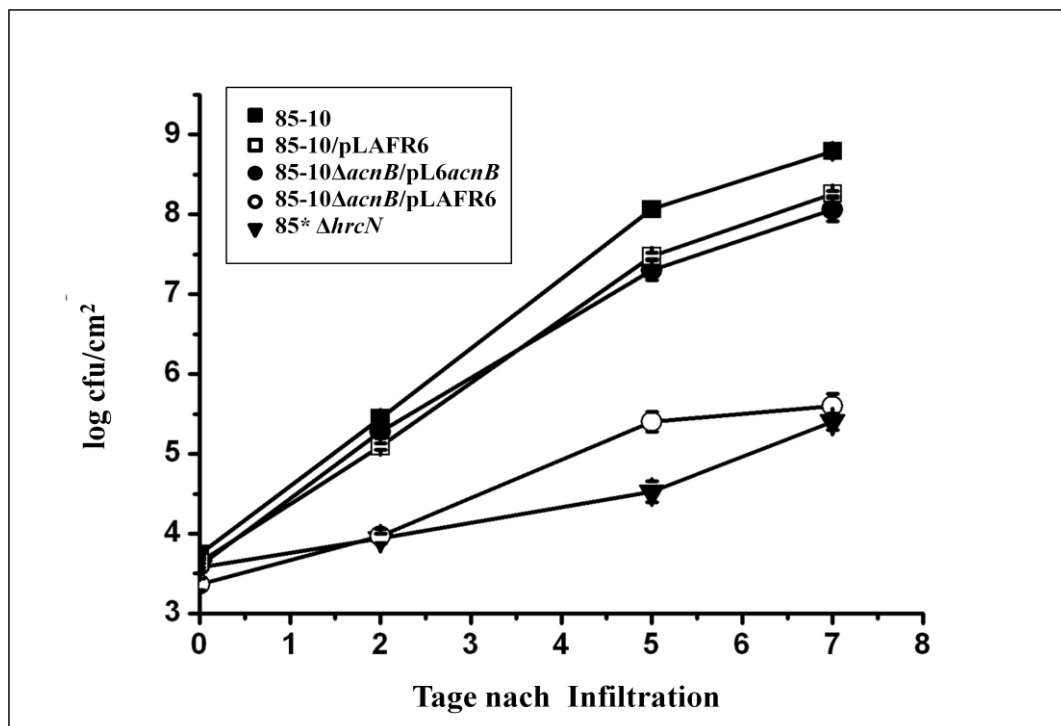


Abb. 17: Wachstumsanalyse der *Xcv*-Deletionsmutante 85-10Δ*acnB*/pLAFR6 und des Komplementationsstammes 85-10Δ*acnB*/pL6*acnB* im Vergleich zu den *Xcv*-Stämmen 85-10 und 85-10/pLAFR6 in *planta*.

Das Wachstum der *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10Δ*acnB*, 85*Δ*hrcN*, 85-10/pLAFR6, 85-10Δ*acnB*/pL6*acnB* und 85-10Δ*acnB*/pLAFR6 wurden für 7 Tage analysiert und dokumentiert. Es wurden voll entwickelte Blätter von 5-6 Wochen alten Paprikapflanzen (Kultivar ECW) infiltriert. Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert von drei Proben, welche aus drei verschiedenen Pflanzen entnommen wurden. Die Standardabweichungen sind eingezeichnet. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Fehlen von *AcnB* zu einer Reduktion des Wachstums *in planta* führte und dass durch das Einbringen von *acnB in trans* in den *Xcv* Stamm 85-10Δ*acnB* der Wachstums-Phänotyp des Wildtyps erreicht wurde. Es ist festzuhalten, dass *AcnB* eine wichtig Rolle für das optimale Wachstum von *Xcv* in Paprikapflanzen spielt.

3.5 Eine Deletion von *acnB* in *Xcv* führt zu verringerter HR in resistenten und verringerter Bildung von Krankheitssymptomen in suszeptiblen Pflanzen

Die *Xcv*-Deletionsmutanten 85-10Δ*acnB* und 85-10Δ*roaX-roaY-acnB* wurden neben dem Wachstum *in planta* auch hingehend der Fähigkeit eine hypersensitive Reaktion bei resistenten Pflanzen (Kultivar ECW-10R) und Symptome der bakteriellen Fleckenkrankheit in Form von wässrigen Läsionen bei suszeptiblen Pflanzen (Kultivar ECW) zubilden. Hierfür wurden Infiltrationsassays, wie unter 2.7 beschrieben, durchgeführt. Als Kontrolle wurde 10 mM MgCl₂ infiltriert, welches weder zur Ausbildung von wässrigen Läsionen noch zur Bildung einer HR führte (nicht gezeigt). Die Abb. 18 zeigt die Ergebnisse der Infiltrationsassays.

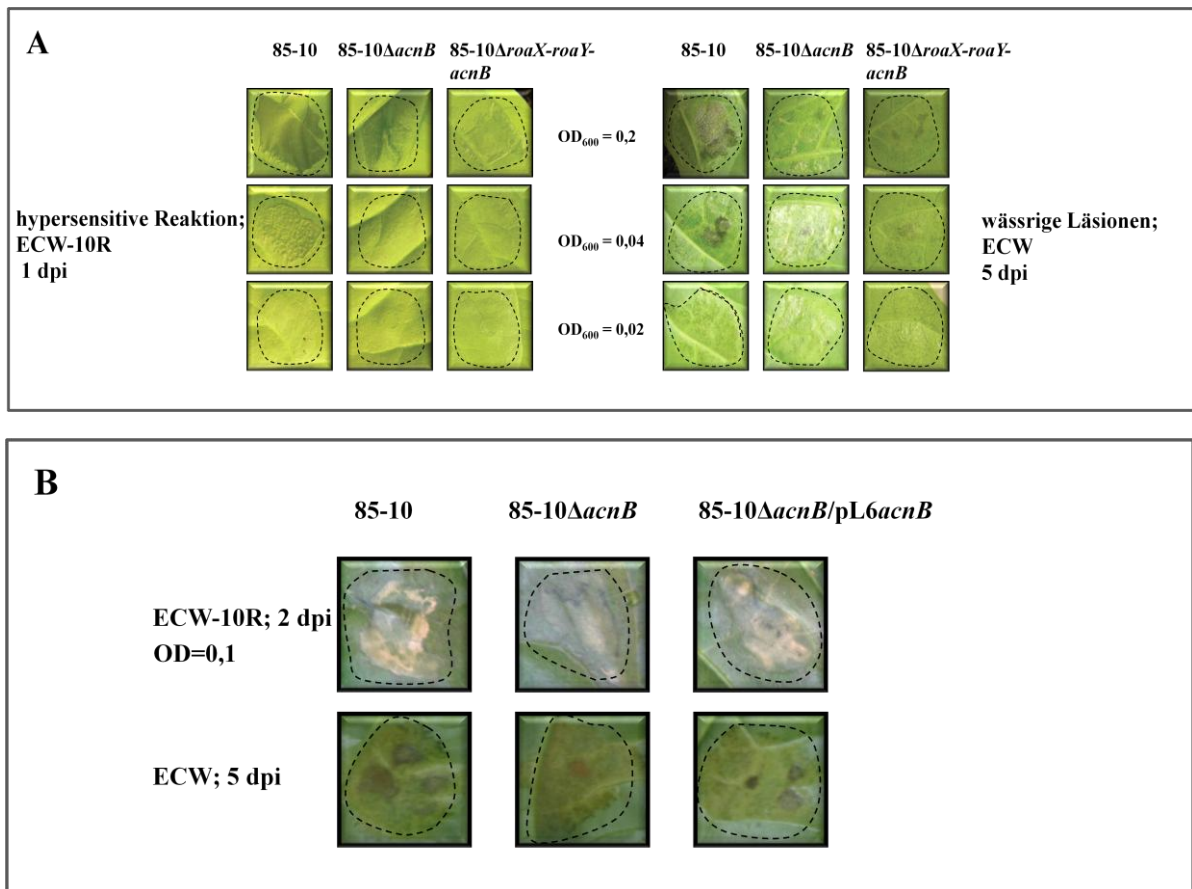


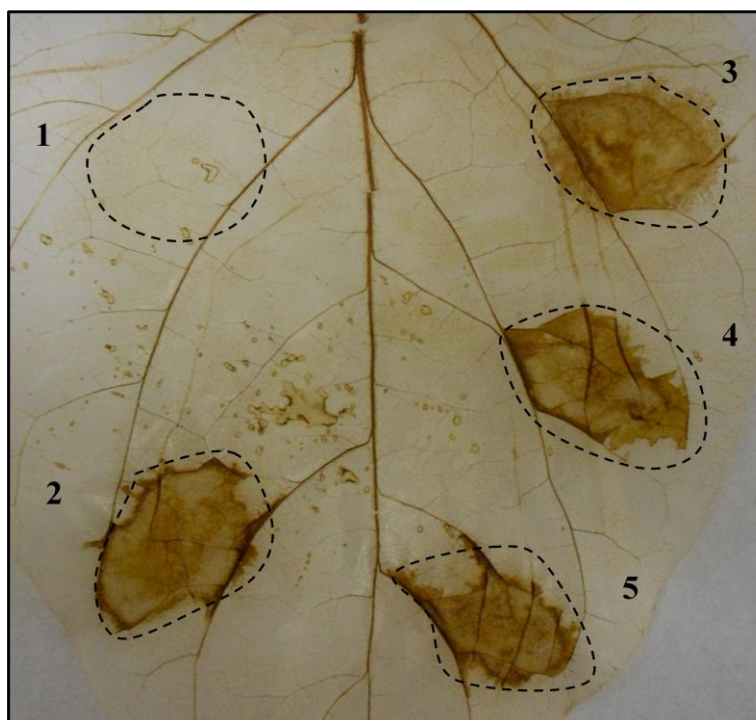
Abb. 18: Vergleich der Bildung von hypersensitiven Reaktionen und Krankheitssymptomen zwischen 85-10 und *acnB* Deletionsmutanten.

Die *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10 Δ *acnB*, 85-10 Δ *roaX-roaY-acnB* und 85-10 Δ *acnB*/pL6*acnB* wurden an gegenüberliegenden Positionen des Blattes infiltriert. Die gezeigten Blattflächen wurden mit den angegebenen Bakteriendichten inokuliert (A) Gezeigt ist die Bildung einer HR nach Infiltration der Stämme 85-10, 85-10 Δ *acnB* und 85-10 Δ *roaX-roaY-acnB*; 1 dpi (ECW-10R) bzw. die Bildung von wässrigen Läsionen; 5 dpi (ECW). (B) Ausbildung der HR (2 dpi) und Krankheitssymptomen als wässrige Läsionen (5 dpi) der *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10 Δ *acnB* und des Komplementationsstammes 85-10 Δ *acnB*/pL6*acnB*. Die Dokumentation erfolgte von der Blattunterseite. dpi= days post infiltration

Die Abb. 18 A zeigt, dass die Infiltration beider *acnB* Deletionsmutanten, sowohl zu einer reduzierten HR bei ECW-10R Pflanzen, als auch zu einer verringerten Ausbildung von wässrigen Läsionen bei ECW Pflanzen führte. Diese Effekte waren besonders deutlich bei der Infiltration einer Bakteriendichte OD₆₀₀ von 0,2 zu verzeichnen. Somit hat die Deletion von *acnB* einen reduzierten Phänotyp in resistenten und suszeptiblen Pflanzen zur Folge. Dieses Ergebnis wurde auch durch die Analyse des *Xcv* Komplementationsstammes 85-10 Δ *acnB*/pL6*acnB* bestätigt (Abb. 18 B), da das Konstrukt pL6*acnB* in der *acnB* Mutante zur Wiederherstellung der Fähigkeit einer Ausbildung der HR bzw. wässrigen Läsionen, wie im Wildtypstamm, führte. Das AcnB Protein scheint demnach eine Rolle bei der Etablierung einer HR und Krankheitssymptome zu besitzen, ist aber möglicherweise auf das gezeigte verzögerte Wachstum der *acnB* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp *in planta* zurückzuführen.

3.6 Infiltration von *Xcv* 85-10 führt zur Freisetzung von ROS *in planta*

Aconitase B Enzyme verfügen über ein [4Fe-4S]-Cluster, welches sensitiv gegenüber oxidativem Stress ist. Da eine Deletion von *acnB* in *Xcv* 85-10 zu einem reduzierten Wachstum *in planta* führt, scheint AcnB während der Besiedlung der Wirtspflanze, aufgrund seines Fe-S-Clusters, an der Sensierung von veränderten Umweltbedingungen *in planta* beteiligt zu sein. Diese können neben Substraten, Eisen und Sauerstoff auch das Vorhandensein von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) sein. Da postuliert wird, dass es bei der Infiltration von *Xcv* 85-10 in Paprikablättern zur Freisetzung von ROS als Bestandteil der pflanzlichen Abwehr kommt, sollte diese These mit Hilfe des Chromogens Diaminobenzidin (DAB) überprüft werden. Die Infiltration, Färbung und Entfärbung der Blätter erfolgte wie unter 2.8 beschrieben. Ein DAB-gefärbtes Blatt nach Infiltration mit *Xcv* 85-10 mit verschiedenen optischen Dichten der Bakterienkultur (0,01; 0,04; 0,1; 0,2 bei 600 nm) zeigt die Abb. 19.



ECW; 7 dpi

- 1 10 mM MgCl₂
- 2 *Xcv* 85-10 OD₆₀₀ = 0,2
- 3 *Xcv* 85-10 OD₆₀₀ = 0,1
- 4 *Xcv* 85-10 OD₆₀₀ = 0,04
- 5 *Xcv* 85-10 OD₆₀₀ = 0,01

Abb. 19: Färbung eines Paprikablattes des Kultivars ECW mit 0,1%iger DAB-Lösung nach Infiltration mit *Xcv* 85-10.

Gezeigt ist ein *C. annuum* Blatt des Kultivars ECW 7 Tage nach Infiltration von *Xcv* 85-10 mit verschiedenen optischen Dichten bei 600 nm (0,01; 0,04; 0,1; 0,2) und anschließender DAB-Färbung (DAB; 3,3'-Diaminobenzidin (w/v); Sigma, München). Die Infiltration erfolgte in die Blattunterseite einer 3-4 Wochen alten Pflanze. Die Färbung erfolgte mit frischer DAB-Lösung für 2 h bei RT. Die Blätter wurden anschließend zur Entfärbung bei 95 °C im Wasserbad gekocht und über Nacht in Chloralhydrat ((w/v); 2,5 mg/ml; Roth, Karlsruhe) verwahrt. Am nächsten Tag wurden die Blätter mit H₂O gespült und zwischen Papiertüchern getrocknet.

Hier sind deutlich bräunliche Verfärbungen an den infiltrierten Blattbereichen zu erkennen, während es bei der Infiltration mit 10 mM MgCl₂ zu keiner Verfärbung des Blattgewebes kam. Dies zeigt, dass

es an den, mit *Xcv* 85-10, infiltrierten Blattbereichen zur Bildung bzw. Freisetzung von H_2O_2 gekommen ist.

Somit kann geschlussfolgert werden, dass es während der Besiedlung des Paprikablattes von ECW mit *Xcv* 85-10 zur Ausbildung von ROS, vermutlich als Abwehrstrategie der Pflanze, kommt.

3.7 Die Ausbildung eines *AcnB*-Enzyms ist nicht erforderlich für das Wachstum von *Xcv* *in vitro* in MA-Medium

Zur Untersuchung des Wachstums von *Xcv* und den erstellten *acnB* Deletionsmutanten *in vitro* wurde NYG sowie 1 x MA-Medium verwendet. Beide *Xcv acnB* Deletionsmutanten 85-10 $\Delta acnB$ und 85-10 $\Delta roaX-roaY-acnB$ zeigten eine ähnliche Wachstumsrate und die gleiche End-OD₆₀₀, wie der Wildtypstamm 85-10, in NYG-Medium (Daten nicht gezeigt). Wachstumsanalysen, die in 1 x MA-Medium mit Saccharose und Casaminoacids als C-Quelle durchgeführt wurden, zeigten, dass die Mutanten auch in diesem Medium ein dem Wildtyp-ähnliches Wachstum aufwiesen. Die Abb. 20 zeigt das Wachstum der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp in 1 x MA-Medium.

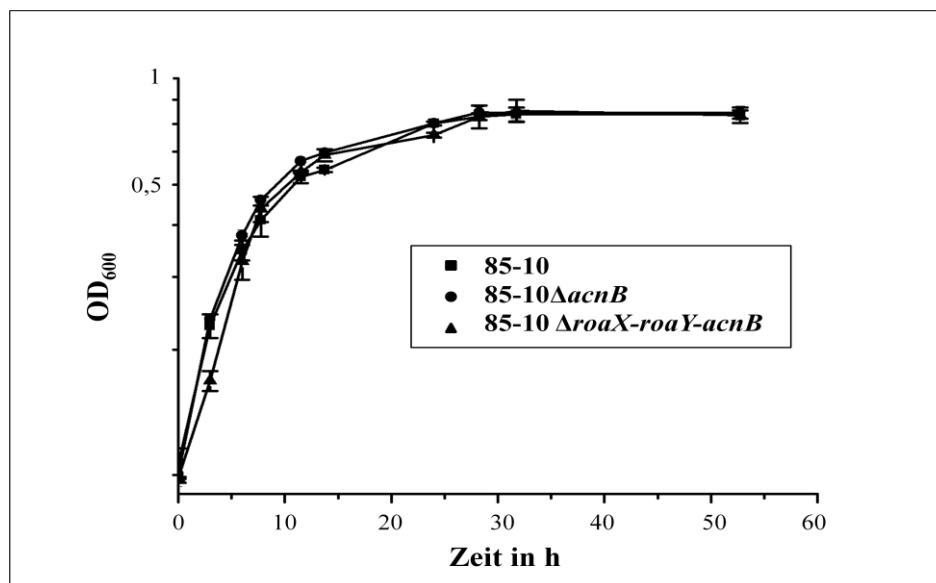


Abb. 20: Wachstum der *Xcv acnB* Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp 85-10 in 1 x MA-Medium..

Die *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10 $\Delta acnB$ und 85-10 $\Delta roaX-roaY-acnB$ wurden mit einer Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Das Wachstum wurde für 53 h analysiert und dokumentiert. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden aus 3 verschiedenen Messungen gebildet

Die Wachstumsexperimente in 1 x MA-Medium zeigten, dass weder eine Deletion von *acnB* noch von *roaX-roaY-acnB* einen Einfluss auf das *in vitro* Wachstum von *Xcv* 85-10 hat.

3.8 Eine Deletion von *acnB* führt zu verzögertem Wachstum in Minimalmedium mit Citrat als C-Quelle

Da Citrat das Substrat der Aconitase Enzyme darstellt, wurde dieses als mögliche C-Quelle im Apoplasten von Paprikapflanzen diskutiert. Kürzliche Studien über Citrat im Apoplasten von Tomatenpflanzen (Rico and Preston, 2008) sowie die erhöhte Expression des Gens *citH* von *Xcv* *in planta*, welches für einen Citrattransporter kodiert (Tamir-Ariel *et al.*, 2007; Tamir-Ariel *et al.*, 2011) bestärken diese Vermutung. Zur Untersuchung dessen, wurde das Wachstum der *Xcv*-Stämme 85-10 und 85-10 Δ *acnB* in Minimalmedium mit 15 mM Na-Citrat (MA-Citrat-Medium) als C-Quelle untersucht. In Abb. 21 wird deutlich, dass der Wildtyp ein schwächeres Wachstum mit Citrat aufwies, als mit Saccharose und Casaminoacids (MA-Medium) als C-Quelle (zum Vergleich Abb. 20). Der Wildtyp zeigte ohne die Zugabe einer C-Quelle kein Wachstum im MA-Medium (Daten nicht gezeigt). Die Deletionsmutante 85-10 Δ *acnB* wies ein klar reduziertes Wachstum mit Citrat im Vergleich zum Wildtyp auf.

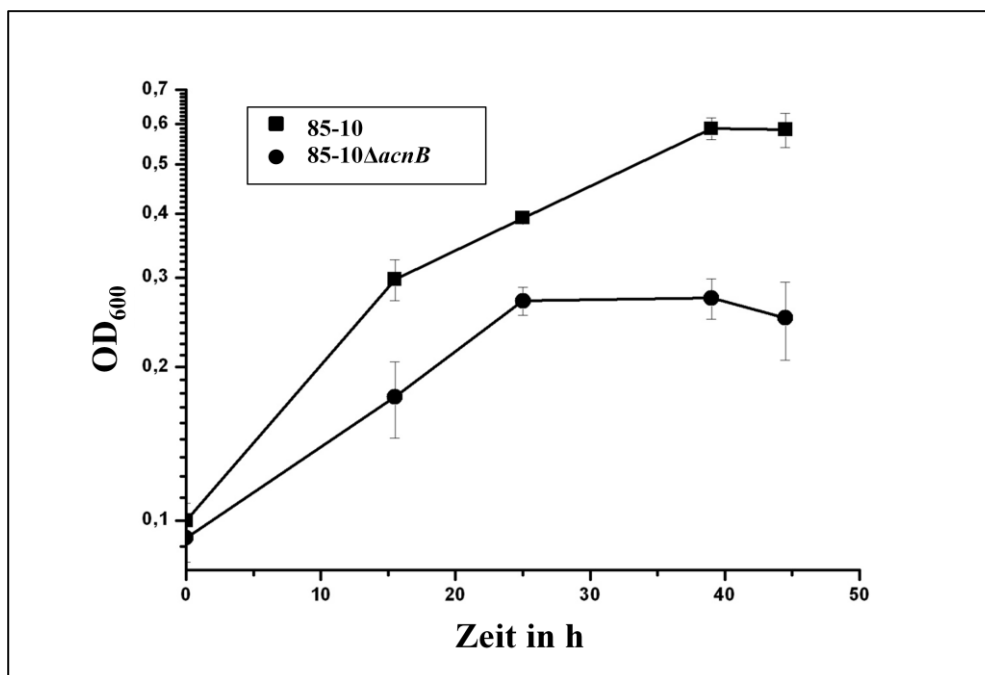


Abb. 21: Wachstumsanalyse der *Xcv* *acnB* Deletionsmutante mit Citrat als C-Quelle im Vergleich zum Wildtyp

Es wurden Vorkulturen der *Xcv*-Stämme 85-10 und 85-10 Δ *acnB* in MA-Medium angefertigt und 4 ml MA-Citrat-Medium in Hungateröhrchen für die Wachstumsanalysen auf eine OD₆₀₀ = 0,1 eingestellt. Das Wachstum erfolgte bei 30 °C und wurde für 45 h dokumentiert. Aus den Werten von 4 Messungen wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet. Das Experiment wurde 3 Mal durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine *acnB* Mutation in *Xcv* keinen Einfluss auf das Wachstum *in vitro* mit Saccharose, jedoch aber mit Citrat als Kohlenstoffquelle hatte. Demnach scheint AcnB an der

Verwertung von Citrat beteiligt zu sein bzw. könnte Citrat eine wichtige C-Quelle für *Xcv* in *planta* darstellen.

3.9 Die Folgen einer Deletion von *acnB* auf die Genexpression in *Xcv* 85-10

Um Hinweise auf durch *AcnB* regulierte Gene zu erlangen, erfolgte ein Vergleich der Transkriptome von *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *acnB* durch Microarray-Analysen. Hierfür wurden, wie in 2.10.7 beschrieben, 10 μ g Gesamt RNA aus *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *acnB* bzw. Zellpellets von 10 ml Kultur (MA-Medium; OD₆₀₀ = 0,6) zur Analyse bereitgestellt. Nach der Durchführung eines Signifikanztestes mit Hilfe des Programms EMMA wurden die Daten von der AG Anke Becker in Marburg überliefert. Die Selektion differentiell exprimierter Gene erfolgte in der Regel nach einem p-Wert < 0,05 bzw 0,1, einem A-Wert (Signalstärke) > 5, einem M-Wert (= log₂ Veränderung der jeweiligen Transkriptmenge zwischen beiden vergleichenden Stämmen) >1 bzw. < -1 und dem M-sd (*standard deviation* des M-Wertes). Ein M-Wert von 1 bzw. -1 steht für eine differentielle Genexpression um den Faktor 2.

Bei der Auswertung anhand des A-Wertes ist es erforderlich den A-Wert der Negativkontrollen (*empty slide* bzw. *spotting buffer*) zubeachten. Diese Kontrollen wiesen eine Signalstärke von 4,3 - 4,6 auf. Somit sollten differentiell exprimierte Gene der Mutante eine deutlich höhere Signalstärke als die Negativkontrollen aufweisen. Einige Gene, welche in der Mutante eine veränderte Expression aufwiesen, sind in Tab. 8 aufgelistet.

Tab. 8: Einige Gene mit veränderter Expression in *Xcv* 85-10 Δ *acnB* im Vergleich zum Wildtyp 85-10.

Genbezeichnung	Putative Funktion	p-Wert	M-Wert	M-sd	A-Wert
empty		0,013	-0,23	1,35	4,6
spotting buffer		6,49E-40	-0,19	0,24	4,32
hochregulierte Expression					
<i>cit</i> ; XCV3602	<i>citrate:H⁺ symporter</i>	0,061	2,258	2,30	5,611
<i>hemT</i> ; XCV2661	<i>hemerythrin-like protein</i>	0,061	1,09	0,978	5,23
XCV2242	<i>putative succinate dehydrogenase</i>	0,05	1,13	1,10	6,65
<i>virB2</i> ; p38 XCV0042	<i>type IV secretion system protein</i>	6,71E-07	1,38	0,109	10,55
<i>virB4</i> ; p38 XCV0041	<i>type IV secretion system protein</i>	4,33E-07	1,38	0,10	8,77
herabregulierte Expression					
<i>cydX</i> , XCV2537	<i>putative membrane protein</i> ;	0,03	-2,08	1,73	8,91

Alle identifizierten, differentiell regulierten Gene der Microarray-Analysen befinden sich in Tab. 13 (Anhang). Die Tab. 8 zeigt, dass die Expression der Gene XCV2242, *virB2* und *virB4* durch eine Deletion von *acnB* um ein 2-faches höher vorlagen, als im Wildtyp. Die Gene *cit* und *hemT* wiesen zwar eine ca. 4-fach bzw. 2-fach erhöhte Expression in der Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp auf, jedoch lag die Wahrscheinlichkeit einer differentiellen Expression über einem p-Wert von 0,05. Des Weiteren konnte eine 4-fach erniedrigte Expression von *cydX* (XCV2537) in der *acnB* Mutante ermittelt werden. Die reduzierte Expression des Gens *cydX* (XCV2537) stellte hierbei ein sehr interessantes Ergebnis dar, da dieses Gen zum *cyd* Operon gehört (Hoppe, 2013). Dieses Operon beinhaltet Gene, welche für Untereinheiten der Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase kodieren.

3.10 Eine Deletion von *roaX* und *roaY* erhöht die Synthese von AcnB

Um mehr Informationen über die mögliche Funktion von RoaX und RoaY zu erhalten, wurde eine *roaX-roaY* Deletionsmutante erstellt (2.10.13.1). Mittels Western-Blot-Analysen wurde die Synthese von AcnB in der *Xcv* Mutante 85-10 Δ *roaX-roaY* mit der Synthese im Wildtypstamm 85-10 in der exponentiellen (OD_{600} = ca. 0,8) und der stationären Wachstumsphase (OD_{600} = ca. 1,5) verglichen (Abb. 22; oberes Bild).

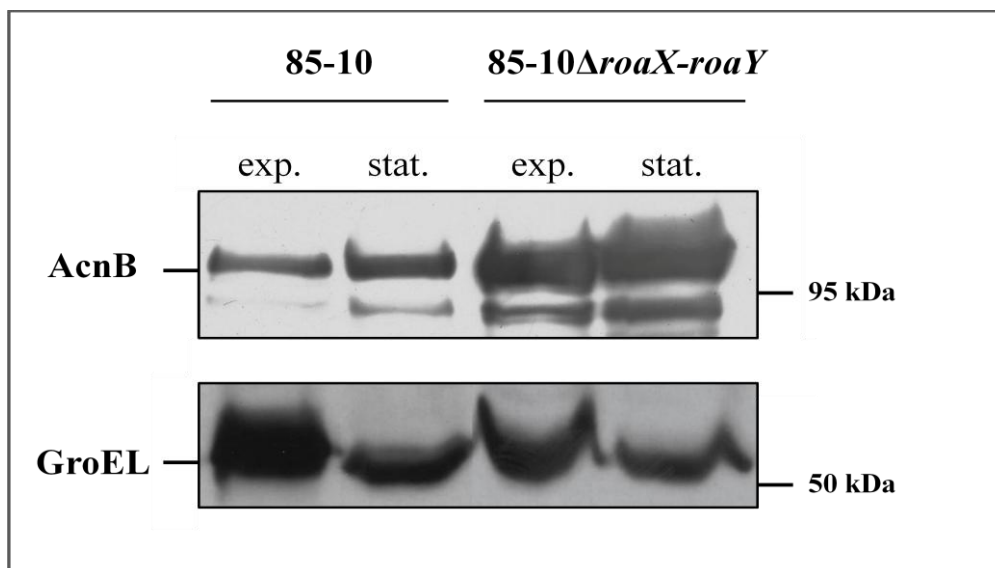


Abb. 22: Vergleich der Synthese von AcnB in den *Xcv*-Stämmen 85-10 Δ *roaX-roaY* und 85-10 mittels Western-Blot-Analyse.

Western-Blot-Analyse mit Extrakten der *Xcv*-Stämme 85-10 und 85-10 Δ *roaX-roaY*. Es wurden 40 μ g Protein des Zellextrakts auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Anti-AcnB (1:10000) im oberen und anti-GroEL (1:5000) aus *E. coli* im unteren Bild dienten zur Detektion. Marker: *Prestained Page Ruler Protein Marker*, Thermo Scientific. exp. = exponentielle Wachstumsphase; stat. = stationäre Wachstumsphase.

Die Abb. 22 zeigt deutlich, dass die Deletion von *roaX-roaY* in *Xcv* 85-10 zu einer stark erhöhten AcnB Synthese in beiden Wachstumsphasen führte. Die Detektion des Chaperons GroEL in *Xcv* mit

Antikörpern gerichtet gegen GroEL aus *E. coli* im unteren Bild der Abb. 22 zeigt, dass in jeder Spur eine vergleichbare Menge an Gesamtprotein eingesetzt wurde.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass RoaX und RoaY die Synthese von AcnB negativ regulieren bzw. reprimieren und wurden aus diesem Grund als *regulators of aconitases (Roa)* bezeichnet.

3.11 Ein erhöhtes Level von RoaY führt zu einem besseren Wachstum *in vitro* mit Citrat als C-Quelle im Vergleich zum Wildtyp

Um Indizien für die einzelnen Rollen von RoaX und RoaY zu erlangen, wurden Komplementationsstämme für Wachstumsanalysen mit Citrat als C-Quelle eingesetzt. Die Komplementationskonstrukte pL6roaX und pL6roaY (bereitgestellt von Fr. Lindenstrauß, 2.10.14) wurden dafür in die *Xcv*-Mutante 85-10 Δ roaX-roaY transformiert (Wesolowska, 2012).

Die Abb. 23 zeigt, dass die *Xcv* roaX-roaY Deletionsmutante ein verbessertes Wachstum mit einer End-OD₆₀₀ von ca. 0,58 im Gegensatz zum Wildtyp mit ca. 0,38 mit Citrat als C-Quelle aufwies.

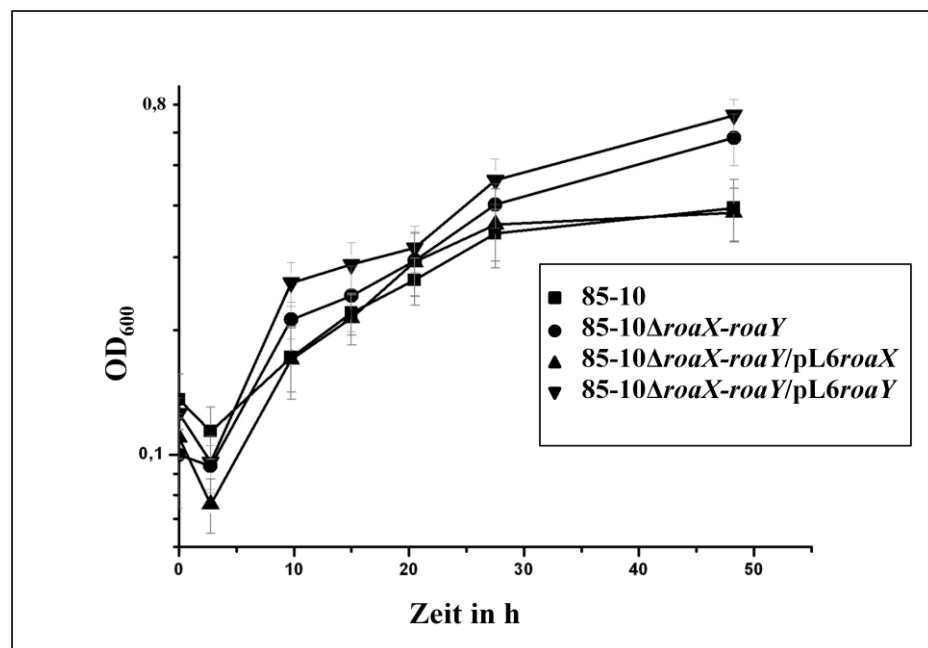


Abb. 23: Wachstumsanalyse der *Xcv* roaX-roaY Deletionsmutante und den Komplementationsstämmen 85-10 Δ roaX-roaY/pL6roaX und 85-10 Δ roaX-roaY/pL6roaY in MA-Citrat-Medium.

Es wurden Vorkulturen der einzelnen *Xcv*-Stämme in MA-Medium angefertigt und 4 ml MA-Citrat-Medium in Hungates für die Wachstumsanalysen auf eine OD₆₀₀ = 0,1 eingestellt. Das Wachstum erfolgte bei 30 °C und wurde für 48 h dokumentiert. Aus den Werten von 4 Messungen wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet.

Dies könnte sogar auf die erhöhte Synthese von AcnB zurückzuführen sein (siehe 3.10). Der *Xcv*-Komplementationsstamm 85-10 Δ roaX-roaY/pL6roaY zeichnete sich sogar durch eine höhere End-OD₆₀₀ mit 0,65 im Vergleich zur Deletionsmutante 85-10 Δ roaX-roaY aus. Das Wachstum des

Komplementationsstammes 85-10 Δ *roaX-roaY*/pL6*roaX* konnte hingegen als vergleichbar mit dem des Wildtypstamms 85-10 beobachtet werden.

Es kann festgehalten werden, dass ein Fehlen von RoaX-RoaY zu einem verbesserten Wachstum mit Citrat als C-Quelle führte. Weiterhin tritt der gleiche Effekt auf, wenn RoaY durch die Einbringung des Konstruktes pL6*roaY* in einer *roaX-roaY* Mutante synthetisiert wird. Da kürzliche Studien ergaben, dass es auch im Stamm 85-10 Δ *roaX-roaY*/pL6*roaY* zu einer erhöhten Synthese des AcnB-Proteins, wie bei einer *roaX-roaY* Mutante kam (Wesolowska, 2012), kann davon ausgegangen werden, dass eine höhere Menge an AcnB zu einem besseren Wachstum mit Citrat führt.

Demnach scheint AcnB eine wichtige Funktion bei der Citratverwertung in *Xcv* 85-10 zu besitzen.

3.12 Einfluss einer Deletion von *roaX-roaY* auf die Genexpression in *Xcv* 85-10

Da eine Deletion von *roaX-roaY* zu einer erhöhten Synthese des AcnB Proteins führt, sollte mit Hilfe von Transkriptomanalysen untersucht werden, ob dies auch auf transkriptioneller Ebene zu beobachten ist. Weiterhin sollten damit Hinweise erlangt werden, ob eine Deletion von *roaX-roaY* Auswirkungen auf die Expression weiterer Gene hat.

Hierfür wurden ebenso (Vergleich 3.9) Zellpellets von 10 ml-Kulturen (OD= 0,6) der Stämme *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *roaX-roaY* der AG Anke Becker in Marburg zur Verfügung gestellt, um die Transkriptome des Wildtyps mit einer *roaX-roaY* Deletionsmutante zu vergleichen. Nach erfolgter RNA-Isolierung wurde diese für Microarray-Analysen eingesetzt und die Daten nach der Durchführung eines Signifikanztestes von der Arbeitsgruppe übermittelt. Die so erhaltenen Rohdaten wurden ebenfalls selektiert nach einem p-Wert < 0,05 bzw 0,1, einem A-Wert (Signalstärke) > 5, einem M-Wert (=log2 Veränderung der jeweiligen Transkriptmenge zwischen beiden vergleichenden Stämmen) > 1 bzw. < -1 und dem M-sd (*standard deviation* des M-Wertes). Ein M-Wert von 1 bzw. -1 steht für eine differentielle Expression um den Faktor 2.

Da die Signalstärken der Negativkontrollen *empty* und *spotting buffer* bei 7,62 und 4,32 liegen, sollten alle differentiell regulierten Gene einen höheren A-Wert aufweisen. Die Tab. 9 zeigt einige Gene, deren Expression in der *roaX-roaY* Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp *Xcv* 85-10 verändert vorlagen.

Tab. 9: Einige differentiell exprimierte Gene einer *roaX-roaY* Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp *Xcv*85-10

Genbezeichnung	Putative Funktion	p-Wert	M-Wert	M-sd	A-Wert
empty		0,018	-0,32	4,69	7,62
spotting buffer		4,30E-10	-0,00021	0,0008	4,32
hochregulierte Expression					
<i>acnA</i> ; XCV1924	<i>aconitate hydratase</i>	7,22E-09	1,50	0,33	10,72
<i>acnB</i> ; XCV1927	<i>aconitate hydratase</i>	8,57E-05	1,47	0,84	12,31
herabregulierte Expression					
<i>gumF</i> ; XCV2783	<i>xanthan biosynthesis acetyltransferase GumF</i>	0,016	-1,03	1,26	8,13

Die Transkriptomvergleiche zeigen, dass eine Deletion von *roaX-roaY* zu einer Hochregulation der Expression von *acnB* und auch *acnA* mit einem Faktor von ca. 3 führte. Demnach scheint RoaX und RoaY Einfluss auf die Expression von *acnB* als auch auf die Expression von *acnA* zu besitzen. Des Weiteren hat eine Deletion von *roaX-roaY* eine reduzierte Expression von *gumF* (XCV2783) zur Folge, welches eine Acetyltransferase der Xanthan-Biosynthese kodiert. Somit scheint RoaX und/oder RoaY in die Bildung eines Biofilms in *Xcv* involviert zu sein. Alle Gene mit differentieller Expression in einer *roaX-roaY* Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp sind in Tab. 15 (Anhang) zu finden.

3.13 Eine Deletion von *acnA* hat keinen Einfluss auf das Wachstum *in vitro* von *Xcv* mit Citrat als C-Quelle

Da eine Deletion von *acnB* zu einem reduzierten Wachstum *in vitro* mit Citrat führt und AcnB vermutlich eine Rolle in der Citratverwertung von *Xcv* während der Kolonisierung von Wirtspflanzen besitzt, sollte nun auch das Wachstum der Deletionsmutante 85-10 Δ *acnA* mit Citrat als C-Quelle untersucht werden. In Abb. 24 ist das Wachstum der Stämme gezeigt und es ist deutlich zu erkennen, dass die Deletionsmutante ein ähnliches Wachstum wie der Wildtypstamm 85-10 aufwies.

Somit hat eine Deletion von *acnA* keinen Einfluss auf das Wachstum *in vitro* mit Citrat als einziger C-Quelle.

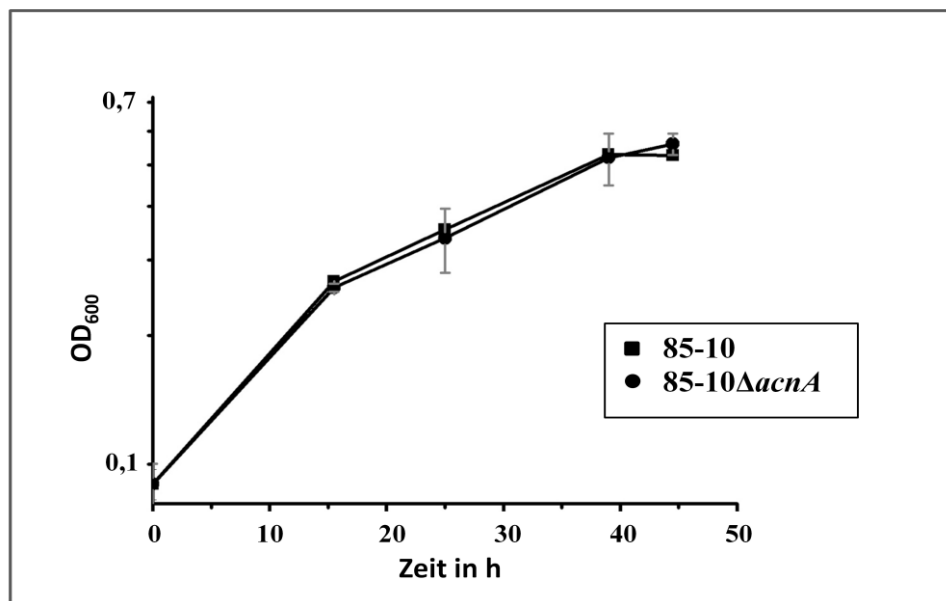


Abb. 24: Analyse des *in vitro* Wachstum der *Xcv* Stämme 85-10 und 85-10Δ*acnA* in MA-Citrat-Medium.

Die Vorkulturen der *Xcv*-Stämme 85-10 und 85-10Δ*acnA* wurden in 1 x MA- Medium angefertigt und 4 ml MA-Citrat-Medium in Hungateröhrchen für die Wachstumsanalysen auf eine OD₆₀₀ = 0,1 eingestellt. Das Wachstum erfolgte bei 30 °C und wurde für 45 h dokumentiert. Aus den Werten von 4 Messungen wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet.

Dieses Ergebnis bestätigte, dass *AcnA* im Vergleich zu *AcnB* vermutlich keine essentielle Rolle im Citratstoffwechsel von *Xcv* 85-10 während der Interaktion mit Wirtspflanzen zukommt. Da für *AcnA*, als Aconitase Protein jedoch auch Citrat ein Substrat darstellt, könnte eine Funktion für *AcnA* in diesem Zusammenhang in der Abwesenheit bzw. eines Funktionsverlustes von *AcnB* denkbar sein. Eventuell ist *AcnA* auch aufgrund von anderen Signalen enzymatisch im Citratmetabolismus aktiv.

Vorläufige Experimente zeigten, dass eine *acnA*-Deletionsmutante in 1 x MA-Medium ein reduziertes Wachstum, vor allem in der exponentiellen Wachstumsphase, aufwies (Abb. 41; Anhang). Hier wurde davon ausgegangen, dass eine Deletion von *acnA* Auswirkung auf das Wachstum bei geringerer Sauerstoffversorgung hat.

3.14 Eine Deletion von *acnA* in *Xcv* hat keinen Einfluss auf das Wachstum *in planta*

Da *acnB* zusammen mit *acnA* in einem Gencluster angeordnet ist, wurde ebenso die Auswirkung einer Deletion von *acnA* auf das Wachstum von *Xcv in planta* untersucht. Hierfür wurde das Wachstum der Deletionsmutanten 85-10Δ*acnA* mit dem des Wildtyp 85-10 verglichen und der Stamm 85*Δ*hrcN* als Kontrolle eingesetzt. In Abb. 25 ist zu erkennen, dass die Mutante ein dem Wildtyp entsprechendes Wachstum zeigte. Jedoch ist in der stationären Wachstumsphase eine leichte Reduktion des

Wachstums im Vergleich zum Wildtypstamm 85-10 zu beobachten. Demnach könnte eine Deletion von *acnA* einen Einfluss auf das Wachstum von *Xcv* *in planta* in der stationären Phase haben.

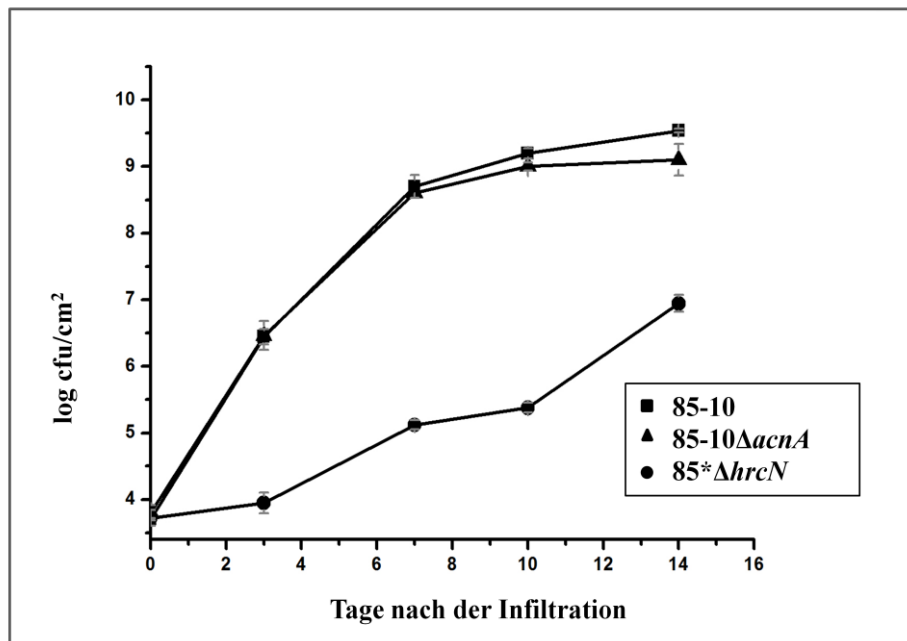


Abb. 25: Wachstumanalyse der *Xcv*-Deletionsmutante 85-10Δ*acnA* im Vergleich zum Wildtyp 85-10 *in planta*.

Das Wachstum der *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10Δ*acnA* und 85*Δ*hrcN* wurden für 14 Tage analysiert und dokumentiert. Die Bakteriensuspensionen wurden auf eine Zellzahl von 5×10^4 cfu/ml mit 10 mM MgCl₂ eingestellt und in voll entwickelte Blätter von 5-6 Wochen alten Paprikapflanzen (Kultivar ECW) infiltriert. Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert von drei Proben, welche aus drei verschiedenen Pflanzen entnommen wurden. Die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

Das Ergebnis deutet darauf hin, dass *AcnA* keine Rolle während des Wachstums *in planta* von *Xcv* in exponentieller Phase, wie *AcnB*, spielt. Jedoch scheint *AcnA* eine Funktion in *Xcv* während der stationären Wachstumsphase einzunehmen. Da eine Deletion von *acnA* keine Folgen für das Wachstum von *Xcv* *in vitro* mit Citrat als C-Quelle aufwies (siehe 3.13), ist es denkbar, dass *AcnA* nicht an der Verwertung von Citrat beteiligt ist, wie es im Fall von *AcnB* postuliert wurde. *AcnA* scheint hier auf ein anderes, limitierendes Signal der stationären Phase zu reagieren.

3.15 Die Deletionsmutante 85-10 Δ acnA zeigt eine dem WT entsprechende HR und wässrigen Läsionen im Infektionsbereich

Auch die Auswirkung einer *acnA* Deletion auf die Fähigkeit eine HR bei resistenten und Krankheitssymptome bei suszeptiblen Paprikapflanzen auszulösen, sollte analysiert werden. Die zugehörigen Infiltrationsassays sind in Abb. 26 dargestellt. Die *Xcv* Mutante 85-10 Δ acnA zeigte 2 Tage nach der Infiltration eine, dem Wildtypstamm 85-10 entsprechende HR (Abb. 26; A), sowie ähnliche wässrigen Läsionen im Infektionsbereich der Blätter des Paprikakultivars ECW nach 8 Tagen der Infiltration der Stämme (Abb. 26; B).

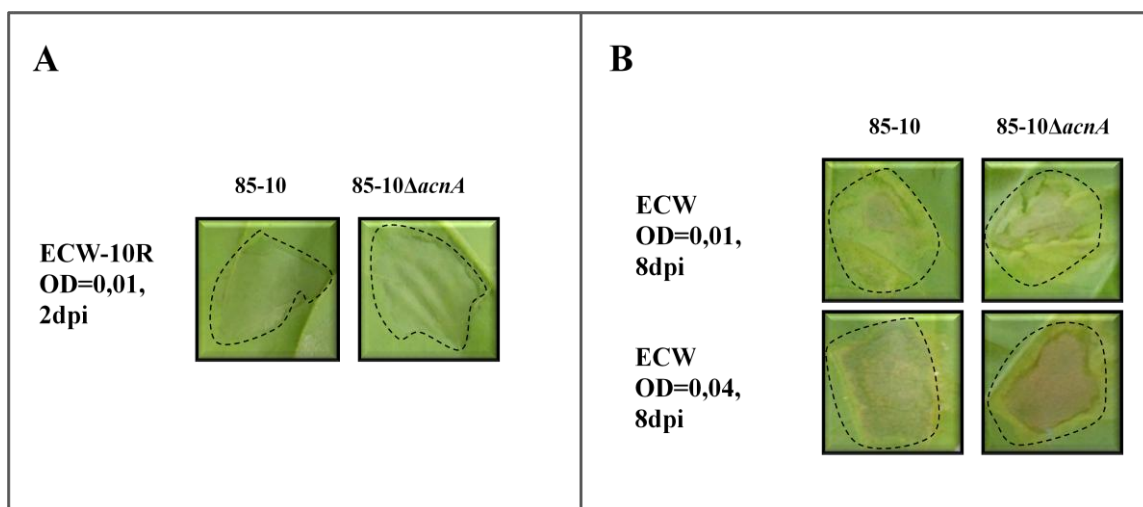


Abb. 26: Bildung einer HR und wässrigen Läsionen der *Xcv*-Deletionsmutante 85-10 Δ acnA bei Paprikapflanzen im Vergleich zum Wildtyp 85-10.

Die *Xcv*-Stämme wurden an gegenüberliegenden Positionen des Blattes infiltriert. Die gezeigten Blattflächen wurden mit den angegebenen Bakteriendichten inokuliert (A) Bildung einer HR nach Infiltration der *Xcv*-Stämme 85-10 und 85-10 Δ acnA. 2 dpi; OD₆₀₀=0,01 (ECW-10R). (B) Ausbildung von wässrigen Läsionen (8 dpi) nach Infiltration der *Xcv*-Stämme 85-10 und 85-10 Δ acnA; OD₆₀₀= 0,01 und 0,04 (ECW). Die Dokumentation erfolgte von der Blattunterseite. dpi= days post infiltration

Somit hat die Deletion von *acnA* weder Einfluss auf die Bildung einer HR noch auf die Entwicklung von Krankheitssymptomen bei Paprikapflanzen, welches vermutlich auf ein, dem Wildtyp entsprechendes Wachstum der Deletionsmutanten *in planta* zurückzuführen ist. Die Ergebnisse zeigten, dass die Funktionalität von AcnA, im Gegensatz zu AcnB, nicht im Zusammenhang mit dem Wachstum von *Xcv* 85-10 in Paprikapflanzen steht bzw. AcnA-Proteine nicht für die Etablierung von *Xcv in planta* notwendig sind.

3.16 *Xcv* 85-10 Δ *acnA2* zeigt ebenfalls reduziertes Wachstum *in planta*

Zur Untersuchung eventueller Effekte einer Deletion von *acnA2* auf das Wachstum von *Xcv* *in planta*, wurden ebenfalls Wachstumsanalysen mit der hergestellten Mutante durchgeführt, deren Darstellung in Abb. 27 aufgeführt ist.

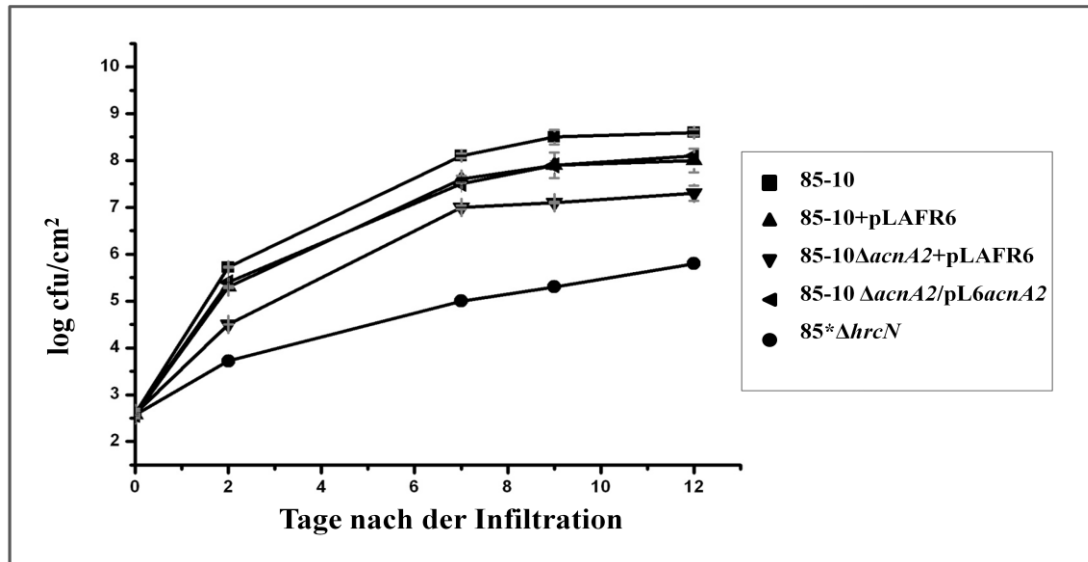


Abb. 27: Untersuchung des Einfluss einer Deletion von *acnA2* auf Wachstum *in planta* mit den *Xcv*-Stämmen 85-10+pLAFR6, 85-10 Δ *acnA2*+pLAFR6, 85-10 Δ *acnA2*/pL6*acnA2*, 85* Δ *hrcN* und 85-10

Es wurden voll entwickelte Blätter von 5-6 Wochen alten Paprikapflanzen (Kultivar ECW) mit Bakteriensuspensionen einer Zelldichte von 5×10^4 cfu/ml der *Xcv*-Stämme 85-10+pLAFR6, 85-10 Δ *acnA2*+pLAFR6, 85-10 Δ *acnA2*/pL6*acnA2*, 85* Δ *hrcN* und 85-10 infiltriert. Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert von drei Proben, welche aus drei verschiedenen Pflanzen entnommen wurden. Die Standardabweichungen sind eingezeichnet. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

Hierfür wurden die *Xcv*-Stämme 85-10+pLAFR6, 85-10 Δ *acnA2*+pLAFR6, der Komplementationsstamm 85-10 Δ *acnA2*/pL6*acnA2* und als Kontrolle der *Xcv* Stamm 85* Δ *hrcN* und 85-10 in Blätter von 5-6 Wochen alten Pflanzen infiltriert und das Wachstum über 12 Tage dokumentiert. Die Abb. 27 zeigt, dass die Deletionsmutante 85-10 Δ *acnA2*+pLAFR6 ebenfalls ein reduziertes Wachstum, wie die Mutante 85-10 Δ *acnB* (Vergleich Abb. 16) *in planta* aufwies. Demnach lässt sich auch für *AcnA2* eine Rolle für optimales Wachstum von *Xcv*85-10 in Wirtspflanzen vermuten. Der Komplementationsstamm 85-10 Δ *acnA2*/pL6*acnA2* zeichnete sich durch ein gleichartiges Wachstum wie der Wildtypstamm mit Leerplasmid 85-10+pLAFR6 aus. Somit wurde bestätigt, dass das reduzierte Wachstum der *Xcv* Deletionsmutante 85-10 Δ *acnA2*+pLAFR6 auf die Deletion von *acnA2* zurück zuführen ist.

3.17 Eine Deletion von *acnA2* in *Xcv* hat eine geringere Bildung von HR und wässrigen Läsionen bei Paprikablättern zur Folge

Neben dem Wachstum wurde die *acnA2* Deletionsmutante auch hinsichtlich der Fähigkeit untersucht wässrige Läsionen, sowie eine HR auszulösen. Die Abb. 28 zeigt die beobachteten Phänotypen von *Xcv* 85-10 Δ *acnA2* im Vergleich zum Wildtyp *Xcv* 85-10.

Es ist deutlich zu erkennen (Abb. 28; A), dass die Infiltration des *Xcv* Stamms 85-10 Δ *acnA2* zu einer verringerten Ausbildung einer HR in resistenten Paprikapflanzen (ECW-10R) im Vergleich zum Wildtyp führte. Auch nach der Infiltration von Paprikapflanzen des Kultivars ECW, wies die *acnA2* Deletionsmutante eine reduzierte Ausbildung von wässrigen Läsionen auf (Abb. 28; B).

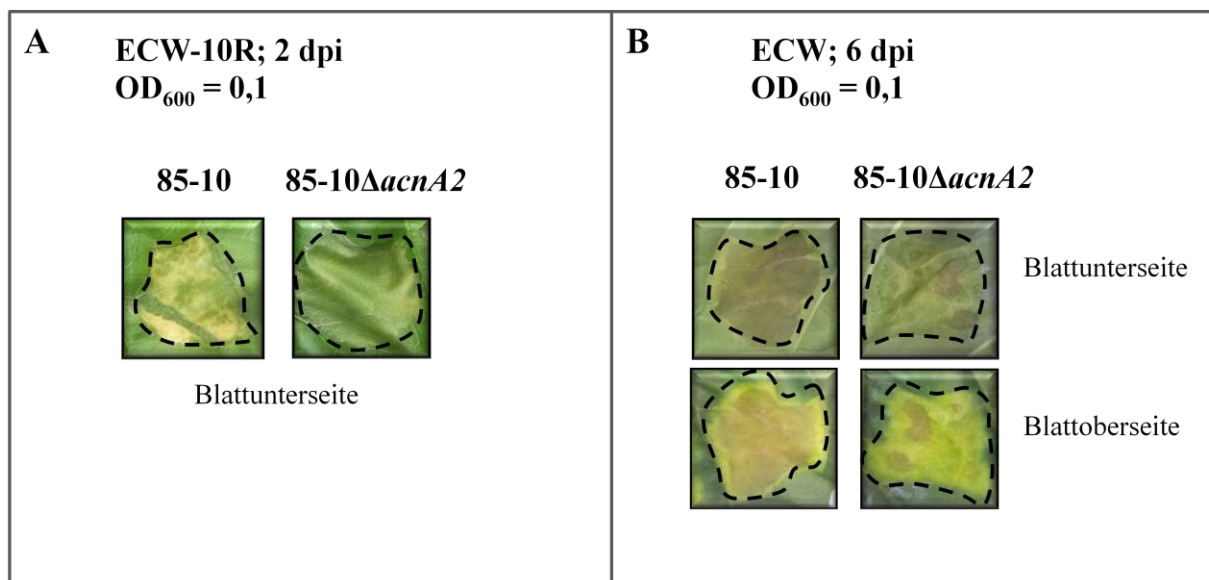


Abb. 28: Analyse der *Xcv acnA2* Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp 85-10 hinsichtlich der Ausbildung einer HR bei resistenten und Krankheitsymptomen bei suszeptiblen Paprikapflanzen.

Die *Xcv*-Stämme 85-10 und 85-10 Δ *acnA2* wurden an gegenüberliegenden Positionen des Blattes infiltriert. Die gezeigten Blattflächen wurden mit den angegebenen Bakteriendichten inokuliert (A). Ausbildung einer HR auf der Blattunterseite nach Infiltration der Stämme *Xcv*85-10 und *Xcv*85-10 Δ *acnA2*; 2 dpi; $OD_{600}=0,1$ (ECW-10R). (B) Ausbildung von wässrigen Läsionen auf der Blattunter-, sowie -oberseite nach Infiltration (6 dpi) der Stämme 85-10 und 85-10 Δ *acnA2*; $OD_{600}=0,1$ (ECW). dpi= days post infiltration

Da die Infiltration des *Xcv* Stammes 85-10 Δ *acnA2*, sowie die Infiltration von 85-10 Δ *acnB* (siehe 3.5) zu einer reduzierten Ausbildung der HR führt, ist es denkbar, dass *AcnA2* und *AcnB* eine Funktion direkt oder indirekt auf die Ausbildung bzw. Sekretion von Avirulenzproteinen während des Wachstums von *Xcv in planta* besitzen. Andererseits sind die reduzierten Phänotypen in resistenten und suszeptiblen Pflanzen möglicherweise auf das mindere Wachstum beider Mutanten zurückzuführen. Ebenso könnten *AcnB* und *AcnA2* eine Rolle in der Nährstoffverwertung *in planta* spielen und ihr Fehlen daher zu verringertem Wachstum und somit zu verzögerter HR und Krankheitsausbildung führen.

3.18 Auswirkungen einer Deletion von *acnA2* auf die Genexpression in *Xcv* 85-10

Auch das Transkriptom einer *Xcv acnA2* Deletionsmutante wurde nach Anzucht in 1 x MA Medium und Zellernte bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 mit dem des Wildtyps verglichen. Auch hier erfolgte ein Signifikanztest der AG Becker in Marburg mit Hilfe des EMMA Programmes (wie in 2.10.7 beschrieben). Die so erhaltenen Rohdaten wurden selektiert nach einem p-Wert < 0,05 bzw. 0,1, einem A-Wert (Signalstärke) > 5, einem M-Wert (= log₂ Veränderung der jeweiligen Transkriptmenge zwischen beiden vergleichenden Stämmen) > 1 bzw. < -1 und dem M-sd (*standard deviation* des M-Wertes). Ein M-Wert von 1 bzw. -1 zeigt eine differentielle Genexpression mit dem Faktor 2. Da die Signalstärken der Negativkontrollen *empty* und *spotting buffer* bei 7,32 und 4,33 liegen, sollten alle Gene mit veränderter Expression einen höheren A-Wert aufweisen. Die Tab. 10 zeigt einige Gene der *acnA2* Mutante mit differentieller Expression im Vergleich zum Wildtyp *Xcv* 85-10 ist. Die Tabelle aller differentiell regulierten Gene befindet sich im Anhang (Tab. 16).

Die Tab. 10 zeigt, dass die Expression der Gene *acnA* (Faktor = ca. 2,4) und *acnB* (Faktor = ca. 2,3) in der *acnA2*-Deletionsmutante hochreguliert vorlag. Auch die Expression von *roaY* zeigte eine Erhöhung um einen Faktor von ca. 2 beim Fehlen des *acnA2* Gens.

Interessanterweise konnten zwei benachbarte Gene von *acnA2* mit hohen Expressionsunterschieden in der *acnA2* Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp identifiziert werden. Das Gen XCV1157, welches für eine putative Citratsynthase kodiert, zeigte eine 6-fach erhöhte Expression gegenüber dem Wildtyp. Außerdem lag eine erhöhte Expression der Gene *suh* (Faktor = ca. 2,3), was für eine Saccharosehydrolase kodiert und *zwf2* (Faktor = ca. 2) vor, dessen Produkt eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase darstellt. Ebenso zeigte das Gen der Fe-S- Untereinheit einer Succinat Dehydrogenase (*sdh*; XCV2245) eine ca. 3,2-fach erhöhte Expression im Vergleich zum Wildtyp. Die Succinat-Dehydrogenase ist ein Enzym des TCA-Zyklus und katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat, sowie die Reduktion von FAD. Es überträgt Elektronen direkt auf Quinone der Atmungskette (Hägerhäll, 1997). Dies deutet darauf hin, dass AcnA2 eventuell einen Regulator von wichtigen Stoffwechselvorgängen darstellt.

Ein weiteres interessantes Ergebnis ist die Herabregulierung der Expression des *cydA* Gens mit einem Faktor von ca. 3,2 und des Gens *petA* (kodiert die Fe-S-Untereinheit einer Ubiquinol Cytochrom-c-Reduktase) mit einem Faktor von ca. 2. Die Daten zeigten, dass AcnA2 offenbar einen Regulator der Aconitase B und A darstellt, sowie an der Regulation von Genen des (Methyl-) Citratmetabolismus (XCV1157 und XCV1156) und des Kohlenhydratstoffwechsels (*suh*, *zwf2*) beteiligt ist. Außerdem scheint AcnA2 die Expression von *cydA*, welches für die Cytochrom-d-Ubiquinol-Oxidase kodiert, sowie *petA* herab zuregulieren und somit eventuell zu reprimieren. Dies spricht auch für eine wichtige Rolle von AcnA2 in der Anpassung von *Xcv* an die verfügbaren Sauerstoffbedingungen durch Regulation von Genen für terminale Oxidasen der Atmungskette.

Tab. 10: Einige Gene mit differentieller Expression in *Xc v85-10ΔacnA2* im Vergleich zum Wildtyp 85-10

Genbezeichnung	putative Funktion	p-Wert	M-Wert	M-sd	A-Wert
empty		0,0032	0,474	5,38	7,32
spotting buffer		0,159	0,013	0,22	4,33
hochregulierte Expression					
XCV1157	<i>Putative citrate synthase</i>	4,99E-08	3,04	0,81	8,61
<i>acnA</i> ; XCV1924	<i>Aconitate hydratase</i>	7,6E-05	1,268	0,718	10,77
<i>sdh</i> ; XCV2245	<i>Putative succinate dehydrogenase iron-sulfur protein</i>	0,012	1,265	1,464	10,12
<i>acnB</i> ; XCV1927	<i>Aconitate hydratase</i>	1,68E-07	1,15	0,346	11,81
<i>suh</i> ; XCV3618	<i>Sucrose hydrolase</i>	0,013	1,155	1,355	11,08
<i>ohr</i> ; XCV0290	<i>Organic hydroperoxide resistance protein</i>	0,0204	1,092	1,39	8,307
<i>roaY</i> ; XCV1926	<i>Conserved hypothetical protein; regulator of AcnB</i>	0,00056	1,086	0,78	10,48
<i>zwf2</i> ; XCV4168	<i>Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase</i>	0,0368	1,066	1,573	9,37
herabregulierte Expression					
<i>fur</i> ; XCV1560	<i>Ferric uptake regulator</i>	3,11E-07	-1,04	0,331	9,31
<i>petA</i> ; XCV2634	<i>Ubiquinol-cytochrome-C-reductase; iron-sulfur subunit</i>	7,62E-05	-1,08	0,613	9,08
<i>cydA</i> ; XCV2535	<i>Cytochrome D ubiquinol oxidase, subunit I</i>	0,0065	-1,638	1,69	7,47
<i>baf</i> ; XCV0526	<i>Bacterioferritin-associated ferredoxin</i>	3,59E-08	-2,19	0,751	8,675

Ebenfalls konnte das Gen *ohr* (XCV0290) mit einer hochregulierten Expression identifiziert werden (Faktor = ca. 2). Dies kodiert für ein Resistenzprotein gegen organische Hydroperoxide. Derartige Proteine sind in Bakterien weit verbreitet und detoxifizieren organische Peroxide (Fuangthong *et al.*, 2001). Somit könnte *AcnA2* auch in die Abwehr und/oder Sensierung von oxidativem Stress involviert sein. Da oxidativer Stress und Eisenmetabolismus in enger Verbindung zu einander stehen, ist es interessant, dass eine herabregulierte Expression eines *fur* Gens (XCV1560) in der Mutante vorlag (Faktor = ca. 2). *Fur* ist ein der am meisten charakterisierteste Eisenaufnahmeregulator in vielen Bakterien.

Neben *fur* konnte auch eine reduzierte Expression von *baf* (XCV0526), welches für einen Bacterioferritin-verbundenes Ferredoxin kodiert, identifiziert werden (Faktor = ca. 4,4). Hierbei handelt es sich um eine Art Eisenspeicher-Protein (Ochsner *et al.*, 2002).

Die Transkriptomvergleiche zwischen *Xcv* 85-10 und der *acnA2*-Deletionsmutante gaben Hinweise, dass *AcnA2* ein weitgreifendes Protein in *Xcv* sein muss und auch in die Regulation des Eisenmetabolismus involviert ist.

3.19 *AcnA2* hat einen negativen Einfluss auf die Expression von *acnA*, *acnB*, *roaY* und *XCV1157*

Aufgrund der Ergebnisse der Microarray-Analysen (3.18), die *acnA*, *acnB*, *roaY* und *XCV1157* als mögliche *targets* von *AcnA2* identifizierten, sollte dies durch qRT-PCR (wie unter 2.10.6 beschrieben) verifiziert werden. Das Gen *XCV1157* kodiert für eine Methylcitratsynthase und spielt vermutlich im Citrat- und Methylcitratstoffwechsel von *Xcv* eine Rolle.

Aus den erhaltenen Ct-Werten der einzelnen quantitativen *Realtime*-Reaktionen mit den jeweiligen genspezifischen Primern (**Tab. 12**; Anhang) wurde der Mittelwert, sowie die Standardabweichung berechnet. Die geringen Differenzen (*16S difference*) der Transkription der 16S rDNA wurde, wie beschrieben, in die jeweilige Berechnung einbezogen. Die errechneten relativen Transkriptraten des Wildtyps 85-10 wurden auf 1,0. Die Ergebnisse sind in Abb. 29 visualisiert.

Die qRT-PCR erfolgte mit cDNA, synthetisiert aus isolierter Gesamt-RNA der *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10 Δ *acnA*, 85-10 Δ *acnA2* und 85-10 Δ *acnB*. In Abb. 29 A wird deutlich, dass, wie zu erwarten, kein Transkript von *acnB* in der *Xcv acnB*-Deletionsmutante nachzuweisen war. Ebenfalls ist zu erkennen, dass die Transkriptrate von *acnB* in der *Xcv* Mutante 85-10 Δ *acnA2* in der exponentiellen ca. 5,5-fach und in der stationären Phase, ca. 4-fach erhöht vorlag. Dies bestätigt somit die identifizierte, erhöhte Expression von *acnB* in der *acnA2* Mutante der Microarray-Daten. Eine Deletion von *acnA* hat dagegen keinen Einfluss auf die Expression von *acnB*, da die relative Transkriptrate dem des Wildtyps 85-10 entsprach.

Dieses Ergebnis zeigte deutlich, dass *AcnA2* einen direkten oder indirekten regulatorischen Einfluss auf die Expression von *acnB* besitzt, da es durch ein Fehlen von *AcnA2* zu einer Erhöhung der Expression von *acnB* kommt.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Transkriptrate von *acnA* (Abb. 29 B) der *Xcv* Mutante 85-10 Δ *acnB* in der exponentiellen, sowie in der stationären Phase der Rate des Wildtyps entsprach, während in der *Xcv acnA* Deletionsmutante, wie zu erwarten, kein Transkript von *acnA* nachzuweisen war. Die Expression von *acnA* zeigte sich jedoch ebenfalls in der Mutante 85-10 Δ *acnA2* erhöht. Während in der exponentiellen Phase eine ca. 2,75-fach höhere Transkriptrate vorlag, könnte eine ca. 3,5-fache Transkription in der stationären Wachstumsphase, im Vergleich zum Wildtyp ermittelt werden. Dies bestätigt ebenfalls die Daten der Microarray-Analyse und identifiziert *AcnA2* ebenfalls als Regulator von *acnA*. Auch in diesem Fall scheint *AcnA2* eine repressorische Rolle in der Expression von *acnA* einzunehmen.

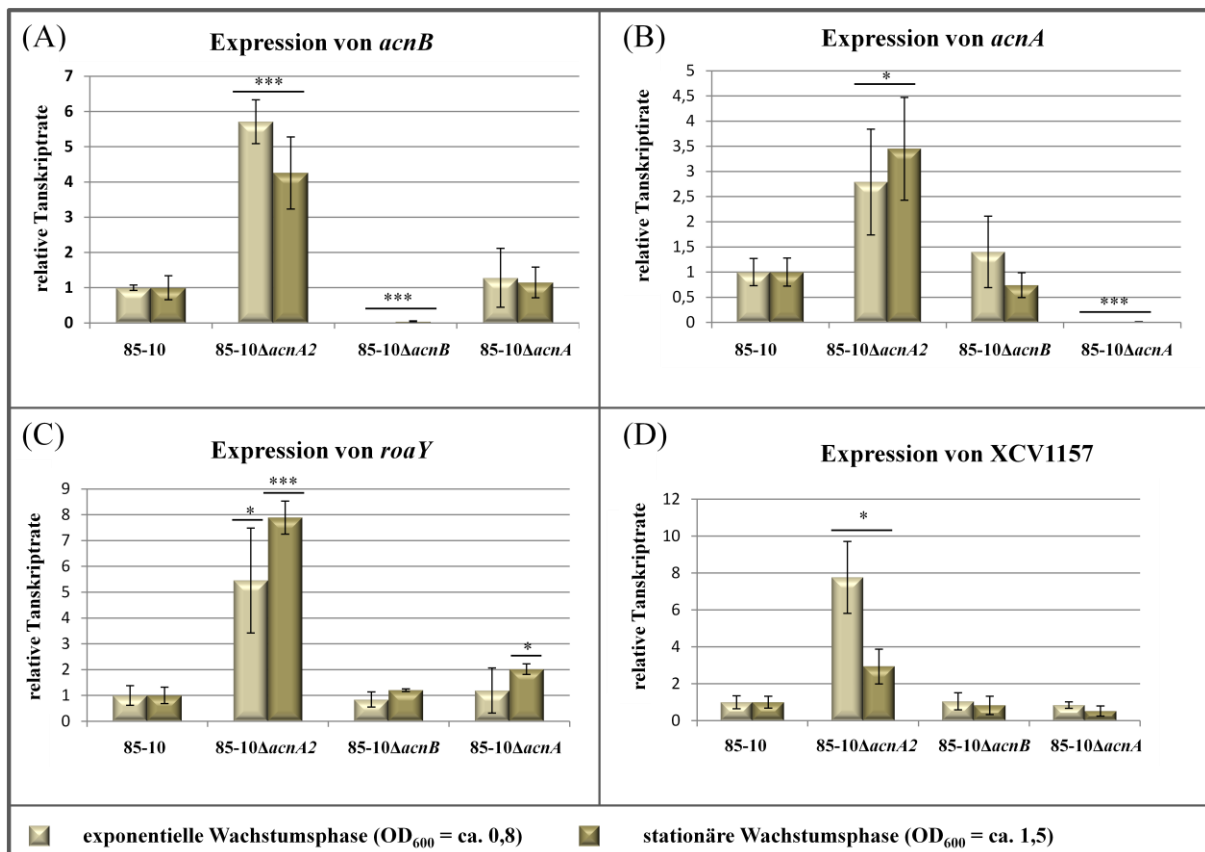


Abb. 29: Quantitativer Vergleich der Expression von *acnB*, *acnA*, *roaY* und XCV1157 in der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase der *Xcv*-Stämme 85-10Δ*acnA*, 85-10Δ*acnA2*, 85-10Δ*acnB* und dem Wildtyp 85-10 mittels qRT-PCR.

Es wurde Gesamt-RNA der *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10Δ*acnA*, 85-10Δ*acnA2* und 85-10Δ*acnB* in exponentieller und stationärer Phase isoliert und cDNA mit Random-Primern synthetisiert. Die qRT-PCR wurde mit dem *QuantiTect SYBR Green PCR Kit* (Qiagen, Hilden), sowie dem Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Qiagen; Hilden) und *acnB*-spezifischen (A), *acnA*-spezifischen (B), *roaY*-spezifischen (C) und XCV1157-spezifischen (D) Primern (Tab. 12; Anhang) durchgeführt. Die Transkription von Gene wurde im Fall des *Xcv* Wildtyps 85-10 auf 1,0 gesetzt. Die relative Transkriptionsrate der Gene der eingesetzten Stämme wurde aus Reaktionen von 3 biologischen Replikaten unter Berücksichtigung der Spezifität, Effizienz und den Transkriptionsunterschieden des Gens der 16S rRNA berechnet. Signifikanz, t-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Auch durch die Ermittlung der relativen Transkriptionsrate von *roaY* mittels qRT-PCR (Abb. 29 C) konnte sich die erhöhte Expression in einer *Xcv acnA2* Deletionsmutante bestätigen. Hierbei konnte in der exponentiellen Phase eine Erhöhung der Transkriptionsrate von *roaY* um den Faktor 5,5 und in der stationären Phase um einen Faktor von ca. 8 ermittelt werden. Während die Expression von *roaY* in der *Xcv acnB* Deletionmutante keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp aufwies, konnte eine ca. 2-fach höhere Transkriptmenge in der stationären Wachstumsphase der Mutante 85-10Δ*acnA* beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigten, dass *AcnA2* neben dem Effekt auf die Expression von *acnB* und *acnA* auch eine beeinflussende Rolle auf die Expression von *roaY* besitzt. Neben *AcnA2* könnte auch *AcnA* in einer stationären Wachstumsphase von *Xcv* 85-10 eine repressorische Funktion auf die Expression von *roaY* ausüben.

Wie die Microarraydaten zeigten, scheint ein Fehlen von *AcnA2* neben der Transkription von *acnA*, *acnB* und *roaY* auch die Transkription von XCV1157 in *Xcv* zu erhöhen. Die Abb. 29 D zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse der qRT PCR zur Analyse der Transkriptrate von XCV1157 in den *Xcv*-Stämmen 85-10, 85-10 Δ *acnA2*, 85-10 Δ *acnB* und 85-10 Δ *acnA*. In den *Xcv*-Stämmen 85-10 Δ *acnB* und 85-10 Δ *acnA* ließen sich keine signifikanten Unterschiede in den Transkriptmengen von XCV1157 im Vergleich zum Wildtyp 85-10 verzeichnen. Die Transkriptrate stieg jedoch in der exponentiellen Wachstumsphase der Deletionsmutante 85-10 Δ *acnA2* auf ein ca. 8-Faches und in der stationären Phase auf ein ca. 2-Faches im Vergleich zum Wildtyp an.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass *AcnB* und *AcnA* vermutlich keinen Einfluss auf die Expression von XCV1157 haben, während *AcnA2* eine reprimierende Wirkung auf die Genexpression, vor allem in der exponentiellen Wachstumsphase von *Xcv*, besitzt.

3.20 Die Deletion von *acnA2* führt zur erhöhten Synthese des *AcnB* Proteins in *Xcv*

Da eine Deletion von *acnA2* eine erhöhte Expression von *acnB* in *Xcv* zur Folge hat, wurde auch die Synthese des Proteins in einer *acnA2* Mutante untersucht. Es wurden hierfür die *Xcv*-Doppeldeletionsmutanten 85-10 Δ *acnA2-acnA* und 85-10 Δ *acnA2-acnB* hergestellt (2.10.13.3) und in diesem Experiment eingesetzt.

Die *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10 Δ *acnA*, 85-10 Δ *acnA2*, 85-10 Δ *acnA2-acnA* und 85-10 Δ *acnA2-acnB* wurden in 1 x MA-Medium bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 kultiviert. Nach der Zellernte erfolgte ein Zellaufschluss mittels Ultraschall zur Gewinnung des Rohextraktes und es wurden jeweils 50 µg Protein zur gelelektrophoretischen Auftrennung in einem 10 %igem SDS-Gel eingesetzt. Die Abb. 30 zeigt das Autoradiogramm nach der Auftrennung und Detektion mit Antikörpern gegen *AcnB* aus *E. coli*. Es wird deutlich, dass in den Rohextrakten der *Xcv*-Stämme 85-10 Δ *acnA2* und 85-10 Δ *acnA2-acnA* eine deutlich intensivere Bande des *AcnB* Proteins mit einer molekularen Masse von ca. 99 kDa zu verzeichnen ist im Vergleich zu den den Rohextrakten des Wildtypstammes 85-10 und der Deletionsmutante 85-10 Δ *acnA*. Im Rohextrakt der *Xcv* Deletionsmutante 85-10 Δ *acnA2-acnB* konnte, wie zu erwarten, keine spezifische Bande des *AcnB* Proteins detektiert werden. Das untere Bild zeigt eine unspezifische Bande mit einer molekularen Masse von ca. 85 kDa bei der Detektion mit einem Antikörper gegen *AcnA* aus *E. coli* (1:5000). Die vergleichbare Bandenintensität verdeutlicht, dass in allen Spuren eine vergleichbare Menge an Gesamtprotein aufgetragen wurde.

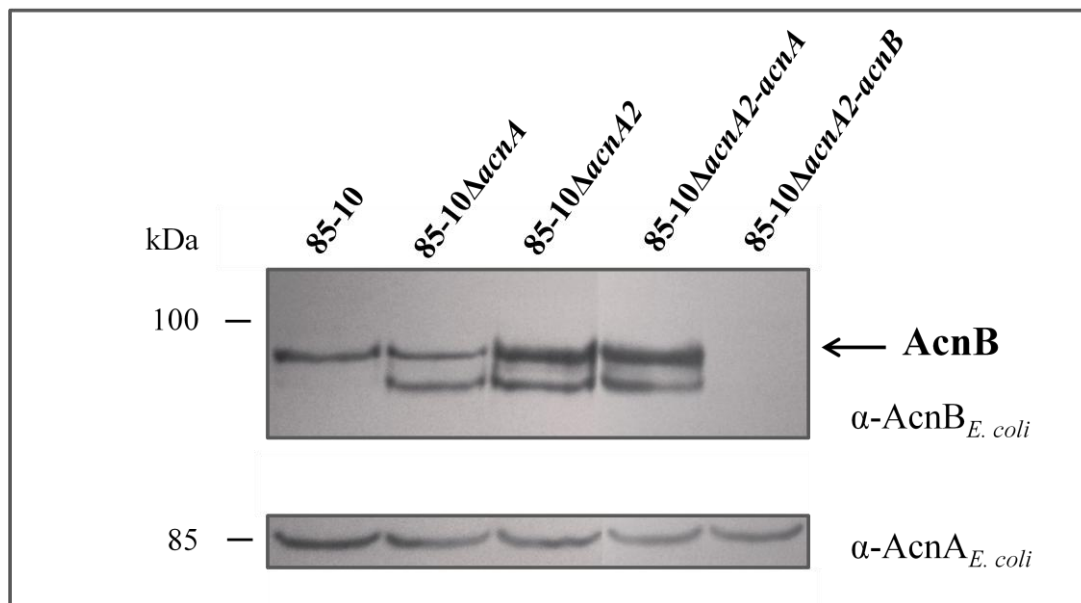


Abb. 30: Autoradiogramm nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Rohextrakte der *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10Δ*acnA*, 85-10Δ*acnA2*, 85-10Δ*acnA2-acnA* und 85-10Δ*acnA2-acnB* zum Nachweis des AcnB Proteins.

Die Gewinnung der Rohextrakte der *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10Δ*acnA*, 85-10Δ*acnA2*, 85-10Δ*acnA2-acnA* und 85-10Δ*acnA2-acnB* erfolgte nach Kultivierung in 1 x MA-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 und anschließendem Zellaufschluss durch Ultraschall. Es wurden jeweils 50 µg Protein aufgetragen und in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem elektrophoretischen Transfer auf Nitrocellulose erfolgte eine Inkubation mit Antikörpern gegen AcnB aus *E. coli* (1:1000; oberes Bild). Das untere Bild zeigt eine unspezifische Bande bei der Detektion mit Antikörpern gegen AcnA aus *E. coli* (1:5000) als Ladungskontrolle. Als Marker diente der PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot).

Die Ergebnisse ließen erkennen, dass durch eine Deletion von *acnA2* nicht nur die Transkription von *acnB* in *Xcv* erhöht war (siehe 3.19), sondern auch eine erhöhte Synthese des AcnB Proteins vorlag. Demnach fungiert AcnA2 direkt oder indirekt als Repressor der *acnB* Expression.

3.21 Die Deletion von *acnA2* führt zu einer erhöhten Synthese des AcnA Proteins in *Xcv*

Neben dem Nachweis des AcnB Proteins sollte auch die Synthese der Aconitasen des Typ A, AcnA und AcnA2 im *Xcv* Wildtypstamm 85-10 nachgewiesen werden und zusätzlich der Effekt einer erhöhten Expression von *acnA* in einer *acnA2* Deletionsmutante auf Proteinebene untersucht werden. Die AS-Sequenzen beider AcnA Proteine weisen eine Identität von 43 % auf. Aufgrund der Zusammensetzung der Aminosäuren beträgt die vorhergesagte molekulare Masse von AcnA ca. 99 kDa während AcnA2 eine theoretische, molekulare Masse von ca. 94 kDa aufweist. Zwischen AcnA aus *E. coli* (AcnA_{*E. coli*}) und AcnA aus *Xcv* (AcnA_{*Xcv*}) besteht eine Identität von 56 %. Die Abb. 31 zeigt das Autoradiogramm einer Western-Analyse der Rohextrakte der *Xcv* Stämme 85-10, 85-10Δ*acnB*, 85-10Δ*acnA*, 85-10Δ*acnA2*, 85-10Δ*acnA2-acnA* und 85-10Δ*acnA2-acnB* nach Auftrennung in einem 10%igen SDS-Gel. In den Rohextrakten von 85-10, 85-10Δ*acnB* sowie 85-10Δ*acnA2-acnB*

fällt ein kreuzreagierendes Polypeptid mit einer molekularen Masse von ca. 113 kDa auf. Hierbei handelt es sich um das AcnA Protein aus *Xcv*, welches im Rohextrakt der *acnA* Deletionsmutanten nicht zu detektieren ist. Somit konnte auch der Einsatz von spezifischen Antikörpern gegen AcnA aus *E. coli* zu einer Kreuzreaktivität mit einem Polypeptid in *Xcv*-Zellextrakten führen. Im Rohextrakt der *Xcv* Deletionsmutante 85-10 Δ *acnA2* erscheint eine intensivere Bande des AcnA Proteins bei 113 kDa, ebenso im Fall von 85-10 Δ *acnA2-acnB*. In diesen Stämmen scheint es durch die Deletion von *acnA2* zu einer erhöhten Synthese von AcnA zu kommen. Dies zeigt eindeutig, dass eine Deletion von *acnA2* zu einer erhöhten Synthese von AcnA in *Xcv* führt und AcnA2 direkt oder indirekt die Synthese von AcnA beeinflusst. Die Synthese von AcnA im Rohextrakt der *Xcv* Deletionsmutante 85-10 Δ *acnB* entspricht dagegen dem des Wildtypstammes 85-10.

Interessanterweise hatte es den Anschein, dass die Synthese von AcnA durch eine zusätzliche Deletion von *acnB* in einer *Xcv acnA2* Deletionsmutante (85-10 Δ *acnA2-acnB*) in einer noch höherer Menge resultiert als im Fall der eigentlichen *Xcv acnA2* Mutante. Dies könnte bedeuten, dass AcnB die Synthese von AcnA beeinflusst bzw. das Fehlen der beiden anderen Aconitasen (AcnA2 und AcnB) zu einer höheren Synthese von AcnA führt.

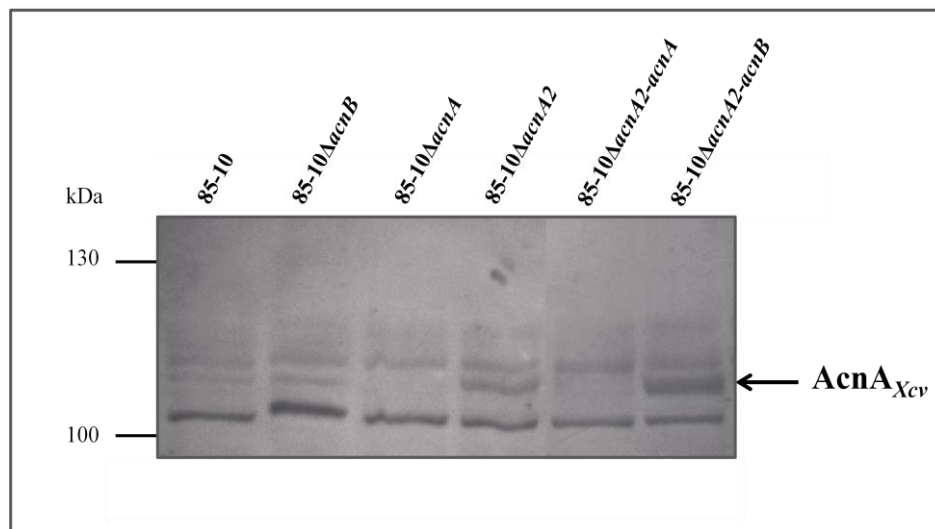


Abb. 31: Autoradiogramm nach Western-Blot-Analyse zum Nachweis von AcnA_{Xcv} mit Antikörpern gegen AcnA_{E.coli} in Rohextrakten der *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10 Δ *acnB*, 85-10 Δ *acnA*, 85-10 Δ *acnA2*, 85-10 Δ *acnA2-acnA* und 85-10 Δ *acnA2-acnB*.

Die *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10 Δ *acnB*, 85-10 Δ *acnA*, 85-10 Δ *acnA2*, 85-10 Δ *acnA2-acnA* und 85-10 Δ *acnA2-acnB* wurden in 1 x MA-Medium kultiviert und bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 geerntet. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Es wurden jeweils 40 µg Protein aufgetragen und in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrocellulose erfolgte eine Inkubation mit Antikörpern gegen AcnA aus *E.coli* (1:5000). Als Marker diente der PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot).

Die Ergebnisse zeigen, dass AcnA_{E.coli} und AcnA_{Xcv} gemeinsame immunologische Epitope besitzen, da AcnA_{Xcv} mit Antikörpern gegen AcnA_{E.coli} nachweisbar war. Ebenso führte eine Deletion von *acnA2* in *Xcv* zu einer erhöhten Synthese des AcnA Proteins, während eine Deletion von *acnB* keinen Einfluss auf die Synthese von AcnA besaß. Diese gesteigerte Synthese von AcnA in den *Xcv*-Stämmen

85-10 Δ *acnA2* und 85-10 Δ *acnA2-acnB* könnte in der bereits gezeigten, erhöhten Transkription von *acnA* in einer *Xcv acnA2* Deletionsmutante begründet sein (3.19). Somit kann gesagt werden, dass AcnA2 vermutlich über eine direkt oder indirekt reprimierende Funktion auf die Expression von *acnA* verfügt.

Anhand der Abbildung kann weiterhin belegt werden, dass AcnA2_{*Xcv*} und AcnA_{*E.coli*} vermutlich keine gemeinsamen Epitope besitzen. Im Rohextrakt von *Xcv* 85-10 ließ sich keine AcnA2-spezifische Proteinbande ausmachen, die im Rohextrakt von *Xcv* 85-10 Δ *acnA2* nicht zu verzeichnen wäre. Somit ist AcnA2 nicht mit den Antikörpern gegen AcnA_{*E. coli*} nachweisbar.

Neben dem Nachweis der AcnA Proteine mit Antikörpern gegen AcnA_{*E. coli*} wurden AcnA_{*Xcv*} und AcnA2_{*Xcv*} mit einem C-terminalen myc-Tag versehen (2.10.14) und konnten so mit Hilfe eines Anti-C-myc-Peroxidase-Konjugates nachgewiesen werden (Abb. 40; Anhang).

3.22 Eine Deletion von *acnA2* in *Xcv* führt zu einem verbessertem Wachstum mit Citrat als C-Quelle im Vergleich zum Wildtyp

Auch der Effekt einer *acnA2* Deletion auf das Wachstum von *Xcv* mit Citrat als C-Quelle sollte untersucht werden. Hierfür wurde das MA-Citrat-Medium verwendet, welches sich durch Fehlen von Saccharose und Casaminoacids vom MA-Medium unterscheidet (2.1). Die Abb. 32 vergleicht das Wachstum des Wildtypstammes und der *Xcv acnA2* Deletionsmutante. Hierbei wurde hervor gebracht, dass eine Deletion von *acnA2* in *Xcv* 85-10 zu einem verbesserten Wachstum mit Citrat als C-Quelle im Vergleich zum Wildtyp 85-10 führte.

Da Citrat das Substrat der Aconitasen darstellt und bereits belegt wurde, dass eine erhöhte Synthese von AcnB ein verbessertes Wachstum mit Citrat als C-Quelle zur Folge hat (siehe 3.10 und 3.11), liegt es nahe, dass eine Verbesserung des Wachstums einer *acnA2* Mutante aus der erhöhten Synthese des AcnB Proteins bzw. der Citrat-Synthase (siehe 3.18, Tab. 10) resultiert. Dieses verbesserte Wachstum einer *Xcv acnA2* Deletionsmutante bestätigte sowohl die erhaltenen qRT-PCR Daten als auch die Rolle von AcnA2 als negativen Regulator der AcnB-Synthese.

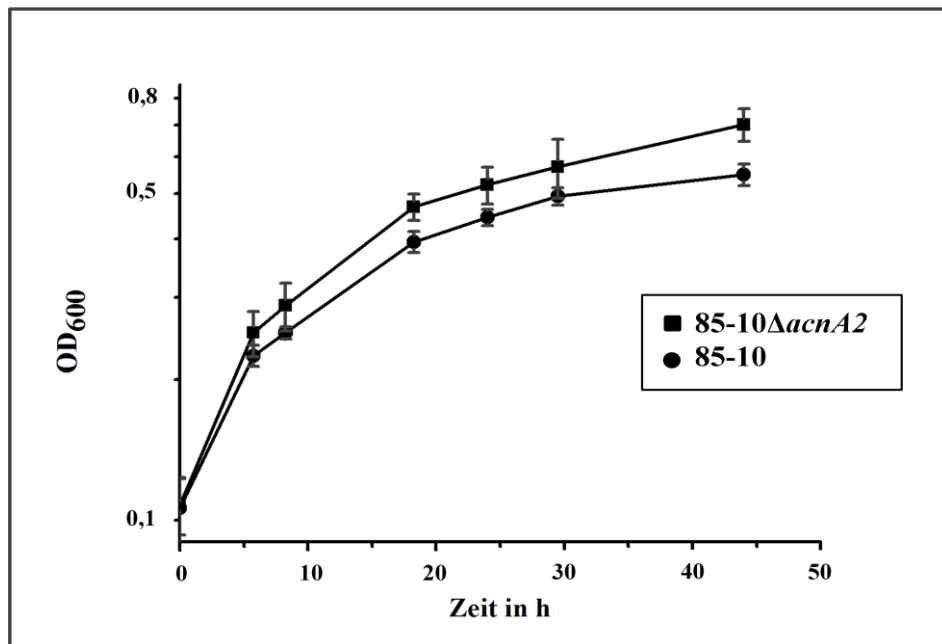


Abb. 32: Wachstumsanalyse der *Xcv acnA2* Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp mit Citrat als C-Quelle.

Es wurden Vorkulturen der einzelnen Stämme in MA-Medium angefertigt und 4 ml MA-Citrat-Medium in Hungateröhrchen für die Wachstumsanalysen auf eine $OD_{600} = 0,1$ eingestellt. Das Wachstum erfolgte bei 30 °C und wurde für 50 h dokumentiert. Aus den Werten von 4 Messungen wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet.

3.23 Eine *acnA2* Deletion führt auch zu verbessertem Wachstum mit Saccharose als C-Quelle im Vergleich zu *Xcv* 85-10

Da neben Citrat auch Saccharose als mögliches Substrat von *Xcv* 85-10 im Apoplasten der Wirtspflanzen diskutiert wird (Kocal *et al.*, 2008; Kocal, 2011), wurden Wachstumsanalysen mit Saccharose als C-Quelle durchgeführt. Hierfür wurden Hungateröhrchen mit 4 ml MA-Saccharose-Medium verwendet und das Wachstum der *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10Δ*acnA2* und 85-10Δ*acnB* über 49 Stunden dokumentiert. Das MA-Saccharose-Medium unterscheidet sich hierbei vom normalen MA-Medium durch das Fehlen von Casaminoacids und Na-Citrat (2.1). Die Abb. 33 zeigt die graphische Darstellung der Wachstumsanalysen.

Es wird deutlich, dass das Wachstum der *Xcv acnB* Deletionsmutante mit nur Saccharose als C-Quelle im Vergleich zum Wachstum des Wildtyps 85-10 verzögert ist. Daher scheint eine Deletion von *acnB* Auswirkung auf die Verwertung von Saccharose zu haben. Auch scheint das Fehlen von Aminosäuren im Medium Einfluss auf das Wachstum einer *Xcv acnB* Deletionsmutante zu haben, da das Wachstum der Mutante in MA-Medium unverändert blieb.

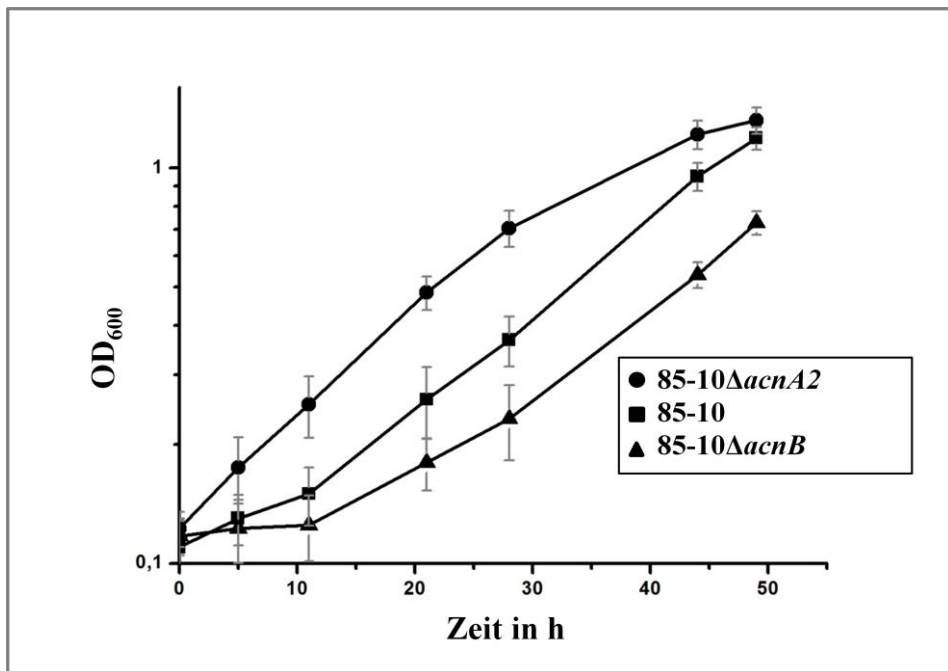


Abb. 33: Analyse des Wachstums der *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10Δ*acnA2* und 85-10Δ*acnB* mit Saccharose als C-Quelle.

Es wurden Vorkulturen der *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10Δ*acnA2* und 85-10Δ*acnB* in MA-Medium angefertigt und 4 ml MA-Saccharose-Medium in Hungates für die Wachstumsanalysen auf eine $OD_{600} = 0,1$ eingestellt. Das Wachstum erfolgte bei 30 °C und wurde für 49 h dokumentiert. Aus den Werten von 4 Messungen wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet.

Im Gegensatz dazu wies die *Xcv acnA2* Deletionsmutante ein deutlich verbessertes Wachstum mit Saccharose als C-Quelle, im Vergleich zum Wildtyp 85-10, auf. Dies könnte wiederum auf der gezeigten erhöhten Synthese des AcnB-Proteins in einer *acnA2* Deletionsmutante begründet sein. Vermutlich spielt AcnB neben der Verwertung von Citrat auch eine Rolle bei der Verwertung von Saccharose, da es ein wichtiges Enzym des Hauptstoffwechselweges, des TCA-Zyklus, darstellt.

In vorläufigen Untersuchungen zeigte eine *Xcv acnA2* Deletionsmutante, ebenso wie eine *acnA* Deletionsmutante, ein reduziertes Wachstum in 1 x MA-Medium (siehe Abb. 41; Anhang). Hierbei wird davon ausgegangen, dass vermutlich eine geringe O_2 -Versorgung einen limitierenden Faktor für diese Mutanten darstellt. Eine *Xcv acnB* Deletionsmutante zeichnete sich, im Vergleich, durch ein Wildtyp-ähnliches Wachstum aus.

3.24 Die Doppeldeletion von *acnA2-acnA* und *acnA2-acnB* in *Xcv* zeigt ebenfalls die Wichtigkeit von AcnA2 in der Citratverwertung und für das Wachstum *in planta*

Um die Rolle von AcnA2 im Zusammenhang mit einer möglichen Regulation von *acnA* und *acnB* beurteilen zu können, wurden die *Xcv* Doppeldeletionsmutanten 85-10 Δ *acnA2-acnA* und 85-10 Δ *acnA2-acnB* hinsichtlich ihres Wachstums *in vitro* mit Citrat als C-Quelle (Abb. 34), als auch *in planta* mit dem Wildtyp 85-10 verglichen (Abb. 35). Während beide Deletionsmutanten keine Wachstumsunterschiede in MA-Medium im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen (Daten nicht gezeigt), scheinen die Doppeldeletionen jedoch Auswirkungen auf das Wachstum von *Xcv* mit Citrat als C-Quelle zu haben. In Abb. 34 wird deutlich, dass beide Deletionsmutanten ein reduziertes Wachstum mit Citrat als C-Quelle im Vergleich zum Wildtypstamm aufwiesen. Die Deletionsmutante 85-10 Δ *acnA2-acnB* zeigte, im Vergleich zur Mutante 85-10 Δ *acnA2-acnA* ein stärker reduziertes Wachstum, vor allem in der exponentiellen Wachstumsphase.

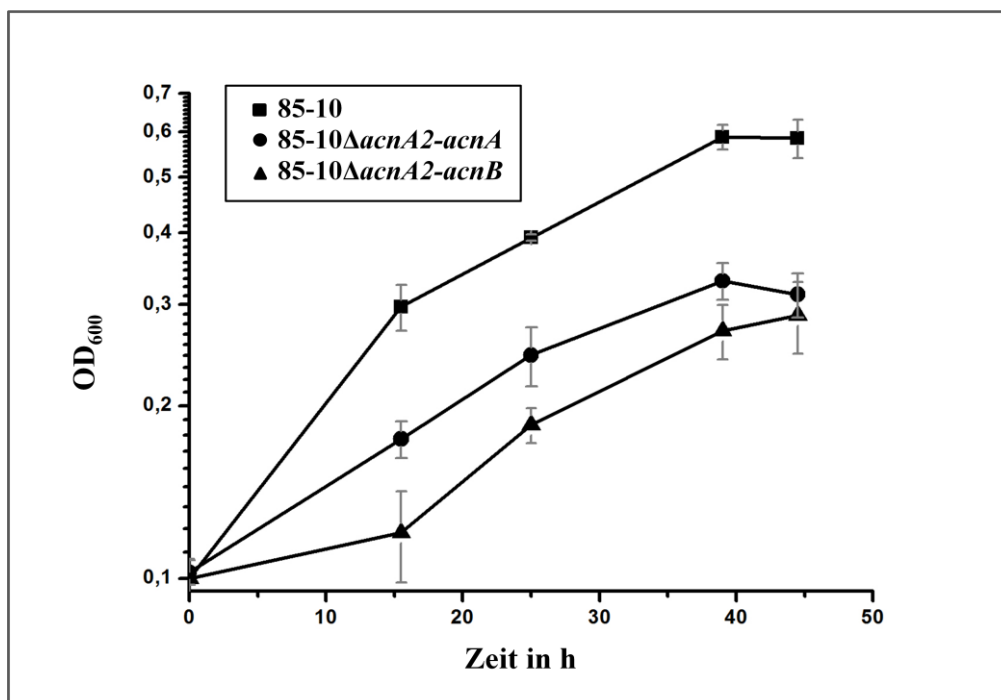


Abb. 34: Wachstumsanalyse der Mutanten 85-10 Δ *acnA2-acnA* und 85-10 Δ *acnA2-acnB* im Vergleich zum Wildtyp 85-10 mit Citrat als C-Quelle.

Mit Vorkulturen der *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10 Δ *acnA2-acnA* und 85-10 Δ *acnA2-acnB* in MA-Medium wurden 4 ml MA-Citrat-Medium (15 mM Na-Citrat) in Hungateröhrchen mit einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und das Wachstum für 45 h bei 30 °C beobachtet und dokumentiert. Es wurde eine 4-fache Bestimmung durchgeführt.

Diese Ergebnisse bestätigten eine Rolle von AcnB in der Citratverwertung. Neben AcnB scheint aber auch AcnA eine Bedeutung im Citratstoffwechsel zuzukommen, da die Deletion von *acnA2-acnA* ebenfalls zu reduziertem Wachstum von *Xcv* mit Citrat als C-Quelle führte, obwohl sich eine *acnA2* Mutante bekanntlich durch verbessertes Wachstum auszeichnet (siehe 3.22). Dies weist darauf hin,

dass das verbesserte Wachstum einer *acnA2* Mutante mit Citrat als C-Quelle nicht allein in der erhöhten Synthese von AcnB begründet liegt, sondern vermutlich auch in der erhöhten Synthese von AcnA und eventuell auch in der Regulation von anderen wichtigen Genen des Citratstoffwechsels durch AcnA2. Jedoch scheint AcnB eine wichtigere Rolle in diesem Zusammenhang zu spielen, da bereits eine Einzeldelektion von *acnB*, im Gegensatz zu *acnA* ein reduziertes Wachstum mit Citrat zur Folge hatte (siehe 3.8 und 3.13). Es kann postuliert werden, dass neben AcnB auch AcnA in diesen Zusammenhang von Bedeutung zu sein scheint. Möglicherweise stehen AcnA und AcnB auch unter gegenseitiger Beeinflussung.

Die Abb. 35 zeigt das Wachstum der *Xcv*-Deletionsmutanten 85-10 Δ *acnA2-acnB* und 85-10 Δ *acnA2-acnA* im Vergleich zum Wildtypstamm 85-10 in Paprikablättern von Pflanzen des Kultivars ECW.

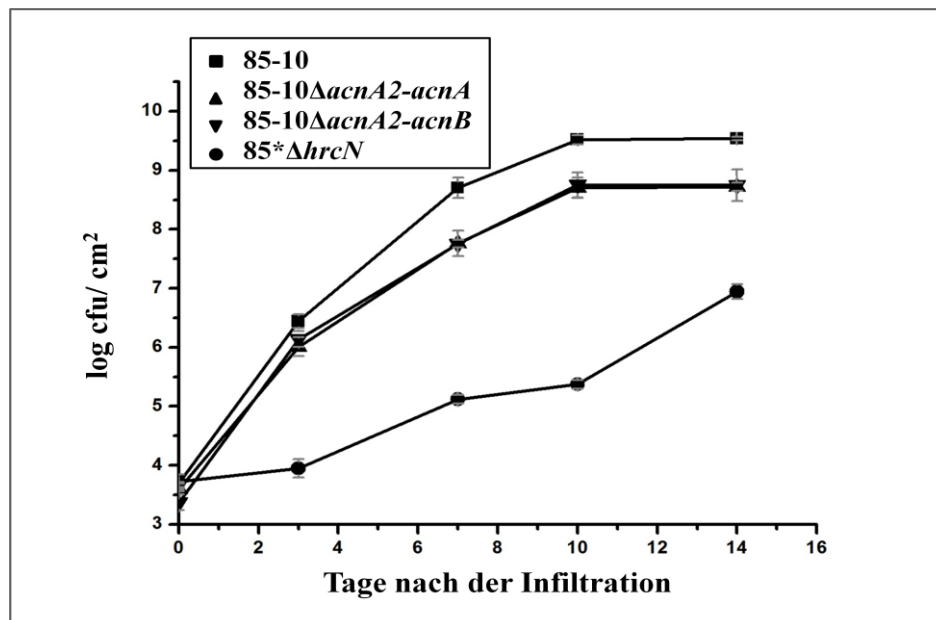


Abb. 35: Wachstumsanalyse der *Xcv* Deletionsstämme 85-10 Δ *acnA2-acnA* und 85-10 Δ *acnA2-acnB* im Vergleich zum Wildtyp 85-10 in Paprikablättern.

Es wurden voll entwickelte Blätter von 5-6 Wochen alten Paprikapflanzen (Kultivar ECW) mit Bakteriensuspensionen einer Zelldichte von 5×10^4 cfu/ml der *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10 Δ *acnA2-acnA*, 85-10 Δ *acnA2-acnB* und 85* Δ *hrcN* infiltriert. Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert von drei Proben, welche aus drei verschiedenen Pflanzen entnommen wurden. Die Standardabweichungen sind eingezeichnet. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt.

Auch hier war ein deutlich reduziertes Wachstum beider Mutanten zu erkennen. Dies verdeutlicht, dass sowohl eine Doppeldeletion von *acnA2-acnA* als auch von *acnA2-acnB* zu einem reduzierten Wachstum von *Xcv* *in planta* führt. An dieser Stelle lässt sich nicht ausschließen, ob das reduzierte Wachstum der *Xcv*-Mutanten *in planta* durch die alleinige Deletion von *acnA2* (wie in 3.16) resultierte. Jedoch ist neben der gezeigten Rolle von AcnB *in planta* (3.4) auch eine Rolle von AcnA denkbar. Diese Annahme wird gestützt durch die Tatsache, dass die Generierung einer *acnA-acnB* Doppelmutante, sowie einer *acnA-acnB-acnA2* Dreifachmutante bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich

war. Denkbar wäre ein wichtiges Zusammenspiel zwischen AcnA und AcnB und dass ein Fehler der drei Aconitase-Proteine die Überlebensfähigkeit des Bakteriums unterbindet.

Auffällig ist, dass während des *in planta* Wachstum kein Unterschied zwischen den *Xcv* Mutanten 85-10 Δ *acnA2-acnA* und 85-10 Δ *acnA2-acnB* wie bei dem *in vitro* Wachstum mit Citrat als C-Quelle beobachtet werden konnte. Da in dem MA-Citrat-Medium keine Casaminoacids enthalten sind, könnte dies darauf hindeuten, dass neben Citrat und Saccharose auch Aminosäuren als wichtige Substrate für *Xcv* angesehen werden könnte.

3.25 Auswirkung der Deletionen von *acnA*, *acnA2* und *acnB* auf die Sensitivität von *Xcv* gegenüber Menadion

Da die Generierung des Superoxidanions zu oxidativem Stress führt, sollte die Sensitivität der *Xcv acn*-Deletionsmutanten gegenüber Menadion untersucht werden. Bei Menadion handelt es sich um ein Naphthochinon, welches eine cytotoxische Wirkung hat, da es bei dessen Reduktion zur Bildung des Superoxidanions kommt und dies zu oxidativem Stress führt. Die Analyse des Effekts des Menadions auf das Wachstum von *Xcv* erfolgte mit Hilfe des sogenannten *plate sensitivity assay* (2.6.1.1). Hierfür wurden die *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10 Δ *acnB*, 85-10 Δ *acnA*, 85-10 Δ *acnA2*, 85-10 Δ *acnA2-acnA* und 85-10 Δ *acnA2-acnB* der Chemikalie Menadion (15 μ M) ausgesetzt und die überlebenden Kolonien (cfu = *colony forming units*) nach 2-3 Tagen bestimmt (Abb. 36).

Die Rate der überlebenden Zellen wurde als *surviving fraction* in % dargestellt. Es wird deutlich, dass eine vergleichbare Sensitivität einer *Xcv acnB*- sowie einer *acnA*-Mutante gegenüber Menadion im Vergleich zum Wildtyp 85-10 festgestellt werden konnte. Die Überlebensrate wies ca. 60 % im Vergleich zum Wildtyp auf. Demnach führt neben einer Deletion von *acnB* auch eine Deletion von *acnA* zu einer erhöhten Sensitivität von *Xcv* gegenüber Menadion. Eine *Xcv acnA2*- Mutante zeigte hingegen nur noch ein Überleben von ca. 20 %, während weder die *Xcv acnA2-acnA*- noch die *acnA2-acnB*- Mutante überlebensfähig in Gegenwart von Menadion war.

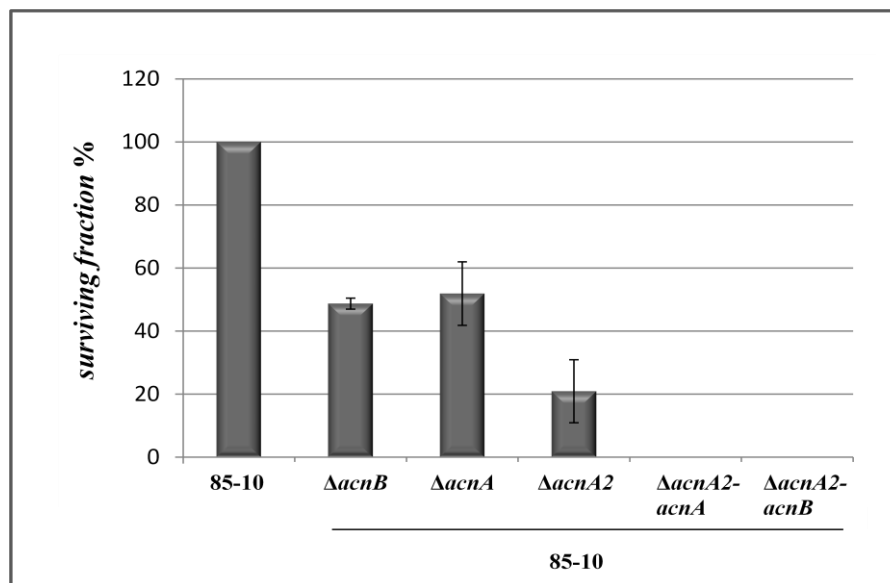


Abb. 36: Analyse der Sensitivität der *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10 $\Delta acnB$, 85-10 $\Delta acnA$, 85-10 $\Delta acnA2$, 85-10 $\Delta acnA2-acnA$ und 85-10 $\Delta acnA2-acnB$ gegenüber Menadion.

Die *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10 $\Delta acnB$; 85-10 $\Delta acnA$, 85-10 $\Delta acnA2$, 85-10 $\Delta acnA2-acnA$ und 85-10 $\Delta acnA2-acnB$ wurden auf die Sensitivität gegenüber, durch Menadion generierten, oxidativem Stress analysiert. Es wurden jeweils Verdünnungen von 10^{-6} von Kulturen der exponentiellen Phase ($OD_{600} = 0,6$) auf MA-Agar-Platten mit 15 μM Menadion, sowie ohne Zusatz plattiert. Nach 2-3 Tagen einer lichtgeschützten Inkubation bei 30 °C wurden die Kolonien der Platten (*colony forming units*; cfu) gezählt. Zur Ermittlung der Überlebensfähigkeit (*surviving fraction*) wurden die cfu der Platten mit Menadion durch die cfu der Platten ohne Menadion dividiert und anhand der Werte für den *Xcv* Wildtyp 85-10 ohne Menadion (= 100 %) in % ausgedrückt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Aconitase-Proteine bedeutend während einer Konfrontation mit ROS bzw. Superoxidationen sind. *AcnA2* scheint hier eine wichtigere Rolle zu spielen als *AcnB* und *AcnA*, jedoch ist auch ein Zusammenspiel der drei Proteine bei der Sensierung oder im Schutz gegen oxidativen Stress denkbar.

3.26 *AcnB* reguliert die Expression des *cit* Gens

Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Expression des Gens des Citrattransporters *CitH* von *Xcv* in Tomatenpflanzen erhöht und dieser Transporter notwendig für die Citrataufnahme ist (Tamir-Ariel *et al.*, 2011). Neben *CitH* existiert in *Xcv* ein möglicher zweiter Citrattransporter, welcher von *cit* (XCV3602) kodiert wird (Thieme *et al.*, 2005). Transkriptomvergleiche mit Gesamt-RNA des *Xcv* Wildtypstammes 85-10 und der *Xcv* Deletionsmutante 85-10 $\Delta acnB$ führten eine ca. 4-fach erhöhte Expression von *cit* in der Mutante (3.9) im Vergleich zum Wildtyp auf. Somit scheint *AcnB* eine reprimierende Wirkung auf die Expression von *cit* zu haben und spielt eine maßgebliche Rolle in der Regulation des Citratstoffwechsels von *Xcv*.

Um dies zu bestätigen, wurde eine quantitativer Vergleich der Expression von *cit* durch qRT-PCR mit synthetisierter cDNA aus Gesamt-RNA der exponentiellen und stationären Wachstumsphase der *Xcv*-Stämme 85-10 und 85-10 $\Delta acnB$ durchgeführt. Die Abb. 37 zeigt die relativen Transkriptraten

resultierend aus den Mittelwerten der Ct-Werte der PCR-Reaktion mit *cit*-spezifischen Primern unter Berücksichtigung der Differenzen der Expression des Gens der 16S rRNA der einzelnen *Xcv*-Stämme. Die relative Transkriptionsrate des Wildtyps 85-10 wurde hierbei auf 1,0 gesetzt. Aus der Darstellung geht hervor, dass die Expression von *cit* in der exponentiellen Phase aufgrund einer Deletion von *acnB* um einen Faktor von 2 erhöht, im Vergleich zum Wildtyp, vorlag, während in der stationären Phase eine ähnlich hohe Transkription wie im Fall des Wildtypstamms zu verzeichnen war.

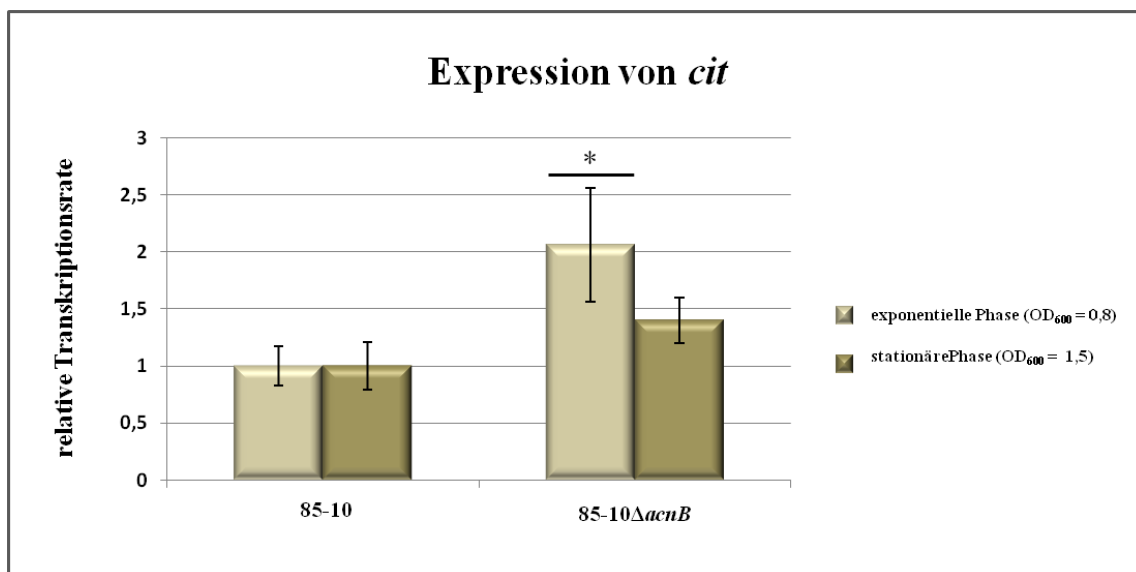


Abb. 37: Quantitativer Vergleich der Expression von *cit* in der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase der *Xcv*-Stämme 85-10 und 85-10Δ*acnB* mittels qRT-PCR.

Es wurde Gesamt-RNA der *Xcv*-Stämme 85-10 und 85-10Δ*acnB* in exponentieller und stationärer Phase isoliert und cDNA mit Random-Primern synthetisiert. Die qRT-PCR wurde mit dem *QuantiTect SYBR Green PCR Kit* (Qiagen, Hilden), sowie dem Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Qiagen; Hilden) und *cit*-spezifischen Primern (Tab. 12; Anhang) durchgeführt. Die Transkription von *cit* wurde im Fall des Wildtyps 85-10 auf 1,0 gesetzt. Die relative Transkriptionsrate des *cit*-Gens der eingesetzten Stämme wurde aus Reaktionen von 3 biologischen Replikaten unter Berücksichtigung der Spezifität, Effizienz und den Transkriptionsunterschieden des Gens der 16S rRNA berechnet. Signifikanz, T-Test: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Die Ergebnisse bestätigen, dass die Transkription von *cit* durch eine Deletion von *acnB* induziert wird, wodurch vermutet werden kann, dass AcnB eine reprimierende Wirkung auf die Expression von *cit* besitzt. Dies verdeutlicht die Rolle von AcnB im Citratstoffwechsel von *Xcv* und identifiziert AcnB als direkten oder indirekten negativen Regulator des putativen zweiten Citrattransporters Cit.

3.27 Einfluss des FLP-Proteins auf die Genexpression in *Xcv85-10*

Um neben der Rolle von FLP als Aktivator der Transkription von *cydA* (siehe 1.6) Hinweise auf weitere regulierte Gene zu erlangen, wurde wie in 2.10.7 beschrieben, 10 µg Gesamt-RNA aus *Xcv 85-10* und *Xcv 85-10Δflp* bzw. Zellpellets aus 10 ml Kultur (MA-Medium; OD₆₀₀ = 0,8) zur Microarray-Analyse (AG Anke Becker, Marburg) bereitgestellt. Auch hier wurde ein Signifikanztest mit Hilfe des Programms EMMA und eine Selektion relevanter Gene nach einem p-Wert < 0,05 bzw 0,1, einem A-Wert (Signalstärke) > 5, einem M-Wert (log₂ Veränderung der jeweiligen Transkriptmenge zwischen beiden vergleichenden Stämmen) > 1 bzw. < -1 und dem M-sd (standard deviation des M-Wertes) durchgeführt. Ein M-Wert von 1 bzw. -1 steht für eine differentielle Expression mit einem Faktor von 2.

Die Auswertung der Microarraydaten erfolgte ebenfalls unter Berücksichtigung der A-Werte der Negativkontrollen (*empty slide* bzw. *spotting buffer*). Diese wiesen Signalstärken von 4,37-4,72 auf. Somit sollten Gene, welche tatsächlich durch eine Deletion von *flp* in ihrer Expression in *Xcv* verändert sind eine deutlich höhere Signalstärke als die Negativkontrollen aufweisen. Einige Gene mit hoch- bzw. herabregulierter Expression sind in Tab. 11 aufgelistet. Alle identifizierten, differentiell exprimierten Gene dieses Transkriptomvergleichs befinden sich in Tab. 13 (Anhang).

Tab. 11: Einige Gene mit veränderter Expression in *Xcv 85-10Δflp* im Vergleich zum Wildtyp *Xcv 85-10*

Genbezeichnung	Putative Funktion	p-Wert	M-Wert	M-sd	A-Wert
empty		0,28	0,086	1,58	4,72
spotting buffer		0,31	0,006	0,15	4,32
hochregulierte Expression					
XCV1972	<i>Putative secreted protein</i>	6,35E-07	1,39	0,47	8,16
XCV3877	<i>Putative ABC transporter permease</i>	1,14E-05	1,11	0,51	7,93
<i>rpsN</i> ;XCV1012	<i>rpsN 30S ribosomal protein S14</i>	7,36E-08	1,07	0,29	8,38
<i>atpA</i> ; XCV3769	<i>ATP synthase alpha chain</i>	0,0002	1,00	0,65	7,86
herabregulierte Expression					
<i>cydA</i> , XCV2535	<i>Cytochrome D ubiquinol oxidase, subunit II</i>	1,69E-05	-1,366	0,654	8,58
<i>cydX</i> ; XCV2537	<i>Putative membrane protein</i>	2,07E-06	-3,98	1,53	7,75
XCV2352	<i>Putative carboxymuconolactone decarboxylase;</i>	4,60E-09	-7,05	1,49	8,76

Die Ergebnisse der Microarrayanalysen zeigten, dass die Expression des Gens XCV1972 um ein ca. 2,8 Faches erhöht im Vergleich zum Wildtyp 85-10 vorlag. Bei dem Genprodukt handelt es sich um ein putatives, sekretiertes Protein mit unbekannter Funktion. Weiterhin konnte durch Vergleich der

Transkriptom von *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *flp* (Tab. 11) eine ca. 2,2-fach erhöhte Expression des Gens einer putativen ABC-Transporterpermease (XCV3877) in der *Xcv flp* Mutante identifiziert werden. Ebenso ist die Expression von *rpsN* (kodiert für ein ribosomales Protein) und *atpA* (kodiert für die α -Kette der ATP Synthase) um ein 2-faches in der Mutante erhöht.

Gene mit einer herabregulierten Expression in der *Xcv flp* Mutante im Vergleich zum Wildtyp 85-10 stellen, neben *cydA* (ca. 2,6-fach), auch *cydX* (ca. 8-fach) und das Gen XCV2352 (kodiert für eine putative Carboxymuconolactoncarboxylase) dar. Das Gen XCV2352 wies in der *flp* Mutante eine stark verminderte Expression (ca. 14-fach) auf.

Die Ergebnisse zeigten, dass FLP im Vergleich zu FNR-ähnlichen Proteinen anderer Bakterien ein kleines Regulon besitzt und, neben *cydA*, auch die Expression von *cydX* zu aktivieren scheint. Somit stellt FLP eventuell ein Aktivator des gesamten *cyd* Operons dar.

3.28 FLP und AcnA2 regulieren die Expression von *cydA*

Neben der gezeigten Aktivierung der Expression von *cydA* durch FLP_{*Xcv*} (siehe 1.6), konnte durch Vergleiche der Transkriptom von *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 Δ *acnA2* durch Microarray-Analysen ebenfalls *cydA* als *target* von AcnA2 identifiziert werden (3.18). Hier konnte durch den Einsatz von Kulturen der exponentiellen Phase ($OD_{600} = 0,6$) eine Reprimierung der Expression von *cydA* in der Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp 85-10 festgestellt werden. Um dies zu bestätigen, wurde eine quantitative Analyse der Expression von *cydA* mittels qRT-PCR (2.10.6) durchgeführt. Die Anzucht der *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10 Δ *acnA2*, sowie 85-10 Δ *acnA* und 85-10 Δ *acnB* erfolgte in 1 x MA-Medium bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase mit einer OD_{600} von ca. 0,8 und der stationären Phase mit einer OD_{600} von ca. 1,5. Anschließend wurde ebenfalls cDNA nach erfolgter Gesamt-RNA-Isolierung der Stämme synthetisiert. Die qRT-PCR erfolgte wie beschrieben mit *cydA*-spezifischen Oligonukleotiden (Tab. 12; Anhang) und einer 1:50 Verdünnung der jeweiligen cDNA. Die relative Transkriprate wurde unter Berücksichtigung der Unterschiede in der Expression der 16S rDNA (*16S difference*) der eingesetzten Stämme, wie in 2.10.6 beschrieben, errechnet. Die RNA-Menge des Wildtyps 85-10 wurde dabei auf 1,0 gesetzt. Die Ergebnisse der Reaktionen sind in Abb. 38 graphisch dargestellt.

Auch in diesem Experiment konnte in der exponentiellen Wachstumsphase der *Xcv* Deletionsmutante 85-10 Δ *acnA2* eine geringere Expression von *cydA* (Faktor = 0,6) im Vergleich zum Wildtypstamm 85-10 ermittelt werden. Die Transkriptionsrate in der stationären Phase zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede zur Transkription im Wildtyp 85-10. Die Expression von *cydA* in der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase der Deletionsmutanten 85-10 Δ *acnB* und 85-10 Δ *acnA* entsprach ebenfalls der Expression von *cydA* im Wildtypstamm 85-10.

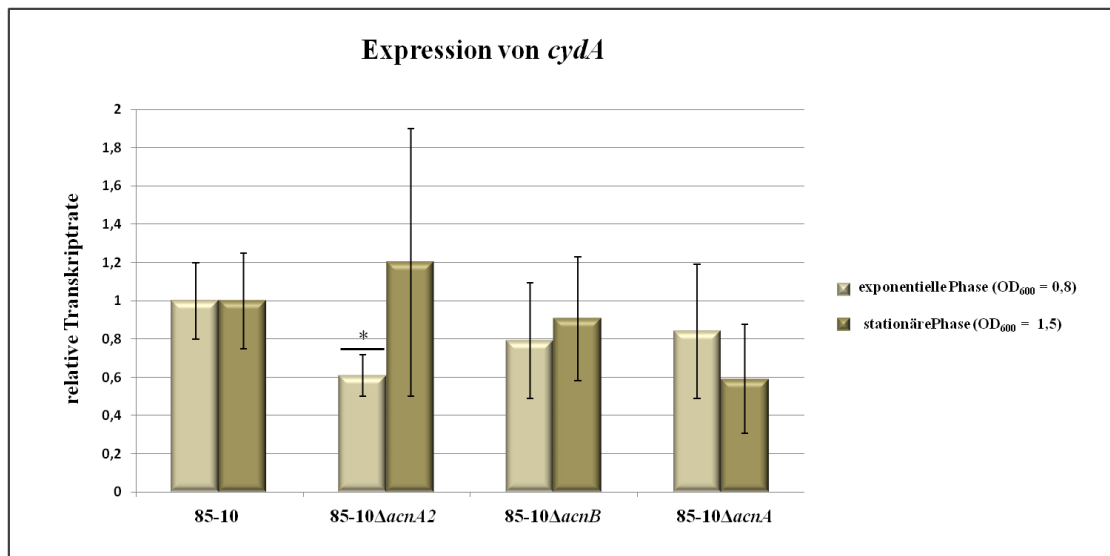


Abb. 38: Quantitativer Vergleich der Expression von *cydA* in der exponentiellen sowie der stationären Wachstumsphase der *Xcv*-Stämme 85-10Δ*acnA2*, 85-10Δ*acnB* und 85-10Δ*acnA* und Wildtyp 85-10.

Es wurde cDNA mit Random-Primern (RevertAid *H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific, Schwerte) nach erfolgter Isolation der Gesamt-RNA der *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10Δ*acnA*, 85-10Δ*acnA2* und 85-10Δ*acnB* aus Zellen der exponentiellen bzw. stationären Phase synthetisiert. Die qRT-PCR wurde mit dem *QuantiTect SYBR Green PCR Kit* (Qiagen, Hilden), sowie dem Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Qiagen; Hilden) und *cydA*-spezifischen Primern (Tab. 12; Anhang) durchgeführt. Die Transkription von *cydA* wurde im Fall des Wildtyps 85-10 auf 1,0 gesetzt. Die relative Transkriptrate des *cydA*-Gens der eingesetzten Stämme wurde aus Reaktionen von 3 biologischen Replikaten unter Berücksichtigung der Spezifität, Effizienz und den Transkriptionsunterschieden des Gens der 16S rRNA berechnet. Signifikanz: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression von *cydA* durch eine Deletion von *acnA2* in *Xcv* in exponentieller Phase leicht reduziert vorlag, während diese durch eine *acnB*- und *acnA*-Deletion unverändert blieb. In der stationären Wachstumsphase entsprach die Expression in den gezeigten Mutanten dem Niveau des Wildtyps. Dies deutet darauf hin, dass AcnA2 direkt oder indirekt an der Regulation von *cydA* beteiligt ist und eventuell, neben FLP, einen zweiten Regulator von *cydA* darstellen könnte bzw. an der Regulation eines zusätzlichen Regulators beteiligt sein könnte. Es hat den Anschein als wäre AcnA2 ausschließlich in der exponentiellen Wachstumsphase für die Regulation der *cydA* Expression von Bedeutung.

4 Diskussion

4.1 Die Rolle der Aconitasen von *Xcv* in der Sensierung von Stressbedingungen und der Nutzung von C-Quellen im Apoplasten von Wirtspflanzen

Pathogene Mikroorganismen sind während der Infektion ihres spezifischen Wirtes den verschiedensten bekannten und unbekannten Faktoren ausgesetzt, welche der Abwendung einer Verbreitung und Auslösung der Infektion dienen. Hierbei handelt es sich um Stressbedingungen, welche hauptsächlich als Abwehrreaktion der Pflanze dienen und während der Pathogen-Wirt-Interaktion induziert werden. Die Anpassung, an sich ändernde Bedingungen und damit verbundene Entwicklung von Strategien zur Umgehung der Abwehr, sind daher essentiell für das Überleben des Bakteriums und einem erfolgreichen Befall des Wirtes. Da die Stressfaktoren, wie die Bildung von ROS und Limitierung von Eisen in den spezifischen Wirten wie Pflanzen und Tieren als Bestandteil der Abwehr induziert werden, sind vermutlich auch die Abwehrstrategien der verschiedenen pathogenen Mikroorganismen funktionell verwandt (Weinberg, 2009; Jittawuttipoka *et al.*, 2010). Weitere Stressbedingungen, die zu einer Abwehr der Wirtszellen gehören, können neben oxidativen Stress und Eisenlimitierung auch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid-Derivaten, pH-Wert Änderungen sowie auch Substratlimitierung und Reduktion von Sauerstoff sein (Mehdy, 1996; Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998; Nürnberger and Brunner, 2002; Somerville *et al.*, 2002; Jittawuttipoka *et al.*, 2010).

Xcv und einige andere phytopathogene Mikroorganismen vermehren sich innerhalb des Apoplasten des pflanzlichen Gewebes und dringen nicht in das Zellinnere ein. Um das Überleben im Apoplasten zu sichern, werden nicht nur extrazelluläre Proteine sekretiert und Effektoren in die Zelle transloziert, sondern auch Proteine benötigt, welche Änderungen der apoplastischen Bedingungen sensieren und eine Anpassung einleiten. Durch den begrenzten Raum des Apoplasten und der kontinuierlich steigenden Bakteriendichte, während des Befalls des Wirtes, stellen neben den erwähnten Auftreten von oxidativem Stress, als Teil der pflanzlichen Abwehr, auch die reduzierte Sauerstoffverfügbarkeit und eine Substratlimitierung mögliche Stressfaktoren dar. Da es sich bei *Xcv* um ein obligat aerob lebendes Bakterium handelt, kann eine geringe Verfügbarkeit von Sauerstoff ebenso wachstumslimitierende Folgen haben.

Gerade durch die Verbreitung im Apoplasten befindet sich das Bakterium in einen wichtigen Kompartiment der Wirtspflanze. Der apoplastische Raum dient als Sauerstoffdepot und stellt einen essentiellen Reaktionsraum dar, der zelluläre Gewebe miteinander verbindet (Felle, 2006). Er ist beteiligt an dem Transport von Stoffen, an Enzymkatalysen, Abwehrmechanismen und am Gasaustausch mit der Umwelt. Der Sauerstoffgehalt des Apoplasten spielt eine maßgebliche Rolle für

den dort vorherrschenden pH-Wert, welcher einer der wichtigsten Parameter für den transmembralen Transport von organischen Stoffen in die Zelle ist. Der Zustand der Hypoxie im Apoplasten ist sowohl für die Pflanze ein Stressfaktor, indem es dadurch zur Depolarisierung von Membranen kommt, als auch für das Bakterium. Die Existenz der Hypoxie sollte nicht von langer Dauer sein und muss daher zur adäquaten Anpassung vom Bakterium sensiert werden. Neben reduzierenden O₂-Bedingungen kann auch, wie bereits dargestellt, eine Substratlimitierung ein wachstumshemmender Faktor sein.

4.1.1 Citrat und andere organische Säuren sowie Aminosäuren als apoplastische Haupt-C-Quellen für *Xcv* und *AcnB* als wichtiges metabolisches Enzym

Die tatsächlichen Kohlenstoffquellen von *Xcv* im Apoplasten sind weitgehend unbekannt und nur wenig untersucht. Ältere Studien zeigten, dass einige intakte Xanthomonadenzellen verschiedener Spezies kein Glukonat als C-Quelle verwerten konnten, aber Glukose ohne weiteres oxidiert wurde. *X. campestris* pv. *campestris* und *X. campestris* pv. *pruni* sind in der Lage Glukose zu oxidieren, während *X. campestris* pv. *phaseoli* Glukonat nicht verwerten kann (Katznelson, 1955; Katznelson, 1958). Somit kommen Monosaccharide als Substrate und C-Quellen auch im Apoplasten der Wirtspflanze für *Xcv* in Frage. Jedoch zeigten Studien, dass *Xcv* ein unverändertes Wachstum in transgenen Pflanzen aufwies, welche in der Synthese einer zellwandgebundenen Invertase reprimiert waren (Kocal *et al.*, 2008; Kocal, 2011). Diese spaltet Saccharose in Glukose und Fruktose. Dies deutete darauf hin, dass Hexosen nicht die Hauptenergiequelle für *Xanthomonas* in den Wirtspflanzen darstellen. Ebenso wurde entdeckt, dass die Aktivität der zellwandgebundenen Invertase von Tomatenpflanzen bei Pathogenbefall anstieg, um den Energiebedarf für Abwehrreaktionen durch erhöhte Aufnahme der Hexosen in die Zellen zu decken (Swarbrick *et al.*, 2006; Essmann *et al.*, 2008). Demnach ist es denkbar, dass Kohlenhydrate eher in geringen Mengen im Apoplasten und vor allem während der Infektion vorliegen. Somit muss auf andere Substrate zurückgegriffen werden. Bisher wurden keine Studien der apoplastischen Flüssigkeit von Paprikablättern im Zusammenhang mit *Xcv* durchgeführt. Jedoch existieren Studien der apoplastischen Metabolite von Tomatenpflanzen nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Rico and Preston, 2008), wobei Succinat und Citrat als die wichtigsten organischen Säuren im pflanzlichen Apoplasten identifiziert werden konnten. Da beide Substrate im TCA-Zyklus für den primären Metabolismus, die Energiekonservierung und für die Bereitstellung von Zwischenprodukten für Biosynthesen benötigt werden, könnten diese organischen Säuren auch als C-Quellen für *Xcv* im pflanzlichen Apoplasten in Frage kommen.

Relevante Enzyme des Citratstoffwechsels sind die, in dieser Arbeit untersuchten Aconitasen, welche wichtige und ubiquitär verbreitete Enzyme des TCA-Zyklus darstellen und Citrat als Substrat nutzen. Ebenso sind diese aufgrund ihres [4Fe-4S]-Clusters bedeutend in der Sensierung von Eisen und ROS, welche wachstumslimitierende Bedingungen für Bakterien sind. Interessanterweise zeigte eine *acnB*-

Deletionsmutante von *Xcv* ein reduziertes Wachstum *in planta* im Vergleich zum Wildtyp 85-10 (3.4; Abb. 16, Abb. 17), jedoch hatte eine Deletion von *acnB* keinen Einfluss auf das *in vitro* Wachstum in MA- und NYG-Medium (Anhang; Abb. 41; 3.7; Abb. 20). Des Weiteren führte eine Deletion von *acnB* zu einem reduzierten Wachstum von *Xcv* in MA-Citrat- und MA-Saccharose-Medium im Vergleich zum Wildtyp-Stamm (3.8; Abb. 21; 3.23, Abb. 33). Da diesen Medien keine Casaminoacids zugefügt wurden, könnten Citrat, Saccharose und auch Aminosäuren als C-Quellen für *Xcv* in Frage kommen und AcnB eine Rolle in deren Verwertung spielen. Es ist denkbar, dass AcnB in dieser Hinsicht für die Sensierung eines Signals bzw. Verwertung eines Substrats im Apoplasten benötigt wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Citrat ein wichtiges Substrat von *Xcv* im Apoplasten sein könnte. Diese Annahme wurde, neben dem reduzierten *in vitro* Wachstum einer *Xcv acnB* Deletionsmutante mit Citrat als C-Quelle auch durch die *in vitro* Analyse einer *Xcv acnA2* Deletionsmutante bestätigt. Diese Mutante wies ein verbessertes Wachstum in Minimalmedium mit Citrat als einziger C-Quelle auf, was durch eine gezeigte, erhöhte Synthese der AcnB- und AcnA-Proteine zurückzuführen ist (3.22; Abb. 32; 3.20, Abb. 30; 3.21, Abb. 31). Eine erhöhte Synthese von AcnB konnte auch bei einer *Xcv roaX-roaY* Deletionsmutante beobachtet werden (3.10, Abb. 22), welches in einem verbessertem Wachstum mit Citrat als C-Quelle resultierte (3.11, Abb. 23). Eine *Xcv acnA* Deletionsmutante zeichnete sich hingegen durch ein unverändertes Wachstum im MA-Citrat-Medium aus (3.13, Abb. 24). Diese Daten identifizieren AcnB als wichtiges Citrat-verwertendes Enzym im Stoffwechsel von *Xcv*. Da eine *Xcv acnB* Mutante jedoch lediglich ein reduziertes Wachstum mit Citrat als einziger C-Quelle aufwies und der Wildtyp bekannterweise nicht ohne eine C-Quelle wachsen kann (Daten nicht gezeigt), scheint neben AcnB eine zweite Aconitase im Citratstoffwechsel aktiv zu sein. Hierbei könnte es sich um AcnA und/oder AcnA2 handeln.

Die Vermutung, dass Citrat eine C-Quelle für *Xcv* im Apoplasten von Paprikablättern darstellt, stützt sich zusätzlich auf Studien einer Mutante des *citH* Gens in *Xcv* (Tamir-Ariel *et al.*, 2011). Bei CitH handelt es sich um einen Citrat:H⁺-Symporter, welcher notwendig für die Aufnahme von Citrat während des Wachstums von *Xcv* in Tomatenpflanzen ist. Diese Untersuchungen identifizierten Citrat eindeutig als eine apoplastische C-Quelle für *Xcv* in Tomate. Eine *citH* Mutante wies in Tomatenpflanzen sowie in Minimalmedium mit Citrat ein reduziertes Wachstum auf, welches *in vitro* in Vollmedium nicht beobachtet werden konnte. Die gleichen Entdeckungen konnten innerhalb dieser Arbeit mit einer *Xcv acnB* Mutante *in vitro* und *in planta* mit Paprikapflanzen gemacht werden. Weiterhin konnten Tamir-Ariel *et al.* (2011) feststellen, dass die Expression des *citH* Gens während des Wachstums von *Xcv* hochreguliert ist. In einer späteren Studie wurde eine deutlich geringere Citratkonzentration im Apoplasten der Blätter von Tomatenpflanzen nach Wachstum des *Xcv* Wildtyps und eines *citH* Komplementationsstammes im Gegensatz zum Wachstum einer *citH* Mutante detektiert (Tamir-Ariel *et al.*, 2011). Dies identifiziert Citrat eindeutig als C-Quelle von *Xcv* im

Apoplasten von Tomate. Somit ist Citrat höchstwahrscheinlich auch eine C-Quelle für *Xcv* in Paprika, was durch Untersuchung der Citratkonzentration im Apoplasten von Paprikablättern nach Wachstum von *Xcv* in zukünftigen Arbeiten bestätigt werden sollte.

Citrat scheint als Kohlenstoffquelle nicht unüblich zu sein, da neben einigen anderen Bakterien (Antranikian, 1987; Hugenholtz, 1993) auch einige enterobakterielle Spezies die Fähigkeit erlangt haben, Citrat als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen (Bott, 1997). Bei *E. coli* konnte durch die Nutzung von TCA-Intermediaten wie Citrat, Isocitrat und Glutamat ein verbessertes Wachstum beobachtet werden (Somerville *et al.*, 1999). In verschiedenen *Pseudomonas* Spezies wurde belegt, dass TCA-Intermediate bevorzugt vor Kohlenhydraten genutzt werden (Rahme *et al.*, 1992). Somit ist es denkbar, dass sich der Stoffwechsel von phytopathogenen Mikroorganismen durch Koevolution mit dem Wirt an die dort verfügbaren C-Quellen angepasst hat (Tamir-Ariel *et al.*, 2007).

Weiterführend ist zu nennen, dass in Studien von Tamir-Ariel (2011) ein erhöhter pH-Wert, durch H^+ -Symport, während des Wachstums des *Xcv* Wildtyps in Minimalmedium mit Citrat als C-Quelle im Gegensatz zum Wachstum einer *citH* Mutante vorlag. Es wurde postuliert, dass die Citrataufnahme und -verwertung durch den simultanen H^+ -Import günstige Bedingungen für das Pathogen durch pH-Wert-Änderungen schafft. Es ist bekannt, dass Alkalisierung im Apoplasten des Wirtes notwendig für die erfolgreiche Vermehrung von vielen phytopathogenen Bakterien ist (Atkinson and Baker, 1987a; Atkinson and Baker, 1987b; Alfano and Collmer, 2004). Die benannten Unterschiede des pH-Wertes *in vitro* nach Wachstum von *Xcv* in der Studie von Tamir-Ariel (2011) sind bisher unklar, da anhand von Genannotation ein weiterer Citrat: H^+ Symporter in *Xcv* existiert (Thieme *et al.*, 2005). Das Gen *cit* (XCV3602) kodiert ebenfalls einen Citrat: H^+ -Symporter, welcher eine 72% Identität zu einem Citrat: H^+ -Symporter aus *Klebsiella pneumoniae* aufweist (Tamir-Ariel *et al.*, 2007).

Innerhalb dieser Arbeit konnte durch Transkriptomvergleiche eine hochregulierte Expression von *cit* in einer *acnB* Mutante identifiziert werden (3.9). Dies ist ein weiteres Indiz für die Verwertung von Citrat im Apoplasten von Paprikablättern und eine damit verbundene Rolle des AcnB Proteins. Die Wichtigkeit von AcnB während des Wachstums von *Xcv* *in planta* wird ebenso deutlich, durch eine reduzierte Bildung einer HR in resistenten Paprikapflanzen sowie einer reduzierten Entwicklung von Krankheitssymptomen bei Infiltration einer *acnB* Mutante von *Xcv* (3.5, Abb. 18). AcnB kann jedoch nicht in Zusammenhang mit dem Typ-III-Sekretionssystem oder dessen Regulatoren HrpX und HrpG gebracht werden, da die Synthese von AcnB in einer *hrpG* und *hrpX* Mutante unbeeinflusst ist (Kirchberg *et al.*, 2012). Daher ist der reduzierte Phänotyp einer *Xcv acnB* Mutante in suszeptiblen Pflanzen vermutlich nur auf das reduzierte Wachstum *in planta* zurückzuführen, wodurch es zu einer verzögerten Ausbildung von Krankheitssymptomen kommt. Diese Annahme würde jedoch nicht die reduzierte Ausbildung einer HR bei resistenten Paprikapflanzen erklären. Eventuell ist dies mit einem generellen physiologischen Effekt, aufgrund des beeinträchtigten TCA-Zyklus einer *Xcv acnB*

Mutante, verbunden. AcnB könnte auch für die Etablierung von *Xcv* zu Beginn des Wachstums in den Wirtspflanzen benötigt werden.

Mit den Erkenntnissen der Regulation des *cit* Gens durch AcnB wäre es denkbar, dass auch der Cit-Transporter eine wesentliche Rolle in der Citrataufnahme von *Xcv* spielt, wobei Cit entweder zusätzlich zum CitH Transporter oder wirtsspezifisch in Paprikapflanzen fungieren könnte. Aufgrund der Ergebnisse lässt sich vermuten, dass AcnB eine reprimierende bzw negative Wirkung auf die Expression von *cit* ausübt. Das Signal, welches eine Herunterregulierung der Expression von *cit* durch AcnB bewirkt, ist bislang jedoch unverstanden. Möglicherweise könnte ein Signal aufgrund von Citratverfügbarkeit die negative Regulation von *cit* durch AcnB aufgehoben werden oder eine regulatorische Funktion von AcnB setzt hierbei erst nach ausreichender Citrataufnahme ein.

Ebenso könnte der Cit-Transporter eine Funktion für den Citratexport bei intrazellulärer Citratakkumulation besitzen oder hauptsächlich zur Aufnahme von Metallionen in Komplex mit Citrat dienen. Es ist bekannt, dass Citrat mit Metallionen, vor allem Eisen, Komplexe zum effizienten Transport dieser Mikronährstoffe bildet (Lopez-Bucio *et al.*, 2000). Eisen ist im Apoplasten von Wirtspflanzen meist in Form von Eisen-Citrat-Komplexen zu finden, da Citrat bei einem pH-Wert von 5,0-6,0, wie er im Apoplast von Tomatenblättern vorliegt, ein effektiver Eisenträger ist (Jia and Davies, 2007; Jones and Wildermuth, 2011). Die Citrattransporter CitN und CitM aus *Bacillus subtilis* transportieren Citrat nur im Komplex mit Metallionen, jedoch kein freies Citrat (Krom *et al.*, 2000). Da in diesem Fall jedoch die Aufnahme von freiem Citrat in *B. subtilis* gezeigt wurde, wird über einen dritten unbekannten Citrattransporter diskutiert. Obwohl durch *alignments* des Cit-Proteins Identitäten von 97 % zu einem Citrat-Carrier-Protein aus *X. axonopodis* pv. *citri* und von 97 % und 80 % zu Citrat: H⁺-Symportern aus *X. axonopodis* und *Pseudomonas syringae* festgestellt werden konnten, würde eine Analyse des Wachstums einer *cit* Deletionsmutante *in planta* sowie in Minimalmedium mit Citrat erst Aussagen liefern, ob das Cit-Protein tatsächlich als Citrattransporter von *Xcv* fungiert. Da für CitH bereits ein Transport von Citrat gezeigt wurde (Tamir-Ariel *et al.*, 2007), könnte Cit eventuell eine Funktion hauptsächlich zur Eisenaufnahme durch Eisen-Citrat-Komplexe besitzen. Da die Synthese von AcnB durch AcnA2 inhibiert wird bzw. auf einem geringen Level gehalten wird, wäre es denkbar, dass dies bei Eisenmangelbedingungen vorliegt. Hierbei könnte AcnA2 als Apo-Protein fungieren, wobei durch Inhibierung der Translation von AcnB eine Transkription von *cit* erfolgen könnte. Es könnte so zur Aufnahme von Eisen-Citrat-Komplexen durch den Cit-Transporter erfolgen. Bei ansteigender, intrazellulärer Eisenkonzentration würde AcnA2 als Holoenzym vorliegen und die Inhibierung der Translation von AcnB aufgehoben werden.

4.1.2 AcnA2 ist in die Regulation alternativer Stoffwechselwege von *Xcv* je nach Substratverfügbarkeit involviert

Obwohl Citrat als wichtige C-Quelle von *Xcv* identifiziert wurde, ist das Bakterium jedoch durchaus in der Lage Saccharose aufzunehmen und zu verwerten, da durch Genomsequenzierung von *Xcv* (Thieme *et al.*, 2005) ein Gen für einen Saccharose-Transporter (*sym*; XCV3616) und für eine Saccharose-Hydrolase (*suh*; XCV3618) identifiziert wurde. Durch Transkriptomvergleiche der Mutante *Xcv* 85-10 Δ *acnA2* mit dem Wildtyp-Stamm 85-10 kann davon ausgegangen werden, dass AcnA2 u.a. Gene des Kohlenhydratstoffwechsels reguliert. Durch die Deletion von *acnA2* kommt es zu einer Hochregulation der Expression von *suh* sowie des Gens *zwf2*, was für eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodiert. Ein weiteres Indiz ist ein besseres Wachstum von *Xcv* in Minimalmedium mit Saccharose als mit Citrat, welches innerhalb dieser Arbeit beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Jedoch geben diese *in vitro* Daten keine Auskunft über die Anwesenheit und Verfügbarkeit dieser Substrate im Apoplasten von Pflanzen und deren Auswirkung auf die Vermehrung des Bakteriums in diesem Kompartiment. Die Deletionsmutanten *Xcv* Δ *sym* und *Xcv* Δ *suh* aus Studien von Kocal *et al.* zeichneten sich im Minimalmedium mit Saccharose durch ein reduziertes Wachstum aus (Kocal *et al.*, 2008; Kocal, 2011). Jedoch spricht die Tatsache eines unveränderten Wachstums dieser Mutanten *in planta* gegen eine zentrale Rolle von Saccharose für die Ernährung von *Xcv* in Wirtspflanzen. Diese Erkenntnisse stützen die Vermutung, dass organische Säuren und auch Aminosäuren die apoplastischen C-Quellen für *Xcv* in Paprikablättern darstellen und Mono- und Disaccharide dort nicht in größeren Mengen vorhanden sind. Da bekannt ist, dass es durch T3-Effektoren zur Induktion von sogenannten *SWEET genes* in *X. oryzae* pv. *oryzae* kommt (Streubel *et al.*, 2013), welche für einen Export von Saccharose in den Apoplasten verantwortlich sind, wird davon ausgegangen, dass Kohlenhydrate zu Beginn des Wachstums von *Xcv* *in planta* nur in geringen Konzentrationen im Apoplasten vorliegen und erst später in ihrer Menge zunehmen könnten. Citrat und Aminosäuren werden vermutlich als erste apoplastische Substrate zur Etablierung von *Xcv* während des beginnenden Wachstums in Wirtspflanzen benötigt.

Da in einer *Xcv* *acnA2* Mutante neben einer erhöhten Genexpression von *suh* und *zwf2* ebenfalls eine hochregulierte Expression von *acnB*, *acnA* und dem Gen einer putativen Citratsynthase (XCV1157) vorliegt, lässt vermuten, dass AcnA2 sowohl als Regulator von Genen des Kohlenhydrat- als auch des Citratstoffwechsels fungiert (3.18; 3.19). Die Citratsynthase katalysiert den ersten irreversiblen Schritt des TCA-Zyklus, wobei Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat kondensiert werden. Studien mit *B. subtilis* konnten zeigen, dass die Citratsynthase ein limitierendes Enzym des TCA-Zyklus darstellt und eventuell die Synthese und Funktion der weiteren Schritte reguliert (Jin and Sonenshein, 1994). Citrat besaß in dieser Studie eine induzierende Funktion auf die Expression des Gens der metabolischen Aconitase CitB. Die Anwesenheit von Glukose dagegen bewirkte eine

Katabolitrepression der Expression von *citB*, der Synthese der Citratsynthase sowie eine Inhibierung der Citrataufnahme (Kim *et al.*, 2003). Dies spricht dafür, dass AcnA2 eine Rolle im Citratstoffwechsel von *Xcv* zukommen könnte, wobei diese bei Citratanreicherung möglicherweise die Synthese der Citratsynthase und die Aufnahme von Citrat indirekt inhibiert. Somit ist es denkbar, dass AcnA2 eine sensierende Funktion im Citratstoffwechsel haben könnte und die eventuellen, primären Stoffwechselenzyme Citratsynthase, AcnB und AcnA reguliert, durch Herunterregulation der Expression von XCV1157, *acnA* und *acnB*.

Interessanterweise konnte ebenfalls ein reduziertes Wachstum einer *Xcv acnA2* Deletionsmutante *in planta*, jedoch ein verbessertes Wachstum in Minimalmedium mit Saccharose (3.23, Abb. 33), als auch mit Citrat (3.22, Abb. 32) im Gegensatz zu einer *Xcv acnB* Mutante beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass das AcnA2 Protein eine andere Funktion als das AcnB Protein besitzt. Jedoch scheint das reduzierte Wachstum einer *acnA2* Mutante *in planta* nicht im Zusammenhang mit der Citratverwertung zu stehen, da eine erhöhte Synthese von AcnB durch die Deletion von *acnA2* keinen Einfluss auf das Wachstum in Paprikablättern hat. Auch das reduzierte Wachstum einer *acnA2-acnA* Mutante *in planta* (3.24, Abb. 35), die sich ebenfalls durch erhöhte AcnB-Synthese auszeichnet, bestätigt diese Vermutung. Offensichtlich scheint AcnA2 im Vergleich zu AcnB auf ein anderes Signal im Apoplasten der Wirtspflanze zu reagieren und vermutlich eine wichtige genregulatorische Funktion zubesitzen, während AcnB eher über eine metabolische Funktion verfügt. Da kein verändertes Wachstum einer *Xcv acnB* Mutante *in vitro* in MA-Medium, aber mit Citrat und Saccharose als C-Quelle und ohne Zugabe von Casaminoacids beobachtet werden konnte, deutet diese Beobachtung auf die Möglichkeit von *Xcv* hin andere Substrate als C-Quellen nutzen zu können. Eine Deletion von *acnA2* hatte, neben einer erhöhten Expression von *suh* und *zwf2*, auch eine höhere Transkription von *sdh* (XCV2245) zur Folge, welches für die Fe-S-Untereinheit einer putativen Succinat-Dehydrogenase kodiert. Das verbesserte Wachstum einer *Xcv acnA2* Mutante mit Saccharose als C-Quelle lag vermutlich in einer erhöhten Aktivität einiger Enzyme des Entner-Doudoroff-Wegs und des TCA-Zyklus zugrunde. Saccharose könnte durch induzierte Synthese von Suh schneller abgebaut werden und durch eine induzierte Synthese von G6PD des Entner-Doudoroff-Wegs könnte es eventuell zu einer verstärkten Bildung des Pyruvats gekommen sein. Durch die Induktion von AcnB, Sdh (Succinat-Dehydrogenase) und CS (Citratsynthase) in einer *Xcv acnA2* Mutante könnte eine verbesserte Energiekonservierung vorliegen, welche zum besseren Wachstum dieses Stammes beigetragen hat.

Eine denkbare Strategie von *Xcv* im Apoplasten von Wirtspflanzen könnte hierbei eine effiziente Regulation spezifischer Gene durch die Aconitasen zur Verwertung der vorherrschenden C-Quelle sein. Da ein höheres Wachstum von *Xcv*-Wildtypstamm 85-10 mit Saccharose im Gegensatz zu Citrat erreicht wird, werden vermutlich Glukose oder Saccharose als primäre Substrate präferiert. Möglicherweise werden die gegebenen Substratbedingungen und auch Stressfaktoren durch AcnA2

sensiert, und die Regulation der Gene für den Kohlenhydrat- oder Citratmetabolismus eingeleitet. Somit wäre *Xcv* in der Lage effizient zwischen der Verwertung von verschiedenen Substraten umzuschalten. Zukünftige Analysen des Metaboloms des Apoplasten von Paprikablättern mit und ohne Infektion von *Xcv* würden Metabolite identifizieren und quantifizieren und Veränderungen der Metabolite durch Pathogenbefall aufdecken.

Da das Gen *acnA2* im Genom von *Xcv* in direkter Nachbarschaft zu Genen des Methylcitratzyklus lokalisiert ist und die Transkription von 2 Genen (*XCV1156*, *prpD*, Methylisocitratlyase; *XCV1157*, Citratsynthase) durch eine Deletion von *acnA2* hochreguliert waren, könnten auch kurzkettige Fettsäuren wie Propionat und Acetat mögliche Substrate von *Xcv* darstellen. In einigen Mikroorganismen befindet sich ein Gen eines homologes oder orthologes Aconitase A Proteins in unmittelbarer Nähe eines Operons von Genen des Methylcitratzyklus, wie auch in *Salmonella enterica* (Horswill and Escalante-Semerena, 2001). *AcnA* hat dort eine hohe enzymatische Aktivität und katalysiert die Hydratisierung von 2-Methyl-*cis*-Aconitat zu 2-Methylisocitrat. Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass *AcnB* die Funktion der Katalyse beim Fehlen von *AcnA* ausüben kann. Auch in *E. coli* gibt es eine dritte Aconitase (*AcnC*), welche als 2-Methylcitrat-Dehydratase fungiert und Citrat sowie auch Isocitrat als Substrate verwendet (Blank *et al.*, 2002). Vorläufige Untersuchungen des Wachstums mit Propionat ergaben jedoch keine Wachstumsunterschiede zwischen dem *Xcv* Wildtyp 85-10 und einer *acnA2* Deletionsmutante (Daten nicht gezeigt). Allerdings scheint *AcnA2* die Expression der Gene der Methylisocitratlyase und der Citratsynthase in *Xcv* negativ zu regulieren. Möglicherweise könnte hier eine Schutzfunktion vorliegen, da 2-Methylcitrat ein starker Inhibitor von Aconitasen und Citratsynthase ist (Roe *et al.*, 1998; Horswill and Escalante-Semerena, 2001; Roe *et al.*, 2002). Daher wäre es denkbar, dass *AcnA2* von *Xcv* bei beiden Substraten, Citrat und Methylcitrat eine Rolle spielt. Hierbei könnten eine enzymatische Funktion in der Katalyse von Citrat zu Isocitrat sowie eine regulatorische Funktion als Apo-Protein durch Kontrolle der Regulation von *AcnB* und *AcnA* in Frage kommen.

4.1.3 Das *AcnA*-Protein könnte eine Rolle bei reduzierten O₂-Bedingungen spielen

Im Gegensatz zu einer Deletion von *acnB* hat eine Deletion von *acnA* in *Xcv* keinen vergleichbaren Einfluss auf das Wachstum *in planta* (3.14, Abb. 25) und auf die Bildung einer HR oder Krankheitssymptomen in Paprikablättern (3.15, Abb. 26). Das deutet darauf hin, dass *AcnA* während des Wachstums von *Xcv* im Apoplasten keine wichtige Rolle hinsichtlich des Wachstums wie *AcnB* zu spielen scheint. Jedoch zeigte sich bei dem Wachstum *in planta* nach 10 Tagen in der stationären Phase ein leicht reduziertes Wachstum einer *acnA* Deletionsmutante (3.14, Abb. 25). In dieser Phase des Wachstums wurde postuliert, dass reduzierte O₂-Bedingungen aufgrund der hohen

Populationsdichte im Apoplasten vorherrschen könnten und AcnA möglicherweise eine Rolle für *Xcv* bei niedrigen O₂-Konzentrationen spielt. Diese Annahme wird gestützt von einem *in vitro* Experiment mit 6 ml MA-Medium in Hungateröhrchen. In diesem Experiment führte eine Deletion von *acnA* in *Xcv*, im Gegensatz zu einer Deletion von *acnB*, zu einem reduzierten Wachstum in MA-Medium, welches vor allem zu Beginn des Wachstums bzw. in exponentieller Phase beobachtet werden konnte. In der stationären Phase wurde allerdings wieder die optische Dichte des Wildtyps erreicht (Anhang, Abb. 41). Es kann davon ausgegangen werden, dass bei diesem Experiment keine optimale O₂-Versorgung im Medium gewährleistet war, welche zu einem reduzierten Wachstum der *acnA*-Mutante führte. Diese Annahme beruht auf einem Experiment, welches mit 4 ml MA-Medium in Hungateröhrchen durchgeführt wurde (Daten nicht gezeigt). Dort konnten keine Wachstumsunterschiede zwischen *Xcv* Wildtyp, einer *acnA*- oder *acnA2*-Mutante, wie im gleichen Experiment mit 6 ml MA-Medium, beobachtet werden. Da hier kein Substrat einen limitierenden Faktor darstellen kann, wird davon ausgegangen, dass in 4 ml Medium eine bessere O₂-Versorgung vorlag. Das reduzierte Wachstum einer *Xcv acnA* Mutante dieses vorläufigen Experiments mit 6 ml deutet somit darauf hin, dass AcnA eine Rolle bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen spielen könnte. Eventuell fungiert AcnA als Sensor für Änderungen in den O₂-Konzentrationen im Apoplasten während der Infektion von Wirtspflanzen.

Auch eine *acnA2* Mutante zeigte in Minimalmedium (6 ml in Hungateröhrchen) ein reduziertes Wachstum (Anhang, Abb. 41). Dies ist ein Indiz dafür, dass im Fall von AcnA2 und AcnA ein anderes Signal existieren muss, als für AcnB bzw. eine andere oder zusätzliche Funktion besteht. Da eine Deletion von *acnB* keine Auswirkung auf das Wachstum *in vitro* mit 6 ml MA-Medium zeigte, scheint die Anwesenheit von Aconitasen des Typ A ausreichend zu sein, während die *in planta* Wachstumsanalysen zeigen, dass dort die Anwesenheit der Aconitase Typ B genügt und das Fehlen von AcnA keine Auswirkungen auf die Etablierung von *Xcv* im Apoplasten hat. Da Aconitasen Fe-S-Proteine sind, könnte eine Änderung im Sauerstoff- und/oder Eisengehalt als mögliches Signal, während des *in vitro* Wachstums in MA-Medium in Frage kommen. In einigen Mikroorganismen zählt bei den Aconitase-Typen A und B eher die Aconitase A als das O₂- und ROS-resistentere Enzym, welches als Regulator zum Überleben des Bakteriums bei oxidativen Stress, Eisenlimitierung und Nährstoffmangel dient (Cunningham *et al.*, 1997) (Tang and Guest, 1999).

AcnA könnte daher auch eine Rolle in *Xcv* bei der intrazellulären Sensierung von ROS oder O₂ im Apoplasten spielen und sich durch eine höhere Resistenz gegenüber ROS und O₂ auszeichnen.

Die Sauerstoffkonzentration im Apoplasten von Paprikablättern ist bislang unbekannt. Jedoch sind Schwankungen in der Sauerstoffkonzentration innerhalb des Apoplasten allein schon durch die photosynthetische Aktivität der Pflanze und dem herrschenden Tag-Nacht-Rhythmus bzw. dem Wechsel von Dunkel- und Lichtreaktion denkbar. Theoretisch müsste während der Lichtreaktion mehr O₂ vorhanden sein, als in der Dunkelreaktion, wo durch Photorespiration auch O₂ verbraucht wird

(Wright *et al.*, 2011). Es wurden Sauerstoffmessungen im Paprikablatt nach Infiltration durchgeführt, wobei jedoch keine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erreicht werden konnte (Daten nicht gezeigt). Hierbei wurde mit optisch isolierten O₂-Sensoren gearbeitet, deren Spitze einem Durchmesser von 50 µm betrug. Damit kam es höchstwahrscheinlich zur Zerstörung des umliegenden Blattgewebes, so dass keine effiziente Messung der O₂-Konzentration möglich war. Mit fortschreitender Technik und der Entwicklung von Sensoren mit geringerem Durchmesser könnte in Zukunft eine Messung in Spaltöffnungen erfolgen, welche nur einen Durchmesser von weniger als ca. 10 µm aufweisen (Dr. Gerd Hause, persönliche Mitteilung).

Das Bakterium *X. campestris* pv. *campestris* besitzt eine Aconitase des Typ A (RpfA), welche in diesem Organismus als die Hauptaconitase identifiziert wurde (Wilson *et al.*, 1998). In *Xcc* führt eine Deletion von *rpfA* zur reduzierten Bildung von extrazellulären Enzymen und extrazellulären Polysacchariden (EPS). RpfA aus *Xcc* weist eine 95%ige Identität in der Aminosäuresequenz zum AcnA-Protein aus *Xcv* auf. Das *rpfA* Gen gehört in *Xcc* einem *rpf* Operon an, welches teilweise für die Bildung von Pathogenitätsfaktoren, wie extrazellulären Polysacchariden verantwortlich ist. Einige *rpf* Gene (*rpfBFCHG*) befinden sich auch in *Xcv* direkt stromaufwärts von *acnA* (Thieme *et al.*, 2005; Einleitung, 1.5), wobei das Genprodukt von *rpfE* aus *Xcc* eine Identität von 85 % zum Genprodukt von *rpfE* aus *Xcv* aufweist. Das *rpf* Gencluster aus *Xcc* kodiert Proteine, welche für die Synthese von diffusionsfähigen Signalmolekülen (DSF, *diffusible signal molecules*) benötigt werden (O'Connell *et al.*, 2013). Diese DSF vermitteln die Zell-Zell-Kommunikation (*Quorum Sensing*) zur Regulation von diversen Prozessen der bakteriellen Virulenz (Von Bodman *et al.*, 2003). Diese Proteine werden zu verschiedenen funktionellen Kategorien, wie Biosynthese, DNA Replikation, oxidativem Stress, Antibiotikaresistenz und intermediären Stoffwechsel zugeordnet und werden vermutlich hauptsächlich während des Wachstums *in planta* benötigt (O'Connell *et al.*, 2013). Somit könnte eventuell ein Zusammenhang zwischen den Aconitasen in *Xcv* und der Bildung und Sekretion von Endogluconasen, Proteasen und Polygalacturonatlyasen, wie im Fall von *Xcc* (Dow *et al.*, 2000) oder auch zur Synthese von DSF und zellulären Prozessen wie z.B. bei Schutz gegen oxidativen Stress bestehen.

Es bestehen bislang keine Hinweise auf eine regulatorische Funktion von AcnA, da keine Transkriptomvergleiche einer *Xcv acnA* Mutante mit dem Wildtyp durchgeführt wurden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass AcnA eine unterstützende oder stabilisierende Funktion für AcnB einnimmt oder an der Sensierung von spezifischen Signalen beteiligt ist. Bestätigend zu dieser Annahme ist auch die Tatsache, dass es nicht möglich war eine *acnB-acnA* Doppelmutante, sowie ein *acnB-acnA-acnA2* Dreifachmutante zu erzeugen. Interessanterweise besteht ein Indiz, dass AcnA aus *Xcv* eventuell durch das Typ-II-Sekretionssystem sekretiert wird (Daniela Büttner, persönliche Information). Analysen zeigten, dass AcnA im Zellüberstand nach Wachstum von *Xcv* 85-10 und nur sehr schwach im Fall einer *xpsE* Mutante zu detektieren war. Das *xpsE* Gen ist Bestandteil eines Genclusters für das Typ-II-

Sekretionssystem und eine Deletion dieses Gens führt zum Verlust extrazellulärer bakterieller Enzyme (Szczesny *et al.*, 2010). Jedoch konnte dieser Effekt nicht eindeutig komplementiert werden, weshalb weitere Analysen in diesem Zusammenhang durchzuführen wären. Über Aconitasen, die sekretiert bzw. aus der Zelle transportiert werden, ist in anderen Organismen bislang nichts bekannt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass AcnA ein Substrat des Typ-II-Sekretionssystems von *Xcv* darstellt und außerhalb der bakteriellen Zelle eine sensierende Rolle einnehmen könnte. Wenn AcnA tatsächlich eine unterstützende Funktion für die Rolle von AcnB im Citratmetabolismus einnimmt, wäre ein Zusammenhang von AcnA vielleicht in der Citratbereitstellung oder -verfügbarkeit denkbar. Eventuell könnte AcnA für die Rekrutierung von Citrat zum Citrattransporter der Zelle verantwortlich sein und ebenso könnte auch Eisen in diesem Zusammenhang seinen Weg in die Zelle durch Komplexbildung mit Citrat finden.

4.1.4 AcnA2 dient als möglicher Regulator der Eisenhomöostase und im Schutz gegenüber oxidativem Stress

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass AcnA2 eine größere Rolle im Stoffwechsel von *Xcv* zukommt als bisher gedacht. AcnA2 könnte, vermutlich neben AcnA, in Prozesse der Anpassung an die umgebenden Sauerstoffbedingungen involviert sein, welche die bereits erwähnten Ergebnisse des *in vitro* Wachstumsexperiments der *acnA2*-Mutante zeigen.

Interessanterweise deuten die Transkriptomvergleiche des *Xcv* Wildtyps 85-10 und einer *acnA2* Deletionsmutante darauf hin, dass die Expression von Genen wichtiger Enzymkomplexe der Atmungskette durch eine *acnA2* Deletion herabreguliert vorliegen (3.18). Hierbei handelt es sich um *petA*, welches für eine Fe-S-haltige Untereinheit der Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase mit Rieske-Cluster kodiert. Weiterhin konnte mit quantitativer Transkriptionsanalyse gezeigt werden, dass ebenso die Expression des *cydA* Gens in der *Xcv acnA2* Mutante reprimiert vorlag. Dies würde bedeuten, dass AcnA2 auch als ein Regulator für Redoxkomponenten der Atmungskette fungiert und somit an der Anpassung von *Xcv* an die umgebenden Sauerstoffbedingungen beteiligt ist.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die gezeigte Sensitivität der *Xcv acnB*- und *acnA*-Deletionmutanten gegenüber Menadion, vor allem aber die erhöhte Sensitivität einer *acnA2* Mutante (3.25, Abb. 36). Die Überlebensunfähigkeit einer *Xcv acnA2-acnA* bzw. einer *acnA2-acnB* Deletionsmutante in diesem Experiment verdeutlicht ein Zusammenspiel der Aconitase-Proteine in *Xcv* bei oxidativem Stress. Da die *Xcv*-Doppelmutanten 85-10 Δ *acnA2-acnA* und 85-10 Δ *acnA2-acnB* nicht in Gegenwart von Menadion überleben können, aber *in planta* zum Wachstum fähig sind, deutet dies darauf hin, dass ROS zwar ein Stressfaktor im Apoplasten darstellen kann, aber dort kein wachstumslimitierender Faktor für *Xcv* ist. Interessanterweise konnte bei einem Transkriptomvergleich der *Xcv acnA2* Deletionsmutante mit dem Wildtyp 85-10 eine erhöhte Expression des Gens *ohr* (XCV0290) in der

Mutante identifiziert werden. Dieses Gen kodiert für ein Resistenzprotein gegen organische Hydroperoxide, welche neben u. a. Peroxidasen und Glutathionperoxidasen eine Funktion in der Detoxifizierung von organischen Hydroperoxiden und damit ROS besitzen (Fuangthong *et al.*, 2001). Neben einer erhöhten Menge an H_2O_2 ist auch eine erhöhte Menge an organischen Hydroperoxiden als Teil der pflanzlichen Abwehr bei Pathogenbefall festzustellen (Sutherland, 1991). In *X. campestris* pv. *phaseoli* zeichnete sich eine *ohr* Mutante durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber wachstumsinhibierenden, als auch letalen Konzentrationen von organischen Hydroperoxiden aus (Mongkolsuk *et al.*, 1998). Die Toxizität der organischen Hydroperoxide bestehen darin, dass sie die Fähigkeit besitzen, freie organische Radikale zu erzeugen, welche mit biologischen Molekülen reagieren können und zur Perpetuierung freiradikalischer Reaktionen führen (Halliwell, 1989; Akaike *et al.*, 1992). Die Sensitivität der Deletionsmutanten gegenüber Menadion und die erhöhte Transkription des *ohr* Gens durch eine Deletion von *acnA2* deutet darauf hin, dass die Aconitasen von *Xcv* in der Sensierung von reaktiven Sauerstoffspezies oder in den Schutz der Zelle involviert sind. Oxidativer Stress tritt vor allem häufig während Pathogen-Wirt-Interaktionen auf und muss besonders währenddessen sensiert werden (Xu and Pan, 2000; Jittawuttipoka *et al.*, 2010).

Besonders H_2O_2 scheint eine wichtige Komponente der pflanzlichen Abwehr, induziert durch Pathogenbefall, zu sein (Xu and Pan, 2000). Auch in dieser Arbeit konnte das Vorhandensein von H_2O_2 in Paprikablättern nach Infiltration mit *Xcv* an den infizierten Blattbereichen durch Diaminobenzidin-Färbung nachgewiesen werden (3.6.). Vor allem die bereits erwähnte Lethalität der *Xcv*-Doppelmutanten *acnA2-acnB* und *acnA2-acnA* bei Behandlung mit Menadion bzw. ROS deutet darauf hin, dass die Aconitasen maßgeblich in den Prozess der Sensierung von ROS beteiligt sind. Daher sind Gene wie *ohr* von Bedeutung bzw. spielen ihre Produkte eine wichtige Rolle in der Reaktion auf oxidativen Stress bei Pathogen-Wirt-Interaktionen.

Neben anderen Bakterien konnte auch in *E. coli* ein Zusammenhang zwischen Aconitasen und oxidativem Stress gezeigt werden. Dort kam es in einer *acnB* Mutante zur Akkumulation von Citrat. Nach einer Behandlung der Zellen mit Paraquat, einem ROS-Generator, blieb die Akkumulation von Citrat in einer *acnB* Mutante aus, während diese in einer *acnA* Mutante zunahm (Varghese *et al.*, 2003). Somit kam es zur Induktion von *acnA* und zur Komplementation des Verlustes von *AcnB* durch *AcnA* und identifizierte *AcnA* als stressinduziertes Protein in *E. coli*. Ebenso konnte eine erhöhte Sensitivität von *acn*-Mutanten in *E. coli* gegenüber H_2O_2 nachgewiesen werden (Tang *et al.*, 2002). In dieser Studie konnte eine Transkriptstabilisierung von *sodA*, dem Gen einer Superoxiddismutase, durch *AcnA* als Apo-Protein gezeigt werden. Es wird vermutet, dass Aconitase-Proteine als schützender Puffer gegen basalen oxidativen Stress fungieren, der während des aeroben Wachstums als Quelle für ROS auftritt. Gerade die Entdeckung der erhöhten Expression wichtiger Gene durch Transkriptomanalysen einer *Xcv acnA2* Mutante im Vergleich zum Wildtyp innerhalb dieser Arbeit,

lässt vermuten, dass diese Regulation von AcnA2 in dessen Apo-Form als posttranskriptioneller Regulator stattfindet.

Ein weiterer Zusammenhang von AcnA2 und ROS, ist die benannte erhöhte Expression des Gens einer Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (*zwf2*) durch eine *acnA2* Deletion und die Hochregulierung der Expression des Gens einer Succinat-Dehydrogenase (XCV2242) durch eine Deletion von *acnB* in *Xcv*. Beide Proteine sind ROS-Generatoren während der Atmung und die Succinat-Dehydrogenase zusätzlich ein membranständiges Enzym des TCA-Zyklus (Mracek *et al.*, 2013). Möglicherweise könnte AcnA2 auch durch seine Regulation der Expression von *acnB* dazu beitragen, die Bildung von ROS in der Zelle niedrig zu halten.

Aufgrund des Fe-S-Zentrums sind Aconitasen neben oxidativem Stress auch sensitiv gegenüber Eisenlimitierung und spielen vermutlich in der Wirtspflanze eine wichtige Rolle neben der Sensierung von ROS, auch in der Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase. Es ist bekannt, dass neben Citrat auch Eisen ein essentielles Element für den Metabolismus vieler Organismen darstellt und die Regulation von Eisen und Citrat sowohl zellulär als auch systemisch kritisch für die normale Zellphysiologie und das Überleben ist (Tong and Rouault, 2007).

Da Eisen einen sehr lebenswichtigen Faktor darstellt, ist es unwahrscheinlich, dass Eisen in Wirtspflanzen für eindringende Mikroorganismen einfach zugänglich ist (Expert *et al.*, 1996). In vielen Bakterien konnte bereits eine Verbindung zwischen Aconitasen und dem Eisenmetabolismus identifiziert werden. So wurde in *Pseudomonas aeruginosa* durch die Anwesenheit von Eisen eine erhöhte Aktivität der Aconitasen bzw. eine reduzierte Aktivität durch Eisenlimitierung gezeigt (Somerville *et al.*, 1999). In *Xcc* konnte eine Verbindung zwischen RpfA, der Hauptaconitase, und dem Eisenmetabolismus beobachtet werden (Wilson *et al.*, 1998). Hier kam es in einer *rpfA* Mutante zur Reduktion der intrazellulären Eisenkonzentration im Vergleich zum Wildtyp. Es folgte eine Bindung von freiem Eisen an Proteine, um die intrazelluläre Eisenkonzentration niedrig zu halten und die Zelle dadurch vor der Bildung von ROS zu schützen. In diesem Zusammenhang wurde postuliert, dass die Aconitase von *Xcc*, ähnlich wie bei *Legionella pneumophila*, das "major iron-containing enzyme" darstellt (Mengaud and Horwitz, 1993) und RpfA mit dieser Rolle einen Einfluss auf die Verteilung von Eisen zwischen den Zellkomponenten haben könnte. Obwohl Untersuchungen zum Eisenmetabolismus in *Xcv* im Zusammenhang mit Aconitasen noch nicht durchgeführt wurden, gibt es durch Transkriptomvergleiche dennoch Indizien für einen Einfluss der Aconitasen auf den Eisenstoffwechsel. Durch Microarray-Analyse einer *Xcv acnA2* Mutante konnte eine herabregulierte Expression des *fur* Gens (XCV1560) identifiziert werden (3.18). Fur ist in Bakterien ein transkriptioneller Repressor für Gene der Eisenaufnahme und Eisen-regulierter Gene und stellt einen zentralen, wichtigen Regulator der intrazellulären Eisenhomöostase dar (Jittawuttipoka *et al.*, 2010). Bei eisenreichen Bedingungen dient Fe^{2+} als Korepressor, wobei der Fur- Fe^{2+} -Komplex die Expression von Fur-regulierten Genen reprimiert. Ist Eisen dagegen limitierend, liegt das Fur Protein

inaktiv vor, was zur Expression der Fur-regulierten Gene führt (Bagg and Neilands, 1987). Ebenso werden von Fur auch Gene reguliert, die in andere wichtige Zellprozesse wie oxidativen Stress, Toxinproduktion und Virulenz involviert sind (Kitphati *et al.*, 2007; Cha *et al.*, 2008). Die Studien einer *fur* Mutante in *Xcc* zeigten, dass Fur dort die Funktion eines Repressors für Gene der Siderophorsynthese ist (Jittawuttipoka *et al.*, 2010). Außerdem zeichneten sich die *fur* Mutanten durch einen aeroben Wachstumsdefekt aus, welcher durch die erhöhte Eisenaufnahme und intrazellulärer Konzentration begründet lag. Somit ist es denkbar, dass Fur ebenfalls eine derartige Rolle in der Eisenhomöostase in *Xcv* spielen könnte und eine Regulation durch AcnA2 stattfindet. Die Untersuchung einer *Xcv fur* Mutante hinsichtlich der Genregulation, des Wachstums und der Sensitivität gegenüber eisenlimitierenden Bedingungen, sollten Bestandteil zukünftiger Arbeiten sein. Ein anderer Hinweis der Wichtigkeit von Aconitasen im Eisenmetabolismus von *Xcv* ist die Tatsache, dass in einer *Xcv acnB* Mutante die Transkription von *hemT* (XCV2661) hochreguliert vorliegt (3.9). Dieses Gen kodiert ein putatives Einzeldomänen-Hämerythrin, während in anderen Bakterien auch Multidomänen-Hämerythrine vorkommen (French *et al.*, 2008). Aufgrund ihres Histidin-gebundenen 2Fe-Zentrums werden als mögliche Funktionen von Hämerythrin die Bindung von O₂ zur Speicherung bzw. die Bindung von O₂ als sensorischer Mechanismus oder die Eisenbindung zur Speicherung angenommen. Die Regulation eines solchen Proteins durch AcnB verdeutlicht die Rolle der Aconitasen im Eisenstoffwechsel von *Xcv*. Die Transkription von *hemT* könnte hierbei indirekt auch durch AcnA2 stattfinden, durch dessen Reprimierung der Expression von *acnB*. Da dieses HemT-Protein in *Xcv* in Relation zum Eisenmetabolismus und zur O₂- Verwertung stehen könnte, sollte es zukünftig hinsichtlich seiner Bindung zu Eisen und Sauerstoff untersucht werden. Die Analyse einer *Xcv hemT* Mutante unter Eisen- und O₂-limitierenden Bedingungen könnte einige Aussagen zu den Funktionen des Genprodukts liefern.

Ein anderes bedeutendes Gen, dessen Expression in einer *Xcv acnA2* Deletionsmutante herabreguliert vorliegt, ist *baf* (XCV0526). Dieses Gen kodiert für ein Bakterioferritin-assoziiertes Ferredoxin und bildet einen weiteren Zusammenhang zwischen Eisenhomöostase und AcnA2 in *Xcv*. Hier besteht das Indiz, dass AcnA2 ein Aktivator des Gens bzw. in die Aktivierung der Transkription von *baf* involviert ist. Studien des Bakterioferritin-assoziiertes Ferredoxins von *E. coli* und *P. aeruginosa* identifizierten es als ein [2Fe-2S]-Cluster-haltiges Protein (Garg *et al.*, 1996). Signifikante Ergebnisse dieser Studie führten auf, dass die Funktion des Bakterioferritin-assoziierten Ferredoxins in einer Mobilisierung des Eisens vom Bakterioferritin liegt. Somit lag unter eisenlimitierenden Bedingungen das Gen des Bakterioferritin-assoziierten Ferredoxins (*bfd*) hochreguliert vor (Ochsner *et al.*, 2002). Möglicherweise ist ebenfalls eine Aktivierung von *baf* durch AcnA2 in *Xcv*, gerade unter eisenlimitierenden Bedingungen, vorhanden. Auch hier sollten zukünftige Untersuchungen einer *Xcv baf* Mutante Aufschluss über die Funktion des Genproduktes liefern.

Neben einer möglichen Regulation von Genen, wie *baf* und *hemT* durch AcnA2 in *Xcv*, welche vermutlich in den Eisenmetabolismus involviert sind, existieren auch Hinweise für eine Regulation von Genen durch AcnA2, welche für TonB-abhängige Proteine der äußeren Membran kodieren (XCV3297, XCV3085) (3.18). Die *tonB* Gene in *Xcc* konnten als essentiell für die Eisenaufnahme bzw die Aufnahme von Eisensiderophoren detektiert werden, da eine *Xcc tonB* Mutante in der Fe^{3+} -Aufnahme beeinträchtigt war und dies eine Zunahme der extrazellulären Siderophore zur Folge hatte (Wiggerich *et al.*, 1997; Vorhölter *et al.*, 2012). Da in *Xcc* die Bildung von Siderophoren durch Eisen reguliert ist, könnte diese Relation auch für *Xcv* denkbar sein, sowie eine TonB-abhängige Aufnahme von Eisensiderophoren, bei dessen Regulation möglicherweise AcnA2 eine Rolle spielt.

In *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 wurden ebenfalls Siderophore analysiert. Neben Yersiniabactin und Pyoverdine wurde Citrat als drittes Siderophore entdeckt, welches notwendig für das Wachstum unter eisenlimitierenden Bedingungen ist (Jones and Wildermuth, 2011). Eventuell könnte auch Citrat bei *Xcv* neben der Funktion als Substrat eine Funktion als Siderophore zukommen und die Aconitasen, vor allem AcnA2, als bifunktionales Protein und Regulator von Genen des Kohlenstoff-, Citrat- und Eisenmetabolismus und für Schutz vor oxidativen Stress in Zusammenhang gebracht werden.

Ein anderer interessanter Aspekt ist die erhöhte Expression von plasmidkodierten Genen (*p38*; *virB2*, XCV0042; *virB4*, XCV0041), welche für sekretierende Proteine des TypIV-Sekretionssystems kodieren. Das TypIV-Sekretionssystem stellt eine Besonderheit der Gattung *Xanthomonas* unter den phytopathogenen Mikroorganismen dar (Souza *et al.*, 2011). Diese Sekretionssysteme befähigen zur Translokation von Proteinen und/oder Protein-DNA-Komplexen ins extrazelluläre Milieu, zur DNA-Aufnahme, zum horizontalen Gentransfer mit anderen Bakterien oder eukaryotischen Zellen, zur Sekretion von Toxinen und zur Injektion von Virulenzfaktoren (Backert and Meyer, 2006). In vielen Fällen trägt es zur effizienten Besiedlung und zur Umgehung des Immunsystems des Wirtes bei und ist in einigen tierpathogenen Mikroorganismen, wie *Legionella pneumophila*, untersucht worden (Ninio and Roy, 2007). Daher könnte es die Aconitasen AcnB und indirekt auch AcnA2, durch Regulation von *acnB*, in Zusammenhang mit der Virulenz des Bakteriums bringen.

Seitdem Eisen, Eisensiderophore und oxidativer Stress als Signale während Pathogen-Pflanzen-Interaktionen bekannt sind und Aconitasen aufgrund ihres Fe-S-Zentrums und ihrer Bifunktionalität als Sensoren derartiger Bedingungen diskutiert werden (Expert *et al.*, 1996; Wojtaszek, 1997; Wilson *et al.*, 1998; Tang and Guest, 1999; Xu and Pan, 2000; Tang *et al.*, 2002; Jittawuttipoka *et al.*, 2010; Cvetkovska and Vanlerberghe, 2012), ist es weiterhin wichtig die Aconitasen von *Xcv* während der Infektion von Paprikapflanzen zu studieren.

4.2 AcnA2 aktiviert die Expression des Gens einer Cytochrom-*d*-Ubiquinol- Oxidase neben FLP als Hauptaktivator

Bei *Xcv* handelt es sich um ein obligat aerob lebendes Bakterium, bei dem die Verfügbarkeit von Sauerstoff für das Wachstum essentiell ist. Da es sich im Apoplasten, einem zentralen Kompartiment der Wirtspflanzen vermehrt und vermutlich innerhalb des Wirts Schwankungen in den Sauerstoffkonzentrationen u.a. durch Photosynthese ausgesetzt ist, müssen sensitive, bakterielle Mechanismen existieren, die diese Schwankungen aufgreifen und der Stoffwechsel folgend an die verfügbaren Ressourcen angepasst wird. Wichtige Proteine unter aeroben Wachstumsbedingungen stellen die eisenhaltigen Cytochrome dar, welche terminale Oxidasen der Atmungskette sind. Alle untersuchten aerob lebenden Bakterienspezies besitzen, aus dem genannten Grund der Anpassung an verfügbaren Sauerstoff, mehrere respiratorische Oxidasen (Anraku, 1988; Kai *et al.*, 1992). *Xcv* besitzt die Gene für drei terminale Cytochrom-Oxidasen (Thieme *et al.*, 2005). Hierbei handelt es sich um die Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase (*cydABX*), die Cytochrom-*o*-Ubiquinol-Oxidase (*cyoABCD*) und eine Cytochrom-*aa*₃-Oxidase (mehrere *cta* Gene).

FLP stellt bekanntlich einen Aktivator der *cydA* Expression in *Xcv* dar (Heinz, 2011; Hoppe, 2013). Dies konnte auch innerhalb dieser Arbeit durch Transkriptomvergleiche zwischen *Xcv* Wildtyp 85-10 und einer *Xcv flp*-Mutante bestätigt werden. Eine Deletion von *flp* zeichnete sich durch eine herabregulierte Expression der Gene *cydA* (Faktor ca. 2,7) und *cydX* (Faktor ca. 8) aus, welche für Untereinheiten der putativen Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase kodieren (3.27). Die Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase zeichnet sich in anderen Mikroorganismen durch eine hohe Affinität gegenüber Sauerstoff aus (Mason *et al.*, 2009) und könnte vor allem für *Xcv* während der Pathogen-Wirt-Interaktion von Bedeutung sein. Untersuchungen vorheriger Studien zeigten, dass unter optimaler O₂-Versorgung sehr wenig *cydA* Transkript in den Zellen vorhanden war im Vergleich zu O₂-limitierenden Bedingungen (Heinz, 2011). Dies spricht für eine regulatorische Rolle von FLP hinsichtlich der *cyd* Expression gerade bei O₂-ärmeren Bedingungen, denen *Xcv* vermutlich im Apoplasten von Wirtspflanzen in einer späten Wachstumsphase und/ oder während der Dunkelheit ausgesetzt ist. Das FLP in diesem Fall als Aktivator fungiert, bestätigten 454 Sequenzierungen durch die Identifizierung der Transkriptions-Initiations-Stelle von *cydA* (Schmidtke *et al.*, 2012). Die FLP-Bindestelle stromaufwärts von *cydA* konnte hierbei in der Region um -41 lokalisiert werden. Dies zeigt, dass es sich bei dem Promotor von *cydABX* um einen Klasse-II-Promotor handelt, welche sich in der Region nahe -41,5 zum Startpunkt befinden und ein FNR-ähnliches Protein dort als Aktivator bindet (Blake *et al.*, 2002). Dieses Beispiel einer Aktivierung eines Gens einer Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase durch ein FNR-ähnliches Protein unter O₂-reduzierten Bedingungen ist in Bakterien bisher einzigartig. In *E. coli* liegt FNR unter aeroben Bedingungen inaktiv, durch den Verlust des Fe-S-Clusters vor und ist nicht mehr zu einer DNA-Bindung fähig, wodurch die

Reprimierung der Expression der Gene der Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase (*cydAB*) aufgehoben wird (Cotter *et al.*, 1990).

Durch Austausch des Glutamat (E214) und des Serins (S217) der DNA-Bindedomäne des FLP Proteins mit Alanin, konnte eine verminderte Aktivierung der *cydA* Transkription mittels qRT-PCR festgestellt werden (Hoppe, 2013). Es wurde postuliert, dass diese AS-Austausche eine verminderte Bindefähigkeit des Proteins an die DNA zur Folge hat. Im FNR Protein von *E. coli* ist die AS Glutamat(E209) neben Serin (S212) in der DNA Bindedomäne essentiell für die DNA-Erkennung. Durch den Austausch des Glutamats zu Aspartat in der FNR-Bindedomäne kam es nicht zur Aktivierung eines FF (FNR-Bindestelle)-*lacZ*-Fusion-Konstruktes durch Bindeverlust des Proteins. Des Weiteren wiesen AS-Austausche (V206R und E209D) und (V208R, S212G und G216K) der DNA-Bindedomäne Veränderungen der FNR Bindungsspezifität auf (Spiro *et al.*, 1990). Da diese essentiellen AS auch in der DNA-Bindedomäne von FLP konserviert vorliegen, kann davon ausgegangen werden, dass FLP an der FLP-Bindestelle stromaufwärts von *cydA* zur Aktivierung der Genexpression unter semiaeroben Bedingungen bindet.

Interessanterweise konnten durch Transkriptomvergleiche von *Xcv*-Deletionsmutanten 85-10 Δ *acnB*, 85-10 Δ *flp* und 85-10 Δ *acnA2* mit dem Wildtyp 85-10 durch Microarray-Analysen eine Verbindung zwischen Aconitase-Proteinen und dem FLP-Protein in der Regulation einiger dieser Gene identifiziert werden. Die Expression des *cydA* Gens konnte ebenfalls durch eine Deletion von *acnA2* als runterreguliert identifiziert werden (3.28, Abb. 38 und Tab. 10). Demnach scheint AcnA2 ebenso wie FLP einen Aktivator der *cydA* Expression darzustellen. Bestätigend hierfür ist eine 3-fach erhöhte Expression von *cydA* in einem Komplementationsstamm einer *Xcv acnA2* Mutante (*Xcv* 85-10 Δ *acnA2*+pL6*acnA2*), wo *acnA2* plasmidkodiert vorliegt (Hoppe, 2013). In diesem Stamm ist das AcnA2 Protein offenbar in einer höheren Kopienzahl vorhanden im Vergleich zu einer chromosomalkodierten Expression von *acnA2*. Ein ähnliches Ergebnis zeigte der Komplementationsstamm *Xcv* 85-10 Δ *flp* + pL6*flp*. Weiterhin führte eine zusätzliche Deletion von *acnA2* im Genom einer *flp* Mutante mit plasmidkodierten, veränderten *flp* (FLP E214A) zu einem kompletten Verlust der Expression von *cydA*, obwohl ein *flp* Transkript nachgewiesen werden konnte (Hoppe, 2013). Diese Daten deuten darauf hin, dass neben FLP auch AcnA2 ein Aktivator der *cydA* Transkription ist. AcnA2 scheint jedoch eher ein indirekter Aktivator der Transkription von *cydA* zu sein, da eine Deletion von *acnA2* nur zu einer leicht reduzierten Expression des *cyd* Operons führt, während durch eine Deletion von *flp* kaum nachweisbare Transkripte von *cydA* vorhanden sind. Vermutlich verfügt AcnA2 in diesem Zusammenhang über eine unterstützende Rolle für FLP. AcnA2 könnte hierbei bei hohen O₂-Konzentrationen als Apo-Protein vorliegen und die Translation der *cydA*-mRNA blockieren oder diese posttranskriptionelle Rolle könnte durch die aktive Holo-Form von AcnA2 unterbunden werden. Ebenfalls ist eine Proteinwechselwirkung zwischen FLP und Holo-AcnA2 zur Aktivierung der Expression von *cydA* nicht auszuschließen. Die Daten deuten darauf hin,

dass AcnA2 wahrscheinlich für die Feinregulation der Synthese der Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase verantwortlich ist. Künftige Experimente mit Cystein-Aminosäureaustauschvarianten von AcnA2 sollten die möglichen Rollen der Apo- bzw. Holo-Formen des Enzyms klären.

In *E. coli* ist die Existenz eines zweiten, zusätzlichen Regulators im Fall der Regulation des *narGHII* Operon bekannt, welches für eine Nitratreduktase kodiert. In diesem Fall wird die Aktivierung des Operons durch den zusätzlichen Regulator NarL um ein 10-faches gesteigert im Vergleich zur alleinigen Aktivierung durch FNR. Die regulatorisch unterstützende Funktion von NarL tritt jedoch nur unter Anwesenheit von Nitrat auf (Li and DeMoss, 1988).

Interessanterweise zeigten Transkriptionsvergleiche einer *acnA2* Mutante mit dem Wildtyp *Xcv* 85-10, dass neben einer Regulierung des *cydA* Gens auch eine erhöhte Transkription des *petA* Gens (XCV2634) vorlag. Dieses Gen kodiert eine Rieske Fe-S-haltige Untereinheit der Ubiquinol-Cytochrom-*c*-Reduktase bzw. des Cytochrom-*bc1*-Komplex der Atmungskette. Dieser Komplex ist für die Bildung des elektrochemischen Gradienten über der Zellmembran wichtig, da er als Oxidoreduktase Elektronen von Ubichinon auf Cytochrom *c* überträgt (Rieske *et al.*, 1964; Mitchell, 1975; Daldal *et al.*, 1987). In Prokaryoten wird vermutet, dass durch Rieske Proteine der Elektronentransfer an die gegebenen Umweltbedingungen angepasst werden können (Schneider and Schmidt, 2005). In vielen Organismen wird der Cytochrom-*bc1*-Komplex von dem Operon *petABC* kodiert, welches auch in *Xcv* zu finden ist (Thieme *et al.*, 2005). Die Gene *petB* und *petC* befinden sich hierbei stromaufwärts des *petA* Gens. Die hochregulierte Expression von *petA* in einer *Xcv acnA2* Mutante rückt AcnA2 zusätzlich in das Licht eines Proteins, welches in die Regulation der Gene der terminalen Oxidasen von *Xcv* in Anpassung an unterschiedliche O₂-Konzentrationen involviert ist.

Andere bekannte Verbindungen von FNR-ähnlichen Proteinen zu Aconitasen existieren in *S. enterica*. Die Expression von AcnA wird hier allerdings durch das cAMP-Rezeptor-Protein (CRP, bei Glukosemangel), dem Fumarat-Nitrat-Reduktase Regulator (FNR, bei O₂-Limitierung), dem Eisenaufnahmeregulator (Fur, bei Eisenlimitierung) und dem Superoxidstress-Regulator (SoxR, bei oxidativen Stress) reguliert (Baothman *et al.*, 2013).

Ein weiterer Zusammenhang zwischen Aconitasen und der Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase in *Xcv* zeigt die reduzierte Transkription von *cydX* durch eine Deletion von *acnB* (3.9). Das Gen *cydX* gehört dem *cyd*-Operon (*cydABX*) an und kodiert vermutlich für eine Unterheit des Proteins (Hoppe, 2013). Demnach scheint AcnB eine induzierende Wirkung auf die Expression von *cydX* und damit wahrscheinlich auch auf das *cyd*-Operon zu haben. Somit ist es denkbar, dass AcnB als Apo-Protein die Expression von *cyd* posttranskriptionell reguliert. Diese Regulation könnte auch ausgehend von AcnA2 stattfinden, da AcnA2 als Regulator von *acnB* identifiziert wurde. Es wäre denkbar, dass AcnA2 als Apo-Protein nach Zerfall seines Fe-S-Zentrums, aufgrund von eventueller erhöhter ROS-Bildung und/oder hohen O₂-Konzentrationen die Expression von *acnB* posttranskriptionell reguliert. Hierbei könnte das Apo-AcnA2, welches vermutlich bei hohen O₂-Konzentrationen vorliegt, die

Translation der *acnB* mRNA blockieren, was bei niedrigen O₂-Konzentrationen ausbleiben würde. Somit würde viel AcnB-Protein vorliegen, dessen Blockierung der Translation der *cydA*-mRNA bei niedrigen O₂ Bedingungen ebenfalls aufgehoben werden würde. Jedoch würde man in diesem Fall auch durch eine *acnA2* Deletion eine reduzierte Expression von *cydX* in Transkriptomvergleichen und qRT-PCR erwarten. Es kann jedoch hierbei nicht ausgeschlossen werden, dass eine regulatorische Funktion der Aconitasen als Holo-Enzyme vorliegen kann. Ob AcnA2 und AcnB tatsächlich posttranskriptionelle Rollen als Apo-Proteine ausüben, müsste in zukünftigen Experimenten durch biochemische Charakterisierung der Aconitasen überprüft werden, wobei auch Aktivitätsmessungen (Kennedy *et al.*, 1983) in Betracht gezogen werden sollten. Hierbei werden präparierte Affinitätsäulen von CH Sepharose mit Apo-AcnA2 versehen und mit Gesamt RNA von *Xcv* äquilibriert und anschließend spezifische RT-PCR mit eluierter und präzipitierter, gebundener RNA durchgeführt (Tang and Guest, 1999).

Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass ein spezifisches Fragment von *flp* nur in der exponentiellen Wachstumsphase von *Xcv* durch RT-PCR detektiert werden konnte (Hoppe, 2013). Daher wäre es vorstellbar, dass das FLP-Protein nur in dieser Phase in der Zelle vorhanden ist und in der stationären Phase entweder instabil ist oder inaktiv vorliegt. FNR von *E. coli* wird negativ autoreguliert und reprimiert, unter anaeroben Bedingungen, demnach seine eigene Genexpression (Spiro and Guest, 1987). Dies könnte auch bei dem FLP-Protein aus *Xcv* der Fall sein, jedoch befindet sich keine erkennbare FLP-Bindestelle stromaufwärts des *flp* Gens.

Ob die Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase in *Xcv* eine essentielle Rolle spielt, ist bislang unklar, da eine *Xcv flp* Mutante keine Wachstumsdefizite *in planta* und *in vitro* aufweist, obwohl kaum *cydA* Transkript detektiert werden konnte (Hoppe, 2013). Da jedoch die Erstellung einer *Xcv cydA* Deletionsmutante bislang nicht möglich war, ist dennoch eine essentielle Funktion unter bestimmten Bedingungen nicht auszuschließen.

Innerhalb des FLP-Proteins lassen sich drei konservierte Cysteine in der N-terminalen Sensordomäne (C28, 31, 39), sowie ein viertes in zentraler Position (C129) erkennen (Heinz, 2011), welche höchstwahrscheinlich zur Ausbildung eines [4Fe-4S]-Clusters befähigt sind. Jedoch kann aufgrund eines veränderten Abstands der drei N-terminalen Cysteinreste von FLP (C28N₂C31N₇C39), im Vergleich zu FNR_{*E. coli*} (C20N₂C23N₅C29), eine andere Stabilität bzw. Sensitivität gegenüber Sauerstoff durch ein modifiziertes Fe-S-Zentrum vermutet werden. Es wäre denkbar, dass bei FLP eine erhöhte Stabilität gegenüber Sauerstoff im Vergleich zu FNR_{*E. coli*} vorliegt bzw. FLP bei anderen Sauerstoffkonzentrationen aktiv ist. Unterstützt wird diese Vermutung von Studien des FNR_{*E. coli*} mit einem AS-Austausch des Leucin 28 gegen ein Histidin (Bates *et al.*, 2000). Dies erhöhte die Stabilität des Fe-S-Clusters unter aeroben Bedingungen und lag, begründet in einer langsameren Umformung des [4Fe-4S]-Clusters zu einem [2Fe-2S]-Clusters. Interessanterweise

zeigten Studien mit Ferredoxinen, dass die Stabilität des [4Fe-4S]-Cluster erhöht ist, wenn die Cluster-Liganden bzw. die Cysteinreste von hydrophoben Aminosäuren benachbart sind (Mulholland *et al.*, 1999). Das Cystein an Position 39 in FLP, welches einen veränderten Abstand zu den anderen Cysteinen der Sensordomäne aufweist, wird im Vergleich zu FNR_{E. coli} überraschenderweise von nur hydrophoben AS benachbart. Es befinden sich Alanine an Position 37, 40 und 41 sowie ein Isoleucin an Position 38. Dies ist ein Indiz für eine höhere Stabilität von FLP_{Xcv} bzw. dessen [4Fe-4S]-Clusters gegenüber Sauerstoff im Gegensatz zu FNR_{E. coli}.

Anhand der aufgeführten Ergebnisse lässt sich ein komplexes Zusammenspiel der Aconitasen und des FLP-Proteins in *Xcv* bei der Regulation der Gene der Cytochrome-*d*-Ubiquinol-Oxidase und der Cytochrome-*aa*₃-Ubiquinoloxidase vermuten. Vor allem AcnA2 scheint neben AcnB eine sensorische und überraschend große und weitläufige regulatorische Rolle einzunehmen und eventuell eine unterstützende Funktion auf die Aktivierung der Expression von *cydABX* auszuüben. Es ist denkbar, dass gerade im Apoplasten von Paprikapflanzen eine Rolle dieser Proteine von *Xcv* vorliegt und aufgrund des Fe-S-Clusters, sensorische Signale wie erhöhte Konzentrationen von Sauerstoff und ROS Induktoren für die Regulationen der Gene der Oxidasen sein können. Es ist denkbar, dass FLP und AcnA2 für eine effiziente Regulation der terminalen Oxidasen je nach verfügbarem Sauerstoff in Frage kommen bzw. eine Repression der Expression von *cyd* bei hoher O₂-Konzentration stattfindet. AcnA2 ist hierbei wahrscheinlich für die Feinregulation der Cytochrom-*d*-Oxidase-Synthese verantwortlich. Jedoch kann auch die Verfügbarkeit von Substraten Auswirkungen auf die Menge der terminalen Oxidasen haben. Es existieren Hinweise, dass die Menge des Cytochrom-*d*-Komplexes in der Zellmembran von *E. coli* von der verfügbaren Kohlenstoffquelle abhängig ist (Georgiou *et al.*, 1987). Daher besteht die Möglichkeit, dass mehrere Faktoren einen Einfluss auf die Regulation und Menge der Oxidasen, auch in *Xcv*, besitzen.

Die Ergebnisse und Vermutungen dieser Arbeit werden zum Verständnis des Zusammenspiels von FLP und den Aconitasen in *Xcv* beitragen und Anstöße für interessante Experimente zum Erlangen neuer Kenntnisse über die Bedingungen der Regulation der terminalen Oxidasen in *Xcv* liefern.

4.3 Die Rolle des möglichen Toxin-Antitoxin-Systems RoaX-RoaY in *Xcv*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *acnB* von *Xcv* zusammen mit den stromaufwärtsliegenden Genen *roaX* und *roaY* kotranskribiert wird und diese einem gemeinsamen Operon angehören (3.2, Abb. 14). Die Anordnung der Gene *acnA*, *roaX*, *roaY* und *acnB* in einem Lokus in *Xcv* lässt eine gemeinsame bzw. gegenseitig beeinflussende Rolle der Genprodukte vermuten. Ein Vergleich der Organisation der Gene in einigen Vertretern der Familie *Xanthomonadaceae* sowie in *E. coli* zeigte, dass diese Anordnung in einigen Mitgliedern der Familie

Xanthomonadaceae konserviert ist (3.1, Abb. 13). Es befindet sich in *Xcc*, *Xoo*, *X. vasicola*, *X. albilineans*, *X. gardneri* und *S. malthophilia* ebenfalls ein Gen direkt stromaufwärts eines *acnB*-ähnlichen Gens in gleicher Orientierung dessen Produkt Ähnlichkeit zu RoaY von *Xcv* aufweist. Ebenfalls befindet sich ein *acnA* stromaufwärts und in divergenter Transkriptionsrichtung zu einem *acnB* Gen. Auch ist in den meisten Fällen ein *roaX* Gen stromaufwärts eines *roaY* Gens lokalisiert, außer im Fall von *X. fastidiosa* und *X. fuscans*. Bei *E. coli* und anderen Bakterien sind die Gene für Aconitasen nicht in unmittelbarer Nähe in Anordnung eines Operons zu finden und es existieren auch keine stromaufwärts- oder -abwärts liegende Gene, deren Produkte Ähnlichkeiten zu RoaX und RoaY aufweisen. Diese konservierte Anordnung unter einigen Vertretern der Familie *Xanthomonadaceae* deutet darauf hin, dass RoaX und RoaY die Aktivität oder Synthese von AcnB beeinflussen könnten. Die Funktion von RoaX und RoaY bei der Regulation der Synthese von AcnB konnte, durch die Untersuchung einer *Xcv roaX-roaY* Deletionsmutante, verifiziert werden. Durch die Tatsache, dass das Fehlen der *roaXY*-Gene zu einer erhöhten Expression des *acnB*-Gens in *Xcv* führt (3.10, Abb. 22), belegte die Rolle von RoaX-RoaY als Regulatoren der Aconitase B.

Das putative Protein RoaX zeigt neben Ähnlichkeiten zu AbrB-Ähnlichen Proteinen, welche für die Genregulation beim Übergang einer exponentiellen in eine stationäre Wachstumsphase von Bedeutung sind (Strauch and Hoch, 1993), auch Ähnlichkeiten zu sogenannten Antitoxin-ähnlichen Proteinen der Toxin-Antitoxin-Systeme (TA-Systeme) (Unterholzner *et al.*, 2013). Es handelt sich hierbei um ca. 9-12 kDa große Proteine, welche autoregulatorisch, durch Bindung an Promotorstrukturen aktiv sind. Im Fall von *Neisseria gonorrhoeae* und dem Antitoxin FitA konnte gezeigt werden, dass die Komplexbildung mit einem Toxinprotein (FitB) essentiell für eine erfolgreiche Bindung an die DNA ist (Mattison *et al.*, 2006). Antitoxine sind generell sehr instabile Proteine und unterliegen einem schnellen Abbau durch Proteasen. Aufgrund der hohen Identität von RoaX aus *Xcv* zu FitA aus *N. gonorrhoeae* und Ähnlichkeiten zu anderen Antitoxinen, wie z.B. MazE aus *E. coli* und VapB aus *Shigella flexneri* (Wesolowska, 2012) wird angenommen, dass RoaX und RoaY ebenfalls Komponenten eines TA-Systems in *Xcv* darstellen könnten. Das Genprodukt von *roaY* zeigt Ähnlichkeiten zu Proteinen mit PIN-Domänen (N-terminale Untereinheit von PilT-Protein-Domänen). Hierbei handelt es sich auch oft um aktive, ca. 130 AS umfassende Toxine, welche aufgrund ihrer teilweisen Relation zur Pathogenität von Mikroorganismen oft auch als *virulence associated protein* (Vap) bezeichnet werden (Pandey and Gerdes, 2005). Interessanterweise konnte das Toxin in vielen Fällen als Endoribonuklease identifiziert werden, was für VapC aus *S. flexneri* gezeigt werden konnte (Mattison *et al.*, 2006; Winther and Gerdes, 2011). Darüber hinaus zeigt RoaY von *Xcv* eine Identität von 100% auf der Aminosäureebene zu dem Toxin FitB aus *S. flexneri* (Mattison *et al.*, 2006). Unter Betracht dieser Tatsachen ist es wahrscheinlich, dass es bei RoaY auch um eine Endoribonuklease handelt. In diesem Fall wäre eine endoribonukleolytische Funktion von RoaY im Zusammenhang mit

einer verbesserten Translation von *acnB*-mRNA durch Spaltung von eventuellen Sekundärstrukturen denkbar.

Weitere Bestätigung einer erhöhten Synthese des AcnB Proteins konnte durch die Wachstumsanalyse in MA-Citrat-Medium einer *Xcv roaX-roaY*-Mutante sowie erstellten Einzelmutanten durch Einbringen von plasmidkodierten *roaX* bzw *roaY* in die Mutante (*Xcv 85-10ΔroaX-roaY/pL6roaX*, *Xcv 85-10ΔroaX-roaY/pL6roaY* (Wesolowska, 2012) erlangt werden (3.11, Abb. 23). Hierbei zeichnete sich die *Xcv roaX-roaY* Mutante, sowie der Stamm *Xcv 85-10ΔroaX-roaY/pL6roaY* durch ein verbessertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp 85-10 und dem Stamm *Xcv 85-10ΔroaX-roaY/pL6roaX* aus. Quantitative Vergleiche der Expression von *acnB* detektierten eine 3-fach erhöhte Transkription von *acnB* im Stamm *Xcv 85-10ΔroaX-roaY/pL6roaY* im Vergleich zu einer *roaX-roaY* Deletionsmutante, welche bereits eine 3-fach erhöhte Expression im Vergleich zum Wildtyp aufwies (Wesolowska, 2012). Durch die erhöhte Synthese von AcnB im Stamm *Xcv 85-10ΔroaX-roaY/pL6roaY* zeichnet sich dieser auch durch ein verbessertes Wachstum mit Citrat als C-Quelle aus, während eine Deletion von *acnB* zu reduzierten Wachstum von *Xcv* führt (3.11, Abb. 23). Da *roaY* in diesem Fall zwar gering exprimiert, aber in höherer Kopienzahl vorliegt als chromosomal exprimiert, führt eine erhöhte Menge von RoaY zu einer starken Induktion der Synthese von AcnB. Dies verdeutlicht ebenfalls die Rolle von AcnB als Hauptenzym des Citratstoffwechsels in *Xcv*.

Im Gegensatz dazu konnte im *Xcv*-Stamm *85-10ΔroaX-roaY/pL6roaX* keine Transkription von *acnB* und auch keine Synthese eines AcnB Proteins nachgewiesen werden. Somit scheint eine Deletion von *roaY* und eine höhere Menge des putativen RoaX-Proteins die Expression von *acnB* stark zu reprimieren, während eine Deletion von *roaX* und eine höhere Menge von RoaY die Expression stark induziert. Offensichtlich liegt hier ein antagonistisches Zusammenspiel der beiden Proteine vor, wie es für bestimmte TA-Systeme bekannt ist (Bukowski *et al.*, 2011).

Eine Repressoraktivität eines Antitoxins, wie es für RoaX denkbar wäre, konnte u.a. in *E. coli* für MqsA gezeigt werden (Wang and Wood, 2011). Hierbei hat die Bindung von MqsA an die Promotorstruktur von *rpoS* eine reprimierte Genexpression zur Folge. RpoS wird als ein wichtiger Sigmafaktor der Stressantwort postuliert. Da Toxine einem schnellen Abbau durch Proteasen unterliegen, führt die Anwesenheit solcher Proteasen zur Aufhebung der Repression von *rpoS* durch MqsA (Kim *et al.*, 2010).

Einige TA-Systeme werden auch in Zusammenhang mit der Bildung eines Biofilms gebracht. Hierbei stellte MqsR/MqsA aus *E. coli* das erste TA-System mit Einfluss in eine derartige Funktion dar (Ren *et al.*, 2004). Dabei zeigten Stämme, denen das TA-System fehlte eine reduzierte Biofilmbildung. Auch RoaX-RoaY von *Xcv* könnte als TA-System in die Biofilmbildung involviert sein. Eine Deletion von *roaX-roaY* hatte eine reduzierte Expression von *gumF* bei Transkriptomvergleichen zur Folge, was eine Acetyltransferase der Xanthan Synthese kodiert (3.12).

Ein anderer Vergleich der Transkriptome von *Xcv* 85-10 Δ *roaX-roaY* mit dem Wildtyp zeigte zusätzlich eine reduzierte Transkription von *gumJ* (Daten nicht gezeigt), welches ebenfalls zum *gum* Gencluster von *Xcv* gehört und dessen Produkt eine putative Oligosaccharidyl-Lipid Flippase der Xanthan Synthese darstellt. Das *gum* Gencluster, welches aus 12 Genen (*gumB-gumM*) besteht, ist wichtig für die Xanthan Synthese und hochkonserviert unter *Xanthomonas* spp (Katzen *et al.*, 1998; Vojnov *et al.*, 1998).

Durch viele Studien von TA-Systemen unterschiedlicher Mikroorganismen wurden eine Komplexbildungen zwischen dem Toxin und dem Antitoxin nachgewiesen, wodurch die Bindung des Antitoxins an die DNA verbessert wird, wie im Fall von FitAB aus *N. gonorrhoeae* (Mattison *et al.*, 2006). FitB ist das Toxin mit Endoribonuklease-Aktivität dieses Systems. Die Aktivität von FitB wird durch die Bindung des Antitoxins FitA aufgehoben. Hier liegt, wie auch bei anderen TA-Systemen eine Autoregulation durch Bindung von FitAB an den eigenen Promotor vor. Da RoaY eine 100%ige Identität zu FitB aufweist, kann die Funktion von RoaY als ein Toxin mit PIN-Domäne vermutet werden. Ebenso könnte eine Komplexbildung von RoaX und RoaY stattfinden und eine Funktion eines TA-Systems tatsächlich vorliegen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass RoaX-RoaY vermutlich am Promotor des *roaX-roaY-acnB* Operons binden und RoaX durch die Sensierung eines spezifischen Signals nicht mehr zu einer Bindung von RoaY fähig ist (Wesolowska, 2012). Bei diesem Signal könnte es sich um Citrat, einen Metabolit, der von Citrat abstammt oder Stressbedingungen während der Pathogen-Wirt-Interaktion handeln. In *B. subtilis* schneidet das Toxin MazF, durch seine Endoribonuklease-Aktivität, aufgrund eines Stresssignals spezifische mRNAs, während unter normalen Bedingungen das Toxin inaktiv, durch Bindung des Antitoxins MazE, vorliegt (Simanshu *et al.*, 2013). Neben einer erhöhten Expression von *acnB* konnte in einer *Xcv roaX-roaY* Mutante durch Transkriptomvergleiche mit dem Wildtyp 85-10 auch eine erhöhte Expression von *acnA* beobachtet werden (Tab. 9). Somit hat RoaX-RoaY ebenfalls einen Einfluss auf die Expression von *acnA*. Dies liegt vermutlich in der gemeinsamen intergenen Region von *acnA* und *roaX-roaY-acnB* begründet, wo Regulationssequenzen der Transkription von *acnA* und der Transkription von *roaX-roaY-acnB* eng beieinander liegen.

Es besteht kein Zweifel, dass in *Xcv* ein Zusammenspiel zwischen den Aconitase-Proteinen und RoaX-RoaY besteht. *Microarray*-Analysen, wie auch quantitative Transkriptionsvergleiche einer *Xcv acnA2* Deletionsmutante und dem Wildtyp mittels qRT-PCR, zeigten eine erhöhte Expression von *roaY* durch die Deletion von *acnA2*. Somit scheint *AcnA2* eine reprimierende Wirkung auf die Expression von *roaY* zu haben, während RoaY anscheinend ein Aktivator der Expression von *acnB* und eventuell auch *acnA* darstellt. Somit könnten die gezeigten, erhöhten Synthesen von *AcnB* und *AcnA* in einer *Xcv acnA2* Deletionsmutante auch durch die erhöhte Anwesenheit von RoaY zurückzuführen sein (3.20, Abb. 30; 3.21, Abb. 31). In diesem Zusammenhang wäre eine endoribonukleolytische Funktion von RoaY interessant und vorstellbar. Somit wäre zu untersuchen, an welcher Stelle die

endoribonukleolytische Aktivität von RoaY in der Regulierung von *acnA* und *acnB* eingreift. Das Toxin MazF aus *E. coli* zeigte, ebenso wie RelE, eine Spaltung von mRNA in der ribosomalen A-Tasche, die zu einer Inhibierung der Translation führte (Christensen *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Jedoch wäre es auch vorstellbar, dass eine spezifische Restriktion von mRNA, anstatt zu einer Inhibierung, auch zu einer verbesserten Translation führen könnte. Es wäre auch denkbar, dass RoaY als Toxin und Endoribonuklease eine translationsfördernde Funktion besitzt. So könnte RoaY z. B. in seiner putativen Funktion als Endoribonuklease durch Spalten von Sekundärstrukturen der mRNA die Translationseffizienz von *acnB* Transkripten erhöhen. Obwohl die Gene *roaX*, *roaY* und *acnB* ein Operon bilden, befindet sich zwischen *roaY* und *acnB* ein intergener Bereich von ca. 50 bp, dessen Rolle unklar ist. Jedoch könnte dieser Bereich wichtige Bindestellen bzw. Sequenzsignale enthalten. Durch Deletion dieses intergenen Bereichs könnten wichtige regulatorische Sequenzen identifiziert werden.

Eine Analyse der Expression von *acnA* und *acnB* in einer *Xcv roaY*- und in einer *acnA2-roaY*-Mutante wird mehr Aussagen über diesen Sachverhalt zulassen. Ebenso sollten die Transkriptmengen von *roaX* und *roaY* in dem *Xcv*-Wildtypstamm 85-10 analysiert werden. Des Weiteren würde die Analyse von Reporter-Fusionkonstrukten des *roaX-roaY-acnB*-Operons Aussagen über eine eventuelle Reprimierung durch RoaX und eine Aktivierung durch RoaY zulassen.

4.4 Hypothetisches Modell der komplexen Interaktion der Aconitasen, FLP und des TA-Systems in *Xcv*

Aufgrund der diskutierten Zusammenhänge zwischen den Aconitasen aus *Xcv*, dem FLP-Protein und eines TA-Systems im Citratstoffwechsel und Komplexen der Atmungskette unter Berücksichtigung diverser Faktoren im Apoplasten der Pflanzenblätter, die während einer Pathogen-Pflanzen-Interaktion vorherrschend sein könnten, lässt sich folgendes Modell erstellen, welches in Abb. 39 zu finden ist.

Es ist bekannt, dass Mikroorganismen und vor allem phytopathogene Bakterien innerhalb ihres Wirts den unterschiedlichsten O₂-Konzentrationen ausgesetzt sind und über effiziente Mechanismen zur adäquaten Anpassung verfügen müssen. Es ist vorstellbar, dass vor allem durch die photosynthetische Aktivität der Wirtspflanze in einer Lichtreaktion der Photosynthese eine höhere O₂-Konzentration (O₂ ↑) durch das PSII im Vergleich zur Dunkelreaktion vorliegt (O₂ ↓). Weiterhin wird davon ausgegangen, dass während der Kolonisierung des Apoplasten der Wirtspflanze durch *Xcv* und durch den exponentiellen Anstiegs der Zelldichte es vermutlich zusätzlich zu einer Reduktion des verfügbaren Sauerstoffs kommt.

Während O₂ über Diffusion in die Zelle gelangt, verfügt *Xcv* über drei terminale Oxidasen zur Reduktion des O₂ zu H₂O. Ist genügend O₂ vorhanden, werden die Gene der Cytochrom-*o*-Ubiquinol-Oxidase und der Cytochrom-*aa*₃-Oxidase, durch einen noch unbekannten

Ist *Xcv* jedoch mit geringen O_2 -Konzentrationen konfrontiert, könnte eine posttranskriptionelle Regulation durch Apo-AcnA2 wegfallen und die Synthese von PetA ist reduziert. Somit ist die Übertragung von Elektronen von der Cytochrom-*c*-Reduktase auf Cytochrom *c* und anschließend auf die Cytochrom-*aa₃*-Oxidase unterbunden und die Oxidase liegt inaktiv vor. Hierbei ist allerdings nicht auszuschließen, dass eine regulatorische Rolle der Aconitasen auch als Holo-Enzyme vorliegen könnte.

Desweiteren kommt es vermutlich zu einer indirekten Aktivierung der Gene der Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase durch AcnA2, als unterstützende Wirkung für den Hauptaktivator FLP (+). Die Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase zeichnet sich in anderen Bakterien durch eine hohe Affinität zu Sauerstoff aus. Hierbei ist nicht klar, ob eine Proteinwechselwirkung zwischen FLP und Holo-AcnA2 bei der Aktivierung von *cydA* stattfindet oder ob Holo-AcnA2 die posttranskriptionelle Rolle des Apoenzyms unterbindet. Im Fall der posttranskriptionellen Regulation ist eine Blockierung der Translation der *cydA*-mRNA durch Apo-AcnA2 bei hohen O_2 -Konzentrationen vorstellbar, welche bei geringer O_2 -Konzentration ausbleiben würde. Somit würde eine aktivierte Expression von *cydA* unter reduzierten O_2 -Bedingungen vorliegen. Die globale Aktivierung der *cydABX* Expression übernimmt FLP bei reduzierten O_2 -Bedingungen und wird allerdings bei hohen Sauerstoffkonzentrationen in seiner Funktion gehemmt. AcnA2 ist wahrscheinlich für die Feinregulation der Cytochrom-*d*-Oxidase-Synthese verantwortlich.

Weiterhin kommt es durch AcnB ebenfalls zur Aktivierung der Cytochrom-*d*-Ubiquinol-Oxidase. AcnB hat eine induzierende Wirkung auf die Expression von *cydABX*. Hierbei wird vermutet, dass die Aktivierung von *cydABX* durch AcnB indirekt über oder *via* AcnA2 vorliegen könnte, da AcnA2 die Synthese von AcnB reguliert.

Obwohl *Xcv* vermutlich durch die Bildung von Xanthan und einen Biofilm aus extrazellulären Polysacchariden vor generierten ROS während der Pathogen-Wirt-Interaktion im Apoplasten geschützt ist, können ROS auch innerhalb der Zelle durch O_2 und freies Fe^{2+} entstehen. Sowohl AcnA, AcnB als auch AcnA2 sind an der Sensierung von ROS beteiligt, wobei AcnA2 der Hauptsensor von ROS zu sein scheint.

Neben ROS und Änderungen der O_2 -Konzentration werden möglicherweise auch reduzierte Mengen an Fe^{2+} von AcnA2 sensiert, worauf dies vermutlich als Apo-Protein den Eisenaufnahmeregulator Fur aktiviert. Dieser könnte wiederum auch in *Xcv* für die Regulation von bisher unbekannten Eisenaufnahmesystemen verantwortlich sein. Neben Fur wird auch Baf (Bakterioferritin-assoziiertes Ferridoxin) von AcnA2 aktiviert, welches verfügbares Eisen von Bakterioferritin rekrutieren könnte. Durch die Regulation von Fur und Baf durch AcnA2 kommt es nicht nur zur Erhöhung der Aufnahme und Verfügbarkeit von Eisen bei Mangelerscheinungen, sondern wird auch das intrazelluläre Level an freien Eisen gering gehalten um die Bildung von toxischen Radikalen zu vermeiden.

Weiterhin übernimmt AcnA2 eine Rolle bei der Anpassung an verfügbare metabolische Substrate. Die Substratnutzung von *Xcv* im Apoplasten von Paprikablättern ist unbekannt, jedoch existieren Indizien für die Nutzung von Glukose, Saccharose, AS und Citrat. Dabei stellt vor allem Citrat eine C-Quelle des Apoplasten der Wirtspflanze dar, während Glukose und Saccharose eher in geringen Konzentrationen vorliegen, vorzugsweise zu Beginn eines Pathogenbefalls. AcnA2 scheint hierbei eine Art Feinregulation der Genexpression für Gene des Citrat- und Zuckermetabolismus auszuüben. In der Verwertung von Citrat konnte AcnB als das metabolische Hauptenzym identifiziert werden, welches Citrat zu *cis*-Aconitat katalysiert. Liegt im Apoplasten eine hohe Menge an Citrat vor, wird die Menge an AcnB durch das TA-System RoaXY erhöht. AcnB verursacht daraufhin eine Erniedrigung der Menge des Citrat:H⁺-Symporters Cit. Der Cit-Transporter fungiert in *Xcv* vermutlich nur als zweiter Citrattransporter. Auch könnte Cit hauptsächlich zur Aufnahme von Eisen in Form von Eisen-Citrat-Komplexen dienen. So könnte eine Limitierung von Eisen einen Zerfall des Fe-S-Clusters von AcnA2 zur Folge haben und eine Inhibierung der AcnB-Synthese vorliegen. Daraufhin kann die Transkription von *cit* stattfinden und Eisen-Citrat-Komplexe *via* Cit aufgenommen werden. Liegt genügend intrazelluläres Eisen vor, ist AcnA2 als Holoenzym mit [4Fe-4S]-Cluster vorzufinden und die AcnB-Synthese wird angehoben. Durch eine erhöhte Menge an AcnB wird die Expression von *cit* wieder herabreguliert.

CitH stellt in *Xcv* vermutlich den Haupttransporter für Citrat dar und ist notwendig für die Aufnahme von Citrat im Apoplasten von Tomatenpflanzen (Tamir-Ariel *et al.*, 2011).

Es wurde gezeigt, dass in einer *Xcv acnA2*-Mutante die Synthese der Citratsynthase (CS) hochreguliert wird, welche die Kondensation von Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat katalysiert. Des Weiteren werden die Gene der Saccharosehydrolase (*Suh*), der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (*G6PD*) sowie AcnB und AcnA hochreguliert. Im Wildtyp *Xcv* reguliert entweder Apo- oder Holo-AcnA2 direkt oder indirekt die Synthese dieser Enzyme. Da die Synthese von AcnB auch durch RoaXY in der Anwesenheit von Citrat induziert wird, deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass AcnA2 die *suh*, *zwf2* und XCV1157 Gene auch in Abhängigkeit von Citrat reguliert. Liegt Citrat vor, wird die Expression sowie die Synthese von AcnB und der Citratsynthase durch AcnA2 erhöht. Sind Saccharose und eventuell Glukose die verfügbaren Substrate im Apoplasten, welche auch zu hohen intrazellulärem Citrat führen, wird ebenso die Expression der *suh* und *zwf2* und deren Synthese hochreguliert.

AcnA scheint eine Rolle in *Xcv* bei reduzierten O₂-Bedingungen zu spielen und Citrat als Substrat zunutzen.

5 Literaturverzeichnis

Agrios, G. N. (1997). "Plant Pathology (4th Edition)." *San Diego, Academic Press.*

Agrios, G. N. (2005). "Plant Pathology (5th Edition)." *New York, USA, Academic Press.*

Akaike, T., Sato, K., Ijiri, S., Miyamoto, Y., Kohno, M., Ando, M. and Maeda, H. (1992). "Bactericidal activity of alkyl peroxy radicals generated by heme-iron-catalyzed decomposition of organic peroxides." *Arch Biochem Biophys* **294**(1): 55-63.

Alavi, P., Muller, H., Cardinale, M., Zachow, C., Sanchez, M. B., Martinez, J. L. and Berg, G. (2013). "The DSF quorum sensing system controls the positive influence of *Stenotrophomonas maltophilia* on plants." *PLoS One* **8**(7): e67103.

Alen, C. and Sonenshein, A. L. (1999). "*Bacillus subtilis* aconitase is an RNA-binding protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(18): 10412-10417.

Alfano, J. R. and Collmer, A. (2004). "Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense." *Annu Rev Phytopathol* **42**: 385-414.

Allen, C., Bent, A. and Charkowski, A. (2009). "Underexplored niches in research on plant pathogenic bacteria." *Plant Physiol* **150**(4): 1631-1637.

Andrade, M. A., Petosa, C., O'donoghue, S. I., Muller, C. W. and Bork, P. (2001). "Comparison of ARM and HEAT protein repeats." *J Mol Biol* **309**(1): 1-18.

Andrews, S. C., Robinson, A. K. and Rodriguez-Quinones, F. (2003). "Bacterial iron homeostasis." *FEMS Microbiol Rev* **27**(2-3): 215-237.

Anraku, Y. (1988). "Bacterial electron transport chains." *Annu Rev Biochem* **57**: 101-132.

Antranikian, G. G., F. (1987). "Citrate metabolism in anaerobic bacteria." *FEMS Microbiol Rev* **46**: 175-198.

Atkinson, M. M. and Baker, C. J. (1987a). "Alteration of plasmalemma sucrose transport in *Phaseolus vulgaris* by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and its association with K⁺/H⁺ exchange." *Phytopathology* **77**: 1573-1578.

Atkinson, M. M. and Baker, C. J. (1987b). "Association of host plasma membrane K⁺/H⁺ exchange with multiplication of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in *Phaseolus vulgaris*." *Phytopathology* **77**: 1273-1279.

Atlung, T. and Brondsted, L. (1994). "Role of the transcriptional activator AppY in regulation of the *cyx appA* operon of *Escherichia coli* by anaerobiosis, phosphate starvation, and growth phase." *J Bacteriol* **176**(17): 5414-5422.

Ausubel, F. A. B., R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K. (1995). "Current Protocols in Molecular Biology I." *Greene Publishing & Wiley Interscience, New York.*

Backert, S. and Meyer, T. F. (2006). "Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis." *Curr Opin Microbiol* **9**(2): 207-217.

- Bagg, A. and Neilands, J. B.** (1987). "Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*." *Biochemistry* **26**(17): 5471-5477.
- Bailey, S., Melis, A., Mackey, K. R., Cardol, P., Finazzi, G., Van Dijken, G., Berg, G. M., Arrigo, K., Shrager, J. and Grossman, A.** (2008). "Alternative photosynthetic electron flow to oxygen in marine *Synechococcus*." *Biochim Biophys Acta* **1777**(3): 269-276.
- Baothman, O. A., Rolfe, M. D. and Green, J.** (2013). "Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium aconitase A." *Microbiology* **159**(Pt 6): 1209-1216.
- Barber, C. E., Tang, J. L., Feng, J. X., Pan, M. Q., Wilson, T. J., Slater, H., Dow, J. M., Williams, P. and Daniels, M. J.** (1997). "A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule." *Mol Microbiol* **24**(3): 555-566.
- Barros, L., Duenas, M., Pinela, J., Carvalho, A. M., Buelga, C. S. and Ferreira, I. C.** (2012). "Characterization and quantification of phenolic compounds in four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmers' varieties in northeastern Portugal homegardens." *Plant Foods Hum Nutr* **67**(3): 229-234.
- Bates, D. M., Popescu, C. V., Khoroshilova, N., Vogt, K., Beinert, H., Munck, E. and Kiley, P. J.** (2000). "Substitution of leucine 28 with histidine in the *Escherichia coli* transcription factor FNR results in increased stability of the [4Fe-4S]⁽²⁺⁾ cluster to oxygen." *J Biol Chem* **275**(9): 6234-6240.
- Baumgart, M., Mustafi, N., Krug, A. and Bott, M.** (2011). "Deletion of the aconitase gene in *Corynebacterium glutamicum* causes strong selection pressure for secondary mutations inactivating citrate synthase." *J Bacteriol* **193**(24): 6864-6873.
- Becker, A., Katzen, F., Puhler, A. and Ielpi, L.** (1998). "Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective." *Appl Microbiol Biotechnol* **50**(2): 145-152.
- Becker, D. F., Leartsakulpanich, U., Surerus, K. K., Ferry, J. G. and Ragsdale, S. W.** (1998). "Electrochemical and spectroscopic properties of the iron-sulfur flavoprotein from *Methanosarcina thermophila*." *J Biol Chem* **273**(41): 26462-26469.
- Beinert, H. and Kennedy, M. C.** (1993). "Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor." *Faseb J* **7**(15): 1442-1449.
- Beinert, H., Kennedy, M. C. and Stout, C. D.** (1996). "Aconitase as Iron-Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein." *Chem Rev* **96**(7): 2335-2374.
- Bekker, M. D. V., S.; Teixeira De Mattos, M. J.** (2009). "Respiration of *Escherichia coli* Can Be Fully Uncoupled via the Nonelectrogenic Terminal Cytochrome *bd-II* Oxidase." *J Bacteriol* **191**(17): 5510-5517.
- Bertram, M. J. and Gassen, H.G.** (1991) "Genetische Methoden", *Gustav Fischer Verlag; Jena, Stuttgart, New York*.
- Berlyn, M. K. B., Low, K. B. and Rudd, K. E.** (1996) "*Escherichia coli* and *Salmonella*: Genome, Genetic and Evolution; Linkage Map of *Escherichia coli* K12, Edition 9." *American Society for Microbiology, 2nd ed*: 1715-1902.

- Bhattacharyya, A., Stilwagen, S., Ivanova, N., D'souza, M., Bernal, A., Lykidis, A., Kapatral, V., Anderson, I., Larsen, N., Los, T., Reznik, G., Selkov, E., Jr., Walunas, T. L., Feil, H., Feil, W. S., Purcell, A., Lassez, J. L., Hawkins, T. L., Haselkorn, R., Overbeek, R., Predki, P. F. and Kyrpides, N. C.** (2002). "Whole-genome comparative analysis of three phytopathogenic *Xylella fastidiosa* strains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19): 12403-12408.
- Blake, T., Barnard, A., Busby, S. J. and Green, J.** (2002). "Transcription activation by FNR: evidence for a functional activating region 2." *J Bacteriol* **184**(21): 5855-5861.
- Blank, L., Green, J. and Guest, J. R.** (2002). "AcnC of *Escherichia coli* is a 2-methylcitrate dehydratase (PrpD) that can use citrate and isocitrate as substrates." *Microbiology* **148**(Pt 1): 133-146.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. and Bonas, U.** (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors." *Science* **326**(5959): 1509-1512.
- Bonas, U., Van Den Ackerveken, G., Buttner, D., Hahn, K., Marois, E., Nennstiel, D., Noel, L., Rossier, O. and Szurek, B.** (2000). "How the bacterial plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* conquers the host." *Mol Plant Pathol* **1**(1): 73-76.
- Bonas, U., Stall, R. E., Staskawicz, B. J.** (1989) "Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." *Mol Gen Genet* **218**(1): 127-136
- Bonas, U., Schulte R., Fenselau, S., Minsavage, G. V., Staskawicz, B. J. und Stall, R. E.** (1991). "Isolation of a gen-cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato." *Mol Plant Microbe Interact* **4**: 81-88.
- Bortolotti, M.** (2013). "Red pepper: from the kitchen to the pharmacy." *J Gastrointestin Liver Dis* **22**(3): 253-256.
- Boshoff, H. I. and Barry, C. E., 3rd** (2005). "Tuberculosis - metabolism and respiration in the absence of growth." *Nat Rev Microbiol* **3**(1): 70-80.
- Bott, M.** (1997). "Anaerobic citrate metabolism and its regulation in *enterobacteria*." *Arch Microbiol* **167**(2/3): 78-88.
- Bradbury, A. J., Gruer, M. J., Rudd, K. E. and Guest, J. R.** (1996). "The second aconitase (AcnB) of *Escherichia coli*." *Microbiology* **142** (Pt 2): 389-400.
- Briat, J. F., Curie, C. and Gaymard, F.** (2007). "Iron utilization and metabolism in plants." *Curr Opin Plant Biol* **10**(3): 276-282.
- Brown, D. G. and Allen, C.** (2004). "*Ralstonia solanacearum* genes induced during growth in tomato: an inside view of bacterial wilt." *Mol Microbiol* **53**(6): 1641-1660.
- Bukowski, M., Rojowska, A. and Wladyka, B.** (2011). "Prokaryotic toxin-antitoxin systems--the role in bacterial physiology and application in molecular biology." *Acta Biochim Pol* **58**(1): 1-9.
- Büttner, D. and Bonas, U.** (2009). "Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors." *FEMS Microbiol Rev* **34**(2): 107-133.

- Büttner, D. and Bonas, U.** (2002). "Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell." *Embo J* **21**(20): 5313-5322.
- Büttner, D., Gurlebeck, D., Noel, L. D. and Bonas, U.** (2004). "HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion." *Mol Microbiol* **54**(3): 755-768.
- Büttner, D., Lorenz, C., Weber, E. and Bonas, U.** (2006). "Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB-dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." *Mol Microbiol* **59**(2): 513-527.
- Camilli, A. and Mekalanos, J. J.** (1995). "Use of recombinase gene fusions to identify *Vibrio cholerae* genes induced during infection." *Mol Microbiol* **18**(4): 671-683.
- Cha, J. Y., Lee, J. S., Oh, J. I., Choi, J. W. and Baik, H. S.** (2008). "Functional analysis of the role of Fur in the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 11528: Fur controls expression of genes involved in quorum-sensing." *Biochem Biophys Res Commun* **366**(2): 281-287.
- Chatterjee, S., Almeida, R. P. and Lindow, S.** (2008). "Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*." *Annu Rev Phytopathol* **46**: 243-271.
- Chatterjee, S. and Sonti, R. V.** (2002). "*rpfF* mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are deficient for virulence and growth under low iron conditions." *Mol Plant Microbe Interact* **15**(5): 463-471.
- Chen, L. Q., Hou, B. H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X. Q., Guo, W. J., Kim, J. G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F. F., Somerville, S. C., Mudgett, M. B. and Frommer, W. B.** (2010). "Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens." *Nature* **468**(7323): 527-532.
- Christensen, S. K., Pedersen, K., Hansen, F. G. and Gerdes, K.** (2003). "Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA." *J Mol Biol* **332**(4): 809-819.
- Cobine, P. A., Cruz, L. F., Navarrete, F., Duncan, D., Tygart, M. and De La Fuente, L.** (2013). "*Xylella fastidiosa* differentially accumulates mineral elements in biofilm and planktonic cells." *PLoS One* **8**(1): e54936.
- Constantinidou, C., Hobman, J. L., Griffiths, L., Patel, M. D., Penn, C. W., Cole, J. A. and Overton, T. W.** (2006). "A reassessment of the FNR regulon and transcriptomic analysis of the effects of nitrate, nitrite, NarXL, and NarQP as *Escherichia coli* K12 adapts from aerobic to anaerobic growth." *J Biol Chem* **281**(8): 4802-4815.
- Cotter, P. A., Chepuri, V., Gennis, R. B. and Gunsalus, R. P.** (1990). "Cytochrome *o* (*cyoABCDE*) and *d* (*cydAB*) oxidase gene expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH, and the *fnr* gene product." *J Bacteriol* **172**(11): 6333-6338.
- Cox, N., Ogata, H., Stolle, P., Reijerse, E., Auling, G. and Lubitz, W.** (2010). "A tyrosyl-dimanganese coupled spin system is the native metalloradical cofactor of the R2F subunit of the ribonucleotide reductase of *Corynebacterium ammoniagenes*." *J Am Chem Soc* **132**(32): 11197-11213.
- Crack, J. C., Jervis, A. J., Gaskell, A. A., White, G. F., Green, J., Thomson, A. J. and Le Brun, N. E.** (2008). "Signal perception by FNR: the role of the iron-sulfur cluster." *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 6): 1144-1148.

- Craig, J. E., Ford, M. J., Blaydon, D. C. and Sonenshein, A. L.** (1997). "A null mutation in the *Bacillus subtilis* aconitase gene causes a block in Spo0A-phosphate-dependent gene expression." *J Bacteriol* **179**(23): 7351-7359.
- Cunningham, L., Gruer, M. J. and Guest, J. R.** (1997). "Transcriptional regulation of the aconitase genes (*acnA* and *acnB*) of *Escherichia coli*." *Microbiology* **143** (Pt 12): 3795-3805.
- Cvetkovska, M. and Vanlerberghe, G. C.** (2012) "Alternative oxidase impacts the plant response to biotic stress by influencing the mitochondrial generation of reactive oxygen species." *Plant Cell Environ* **36**(3): 721-732.
- Daldal, F., Davidson, E. and Cheng, S.** (1987). "Isolation of the structural genes for the Rieske Fe-S protein, cytochrome *b* and cytochrome *c1* all components of the ubiquinol: cytochrome *c2* oxidoreductase complex of *Rhodopseudomonas capsulata*." *J Mol Biol* **195**(1): 1-12.
- Daniels, M. J., Barber, C. E., Turner, P. C., Sawczyc, M. K., Byrde, R. J. and Fielding, A. H.** (1984). "Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1." *Embo J* **3**(13): 3323-3328.
- Dassa, J., Fsihi, H., Marck, C., Dion, M., Kieffer-Bontemps, M. and Boquet, P. L.** (1991). "A new oxygen-regulated operon in *Escherichia coli* comprises the genes for a putative third cytochrome oxidase and for pH 2.5 acid phosphatase (*appA*)." *Mol Gen Genet* **229**(3): 341-352.
- De Crecy-Lagard, V., Binet, M. and Danchin, A.** (1995). "Fructose phosphotransferase system of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: characterization of the *fruB* gene." *Microbiology* **141**(Pt 9): 2253-2260.
- Dellagi, A., Rigault, M., Segond, D., Roux, C., Kraepiel, Y., Cellier, F., Briat, J. F., Gaymard, F. and Expert, D.** (2005). "Siderophore-mediated upregulation of Arabidopsis ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection." *Plant J* **43**(2): 262-272.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A. and Lamb, C.** (1998). "Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance." *Nature* **394**(6693): 585-588.
- Denny, T. P.** (1995). "Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis." *Annu Rev Phytopathol* **33**: 173-197.
- Dietz, I. J., S.; Szasnak, M.; Shima, K.; Rupp, S.** (2012). "When oxygen runs short: the microenvironment drives host-pathogen interactions." *Microbes Infect* **14**(4): 311-316.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helinski, D. R.** (1980). "Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(12): 7347-7351.
- D'mello, R., Hill, S. and Poole, R. K.** (1996). "The cytochrome *bd* quinol oxidase in *Escherichia coli* has an extremely high oxygen affinity and two oxygen-binding haems: implications for regulation of activity *in vivo* by oxygen inhibition." *Microbiology* **142**(Pt 4): 755-763.
- Dow, J. M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y. Q., Feng, J. X. and Tang, J. L.** (2003). "Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(19): 10995-11000.

- Dow, J. M., Feng, J. X., Barber, C. E., Tang, J. L. and Daniels, M. J.** (2000). "Novel genes involved in the regulation of pathogenicity factor production within the *rpf* gene cluster of *Xanthomonas campestris*." *Microbiology* **146**(Pt 4): 885-891.
- Dower, W. J., Miller, J. F. and Ragsdale, C. W.** (1988) "High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation." *Nucleic Acids Res* **16**(13): 6127-6145
- Durner, J., Wendehenne, D. and Klessig, D. F.** (1998). "Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(17): 10328-10333.
- Ebright, R. H., Kolb, A., Buc, H., Kunkel, T. A., Krakow, J. S. and Beckwith, J.** (1987). "Role of glutamic acid-181 in DNA-sequence recognition by the catabolite gene activator protein (CAP) of *Escherichia coli*: altered DNA-sequence-recognition properties of [Val181]CAP and [Leu181]CAP." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(17): 6083-6087.
- Essmann, J., Schmitz-Thom, I., Schon, H., Sonnewald, S., Weis, E. and Scharte, J.** (2008). "RNA interference-mediated repression of cell wall invertase impairs defense in source leaves of tobacco." *Plant Physiol* **147**(3): 1288-1299.
- Expert, D., Enard, C. and Masclaux, C.** (1996). "The role of iron in plant host-pathogen interactions." *Trends Microbiol* **4**(6): 232-237.
- Felle, H. H.** (2006). "Apoplastic pH during low-oxygen stress in Barley." *Ann Bot* **98**(5): 1085-1093.
- Figurski, D. H. and Helinski, D. R.** (1979). "Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(4): 1648-1652.
- Fischer, H. M.** (1994). "Genetic regulation of nitrogen fixation in *rhizobia*." *Microbiol Rev* **58**(3): 352-386.
- Fleischhacker, A. S. and Kiley, P. J.** (2011) "Iron-containing transcription factors and their roles as sensors." *Curr Opin Chem Biol* **15**(2): 335-341
- Fontenelle, C., Blanco, C., Arrieta, M., Dufour, V. and Trautwetter, A.** (2012) "Resistance to organic hydroperoxides requires *ohr* and *ohrR* genes in *Sinorhizobium meliloti*." *BMC Microbiol* **11**: 100.
- French, C. E., Bell, J. M. and Ward, F. B.** (2008). "Diversity and distribution of hemerythrin-like proteins in prokaryotes." *FEMS Microbiol Lett* **279**(2): 131-145.
- Fuangthong, M., Atichartpongkul, S., Mongkolsuk, S. and Helmann, J. D.** (2001). "OhrR is a repressor of *ohrA*, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **183**(14): 4134-4141.
- Galperin, M. Y.** (2004). "Bacterial signal transduction network in a genomic perspective." *Environ Microbiol* **6**(6): 552-567.
- Garcia-Horsman, J. A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J. and Gennis, R. B.** (1994). "The superfamily of heme-copper respiratory oxidases." *J Bacteriol* **176**(18): 5587-5600.
- Gardner, P. R. and Fridovich, I.** (1991). "Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase." *J Biol Chem* **266**(29): 19328-19333.

Garg, R. P., Vargo, C. J., Cui, X. and Kurtz, D. M., Jr. (1996). "A [2Fe-2S] protein encoded by an open reading frame upstream of the *Escherichia coli* bacterioferritin gene." *Biochemistry* **35**(20): 6297-6301.

Georgiou, C. D., Fang, H. and Gennis, R. B. (1987). "Identification of the *cydC* locus required for expression of the functional form of the cytochrome *d* terminal oxidase complex in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **169**(5): 2107-2112.

Gerlach, R. G. and Hensel, M. (2007). "Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens." *Int J Med Microbiol* **297**(6): 401-415.

Green, J., Crack, J. C., Thomson, A. J. and Lebrun, N. E. (2009) "Bacterial sensors of oxygen." *Curr Opin Microbiol* **12**(2): 145-151

Griffiths, E. (1987). "The iron uptake systems of pathogenic bacteria." In *J. J. Bullen und E. Griffiths (ed) Iron and Infection*. John Wiley and Sons, Chichester, UK: 69-137.

Grimm, C., Evers, A., Brock, M., Maerker, C., Klebe, G., Buckel, W. and Reuter, K. (2003). "Crystal structure of 2-methylisocitrate lyase (PrpB) from *Escherichia coli* and modelling of its ligand bound active centre." *J Mol Biol* **328**(3): 609-621.

Groves, M. R., Hanlon, N., Turowski, P., Hemmings, B. A. and Barford, D. (1999). "The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs." *Cell* **96**(1): 99-110.

Gruer, M. J., Artymiuk, P. J. and Guest, J. R. (1997). "The aconitase family: three structural variations on a common theme." *Trends Biochem Sci* **22**(1): 3-6.

Gruer, M. J. and Guest, J. R. (1994). "Two genetically-distinct and differentially-regulated aconitases (AcnA and AcnB) in *Escherichia coli*." *Microbiology* **140**(Pt 10): 2531-2541.

Guest, J. R., Green, J., Irvine, S., and Spiro, S. (1996). „The FNR modulon and FNR-regulated gene expression. in regulation of gene expression in *Escherichia coli*.“ *Lin, E.C. and Lynch, A. (eds). N. Y.: Chapman & Hall: 317-342.*

Gunsalus, R. P. (1992). "Control of electron flow in *Escherichia coli*: coordinated transcription of respiratory pathway genes." *J Bacteriol* **174**(22): 7069-7074.

Hägerhäll, C. (1997). "Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme." *Biochim Biophys Acta* **1320**(2): 107-141.

Halliwell, B. (1989). "Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis." *Br J Exp Pathol* **70**(6): 737-757.

Han, D., Canali, R., Garcia, J., Aguilera, R., Gallaher, T. K. and Cadenas, E. (2005). "Sites and mechanisms of aconitase inactivation by peroxynitrite: modulation by citrate and glutathione." *Biochemistry* **44**(36): 11986-11996.

Heinz, T. (2011). "Identifizierung und funktionelle Charakterisierung eines FNR-ähnlichen Proteins aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* " *Diplomarbeit, Institut für Biologie/Bereich Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*

- Henderson, B. R.** (1996). "Iron regulatory proteins 1 and 2." *Bioessays* **18**(9): 739-746.
- Hengge-Aronis, R.** (1996). "Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **21**(5): 887-893.
- Hentze, M. W. and Kuhn, L. C.** (1996). "Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16): 8175-8182.
- Hill, S., Viollet, S., Smith, A. T. and Anthony, C.** (1990). "Roles for enteric *d*-type cytochrome oxidase in N₂ fixation and microaerobiosis." *J Bacteriol* **172**(4): 2071-2078.
- Hoppe, T.** (2011). "Regulation des *cydA* Gens durch das FNR-ähnliche Protein (FLP) aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." Bachelorarbeit, Institut für Biologie/Bereich Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Hoppe, T.** (2013). "Untersuchungen zur Regulation der *cydABX* Expression durch den Regulator FLP aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." Masterarbeit, Institut für Biologie/Bereich Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität-Halle-Wittenberg.
- Horswill, A. R. and Escalante-Semerena, J. C.** (2001). "In vitro conversion of propionate to pyruvate by *Salmonella enterica* enzymes: 2-methylcitrate dehydratase (PrpD) and aconitase enzymes catalyze the conversion of 2-methylcitrate to 2-methylisocitrate." *Biochemistry* **40**(15): 4703-4713.
- Hoson, T.** (1998) "Apoplast as the site of response to environmental signals." *J Plant Res* **111**(1101): 167-177.
- Hu, Y., Fay, A. W., Lee, C. C., Yoshizawa, J. and Ribbe, M. W.** (2008). "Assembly of nitrogenase MoFe protein." *Biochemistry* **47**(13): 3973-3981.
- Hugenholtz, J.** (1993) "Citrate metabolism in lactic acid bacteria." *FEMS Microbiol Rev* **12**: 165-178.
- Huguet, E., Hahn, K., Wengelnik, K. and Bonas, U.** (1998) "*hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction." *Mol Microbiol* **29**(6): 1379-1390.
- Jia, W. and Davies, W. J.** (2007). "Modification of leaf apoplastic pH in relation to stomatal sensitivity to root-sourced abscisic acid signals." *Plant Physiol* **143**(1): 68-77.
- Jin, S. and Sonenshein, A. L.** (1994). "Transcriptional regulation of *Bacillus subtilis* citrate synthase genes." *J Bacteriol* **176**(15): 4680-4690.
- Jittawuttipoka, T., Sallabhan, R., Vattanaviboon, P., Fuangthong, M. and Mongkolsuk, S.** (2010). "Mutations of ferric uptake regulator (*fur*) impair iron homeostasis, growth, oxidative stress survival, and virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*." *Arch Microbiol* **192**(5): 331-339.
- Jones, A. M. and Wildermuth, M. C.** (2011). "The phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 has three high-affinity iron-scavenging systems functional under iron limitation conditions but dispensable for pathogenesis." *J Bacteriol* **193**(11): 2767-2775.
- Jones, H. M. and Gunsalus, R. P.** (1985). "Transcription of the *Escherichia coli* fumarate reductase genes (*frdABCD*) and their coordinate regulation by oxygen, nitrate, and fumarate." *J Bacteriol* **164**(3): 1100-1109.

- Jones, J. B., Bouzar, H., Somodi, G. C., Stall, R. E., Pernezny, K., El-Morsy, G. and Scott, J. W.** (1998). "Evidence for the Preemptive Nature of Tomato Race 3 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida." *Phytopathology* **88**(1): 33-38.
- Jones, J. D. and Dangl, J. L.** (2006). "The plant immune system." *Nature* **444**(7117): 323-329.
- Jordan, P. A., Tang, Y., Bradbury, A. J., Thomson, A. J. and Guest, J. R.** (1999). "Biochemical and spectroscopic characterization of *Escherichia coli* aconitases (AcnA and AcnB)." *Biochem J* **344**(Pt 3): 739-746.
- Kai, M., Yano, T., Tamegai, H., Fukumori, Y. and Yamanaka, T.** (1992). "*Thiobacillus ferrooxidans* cytochrome c oxidase: purification, and molecular and enzymatic features." *J Biochem* **112**(6): 816-821.
- Kang, Y., Weber, K. D., Qiu, Y., Kiley, P. J. and Blattner, F. R.** (2005). "Genome-wide expression analysis indicates that FNR of *Escherichia coli* K-12 regulates a large number of genes of unknown function." *J Bacteriol* **187**(3): 1135-1160.
- Katzen, F., Ferreira, D. U., Oddo, C. G., Ielmini, M. V., Becker, A., Puhler, A. and Ielpi, L.** (1998). "*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence." *J Bacteriol* **180**(7): 1607-1617.
- Katznelson, H.** (1955). "The metabolism of phytopathogenic bacteria. I. Comparative studies on the metabolism of representative species." *J Bacteriol* **70**(4): 469-475.
- Katznelson, H.** (1958). "Metabolism of phytopathogenic bacteria. II. Metabolism of carbohydrates by cell-free extracts." *J Bacteriol* **75**(5): 540-543.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G. and Bonas, U.** (2007). "A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator." *Science* **318**(5850): 648-651.
- Kennedy, M. C. and Beinert, H.** (1988). "The state of cluster SH and S2- of aconitase during cluster interconversions and removal. A convenient preparation of apoenzyme." *J Biol Chem* **263**(17): 8194-8198.
- Kennedy, M. C., Emptage, M. H., Dreyer, J. L. and Beinert, H.** (1983). "The role of iron in the activation-inactivation of aconitase." *J Biol Chem* **258**(18): 11098-11105.
- Kessler, D., Leibrecht, I. and Knappe, J.** (1991). "Pyruvate-formate-lyase-deactivase and acetyl-CoA reductase activities of *Escherichia coli* reside on a polymeric protein particle encoded by *adhE*." *FEBS Lett* **281**(1-2): 59-63.
- Kim, H. J., Kim, S. I., Ratnayake-Lecamwasam, M., Tachikawa, K., Sonenshein, A. L. and Strauch, M.** (2003). "Complex regulation of the *Bacillus subtilis* aconitase gene." *J Bacteriol* **185**(5): 1672-1680.
- Kim, H. S., Park, H. J., Heu, S. and Jung, J.** (2004). "Molecular and functional characterization of a unique sucrose hydrolase from *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*." *J Bacteriol* **186**(2): 411-418.
- Kim, S. J., Han, Y. H., Kim, I. H. and Kim, H. K.** (1999). "Involvement of ArcA and Fnr in expression of *Escherichia coli* thiol peroxidase gene." *IUBMB Life* **48**(2): 215-218.
- Kim, Y., Wang, X., Zhang, X. S., Grigoriu, S., Page, R., Peti, W. and Wood, T. K.** (2010). "*Escherichia coli* toxin/antitoxin pair MqsR/MqsA regulate toxin CspD." *Environ Microbiol* **12**(5): 1105-1121.

- Kirchberg, J., Buttner, D., Thiemer, B. and Sawers, R. G.** (2012). "Aconitase B is required for optimal growth of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper plants." *PLoS One* **7**(4): e34941.
- Kitphati, W., Ngok-Ngam, P., Suwanmaneerat, S., Sukchawalit, R. and Mongkolsuk, S.** (2007). "*Agrobacterium tumefaciens* has important physiological roles in iron and manganese homeostasis, the oxidative stress response, and full virulence." *Appl Environ Microbiol* **73**(15): 4760-4768.
- Klement, Z.** (1982). "Hypersensitivity." *Phytopathogenic prokaryotes*. In Mount, M. S. and Lacy G.H. (eds). *Phytopathogenic prokaryotes*, New York. Academic Press **2**: 149-177.
- Kocal, N.** (2011). "Die Rolle Zellwand-gebundener Invertasen bei der Interaktion zwischen *Solanum lycopersicum* und *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* und Untersuchungen zu dessen Nährstoffversorgung." *Naturwissenschaftlichen Fakultät; Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg*.
- Kocal, N., Sonnewald, U. and Sonnewald, S.** (2008). "Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*." *Plant Physiol* **148**(3): 1523-1536.
- Koch, K. E.** (1996). "Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 509-540.
- Körner, H., Sofia, H. J. and Zumft, W. G.** (2003). "Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs." *FEMS Microbiol Rev* **27**(5): 559-592.
- Krom, B. P., Warner, J. B., Konings, W. N. and Lolkema, J. S.** (2000). "Complementary metal ion specificity of the metal-citrate transporters CitM and CitH of *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **182**(22): 6374-6381.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Laue, H., Schenk, A., Li, H., Lambertsen, L., Neu, T. R., Molin, S. and Ullrich, M. S.** (2006). "Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*." *Microbiology* **152**(Pt 10): 2909-2918.
- Lee, B. M., Park, Y. J., Park, D. S., Kang, H. W., Kim, J. G., Song, E. S., Park, I. C., Yoon, U. H., Hahn, J. H., Koo, B. S., Lee, G. B., Kim, H., Park, H. S., Yoon, K. O., Kim, J. H., Jung, C. H., Koh, N. H., Seo, J. S. and Go, S. J.** (2005). "The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice." *Nucleic Acids Res* **33**(2): 577-586.
- Li, S. F. and Demoss, J. A.** (1988). "Location of sequences in the nar promoter of *Escherichia coli* required for regulation by Fnr and NarL." *J Biol Chem* **263**(27): 13700-13705.
- Lopez-Bucio, J., Nieto-Jacobo, M. F., Ramirez-Rodriguez, V. V. and Herrera-Estrella, L.** (2000). "Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils." *Plant Sci* **160**(1): 1-13.
- Lopez-Millan, A. F., Morales, F., Abadia, A. and Abadia, J.** (2000). "Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. Implications for iron and carbon transport." *Plant Physiol* **124**(2): 873-884.

- Lorenz, C. and Buttner, D.** (2009). "Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." *J Bacteriol* **191**(5): 1414-1428.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.** (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* **193**(1): 265-275
- Lu, X. H., An, S. Q., Tang, D. J., Mccarthy, Y., Tang, J. L., Dow, J. M. and Ryan, R. P.** (2012). "RsmA regulates biofilm formation in *Xanthomonas campestris* through a regulatory network involving cyclic di-GMP and the Clp transcription factor." *PLoS One* **7**(12): e52646.
- Mahan, M. J., Slauch, J. M. and Mekalanos, J. J.** (1993). "Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues." *Science* **259**(5095): 686-688.
- Maillaux, R. J.; Lemire, J.; Singh, R.; Chenier, D. R.; Hamel, R. D. and Appanna, V. D.** (2007) " The tricarboxylic acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist." *PLoS One* **2** (8): e690
- Marois, E., Van Den Ackerveken, G. and Bonas, U.** (2002). "The *xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host." *Mol Plant Microbe Interact* **15**(7): 637-646.
- Mason, M. G., Shepherd, M., Nicholls, P., Dobbin, P. S., Dodsworth, K. S., Poole, R. K. and Cooper, C. E.** (2009). "Cytochrome bd confers nitric oxide resistance to *Escherichia coli*." *Nat Chem Biol* **5**(2): 94-96.
- Mattison, K., Wilbur, J. S., So, M. and Brennan, R. G.** (2006). "Structure of FitAB from *Neisseria gonorrhoeae* bound to DNA reveals a tetramer of toxin-antitoxin heterodimers containing pin domains and ribbon-helix-helix motifs." *J Biol Chem* **281**(49): 37942-37951.
- Mehdy, M. C. Sharma, Y.K.; Sathasivan, K. And N.W. Bays** (1996). "The role of activated oxygen species in plant disease resistance." *Physiologia plantarum* **98**(2): 365-374.
- Mengel, K.** (1995). "Iron availability in plant tissues-iron chlorosis on calcareous soils." *Plant and Soil* **165**: 275-283.
- Ménard R.; Sansonetti, P. J. and Parsot, C.** (1993) " Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells." *J Bacteriol* **175**(18): 5899-5906
- Mengaud, J. M. and Horwitz, M. A.** (1993). "The major iron-containing protein of *Legionella pneumophila* is an aconitase homologous with the human iron-responsive element-binding protein." *J Bacteriol* **175**(17): 5666-5676.
- Miethke, M. and Marahiel, M. A.** (2007). "Siderophore-based iron acquisition and pathogen control." *Microbiol Mol Biol Rev* **71**(3): 413-451.
- Miller, M. B. and Bassler, B. L.** (2001). "Quorum sensing in bacteria." *Annu Rev Microbiol* **55**: 165-199.
- Mitchell, P.** (1975). "Protonmotive redox mechanism of the cytochrome *b-c1* complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle." *FEBS Lett* **56**(1): 1-6.
- Mongkolsuk, S., Praituan, W., Loprasert, S., Fuangthong, M. and Chamnongpol, S.** (1998). "Identification and characterization of a new organic hydroperoxide resistance (*ohr*) gene with a novel pattern of oxidative stress regulation from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*." *J Bacteriol* **180**(10): 2636-2643.

- Mráček, T., Holzerová, E., Drahota, Z., Kovářová, N., Vrbacký, M., Ješina, P. and Houštěk, J.** (2013). "ROS generation and multiple forms of mammalian mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase." *Biochim Biophys Acta* **1837**(1): 98-111.
- Mudgett, M. B.** (2005). "New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants." *Annu Rev Plant Biol* **56**: 509-531.
- Mulholland, S. E., Gibney, B. R., Rabanal, F. and Dutton, P. L.** (1999). "Determination of nonligand amino acids critical to $[4\text{Fe-4S}]^{2+/+}$ assembly in ferredoxin maquettes." *Biochemistry* **38**(32): 10442-10448.
- Munoz-Elias, E. J. and Mckinney, J. D.** (2006). "Carbon metabolism of intracellular bacteria." *Cell Microbiol* **8**(1): 10-22.
- Nadwodnik, J. and Lohaus, G.** (2008). "Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*." *Planta* **227**(5): 1079-1089.
- Naushad, H. S. and Gupta, R. S.** (2013). "Phylogenomics and molecular signatures for species from the plant pathogen-containing order *xanthomonadales*." *PLoS One* **8**(2): e55216.
- Ninio, S. and Roy, C. R.** (2007). "Effector proteins translocated by *Legionella pneumophila*: strength in numbers." *Trends Microbiol* **15**(8): 372-380.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D. and Bonas, U.** (2001). "cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide hrpG-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." *Mol Microbiol* **41**(6): 1271-1281.
- Nürnberg, T. and Brunner, F.** (2002). "Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns." *Curr Opin Plant Biol* **5**(4): 318-324.
- Ochsner, U. A., Wilderman, P. J., Vasil, A. I. and Vasil, M. L.** (2002). "GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes." *Mol Microbiol* **45**(5): 1277-1287.
- O'connell, A., An, S. Q., McCarthy, Y., Schulte, F., Niehaus, K., He, Y. Q., Tang, J. L., Ryan, R. P. and Dow, J. M.** (2013). "Proteomics analysis of the regulatory role of Rpf/DSF Cell-to-Cell signaling system in the virulence of *Xanthomonas campestris*." *Mol Plant Microbe Interact* **26**(10): 1131-1137.
- Pandey, A. and Sonti, R. V.** (2010). "Role of the FeoB protein and siderophore in promoting virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on rice." *J Bacteriol* **192**(12): 3187-3203.
- Pandey, D. P. and Gerdes, K.** (2005). "Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes." *Nucleic Acids Res* **33**(3): 966-976.
- Pantopoulos, K. and Hentze, M. W.** (1995). "Rapid responses to oxidative stress mediated by iron regulatory protein." *Embo J* **14**(12): 2917-2924.
- Poole, R. K.** (1983). "Bacterial cytochrome oxidases. A structurally and functionally diverse group of electron-transfer proteins." *Biochem Biophys Acta* **726**(3): 205-243.

- Poole, R. K. and Cook, G. M.** (2000). "Redundancy of aerobic respiratory chains in bacteria? Routes, reasons and regulation." *Adv Microb Physiol* **43**: 165-224.
- Postle, K. and Kadner, R. J.** (2003). "Touch and go: tying TonB to transport." *Mol Microbiol* **49**(4): 869-882.
- Potnis, N., Krasileva, K., Chow, V., Almeida, N. F., Patil, P. B., Ryan, R. P., Sharlach, M., Behlau, F., Dow, J. M., Momol, M., White, F. F., Preston, J. F., Vinatzer, B. A., Köbnik, R., Setubal, J. C., Norman, D. J., Staskawicz, B. J. and Jones J. B.** (2011) "Comparative genomics reveals diversity among *xanthomonads* infecting tomato and pepper." *BMC Genomics* **12**: 146.
- Preston, G. M., Studholme, D. J. and Caldelari, I.** (2005). "Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria." *FEMS Microbiol Rev* **29**(2): 331-360.
- Prodromou, C., Artymiuk, P. J. and Guest, J. R.** (1992). "The aconitase of *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the aconitase gene and amino acid sequence similarity with mitochondrial aconitases, the iron-responsive-element-binding protein and isopropylmalate isomerases." *Eur J Biochem* **204**(2): 599-609.
- Purcell, A. H. and Hopkins, D. L.** (1996). "Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens." *Annu Rev Phytopathol* **34**: 131-151.
- Rahme, L. G., Mindrinos, M. N. and Panopoulos, N. J.** (1992). "Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*." *J Bacteriol* **174**(11): 3499-3507.
- Ramos-Gonzalez, M. I., Campos, M. J. and Ramos, J. L.** (2005) "Analysis *Pseudomonas putida* KT2440 gene expression in the maize rhizosphere: in vivo expression technology capture and identification of root-activated promoters" *J Bacteriol* **187**(12): 4033-4041
- Ratledge, C. and Dover, L. G.** (2000). "Iron metabolism in pathogenic bacteria." *Annu Rev Microbiol* **54**: 881-941.
- Reents, H., Munch, R., Dammeyer, T., Jahn, D. and Hartig, E.** (2006). "The Fnr regulon of *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **188**(3): 1103-1112.
- Rellan-Alvarez, R., Abadia, J. and Alvarez-Fernandez, A.** (2008). "Formation of metal-nicotianamine complexes as affected by pH, ligand exchange with citrate and metal exchange. A study by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry." *Rapid Commun Mass Spectrom* **22**(10): 1553-1562.
- Ren, D., Bedzyk, L. A., Thomas, S. M., Ye, R. W. and Wood, T. K.** (2004). "Gene expression in *Escherichia coli* biofilms." *Appl Microbiol Biotechnol* **64**(4): 515-524.
- Rico, A. and Preston, G. M.** (2008). "*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 uses constitutive and apoplast-induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients that are abundant in the tomato apoplast." *Mol Plant Microbe Interact* **21**(2): 269-282.
- Rieske, J. S., Hansen, R. E. and Zaugg, W. S.** (1964). "Studies on the Electron Transfer System. 58. Properties of a New Oxidation-Reduction Component of the Respiratory Chain as Studied by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy." *J Biol Chem* **239**: 3017-3022.
- Robbins, A. H. and Stout, C. D.** (1989). "The structure of aconitase." *Proteins* **5**(4): 289-312.
- Roe, A. J., Mclaggan, D., Davidson, I., O'byrne, C. and Booth, I. R.** (1998). "Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids." *J Bacteriol* **180**(4): 767-772.

- Roe, A. J., O'byrne, C., Mclaggan, D. and Booth, I. R. (2002). "Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity." *Microbiology* **148**(Pt 7): 2215-2222.
- Rouault, T. A. (2006). "The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease." *Nat Chem Biol* **2**(8): 406-414.
- Rouault, T. A. and Klausner, R. D. (1996). "Iron-sulfur clusters as biosensors of oxidants and iron." *Trends Biochem Sci* **21**(5): 174-177.
- Rudolph, K. W. E. G., M.; Ebrahim-Nesbat, F.; Nöllenburg, M.; Zomorodian, A.; Wydra, K.; Neugebauer, M.; Hettwer, U.; El-Shouny, W.; Sonnenberg, B.; Klement, Z. (1994). "The role of extracellular polysaccharides as virulence factors for phytopathogenic *pseudomonads* and *xanthomonads*." In C. I. Kado und J. H. Crosa (eds), *Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence*. Kluwer Academic Publisher, Netherlands: 357-378.
- Ryan, R. P., Fouhy, Y., Lucey, J. F., Jiang, B. L., He, Y. Q., Feng, J. X., Tang, J. L. and Dow, J. M. (2007). "Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*." *Mol Microbiol* **63**(2): 429-442.
- Ryan, R. P., Vorholter, F. J., Potnis, N., Jones, J. B., Van Sluys, M. A., Bogdanove, A. J. and Dow, J. M. (2011). "Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions." *Nat Rev Microbiol* **9**(5): 344-355.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* **230**(4732): 1350-1354.
- Salerno, J. C., Bolgiano, B. and Ingledew, W. J. (1989). "Potentiometric titration of cytochrome-*bo* type quinol oxidase of *Escherichia coli*: evidence for heme-heme and copper-heme interaction." *FEBS Lett* **247**(1): 101-105.
- Salmon, K., Hung, S. P., Mekjian, K., Baldi, P., Hatfield, G. W. and Gunsalus, R. P. (2003). "Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR." *J Biol Chem* **278**(32): 29837-29855.
- Salzberg, S. L., Sommer, D. D., Schatz, M. C., Phillippy, A. M., Rabinowicz, P. D., Tsuge, S., Furutani, A., Ochiai, H., Delcher, A. L., Kelley, D., Madupu, R., Puiu, D., Radune, D., Shumway, M., Trapnell, C., Aparna, G., Jha, G., Pandey, A., Patil, P. B., Ishihara, H., Meyer, D. F., Szurek, B., Verdier, V., Koebnik, R., Dow, J. M., Ryan, R. P., Hirata, H., Tsuyumu, S., Won Lee, S., Seo, Y. S., Sriariyanum, M., Ronald, P. C., Sonti, R. V., Van Sluys, M. A., Leach, J. E., White, F. F. and Bogdanove, A. J. (2008). "Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A." *BMC Genomics* **9**: 204.
- Sambrook, J. F., E. F.; Maniatis, T. (1989). "In Molecular cloning: A laboratory manual - 2nd ed." *Gold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sanger, F., Nickla, S. and Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". *Proc Natl Acad Sci USA* **74**(12): 5463-5467

- Sattelmacher, B.** (2001). "The apoplast and its significance for plant mineral nutrition." *New Phytol* **149**: 167-192.
- Sawers, G. and Bock, A.** (1988). "Anaerobic regulation of pyruvate formate-lyase from *Escherichia coli* K-12." *J Bacteriol* **170**(11): 5330-5336.
- Sawers, G. and Bock, A.** (1989). "Novel transcriptional control of the pyruvate formate-lyase gene: upstream regulatory sequences and multiple promoters regulate anaerobic expression." *J Bacteriol* **171**(5): 2485-2498.
- Schmidtke, C., Findeiss, S., Sharma, C. M., Kuhfuss, J., Hoffmann, S., Vogel, J., Stadler, P. F. and Bonas, U.** (2012). "Genome-wide transcriptome analysis of the plant pathogen *Xanthomonas* identifies sRNAs with putative virulence functions." *Nucleic Acids Res* **40**(5): 2020-2031.
- Schneider, D. and Schmidt, C. L.** (2005). "Multiple Rieske proteins in prokaryotes: where and why?" *Biochim Biophys Acta* **1710**(1): 1-12.
- Schulte, R. and Bonas, U.** (1992). "Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible." *J Bacteriol* **174**(3): 815-823.
- Shaw, D. J., Rice, D. W. and Guest, J. R.** (1983). "Homology between CAP and Fnr, a regulator of anaerobic respiration in *Escherichia coli*." *J Mol Biol* **166**(2): 241-247.
- Shepherd, M., Sanguinetti, G., Cook, G. M. and Poole, R. K.** (2010) "Compensations for diminished terminal oxidase activity in *Escherichia coli*: cytochrome *bd-II*-mediated respiration and glutamate metabolism." *J Biol Chem* **285**(24): 18464-18472.
- Shimada, T., Fujita, N., Yamamoto, K. and Ishihama, A.** (2011). "Novel roles of cAMP receptor protein (CRP) in regulation of transport and metabolism of carbon sources." *PLoS One* **6**(6): e20081.
- Simanshu, D. K., Yamaguchi, Y., Park, J. H., Inouye, M. and Patel, D. J.** (2013). "Structural Basis of mRNA Recognition and Cleavage by Toxin MazF and Its Regulation by Antitoxin MazE in *Bacillus subtilis*." *Mol Cell* **52**(3): 447-458.
- Slater, H., Alvarez-Morales, A., Barber, C. E., Daniels, M. J. and Dow, J. M.** (2000). "A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*." *Mol Microbiol* **38**(5): 986-1003.
- Solomon, P. S. and Oliver, R. P.** (2001). "The nitrogen content of the tomato leaf apoplast increases during infection by *Cladosporium fulvum*." *Planta* **213**(2): 241-249.
- Somerville, G., Mikoryak, C. A. and Reitzer, L.** (1999). "Physiological characterization of *Pseudomonas aeruginosa* during exotoxin A synthesis: glutamate, iron limitation, and aconitase activity." *J Bacteriol* **181**(4): 1072-1078.
- Somerville, G. A., Chaussee, M. S., Morgan, C. I., Fitzgerald, J. R., Dorward, D. W., Reitzer, L. J. and Musser, J. M.** (2002). "*Staphylococcus aureus* aconitase inactivation unexpectedly inhibits post-exponential-phase growth and enhances stationary-phase survival." *Infect Immun* **70**(11): 6373-6382.
- Souza, D. P., Andrade, M. O., Alvarez-Martinez, C. E., Arantes, G. M., Farah, C. S. and Salinas, R. K.** (2011). "A component of the *Xanthomonadaceae* type IV secretion system combines a VirB7 motif with a N0 domain found in outer membrane transport proteins." *PLoS Pathog* **7**(5): e1002031.

- Spiro, S.** (1994). "The FNR family of transcriptional regulators." *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**(1-3): 23-36.
- Spiro, S., Gaston, K. L., Bell, A. I., Roberts, R. E., Busby, S. J. and Guest, J. R.** (1990). "Interconversion of the DNA-binding specificities of two related transcription regulators, CRP and FNR." *Mol Microbiol* **4**(11): 1831-1838.
- Spiro, S. and Guest, J. R.** (1987). "Regulation and over-expression of the *fnr* gene of *Escherichia coli*." *J Gen Microbiol* **133**(12): 3279-3288.
- Spiro, S. and Guest, J. R.** (1990). "FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*." *FEMS Microbiol Rev* **6**(4): 399-428.
- Stall, R. E.** (1995). "*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." In R. P. Singh, U. S. Singh und K. Kohmoto (ed.). *Pathogenesis and host-parasite specificity in plant disease* Vol. I, Prokaryotes, Pergamon, Elsevier Science Inc., Tarrytown, New York.
- Strauch, M. A. and Hoch, J. A.** (1993). "Transition-state regulators: sentinels of *Bacillus subtilis* post-exponential gene expression." *Mol Microbiol* **7**(3): 337-342.
- Streubel, J., Pesce, C., Hutin, M., Koebnik, R., Boch, J. and Szurek, B.** (2013). "Five phylogenetically close rice SWEET genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*." *New Phytol* **200**(3): 808-819.
- Subramoni, S. and Sonti, R. V.** (2005). "Growth deficiency of a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *fur* mutant in rice leaves is rescued by ascorbic acid supplementation." *Mol Plant Microbe Interact* **18**(7): 644-651.
- Sutherland, M. W.** (1991). "The generation of oxygen radicals during host plant response to infection." *Physiol Mol Plant Pathol* **39**: 79-93.
- Swarbrick, P. J., Schulze-Lefert, P. and Scholes, J. D.** (2006). "Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew." *Plant Cell Environ* **29**(6): 1061-1076.
- Szczesny, R., Jordan, M., Schramm, C., Schulz, S., Coge, V., Bonas, U. and Buttner, D.** (2010). "Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." *New Phytol* **187**(4): 983-1002.
- Tamir-Ariel, D., Navon, N. and Burdman, S.** (2007). "Identification of genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* induced during its interaction with tomato." *J Bacteriol* **189**(17): 6359-6371.
- Tamir-Ariel, D., Rosenberg, T. and Burdman, S.** (2011). "The *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *citH* gene is expressed early in the infection process of tomato and is positively regulated by the TctDE two-component regulatory system." *Mol Plant Pathol* **12**(1): 57-71.
- Tang, D. J., He, Y. Q., Feng, J. X., He, B. R., Jiang, B. L., Lu, G. T., Chen, B. and Tang, J. L.** (2005). "*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* possesses a single gluconeogenic pathway that is required for virulence." *J Bacteriol* **187**(17): 6231-6237.
- Tang, J. L., Liu, Y. N., Barber, C. E., Dow, J. M., Wootton, J. C. and Daniels, M. J.** (1991). "Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*." *Mol Gen Genet* **226**(3): 409-417.

- Tang, Y. and Guest, J. R.** (1999). "Direct evidence for mRNA binding and post-transcriptional regulation by *Escherichia coli* aconitases." *Microbiology* **145**(Pt 11): 3069-3079.
- Tang, Y., Guest, J. R., Artymiuk, P. J. and Green, J.** (2005). "Switching aconitase B between catalytic and regulatory modes involves iron-dependent dimer formation." *Mol Microbiol* **56**(5): 1149-1158.
- Tang, Y., Guest, J. R., Artymiuk, P. J., Read, R. C. and Green, J.** (2004). "Post-transcriptional regulation of bacterial motility by aconitase proteins." *Mol Microbiol* **51**(6): 1817-1826.
- Tang, Y., Quail, M. A., Artymiuk, P. J., Guest, J. R. and Green, J.** (2002). "*Escherichia coli* aconitases and oxidative stress: post-transcriptional regulation of *sodA* expression." *Microbiology* **148**(Pt 4): 1027-1037.
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Buttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., Mchardy, A. C., Meyer, F., Mittenhuber, G., Nies, D. H., Niesbach-Klosgen, U., Patschkowski, T., Ruckert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S. C., Vorholter, F. J., Weber, E., Puhler, A., Bonas, U., Bartels, D. and Kaiser, O.** (2005). "Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence." *J Bacteriol* **187**(21): 7254-7266.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. and Collinge, D. B.** (1997) "Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction." *Plant J* **11**: 1187-1194
- Tolla, D. A. and Savageau, M. A.** (2010). "Regulation of aerobic-to-anaerobic transitions by the FNR cycle in *Escherichia coli*." *J Mol Biol* **397**(4): 893-905.
- Tong, W. H. and Rouault, T. A.** (2007). "Metabolic regulation of citrate and iron by aconitases: role of iron-sulfur cluster biogenesis." *Biometals* **20**(3-4): 549-564.
- Tseng, C. P., Albrecht, J. and Gunsalus, R. P.** (1996). "Effect of microaerophilic cell growth conditions on expression of the aerobic (*cyoABCDE* and *cydAB*) and anaerobic (*narGHJI*, *frdABCD*, and *dmsABC*) respiratory pathway genes in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **178**(4): 1094-1098.
- Tsuchiya, D., Shimizu, N. and Tomita, M.** (2009). "Cooperativity of two active sites in bacterial homodimeric aconitases." *Biochem Biophys Res Commun* **379**(2): 485-488.
- Tyson, K. L., Cole, J. A. and Busby, S. J.** (1994). "Nitrite and nitrate regulation at the promoters of two *Escherichia coli* operons encoding nitrite reductase: identification of common target heptamers for both NarP- and NarL-dependent regulation." *Mol Microbiol* **13**(6): 1045-1055.
- Unterholzner, S. J., Poppenberger, B. and Rozhon, W.** (2013). "Toxin-antitoxin systems: Biology, identification, and application." *Mob Genet Elements* **3**(5): e26219.
- Urbany, C. and Neuhaus, H. E.** (2008). "Citrate uptake into *Pectobacterium atrosepticum* is critical for bacterial virulence." *Mol Plant Microbe Interact* **21**(5): 547-554.
- Van Sluys, M. A., Monteiro-Vitorello, C. B., Camargo, L. E., Menck, C. F., Da Silva, A. C., Ferro, J. A., Oliveira, M. C., Setubal, J. C., Kitajima, J. P. and Simpson, A. J.** (2002). "Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria." *Annu Rev Phytopathol* **40**: 169-189.
- Varghese, S., Tang, Y. and Imlay, J. A.** (2003). "Contrasting sensitivities of *Escherichia coli* aconitases A and B to oxidation and iron depletion." *J Bacteriol* **185**(1): 221-230.

- Vereecke, D., Cornelis, K., Temmerman, W., Holsters, M. and Goethals, K. (2002). "Versatile persistence pathways for pathogens of animals and plants." *Trends Microbiol* **10**(11): 485-488
- Visca, P., Leoni, L., Wilson, M. J. and Lamont, I. L. (2002). "Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*." *Mol Microbiol* **45**(5): 1177-1190.
- Vojnov, A. A., Zorreguieta, A., Dow, J. M., Daniels, M. J. and Dankert, M. A. (1998). "Evidence for a role for the *gumB* and *gumC* gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*." *Microbiology* **144** (Pt 6): 1487-1493.
- Von Bodman, S. B., Bauer, W. D. and Coplin, D. L. (2003). "Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria." *Annu Rev Phytopathol* **41**: 455-482.
- Von Wiren, N. K., S.; Bansal, S.; Briat, J. F.; Khodr, H.; Shioiri, T.; Leigh, R. A.; Hider, R. C. (1999). "Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants." *Plant Physiol* **119**(3): 1107-1114.
- Vorhölter, F. J., Schneiker, S., Goesmann, A., Krause, L., Bekel, T., Kaiser, O., Linke, B., Patschkowski, T., Ruckert, C., Schmid, J., Sidhu, V. K., Sieber, V., Tauch, A., Watt, S. A., Weisshaar, B., Becker, A., Niehaus, K. and Puhler, A. (2008). "The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis." *J Biotechnol* **134**(1-2): 33-45.
- Vorhölter, F. J., Wiggerich, H. G., Scheidle, H., Sidhu, V. K., Mrozek, K., Kuster, H., Puhler, A. and Niehaus, K. (2012). "Involvement of bacterial TonB-dependent signaling in the generation of an oligogalacturonide damage-associated molecular pattern from plant cell walls exposed to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pectate lyases." *BMC Microbiol* **12**: 239.
- Walden, W. E., Selezneva, A. I., Dupuy, J., Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J. C., Theil, E. C. and Volz, K. (2006). "Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA." *Science* **314**(5807): 1903-1908.
- Wang, X. and Wood, T. K. (2011). "Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response." *Appl Environ Microbiol* **77**(16): 5577-5583.
- Weber, I. T. and Steitz, T. A. (1987). "Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution." *J Mol Biol* **198**(2): 311-326.
- Weinberg, E. D. (2009). "Iron availability and infection." *Biochim Biophys Acta* **1790**(7): 600-605.
- Wengelnik, K. and Bonas, U. (1996). "HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." *J Bacteriol* **178**(12): 3462-3469.
- Wengelnik, K., Van Den Ackerveken, G. and Bonas, U. (1996b). "HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators." *Mol Plant Microbe Interact* **9**(8): 704-712.
- Wengelnik, K., Rossier, O. and Bonas, U. (1999). "Mutations in the regulatory gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* result in constitutive expression of all *hrp* genes." *J Bacteriol* **181**(21): 6828-6831
- Wesolowska, K. (2012). "Charakterisierung des Toxin/ Antitoxin-Systems RoaX und RoaY und dessen Einfluss auf die Aconitase B in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." *Diplomarbeit, Institut für Biologie/Bereich Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- White, F. F., Yang, B. and Johnson, L. B. (2000). "Prospects for understanding avirulence gene function." *Curr Opin Plant Biol* **3**(4): 291-298.
- Wiegand, G. and Remington, S. J. (1986). "Citrate synthase: structure, control, and mechanism." *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **15**: 97-117.

- Wiggerich, H. G., Klauke, B., Koplín, R., Priefer, U. B. and Puhler, A.** (1997). "Unusual structure of the tonB-exb DNA region of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: tonB, exbB, and exbD1 are essential for ferric iron uptake, but exbD2 is not." *J Bacteriol* **179**(22): 7103-7110.
- Williams, C. H., Stillman, T. J., Barynin, V. V., Sedelnikova, S. E., Tang, Y., Green, J., Guest, J. R. and Artymiuk, P. J.** (2002). "*E. coli* aconitase B structure reveals a HEAT-like domain with implications for protein-protein recognition." *Nat Struct Biol* **9**(6): 447-452.
- Wilson, T. J., Bertrand, N., Tang, J. L., Feng, J. X., Pan, M. Q., Barber, C. E., Dow, J. M. and Daniels, M. J.** (1998). "The *rpfA* gene of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*, which is involved in the regulation of pathogenicity factor production, encodes an aconitase." *Mol Microbiol* **28**(5): 961-970.
- Winther, K. S. and Gerdes, K.** (2011). "Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(18): 7403-7407.
- Wojtaszek, P.** (1997). "Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection." *Biochem J* **322** (Pt 3): 681-692.
- Wu, G., Cruz-Ramos, H., Hill, S., Green, J., Sawers, G. and Poole, R. K.** (2000). "Regulation of cytochrome *bd* expression in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii* by CydR (Fnr). Sensitivity to oxygen, reactive oxygen species, and nitric oxide." *J Biol Chem* **275**(7): 4679-4686.
- Wu, G., Hill, S., Kelly, M. J., Sawers, G. and Poole, R. K.** (1997). "The *cydR* gene product, required for regulation of cytochrome *bd* expression in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii*, is an Fnr-like protein." *Microbiology* **143**(Pt 7): 2197-2207.
- Wright, A. H., Delong, J. M., Gunawardena, A. H. and Prange, R. K.** (2011) "The interrelationship between the lower oxygen limit, chlorophyll fluorescence and the xanthophyll cycle in plants" *Photosynth Res* **107**(3): 223-235
- Xu, X. M. and Moller, S. G.** (2011). "Iron-sulfur clusters: biogenesis, molecular mechanisms, and their functional significance." *Antioxid Redox Signal* **15**(1): 271-307.
- Xu, X. Q. and Pan, S. Q.** (2000). "An *Agrobacterium* catalase is a virulence factor involved in tumorigenesis." *Mol Microbiol* **35**(2): 407-414.
- Yang, B., Sugio, A. and White, F. F.** (2006). "Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(27): 10503-10508.
- Yokosho, K., Yamaji, N., Ueno, D., Mitani, N. and Ma, J. F.** (2009). "OsFRDL1 is a citrate transporter required for efficient translocation of iron in rice." *Plant Physiol* **149**(1): 297-305.
- Zhang, Y., Zhang, J., Hoeflich, K. P., Ikura, M., Qing, G. and Inouye, M.** (2003). "MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*." *Mol Cell* **12**(4): 913-923.
- Zheng, D., Constantinidou, C., Hobman, J. L. and Minchin, S. D.** (2004). "Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling." *Nucleic Acids Res* **32**(19): 5874-5893.

6 Anhang

Tab. 12: Verwendete Oligonuklotide

Bezeichnung	Sequenz: 5'-3'	Verwendung
Deletionskonstrukte		
f-acn2823Xba r-XCV1926-3800Hind	cctagttctagaggcgtagcaggttctccagca ctggtaaagcttcgggttctcaaaaaagcagc	Amplifikation stromaufwärts von <i>acnB</i>
f-XCV1928-2825Hind r-XCV1928-3761Apa	ctcactaagctttcccgcctctaccactgcc taactggggcccagcccgcctctgtccgtaaa	Amplifikation stromabwärts von <i>acnB</i>
f-acnA2118Xba r-acn3089Hind	tgcatactagacgacgaactgcccaccacc ctctgaaagctttgctccagaaagtatgcacgc	Amplifikation stromaufwärts von <i>roaX-roaY</i>
r-XCV1928-3761Sal f-XCV1928-2825Hind r-acnB4741Bam	taactggtgcacagcccgcctctgtccgtaaa ctcactaagctttcccgcctctaccactgcc gtaccaggatccacatgcggtgtccatctgc	Amplifikation stromabwärts von <i>roaX-roaY</i>
r-seq3450 f-seq 1923 f-seq acnA r-seq acnB f-seq 3565	acagggcatccaggcggctcgg gccagggcatggatggggggg tcgggctcggcggcgggggc aggtcgtcggtattggttctg ccaccaggaagcggcggcag	Sequenzierung und KoloniePCR
r-Del-acnA-Hind2 f-Del-acnA-Xba	ctggtaaagcttcacagcgcgcattgcgtgca cacatgtctagagtcttccgaagctatggtac	Amplifikation stromaufwärts von <i>acnA</i>
r-Del-acnA-Apa f-Del-acnA-Hind3	agatgtgggccccgcgtcgcagccggccggca tgcataaagctttatcactcctatggcatcgaag	Amplifikation stromabwärts von <i>acnA</i>
r-seqDelacnA f-seqDelacnA	cgaggaatccaggcgatcatgggtcgaacgg gttgggtgcccgatcaggtgcagacctatcag	Sequenzierung und Kolonie- PCR
f-DelacnA2-Xba r-DelacnA2-Hind2	cttcagcttagagatgtgatgcgcaccggcgtg cattacaagctttggcgatatcgaagcggggcgg	Amplifikation stromaufwärts von <i>acnA2</i>
f-DelacnA2-Hind3 r-DelacnA2BamHI	catagaaagcttgacgaccatggccgattctt cgatacggatccgggctgccgatccccgcaac	Amplifikation stromabwärts von <i>acnA2</i>
r-seqDelacnA2 f-seqDelacnA2	gctgcatagctgatcgttacgtgcggcgtgtg ctttggacatccggtgtacacgggtgtcggacc	Sequenzierung und Kolonie- PCR
f-1870BamHI r-1870HindIII	aggataggatcccgggtggacgatcgggattc tcgagaaagcttggcgggctgattgatggat	Amplifikation stromaufwärts von <i>flp</i>
f-flp-HindIII r-flp-Xba	ctaggttaagctttgactgtgggacgcattga agctatctagatgggtccattgcacctcgggt	Amplifikation stromabwärts von <i>flp</i>
f-seq-flp r-seq-flp	cggcgagaacctggcgggcgaa tctcgttgccaccgctgcgc	Sequenzierung und Kolonie- PCR
Komplementationskonstrukte		
f-pLAFRacnB-BamHI r-acnB-HindIII	ttccttggatccccctgatccacgttcgcgctt cccaagcttcccaaacccgcacctgatcc	Amplifikation von <i>acnB</i> zur Klonierung in pLAFR6
f-acnA-myc r-acnA-myc	tttggctcttatgagcgattcctttcc	Amplifikation von <i>acnA</i> zur Klonierung in pBRM
f-acnA2-myc r-acnA2-myc	tttggctcttatgaatagccagtaccgc tttggctcttcacctgcggcctgtttgc	Amplifikation von <i>acnA2</i> zur Klonierung in pBRM
r-pLAFR6/acnA2-Xba f-pLAFR6/acnA2-HindIII	atccgttctagactatgcggccctgtttgcctc gctattaagcttgcgtggagcgcgcacatcatcg	Amplifikation von <i>acnA2</i> zur Klonierung in pLAFR6

Bezeichnung	Sequenz: 5'-3'	Verwendung
Quantitative RT-PCR		
f-acnA-qRT r-acnA-qRT	cttgacctggaactgcttgac cgtatccatcgctccaatct	partielle Amplifikation von <i>acnA</i> zur qRT-PCR
f-acnA2-qRT r-acnA2-qRT	tatacgacccgatgttcaagc aagtggtcgggtggtgatgtt	partielle Amplifikation von <i>acnA2</i> zur qRT-PCR
f-acnB-qRT r-acnB-qRT	cgcacaaagaagatggaagac cgatgaatacttcgctgatgg	partielle Amplifikation von <i>acnB</i> zur qRT-PCR
f-cit-qRT r-cit-qRT	tc tcccttcatcttcttgc tgcgtaacacgggtgatcagata	partielle Amplifikation von <i>cit</i> zur qRT-PCR
f-cydA-qRT1 r-cydA-qRT1	aagcacgcaaggttttcg agcgaaaaacgcgatgag	partielle Amplifikation von <i>cydA</i> zur qRT-PCR
f-1157-qRT r-1157-qRT	cgcaaggaagtgggtattgg gaaccaatccaggttcggga	partielle Amplifikation von <i>XCV1157</i> zur qRT-PCR
f-qRT-y r-qRT-y	cgccggccatatgaaca cgggtttgggaacgatgc	partielle Amplifikation von <i>roaY</i> zur qRT-PCR
16s 3' 16s 5'	tggcacgaagttagccggtg tacgctaataccgcatacga	partielle Amplifikation der 16srDNA

Tab. 13: Differentiell exprimierte Gene in *Xcv 85-10ΔacnB* im Vergleich zum Wildtyp 85-10

Genbezeichnung	Funktion/ putative Funktion	t-Wert	p-Wert	p- adjusted	M-wert	M-sd	A-wert	n
<i>empty</i>		-2,49	0,013	0,20	-0,23	1,35	4,6	202
<i>spotting buffer</i>		-15,17	6,49E-40	3,26E-36	-0,19	0,24	4,32	334
hochregulierte Expression								
<i>cit</i> ; XCV3602	<i>citrate:H⁺ symporter</i>	2,40	0,061	0,43	2,258	2,30	5,611	6
<i>virB2</i> ; p38 XCV0042	<i>Type IV secretion system protein</i>	30,85	6,71E-07	0,0011	1,38	0,109	10,55	6
<i>virB4</i> ; p38 XCV0041	<i>Type IV secretion system protein</i>	33,63	4,33E-07	0,0010	1,38	0,10	8,77	6
XCV2242	<i>Putative succinate dehydrogenase membrane anchor subunit</i>	2,535	0,0522	0,4118	1,139	1,100	6,653	6
<i>hemT</i> ; XCV2661;	<i>Hemerythrin- like protein</i>	2,496	0,067	0,444	1,092	0,978	5,23	5
<i>ppiD</i> ; XCV1085	<i>Peptidylprolyl isomerase</i>	3,016	0,0295	0,3211	1,061	0,861	6,48	6
XCV2186	<i>Methyl- accepting chemotaxis protein</i>	2,114	0,088	0,476	1,0289	1,191	7,015	6
XCV1414	<i>Cation diffusion facilitator family protein</i>	2,929	0,0428	0,380	1,014	0,774	5,382	5

Genbezeichnung	Funktion/ putative Funktion	t-Wert	p-Wert	p- adjusted	M-wert	M-sd	A-wert	n
herabregulierte Expression								
<i>cydX</i> ; XCV2537	<i>Putative membrane protein</i>	-2,941	0,032	0,334	-2,089	1,739	8,91	6

Tab. 14: Differenziell exprimierte Gene in *Xcv* 85-10Δ*flp* im Vergleich zu *Xcv* 85-10

Genbezeichnung	Funktion/ putative Funktion	t-Wert	p-Wert	p- adjusted	M-wert	M-sd	A- Wert	n
<i>empty</i>		1,068	0,28	0,683	0,086	1,58	4,72	379
<i>spotting buffer</i>		1,00	0,317	0,705	0,006	0,156	4,323	661
hochregulierte Expression								
XCV1972	<i>Putative secreted protein</i>	10,15	6,35E-07	0,00063	1,398	0,477	8,16	12
XCV3877	<i>Putative ABC transporter permease</i>	7,54	1,14E-05	0,0024	1,117	0,513	7,93	12
<i>rpsN</i> ; XCV1012	<i>rpsN 30S ribosomal protein S14</i>	12,54	7,36E-08	0,00018	1,074	0,296	8,38	12
<i>atpA</i> ; XCV3769	<i>ATP synthase alpha chain</i>	5,314	0,00024	0,0139	1,007	0,656	8,58	12
herabregulierte Expression								
<i>cydA</i> ; XCV2535	<i>Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit II</i>	-7,22	1,69E-05	0,0031	-1,36	0,654	8,58	12
<i>cydX</i> ; XCV2537	<i>Putative membrane protein</i>	-9,01	2,07E-06	0,00069	-3,98	1,53	7,75	12
XCV2352	<i>Putative carboxymuconolacto ne decarboxylase</i>	-16,34	4,6E-09	2,31E-05	-7,05	1,49	8,76	12

Werte gefiltert nach: M-Wert größer 1 bzw. kleiner -1; p-Wert $\leq 0,1$; A-Wert > 5 ; n > 6

Tab. 15: Differenziell exprimierte Gene in *Xcv* 85-10Δ*roaX-roaY* im Vergleich zu *Xcv* 85-10

Genbezeichnung	Funktion/ putative Funktion	t-Wert	p-Wert	p- adjusted	M-wert	M-sd	A- Wert	n
<i>empty</i>		-2,35	0,018	0,193	-0,32	4,69	7,62	1137
<i>spotting buffer</i>		-6,34	4,30E-10	1,15E-06	-0,00021	0,00087	4,32	649
hochregulierte Expression								
XCV3310	<i>Putative siderophore biosynthesis protein</i>	3,78	0,0029	0,063	2,76	2,52	8,69	12
<i>rpsN</i> ; XCV1012	<i>30S ribosomal protein S14</i>	5,77	0,000179	0,011	1,849	1,062	8,87	11
XCV3572	<i>TonB-dependent outer membrane receptor</i>	9,20	1,68E-06	0,00052	1,798	0,676	10,11	12

Genbezeichnung	Funktion/ putative Funktion	t-Wert	p-Wert	p-adjusted	M-wert	M-sd	A-Wert	n
<i>kbl</i> ; XCV1046	2-amino-3-ketobutyrate CoA ligase	5,58	0,00016	0,010	1,75	1,089	9,40	12
XCV0874	Conserved hypothetical protein	5,45	0,00019	0,011	1,513	0,961	12,90	12
<i>acnA</i> , XCV1924	Aconitate hydratase	15,66	7,22E-09	1,21E-05	1,50	0,33	10,72	12
XCV0159	TonB-dependent outer membrane receptor	2,81	0,016	0,182	1,47	1,81	10,44	12
<i>acnB</i> , XCV1927	Aconitate hydratase	6,028	8,57E-05	0,0081	1,47	0,84	12,31	12
XCV3297	TonB-dependent outer membrane receptor	3,50	0,0049	0,091	1,426	1,41	8,68	12
<i>sufC</i> ; XCV3080	ABC transporter ATPase involved in Fe-S cluster assembly	2,48	0,030	0,252	1,379	1,92	10,31	12
<i>sspA</i> ; XCV2631	Stringent starvation protein A	5,50	0,00018	0,011	1,30	0,82	9,59	12
XCV3977	D-alanyl-D-alanine dipeptidase	2,40	0,0349	0,27	1,28	1,844	9,42	12
XCV3059	Putative secreted protein	7,71	9,20E-06	0,00171	1,122	0,504	8,98	12
XCV1296	<i>ISxac2</i> transposase	2,529	0,0279	0,241	1,109	1,518	9,12	12
<i>groES</i> ; XCV0570	10kDa chaperonin	2,576	0,025	0,233	1,094	1,471	9,93	12
XCV2276	Hypothetical protein	7,361	1,43E-05	0,0023	1,055	0,496	10,29	12
<i>xol5</i> ; XCV0324	Conserved hypothetical protein	4,46	0,00095	0,029	1,049	0,813	9,18	12
<i>ccmF1</i> ; XCV1712	C-type cytochrome biogenesis membrane protein CcmF	4,65	0,00070	0,026	1,048	0,781	8,86	12
XCV0788	Putative alcohol dehydrogenase class III	5,62	0,000154	0,010	1,030	0,634	9,40	12
<i>xopH</i> ; XCV0105; p183	Xanthomonas outer protein H	5,85	0,00010	0,0088	1,027	0,607	8,26	12
XCV0093; p183	Putative secreted protein	11,50	1,79E-07	0,00012	1,004	0,302	11,68	12
herabregulierte Expression								
<i>gumF</i> ; XCV2738	Xanthan biosynthesis acetyltransferase GumF	-2,834	0,016	0,180	-1,03	1,263	8,13	12
<i>amiC</i> ; XCV2603	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	-3,105	0,010	0,136	-1,085	1,21	8,47	12
XCV0116; p183	Hypothetical protein	-4,20	0,0014	0,0389	-1,21	1,001	8,69	12
<i>rpsF</i> ; XCV1661	30S ribosomal protein S6	-4,15	0,0016	0,0411	-1,53	1,28	9,53	12
XCV3774	Putative membrane protein	-2,718	0,019	0,200	-1,80	2,298	8,14	12
XCV2015	putative two-component response regulator	-3,39	0,0059	0,102	-1,91	1,953	8,12	12

Werte gefiltert nach: M-Wert > 1 bzw. < -1; p-Wert ≤ 0,05; A-Wert > 8; n >

Tab. 16: Differenziell exprimierte Gene in *Xcv 85-10ΔacnA2* im Vergleich zu *Xcv 85-10*

Genbezeichnung	Funktion/ putative Funktion	t-Wert	p-Wert	p- adjusted	M- wert	M-sd	A-wert	n
<i>empty</i>		2,945	0,0032	0,075	0,474	5,38	7,32	1119
<i>spotting buffer</i>		1,408	0,159	0,468	0,013	0,228	4,33	600
hochregulierte Expression								
XCV3297	<i>TonB-dependent outer membrane receptor</i>	7,95	6,88E-06	0,0011	4,299	1,87	9,61	12
XCV34449	<i>cysH 3'- phosphoadenosine 5'-phosphosulfate reductase</i>	7,59	1,07E-05	0,0014	3,59	1,63	8,23	12
XCV1157	<i>putative citrate synthase</i>	1302	4,99E-08	4,52E-05	3,049	0,81	8,61	12
XCV4064	<i>conserved hypothetical protein</i>	7,51	1,17E-05	0,0015	3,042	1,40	11,95	12
XCV1591	<i>transcriptional regulator, GntR family</i>	18,90	9,75E-10	4,91E-06	2,83	0,51	8,05	12
XCV1590	<i>ABC transporter ATP-binding protei</i>	7,31	1,51E-05	0,0018	2,66	1,26	8,03	12
XCV3461	<i>conserved hypothetical protein</i>	8,77	2,67E-06	0,00069	2,42	0,95	9,87	12
XCV3572	<i>TonB-dependent outer membrane receptor</i>	6,31	5,73E-05	0,0046	2,35	1,29	9,81	12
XCV1159	<i>hypothetical protein</i>	16,31	4,70E-09	1,18E-05	1,97	0,41	8,20	12
XCV0633	<i>conserved hypothetical protein</i>	8,35	4,31E-06	0,00083	1,93	0,80	8,76	12
XCV3889	<i>conserved hypothetical protein</i>	8,75	2,75E-06	0,00069	1,869	0,73	8,23	12
XCV0665	<i>conserved hypothetical protein</i>	7,51	1,18E-05	0,0015	1,82	0,84	9,05	12
<i>glpD</i> ; XCV0374	<i>Glycerol-3- phosphate dehydrogenase</i>	9,55	1,17E-06	0,00034	1,72	0,626	10,06	12
XCV0887	<i>two-component system regulatory protein</i>	2,98	0,012	0,162	1,61	1,87	8,99	12
<i>cysD</i> ; XCV3446	<i>ATP sulfurylase, small subunit</i>	4,95	0,00043	0,019	1,60	1,12	8,28	12
XCV2225	<i>conserved hypothetical protein</i>	5,30	0,00025	0,013	1,54	1,00	10,66	12
<i>ohrR</i> ; XCV0289	<i>transcriptional regulator, MarR family</i>	7,16	1,84E-05	0,0021	1,48	0,71	10,47	12
XCV3856	<i>conserved hypothetical protein</i>	4,55	0,00082	0,029	1,42	1,08	8,15	12
<i>moaC</i> ; XCV1107	<i>molybdenum cofactor biosynthesis protein C</i>	5,67	0,00014	0,009	1,34	0,82	8,93	12
XCV2951	<i>conserved hypothetical protein</i>	3,13	0,0094	0,13	1,28	1,41	8,90	12
<i>acnA</i> ; XCV1924	<i>aconitate hydratase</i>	6,11	7,60E-05	0,0054	1,26	0,71	10,77	12
XCV2245	<i>putative succinate dehydrogenase iron- sulfur protein</i>	2,99	0,012	0,162	1,265	1,464	10,12	12

Genbezeichnung	Funktion/ putative Funktion	t-Wert	p-Wert	p- adjusted	M- wert	M-sd	A-wert	n
XCV2250	<i>putative secreted protein</i>	7,954	6,89E-06	0,0011	1,261	0,549	9,38	12
XCV3046	<i>putative xanthine dehydrogenase iron-sulfur binding subunit</i>	2,691	0,0209	0,2201	1,237	1,592	8,39	12
<i>rhlE</i> ; XCV3733	<i>ATP-dependent RNA helicase</i>	3,076	0,010	0,146	1,215	1,36	9,98	12
XCV3869	<i>conserved hypothetical protein</i>	8,43	3,94E-06	0,00083	1,211	0,497	10,66	12
XCV1547	<i>conserved hypothetical protein</i>	8,38	4,18E-06	0,00083	1,20	0,496	9,97	12
<i>acnB</i> ; XCV1927	<i>aconitate hydratase</i>	11,57	1,68E-07	0,00010	1,156	0,346	11,81	12
<i>suh</i> ; XCV3618	<i>sucrose hydrolase</i>	2,95	0,0131	0,168	1,155	1,35	11,08	12
XCV0299	<i>putative membrane protein</i>	4,311	0,00123	0,040	1,148	0,922	9,07	12
XCV0588	<i>putative secreted protein</i>	4,674	0,00067	0,026	1,134	0,840	8,64	12
<i>ohr</i> ; XCV0290	<i>organic hydroperoxide resistance protein</i>	2,706	0,0204	0,217	1,092	1,397	8,30	12
<i>roaY</i> ; XCV1926	<i>Conserved hypothetical protein</i>	4,786	0,00056	0,0243	1,086	0,786	10,48	12
<i>zwf2</i> ; XCV4168	<i>Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase</i>	2,347	0,0386	0,305	1,066	1,57	9,37	12
XCV9303	<i>Hypothetical protein</i>	7,97	6,69E-06	0,0011	1,065	0,462	11,01	12
XCV1639	<i>Conserved hypothetical protein</i>	2,274	0,043	0,323	1,027	1,565	8,48	12
herabregulierte Expression								
XCV0025; p38	<i>Hypothetical protein</i>	-2,407	0,0347	0,288	-1,00	1,448	8,21	12
XCV3078	<i>Conserved hypothetical protein</i>	-8,072	5,99E-06	0,0011	-1,03	0,442	10,96	12
XCV1371	<i>Putative negative regulator of sigma E activity</i>	-3,40	0,0058	0,105	-1,040	1,058	10,87	12
<i>fur</i> ; XCV1560	<i>Ferric uptake regulator</i>	-10,89	3,11E-07	0,000142	-1,04	0,331	9,31	12
XCV3088	<i>Putative membrane protein</i>	-2,41	0,0341	0,286	-1,05	1,51	9,68	12
<i>petA</i> ; XCV2634	<i>Ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit</i>	-6,11	7,62E-05	0,00545	-1,081	0,613	9,08	12
XCV2499	<i>Putative membrane protein</i>	-6,319	5,68E-05	0,0046	-1,083	0,593	8,49	12
<i>putA</i> ; XCV4008	<i>Proline dehydrogenase</i>	-3,98	0,0021	0,0574	-1,108	0,962	8,49	12
XCV3089	<i>Putative secreted protein</i>	-3,30	0,0070	0,115	-1,129	1,184	12,18	12
XCV1100	<i>putative transcriptional regulator, XRE family</i>	-4,771	0,00057	0,0243	-1,145	0,831	9,44	12
XCV0506	<i>Putative threonine aldolase</i>	-6,861	2,72E-05	0,00274	-1,203	0,610	9,68	12
<i>flicC</i> ; XCV2022	<i>Flagellin and related hook-associated</i>	-2,292	0,042	0,320	-1,229	1,858	10,17	12

	<i>protein</i>							
Genbezeichnung	Funktion/ putative Funktion	t-Wert	p-Wert	p- adjusted	M- wert	M-sd	A-wert	n
<i>guaB</i> ; XCV2486	<i>Inosine-5'- monophosphate dehydrogenase</i>	-6,913	2,54E-05	0,0026	-1,261	0,632	11,30	12
<i>mreB</i> ; XCV0717	<i>Rod shape- determining protein</i>	-4,78	0,00056	0,0243	-1,305	0,944	9,139	12
<i>flgE</i> ; XCV2030	<i>Flagellar hook protein FlgE</i>	-6,47	4,61E-05	0,00402	-1,383	0,740	9,123	12
XCV0019; p38	<i>Putative secreted protein</i>	-5,065	0,00036	0,0175	-1,388	0,949	10,19	12
XCV0564	<i>Conserved hypothetical protein</i>	-4,55	0,00082	0,029	-1,434	1,090	9,49	12
XCV1626	<i>Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase</i>	-2,50	0,029	0,258	-1,44	1,993	8,36	12
<i>fabH</i> ; XCV1143	<i>3-oxoacyl-[acyl- carrier protein] synthase III</i>	-3,352	0,0064	0,110	-1,511	1,561	8,37	12
XCV3086	<i>Conserved hypothetical protein</i>	-7,86	7,65E-06	0,00124	-1,52	0,670	11,23	12
<i>accC</i> ; XCV0563	<i>Biotin carboxylase</i>	-3,45	0,00541	0,101	-1,568	1,573	8,988	12
XCV0102; p183	<i>Conserved hypothetical protein</i>	-6,59	3,87E-05	0,00367	-1,623	0,852	8,192	12
<i>cydA</i> ; XCV2535	<i>Cytochrome D ubiquinol oxidase, subunit II</i>	-3,34	0,00651	0,111	-1,638	1,69	7,475	12
XCV0153; p183	<i>Hypothetical protein</i>	-4,699	0,00065	0,0255	-1,79	1,324	8,34	12
XCV2276	<i>Hypothetical protein</i>	-13,69	2,96E-08	4,52E-05	-1,846	0,466	8,762	12
XCV1110	<i>Site-specific DNA- methyltransferase (cytosine-N(4)- specific)</i>	-5,422	0,000209	0,01212	-1,857	1,186	8,335	12
XCV0004; p19	<i>Hypothetical protein</i>	-10,50	4,49E-07	0,000172	-1,861	0,613	9,77	12
XCV1141	<i>Conserved hypothetical protein</i>	-5,14	0,000321	0,0164	-1,975	1,33	9,568	12
XCV2484	<i>Phage-related integrase</i>	-6,46	4,64E-05	0,00402	-2,097	1,123	8,99	12
XCV2277	<i>Putative secreted protein</i>	-11,42	1,93E-07	0,00010	-2,10	0,637	10,90	12
XCV3085	<i>TonB-dependent outer membrane receptor</i>	-5,244	0,000274	0,0148	-2,178	1,438	12,01	12
XCV0002; p19	<i>DotA/TraY family membrane protein</i>	-10,03	7,13E-07	0,00022	-2,234	0,771	10,675	12
XCV0018; p38	<i>Putative secreted protein</i>	-6,509	4,37E-05	0,0039	-2,40	1,277	9,138	12
XCV0093; p183	<i>Putative secreted protein</i>	-12,93	5,38E-08	4,52E-05	-2,53	0,679	9,96	12
XCV0874	<i>Conserved hypothetical protein</i>	-4,59	0,00076	0,0286	-2,88	2,172	10,99	12
XCV0526; <i>baf</i>	<i>bacterioferritin- associated ferredoxin</i>	-13,44	3,59E-08	4,52E-05	-2,19	0,751	8,675	12
XCV0117; p183	<i>Hypothetical protein</i>	-4,593	0,00077	0,0286	-3,348	2,525	8,067	12

Werte gefiltert nach: M-Wert > 1 bzw. < -1; p-Wert ≤ 0,05; A-Wert > 8 (außer im Fall von *cydA*); n > 7

Nachweis des c-myc-getagten AcnA- und AcnA2-Proteins aus Xcv

Die Abb. 40 zeigt das Autoradiogramm nach elektrophoretischer Auftrennung der Rohextrakte der *E. coli* - Stämme Rosetta/pBRM-AcnA2_{Xcv} und XL1/pBRM-AcnA_{Xcv}. Durch die Klonierung der Gene in den pBRM Vektor zeichnet sich das synthetisierte Protein durch einen angefügten 3 x C-my-Tag mit einer molekulare Masse von ca. 4 kDa aus, wodurch die Proteine durch die Auftrennung eine größere molekulare Masse besitzen.

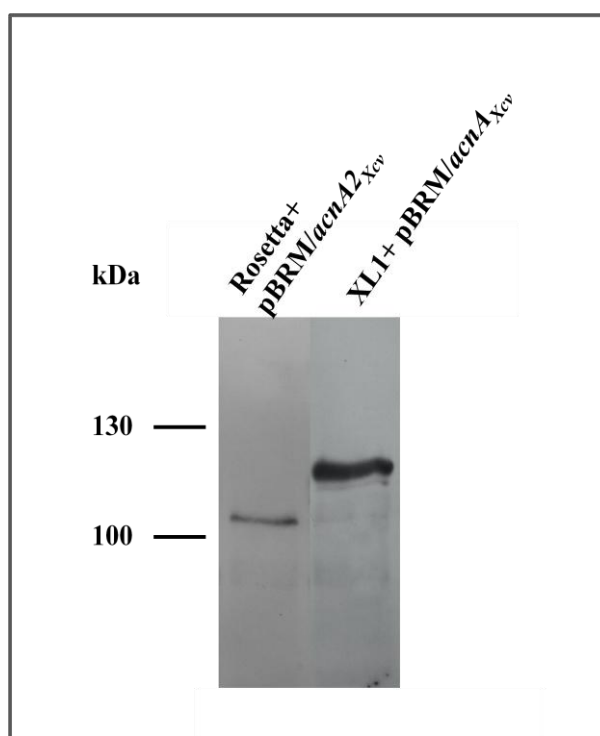


Abb. 40: Autoradiogramm zum Nachweis von C-myc-getagten AcnA und AcnA2 aus Xcv mit den Rohextrakten der *E. coli*-Stämme Rosetta+pBRM/AcnA2_{Xcv} und XL1+pBRM/AcnA_{Xcv}.

Autoradiogramm nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Rohextrakte von Rosetta+pBRM/AcnA2_{Xcv} und XL1+pBRM/AcnA_{Xcv} in einem 10 % SDS- Gel. Die Stämme wurden in LB-Medium kultiviert und bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 geerntet und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der Nachweis erfolgte mit dem Konjugat Anti-C-myc-Peroxidase (1:10000 in 1xPBS + 0,1 % Tween und 1,5 % BSA; Roche Diagnostics-Mannheim). Es wurden jeweils 40 µg Protein eingesetzt. Als Marker diente der PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)

Das AcnA Protein besitzt hier eine molekulare Masse von ca. 120 kDa während AcnA2 eine molekulare Masse von ca. 105 kDa aufweist.

Demnach müsste AcnA2 durch Berücksichtigung des myc-Tags und der Massenveränderung im Fall des AcnA Proteins eine tatsächliche molekulare Masse von ca. 98 kDa besitzen.

Eine *acnA*- sowie eine *acnA2* Mutante zeigt reduziertes Wachstum *in vitro* bei einer O₂-Limitierung im Vergleich zum Wildtyp

Die Auswirkung einer Deletion von *acnA*, sowie des Gens der dritten Aconitase, *acnA2*, sollten auf das Wachstum *in vitro* in 1 x MA-Medium untersucht werden. Hierfür wurde die Deletionsmutante *Xcv* 85-10 Δ *acnA2* konstruiert (2.10.13.2) und ihr Wachstum, zusammen mit der *acnA* Mutante, mit dem des WT und der *acnB* Mutante verglichen. In diesem Experiment wurden statt 4 ml, 6 ml MA-Medium in den Hungateröhrchen verwendet, um einen möglichen Effekt der Sauerstoff-Limitierung auf das Wachstum von *Xcv* zu analysieren. Die Ergebnisse sind in Abb. 41 graphisch dargestellt.

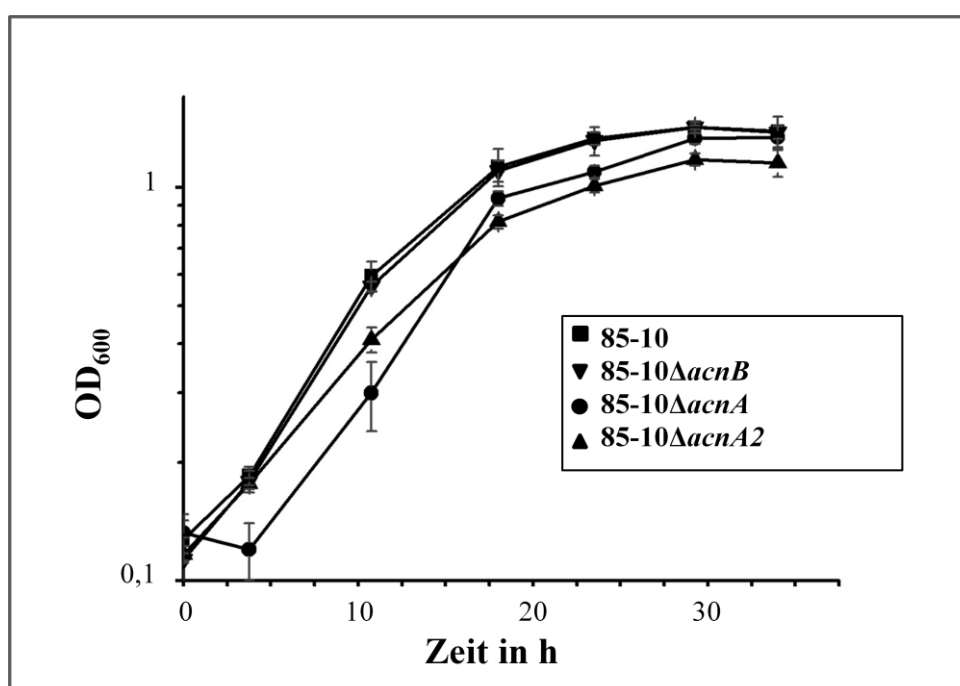


Abb. 41: Analyse des *in vitro* Wachstum in 1 x MA-Medium der *Xcv*-Stämme 85-10 Δ *acnA* und 85-10 Δ *acnA2* im Vergleich zu 85-10 und 85-10 Δ *acnB*.

Zur Analyse des Wachstums wurden Vorkulturen der *Xcv*-Stämme 85-10, 85-10 Δ *acnB*, 85-10 Δ *acnA* und 85-10 Δ *acnA2* in 1 x MA-Medium verwendet um 6 ml 1 x MA-Medium in Hungateröhrchen auf eine OD₆₀₀ = 0,1 einzustellen. Das Wachstum erfolgte bei 30 °C und wurde für ca. 34 h dokumentiert. Aus den Werten von 4 Messungen wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet.

Zur Kontrolle wurde die *Xcv* Deletionsmutante 85-10 Δ *acnB* mitgeführt, welche sich durch unverändertes Wachstum *in vitro* auszeichnet (3.7). Die *in vitro* Analyse des Wachstums in 1 x MA-Medium ergab, dass eine Deletion von *acnA2* zu reduziertem Wachstum von *Xcv* in 6 ml MA-Medium in Hungateröhrchen im Vergleich zum Wildtyp 85-10 führt. Eine *Xcv* *acnA* Deletionsmutante zeigte ebenfalls ein reduziertes Wachstum. Dieses war vor allem in exponentieller Phase zu beobachten und war noch reduzierter als im Fall der *acnA2* Deletionsmutante. Jedoch erreichte die *Xcv* Mutante 85-10 Δ *acnA* nach 34 Stunden die gleiche End-OD₆₀₀ wie der Wildtypstamm 85-10.

Im Gegensatz zu AcnB scheint AcnA2, sowie AcnA eine Rolle während des *in vitro* Wachstums zu spielen.

Während AcnA2 über den gesamten Zeitraum des Wachstums von Bedeutung zu sein scheint, besitzt AcnA hingegen hauptsächlich in der exponentiellen Wachstumsphase eine Funktion. Dies könnte bedeuten, dass AcnA2, sowie auch AcnA im Gegensatz zu AcnB eventuell an einer Sensierung von sich ändernden Bedingungen im Laufe des Wachstums beteiligt sein könnten. Hierbei könnte es sich um O₂ handeln, da das gleiche Experiment mit nur 4 ml Medium in Hungateröhrchen keine Wachstumsunterschiede der *Xcv*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp 85-10 zeigte. Eventuell ist die O₂-Versorgung in 6 ml Medium in Hungateröhrchen nicht optimal gewährleistet. Somit scheint das AcnA-Protein eine Rolle in *Xcv* zu spielen, wenn das Bakterium mit niedrigen O₂-Konzentrationen konfrontiert ist.

Die O₂-Menge während diesem Experimentes könnte in Zukunft durch den Einsatz von sogenannten "sensor spots" überprüft werden, welche an den Innenseiten der Kulturgefäße befestigt werden und den Sauerstoffgehalt messen könnten.

AS-alignment der AcnB-Proteine aus *Xcv* und *E. coli*

Domäne 5		
AcnB <i>Ecoli</i>	MLEEYRKHVAERAAEGIAPKPLDANQMAALVELLKNPPAGEEEFLDLLTNRVPPGVDEA	60
AcnB <i>Xcv</i>	MLEAYRHHVAERAAALGIPPLPLTAQQTAIEVIELLKAPPAGEEEFLVELLSQRVPAGVDDA	60
AcnB <i>Xoo</i>	MLEAYRHHVAERAAALGIPPLPLTAQQTAIEVIELLKAPPAGEEEFLVELLSQRVPAGVDDA	60
AcnB <i>Xcc</i>	MLEAYRHHVAERQALGIPPLPLTAQQTAIEVIELKNPPAGEEAFVELLSQRVPAGVDDA	60
	*** **:**** * **. * ** *: * *:**** ***** **: **: **:***.***:*	
AcnB <i>Ecoli</i>	AYVKAGFLAAIAKGEAKSPLLTPEKAIELLGTMQGGYNIHPLIDALDDAKLAPIAAKALS	120
AcnB <i>Xcv</i>	AKVKASYLAAVAFGTETTALISPTRATELLGTMGGYNIQPLIDLDDNAELGATAAEALK	120
AcnB <i>Xoo</i>	AKVKASYLAAVAFGTETKTALISPTRATELLGTMGGYNIQPLIDLDDNAELGATAAEALK	120
AcnB <i>Xcc</i>	AKVKASYLAAVAFGTETSALISPTRATELLGTMGGYNIHPLIELLDNTELGATAAEALK	120
	.::* * ..*::* *: ***** *****:***: ***::*.. **:*..	
Domäne 4		
AcnB <i>Ecoli</i>	HTLLMFDNFYDVEEKAKAGNEYAQVMQSWADAEWFLNRPALAEKLTVTVFVKVTGETNTD	180
AcnB <i>Xcv</i>	HTLLVFDAFHDVQEKAQAGNAHAKAVLQSWADAEWFTSKPEVPQSLTVTVFVKVPGETNTD	180
AcnB <i>Xoo</i>	HTLLVFDAFHDVQEKAEGNAHATSVLQSWADAEWFTSKPQVPQSLTVTVFVKVPGETNTD	180
AcnB <i>Xcc</i>	HTLLVFDAFHDVQEKAEGNAHAKAVLQSWADAEWFTSKPEVPQSMITVVFVKVPGETNTD	180
	: ** *:*::*** :. *:*****. :.* :.:*:*****.*****	
AcnB <i>Ecoli</i>	DLSPAPDAWSRPDIPLHALAMLKNAREG--IEPDQPGVVGPIKQIEALQQKGFPPLAYVGD	238
AcnB <i>Xcv</i>	DLSPAPDATTRPDIPLHALAMLKNKRDGAAFEPEEDGKRGPIQAIADLKAKGHLVAYVGD	240
AcnB <i>Xoo</i>	DLSPAPDATTRPDIPLHALAMLKNKRDGAAFEPEEDGKRGPIQAIADLKDKGHLVAYVGD	240
AcnB <i>Xcc</i>	DLSPAPDATTRPDIPLHALAMLKNAREGAAGVPEEDGKRGPIQAIADLKDKGHLVAYVGD	240
	*****. *****.*****. * * . * . * * * * * * * * * *	


```

AcnBEcoli  QARVADGATVVSTSTRNFPNRLGTGANVFLASAELAAVAALIGKLPTPEEYQTYVAQVDK 835
AcnBXcv    QAQAREGATVFSTSTRNFPNRLGRNTNVYLGSAELAAICSLRGRIPTKDEYMADVGVKT 837
AcnBXoo    QAQAREGATVFSTSTRNFPNRLGRNTNVYLGSAELAAICSLRGRIPTKDEYMADVGVKT 837
AcnBXcc    QAQAREGATVFSTSTRNFPNRLGRNTNVYLGSAELAAICSLRGRIPTKDEYMADVGVKT 837
          **:. :****.*****. :*:*.*****:.. :*:** :** : * . :..
          X
          |
AcnBEcoli  TAVDTRYLNFNQLSQYTEKADGVIFQTAV 865
AcnBXcv    SGDQIYRYMNFQIQEYQDVAETVAA---- 863
AcnBXoo    SGEQIYRYMNFQIQEYQDVAETVAA---- 863
AcnBXcc    SGEQIYRYMNFQIQEYQDVAETVAA---- 863
          :. : ***:**:*.:. : * : * :

```

Abb. 42: Vergleich der vollständigen AS-Sequenz der AcnB Proteine aus Xcv, Xoo, Xcc und E. coli.

Gezeigt ist der Vergleich der Aminosäuresequenzen von AcnB aus *X. campestris* pv. *vesicatoria* (AcnBXcv), AcnB aus *X. oryzae* pv. *oryzae* (AcnBXoo), *X. campestris* pv. *campestris* (AcnBXcc) und *E. coli* (AcnBEcoli). Die einzelnen Domänen der AcnB-Proteine sind eingezeichnet. Die drei konservierten Cysteinreste sind rot markiert (Δ). Grüne Kreuze zeigen die vier Aminosäurereste des aktiven Zentrums. Konservierte Aminosäuren sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet. Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften hinsichtlich Polarität, Ladung sowie saurer oder basischer Eigenschaften sind durch Punkte (.) und eingefügte Lücken durch (-) gekennzeichnet.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Gary Sawers für die Bereitstellung dieses interessanten Themas bedanken und für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Weiterhin möchte ich Ihm danken für sein stetiges Interesse, seine große Unterstützung, sein Verständnis sowie für die anregenden Diskussionen, Tipps und Ideen und für die Erstellung des Erstgutachtens.

Ich möchte mich weiterhin recht herzlich bei dem 2. bzw. 3. Gutachter, für die freundliche Erstellung der Gutachten, bedanken.

Fr. Dr. Barbara Thiemer gilt an dieser Stelle ebenfalls großer Dank für die Begleitung und Betreuung in den Anfängen dieser Arbeit. Ich möchte Ihr besonders für ihre Unterstützung, Tipps und der Vermittlung ihres Wissens danken.

Ein besonderer Dank gilt allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Bereichs für Mikrobiologie. Speziell den Kollegen des Labors 209 und 211 gilt großer Dank, für die gegenseitigen Wissensaustausche, das stetige Interesse, für die konstruktive Kritik sowie für die lustige Atmosphäre. Ein ganz großer Dank gilt Tina Hoppe, deren Bachelor- und Masterarbeit ich betreuen durfte. Man kann sich als Betreuer keinen besseren Studenten vorstellen. Ich möchte ihr herzlich danken für ihre unermüdliche und selbstlose Hilfe im Labor, für die tolle Zusammenarbeit, welche so oft auch ohne Worte funktionierte, für ihre Unterstützung und netten Worte an frustrierenden Tagen, für ihren Wissensdurst, Witz und ihren Fleiß und vor allem für Ihre Freundschaft.

Weiterhin möchte ich speziell Claudia Hammerschmidt danken, da sie die ganzen Jahre immer unterstützend und beruhigend zur Seite stand und man sich immer auf sie verlassen konnte. Auch bei Kinga Wesolowska möchte ich mich recht herzlich bedanken. Durch die Betreuung ihrer Arbeit und dem guten Teamwork und Diskussionen am Thema, kamen viele interessante Fragestellungen auf. Auch sorgte sie für eine entspannte Arbeitsatmosphäre sowie für lustige Begleitung zu Raucher- und Kaffeepausen.

Auch möchte ich mich besonders bei Ly, Hannes, Doreen, Claudi, Dörte, Marco, Mario und Steffi für die stetige Hilfsbereitschaft, die vielen Ideen und Ratschläge, den Informationsaustausch, die lustigen Momente sowie auch für die gute nächtliche Gesellschaft im Labor bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch Fr. Lindenstrauß für die vielen guten Tipps bei Klonierungsfragen und die Hilfe bei der Erstellung diverser Konstrukte.

Weiterhin danke ich Cornelius Schmidtke für seine Hilfsbereitschaft bei der qRT-PCR und der Hilfe bei der Datenauswertung sowie für die netten Kaffee-Gespräche.

Ich möchte mich recht herzlich bei allen Mitarbeitern der AG Bonas bedanken, für die Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit. Besonderen Dank geht an Fr. Prof. Dr. Ulla Bonas für die Möglichkeit Pflanzenexperimente durchzuführen und an Fr. Dr. Daniela Büttner für ihre stetig bereite Hilfestellung sowie für Ihre Zusammenarbeit und viele Ratschläge.

Dem SFB 648 danke ich für die finanzielle Unterstützung, die großartigen Workshops/Seminare und Konferenzen sowie die konstruktiven Tipps und Anregungen. Speziell möchte ich hierbei Herrn Prof. Dr. Dirk Scheel danken, für sein stetiges Interesse und seine Freundlichkeit. Auch gilt Lennert, Pascal, Moni, Tom, Justin, Jens und Sebastian ein Dank für die tollen und interessanten 2 Wochen in Japan.

Ein sehr großer Dank gilt auch meinen Freunden, die mir immer zu Seite stehen und an mich glauben, mich aufbauen und lieb haben. Vielen Dank auch fürs Korrekturlesen. Ich danke Chess, Ulle, Frances und Benni. Danke, dass ich immer auf euch zählen kann.

Der allergrößte Dank geht an meine Eltern und meine Familie. Ich danke euch für den Halt, die Zuversicht, dem stetigen Glauben an mich und euer Vertrauen. Ohne eure Unterstützung und Motivation wäre das alles nicht möglich gewesen. Danke, dass ihr mir dieses Studium ermöglicht habt, mir immer zur Seite steht und an mich glaubt. Danke, dass es euch gibt.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Janine Kirchberg

Adresse: Friesenstr. 26, 06112, Halle

Geburtsdatum: 14.05.1981

Geburtsort: Lutherstadt Eisleben

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Ausbildung

09/1987-07/1991 Hans-Seidel Grundschule, Lutherstadt Eisleben

08/1991-07/1993 Gymnasium Bergmannsallee, Lutherstadt Eisleben

08/1993-07/1999 Martin-Luther-Gymnasium Lutherstadt Eisleben
Abschluss: Abitur

10/1999-03/2001 Ausbildung zur Medizinisch-technischen-Laboratoriumsassistentin
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät Halle
Abschluss: Medizinisch-technische-Laboratoriumsassistentin

10/2001-12/2008 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Studium der Biologie

03/2008-12/2008 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Biologie,
Institut für Biologie/Bereich Mikrobiologie, Arbeitsgruppe von Prof. Dr.
G. Sawers, unter Betreuung von Dr. Barbara Thiemer
Diplomarbeit mit dem Thema: "Funktionelle Charakterisierung der
Aconitasen in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*"
Abschluss: Diplom Biologin

03/2009-12/2012 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie/ Bereich
Mikrobiologie; Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Sawers
Promotion mit dem Thema: "Die Rolle der Aconitasen als Fe-S-Proteine im
Citrat- und Eisenstoffwechsel des phytopathogenen Bakteriums
Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria*"

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung von angegebener Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Quellen und Zitate der benutzten Werke wurden wörtlich oder inhaltlich entnommen und die Stellen als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin versichere ich, mich mit dieser Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades zu bewerben. Es erfolgten bereits weder Publikationsversuche noch die Vorlage der Dissertation in der gegenwärtigen bzw. in einer anderen Fassung an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch einer anderen Fakultät.

Halle (Saale), den 10. 12. 2013

Janine Kirchberg

