

Untersuchungen zum epiphytisch lebenden Bakterium
Pseudomonas fluorescens Bk3
und dessen Wechselwirkungen mit der Wirtspflanze
Malus domestica cv. Holsteiner Cox

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Annabel Steinfelder

geboren am 05. August 1974, in Springe

2008

Untersuchungen zum epiphytisch lebenden Bakterium
Pseudomonas fluorescens Bk3
und dessen Wechselwirkungen mit der Wirtspflanze
Malus domestica cv. Holsteiner Cox

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Annabel Steinfelder

geboren am 05. August 1974, in Springe

2008

Referent: PD Dr. Achim E. Gau

Korreferentin: Prof. Dr. Kerstin Wydra

Tag der Disputation: 19.02.2009

Zusammenfassung

Die Mechanismen der bereits bekannten antagonistischen Wirkung des epiphytisch lebenden, nicht-pathogenen Bakteriums *Pseudomonas fluorescens* Bk3 gegen den pathogenen Pilz *Venturia inaequalis*, Erreger der Apfelschorf-Krankheit (Fiss, 2001, Kürkcüoglu, 2006), wurde in dieser Arbeit analysiert.

Bei der Untersuchung von *P. fluorescens* Bk3, hinsichtlich der Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen, wurde festgestellt, dass die Bakterien in ihrer Vermehrung durch eine extreme Lichteinstrahlung stark gehemmt werden, wobei diese Hemmung bereits durch eine leichte Abschattung aufgehoben werden konnte. Bei der Analyse der molekularbiologischen Prozesse zur Etablierung auf Pflanzenoberflächen mittels Suppression-Subtraktions-Hybridisierung wurden hauptsächlich Sequenzen mit Homologien zu ribosomaler RNA ermittelt. Die hier angewendete modifizierte Methode für Prokaryonten bedarf daher einer weiteren Optimierung, um vollständig etabliert zu werden.

Bereits im Vorfeld konnte eine extrazelluläre Esterase aus *P. fluorescens* Bk3 durch einen Aktivitäts-Test nachgewiesen werden (Singh et al, 2004), der häufig für den Nachweis von Cutinasen eingesetzt wird. Darauf basierend wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich auch bei diesem Enzym um eine Cutinase handeln könnte, welche die Cuticula hydrolysieren kann, wobei die freigesetzten Monomere als mögliche Elicitoren zur Induktion von Pflanzenantworten dienen.

Nach Etablierung einer Reinigungsmethode mit verschiedenen Säulen-Chromatographie-Schritten konnte ein Protein-Komplex von ca. 4,8 MDa, bestehend aus verschiedenen Untereinheiten von 47 kDa, 29 kDa, 17 kDa und 11 kDa aufgereinigt werden. Aus der *de novo* Sequenzierung von zwei Untereinheiten (47 kDa und 17 kDa) durch Elektronenspray-Ionisation Quadrupol Flugzeit Massen-Spektrometrie (ESI-QToF MS) wurden Sequenzhomologien zum Flagellin-Filament FliC, sowie zu den Outer Membrane Protein-Familien OmpW und OprG, Vertreter der Porine, ermittelt und nicht, wie vermutet, zu bereits bekannten Cutinasen-Sequenzen.

Die partielle Charakterisierung des Proteinkomplexes zeigte, dass das Protein über eine sehr hohe Temperatur-Stabilität verfügt. Die detektierbare Esterase-Aktivität nahm als Folge der Auftrennung des Protein-Komplexes durch Anwesenheit von Dodecyl- β -D-Maltosid bei 1 μ M um 20 % und bei 20 μ M um knapp 70 % ab. Außerdem konnte eine partielle Hemmung der Aktivität von 20 % unter Einfluss von 20 μ M Phenylmethylsulfonylfluorid und 150 μ M Diisopropylfluorophosphat erreicht werden. Die katalytische Aktivität des Enzyms konnte der 47 kDa-Untereinheit zugeordnet werden. Nach direkter Applikation des isolierten Protein-Komplexes auf Blattoberflächen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox wurde in den Pflanzen mittels Suppression-Subtraktions-Hybridisierung ein Hochregulieren von Genen analysiert (unspezifische Monooxygenase, ATPase III Untereinheit, mutmaßliche Esterase und bisher unbekannte Proteine), die auch bei anderen Organismen nach biotischem und abiotischem Stress zu finden sind. Der Protein-Komplex aus *P. fluorescens* Bk3 ist also in der Lage, innerhalb der Apfelpflanze eine Stress-Antwort auszulösen.

Schlagwörter: *Pseudomonas fluorescens* Bk3 - Flagellin Filament FliC - *Malus domestica* cv. Holsteiner Cox

Abstract

The mechanisms of the known antagonistic effect of the epiphytic living, non-pathogen bacterium *Pseudomonas fluorescens* Bk3 against the pathogenic fungus *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple-scab (Fiss, 2001, Kürkcüoğlu, 2006) was analysed in this work.

During the investigation of *P. fluorescens* Bk3 in respect of changing environmental conditions it was found that the bacteria's reproduction was heavily inhibited upon high light intensities, but the effect was decreased again by adding some light shade. The analysis of molecular biological processes after their establishing on plant leaf surfaces by suppression subtraction hybridisation showed homologies mainly to ribosomal RNA. Consequently, the already modified method used here, requires a further optimisation in order to be fully established.

Within the extracellular proteins produced by *P. fluorescens* Bk3 esterase activity has already been demonstrated (Singh et al., 2004) by means of an activity-assay that is often used for detection cutinases. Based on this it was hypothesised that the detected enzyme could be a secreted bacterial cutinase, known as a cutin hydrolysing enzyme. Thereby the released monomeres might act as elicitors for induction of plant responses.

Furthermore a method for isolating the enzyme with different steps of column chromatography was established and a protein complex with approximately 4.8 MDa could be purified containing subunits of 47 kDa, 29 kDa, 17 kDa and 11 kDa. *De novo* sequencing with electron spray ionisation quadrupole time of flight mass spectrometry (ESI-QToF MS) of two subunits showed homologies to a flagellin filament called FliC and to families of outer membrane proteins like OmpW and OprG, like porines, but not as expected to known cutinase sequences.

A partial characterisation of this protein complex revealed a high temperature stability of the protein and the lost of the detected esterase-activity as a result of separation of the protein complex in the presence of Dodecyl- β -D-Maltoside at 1 μ M of 20 % and at 20 μ M of about 70 %. An further inhibition of 20 % could be shown under the influence of Phenylmethanesulphonyl fluoride and Diisopropyl fluorophosphate. The catalytic activity could be assigned to the 47 kDa subunit of the protein complex.

After application of the isolated protein complex to the leaf surface of *M. domestica* cv. Holsteiner Cox an upregulation of genes (unspecific monooxygenase, ATPase III subunit, putative esterase and so far unknown proteins) could be detected in the plant by means of the suppression subtractive hybridisation. This reaction is comparable with regulations found in other plants challenged by abiotic and biotic stresses. Consequently the isolated protein complex of *P. fluorescens* Bk3 containing the flagellin filament FliC was shown to be able to induce a stress response in scab susceptible apple cultivars.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens* Bk3 - flagellin filament FliC - *Malus domestica* cv. Holsteiner Cox

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Die Apfel-Pflanze <i>Malus domestica</i>	1
1.1.1 <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox	2
1.1.2 Erkrankungen von <i>M. domestica</i> , Pflanzenschutz und resistente Apfelsorten	2
1.2 Ökosystem Phyllosphäre	5
1.3 Pseudomonadaceae	6
1.3.1 Pathogene und nicht-pathogene Wechselwirkungen zwischen Mikro-Organismen und Wirts-Organismen	8
1.3.2 <i>Pseudomonas fluorescens</i> Bk3	12
1.4 Mikrobielle Sekretionsmechanismen	13
1.5 Ziele dieser Arbeit	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Bakterienstamm und Anzuchtbedingungen	17
2.2 Photometrische Konzentrations-Bestimmung von Bakterien-Suspensionen	17
2.3 Verwendete Apfel-Pflanzen und ihre Anzuchtbedingungen	17
2.4 Quantitative Proteinbestimmung	18
2.5 Enzymatischer Esterase-Aktivitäts-Nachweis	19
2.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit Tris-Tricin für Proteine	20
2.7 Visualisierung der Proteine in der PAGE	21
2.7.1 Silber-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	21
2.7.2 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gele	22
2.7.3 Coomassie-Colloidal-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	22
2.8 Aktivitätsfärbung von renaturierten Proteinen nach SDS-PAGE	23
2.9 Dialyse	23
2.10 Ammonium-Sulfat-Fällung	24
2.11 Chromatographie	24
2.11.1 Ionenaustauschchromatographie	24
2.11.2 Ausschlusschromatographie	25
2.12 Einfluss verschiedener Lichtintensitäten auf <i>P. fluorescens</i> Bk3	26
2.13 Bestimmung von Aminosäure-Sequenzen aus isolierten Proteinen	27
2.14 Inokulieren von <i>in vitro</i> -Pflanzen (<i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox)	29
2.14.1 Inokulieren mit <i>P. fluorescens</i> Bk3	29

Inhaltsverzeichnis

2.14.2 Inokulieren mit dem isolierten Protein-Komplex	29
2.15 Isolierung von Apoplastenflüssigkeit	30
2.16 Isolierung von Gesamt-RNA	30
2.16.1 Isolierung aus Pflanzenmaterial	30
2.16.2 Isolierung aus Bakterien-Zellen	31
2.16.2.1 Isolierung durch NucleoSpin® RNA II	32
2.16.2.2 Isolierung durch Phenol-Chloroform-Extraktion	32
2.17 RNA-Gelelektrophorese	34
2.18 Isolierung von DNA	35
2.18.1 Isolierung von Plasmiden durch alkalische Lyse (HB-Lyse)	35
2.18.2 Isolierung von Plasmiden durch GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	36
2.19 DNA-Gelelektrophorese	37
2.20 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	38
2.21 Entfernen von ribosomaler RNA aus prokaryontischer Gesamt-RNA	38
2.22 Poly(A)-Tailing an prokaryontische RNA	39
2.23 Aufreinigung der Poly(A)-RNA mit Oligo(dT)-Cellulose-Partikeln	40
2.24 Transkription von RNA in cDNA	41
2.24.1 Transkription durch Verwendung der Reversen Transkriptase	41
2.24.2 Transkription durch Verwendung des High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix und anschließender Doppelstrang-Synthese mit PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	42
2.24.3 Transkription durch SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit	44
2.25 Supression-Subtraktions-Hybridisierung (SSH)	48
2.25.1 <i>Rsa</i> I-Spaltung der cDNA	50
2.25.2 Aufreinigung der gespaltenen cDNA	50
2.25.2.1 nach Transkription der cDNA durch High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix	51
2.25.2.2 nach Transkription der cDNA durch SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit	52
2.25.3 Adaptor-Ligation der cDNA der tester-Population	53
2.25.4 Erste Hybridisierung	54
2.25.5 Zweite Hybridisierung	55
2.25.6 PCR-Amplifizierung der nicht hybridisierten tester-cDNA	55
2.26 Klonierung in pGEM®-T Vector	57
2.27 Transformation in <i>E. coli</i> Top10	58
2.27.1 Herstellung kompetenter Bakterien-Zellen	59
2.27.2 Durchführung der Hitze-Schock-Transformation	59
2.28 Blau-Weiß-Selektion	60
2.29 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	60
2.29.1 Herstellung der <i>Taq</i> -Polymerase	61
2.29.2 Kolonie-PCR	62
2.29.3 Semiquantitative RT-PCR mit ausgewählten Transkripten	63
2.30 Restriktions-Enzymspaltung	65
2.31 Dot Blot-Hybridisierung	65
2.31.1 Herstellung der radioaktiv markierten Sonde	66
2.31.1.1 Isolierung genomischer DNA	66

Inhaltsverzeichnis

2.31.1.2 Herstellung der Sonde	67
2.31.2 Durchführung der Hybridisierung und bildliche Darstellung	70
2.32 DNA-Sequenzierung der identifizierten Klone	71
2.32.1 DNA-Sequenzierung von Plasmid-Präparationen	71
2.32.2 DNA-Sequenzierung aus Bakterien-Kolonien	71
2.33 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>P. fluorescens</i> Bk3	71
3. Ergebnisse	72
3.1 Aufreinigung der extrazelluläre Esterase aus <i>P. fluorescens</i> Bk3	72
3.2 Sequenzierung der Protein-Untereinheiten durch ESI-QToF MS	79
3.3 Aktivitäts-Test von renaturierten Proteinen nach SDS-PAGE	83
3.4 Partielle Charakterisierung des gereinigten Proteins	84
3.4.1 Größenbestimmung des Protein-Komplexes	84
3.4.2 Hemmung der enzymatischen Aktivität	89
3.4.3 Temperatur-Stabilität	92
3.4.4 pH-Optimum	93
3.4.5 Substratabhängigkeit	94
3.5 Esterase-Aktivität verschiedener Flagellinhaltiger Bakterien	97
3.6 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Lichtintensitäten auf das Wachstum von <i>P. fluorescens</i> Bk3	98
3.7 Supression-Subtraktions-Hybridisierung mit RNA aus Bakterienpopulationen von <i>P. fluorescens</i> Bk3 aus unterschiedlicher Anzucht	103
3.7.1 Isolierung von prokaryontischer RNA mit unterschiedlichen Methoden	104
3.7.2 Entfernen der ribosomalen RNA aus prokaryontischer Gesamt-RNA	105
3.7.3 Polyadenylierung der prokaryontischen mRNA	106
3.7.4 Reverse Transkription der RNA in cDNA	107
3.7.4.1 Transkription durch LD-PCR mit SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit	107
3.7.4.2 Reverse Transkription mittels High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix und anschließender Doppelstrang-Synthese mit PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	108
3.7.5 SSH von <i>P. fluorescens</i> Bk3 aus Flüssig-Kultur und reisoliert von der Blattoberfläche von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox	109
3.7.5.1 Kolonie-PCR	111
3.7.5.2 Alkalische Lyse einiger SSH-Klone	113
3.7.5.3 PCR und Restriktionsenzym-Spaltung zur Kontrolle der isolierten Plasmide ...	114
3.7.5.4 Dot Blot-Hybridisierung	115
3.7.5.5 Sequenzanalyse	117
3.8 Einfluss des isolierten Protein-Komplexes aus <i>P. fluorescens</i> Bk3 nach Applikation auf <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox	118
3.8.1 Analyse der Apoplastenflüssigkeit von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox	118
3.8.2 Semiquantitative Analyse von ausgewählten Transkripten von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox	121
3.8.3 SSH von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox	123
3.8.3.1 Kolonie-PCR der erhaltenen SSH-Klone	123
3.8.3.2 Plasmide der isolierten Klone nach SSH	124
3.8.3.3 Restriktionsenzym-Spaltung der Plasmide nach SSH	125
3.8.3.4 Sequenzanalyse der erhaltenen Klone nach SSH	125
3.9 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>P. fluorescens</i> Bk3	128

Inhaltsverzeichnis

4. Diskussion	131
4.1 Isolierung und Charakterisierung einer extrazellulären Esterase von <i>P. fluorescens</i> Bk3	132
4.2 Analysen zur Reaktion der Wirtspflanze <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox auf den isolierten Protein-Komplex von <i>P. fluorescens</i> Bk3	136
4.3 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>P. fluorescens</i> Bk3 auf der Blattoberfläche von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox	140
4.4 Untersuchungen zur Anpassung von <i>P. fluorescens</i> Bk3 auf Lebensraumveränderungen	141
4.4.1 Kultivierung von <i>P. fluorescens</i> Bk3 unter verschiedenen Lichtbedingungen	141
4.4.2 Transkriptom-Analysen nach Etablierung von <i>P. fluorescens</i> Bk3 auf pflanzlicher Cuticula im Vergleich zur Kultivierung in Vollmedium	143
4.5 Ausblick	145
5. Literatur	148
6. Anhang	159
Primer-Liste	159

Abbildungen

Abb. 1.1	Darstellung der Pflanzen und Früchte von <i>M. sylvestris</i> und <i>M. domestica</i>	1
Abb. 1.2	Strukturübersicht des Flagellums bei Bakterien.....	7
Abb. 1.3	Schematischer Vergleich der beiden Resistenz-Mechanismen ISR und SAR.....	9
Abb. 1.4	Modelldarstellung der möglichen Schritte innerhalb einer hypersensitive response (HR).....	11
Abb. 1.5	Schematische Darstellung des Typ III Sekretions-Systems bei verschiedenen Organismen.....	15
Abb. 2.1	Sterile <i>in vitro</i> Pflanzen von <i>Malus domestica</i> cv. Holsteiner Cox.....	18
Abb. 2.2	Schematische Darstellung der Supression-Subtraktions-Hybridisierung (SSH).....	49
Abb. 2.3	Vector-Karte von pGEM-T [®] (Promega).....	57
Abb. 3.1	Prozentuale Verteilung der Esterase-Aktivität in den einzelnen Fraktionen der Ammonium-Sulfat-Fällung innerhalb der Proteinreinigung.....	73
Abb. 3.2	Prozentuale Verteilung der Esterase-Aktivität im Durchlauf der DEAE-Sephacel-Säule (pH 8,0) innerhalb der Proteinreinigung.....	74
Abb. 3.3	Darstellung der Proteinkonzentration und Esterase-Aktivität innerhalb des Elutionsverlaufs nach Säulenchromatographie (DEAE-Sephacel, pH 11,0) innerhalb der Proteinreinigung.....	75
Abb. 3.4	Chromatographie-Diagramm des gereinigten Enzyms während der Gelfiltration (Superose 12 Säule) innerhalb des Reinigungsverfahrens.....	75
Abb. 3.5	Zusammenfassendes Flussdiagramm der Protein-Reinigung.....	76
Abb. 3.6	Tris-Tricin-PAGE der Esterase-Reinigung.....	78
Abb. 3.7	Eichgerade des Markers SeeBlue [®] Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen).....	78
Abb. 3.8	SDS-PAGE mit Tris-Tricin für Protein-Sequenzierung.....	79
Abb. 3.9	Darstellung des Übersichtsspektrogramm MS-, und der <i>de novo</i> -Abfolge...	80
Abb. 3.10	Aktivitäts-Färbung einer SDS-PAGE mit Tris-Tricin nach Renaturierung der Proteine.....	83
Abb. 3.11	Eichgerade zur Gelfiltration (Superose 12-Säule).....	85
Abb. 3.12	Diagramm zur Gelfiltration des isolierten Protein-Komplexes.....	86
Abb. 3.13	Diagramme zur Gelfiltration des Protein-Komplexes unter Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an Dodecyl- β -D-Maltosid.....	87
Abb. 3.14	Eichgerade zur Gelfiltration (Superose 12-Säule) unter Anwesenheit von Dodecyl- β -D-Maltosid.....	87
Abb. 3.15	Analysen zum Hemmverhalten der Esterase nach Zugabe von PMSF, AEBSF und DFP.....	91

Abbildungen und Tabellen

Abb. 3.16	Einfluss von Dodecyl- β -D-Maltosid auf die Esterase-Aktivität.....	92
Abb. 3.17	Analyse zur Temperatur-Stabilität.....	92
Abb. 3.18	Spezifische Esterase-Aktivität in Abhängigkeit verschiedener pH-Stufen....	93
Abb. 3.19	Sättigungs-Kurve der Esterase mit steigender Substrat-Konzentration, Michaelis-Menten-Kinetik.....	94
Abb. 3.20	Lineweaver-Burk-Diagramm nach Analyse der Substratabhängigkeit.....	96
Abb. 3.21	Graphische Darstellung der Esterase-Aktivität in Wachstums-Überständen verschiedener flagellinhaltiger Bakterien-Stämme.....	98
Abb. 3.22	Zellkonzentration und Esterase-Aktivität nach Kultivierung von <i>P. fluorescens</i> Bk3 unter verschiedenen Lichtbedingungen.....	99
Abb. 3.23	Zellkonzentration und Esterase-Aktivität nach Kultivierung von <i>P. fluorescens</i> Bk3 unter Starklicht im zeitlichen Verlauf.....	100
Abb. 3.24	Zellkonzentration und Esterase-Aktivität nach Kultivierung von <i>P. fluorescens</i> Bk3 unter verschiedenen Lichtbedingungen im zeitlichen Verlauf.....	102
Abb. 3.25	Übersichtsdiagramm zur Vorbereitung der prokaryontischen RNA zum Einsatz in die SSH.....	103
Abb. 3.26	Isolierung prokaryontischer Gesamt-RNA.....	104
Abb. 3.27	Agarose-Gel zur Kontrolle nach Entfernen der ribosomalen 16S- bzw. 23S-rRNA.....	105
Abb. 3.28	Agarosegel zur Ermittlung der optimalen Zyklenzahl zur PCR innerhalb der cDNA-Synthese (SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit, Clontech Laboratories).....	107
Abb. 3.29	Kontroll-PCR nach cDNA-Synthese mittels High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems).....	108
Abb. 3.30	Agarosegel zur Kontrolle der Restriktions-Enzymspaltung mit <i>RsaI</i>	109
Abb. 3.31	Agarosegel zur Kontrolle der PCR nach SSH von <i>P. fluorescens</i> Bk3.....	110
Abb. 3.32	Darstellung der PCR-Produkte nach Kolonie-PCR der erhaltenen Klone aus der SSH von <i>P. fluorescens</i> Bk3 (Klone 1-1 bis 1-181).....	112
Abb. 3.33	Darstellung der PCR-Produkte nach Kolonie-PCR der erhaltenen Klone aus der SSH von <i>P. fluorescens</i> Bk3 (Klone 3-1 bis 3-48).....	112
Abb. 3.34	Darstellung der PCR-Produkte nach Kolonie-PCR der erhaltenen Klone aus der SSH von <i>P. fluorescens</i> Bk3 (Klone 4-1 bis 4-49).....	113
Abb. 3.35	Darstellung der isolierten Plasmide der erhaltenen Klone aus der SSH von <i>P. fluorescens</i> Bk3 (Klone 6-1 bis 6-113).....	113
Abb. 3.36	Darstellung der PCR-Produkte nach Kontroll-PCR der erhaltenen Klone aus der SSH von <i>P. fluorescens</i> Bk3 (Klone 6-1 bis 6-24).....	114
Abb. 3.37	Darstellung der Spaltprodukte nach Restriktions-Enzymspaltung (mit <i>SacI</i> und <i>NcoI</i>) der erhaltenen Klone aus der SSH von <i>P. fluorescens</i> Bk3 (Klone 6-1 bis 6-24).....	114
Abb. 3.38	Agarosegel der Amplifikate für die 16S-rRNA zur Herstellung der Sonde für die Dot Blot-Hybridisierung.....	115

Abbildungen und Tabellen

Abb. 3.39	Darstellung der Dot Blot-Membranen nach Hybridisierung mit Fragmenten der 16S-rRNA aus <i>P. fluorescens</i>	116
Abb. 3.40	SDS-PAGE mit Tris-Tricin der isolierten Apoplastenflüssigkeit aus <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox nach Behandlung mit dem isolierten Protein-Komplex aus <i>P. fluorescens</i> Bk3 und Darstellung der Banden-Intensität.....	119
Abb. 3.41	Eichgerade basierend auf den Standard-Proteinen aus der SDS-PAGE mit Tris-Tricin der isolierten Apoplastenflüssigkeit aus <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox nach Behandlung mit dem isolierten Protein-Komplex aus <i>P. fluorescens</i> Bk3.....	120
Abb. 3.42	Darstellung der semiquantitativen Analyse von ausgewählten Transkripten aus <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox nach Behandlung mit dem isolierten Protein-Komplex aus <i>P. fluorescens</i> Bk3.....	122
Abb. 3.43	Agarosegel zur Kontrolle der PCR nach SSH von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox.....	123
Abb. 3.44	Darstellung der PCR-Produkte der erhaltenen Klone aus der SSH von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox (Klone 2-1 bis 2-47).....	124
Abb. 3.45	Darstellung der isolierten Plasmide der erhaltenen Klone aus der SSH von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox (Klone 7-1 bis 7-69).....	124
Abb. 3.46	Darstellung der Spaltprodukte nach Restriktions-Enzymspaltung der erhaltenen Klone aus der SSH von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox (Klone 7-1 bis 7-69).....	125
Abb. 3.47	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>P. fluorescens</i> Bk3 auf <i>in vitro</i> -Pflanzen von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox (Aufsicht) nach Fixierung.....	128
Abb. 3.48	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>P. fluorescens</i> Bk3 auf <i>in vitro</i> -Pflanzen von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox (Aufsicht) nativ.....	129
Abb. 3.49	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>P. fluorescens</i> Bk3 auf <i>in vitro</i> -Pflanzen von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox (Querschnitt).....	130
Abb. 4.1	Zusammenfassung der Schritte innerhalb der Protein-Biosynthese bei Eukaryonten und Prokaryonten.....	144

Tabellen

Tab. 1.1	Familien der PR-Proteine.....	10
Tab. 2.1	Standardproteine zur Kalibrierung der Gelfiltrationssäule.....	26
Tab. 2.2	Verwendete Primer für RT-PCR mit <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox.....	64
Tab. 3.1	Reinigungstabelle des isolierten Proteins mit Esterase-Aktivität.....	77
Tab. 3.2	<i>De novo</i> -Sequenzierung und Homologiensuche von den trypsin-behandelten Fragmenten des gereinigten Protein-Komplexes.....	81
Tab. 3.3	Eichproteine für die Kalibrierung der Gelfiltrations-Säule (Superose 12).....	84
Tab. 3.4	R _F -Werte und errechnete molare Massen der erhaltenen Peaks des Protein-Komplexes unter Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an Dodecyl-β-D-Maltosid nach Gelfiltration (Superose 12-Säule).....	88
Tab. 3.5	Eingesetzte Salzverbindungen zur Untersuchung des Hemmverhaltens der Enzym-Aktivität.....	89
Tab. 3.6	Zusammenfassung der ermittelten Esterase-Aktivitäten unter Anwesenheit verschiedener Salze.....	90
Tab. 3.7	Verwendete Bakterienstämme zur Analyse von Esterase-Aktivität im Wachstums-Überstand als Resultat aus vorhandenem Flagellin.....	97
Tab. 3.8	Auflistung der erhaltenen Klone, die nach der Dot Blot-Hybridisierung als negativ identifiziert wurden.....	117
Tab. 3.9	Ergebnisse der Sequenzanalyse nach Sequenzierung der erhaltenen Klone nach SSH mit <i>P. fluorescens</i> Bk3.....	118
Tab. 3.10	Zusammenfassung der erhaltenen Daten aus der Apoplastenflüssigkeit von <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox nach Behandlung mit dem isolierten Protein-Komplex aus <i>P. fluorescens</i> Bk3.....	120
Tab. 3.11	Ergebnisse der Identifizierung verschiedener Klone nach SSH mit <i>M. domestica</i> cv. Holsteiner Cox nach Sequenzierung.....	126

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ACN	Azetonitril
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzonsulfonylfluorid
<i>A. Iwoffii</i>	<i>Acinetobacter Iwoffii</i>
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
β-DM	Dodecyl-β-D-Maltosid
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Kalzium-Chlorid
C-Atome	Kohlenstoff-Atome
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
C ₂ H ₃ NO ₂	Natrium-Azetat
CI	Chloroform-Isoamylalkohol
cm	Zentimeter
CoCl ₂	Cobalt-Chlorid
cv.	Cultivar
CW	Zellwand der Pflanzenzelle
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
DEAE	Diethylaminoethylgruppen
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphaten
DTT	Dithiothreitol
<i>E. amylovora</i>	<i>Erwinia amylovora</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylindiamintetraessigsäure
EM	eukaryontische Zellmembran
ESI QToF MS	Elektronenspray-Ionisation Quadrupol Flugzeit

Abkürzungsverzeichnis

	Massenspektrometrie
EST	expressed sequence tag
et al.	und andere
€	Euro
FAO	Food and agriculture organisation
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gramm
x g	multipliziert mit Fallbeschleunigung (9,81 m x s ⁻²)
GFC	Gelfiltrationschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
ha	Hektar
HCl	Chlor-Wasserstoff
HR	Hypersensitive Response
hrp	Hypersensitive Response and Pathogenicity Genes
IM	Innere Zellmembran
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ISR	Induzierte systemische Resistenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Lysogeny Broth Medium
LiCl	Lithium-Chlorid
Lsg.	Lösung
M	Molarität
m ²	Quadratmeter
mA	Milliampere
<i>M. baccata</i>	<i>Malus baccata</i>
MBq	Megabecquerel
MCS	Multiple Cloning Site
MDa	Megadalton
<i>M. domestica</i>	<i>Malus domestica</i>
<i>M. floribunda</i>	<i>Malus floribunda</i>
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MgCl	Magnesium-Chlorid

Abkürzungsverzeichnis

MgSO ₄	Magnesium-Sulfat
min.	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
µm	Mikrometer
MMLV	Moloney-Murine-Leukemia-Virus
µmol	Mikromol
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
<i>M. sylvestris</i>	<i>Malus sylvestris</i>
NaBr	Natrium-Bromid
NaCl	Natrium-Chlorid
NaF	Natrium-Fluorid
NH ₄ Cl	Ammonium-Chlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaI	Natrium-Iodid
NaNO ₃	Natrium-Nitrat
NaOH	Natrium-Hydroxid
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OM	äußere Zellmembran
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>P. avenae</i>	<i>Pseudomonas avenae</i>
PBS-Puffer	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
pg	Pikogramm
PL	Peptidoglykan-Schicht
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
PR-Proteine	Pathogenesis-Related-Proteins
<i>P. saccharophila</i>	<i>Pseudomonas saccharophila</i>
PSI	Pfund pro Quadratzoll (Pound-force per square inch)

Abkürzungsverzeichnis

<i>P. syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
PVP	Polyvenylpyrrolidin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RSA	Rinderserum-Albumin
<i>R. solanacearum</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>
<i>R. solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAR	Systemisch erworbene Resistenz
<i>S. diastatochromogenes</i>	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>
<i>S. scabies</i>	<i>Streptomyces scabies</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	Super Optimal Broth-Medium mit dem Zusatz an Glucose
SSC-Puffer	Natrium-Zitrat-Natrium-Chlorid-Puffer
SSH	Supression-Subtraktions-Hybridisierung
SSPE	Natrium-Chlorid-Natriumdihydrogenphosphat-EDTA-Puffer
STET-Puffer	Saccharose-Tris-EDTA-Triton-Puffer
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Natrium-Azetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TNE-Puffer	Tris-Natrium-Chlorid-EDTA-Puffer
TNEDT-Puffer	Tris-Natrium-Chlorid-EDTA-DTT-Triton-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTSS	Typ III Sekretions-System
U	unit
UV	ultraviolett
<i>V. inaequalis</i>	<i>Venturia inaequalis</i>
vs.	gegen, gegenüber gestellt
<i>X. campestris</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

1. Einleitung

1.1 Die Apfel-Pflanze *Malus domestica*

Der Apfel genießt als eine der beliebtesten Früchte einen hohen Bekanntheitsgrad. So wurden im Jahre 2006 mehr als 63 Mio. Tonnen Äpfel weltweit produziert, davon 55 % in Asien, 22 % in Europa und 15 % in Amerika (World Apple Review, Belrose Inc, 2007).

Systematisch eingeordnet gehört er in die Klasse der Dicotylen (Rosopsida), zur Unterklasse der Rosenähnlichen (Rosidae), in die Ordnung der Rosenartigen (Rosales), hier zur Familie der Rosengewächse (Rosaceae) und dort zu den Kernobstgewächsen (Pyrinae). Erstmals botanisch beschrieben wurde er von Philip Miller (1691 - 1771), einem englischen Gärtner und Botaniker.

Durch Befunde belegt, haben bereits die Menschen in der Steinzeit den Holzapfel (*M. sylvestris*) verzehrt, obwohl dieser seinen Namen aufgrund des wenig schmackhaften, sowie holzigen Fruchtfleisches trägt (Kremer, 2001). Neben der Entstehung des Kulturapfels *Malus domestica*, der durch das Einkreuzen mit *Malus pumila* (Zwergapfel) aus Asien hervorging, kam es am Ende des 18. Jahrhunderts durch die Bildung von Hybriden zwischen *M. sylvestris* und *M. baccata* (Beerenapfel) zur Entstehung des Zierapfels (Kreuzer, 1997). Für die morphologische Unterscheidung zwischen *M. sylvestris* und *M. domestica* sind in Abb. 1.1 schematische Zeichnungen beider Arten zu sehen.

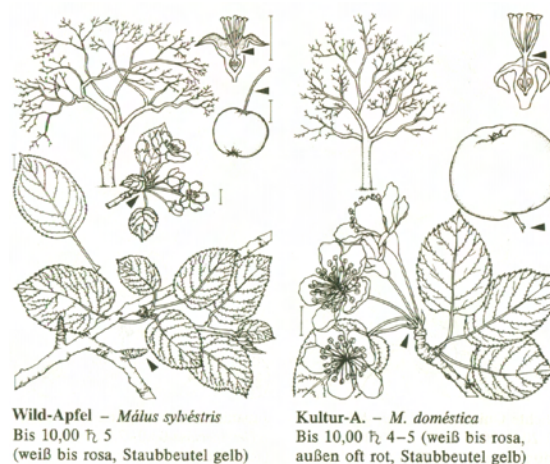


Abb. 1.1 Darstellung der Pflanzen und Früchte von *M. sylvestris* und *M. domestica* mit Unterschieden in der Größe und Form des Blütenstandes, der Stiel-Länge der Frucht, der Blütengröße und der Beschaffenheit der Zweige mit Dornen bei *M. sylvestris* und ohne Dornen bei *M. domestica*. (entnommen aus Rothmaler, 2000)

Einleitung

Die Entstehung neuer Apfelsorten erfolgt heute auf unterschiedlichen Wegen. Zum einen kommt es nach wie vor zur traditionellen Züchtung. Auf der anderen Seite werden künstliche Mutationen verursacht, die durch Anwendung radioaktiver oder ultravioletter (UV) Strahlung, aber auch durch den Einsatz chemischer Lösungen ausgelöst werden. Ziel der Erzeugung neuer Apfelsorten ist dabei eine Verbesserung des Aromas, des Aussehens, aber auch eine Weiterentwicklung hinsichtlich der Widerstandsfähigkeit und der Toleranz gegenüber biotischen und abiotischen Umweltbedingungen (Kreuzer, 1997).

Äpfel gehörten den wichtigsten Nahrungsmitteln, dienten sie doch zu Zeiten vor der Globalisierung in kühleren Regionen während der Wintermonate als frisches Obst und Vitaminquelle aufgrund ihrer Lagerfähigkeit und Haltbarkeit. Heute gibt es schätzungsweise um die 20000 verschiedene Sorten, die sich nicht nur geschmacklich voneinander unterscheiden, sondern auch farblich, in der Konsistenz des Fruchtfleisches, in den Ernte- und Genusszeiten und ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber äußeren Einflüssen (Bickel-Sandkötter, 2003).

1.1.1 *M. domestica* cv. Holsteiner Cox

Durch die Aussaat von Sämlingen der Sorte Cox's Orangenrenette entstand das Cultivar Holsteiner Cox und geht zurück auf Lehrer Vahldiek in Eutin (Holstein) im Jahre 1920. Die Äpfel zeichnen sich aus durch ihre mittlere Größe, die gleichmäßig runde Form, mit einer grünlich-gelben Schale, die zur Sonnenseite hin leuchtend rot werden kann. Die Pflückreife ist normalerweise ab Mitte September. Seine Genussreife erreicht er ab Oktober (Kreuzer, 1997). Holsteiner Cox gilt als anfällig gegenüber der Schorf-Krankheit, verursacht durch den mykotischen Erreger *Venturia inaequalis*.

1.1.2 Erkrankungen von *M. domestica*, Pflanzenschutz und resistente Apfelsorten

Verschiedene Krankheiten sind an Apfelbäumen bekannt, wovon vier, ausgehend von mikrobiellen Pathogenen, im Vordergrund stehen. Dazu gehört beispielsweise der Echte Mehltau, der von *Podosphaera leucotricha* ausgelöst wird (Xu et al., 1995). Es handelt sich hierbei um einen Schlauchpilz der Familie der Erysiphaceae, der nach Befall seiner Wirtspflanze oberflächlich auf ihr wächst und dabei einen weißen Flaum verursacht.

Einleitung

Dem gegenüber steht der Befall mit *Nectria galligena*, einem Pilz, der zu den Pustelpilzen gehört (Ng und Roberts, 1974). Bei Befall der Bäume mit diesem Pilz kommt es zu Rissen in der Rinde, auf denen sich im weiteren Jahresverlauf eine Wucherung bildet. Dieses Bild gibt der Krankheit den Namen Baumkrebs. Bereits große und ältere Bäume können mit dieser Erkrankung gut leben, während bei kleineren Bäumen oder Ästen die Möglichkeit des Absterbens besteht.

Eine weitere wichtige Krankheit bei Apfelpflanzen ist der Schorf, verursacht durch *Venturia inaequalis* (Boone, 1971). Auch hier handelt es sich um einen Pilz, bei dem sowohl die Blüten, als auch die Blätter und Früchte befallen werden können. Es kommt zur Nekrosenbildung, die im Falle befallener Blüten zu einer schlechteren Ausgangssituation für bevorstehende Befruchtungen führt, bei befallenen Früchten zu einer frühzeitigen Fäulnisbildung, wodurch die Äpfel die Fähigkeit ihrer Haltbarkeit und Lagerfähigkeit verlieren.

Außerdem ein wichtiger Vertreter der Erkrankungen an Apfelbäumen ist der Feuerbrand, ausgelöst durch das Bakterium *Erwinia amylovora* (Schroth et al., 1974). Hier kommt es erst zum Absterben befallener Pflanzenteile, im Folgenden zum Absterben des gesamten Baumes. Die Krankheit gilt als hochgradig ansteckend.

Um Erkrankungen an Apfelpflanzen und damit hohen Einbußen der Apfelbauern beim Ertrag zu umgehen, werden verschiedene Strategien verfolgt. So kommt es häufig zum Einsatz von Pestiziden, durch die den Krankheiten vorgebeugt werden soll. Bereits im Jahre 2001 (FAO, 2001) waren 70000 Pestizide auf dem Markt erhältlich. Mit ihrem Einsatz ist allerdings ein erhöhtes Risiko verbunden, sowohl an Resistenzbildungen bei den Pathogenen, als auch an Umweltbelastungen durch Rückstände im Boden und in den Pflanzen und nicht zuletzt Früchten.

Von insgesamt 1058 Pflanzenschutzmitteln sind derzeit in Deutschland laut Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 358 Pflanzenschutzmittel für den Obstbau zugelassen, davon 273 für die Apfelproduktion und 34 speziell gegen Apfelschorf (Stand: 12. September 2008). Je nach angewendetem Mittel müssen zwischen 3 und 14 Spritzungen pro Jahr durchgeführt werden. Dabei gibt es eine Vielzahl von Wirkstoffen, wie Schwefel (Hemmung der Sporenkeimung), Myclobutanil (Hemmung der Sterol-Biosynthese), Cyprodinil (Hemmung der Methionin-Synthese), Kupferoktanoat (Enzymgift, Verhinderung der Sporenkeimung), Dithianon (vorbeugende Wirkung gegen Sporenkeimung und bereits vorhandenen Keimschlauch), Mancozeb (Fungizid), Kresoxim-methyl (Enzymhemmung innerhalb des pilzlichen Stoffwechsels/Atmungskette), Trifloxystrobin (Enzymhemmung innerhalb des pilzlichen Stoffwechsels/Atmungskette), Captan (Verhinderung von Sporenkeimung und Mycelbildung), Pyrimethanil (Fungizid), Fluquinconazol (Demethylase-Inhibitor), Dodin (Fungizid) und das Bakterium *Bacillus subtilis* Stamm QST 713 (Fungizid). Dabei variiert der finanzielle

Einleitung

Aufwand entsprechend dem Angebot an Pflanzenschutzmitteln. Im Durchschnitt kann man derzeit pro Jahr mit Kosten von ca. 80 € / ha und m Kronenhöhe rechnen (errechnet anhand der Daten von fünf verschiedenen Mitteln nach Auskunft von „agravis Raiffeisen AG“).

Eine andere Möglichkeit zur Umgehung von Krankheiten ist die natürliche Resistenz bei Pflanzen, die in manchen bereits besteht, und die durch Züchtungen, wie bereits erwähnt, weiter voran getrieben wird. So hat sich das Institut für Obstzüchtung der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen in Dresden-Pillnitz auf die Züchtung von Apfelpflanzen spezialisiert, und erzeugt auch resistente Apfelsorten. Man geht hier zwei verschiedenen Zielrichtungen nach:

1) Die Züchtung von Apfelsorten ohne Resistenzgene, jedoch zur Verbesserung und Ergänzung herkömmlicher Apfelsorten entstammen aus dem Programm der Pi-Serie (Fischer und Fischer, 2002).

2) Die Züchtung gezielter Resistenzgene gegen verschiedene Pathogene, so wie es bei den Re-Sorten® (Resistenz), wie beispielsweise Reballa, Reka, Remo und Rewena der Fall ist (Fischer und Fischer, 2002). Diese neuen Re-Sorten® sollen den Einsatz von Fungiziden um bis zu 80 % herabsetzen (Fischer und Fischer, 1999). Die Resistenz beruht auf der Anwesenheit von Resistenzloci, die der Ursprung einer natürlichen Resistenz waren, und im Laufe der Zeit durch die Züchtung mit Zielen wie Verbesserung in Größe, Geschmack und Aussehen, verloren gingen. Bekannt sind verschiedene Genloci unterschiedlicher Herkunft, wie V_f , V_a , V_b , V_{bj} , V_r und V_m , von denen der V_r -Locus, welches aus *M. floribunda* stammt, eine Resistenz gegen *V. inaequalis* bewirkt und am weitesten verbreitet ist (Williams und Kuc, 1969). Vinatzer et al. (2001) konnte die Natur des V_r -Locus aufklären, wobei die Gene für eine Leucin-reiche Domäne und eine Transmembran-Domäne kodieren.

Allerdings konnte auch hier schon 1984 ein Durchbrechen der Resistenz beobachtet werden, wie Parisi et al. (1993) beschreibt. Während an *M. floribunda* noch eine Resistenz zu erkennen war, konnte an *M. domestica* cv. Prima, wobei es sich um Pflanzen handelte, die zuvor auf die Resistent durch das V_f -Gen selektioniert waren, erste Symptome einer Schorf-Krankheit, ausgelöst durch *V. inaequalis*, nachgewiesen werden.

1.2 Ökosystem Phyllosphäre

Die Phyllosphäre ist der Lebensraum, der sich oberhalb des Erdreichs an der Pflanzenoberfläche erstreckt, im Gegensatz zur Rhizosphäre, welche den Lebensraum an der Wurzeloberfläche umfasst. Sie wird besiedelt von einer Vielzahl epiphytisch lebender Mikro-Organismen (Beattie und Lindow, 1999). Hirano und Upper (2000) beschreiben den Lebensraum der Phyllosphäre als sehr extrem, aufgrund der schnellen Wechsel innerhalb der abiotischen Faktoren, wie Licht, Feuchtigkeit und Temperatur. Dieses Zusammenspiel der verschiedenen Einflüsse hat eine erhebliche Auswirkung auf Vielfalt und Verteilung der epiphytisch lebenden Mikro-Organismen (Andrews und Harris, 2000).

Die Nährstoffe in diesem System, wie Kohlenhydrate, Aminosäuren und organische Säuren, befinden sich zunächst in den Blättern der Pflanzen und werden beispielsweise durch Auswaschung durch die Cuticula an die Blattoberfläche gebracht, wo sie für Mikro-Organismen verfügbar werden (Godfrey, 1976). Eine weitere Möglichkeit, um Nährstoffe verfügbar zu machen, ist das aktive Rekrutieren. So hat McKeen (1974) anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen Rückschlüsse auf das Eindringen von Pilze in Wirtspflanzen durch enzymatische Aktivität gezogen. Darüber hinaus konnte von zahlreichen Arbeitsgruppen beschrieben werden, dass Mikro-Organismen Cutin, einen Bestandteil der Cuticula, als Kohlenstoffquelle nutzen (Heinen und de Vries, 1966, Purdy und Kolattukudy, 1973).

Die Zusammensetzung der in der Phyllosphäre lebenden Mikro-Organismen wurde bereits in verschiedenen Arbeiten beschrieben. So konnten Legard et al. (1994) vom Frühlingsweizen 37 verschiedene Gattungen und 88 verschiedene Arten isolieren, unter ihnen *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Microbacterium lacticum*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas fluorescens* und *Pseudomonas putida*. Die Gruppe um Thompson (1993) konnte von der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) 1236 Bakterienstämme isolieren, die später in 115 Arten eingeteilt wurden, darunter auch verschiedene Arten von *Pseudomonas*, sowie *Pantoea agglomerans*. Des Weiteren wurde bekannt, dass mehrere Hundert Pilz-Arten am Land lebende Pflanzen besiedeln (Ellis und Ellis, 1985). Allein von Apfelpflanzen konnten über 100 Arten, inklusive 13 verschiedener Hefe-Arten isoliert werden (Andrews et al., 1987). Vergleichbares konnten auch Burr et al. (1996) und Fiss (2001) bestätigen.

Bakterien liegen innerhalb ihrer Lebensgemeinschaft in Verbänden vor, was den Vorteil des horizontalen Gentransfers, aber auch der Resistenzbildung und -verbreitung, beispielsweise gegen Antibiotika hat (Costerton et al., 1999, Normander et al., 1998). Dabei unterliegt die Zusammensetzung dieser Zellverbände in einem Areal verschiedenen Umständen, wie der Entstehung, der Zuwanderung, dem Zelltod und der Abwanderung, wobei die Einflüsse Zu- und Abwanderung, in der Phyllosphäre, im Gegensatz zur Rhizosphäre einen größeren Einfluss auf die Dynamik der Zusammensetzung der Mikro-Organismen innerhalb der Lebensgemeinschaft haben (Brock, 1971). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass bevorzugt die Blattunterseite von Mikro-Organismen besiedelt wird, um möglicherweise besser an Nährstoffe zu gelangen, leichter eine Mikrogemeinschaft zu bilden, und einen Mikro-Lebensraum zu schaffen, wobei auch die Topographie des Blattes wie Leitbündel, Trichome, Stomata und epidermale Zellverbindungen eine große Rolle spielen (Andrews, 1992, Andrews et al., 1980, Andrews und Kenerley, 1978, Beattie und Lindow, 1999, Kinkel, 1997).

1.3 Pseudomonadaceae

Bei den Pseudomonadaceae handelt es sich um eine Familie innerhalb der gram-negativen Stäbchenbakterien. Sie leben unter aeroben Bedingungen, wobei einige Arten in der Lage sind, im anaeroben Milieu Nitrat-Atmung (Denitrifizierung) zu betreiben (Schlegel, 1992). Da sie hinsichtlich ihrer Umwelt als eher anspruchslos gelten, findet man sie im Boden, im Wasser bzw. Abwasser und in der Luft. Für viele *Pseudomonas*-Arten ist die Bildung wasserlöslicher Pigmente charakteristisch. Zu diesen Pigmenten gehören beispielsweise Pyocyanin, ein blau-grünes Phenazinderivat, und verschiedene gelb-grün-fluoreszierende Pigmente (Schlegel, 1992).

Zu den bekannten Arten der Pseudomonadaceae gehören *P. aeruginosa*, ein Humanpathogen, sowie das Pflanzenpathogen *P. syringae*. Durch die Entdeckung des Entner-Doudoroff-Weges zum Abbau von Glucose als Energiequelle wurde auch *P. saccharophila* bekannt. Abschließend seien noch die Wasser- und Bodenbakterien *P. fluorescens* und *P. putida* genannt, die die Fähigkeit besitzen, eine Vielfalt an verschiedenen organischen Verbindungen zu oxidieren (Schlegel, 1992).

Die Bakterien der Pseudomonadaceae verfügen über Geißeln in polarer Anordnung, bestehend aus helikal gewundenen Fäden, die an einem Proteinkomplex in der Zytoplasmamembran befestigt sind und durch ihre Bewegung die Mobilität der Zellen ermöglichen. Bei den verschiedenen Bakterienarten unterscheiden sich die Geißeln in der Länge (bis 20 µm), der Dicke (12 - 18 nm) und der Amplitudenlänge der Schraubenlinie (Schlegel, 1992).

Die Geißelfilamente bestehen aus Flagellin-Molekülen, deren Untereinheiten um einen axialen Hohlraum helikal angeordnet sind, woraus die Geißelstruktur resultiert. Die Geißel besteht aus drei

Einleitung

Abschnitten, wobei die Flagellin-Struktur den äußere Bereich darstellt und durch den Geißelhaken mit dem Basalkörper verbunden ist, welcher die Verankerung in der Zytoplasmamembran und in der Zellwand bildet. Er besteht aus einem Stift mit zwei Ring-Paaren (L- und P-Ring außen, MS- und P-Ring innen, Madigan und Martinko, 2006). In Abb. 1.2 ist eine schematische Darstellung über den Aufbau einer Geißel gegeben.

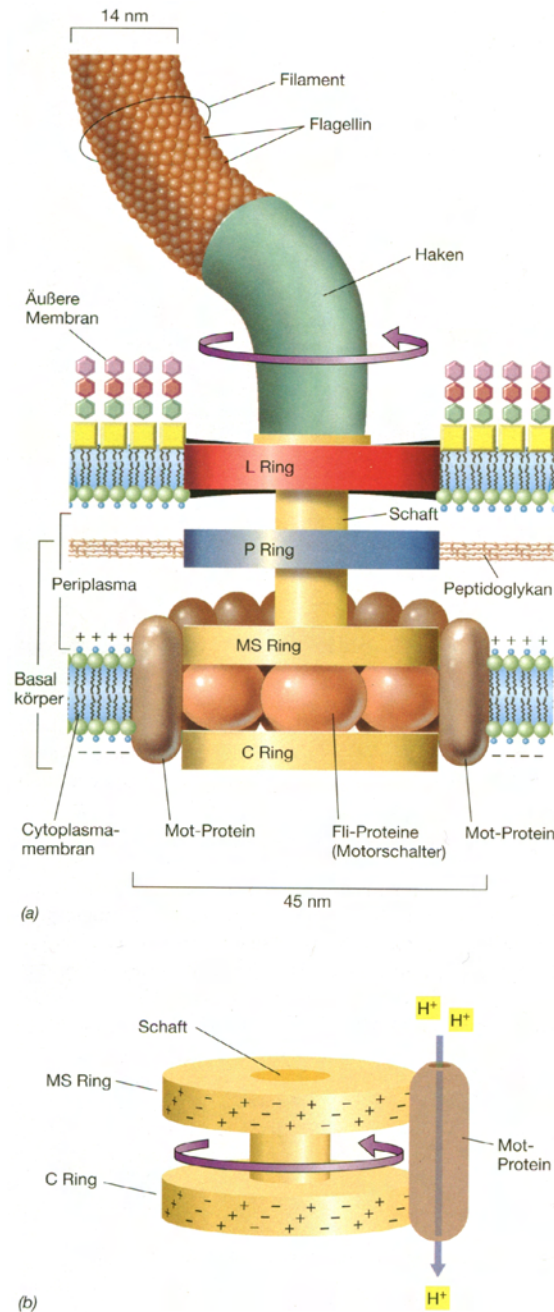


Abb. 1.2 a) Strukturübersicht, Filament bestehend aus Flagellin-Untereinheiten in helicaler Anordnung, befestigt an einem Haken, der durch einen Schaft in den Basalkörper ragt, L-Ring befindet sich in der Lipopolysaccharid-Schicht, P-Ring in der Peptidoglykan-Schicht, MS-Ring in der Zytoplasmamembran, C-Ring im Zytoplasma; Mot-Proteine fungieren als Geißelmotor, Fli-Proteine, als Schalter des Motors b) Funktions-Modell, durch den Protonenfluss in den Mot-Proteinen kommt es zur Ladungsübertragung, wodurch der Motor betrieben wird (entnommen aus Madigan und Martinko, 2006)

1.3.1 Pathogene und nicht-pathogene Wechselwirkungen zwischen Mikro-Organismen und Wirts-Organismen

Pseudomonas ist neben den Gattungen *Ralstonia* und *Xanthomonas*, die ebenfalls zur Gruppe der gram-negativen, polar begeißelten Bakterien zählen, auch durch seine Pathogenität gegenüber Pflanzen bekannt geworden (Madigan und Martinko, 2006). So ist beispielsweise *P. syringae* pv. *syringae* der Auslöser für Bakterienbrand bei Kirschen und Zwetschgen. *R. solanacearum* dagegen befällt Kartoffeln, Tabak und andere Arten der Nachtschattengewächse, aber auch Zierpflanzen, und ist der Erreger der Schleimkrankheit. *X. campestris* kann neben nekrotischen Läsionen auch Welkekrankheiten und Gewebefäule bei verschiedenen Kohlarten verursachen.

Der Mechanismus einer Infektion erfolgt in der Ausschüttung von Toxinen, lytischen Enzymen und Wachstumsfaktoren, wodurch eine Schädigung des Pflanzengewebes, und damit die Symptome hervorgerufen werden. Dabei ist die Pathogenität als Wechselwirkung zwischen Wirtspflanze und Pathogen recht spezifisch, so dass es nur zum Ausbruch der jeweiligen Krankheit kommt, wenn das Pathogen eine dafür anfällige Pflanze befällt (Madigan und Martinko, 2006).

Im Gegensatz zu den Pflanzenpathogenen sind allerdings auch Antagonisten aus der Familie der Pseudomonaden bekannt. So konnte bereits erfolgreich nachgewiesen werden, dass *Burkholderia cepacia* als biologische Kontrolle gegen *Rhizoctonia solani*, den Erreger der Kartoffelpocken bzw. der Wurzeltöterkrankheit, wirksam ist (Hwang und Benson, 2002). Außerdem sind Bakterienstämme von *P. fluorescens* mit Kontroll-Funktionen gegen pilzliche Wurzelkrankheiten, verursacht durch *Fusarium* und *Pythium*, bekannt (Haas und Keel, 2003). Diese biologische Kontrolle verläuft einerseits über die Induktion einer systemischen Resistenz in der Pflanze, andererseits über die Produktion von Fungiziden. *P. fluorescens* sp. wird außerdem bereits erfolgreich als Pflanzenstärkungsmittel (Proradix®) für Kartoffeln eingesetzt, um sie vor dem Befall von *R. solani* und damit dem Ausbruch einer Fäulniserkrankung zu schützen (BBA, 2005).

Die Mechanismen der Pseudomonaden zur Unterstützung von Pflanzen gegen Pathogene sind vielfältig (Ellis et al., 2001, Haas und Keel, 2003, Harris und Stahlman, 1996, Maurhofer et al., 1994 und 1998, Molina et al., 2003).

Man unterscheidet:

- a) den indirekten Weg zur Förderung der Widerstandsfähigkeit der Pflanze, und
- b) den direkten Weg durch die Hemmung von Parasiten, Pathogenen oder Pflanzen-Konkurrenten.

Einleitung

Eine andere Möglichkeit ist der Antagonismus gegen Pathogene, in dem beispielsweise eine Vielzahl von Pseudomonaden Enzyme oder Signal-Moleküle zum Eingreifen in die Pathogenitäts-Mechanismen produzieren (Raaijmakers et al., 2002, Sharif-Tehrani et al., 1998, Toyoda et al., 1988).

Zwei Mechanismen mit einem positiven und direkten Effekt zur Unterstützung der Pflanze bei Pathogenabwehr sind bereits aufgedeckt worden (s. Abb. 1.3). Es wird eine Resistenz induziert, wodurch ein dauerhaftes System mit einem vielschichtigen Schutz gegen Pathogene, Parasiten und teilweise auch Insekten entsteht (Chin-A-Woeng et al., 1998, Maurhofer et al., 1998, Pieterse et al., 2003, Zehnder et al., 1997).

- 1) Systemisch erworbene Resistenz (SAR = systemic acquired resistance). Sie wurde durch Hunt et al. (1996) nach Infektionen von Blättern durch Viren, Bakterien und Pilzen als Verursacher kleiner Nekrosen beobachtet. Diese Reaktion setzt das Vorhandensein von Salizylsäure voraus, welche die Anreicherung von Pathogenesis-Related-Proteins (PR-Proteine) induziert (Hunt et al. 1996, Ryals, et al., 1996).
- 2) Induzierte systemische Resistenz (ISR = induced systemic resistance). Sie setzt das Vorhandensein von Ethylen und Jasmonsäure in der Pflanze voraus und gilt als die effizientere Reaktion bei bereits eingedrungenen Pathogenen. Sie wird durch Zelloberflächenstrukturen wie beispielsweise Lipopolysaccharide aktiviert (Chin-A-Woeng et al., 1998, Pieterse et al., 2003).

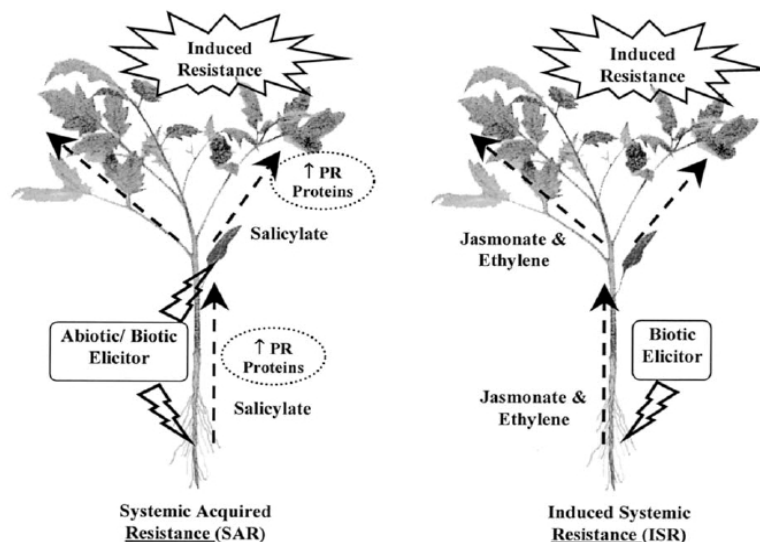


Abb. 1.3 Ein schematischer Vergleich der beiden Resistenz-Mechanismen in Pflanzen. Systemisch erworbene Resistenz, die durch abiotische Faktoren an Wurzel oder Blattgewebe oder durch biotische Elicitoren induziert wird, hängt ab vom Phytohormon Salizylsäure und ist assoziiert mit der Anreicherung von PR-Proteinen. Induzierte systemische Resistenz, die durch den Kontakt mit Rhizobakterien an den Wurzeln induziert wird, ist abhängig von den Phytohormonen Ethylen und Jasmonsäure, unabhängig von Salizylsäure und nicht assoziiert mit der Anreicherung von PR-Proteinen. (entnommen von Vallad und Goodman, 2004)

Einleitung

Die PR-Proteine, tabellarisch zusammengefasst in Tab. 1.1 (nach Buchanan et al., 2001, und Ros, 2004), wirken toxisch auf eingedrungene Pathogene. Sie werden in verschiedene Gruppen eingeteilt, wie beispielsweise mit antifungaler Wirkung, aber auch mit enzymatischer, z.B. Chitinasen, Glucanasen, Endoproteinasen und Peroxidasen.

Tab. 1.1 Familien der PR-Proteine (entnommen aus Buchanan et al., 2001 und Ros, 2004)

Familie	Typ	Eigenschaften	Referenz
PR-1	Tabak PR-1a	Antifungal, anti- <i>Oomycete</i>	Antoniw et al., 1980
PR-2	Tabak PR-2	β -1,3-Glukanase	Antoniw et al., 1980
PR-3	Tabak P, Q	Chitinase Typ I, II, IV, V, VI, VII	Van Loon, 1982
PR-4	Tabak R	Chitinase Typ I, II	Van Loon, 1982
PR-5	Tabak-S	Thaumatin-ähnlich	Van Loon, 1982
PR-6	Tomate Inhibitor I	Protease Inhibitor	Green und Ryan, 1972
PR-7	Tomate P69	Endoproteinase	Vera und Conejero, 1988
PR-8	Gurke Chitinase	Chitinase Typ III	Mettraux et al., 1988
PR-9	Tabak Lignin-bildende Peroxidase	Peroxidase	Lagrimini et al., 1987
PR-10	Petersilie PR-1	Ribonuklease-ähnlich	Somssich et al., 1986
PR-11	Tabak Klasse V Chitinase	Chitinase	Melchers et al., 1994
PR-12	Rettich Rs-AFP3	Defensin	Terras et al., 1992
PR-13	Arabidopsis TH12.1	Thionin	Epple et al., 1995
PR-14	Gerste LTP4	Lipid-transfer Protein	García-Olmedo et al., 1995
PR-15	Gerste OxOa	Oxalat-Oxidase	Zhang et al., 1995
PR-16	Gerste OxOLP	Oxalat-Oxidase-ähnliches Protein	Wei et al., 1998
PR-17	Tabak PRp27	unbekannt	Okushima et al., 2000

Die Produktion der PR-Proteine ist, genau wie SAR, eine Folge der Hypersensitive Response (HR). Hierbei handelt es sich um den gesamten Prozess, der nach Kontakt eines Pathogens mit der Pflanze angestoßen wird, und ist schematisch in Abb. 1.4 dargestellt.

Wie bei Agrios (2005) beschrieben, wird auf die HR nicht nur das Absterben des Pathogens zurück geführt, sondern auch die Resistenzbildung, die eine Pflanze nach einem Pathogenbefall erfährt. Dabei tritt diese Reaktion sowohl bei einem Befall von virulenten Pathogenen auf Nicht-

Einleitung

Wirtspflanzen auf, wie auch bei einem Befall von Wirtspflanzen durch nicht-virulente Pathogen-Stämme, also bei einer nicht miteinander vereinbarenden Kombination. Die HR ist dabei nicht immer der Auslöser für Resistenz-Bildung innerhalb der Pflanze.

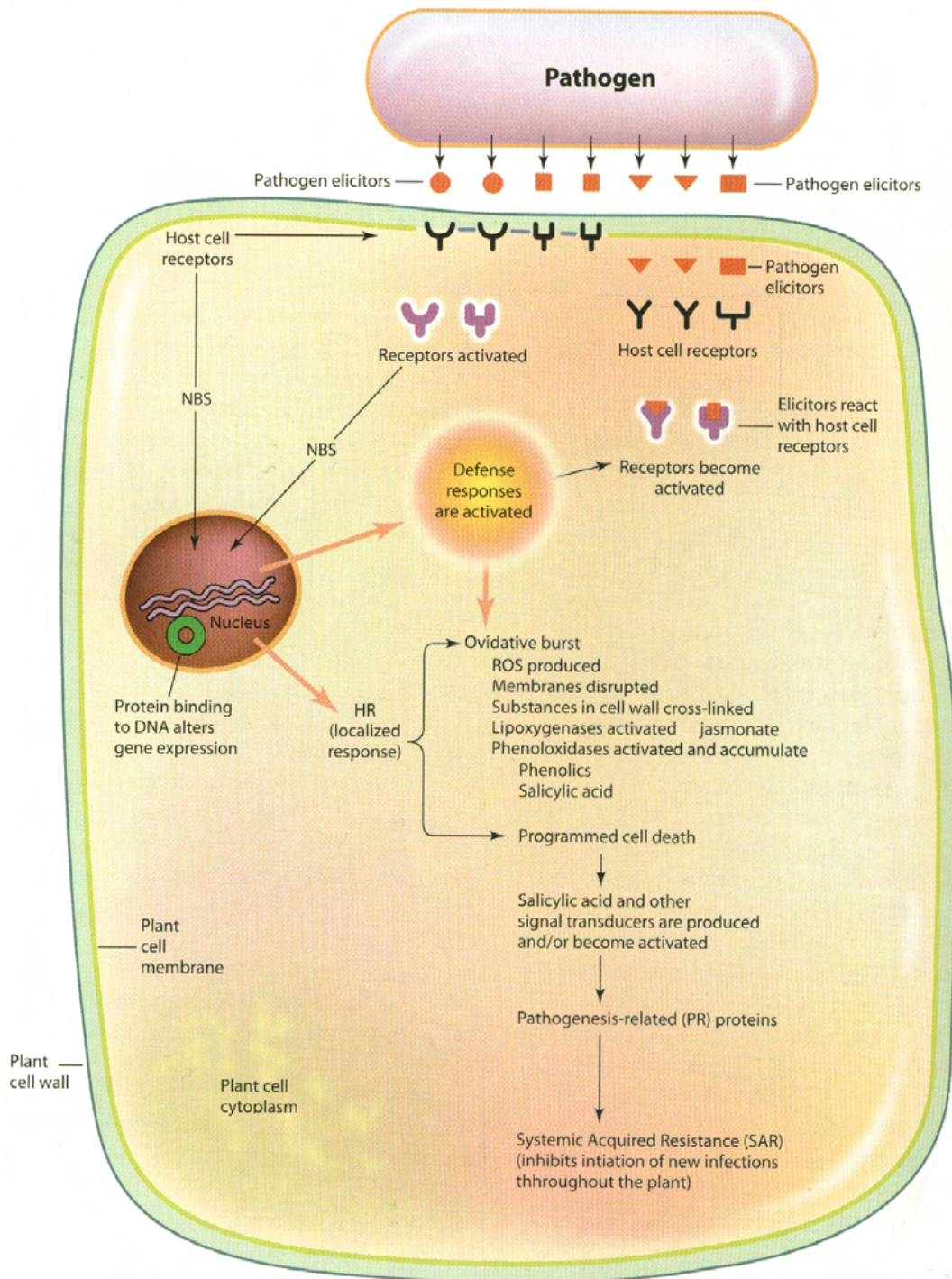


Abb. 1.4 Modelldarstellung der möglichen Schritte innerhalb einer Hypersensitive Response (HR). Nach Kontakt eines Pathogens mit der Pflanzenzelle über Rezeptoren werden verschiedene Mechanismen angestoßen. (entnommen aus Agrios, 2005)

Wie auch in Abb. 1.4 dargestellt (Agrios, 2005), wird die Hypersensitive Response durch den Kontakt eines Pathogens ausgelöst, wobei es zu einer Bindung zwischen den Elicitoren der Pathogene und den Rezeptoren an der Wirtszelle kommt. In Folge dessen wird sowohl in der befallenen, aber auch in den Nachbarzellen, eine Kaskade biochemischer Reaktionen ausgelöst, in dessen Anschluss es unter anderem zu Vernetzungen zwischen Zellwandkomponenten und phenolischen Verbindungen kommt, um die Zellwände zu verstärken, aber auch zur Produktion von Proteinkinasen, antimikrobiellen Substanzen und den bereits erwähnten PR-Proteinen.

1.3.2 *Pseudomonas fluorescens* Bk3

Der Bakterienstamm *P. fluorescens* Bk3 wurde aus der Phyllosphäre von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox isoliert (Fiss, 1996). Die damals beprobte Apfelplantage war seit 7 Jahren nicht mehr mit Fungiziden behandelt worden, so dass man davon ausging, dass die 107 Pilz- und die 111 Bakterienisolate, die gewonnen werden konnten, aus einer natürlichen Phyllosphäre stammten. Die Apfelsorten, von denen die jeweiligen Proben genommen wurden, waren Gloster, Ingrid Marie, Holsteiner Cox, Jamba und Boskoop. Fiss konnte in einer späteren Arbeit (2001) zeigen, dass das Nicht-Pathogen *P. fluorescens* Bk3 in der Lage ist, den pilzlichen Erreger des Apfelschorfs, *V. inaequalis*, zu hemmen, wie durch Dual-Culture Tests in Petrischalen und an Versuchen mit Apfelsämlingen zu beobachten war. Kürkcüoglu (2006) wies später in einem Freilandversuch nach, dass der Einsatz von *P. fluorescens* Bk3 als biologisches Pflanzenschutzmittel erfolgreich gegen *V. inaequalis* war. Durch molekularbiologische Untersuchungen an *in vitro*-Pflanzen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox konnte gezeigt werden, dass diese nach Inokulation mit *P. fluorescens* Bk3 ähnliche Reaktionen in der Proteinexpression zeigten, wie nach Infektion mit *V. inaequalis*, wobei keine morphologischen Veränderungen an der Pflanze zu erkennen waren. Daraus wurde geschlossen, dass sich die Pflanze durch den Kontakt mit dem nicht-pathogenen Bakterium auf einen Angriff durch ein mykotisches Pathogen vorbereiten kann (Kürkcüoglu 2006, Kürkcüoglu et al., 2004 und 2007).

Auch Singh et al. (2004) konnte eine hemmende Wirkung von *P. fluorescens* Bk3 gegenüber *V. inaequalis* bestätigen. Darüber hinaus wurde dort innerhalb der extrazellulären Proteine von *P. fluorescens* Bk3 eine Esterase-Aktivität nachgewiesen, die darauf schließen ließ, dass es sich dabei um eine Cutinase handeln könnte.

1.4 Mikrobielle Sekretionsmechanismen

Es ist schon lange bekannt, dass Prokaryonten mit Eukaryonten in Kontakt treten, um beispielsweise Nährstoffe zu rekrutieren (Heinen und de Vries, 1966, Purdy und Kolattukudy, 1973) oder Krankheiten auszulösen (Boone, 1971, Ng und Roberts, 1974, Schroth et al., 1974, Xu et al., 1995). Dafür stehen den Bakterien verschiedene Sekretionswege zur Verfügung, um Proteine an eukaryontische Wirtsorganismen abzugeben. Wie bei Hueck (1998) zusammengefasst, hat man bereits bei gram-negativen Bakterien vier verschiedene Mechanismen aufgeklärt, die als Protein-Sekretions-Mechanismen Typ I - IV bezeichnet werden, und Ähnlichkeiten untereinander aufweisen.

Man weiß von Typ II und IV, dass sie aus zwei verschiedenen Schritten bestehen, und es sich um *sec*-abhängige Exportmechanismen handelt, die sich durch die Anwesenheit einer Signalsequenz am sekretierten Protein auszeichnet, welche beim Erreichen des Periplasmas durch eine Peptidase abgespalten wird. Der *sec*-pathway bildet einen wichtigen Sekretionsweg zum Durchschleusen der Proteine vom Zytosol durch die Zytoplasma-Membran.

Der Typ II gilt als wichtigster Mechanismus innerhalb der gram-negativen Bakterien und wurde zunächst am Pflanzenpathogen *Erwinia chrysanthemi* (He et al., 1991), heute *Dickeya dadantii*, und am Humanpathogen *Klebsiella oxytoca* (Pugsley, 1993) beschrieben.

Der Typ IV wurde an den Humanpathogenen *Helicobacter pylori* und *Bordetella pertussis* von Finlay und Falkow (1997) aufgeklärt. Er beinhaltet eine Gruppe an Autotransportern, und ist vermutlich verantwortlich für den Transfer über die äußere Zell-Membran hinaus und in die Zielzelle hinein. Während der Protein-Komplex für den Typ II-Mechanismus aus ca. 16 Proteinen besteht, weist der Typ IV nur 9 - 12 Proteine auf.

Diesen beiden Mechanismen stehen die Transportwege der Typen I und III gegenüber, die sich durch die *sec*-Unabhängigkeit von den Typen II und IV unterscheiden.

Der Sekretions-Mechanismus Typ I wurde an *Pasteurella haemolytica*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Dickeya dadantii* von Hueck (1998) aufgezeigt. Dieser Sekretionsweg beinhaltet drei sekretorische Proteine: eine ATPase für den inneren Transport, ein Membranprotein für die äußere Membran, und ein Fusions-Protein, welches in der inneren Membran lokalisiert ist und in das

Einleitung

Periplasma hinein reicht. Die für den Sekretions-Apparat und für die zu sekretierenden Proteine kodierenden Gene, sind im Cluster angeordnet.

Der letzte Sekretions-Weg ist der Typ III (TTSS = Type Ihree Secretion System). Er wurde anhand der Pflanzenpathogene *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Erwinia amylovora*, *Dickeya dadantii*, *Ralstonia solanacearum* und *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, heute *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* beschrieben (Alfano und Collmer, 1997, Bonas, 1994, Van Gijsegem et al., 1995). Das TTSS besteht aus ungefähr 20 Proteinen, von denen die meisten in der inneren Membran verankert sind. Der Apparat wird kodiert durch die Gene des *hrp*-Gen-Clusters (Hypersensitive Response and Pathogenicity Genes), was verantwortlich ist für die Pathogenität, die bei Hrp-Mutanten ausbleibt (Alfano und Collmer, 1997, Bonas, 1994, He, 1998 und Van Gijsegem et al., 1993). Durch das Einschleusen von Proteinen wird der Metabolismus der Wirtszelle so beeinflusst, dass die Bakterien Nährstoffe rekrutieren können, während gleichzeitig die Pflanzenabwehr unterdrückt und der Apoplast darauf vorbereitet wird, die Vermehrung des Pathogens zuzulassen.

Bislang wurde das Typ III Sekretions-System überwiegend bei Pathogenen identifiziert. Man hat herausgefunden, dass fadenförmige Anhängsel oft am TTSS beteiligt oder involviert sind, sog. hrp-abhängige Pili (Ginocchio et al., 1994 und Roine et al., 1997). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass Teile des Sekretions-Apparats dem Basalkörper des Flagellin genetisch und morphologisch sehr ähnlich sind (Kubori et al., 1997).

In Abb. 1.5 befindet sich eine schematische Darstellung des Typ III Sekretions-Mechanismus. Dargestellt sind hier einmal die schematische Flagellum-Struktur eines Bakteriums, und im Vergleich dazu die TTSS-Strukturen bei drei verschiedenen Bakterien-Arten: *Yersinia*, *E. coli* und *P. syringae*.

Einleitung

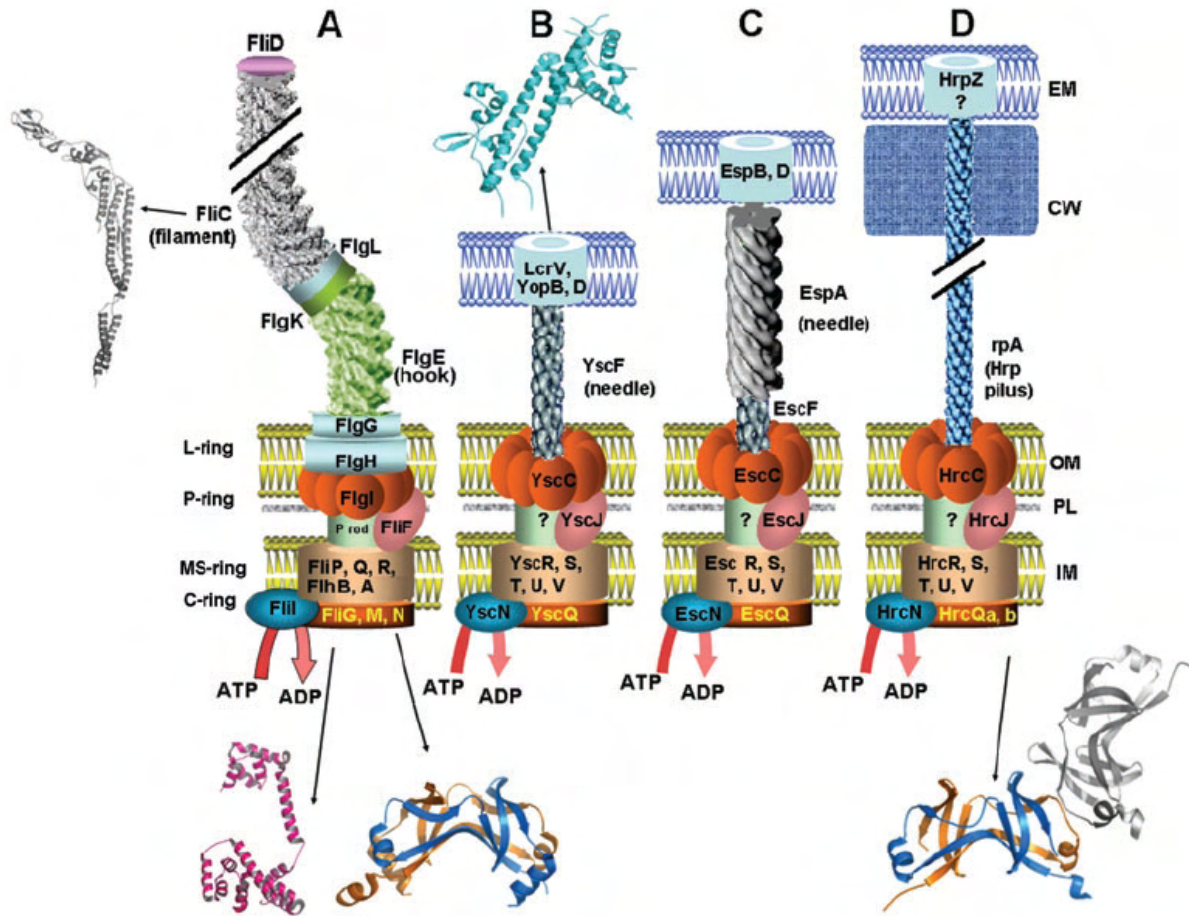


Abb. 1.5 Schematische Darstellung des Typ III Sekretions-System (TTSS) bei verschiedenen Organismen. A = bakterielles Flagellum, B = Sekretions-System bei *Yersinia*, C = bei *E. coli*, D = bei *P. syringae*. Der Basalkörper des Flagellums bildet die Proteine für den C-, MS-, P- und L-Ring. Die konservierten Proteine im TTSS (und ihre Flagellar-Homologien) sind in gleicher Position und Farbe angeordnet. Der P-Schaft (P rot) besteht aus FlgB, FlgC, FlgF und FliE, und hat keine homologen Proteine in TTSS. Das Fragezeichen im TTSS deutet darauf hin, dass bis jetzt noch keine Kanal-Strukturen in der inneren Zellmembran (IM) identifiziert wurden. Das Hauptinstrument der Nadel ist YscF bei *Yersinia*, EspA bei *E. coli* und HrpA in *P. syringae*. Porenbildende Proteine besitzen dieselbe Farbe in der eukaryontischen Zellmembran (EM): LcrV, YopB, YopD bei *Yersinia* und EspB, D bei *E. coli*. Bei Pflanzenpathogenen sind vermutlich HrpZ (*P. syringae*) und HrpF (*X. campestris*) die Translokator-Proteine. Strukturell analysierte Proteine sind schematisch gezeigt. Die homologen Proteine FliN (PDB code: 1O6A) und HrcQ_B (PDB code: 1O9Y) wurden in der dimeren bzw. tetrameren Form kristallisiert und zeigen eingehende strukturelle Ähnlichkeiten. Andere bekannte 3D-Strukturen sind die des C-Terminus von FlgG (PDB code: 1LKV), FliC (PDB code: 1UCU) und LcrV (PDB code: 1R6F). Die Darstellung der Nadel-Komplexe, die EspA und das Flagellar-Filament basiert niedrig-auflösenden Struktur-Studien (Cordes et al., 2003; Daniell et al., 2003; Mimori et al., 1995). OM = äußere Zellmembran, PL = Peptidoglykan-Schicht, IM = innere Zellmembran des Bakteriums; EM = eukaryotische Membran, CW = Zellwand der Pflanzelle. Die verschiedenen Komponenten sind nicht maßstabsgetreu. (entnommen aus Tampakaki et al., 2004)

1.5 Ziele dieser Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, ein extrazelluläres Protein mit Esterase-Aktivität von *P. fluorescens* Bk3 zu isolieren und zu charakterisieren. Wie bereits erwähnt, konnte Singh et al. (2004) die enzymatische Aktivität einer Esterase innerhalb der extrazellulären Proteine von *P. fluorescens* Bk3 detektieren. Da weiterhin bereits bekannt ist, dass es zwischen *P. fluorescens* Bk3 und *M. domestica* cv. Holsteiner Cox zu Wechselwirkungen kommt (Kürkcüoglu 2006, Kürkcüoglu et al, 2004 und 2007), besteht die Hypothese, dass es sich bei der detektierten Esterase um eine Cutinase handeln könnte. Das Nachgehen dieser Fragestellung soll dazu dienen, die Mechanismen zwischen dem mikrobiellen Antagonist *P. fluorescens* Bk3 gegen *V. inaequalis* und der Wirtspflanze *M. domestica* besser zu verstehen.

Im Anschluss daran soll untersucht werden, was die Etablierung von epiphytisch lebenden Bakterien, hier: *P. fluorescens* Bk3, auf Pflanzen und somit die Anpassung an einen Lebensraum für einen Einfluss auf den Metabolismus der Bakterien hat. Wie bereits unter 1.2 erwähnt, leben die Mikro-Organismen in der Phyllosphäre unter extremen Bedingungen durch die abiotischen Faktoren. Es sollen also Bakterien nach einer Inkubations-Zeit auf den Pflanzen, während der sie sich etablieren können, wieder isoliert werden, um die Reaktion auf Transkript-Ebene zu analysieren. Auf diese Weise erhofft man sich Aufschlüsse über weitere Mechanismen, die *P. fluorescens* Bk3 verwendet, um mit *M. domestica* in Kontakt zu treten.

2. Material und Methoden

2.1 Bakterienstamm und Anzuchtbedingungen

Bei dem verwendeten Bakterienstamm handelt es sich um *Pseudomonas fluorescens* Bk3. Er wurde durch Fiss (1996) von *Malus domestica* cv. Holsteiner Cox isoliert. Da die Pflanzen innerhalb der beprobten Plantage mehr als 7 Jahre nicht mit Fungiziden behandelt wurde, war davon auszugehen, dass es sich bei den isolierten Bakterien von den Blattoberflächen um die natürliche Mikroflora der Pflanze handelt. Der Stamm *P. fluorescens* Bk3 liegt als Glycerin-Dauer-Kultur vor, wird bei -70°C gelagert und bei Bedarf in LB-Flüssig-Medium angeimpft.

Der Bakterienstamm wurde freundlicherweise von Prof. Dr. G. Auling aus dem Institut für Mikrobiologie, Leibniz Universität Hannover zur Verfügung gestellt.

2.2 Photometrische Konzentrations-Bestimmung von Bakterien-Suspensionen

Die Konzentration von Bakterien-Kulturen wurde durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch bestimmt. Durch eine Zellzählung mit Hilfe der Thoma-Kammer konnte ermittelt werden, dass eine OD₆₀₀ von 1 einer Zellzahl von ca. $1,02 \times 10^9$ Zellen/ml entspricht.

2.3 Verwendete Apfel-Pflanzen und ihre Anzuchtbedingungen

Bei den hier verwendeten Apfel-Pflanzen handelte es sich um *Malus domestica* cv. Holsteiner Cox, die als *in vitro* Kulturen nach Gau et al. (2002) bei 24°C in einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden in Klimakammern kultiviert wurden. In Abb. 2.1 befindet sich eine beispielhafte Aufnahme verwendeter *in vitro* Pflanzen.

Die Pflanzen wurden ursprünglich freundlicherweise von Juniorprof. Dr. I. Szankowski, FG Produktqualität - Obstbau im Inst. f. Biologische Produktionssysteme, Leibniz Universität Hannover zur Verfügung gestellt.



Abb. 2.1 Sterile *in vitro* Pflanzen von *Malus domestica* cv. Holsteiner Cox, hier auf Bewurzelungsmedium. Normalerweise befinden sich 5 Pflanzen in einem Tank. Sie werden bei einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus bei 24°C in der Klimakammer unter kontinuierlichen Bedingungen kultiviert. Die Pflanzen wurden ursprünglich freundlicherweise von Juniorprof. Dr. I. Szankowski, FG Produktqualität - Obstbau, Leibniz Universität Hannover zur Verfügung gestellt.

2.4 Quantitative Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Lowry et al. (1951). Dieser Nachweis verläuft in zwei Schritten, wobei zunächst eine Biuret-Reaktion durchgeführt wird, bei der es zur Bildung eines blau-violetten Komplexes zwischen den Peptidbindungen und den Kupfer(II)-Ionen kommt. Diese Reaktion findet unter alkalischen Bedingungen statt. Im Anschluss wird der Komplex durch Folin-Ciocalteu-Reagenz reduziert, wobei sich eine Blaufärbung zeigt. Diese wird photometrisch bei 730 nm gemessen.

Zur Berechnung der Konzentration wird parallel eine Eichreihe mit verschiedenen Konzentrationen an Rinderserum-Albumin (BSA bzw. RSA) durchgeführt.

Testansatz:

Biuret-Reaktion: 2 ml Lösung C
200 µl Probe

Lösung C:

50 Teile Lösung A

4 g Natrium-Hydroxid

20 g Natriumcarbonat

0,2 g Kalium-Natrium-Tartrat

in 1 l H₂O

1 Teil Lösung B

0,5 g Kupfersulfat-Pentahydrat

in 0,1 l H₂O

Inkubation: 10 min.

Komplex-Reduktion: Zugabe von Lösung D

Lösung D:

1 Teil Folin-Ciocalteu-Reagenz

1 Teil H₂O

Inkubation: 30 - 40 min.

Photometrische Messung
bei 730 nm

2.5 Enzymatischer Esterase-Aktivitäts-Nachweis

Bei einer enzymatischen Reaktion kommt es zu Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und dem Substrat, wobei sich zunächst ein Enzym-Substrat-Komplex bildet, aus dem nach Interaktion das Produkt hervor geht.

In diesem Fall ist das Enzym das zu charakterisierende Protein, was mit p-Nitrophenyl-Butyrat als künstliches Substrat eine Wechselwirkung eingeht. Bei dieser hydrolytischen Spaltung unter Anwesenheit einer Esterase entsteht neben Butyrat das gelb gefärbte Produkt p-Nitrophenol, was photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm detektierbar ist (Fett et al., 1992 und Wang et al., 2000).

Der Testansatz besteht aus 20 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 8,0) und 0,2 % Triton X-100. In einen 1 ml-Ansatz werden 200 µl enzymhaltige Probelösung eingesetzt. Direkt vor der Messung werden 10 µl Substrat dazu gegeben und gut durchmischt. Das Substrat wird mit einer Konzentration von 17,6 µl/ml Lösungsmittel (hier: Azetonitril, ACN) versetzt, um die Löslichkeit zu verbessern.

Testansatz:

Kalium-Phosphat-Puffer, pH 8,0, 200 mM	250 µl
Triton X-100	2 µl
H ₂ O	538 µl
p-Nitrophenyl-Butyrat (17,6 µl/ml ACN)	10 µl
Probe	200 µl

Die photometrische Messung erfolgte unverzüglich bei einer Wellenlänge von 405 nm über mehrere Minuten. Die Testdurchführung erfolgt bei Raumtemperatur bei einem pH-Wert von 8,0.

2.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit Tris-Tricin für Proteine

Bei den Polyacrylamid-Gelelektrophoresen macht man sich die negative Ladung des Natriumdodecylsulfat (SDS = Sodium Dodecyl Sulfat) zu Nutze, welche die Eigenladung der apparenten molaren Masse überdeckt. Auf diese Weise wandern die Proteine gerichtet durch ein Gel, an das ein elektrisches Feld angelegt ist. Durch den voran gestellten Denaturierungsschritt, bei dem die Proteine mit SDS (Verhältnis 1,4 g SDS / g Protein) und Mercaptoethanol für 5 min. in einem kochenden Wasserbad inkubiert werden, kommt es durch das Auflösen der Wasserstoffbrückenbindungen zur Streckung der Proteine, da die Sekundär- und die Tertiär-Struktur, sowie Protein-Protein-Wechselwirkungen aufgehoben werden. Durch die Verwendung von Tricin anstelle des Glycin als Folge-Ion und die Erhöhung der Molarität der Laufpuffer (nach Schägger und van Jagow, 1987) kommt es nicht nur im hochmolekularen, sondern auch im niedermolekularen Bereich von 0,1 bis 1 kDa zu einer linearen Auftrennung.

Das Trenngel wurde überwiegend mit einem 7 %igen Anteil an Polyacrylamid hergestellt. Zur besseren Auspolymerisierung unter Luftabschluss und dem Erhalt einer ebenen Oberfläche wurde das frisch gegossene Gel mit Butanol überschichtet. Das Sammelgel wurde mit einem Gehalt an 4 % Polyacrylamid angefertigt.

Die Proben wurden zum Denaturieren in einem Verhältnis von 1:1 mit 2x Probenpuffer verdünnt und für 5 min. bei 100°C inkubiert.

<i>3x Gelpuffer:</i>	Tris, pH 8,45	36,3 g
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,3 %
	H ₂ O	in 100 ml
<i>Trenngel:</i>	3x Gelpuffer	4 ml
	87 %ig Glycerin	1,6 ml
	Acrylamid/Bisacrylamid (40 % / 1,6 %)	2,1 ml
	H ₂ O	4,25 ml
	Tetramethylethyldiamin (TEMED)	6 µl
	Ammoniumpersulfat (10 %)	60 µl
<i>Sammelgel:</i>	3x Gelpuffer	1,6 ml
	Bromphenolblau (20 %)	15 µl
	Acrylamid/Bisacrylamid (30 %, 0,8 %)	0,85 ml
	H ₂ O	3,92 ml
	Tetramethylethyldiamin (TEMED)	5 µl
	Ammoniumpersulfat (10 %)	62,5 µl

Material und Methoden

10x	Tris, pH 8,9	121 g
Anodenpuffer:	H ₂ O	in 500 ml
10x	Tris, pH 8,25	60,5 g
Kathodenpuffer:	Tricin	89,6 g
	SDS	5 g
	H ₂ O	in 500 ml
2x Probenpuffer:	1 M Tris, pH 6,8	0,62 ml
	Glycerin (87 %)	1 ml
	2-Mercaptoethanol	0,5 ml
	SDS (20 %)	2,5 ml
	Serva Blue (10 %)	10 µl

Die Elektrophorese lief bei einer Stromstärke von 50 mA.

2.7 Visualisierung der Proteine in der PAGE

Als Standard für die Bestimmung der Proteingröße anhand der apparenten molaren Massen wurde SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen) verwendet.

2.7.1 Silber-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Angewendet wurde die Methode nach Nesternko et al. (1994). Die Proteine werden zuerst durch ein Gemisch aus Trichloressigsäure (TCA), Azeton und Formaldehyd fixiert. Anschließend lagern sich mit Hilfe einer Silbernitratlösung Silber-Ionen an die Proteine an, die durch ein starkes Reduktionsmittel zu metallischem Silber reduziert werden und sich so braun-schwarz färben. Zum Stoppen der Reaktion reicht eine starke Änderung des pH-Wertes durch Essigsäure.

Färbevorschrift:

Fixierung:	5 min.	1,5 ml TCA-Lösung (50%) 25 µl Formaldehyd (37%) in 60 ml Azeton (50%)
	3 x 5 s	Spülen mit H ₂ O
Waschen:	5 min.	H ₂ O
	3 x 5 s	Spülen mit H ₂ O
Vorbehandlung:	5 min.	60 ml Azeton (50%)
	1 min.	100 µl Natriumthiosulfat (10%) in 60 ml H ₂ O

Material und Methoden

Imprägnieren:	3 x 5 s	Spülen mit H ₂ O
	8 min.	800 µl Silbernitrat (20%) 600 µl Formaldehyd (37%) in 60 ml H ₂ O
Entwicklung:	2 x 5 s	Spülen mit H ₂ O
	10-20 s	1,2 g Natriumcarbonat 25 µl Formaldehyd (37%) 25 µl Natriumthiosulfat (10%) in 60 ml H ₂ O
Beenden der Reaktion:	30 s	60 ml Essigsäure (1%)
	10 s	Spülen mit H ₂ O

2.7.2 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Verwendet wurde der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue, der sich an basische Seitenketten von Aminosäuren anlagert. Das Gel wird nach der Elektrophorese 30 bis 60 Minuten in der Färbelösung unter Bewegung bei Raumtemperatur gefärbt und im Anschluss unter mehrfachem Wechsel des Entfärbers so lange entfärbt, bis die Hintergrundfarbe entfernt ist, und die Banden deutlich zu erkennen sind.

<i>Färbelösung:</i>	Coomassie Brilliant Blue G250	0,25 %
	Essigsäure	10 %
	Methanol	50 %
<i>Entfärber:</i>	Essigsäure	10 %

2.7.3 Coomassie-Colloidal-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Die Methode erfolgte nach Neuhoff et al. (1988). Zur Fixierung der Proteine wird das Gel 1 Stunde in einem Fixierer inkubiert. Anschließend wird es mit der Färbelösung überschichtet und über einige Stunden (mind. 3 Stunden) angefärbt. Abschließend wird der überschüssige Farbstoff mit H₂O ausgewaschen, so dass sich am Ende die Proteinbanden blau gefärbt darstellen.

<i>Fixierer:</i>	Methanol	40 %
	Essigsäure	10 %
<i>Lösung A:</i>	ortho-Phosphorsäure	2 %
	Ammonium-Sulfat	10 %

Material und Methoden

<i>Lösung B:</i>	Coomassie-Brilliant-Blue G250 in H ₂ O	5 % 20 ml
<i>Färbelösung:</i>	Lösung A Lösung B nach guter Durchmischung Zugabe von Methanol	98 % 2 % 20 %

2.8 Aktivitätsfärbung von renaturierten Proteinen nach SDS-PAGE

Um enzymatisch aktive Proteinbanden zu detektieren, wurde eine Tris-Tricin-PAGE (s. 2.6) angefertigt. Die denaturierten Proteine wurden im Anschluss renaturiert und mit der Aktivitäts-Test-Lösung inkubiert, um eine enzymatische Reaktion, wie in 2.5 beschrieben, zu ermöglichen.

Vorschrift:

<i>Renaturierung der Proteine nach SDS-PAGE:</i>	Renaturierungs-Puffer: 0,7152 g Hepes 600 µl Triton X-100 auf 60 ml H ₂ O pH 7,0	1 h 37°C 40 rpm
<i>Vorbereitung:</i>	18,75 ml Kalium-Phosphat-Puffer (20 mM, pH 8,0) 150 µl Triton X-100 auf 60 ml H ₂ O	1 h RT 40 rpm
<i>Aktivitäts-Test:</i>	18,75 ml Kalium-Phosphat-Puffer (20 mM, pH 8,0) 150 µl Triton X-100 750 µl p-Nitrophenyl-Butyrat (17,6 µl/ml ACN) auf 60 ml H ₂ O	RT 40 rpm Inkubation über mehrere Minuten, bis Gelbfärbung sichtbar wird

2.9 Dialyse

Die Dialyse wurde zum Entsalzen der proteinhaltigen Probe, wie beispielsweise nach Ammonium-Sulfat-Fällung oder Elution durch NaCl, aber auch zum Ändern des pH-Wertes oder des Puffers, in dem sich die Proteine befanden, eingesetzt.

Der Dialyseschlauch wurde zunächst zum Entfernen störender Ionen einige Minuten in destilliertem Wasser ausgekocht, bevor er nochmals mit Wasser gespült und auf seine Dichtigkeit überprüft wurde. Die zu dialysierende Proteinlösung wurde in den Schlauch eingefüllt, welcher mit Schlauchklemmen verschlossen und in ein Becherglas mit dem gewünschten Puffer gehängt wurde, wobei ein Volumen-Verhältnis von 5:100 bestand. Unter Bewegung durch einen Magnetrührer wurde die Dialyse bei 4°C über Nacht durchgeführt. Nach 2 - 4 Stunden erfolgte ein Pufferwechsel mit frischer Pufferlösung.

Verwendeter Dialyse-Schlauch: Dialysis-Membrane Type 27, cut-off: 12 - 16 kDa, pore size: 25 Å, von biomol

2.10 Ammonium-Sulfat-Fällung

Die Anwesenheit von Salzen führt dazu, dass die Hydrathülle, die die Proteine umgibt und sie dadurch löslich macht, entfernt wird. Die Proteinaggregation wird durch diesen Effekt verstärkt. Ammonium-Sulfat eignet sich besonders gut, da auch bei hohen Konzentrationen die biologische Wirkung von Proteinen erhalten bleibt.

Die Fällung wurde in den Konzentrationsstufen 0 - 30 %, 30 - 55 % und 55 - 90 % vorgenommen. Dabei wurden die Salzkristalle zunächst durch Mörsern pulverisiert.

Der gewonnene Überstand einer Bakterienkultur wurde auf Eis gelagert, bevor die entsprechende Salzmenge langsam mit einem Glasstab eingerührt wurde. Zum Ausfällen der Proteine wurde die Lösung 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die ausgefallenen Proteine wurden durch einen Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 10000 rpm (Sorvall-Zentrifuge, GS-3-Rotor) und 4°C von der Lösung getrennt. In diesem Fall wurden die gefällten Proteine in Kalium-Phosphat-Puffer (20 mM, pH 8,0) resuspendiert und durch eine anschließende Dialyse gegen den gleichen Puffer entsalzt (s. 2.9).

2.11 Chromatographie

2.11.1 Ionenaustauschchromatographie

Bei dieser Form der Chromatographie macht man sich die kompetitiven Wechselwirkungen geladener Ionen zu Nutze. Dabei binden die Proteine an die Ladungen der stationären Phase, wobei der Gesamtladungszustand des Proteins vom pH-Wert des umgebenden

Puffers abhängt. Anschließend kommt es durch die Zugabe eines Salzgradienten zur steigenden Konkurrenz an den Bindestellen, wodurch sich die Proteine wieder von der stationären Phase lösen und fraktioniert gesammelt werden.

In diesem Fall wurden als stationäre Phase Diethylaminoethylgruppen (DEAE) verwendet. Es handelt sich dabei um einen schwachen Anionenaustauscher. Die NaCl-Konzentration zur Elution wurde in einem Gradienten von 0 - 0,5 M gewählt.

Zur Aufreinigung des gewünschten Proteins wurde zunächst eine DEAE-Säule mit einem pH-Wert von 8,0 (äquilibriert mit Kalium-Phosphat-Puffer, 20 mM) verwendet. In diesem Fall handelte es sich um eine Negativ-Chromatographie, bei der das gewünschte Protein nicht gebunden hat.

Im Anschluss wurde der Durchlauf dieser Chromatographie gegen das Puffersystem CHES (20 mM, pH 11,0) dialysiert und auf eine mit dem Puffer äquilibrierte DEAE-Säule gegeben. Anschließend erfolgte die Elution.

Die verwendeten Chromatographie-Säulen hatten einen Radius von 0,75 cm und wurden in einer Höhe von 10 cm mit dem entsprechenden Säulenmaterial gepackt. Daraus ergab sich ein Volumen des Säulenmaterials von 17,7 ml. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,5 ml / min.

2.11.2 Ausschlusschromatographie

Bei diesem Chromatographieverfahren handelt es sich um ein Ausschlussprinzip nach der Größe. Als Trennmittel wird ein Gel mit einer bestimmten Porengröße verwendet. Kleine Proteinmoleküle können in diese Poren eindringen und wandern so langsamer durch die Gelsäule als große, die nicht eindringen.

Da es sich hier um ein wässriges Trennsystem handelt, spricht man auch von Gelfiltrationschromatographie (GFC), im Gegensatz zu Systemen mit einem nicht-wässrigen Trennmittel, bei denen es sich um Gelpermeationschromatographie (GPC) handelt.

In dieser Arbeit wurde eine Superose 12 - Säule (Pharmacia, Partikelgröße von $10 \pm 2 \mu\text{m}$) verwendet, die mit Hilfe einer FPLC-Anlage (Fast Protein Liquid Chromatography) beladen und gesteuert wurde. Die verwendeten Protein-Lösungen hatten eine Konzentration von 1 mg/ml und wurden mit einem Volumen von 500 μl aufgetragen. Die Fließgeschwindigkeit

betrug 0,5 ml/min. Zur Kalibrierung der Gelfiltrations-Säule wurden verschiedene Standards eingesetzt, die in Tab. 2.1 aufgelistet sind.

Tab. 2.1 Standardproteine zur Kalibrierung der Gelfiltrationssäule und Kalkulation der apparenten molaren Masse des fraglichen Proteins

Standard	Größe in kDa
Bluedextran	2000
Ferritin	400
Katalase	240
BSA	66
Ovalbumin	45
Carboanhydrase	30
Myoglobin	17
Cytochrom C	12,7

Bluedextran gilt an dieser Stelle zur Bestimmung des Totvolumens der Säule, da das Molekül eine Größe besitzt, die es ohne Hinderung durch die Säule laufen lässt.

Um hydrophobe Wechselwirkungen zu lösen und den Komplex in Untereinheiten zu spalten, wurde das Protein mit dem Detergenz Dodecyl- β -D-Maltosid (β -DM, Endkonzentrationen: 1, 2,5, 5, 10, 20 und 40 mM) versetzt. Nach einer Inkubation über 30 min. auf Eis wurde die Gelfiltration wiederholt, wobei die Gelfiltrationssäule auch mit einem Detergenz-haltigen Puffer äquilibriert war. Die entsprechenden Standardproteine wurden ebenfalls mit Dodecyl- β -D-Maltosid behandelt.

2.12 Einfluss verschiedener Lichtintensitäten auf *P. fluorescens* Bk3

Da es sich bei *P. fluorescens* Bk3 um ein Isolat aus der Phyllosphäre von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox handelt, sind sie, je nach klimatischer Situation und Lage des Blattes, unterschiedlichen Strahlungsbedingungen ausgesetzt. Um den Einfluss verschiedener Lichtintensitäten auf die Bakterien zu untersuchen, wurden Bakterien-Flüssigkulturen mit *P. fluorescens* Bk3 in LB-Medium bei verschiedenen Lichtbedingungen (0, 100 und 1000 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$) inkubiert. Damit eine möglichst große Fläche der Flüssigkultur dem Licht ausgesetzt werden konnte, wurden Kulturkolben nach Fernbach verwendet.

2.13 Bestimmung von Aminosäure-Sequenzen aus isolierten Proteinen

Zur Bestimmung von Aminosäure-Sequenzen wurde die *de novo* Sequenzierung mittels Massenspektrometrie angewandt. Hier wird durch eine Ionenquelle aus der zu analysierenden Probe ein gasförmiger Ionenstrahl erzeugt, der im Folgenden nochmal in einer Stoßzelle fragmentiert wird. Die Detektion erfolgt auf der Grundlage des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses. Zu Grunde liegt hier die Flugzeit der Ionen.

Diese Analyse wurde freundlicherweise von PD Dr. Markus Piotrowski, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie in der Ruhr-Universität Bochum an einem Q-ToF2 (Micromass, Waters, Manchester, UK) durchgeführt. Der Homologien-Vergleich erfolgte mit Hilfe diverser Datenbanken im Internet.

Als Probengrundlage diente eine PAGE (s. 2.6), die zuvor zur Visualisierung der Protein-Banden mit Coomassie (s. 2.7.2) gefärbt wurde. Die entsprechenden Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Im weiteren wurden die Proteine von den Gelresten nach der Methode von Jensen et al. (1998) befreit.

Die ausgeschnittenen Proteinbanden wurden in kleine Stücke geschnitten und in ein Eppendorf-Reaktions-Gefäß gegeben. Dann wurden sie in ihrem doppelten Volumen mit Azetonitril (ACN, 50 %) versetzt und unter Schütteln (450 rpm) 15 min. inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde dieser Vorgang wiederholt.

Die Gelstücke wurden in einfachem Volumen ACN aufgenommen, gemischt und 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen des Azetonitril wurde dieser Vorgang nochmals mit Ammonium-Bicarbonat (100 mM) wiederholt. Es folgte die Zugabe eines einfachen Volumens an ACN und die Inkubation unter Schütteln (450 rpm) für 15 min. bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Flüssigkeit vollständig entfernt.

Die Gelstückchen wurden unter Vakuum (SpeedVac) getrocknet, im doppelten Volumen Dithiothreitol (DTT, 10 mM gelöst in 100 mM Ammonium-Bicarbonat) aufgenommen und 45 min. bei 56°C inkubiert. Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 5 min. abgekühlt.

Dann wurde die Flüssigkeit vollständig entfernt und die Gelstückchen im doppelten Volumen Iodacetamid (55 mM gelöst in 100 mM Ammonium-Bicarbonat) aufgenommen. Der Ansatz wurde unter Lichtabschluss für 30 min. inkubiert.

Material und Methoden

Nach Entfernen des Überstandes wurden die Gelstückchen im einfachen Volumen Ammonium-Bicarbonat (100 mM) aufgenommen und 30 min. bei Raumtemperatur geschüttelt (450 rpm). Nach Zugabe von einem Volumen ACN folgte eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min. unter Schütteln (450 rpm). Der Überstand wurde entfernt, sollten die Gelstückchen noch immer mit Coomassie blau angefärbt sein, waren die letzten beiden Inkubationsschritte nochmals zu wiederholen.

Die Gelstücke wurden nach vollständiger Entfernung des Farbstoffs unter Vakuum (SpeedVac) getrocknet. Dann erfolgte eine schrittweise Zugabe von Trypsin (0,01 µg/µl in 50 mM Ammonium-Bicarbonat). Die getrockneten Gelstückchen wurden auf Eis gelagert und mit 10 µl Trypsinlösung versetzt. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis wurden weitere 10 µl hinzu gegeben. Auf diese Weise wurde ein langsames Quellen und Eindringen der Enzym-Lösung in die Gelstücke erreicht. Sobald eine maximale Quellung erreicht war, wurde die Trypsin-Lösung vollständig entfernt und die Gelstückchen mit Ammonium-Bicarbonat (25 mM) bedeckt. Der enzymatische Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C.

Am folgenden Tag folgte das Herauslösen der verdauten Peptide aus den Gelstückchen. Diese wurden dafür zunächst in den Reaktionsgefäßen nach Eppendorf kurz anzentrifugiert und für 2 min. in ein Ultraschallbad gestellt. Die Flüssigkeit wurde in ein neues Reaktionsgefäß gesammelt. Die Gelstückchen wurden mit einem Volumen Ammonium-Bicarbonat (25 mM) versetzt und 20 min. bei Raumtemperatur geschüttelt (450 rpm). Anschließend wurde ein Volumen ACN hinzu gegeben und weitere 15 min. bei Raumtemperatur unter Schütteln (450 rpm) inkubiert. Nach 2 min. im Ultraschallbad wurde die überständige Flüssigkeit mit der bereits abgesammelten Flüssigkeit in einem separaten Reaktionsgefäß vereint.

Die Gelstücke wurden mit einem Gemisch aus Ameisensäure (5 %) und ACN (Verhältnis 1:1) versetzt und 15 min. unter Schütteln (450 rpm) inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und der bereits gesammelten Flüssigkeit zugefügt. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt.

Die gewonnene Flüssigkeit, welche die Peptide der Proteinbanden enthielt, wurde unter Vakuum (SpeedVac) auf ein Volumen von 10 - 15 µl gebracht.

Die durch die *de novo* Sequenzierung erhaltenen Aminosäure-Sequenzen wurden mittels Datenbankenabgleich auf Homologien bereits bekannter Sequenzen analysiert.

2.14 Inokulieren von *in vitro*-Pflanzen (*M. domestica* cv. Holsteiner Cox)

2.14.1 Inokulation mit *P. fluorescens* Bk3

Es sollte ein Vergleich erhoben werden, ob auf Transkriptom-Ebene ein Unterschied zu erkennen ist, wenn die Bakterienzellen in Flüssigkultur (LB-Medium) angezogen werden, oder auf der Blattoberfläche einer Apfel-Pflanze leben. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Populationen des gleichen Bakterienstammes *P. fluorescens* Bk3 erstellt.

Die eine wurde in LB-Flüssigmedium unter den bekannten Bedingungen kultiviert, während die andere auf *in vitro*-Pflanzen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox aufgebracht und dort kultiviert wurde.

Für das Aufbringen auf die Pflanzen wurde zunächst eine Übernachtskultur (5 ml) mit Zellen einer Glycerin-Dauerkultur beimpft. Die Zellen der Übernachtskultur (2 ml davon) wurden zwei Mal mit destilliertem und autoklaviertem Wasser unter sterilen Bedingungen gewaschen, in 2 ml Wasser aufgenommen und mit Hilfe einer Sprühflasche auf die Pflanzen in den Tanks aufgebracht. Die Pflanzen wurden 5 Tage in der Klimakammer inkubiert (24°C, 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus), um den Bakterienzellen die Möglichkeit der Etablierung auf den Blattoberflächen zu geben.

Zur Ernte der Bakterien wurden die Blätter von den Pflanzen abgetrennt und 1 min. in 1x PBS-Puffer leicht geschüttelt. Die Blätter wurden entfernt und der bakterienhaltige Puffer abzentrifugiert. Das Pellet bestehend aus Bakterien wurde direkt für weitere molekularbiologische Zwecke eingesetzt.

2.14.2 Inokulieren mit dem isolierten Protein-Komplex

Um die RNA-Reaktion von *M. domestica* auf den Kontakt mit dem isolierten Protein-Komplex analysieren zu können, wurde dieser unter sterilen Bedingungen auf die *in vitro*-Pflanzen aufgebracht (2,5 ml, 95 µg Protein/ml). Dafür wurde er zunächst steril filtriert und mit einer Sprühflasche direkt auf die Pflanzen im Tank aufgesprüht. Die Pflanzen wurden 5 Tage in der Klimakammer inkubiert (24°C, 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus).

Anschließend wurde das Blattmaterial geerntet. Für die spätere Isolierung von RNA wurden die Blätter sofort in flüssigem Stickstoff konserviert. Die Lagerung erfolgte bis zum Einsatz in molekularbiologische Methoden bei -70°C .

Zur Isolierung der Apoplastenflüssigkeit wurden die Blätter direkt eingesetzt (vgl. 2.15).

Als Negativ-Kontrolle wurden *in vitro*-Pflanzen mit sterilem Kalium-Phosphat-Puffer (20 mM, pH 8,0) inokuliert (24°C , 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus).

2.15 Isolierung von Apoplastenflüssigkeit

Der Apoplast übernimmt in der Pflanze Transport- und Reaktionsfunktionen, so dass er eine besondere Rolle in der Betrachtung der Reaktion auf Pathogene darstellt.

Die Apoplastenflüssigkeit wurde nach einer modifizierten Methode von Gau et al. (2004) isoliert. Dafür wurden die Pflanzenblätter geerntet, in dem sie an der Petiole abgeschnitten und mit Wasser unter Vakuum infiltriert wurden. Im Anschluss wurden sie zwischen zwei stabile Plastikfolien eingerollt und 5 Minuten bei 750 rpm (Jouan Zentrifuge, Rotor: AC50.10) abzentrifugiert, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen.

Beim nächsten Zentrifugationsschritt über 15 Minuten bei 2400 rpm (Jouan Zentrifuge, Rotor: AC50.10) wurde die eigentliche Apoplastenflüssigkeit aus den Blättern abzentrifugiert, die die im Apoplasten befindlichen Proteine beinhaltet.

2.16 Isolierung von Gesamt-RNA

2.16.1 Isolierung aus Pflanzenmaterial

Zur Isolierung der pflanzlichen RNA wurde ein Isolierungs-Kit von Macherey-Nagel (NucleoSpin® RNA Plant) verwendet. Dafür wurden ca. 100 mg unter Stickstoff pulverisiertes Pflanzenmaterial eingesetzt. Nach der Zell-Lyse folgte ein Filtrationsschritt, um grobe Zellreste zu entfernen. Im Anschluss wurde die RNA an eine Silica-Säule gebunden. Das Säulenmaterial wurde entsalzt und die vorhandene DNA durch einen Verdau mit DNase entfernt. Nach verschiedenen Waschschrinen wurde die gereinigte RNA von der Membran eluiert.

Material und Methoden

Vorschrift:

Homogenisieren der Zelle	maximal 30 mg Pflanzenmaterial wurden unter flüssigem Stickstoff durch Mörsern pulverisiert	
Zell-Lyse	Überführen des Pflanzenpulvers in ein Reaktionsgefäß nach Eppendorf Zugabe von 350 µl RA1-Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol	mischen mittels Vortex
Filtration des Lysats	Gemisch auf einen NucleoSpin® Filter geben	1 min. bei 11000x g zentrifugieren
Anpassen der RNA-Bindungs-Bedingungen	Zugabe von 350 µl Ethanol (70 %) zum Filtrat	mischen
RNA binden	Lysat auf eine NucleoSpin® RNA II Säule laden	30 s bei 11000x g zentrifugieren
Silica-Membran entsalzen	Auftragen von 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer) auf die Säule	1 min. bei 11000x g zentrifugieren
DNA-Verdau	Auftragen von 95 µl DNase Reaktions-Puffer (10 µl rDNase, 90 µl Reaktions-Puffer für rDNase) auf die Säule	15 min. bei Raumtemperatur inkubieren
Waschen und Trocknen der Silica-Membran	Auftragen von 200 µl RA2-Puffer auf die Säule zum Inaktivieren der rDNase	30 s bei 11000x g zentrifugieren
	Auftragen von 600 µl RA3-Puffer auf die Säule	30 s bei 11000x g zentrifugieren
	Auftragen von 250 µl RA3-Puffer auf die Säule	2 min. bei 11000x g zentrifugieren
Elution der RNA	Auftragen von 60 µl H ₂ O (RNase frei) auf die Säule	1 min. bei 11000x g zentrifugieren

2.16.2 Isolierung aus Bakterien-Zellen

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Bakterien-Zellen wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet, je nach erwünschtem Reinheitsgrad und Ausbeute.

2.16.2.1 Isolierung durch NucleoSpin® RNA II

Die bakterielle RNA wurde ähnlich wie die pflanzliche RNA mit Hilfe eines Isolierungs-Kits von Macherey-Nagel (NucleoSpin® RNA II) isoliert. Zunächst wurde hierfür die Zellzahl durch das Auszählen der Bakteriensuspension in der Thoma-Kammer bestimmt.

Es wurden maximal 10^9 Zellen eingesetzt. Die Bakterien wurden durch die Zugabe von mit Lysozym versetztem TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer) homogenisiert, bevor eine Zell-Lyse folgte.

Das Lysat wurde filtriert, um überschüssige Zellreste zu entfernen. Die RNA wurde an die Silica-Säule gebunden, die anschließend entsalzt wurde. Vorhandene DNA wurde durch die Zugabe von DNase abgebaut. Nach verschiedenen Waschschritten konnte die RNA von der Silica-Membran eluiert werden.

Vorschrift:

Homogenisieren der Probe	maximal 10^9 Bakterien-Zellen wurden eingesetzt Zellen resuspendieren Zugabe von 100 μ l TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) mit 0,2 mg/ml Lysozym	mischen mittels Vortex Inkubation 10 min. bei 37°C
Zell-Lyse	Zugabe von 350 μ l RA1-Puffer und 3,5 μ l β -Mercaptoethanol	mischen mittels Vortex
Filtration des Lysats	Lysat auf einen NucleoSpin® Filter laden	1 min. bei 11000x g zentrifugieren
Anpassen der RNA-Bindungs-Bedingungen	Zugabe von 350 μ l Ethanol (70 %) zum Filtrat	mischen
dann weiter wie in 2.16.1 beschrieben		

2.16.2.2 Isolierung durch Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Methode erfolgt nach Reddy et al. (1990) durch Phenol-/Chloroform-Extraktion. Bei RNA-Isolierungen nach dieser Methode kam es zu einer erhöhten Ausbeute durch eine zuvor eingesetzte größere Bakterienmenge. Die Zellen wurden aus 50 ml einer Bakterien-Flüssigkultur (LB-Medium) gewonnen (Zentrifugation: 10 min. bei 10000 rpm, Jouan Zentrifuge, Rotor AC50.10), sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und direkt vor dem Einsatz in die Isolierung auf Eis aufgetaut.

Material und Methoden

Vorschrift:

Zell-Lyse	Zugabe von 2 ml STET-Puffer (eiskühlt, frisch zusammen gesetzt) resuspendieren	<i>STET-Puffer:</i> 20 ml Saccharose (40 %) 5 ml Tris (1 M, pH 7,0) 5 ml EDTA (0,1 M, pH 8,0) 5 ml Triton X-100 69 ml H ₂ O (destilliert, autoklaviert)
Fällung von Proteinen	Zugabe von 1 ml Phenol (60°C), mischen mittels Vortex, Zugabe von 1 ml Chloroform, mischen mittels Vortex 10 min. bei 4°C und 10000 rpm (Jouan Zentrifuge, Rotor AC50.10) zentrifugieren Fällungsschritt mit dem Überstand 3 Mal wiederholen Chloroform-Fällung mit dem Überstand 2 Mal wiederholen	
Fällung von RNA	Zugabe von 200 µl Natrium-Azetat (3 M, pH 6,0) und 2 Volumen Ethanol abs. Inkubation: 2 h bei -20°C Pellet unter Vakuum im Exsikkator trocknen	
Abbau von DNA	RNA in 300 µl TE-Puffer resuspendieren Zugabe von 30 µl 10x DNase-Puffer und 3 µl DNase I (RNase frei, Boehringer) 30 min. bei 37°C inkubieren	<i>TE-Puffer:</i> 10 mM Tris (pH 8,0) 1 mM EDTA <i>10x DNase-Puffer:</i> 1 M Natrium-Azetat pH 5,0 50 mM Magnesium-Sulfat
Phenol-/Chloroform- Extraktion zum Entfernen der Proteine	Zugabe von 300 µl Phenol / Chloroform (1:1) 10 min. bei 4°C und 10000 rpm (Jouan Zentrifuge, Rotor AC50.10) zentrifugieren Fällung mit dem Überstand wiederholen Zugabe von 300 µl Chloroform zum Überstand 10 min. bei 4°C und 10000 rpm (Jouan Zentrifuge, Rotor AC50.10) zentrifugieren	

Material und Methoden

	Fällung mit dem Überstand wiederholen	
RNA-Fällung	Zugabe von 30 µl Natrium-Azetat (3 M, pH 6,0) und 2 Volumen Ethanol abs. zum Überstand Inkubation: mind. 2-3 Stunden (besser über Nacht) bei -20°C Pellet in 30 µl TE-Puffer lösen	<i>TE-Puffer:</i> 10 mM Tris (pH 8,0) 1 mM EDTA

Die so erhaltene prokaryontische Gesamt-RNA wurde bis zum Einsatz in molekularbiologische Techniken bei -70°C gelagert.

2.17 RNA-Gelelektrophorese

Hier wurden Agarosegele (1,5 %) mit 1,1 % Formaldehyd angewandt. Die Aldehydgruppen des Formaldehyd bilden mit den Nucleotiden Adenin, Guanin und Cytosin Schiff'sche Basen, wodurch die RNA denaturiert wird. Um eine Reaktion zwischen Formaldehyd und Aminogruppen im Laufpuffer, wie beispielsweise bei Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) zu vermeiden, wird bei diesen Gelen als Puffersystem MOPS (3-Morpholino-1-propansulfonsäure) in Verbindung mit Natrium-Azetat eingesetzt.

Die RNA-Proben wurden 15 Minuten bei 65°C in Probenpuffer denaturiert. Der Probenpuffer enthielt bereits Ethidiumbromid, was sich durch Interaktion mit den eigenen aromatischen Ringen und den heteroaromatischen Ringen der Basen der Nucleinsäuren anlagert. Durch Anregung mit UV-Licht (Wellenlänge von 254 - 366 nm) können die angefärbten Nucleinsäuren sichtbar gemacht werden.

<i>Formaldehyd- Agarose-Gel:</i>	Agarose	1,5 g
	H ₂ O	86,5 ml
	nach kurzem Aufkochen und Abkühlen auf ca. 50°C Zugabe von	
	10x MOPS-Puffer	10 ml
	37 % Formaldehyd	3,4 ml
<i>10x MOPS- Puffer:</i>	MOPS	0,2 M
	Natrium-Azetat	50 mM
	EDTA	10 mM
	pH 7,0	

Material und Methoden

<i>Probenpuffer:</i>	Lösung 1	5 ml
	(1x MOPS, pH 7,0 6,5 % Formaldehyd 50 % Formamid)	
	Lösung 2	1 ml
	(0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylene Cyanol 50 % Glycerin 1 mM EDTA 40 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml))	

Als Standard wurde der λ DNA/*Hind*III Marker, 2 von Fermentas verwendet.

2.18 Isolierung von DNA

2.18.1 Isolierung von Plasmiden durch alkalische Lyse (HB-Lyse)

Hierbei handelt es sich um die gebräuchlichste Methode zur Isolierung von Plasmiden. Die Bakterienzellen werden pelletiert und in einem EDTA-haltigen Puffer aufgenommen, der für die Komplexierung zweiwertiger Ionen verantwortlich ist, so dass die Bakterienzellen destabilisiert werden. Um unerwünschte bakterielle RNA abzubauen, wird diesem Puffer RNase A zugeführt. Im Anschluss werden die Bakterienzellen durch die Zugabe von SDS und Natrium-Hydroxid (NaOH) vollständig lysiert, wobei chromosomale und Plasmid-DNA, sowie Proteine denaturiert werden. Zur Neutralisierung wird ein saurer Kalium-Azetat-Puffer verwendet, wodurch es zur Präzipitation der Proteine und der chromosomalen DNA kommt. Die im Lösungsüberstand enthaltene Plasmid-DNA wird mit einer Fällung durch Isopropanol gereinigt. Das Plasmid-Pellet wird mit 70 %igem Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet, und in autoklaviertem H₂O gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Vorschrift:

Destabilisierung der Bakterien-Zellen	1,5 ml Übernacht-Kultur für 2 min. bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11) Pellet in 300 µl Puffer 1 resuspendieren	<i>Puffer 1:</i> 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 400 µg/ml RNase
Alkalische Lyse der Zellen	Zugabe von 300 µl Puffer 2, mischen Inkubation: 5 min. bei Raumtemperatur	<i>Puffer 2:</i> 200 mM NaOH 1 % SDS

Material und Methoden

Neutralisation	Zugabe von 300 µl Puffer 3, mischen Inkubation: 10 min. bei Raumtemperatur	<i>Puffer 3:</i> 2,55 M Kalium-Azetat, pH 4,8
	Zentrifugation: 10 min. bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11) Zentrifugationsschritt mit dem Überstand wiederholen	
Fällung der DNA	800 µl der Überstandes mit 700 µl Isopropanol versetzen, mischen mittels Vortex Zentrifugation: 30 min. bei 13000 rpm (Eppendorf Zentrifuge, Rotor F45-24-11)	
Waschen der DNA	Pellet mit 500 µl kaltem Ethanol (70 %) überschichten Inkubation: 2 min. Zentrifugation: 10 min. bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11) Pellet 10 min. bei 60°C trocknen Pellet in 50 µl TE-Puffer aufnehmen und 10 min. bei 50°C lösen	<i>TE-Puffer:</i> 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA

2.18.2 Isolierung von Plasmiden durch GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit

Zur Präparation von Plasmiden wurde das GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit von Fermentas verwendet. Auch hierbei handelt es sich im Grundprinzip um eine alkalische Lyse, der allerdings noch verschiedene Aufreinigungsschritte angeschlossen sind. So wird nach der Lyse der DNA-haltige Überstand über eine Silica-Membran aufgereinigt, mit einem alkoholhaltigen Puffer gewaschen und durch Wasser oder einen Elutionspuffer eluiert. Auf diese Weise erhält man einen höheren Reinheitsgrad, der für weitere Experimente entscheidend sein kann.

Vorschrift:

Destabilisierung der Bakterien-Zellen	1 - 5 ml Bakterienzellen einer Übernacht-Kultur 10 min. bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren Pellet in 250 µl Resuspension Solution resuspendieren
Zell-Lyse	Zugabe von 250 µl Lysis Solution mischen durch 4- bis 6-maliges Invertieren

Material und Methoden

Neutralisation	Zugabe von 350 µl Neutralization Solution und sofort mischen durch 4- bis 6-maliges Invertieren 5 min. bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren Überstand auf eine Säule (GeneJET™ spin column) auftragen 1 min. bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren
Plasmid-DNA waschen	500 µl Wash Solution auf die Säule auftragen 30 - 60 s bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren Waschschritt nochmals wiederholen
Membran trocknen	Säule 1 min. bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren
Elution der Plasmid-DNA	50 µl Elution Buffer oder H ₂ O auf die Säule auftragen Inkubation: 2 min. bei Raumtemperatur 2 min. bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren

Die isolierte Plasmid-DNA wurde bis zum weiteren Einsatz für molekularbiologische Techniken bei -20°C gelagert.

2.19 DNA-Gelelektrophorese

Als Trägermaterial wurde in TAE-Puffer gelöste Agarose verwendet, wobei die Konzentration der Agarose je nach Fragestellung zwischen 0,8 und 2 % variierte. Zur Visualisierung der im Gel gelaufenen DNA-Banden erfolgte eine Färbung mit Ethidiumbromid für 20 - 30 Minuten. Das Färbeprinzip hierfür wurde bereits unter 2.17 beschrieben.

Als Standard zur Bestimmung der Molekülgrößen wurden der GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) für kleinere, und der GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) für größere Moleküle verwendet.

TAE-Puffer: 40 mM Tris
10 mM Natrium-Azetat
1 mM EDTA
pH 7,8

Probenpuffer: 15 % Glycerin
0,01 % Bromphenolblau /
Xylencyanol
in TAE-Puffer

Die Elektrophoresen wurden bei einer elektrischen Spannung von 80 Volt durchgeführt.

2.20 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Das Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren liegt bei 260 nm, wodurch man eine Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäure-haltigen Lösungen photometrisch durchführen kann, in dem die OD_{260} gemessen wird. Dabei wird davon ausgegangen, dass eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml RNA, bzw. 50 µg/ml DNA entspricht.

2.21 Entfernen von ribosomaler RNA aus prokaryontischer Gesamt-RNA

Ribosomale RNA macht zusammen mit der transfer-RNA den größten Bestandteil der Gesamt-RNA aus. Deswegen wurde die ribosomale RNA als Vorbereitung für die Suppression-Subtraktions-Hybridisierung, die mit prokaryontischer RNA durchgeführt werden sollte, mit einer Methode nach Mamat (Research Center Borstel) entfernt.

Zuerst werden biotinierte Primer mit 16S- und 23S-rRNA-Sequenzen an die entsprechenden Moleküle innerhalb der Gesamt-RNA hybridisiert. Die Zugabe von Magnet-Partikeln, die mit Streptavidin gekoppelt sind, ermöglicht eine Komplexbildung zwischen Biotin und Streptavidin, und in Folge dessen auch zwischen der ribosomalen RNA und den Magnet-Partikeln, die durch das Anlegen eines Magnetfeldes räumlich beeinflusst, und so von den restlichen RNA-Molekülen getrennt werden können.

Vorschrift:

Hybridisierung	20 µg Gesamt-RNA SSC-Puffer 1 µl 16SL_Biotin Primer 1 µl 16SR_Biotin Primer 1 µl 23S_118R_biotin Primer 1 µl 23S_1370V_biotin Primer Gesamt-Vol.: 100 µl	<i>SSC-Puffer:</i> 15 mM Natrium-Zitrat, pH 7,0 150 mM Natrium-Chlorid
----------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------

Material und Methoden

Inkubation:

5 min. bei 70°C

15 min. bei 56°C

Zugabe von 200 µl Streptavidin
Magnetic Beads (New England
Biolabs Inc.)

Inkubation:

15 min. auf Eis

Anlegen des
Magnetfeldes

Reaktionsgefäß auf einen
starken Magneten setzen
(auf Eis)
nach 5 min. den Überstand
abnehmen

Die Primer wurden in einer Konzentration von 10 pmol/µl eingesetzt.

Zur Kontrolle wurde sowohl die Konzentration photometrisch bestimmt (s. 2.20), als auch ein Agarose-Gel (s. 2.17) angefertigt.

Um das Volumen zu reduzieren, wurde eine Ethanol-Fällung angeschlossen, indem die Probe mit dem Doppelten ihres Volumens an Ethanol abs. versetzt und 2 Stunden bei -20°C inkubiert wurde. Nach Abzentrifugieren (20 min. bei 4°C und 13000 rpm, Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11) wurde der Überstand verworfen und das Pellet direkt für das Poly(A)-Tailing (s. 2.22) eingesetzt.

2.22 Poly(A)-Tailing an prokaryontische RNA

Da prokaryontische mRNA über nahezu keinen Poly(A)-Schwanz verfügt, dieser allerdings für die Methode der Suppression-Subtraktions-Hybridisierung von großer Bedeutung als Bindestelle für Oligo(dT)-Primer ist, wird auf künstlichem Wege mit Hilfe einer Poly(A)-Polymerase eine Polyadenylierung nach einer Methode von Mamat (Research Center Borstel) vorgenommen, um einen Poly(A)-Schwanz zu erhalten.

Reaktionsansatz:

5x Poly(A)-Polymerase-Puffer (USB, 100 mM Tris-HCl, pH 7,0, 250 mM KCl, 3,5 mM MnCl ₂ , 1 mM EDTA, 500 µg/ml azetyliertes BSA, 50 % Glycerol)	5 µl
RNA (s. 2.21)	Pellet
dATP (25 mM)	0,5 µl
Poly(A)-Polymerase (USB, 600 units/µl)	1 µl
RNase freies H ₂ O	18,5 µl

Material und Methoden

Inkubationen:

Denaturierung:	5 min.	70°C
Polyadenylierung:	25 min.	37°C
Denaturierung:	10°C	65°C

Um das Volumen zu reduzieren, wurde der Ansatz anschließend wie bereits unter 2.21 beschrieben mit Ethanol abs. gefällt.

2.23 Aufreinigung der Poly(A)-RNA mit Oligo(dT)-Cellulose-Partikeln

Durch diesen Vorgang nach einer Methode von Mamat (Research Center Borstel) wird die erhaltene Poly(A)-RNA (s. 2.22) durch die Anlagerung an Oligo(dT)-Cellulose-Partikel und die spätere Elution gereinigt.

Vorschrift:

Vorbereitung der Oligo(dT)-Cellulose-Partikel (Beads)	150 µl Oligo(dT) ₂₅ Cellulose-Beads (New England Biolabs Inc.) 20 s bei 5000x g abzentrifugieren Überstand verwerfen Beads in 500 µl Lade-Puffer äquilibrieren durch 2 min. leichtes Schütteln (Hand) Zentrifugationsschritt wiederholen	<i>Lade-Puffer:</i> 0,5 M Natrium-Chlorid 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA
Vorbereitung der RNA	RNA-Pellet (s. 2.22) in 500 µl Lade-Puffer lösen Inkubation: 5 min. bei 65°C auf Eis abkühlen lassen	
Anlagerung der Poly(A)-RNA an die Oligo(dT)-Partikel	gelöste RNA zu den vorbereiteten Oligo(dT)-Partikeln geben 5 min. unter leichtem Schütteln (Hand) bei Raum-Temperatur inkubieren 10 min. bei 5000x g zentrifugieren Überstand 5 min. bei 65°C inkubieren auf Eis abkühlen lassen und erneut zu den Oligo(dT)-Partikeln geben 5 min. unter leichtem Schütteln (Hand) bei Raum-Temperatur inkubieren	
Waschen der Oligo(dT)-Partikel	500 µl Lade-Puffer zu den Oligo(dT)-Partikel geben 5 min. bei 5000x g zentrifugieren Überstand abnehmen und aufbewahren diesen Waschvorgang 4 mal wiederholen	

Material und Methoden

	500 µl Niedrig-Salz-Puffer zu den Oligo(dT)-Partikel geben 5 min. bei 5000x g zentrifugieren Überstand abnehmen und aufbewahren	<i>Niedrig-Salz-Puffer:</i> 0,1 M Natrium-Chlorid 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA
Elution	250 µl Elutions-Puffer (auf 70°C vorgewärmt) zu den Oligo(dT)-Partikeln geben 5 min. bei 5000x g zentrifugieren Überstand abnehmen und aufbewahren diesen Vorgang nochmals wiederholen	<i>Elutions-Puffer:</i> 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA
Detektion der gereinigten Poly(A)-RNA	alle gesammelten Fraktionen werden im Photometer analysiert, um die RNA ausfindig zu machen	
Fällung der RNA zur Reinigung	Zugabe von Natrium-Azetat (3 M) auf eine Endkonzentration von 0,3 M und 2,2 Volumen Ethanol abs. Inkubation: 2 h bei -20°C Zentrifugation: 20 min. bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11) Pellet mit Ethanol (70 %) überschichten Zentrifugation: 10 min. bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11)	

Die Lagerung der RNA erfolgte bei -70°C.

2.24 Transkription von RNA in cDNA

Die Transkription erfolgt durch Reverse Transkriptasen, die auch als RNA-abhängige DNA-Polymerasen bezeichnet werden, und in der Lage sind, aus einer mRNA, die als Matrize vorliegt, den komplementären DNA-Strang zu bilden.

2.24.1 Transkription durch Verwendung der Reversen Transkriptase

Die Reverse Transkription (RT-PCR) wurde als Vorbereitung für eine semiquantitative Analyse der vorhandenen mRNA angewendet. Sie besteht im Wesentlichen aus zwei Schritten, wobei zunächst durch eine Reverse Transkriptase die RNA in cDNA transkribiert wird, und dann die Transkripte mit einer herkömmlichen PCR amplifiziert werden.

Material und Methoden

In dieser Arbeit wurde die MMLV-RTase (RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas) verwendet, die ursprünglich aus dem Moloney-Murine-Leukemia-Virus isoliert wurde, woher auch ihr Namen stammt. Sie ist in der Lage, einen Strang von 10 kb zu synthetisieren.

Reaktionsansatz 1:

Gesamt-RNA	500 ng
dNTP-Mix (10 mM, Fermentas)	1 µl
Oligo(dT)23-Primer (100 pmol/µl, MWG)	1 µl
H ₂ O	4 µl

Inkubationen:

70°C (Wasserbad)	10 min.
auf Eis	2 min.

Zugabe von Reaktionsansatz 2 (10 µl):

H ₂ O	6 µl
5x Puffer für M-MuLV (Fermentas)	2 µl
RNase Inhibitor 1 U/µl (Fermentas)	1 µl
M-MuLV Reverse Transkriptase (Fermentas)	1 µl

Inkubation: 1 h bei 50°C

Die cDNA konnte direkt in eine PCR eingesetzt, oder bei -20°C gelagert werden.

2.24.2 Transkription durch Verwendung des High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix und anschließender Doppelstrang-Synthese mit PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit

Hierbei handelt es sich um einen fertigen Mix, der bereits alle Komponenten für die Reverse Transkription enthält. Zusätzlich zum Oligo(dT)-Primer, der an den Poly(A)-Schwanz bindet, enthält dieser Mix Random Primer, die dazu führen, dass auch ohne die Binde-Stelle eines Poly(A)-Schwanzes eine Amplifikation stattfinden kann. Dabei handelt es sich um ein Gemisch aus allen möglichen Hexanucleotiden, so dass es statistisch gesehen an jeder Stelle des DNA-Strangs zu einer Hybridisierung kommen kann.

Material und Methoden

Reaktionsansatz:

RNA-Template (1 pg - 1 µg, maximal 16 µl)	x µl
Master Mix (5x konzentriert)	4 µl
Nuclease-freies H ₂ O	y µl
Gesamt-Volumen: 20 µl	

Inkubation im Thermocycler:

25°C	5 min.
42°C	30 min.
85°C	5 min.
4°C	∞

Das hier erhaltene Produkt wurde zur cDNA-Doppelstrang-Synthese in das PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech Laboratories) eingesetzt.

Reaktionsansatz:

cDNA	10 µl
steriles H ₂ O	48,4 µl
5x Second-Strand Buffer	16 µl
dNTP Mix (10 mM)	1,6 µl
20x Second-Strand Enzyme Cocktail	4 µl

Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei 16°C. Anschließend wurden 2 µl T4 DNA Polymerase (6 u) zugefügt und weitere 30 min. bei 16°C inkubiert. Das Stoppen der Reaktion wurde durch die Zugabe von 4 µl 20x EDTA/Glycogen erreicht.

Anschließend wurde die cDNA durch Phenol-/Chloroform-Extraktionen aufgereinigt.

Fällung der Proteine Zugabe von 100 µl PCI

PCI:
25 Teile Phenol
(zuvor äquilibriert in TNE-Puffer
(50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM
Natrium-Chlorid, 1 mM EDTA))
24 Teile Chloroform
1 Teil Isoamyl-Alkohol

mischen mittels Vortex

Material und Methoden

	10 min. bei 13000 rpm (Eppendorf Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren	
	Zugabe von 100 µl CI zum Überstand	<i>CI:</i> 24 Teile Chloroform 1 Teil Isoamyl-Alkohol
	mischen mittels Vortex 10 min. bei 13000 rpm (Eppendorf Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren	
Fällen der cDNA	Zugabe von 40 µl Ammonium-Azetat (4 M) und 300 µl Ethanol (95 %) zum Überstand	
	mischen mittels Vortex 20 min. bei 13000 rpm (Eppendorf Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren	
	Überstand verwerfen und Pellet 10 min. lufttrocknen lassen	
	Lösen der cDNA in 50 µl sterilem H ₂ O	

Die daraus erhaltene cDNA wurde im weiteren Verlauf für die Suppression-Subtraktions-Hybridisierung (SSH) eingesetzt (s. 2.25).

2.24.3 Transkription durch SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit

Für diese Methode wird das SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit von Clontech verwendet. Hier kommt es zunächst zu einer Einzelstrang-Synthese durch reverse Transkriptase mit Hilfe eines CDS Primers und der Anwesenheit von SMART II A Oligonukleotiden. Außerdem kommt es zu einem dC-Tailing, wodurch das Template in cDNA umgeschrieben und verlängert wird. Abschließend kommt es zu einer Amplifizierung der erhaltenen cDNA, an dessen Ende eine doppelsträngige cDNA entsteht.

Material und Methoden

Einzelstrang-Synthese:

Reaktionsansatz:

RNA (0,05 - 1 µg Gesamt-RNA oder 0,025 - 1 µg Poly(A)-RNA)	1 - 3 µl
3'SMART CDS Primer II A	1 µl
SMART II A Oligonukleotide	1 µl
deionisiertes H ₂ O	x µl
Gesamt-Volumen: 5 µl	
Inkubation: 2 min. bei 72°C	

Zugabe von:

5x First-Strand Buffer	2 µl
DTT (20 mM)	1 µl
dNTP Mix (10 mM pro dNTP)	1 µl
PowerScript Reverse Transcriptase	1 µl

Inkubation: 1 h bei 42°C

Der Reaktions-Ansatz wird mit TE-Puffer (10 mM Tris (pH 7,6), 1 mM EDTA) verdünnt, wobei folgende Verdünnungsstufen zu berücksichtigen sind:

nach Verwendung von Gesamt-RNA	40 µl TE-Puffer
nach Verwendung von mehr als 0,2 µg Poly(A)-RNA	450 µl TE-Puffer
nach Verwendung von weniger als 0,2 µg Poly(A)-RNA	90 µl TE-Puffer

Die verdünnte Probe wird 7 min. bei 72°C inkubiert. Die Lagerung erfolgt bis zum Einsatz der cDNA-Amplifizierung mittels LD-PCR bei -20°C.

Bei der LD-PCR wird die normale PCR in 3 parallelen Ansätzen durchgeführt. Mit einem der Parallel-Ansätze wird die optimale Zyklen-Zahl für diese PCR ermittelt, indem nach den ersten 15 Zyklen alle 3 Zyklen ein Aliquot entnommen wird, bis 24 Zyklen beprobt wurden. Von diesen Aliquots werden anschließend 5 µl zur Kontrolle auf eine Agarose-Gel aufgetragen (s. 2.19), um festzustellen, welches die optimale Zyklenzahl ist. Die beiden anderen PCR-Ansätze der ursprünglich drei parallelen Ansätze werden nach dem 15. Zyklus aus der PCR-Maschine entnommen, bei 4°C gelagert bis die optimale Zyklenzahl bestimmt wurde und mit den fehlenden PCR-Zyklen ergänzt.

Material und Methoden

Master-Mix:

deionisiertes H ₂ O	74 µl
10x Advantage 2 PCR Buffer	10 µl
50x dNTP Mix (10 mM pro dNTP)	2 µl
5' PCR Primer II A	2 µl
50x Advantage 2 Polymerase Mix	2 µl
<hr/>	
Gesamt-Volumen: 90 µl	

Je nach Typ und Menge der Ausgangs-RNA variiert der Einsatz der Template-cDNA.

Gesamt-RNA	Volumen der doppelsträngigen cDNA als Einsatz für das Template
ca. 1 µg	1 µl
ca. 0,5 µg	2 µl
ca. 0,25 µg	4 µl
ca. 0,1 µg	10 µl
ca. 0,05 µg	10 µl

Poly(A)-RNA	Volumen der doppelsträngigen cDNA als Einsatz für das Template
ca. 1 µg	1 µl
ca. 0,5 µg	2 µl
ca. 0,1 - 0,25 µg	4 µl
ca. 0,05 µg	8 µl
ca. 0,025 µg	10 µl

Das entsprechende Volumen wird ggf. auf 10 µl mit deionisiertem H₂O aufgefüllt und als Template in die LD-PCR eingesetzt.

PCR-Programm:

95°C	1 min.	
95°C	15 s	x Zyklen
65°C	30 s	
68°C	6 min.	

Nach Abschluss der kompletten LD-PCR wird zur Kontrolle ein weiteres Agarose-Gel angefertigt (s. 2.19), um die Konzentration der beinhaltenen cDNA zu überprüfen.

Material und Methoden

Um die PCR-Reaktion zu stoppen, werden die Proben mit 2 µl EDTA (0,5 M) versetzt. Anschließend wird die amplifizierte cDNA mit Hilfe von CHROMA SPIN 1000 Columns (Clontech Laboratories) aufgereinigt.

Vorschrift:

Fällung von Proteinen	Zugabe eines äquivalenten Volumens an PCI zur cDNA	<i>PCI:</i> 25 Teile Phenol (zuvor äquilibriert in TNE-Puffer (50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM Natrium-Chlorid, 1 mM EDTA)) 24 Teile Chloroform 1 Teil Isoamyl-Alkohol
	mischen mittels Vortex 10 min. bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren	
Volumen reduzieren	Zugabe von 700 µl n-Butanol zum Überstand mischen mittels Vortex 1 min. bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren obere Phase verwerfen	
Säulenchromatographie	Probe auf die vorbereitete Säule CROMA SPIN1000 auftragen Zugabe von 25 µl TNE-Puffer	<i>TNE-Puffer:</i> 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM NaCl 0,1 mM EDTA
	nach komplettem Durchfluss Zugabe von 150 µl TNE-Puffer anschließend Zugabe von 320 µl TNE-Puffer anschließend Zugabe von 75 µl TNE-Puffer alle Fraktionen des Durchflusses werden gesammelt	

Um die entsprechende Fraktion mit der gereinigten cDNA zu detektieren, wurde zur Kontrolle ein Agarose-Gel angefertigt (s. 2.19).

2.25 Supression-Subtraktions-Hybridisierung (SSH)

Durch die Supression-Subtraktions-Hybridisierung (SSH) besteht die Möglichkeit, zwei verschiedene mRNA-Populationen miteinander zu vergleichen, und Gene, die in einer der beiden Populationen hoch bzw. runter reguliert werden, zu identifizieren. Um die beiden Populationen auf Transkriptom-Ebene miteinander vergleichen zu können, wird im ersten Schritt die isolierte RNA (s. 2.16) in cDNA transkribiert (s. 2.24), und anschließend in die SSH eingesetzt. Die SSH besteht aus verschiedenen Hybridisierungsschritten, die in Abb. 2.2 schematisch dargestellt sind.

Als Driver dient die cDNA aus der Population, die als Standard betrachtet wird und unbehandelt geblieben ist. Der Tester hingegen beinhaltet die cDNA aus der Population, die eine Behandlung erfahren hat. Vorausgehend wurde jeweils die RNA isoliert, wie unter 2.16 beschrieben und durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben, wie unter 2.24 beschrieben. Nach einem Restriktionsverdau der cDNA-Populationen mit dem Restriktions-Enzym *RsaI* sind blunt ends an den Molekülen entstanden, an die Adaptoren ligiert werden. Diese sind für die abschließende PCR von Bedeutung, da sie die Bindestellen für die verwendeten Primer bilden.

Im Anschluss an die Ligation kommt es zu zwei verschiedenen Hybridisierungsschritten, wobei beim ersten die mit den unterschiedlichen Adaptoren ligierten Tester-Populationen getrennt mit der jeweiligen Driver-Population inkubiert werden. Dann werden beide Hybridisierungsansätze mit frisch denaturierter Driver-cDNA versetzt und erneut hybridisiert. In abschließenden PCR-Schritten können die Tester-Populations-Fragmente, die nicht mit der Driver-Population hybridisieren konnten, amplifiziert werden, da sie die zuvor ligierten Adaptoren besitzen. Auf diese Weise erhält man cDNA, die im Tester, im Gegensatz zum Driver, exprimiert wurden.

Material und Methoden

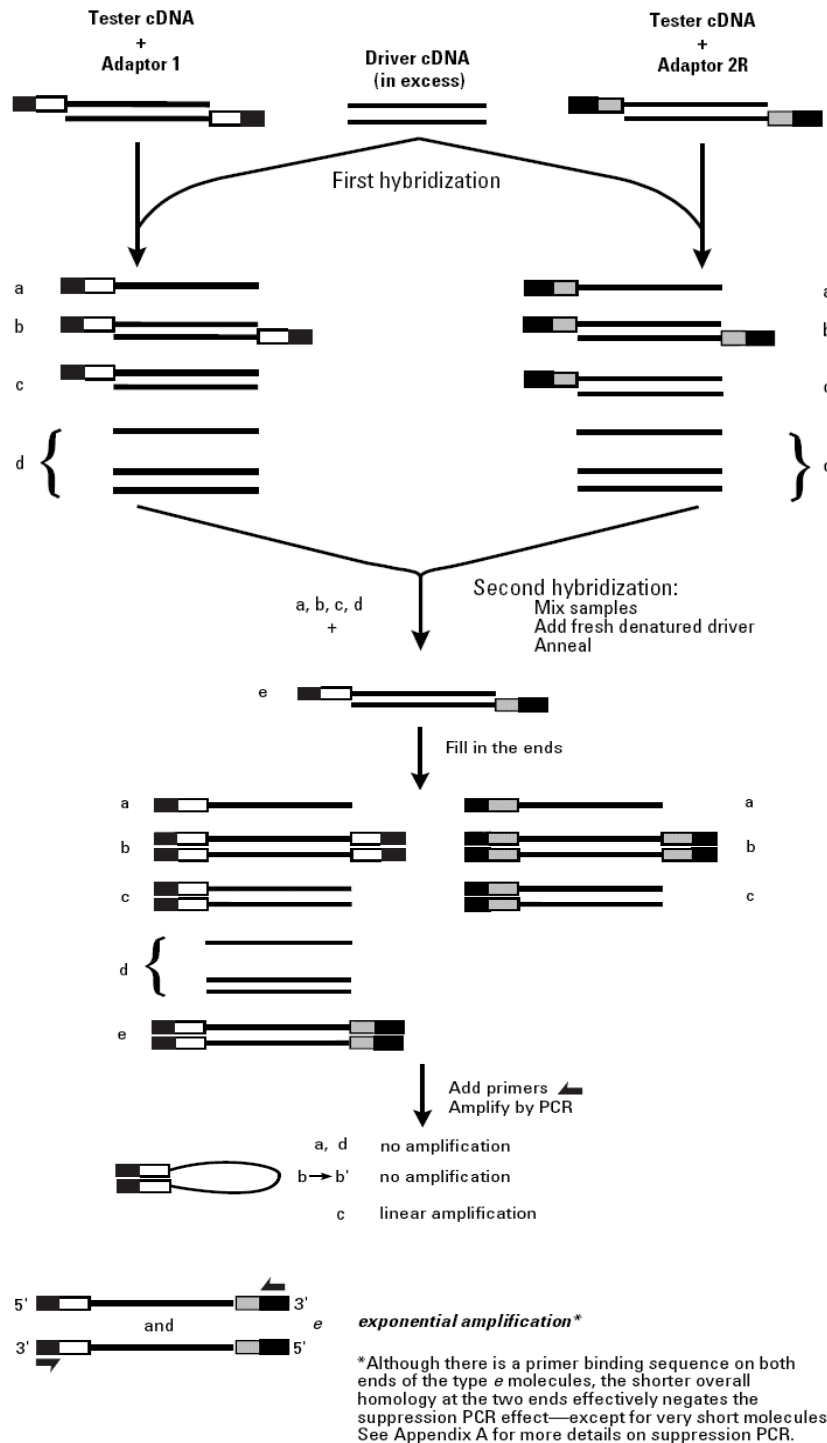


Abb. 2.2 Schematische Darstellung der Suppression-Subtraktions-Hybridisierung (SSH). Driver = cDNA aus der unbehandelten Population, Tester = cDNA aus der behandelten Population, entnommen aus dem User-Manual von Clontech Laboratories

Die entstandenen PCR-Produkte werden zur weiteren Identifizierung in den pGEM-T Vector ligiert (s. 2.26), um hoch regulierte Transkripte zu amplifizieren, nachfolgend zu sequenzieren und durch Datenbankrecherche und Abgleich mit vorhandenen Sequenzen zu identifizieren.

2.25.1 *Rsa*I-Spaltung der cDNA

Um die Hybridisierung zu ermöglichen, müssen zunächst die Moleküle der cDNA mit dem Restriktionsenzym *Rsa*I gespalten werden. Es entstehen kleinere Fragmente mit blunt ends, an die im weiteren Verlauf die entsprechenden Adaptoren ligiert werden.

Zugabe folgender Komponenten zur cDNA (s. 2.24):

10x <i>Rsa</i> I Restriktions-Puffer	36 µl
<i>Rsa</i> I (10 units)	1,5 µl

Die Inkubation erfolgte bei 37°C, nach Verwendung des SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech Laboratories) für 3 Stunden, nach Verwendung des High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems) für 1,5 Stunden. In einem Agarose-Gel (s. 2.19) wurde kontrolliert, ob die Spaltung erfolgreich war.

2.25.2 Aufreinigung der gespaltenen cDNA

Um die Reinheit der cDNA für die weitere Vorgehensweise zu erhöhen, wurde ein Reinigungsschritt vorgenommen. Dieser unterscheidet sich je nach Methode zum Erhalt der cDNA.

2.25.2.1 nach Transkription der cDNA durch High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix

Nach Anwendung des High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix wurde die Aufreinigung wie folgt durchgeführt.

Reaktionsstop nach <i>RsaI</i> -Verdau	Zugabe von 2,5 µl 20x EDTA/Glycogen Mix	
Fällung der Proteine	Zugabe von 50 µl PCI	<i>PCI</i> : 25 Teile Phenol (zuvor äquilibriert in TNE-Puffer (50 mM Tris, pH 7,5, 150 mM Natrium-Chlorid, 1 mM EDTA) 24 Teile Chloroform 1 Teil Isoamyl-Alkohol
	mischen mittels Vortex, 10 min. bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren	
	Zugabe von 50 µl CI zum Überstand	<i>CI</i> : 24 Teile Chloroform 1 Teil Isoamyl-Alkohol
	mischen mittels Vortex 10 min. bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren	
Fällung der verdauten cDNA	Zugabe von 25 µl Ammonium- Azetat (4 M) und 187,5 µl Ethanol (95 %)	
	mischen mittels Vortex 10 min. bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren	
	Überstand verwerfen	
Waschen der verdauten cDNA	Pellet mit 200 µl Ethanol (80 %) überschichten	
	5 min. bei 13000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren	
	Überstand verwerfen Pellet 5 - 10 min. lufttrocknen lassen	
	pelletierte cDNA in 5,5 µl H ₂ O lösen	

Die aufgereinigte und verdaute cDNA steht jetzt zur weiteren Vorgehensweise der SSH zur Verfügung.

2.25.2.2 nach Transkription der cDNA durch SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit

Die Aufreinigung erfolgte hier mit dem NucleoTrap® CR Kit von Macherey-Nagel, wobei es sich um das Prinzip der Silica-Matrix Technologie handelt und entsprechende Silica-Partikel zum Einsatz kommen. Ein weiterer Aufreinigungsschritt erfolgt durch die NucleoTrap® Microfiltern von Macherey-Nagel.

Reaktionsstop nach <i>Rsal</i> -Verdau	Zugabe von 8 µl EDTA (0,5 M)	
	cDNA wird in zwei gleich große Teile fraktioniert, um eine bessere Aufreinigung zu ermöglichen	
Binden der cDNA an Silica-Partikel	Zugabe von 680 µl Puffer NT2 und 17 µl NucleoTrap-Suspension (zuvor resuspendiert)	
	Inkubation: 10 min. bei Raumtemperatur, dabei alle 2 - 3 min. mischen	
	1 min. bei 10000 rpm (Eppendorf Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren	
Waschen der Silica- Partikel	Überstand verwerfen	
	Zugabe von 680 µl Puffer NT2 resuspendieren	
	1 min. bei 10000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren	
	Überstand komplett entfernen und Waschschrift wiederholen	
	1 min. bei 10000 rpm (Eppendorf Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren	
	das Pellet 15 min. lufttrocknen	
Elution der cDNA	Resuspension der Partikel in 50 µl TE-Puffer	<i>TE-Puffer:</i> 10 mM Tris, pH 8,0 1 mM EDTA

Material und Methoden

	Inkubation: 5 min. bei 50°C, während dieser Zeit 2 - 3 Mal mischen
Aufreinigung des Eluats	Überstand der Partikel auf einen NucleoTrap Microfilter geben
	5 min. bei 13000 rpm (Eppendorf Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren
Fällung der cDNA	Zugabe des halben Volumens Ammonium-Azetat (4 M) und des 2,5 fachen Volumens an Ethanol (95 %)
	mischen mittels Vortex 20 min. bei 13000 rpm (Eppendorf Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren
	Überstand verwerfen
Waschen der cDNA	Pellet mit 500 µl Ethanol (80 %) überschichten
	10 min. bei 13000 rpm (Eppendorf Zentrifuge, Rotor F45-24-11) zentrifugieren
	Überstand verwerfen Pellet 5 - 10 min. lufttrocknen lassen
	pelletierte cDNA in 6,7 µl TNE-Puffer lösen
	<i>TNE-Puffer:</i> 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM NaCl 0,1 mM EDTA

Die aufgereinigte und verdaute cDNA steht jetzt zur weiteren Vorgehensweise der SSH zur Verfügung.

2.25.3 Adaptor-Ligation der cDNA der tester-Population

Ausschließlich bei der cDNA der tester-Population werden Adaptoren ligiert, da diese nach den Hybridisierungsschritten für die Amplifizierung der nicht hybridisierten tester-cDNA als Bindestellen für die Primer dienen.

Von der aus 2.25.2 erhaltenen cDNA wird 1 µl mit 5 µl sterilem H₂O verdünnt.

Material und Methoden

Master Mix:

steriles H ₂ O	3 µl
5x Ligation Buffer	2 µl
T4 DNA Ligase (400 units/µl)	1 µl

Da es sich um zwei verschiedene Arten von Adaptoren handelte (Adaptor 1 und Adaptor 2R, vgl. Abb. 2.2), wurden parallel zwei Ansätze durchgeführt.

Schema:

	Ansatz 1 (Tester 1-1)	Ansatz 2 (Tester 1-2)
verdünnte cDNA (s.o.)	2 µl	2 µl
Adaptor 1 (10 µM)	2 µl	-
Adaptor 2R (10 µM)	-	2 µl
Master Mix (s.o.)	6 µl	6 µl

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 µl EDTA/Glycogen Mix und einer Inkubation von 5 min. bei 72°C beendet.

2.25.4 Erste Hybridisierung

In der ersten Hybridisierung wurde die driver-cDNA mit den beiden ligierten tester-cDNA getrennt hybridisiert (vgl. Abb. 2.2).

Schema:

	Hybridisierungsprobe 1	Hybridisierungsprobe 2
<i>Rsa</i> I-verdaute driver-cDNA	1,5 µl	1,5 µl
Adaptor 1-ligierte tester-cDNA	1,5 µl	-
Adaptor 2R-ligierte tester-cDNA	-	1,5 µl
4x Hybridization Buffer	1 µl	1 µl

Die Ansätze wurden in der PCR-Maschine wie folgt inkubiert.

98°C	1,5 min.
68°C	8 h

Die zweite Hybridisierung war sofort im Anschluss durchzuführen.

2.25.5 Zweite Hybridisierung

An dieser Stelle wurden die beiden Proben der ersten Hybridisierung (s. 2.25.4) gemischt und zusätzlich mit frisch denaturierter driver-cDNA versetzt.

Zur Denaturierung der driver-cDNA wurde folgender Ansatz vorbereitet:

driver-cDNA (s. 2.25.2)	1 µl
4x Hybridization Buffer	1 µl
steriles H ₂ O	2 µl

Davon wurde 1 µl (mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet) für 1,5 min. bei 98°C denaturiert. Anschließend wurde der zweite Hybridisierungs-Ansatz gemischt, indem in einer Pipettenspitze zunächst die Hybridisierungsprobe 2 (s. 2.25.4) und dann die frisch denaturierte driver-cDNA aspiriert wurde, um dann in einer Pipettenspitze, getrennt durch ein kleines Luftpolster, in die Hybridisierungsprobe 1 (s. 2.25.4) pipettiert zu werden. Die erneute Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C.

Abschließend wurde der Ansatz mit 200 µl Dilution Buffer verdünnt und nochmal 7 min. bei 68°C inkubiert.

Die Hybridisierung war nun abgeschlossen, so dass die nicht hybridisierten tester-cDNA-Moleküle mit einer anschließenden PCR amplifiziert werden konnten.

2.25.6 PCR-Amplifizierung der nicht hybridisierten tester-cDNA

Die unterschiedlich exprimierte cDNA, die durch die Hybridisierung aus 2.25.5 ermittelt wurde, wurde nun in zwei aufeinander folgenden PCR amplifiziert. In der ersten PCR wurden die cDNA-Moleküle mit unterschiedlichen Adaptoren (1 und 2R, s. 2.25.3) amplifiziert, und

Material und Methoden

bei der anschließenden Nested PCR der Hintergrund minimiert, und die unterschiedlich exprimierten Sequenzen nochmals amplifiziert wurden.

PCR-Reaktionsansatz:

steriles H ₂ O	19,5 µl
10x PCR Reaction Buffer	2,5 µl
dNTP Mix (10 mM)	0,5 µl
PCR Primer 1 (10 µM)	1 µl
50x Advantage cDNA Polymerase Mix	0,5 µl
verdünnte cDNA (s. 2.25.5)	1 µl

Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung	75°C	5 min.	
Denaturierung	94°C	30 s	27 Zyklen
Annealing	66°C	30 s	
Elongation	72°C	1,5 min.	

Zum Überprüfen der PCR wurde eine Agarose-Gelelektrophorese angefertigt (s. 2.19). Waren an dieser Stelle keine PCR-Produkte zu sehen, wurden 3 zusätzliche Zyklen der PCR durchlaufen. Die Kontrolle erfolgte dann nochmals durch ein Agarose-Gel.

Als Kontrolle (Obligations-Kontrolle) galt ein Ansatz, in dem je 2 µl der Ansätze Tester 1-1 und Tester 1-2 (s. 2.25.3) gemischt, und ebenfalls wie die anderen Ligations-Ansätze inkubiert wurde. Von diesem Ansatz wurde anschließend 1 µl mit 1 ml H₂O verdünnt und bis zur Durchführung dieser PCR bei -20°C gelagert. Anschließend wurden 3 µl des PCR-Produktes mit 27 µl H₂O verdünnt, wovon 1 µl für die folgende PCR eingesetzt wurde.

PCR-Reaktions-Ansatz:

steriles H ₂ O	18,5 µl
10x PCR Reaction Buffer	2,5 µl
Nested PCR primer 1 (10 µM)	1 µl
Nested PCR primer 2R (10 µM)	1 µl
dNTP Mix (10 mM)	0,5 µl
50x Advantage cDNA Polymerase Mix	0,5 µl
verdünntes PCR-Produkt (s.o.)	1 µl

PCR-Programm:

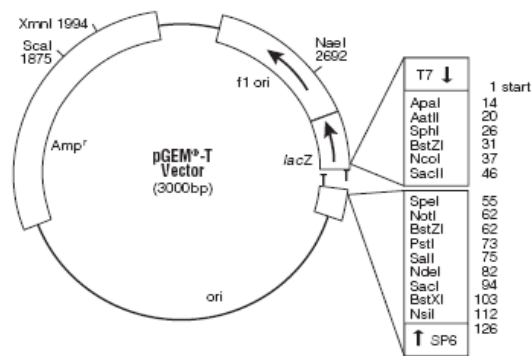
Denaturierung	94°C	30 s	10 - 12 Zyklen
Annealing	68°C	30 s	
Elongation	72°C	1,5 min.	

Zur Kontrolle wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.19) durchgeführt. Waren hier keine PCR-Produkte zu detektieren, bestand die Möglichkeit, 3 zusätzliche Zyklen der PCR durchlaufen zu lassen. Dann erfolgte nochmals eine Kontrolle durch eine Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.19).

Die so erhaltenen PCR-Produkte am Ende der SSH konnten nun in einen Vector kloniert werden.

2.26 Klonierung in pGEM[®]-T Vector

Die aus der SSH erhaltenen cDNA-Fragmente wurden in den Klonierungsvector pGEM[®]-T ligiert, um sie anschließend in *E. coli* TOP10 zu klonieren. Mit diesem bekannten Backbone ist es möglich, eine gezielte Sequenzierung durchzuführen. In Abb. 2.3 befindet sich die Vektorkarte mit den Informationen zu Restriktions- und Primer-Bindestellen.



pGEM[®]-T Vector circle map and sequence reference points.

pGEM[®]-T Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-113
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	124-143
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	126
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	161-177
<i>lacZ</i> start codon	165
<i>lac</i> operator	185-201
β -lactamase coding region	1322-2182
phage fl region	2365-2820
<i>lac</i> operon sequences	2821-2981, 151-380
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2941-2957
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2984-3

Abb. 2.3 Vector-Karte von pGEM[®]-T (Promega), entnommen von Promega.

Innerhalb der Multiple Cloning Site (MCS) befinden sich verschiedene Restriktionsschnittstellen, sowie die Bindestellen für verschiedene Primer. Der Vector besitzt zum ligieren Poly(T)-Enden, an die die Poly(A)-Bindestellen der Fremd-DNA ligiert werden können. Es handelt sich um ein high-copy-Plasmid, mit dessen Hilfe später auch eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt werden kann (s. 2.28). Außerdem verfügt der Vector zu Selektions-Zwecken über eine Ampicillin-Resistenz. Dadurch wachsen auf Ampicillin-haltigen Medien nur Bakterien, die den Vector enthalten.

Reaktionsansatz:

	Proben- Ansatz	Positiv- Kontrolle	Negativ- Kontrolle
2x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 µl	5 µl	5 µl
pGEM®-T Vector (50 ng)	1 µl	1 µl	1 µl
PCR-Produkt	x µl	-	-
Kontroll-Insert DNA	-	2 µl	-
T4 DNA Ligase (3 Weiss units / µl)	1 µl	1 µl	1 µl
deionisiertes Wasser für ein endgültiges Volumen von 10 µl	y µl	1 µl	3 µl

Nach der SSH (s. 2.25) wurden 3 µl der PCR-Produkte in den Reaktionsansatz eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

2.27 Transformation in *E. coli* Top10

Durch die Transformation wird Fremd-DNA in Bakterienzellen eingebracht, um sie dann durch die natürliche Zellteilung der Bakterien zu vermehren. Dabei gibt es drei verschiedene Varianten:

- 1) die Hitzeschock-Transformation, bei der die kompetenten Zellen für kurze Zeit einer erhöhten Temperatur von 42°C ausgesetzt werden, um auf diese Weise das Plasmid aufzunehmen. Der Mechanismus hierfür ist noch weitgehend unbekannt.
- 2) die Elektroporation, bei der die elektrokompenten Zellen kurzzeitig einem elektrischen Feld mit hoher Stärke ausgesetzt werden. Dadurch verändert sich die Membranpermeabilität so, dass das Plasmid aufgenommen werden kann.
- 3) die Konjugation, bei der sich die natürliche Fähigkeit des Plasmid-Transfers mancher Bakterien zu Nutzen gemacht wird.

In dieser Arbeit wurde die Hitzeschock-Transformation durchgeführt, da es sich um die Methode mit der höchsten Effizienz handelt.

2.27.1 Herstellung kompetenter Bakterien-Zellen

Die Hitzeschocktransformation erfolgte nach der Methode von Inuo et al. (1990) mit dem Bakterienstamm *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen). Die Bakterien wurden bei 18°C in 30 ml LB-Medium angezogen, bis sie bei einer Wellenlänge von 600 nm eine OD₆₀₀ von 0,55 - 0,6 erreichten.

Die Kultur wurde 10 min. auf Eis gelagert und dann 10 min. bei 4000x g und 4°C zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 19,2 ml eiskaltem Inuo-Puffer resuspendiert. Es erfolgte eine weitere Inkubation von 10 min. auf Eis bevor die Zellen unter bereits bekannten Bedingungen erneut zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde erneut verworfen, und die pelletierten Zellen in 2,4 ml Inuo-Puffer resuspendiert.

Es wurden 84 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzu gegeben und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Mit vorgekühlten Pipettenspitzen wurden Aliquots von 100 µl erstellt und direkt in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

Inuo-Puffer:

15 mM	CaCl ₂
250 mM	KCl
55 mM	MnCl ₂
55 mM	Pipes
pH 6,7	

2.27.2 Durchführung der Hitze-Schock-Transformation

Die kompetenten Zellen wurden direkt vor Verwendung vorsichtig aufgetaut. Von der zu transformierenden DNA wurden 10 ng hinzu pipettiert. Es erfolgte eine Inkubation auf Eis für 10 min., bevor die Zellen für 45 - 55 s bei 42°C im Wasserbad dem Hitzeschock ausgesetzt wurden. Die Zellen wurden nochmals für 2 min. auf Eis inkubiert und anschließend mit 950 µl SOC-Medium (auf Raumtemperatur vortemperiert) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden bei 37°C unter Schütteln wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten ausgestrichen.

In diesem Fall enthielt das LB-Medium zu Selektionszwecken das Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) und für die Blau-Weiß-Selektion X-Gal (40 µg/ml) und IPTG (0,1 mM, s. 2.28).

SOC-Medium:

0,5 %	Hefe-Extrakt
2 %	Trypton
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄
20 mM	Glucose

2.28 Blau-Weiß-Selektion

Die Multiple Cloning Site im Vector pGEM[®]-T befindet sich innerhalb eines *lac*-Operons. Normalerweise codiert das *lac*-Operon für das Enzym β -Galactosidase, das durch den Indikator-Farbstoff 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) blau angefärbt werden kann. Es handelt sich dabei um eine enzymatische Reaktion, bei der X-Gal durch β -Galactosidase zum blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo umgesetzt wird. Die Transkription wird dabei durch den Zusatz von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Ist das Operon jedoch durch den Einbau eines Inserts, beispielsweise durch eine erfolgreiche Klonierung, unterbrochen, so wird keine β -Galactosidase produziert. Es kommt nicht zur Blaufärbung der Bakterien-Kolonien, und sie bleiben weiß. Durch diese Möglichkeit kann man die Kolonien, in denen sich ein Plasmid mit kloniertem Insert befindet, von denen ohne Insert unterscheiden.

Die Reagenzien X-Gal (40 µg/ml) und IPTG (0,1 mM) wurde dem LB-Medium nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50°C zugefügt, bevor es zum Aushärten in Petrischalen gegossen wurde.

2.29 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) werden DNA-Bereiche amplifiziert, die zuvor durch das Einsetzen bestimmter Primer festgelegt wurden. Der DNA-Doppelstrang wird erst denaturiert, damit er als Einzelstrang vorliegt, und im weiteren Verlauf als Matrize

Verwendung findet. Anschließend kommt es zur Hybridisierung der Primer. Bei den Primern handelt es sich um Oligonukleotide, die auf einen bestimmten DNA-Bereich abgestimmt sind. An diese bindet die DNA-Polymerase, die unter Anwesenheit von Desoxyribonukleotid-Triphosphaten (dNTPs) den neuen, komplementären DNA-Strang synthetisiert. Dieser Zyklus wird mehrere Male durchlaufen, wobei es zu einer exponentiellen Zunahme an amplifizierten DNA-Molekülen kommt.

In diesem Fall wurden die Primer T7-forward und M13-reverse entsprechend der Bindestellen am verwendeten Vector ausgewählt. Als Polymerase wurde die *Taq*-Polymerase (vgl. 2.29.1) verwendet.

2.29.1 Herstellung der *Taq*-Polymerase

Die *Taq*-Polymerase ist ein Enzym, was ursprünglich aus dem thermostabilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus* isoliert wurde und für den Großteil der PCRs eingesetzt wird. Es handelt sich dabei um eine 5'→3' Exonuclease mit einer 3'-Adenylierungsaktivität. Sie ist in der Lage, bis zu ca. 6000 bp zu amplifizieren.

Um die *Taq*-Polymerase zu isolieren, wurde eine Bakterienkultur vom Stamm *E. coli* BC 21 TAQ in LB unter Anwesenheit von Ampicillin (100 µg/ml) angezogen, bis bei einer Wellenlänge von 600 nm eine OD₆₀₀ von 0,3 erreicht war. Zur Enzym-Induktion wurde IPTG (Endkonzentration von 0,5 mM) hinzu gegeben und für weitere 16 Stunden inkubiert. Nach Bestimmung der Zellzahl durch Hämatokrit-Röhrchen wurde die Bakterienkultur 10 min. bei 4000 rpm (Sorvall Zentrifuge, GS-3 Rotor) zentrifugiert, und anschließend der Kulturüberstand verworfen.

Die pelletierten Zellen wurden in Resuspensionspuffer aufgenommen, und auf eine Konzentration von 100 µl Zellen / ml eingestellt. Die resuspendierten Zellen wurden in der French-Press durch zweimaliges Pressen bei einem Druck von 20000 PSI aufgeschlossen. Bei diesem Verfahren werden die Zellen durch eine enge Öffnung gepresst, wobei die auftretenden Scherkräfte die Zellen zerstören.

Durch Zentrifugation wurden die Zelltrümmer entfernt. Die im Überstand enthaltenen Enzyme wurden durch die Inkubation bei 75°C für 1 Stunde unter leichtem Schütteln inaktiviert. Anschließend wurde die Suspension zwei Mal für 10 min. bei 2000 rpm zentrifugiert (Jouan Zentrifuge, AC50.10 Rotor). Der Überstand wurde über Nacht gegen einen Tris-Puffer (50 mM, pH 8,0) dialysiert.

Material und Methoden

Am folgenden Tag wurde das Dialysat 10 min. bei 10000 rpm abzentrifugiert (Jouan Zentrifuge, AC50.10 Rotor). Der Überstand wurde auf eine durch eine FPLC-Anlage gesteuerte MonoQ-Säule gegeben.

Das Chromatographie-Prinzip ist vergleichbar mit dem unter 2.11.1 beschriebenen. Bei dem Säulenmaterial handelt es sich um stark anionisch wirkende, quaternäre Trimethylaminoethylgruppen, an die die Polymerase bindet.

Das Enzym wurde im Anschluss mit einem NaCl-Gradienten (Elutionspuffer) in einem Konzentrationsanstieg von 0 - 500 mM eluiert. Zur Kontrolle wurde von den Aliquots, die bei allen Schritten gesammelt wurden, eine SDS-PAGE angefertigt. Die Fraktionen, die nach Elution die *Taq*-Polymerase enthielten, wurden gepoolt, gegen TNEDT-Puffer über Nacht dialysiert und am nächsten Tag mit gleichem Volumen Storage-Puffer verdünnt. Es wurden Aliquots von je 100 µl erstellt, die bei -70°C gelagert wurden.

<i>Tris-Puffer:</i>	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
<i>TNEDT-Puffer:</i>	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA	0,1 mM
	DTT	0,5 mM
	Triton X-100	1 %
<i>Elutionspuffer:</i>	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	500 mM
<i>Storage-Puffer:</i>	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA	0,1 mM
	DTT	0,5 mM
	Triton X-100	1 %
	Glycerin	75 %

2.29.2 Kolonie-PCR

Um die unterschiedlichen Inserts als Produkte der SSH in den gewachsenen Bakterien-Kolonien nach Blau-Weiß-Selektion zu detektieren, wurde die Kolonie-PCR angewendet. Als Template diente eine gepickte Kolonie, die in den vorgelegten PCR-Reaktions-Ansatz hinein gebracht wurde.

Material und Methoden

Reaktions-Ansatz:

dNTP-Mix (40 mM, 10 mM je dNTP, Fermentas)	0,5 µl
10x <i>Taq</i> -Polymerase-Reaktions-Puffer	2,5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (s. 2.29.1)	1 µl
T7-forward-Primer (amersham)	2 µl
M13-reverse-Primer (MWG)	2 µl
H ₂ O	16 µl

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind der Primer-Liste im Anhang zu entnehmen.

10x <i>Taq</i> -Reaktions-Puffer:	Tris/HCl, pH 8,3	100 mM
	KCl	500 mM
	MgCl ₂	11 mM
	Gelatin	0,1 %

PCR-Programm:

Denaturierung	94°C	3 min.	
Denaturierung	94°C	30 s	35 Zyklen
Annealing	45°C	30 s	
Elongation	72°C	1 min.	
Abschließende Elongation	72°C	3 min.	

Zur Visualisierung der PCR-Produkte wurde ein Agarose-Gel (s. 2.19) verwendet.

2.29.3 Semiquantitative RT-PCR mit ausgewählten Transkripten

Um vorab eine Aussage über Unterschiede der Transkriptlevel bei *M. domestica* cv. Holsteiner Cox nach Behandlung mit dem isolierten Protein-Komplex (s. 2.14.2) treffen zu können, wurde mit verschiedenen Primern eine PCR durchgeführt. Die Primer detektieren cDNA (s. 2.24.1), die aus einer Antwort durch *M. domestica* cv. Holsteiner Cox auf Pathogeneinfluss resultiert.

Material und Methoden

PCR-Reaktions-Ansatz:

Template, hier: cDNA aus Reverser Transkription	1 μ l
dNTP-Mix (40 mM, 10 mM je dNTP, Fermentas)	0,5 μ l
10x <i>Taq</i> -Polymerase-Reaktions-Puffer (s. 2.29.2)	2,5 μ l
<i>Taq</i> -Polymerase (s. 2.29.1)	1 μ l
forward-Primer	2 μ l
reverse-Primer	2 μ l
H ₂ O	16 μ l

Die verwendeten Primer sind in Tab. 2.2 aufgeführt.

PCR-Programm:

Denaturierung	94°C	3 min.	
Denaturierung	94°C	30 s	35 Zyklen
Annealing	45°C	30 s	
Elongation	72°C	1 min.	
Abschließende Elongation	72°C	3 min.	

Die Visualisierung der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.19).

Tab. 2.2 Verwendete Primer, sowie ihre Annealing-Temperaturen

Primer	Name	Annealing-Temperatur	Fragment-Größe
Protease Subunit Alpha Type 4	Prota4	50°C	324 bp
Avr9/Cf-9rapidly elicited Protein 284	Avr9	50°C	178 bp
Ribonuclease-ähnliches Protein PR10b	Pr10	50°C	280 bp
Heat Shock Protein 90	HSP90	50°C	207 bp
Transmembrane CLPTM1 family	S56	50°C	159 bp
Glutathion-S-transferase	GluStrans	50°C	478 bp
Germin-ähnliches Protein	Germl	50°C	262 bp
β -Actin		50°C	238 bp

Die Primer-Sequenzen sind der Primer-Liste im Anhang zu entnehmen.

β -Actin gilt als unabhängiger Parameter und dient als Kontrolle zur Überprüfung der eingesetzten Menge. Diese sollte bei beiden eingesetzten Populationen gleich sein, um auch die Menge an DNA, die durch die PCR amplifiziert wurde, beurteilen zu können. Zur Visualisierung der PCR-Produkte wurde ein Agarose-Gel (s. 2.19) angefertigt.

2.30 Restriktions-Enzymspaltung

Eine weitere Methode zum Detektieren von vorhandenen Inserts in den Plasmiden, die nach der SSH kloniert wurden, war die Restriktions-Spaltung. Wie bereits unter 2.26 beschrieben, besitzt der Vector pGEM[®]-T verschiedene Schnittstellen innerhalb der Multiple Cloning Site. Mit Hilfe dieser Information wurden die Restriktions-Enzyme *NcoI* und *SacI* (Fermentas) ausgewählt. Sie flankieren das Insert, so dass es direkt aus dem Backbone des Vectors heraus geschnitten werden kann.

Restriktionsansatz:

Plasmid-DNA	2 μ l
Enzym I (hier: <i>NcoI</i> , 10 units/ μ l, Fermentas)	0,3 μ l
Enzym II (hier: <i>SacI</i> , 10 units/ μ l, Fermentas)	0,3 μ l
10x Tango-Reaktions-Puffer (Fermentas, 33 mM Tris-Azetat, pH 7,9, 66 mM Kalium-Azetat, 10 mM Magnesium-Azetat, 0,1 mg/ml BSA)	2 μ l
H ₂ O	5,4 μ l

Die Spaltung erfolgte über Nacht bei 37°C. Zur Visualisierung der Spaltprodukte wurde ein Agarose-Gel (s. 2.19) angewendet.

2.31 Dot Blot-Hybridisierung

Die Hybridisierung basiert auf der Basenpaarung der komplementären DNA-Basen mit Hilfe von Wasserstoffbrückenbindungen. Es handelt sich also um eine sequenzspezifische Anlagerung der bekannten DNA in der Sonde an die unbekannt Target-DNA.

Um nach der SSH Klone zu identifizieren, die redundante Fragmente beinhalteten, wurde ein Dot Blot angewendet. Die zu untersuchende Target-DNA wurde unter Anwendung von Vakuum auf eine Nylonmembran gebracht. Die Sonde mit bekannter Sequenz wurde mit Radioaktivität gelabelt, in diesem Fall mit α -³²P, welches sich innerhalb der Nucleotide am Cytosin befindet und bei der Neustrang-Synthese nicht abgespalten wird. Nach der Hybridisierung der Sonde mit der DNA konnte die hybridisierte DNA, die aus der hier unerwünschten ribosomalen RNA transkribiert war, detektiert werden.

Zum Herstellen der Membranen mit den Target-DNA-Sequenzen wurden 2 µl DNA mit 100 µl H₂O in einer Microtiter-Platte vorverdünnt. Als Target-DNA dienten sowohl PCR-Fragmente aus einer Kolonie-PCR (s. 2.29.2), als auch isolierte Plasmide aus einer alkalischen Lyse (s. 2.18.1). Die Membran wurde anschließend in Frischhalte-Folie für 90 s mit UV-Licht bestrahlt, um die DNA auf der Membran zu fixieren. Die Lagerung der Membranen erfolgte bis zur Hybridisierung in 2x SSC-Puffer bei 4°C.

2.31.1 Herstellung der radioaktiv markierten Sonde

Zur Herstellung der Sonde dienten zwei PCR-Produkte, die von genomischer DNA aus *P. fluorescens* Bk3 amplifiziert wurden. Dafür wurden vier verschiedene Primer verwendet, wobei zwei Primer-Paare jeweils einen großen Teil der 16S-rRNA abdecken. Die Sequenzen der Primer sind der Primer-Liste im Anhang zu entnehmen. Als Template diente genomische DNA isoliert aus *P. fluorescens* Bk3.

2.31.1.1 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA wurde eine Methode mit Phenol-Chloroform-Extraktion angewendet.

2 x 10 ml einer Übernacht-Kultur
5 min. bei 5000 x g zentrifugieren

pro ml Pellet Zugabe von
2 ml gesättigter NaI-Lösung

Natrium-Iodid (NaI) gesättigt:
1,84 g/ml

Inkubation: 20 min. bei 37°C

mit H₂O auf 30 ml auffüllen

5 min. bei 8000 rpm (Sorvall,
SS34 Rotor) zentrifugieren

Pellet in 3 ml Lsg. I aufnehmen

Lsg. I:
50 mM Tris-HCl, pH 8,0
50 mM EDTA

Zugabe von einer Spatelspitze
Lysozym

Inkubation: 60 min. bei 37°C,
zwischendurch mehrmals in flüssigem
Stickstoff gefrieren

Material und Methoden

Zugabe von 3 ml Lsg. II und
2 µl RNase

Lsg. II:
30 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
2 % N-Lauryl-Sarkosyl

Inkubation: 20 min. bei 37°C

Aliquotieren in 6 Reaktions-Gefäße
nach Eppendorf à 500 µl

Zugabe von 300 µl Phenol /
Chloroform (1:1),
mischen und 10 min. bei 13000 x g
zentrifugieren

Phenol zuvor äquilibriert mit TE-
Puffer

Phenol-/Chloroform-Fällung mit
Überstand wiederholen

Zugabe von 400 µl Cl zum Überstand,
10 min. bei 13000 x g zentrifugieren

Cl:
24 Teile Chloroform
1 Teil Isoamyl-Alkohol

Überstand mit gleichem Volumen an
Isopropanol versetzen

30 min. bei 13000 x g zentrifugieren

Pellet mit 500 µl Ethanol (70 %, 4°C)
überschichten

10 min. bei 13000 x g zentrifugieren

Pellet nach Entfernen des
Überstandes bei 60°C unter Vakuum
(SpeedVac) trocknen

Pellet in 50 µl TE-Puffer aufnehmen
und 10 min. bei 50°C resuspendieren

TE-Puffer:
10 mM Tris-HCl, pH 8,0
0,1 mM EDTA

Die so erhaltene genomische DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.31.1.2 Herstellung der Sonde

Zur Herstellung der Sonde wurde zunächst zum Amplifizieren entsprechender Sequenzen eine PCR durchgeführt, deren Template die zuvor, wie unter 2.31.1.1 beschrieben, genomische DNA war. Es wurden zwei PCR mit unterschiedlichen Primer-Paaren durchgeführt, um einen möglichst großen Bereich des gewünschten Gens, in diesem Fall ribosomale 16S-RNA, abzudecken.

Material und Methoden

PCR-Reaktions-Ansatz 1:

Template, genomische DNA aus <i>P. fluorescens</i> Bk3	1 µl
dNTP-Mix (40 mM, 10 mM je dNTP, Fermentas)	0,5 µl
10x <i>Taq</i> -Polymerase-Puffer (s. 2.29.2)	2,5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (s. 2.29.1)	1 µl
Primer I: B785 (MWG)	2 µl
Primer II: SR-Primer (MWG)	2 µl
H ₂ O	16 µl

PCR-Reaktions-Ansatz 2:

Template, genomische DNA aus <i>P. fluorescens</i> Bk3	1 µl
dNTP-Mix (40 mM, 10 mM je dNTP, Fermentas)	0,5 µl
10x <i>Taq</i> -Polymerase-Puffer (s. 2.29.2)	2,5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (s. 2.29.1)	1 µl
Primer I: U522 (MWG)	2 µl
Primer II: SL-Primer (MWG)	2 µl
H ₂ O	16 µl

PCR-Programm:

Denaturierung	95°C	3 min.	
Denaturierung	95°C	1 min.	33 Zyklen
Annealing	48 °C	1 min.	
Elongation	72°C	1,5 min.	
Abschließende Elongation	72°C	10 min.	

Beide PCR-Produkte wurden für den Dot Blot zusätzlich als positive Kontrolle eingesetzt.

Die Markierung der PCR-Produkte mit Radioaktivität erfolgte mit Hilfe des DecaLabel™ DNA Labelin Kits (Fermentas). Als Enzym wird das Klenow-Fragment verwendet, wobei es sich um die größere von zwei Untereinheiten der DNA-Polymerase I handelt, welche die 3'-5'-Exonuclease und die DNA-Polymerase beinhaltet.

Material und Methoden

Reaktionsansatz:

DNA-Template (hier: die erstellten PCR-Produkte)	10 μ l
Decanucleotide in 5x Reaktionspuffer (random-Primer)	10 μ l
Nuclease-freies H ₂ O	20 μ l

Inkubation:

kochendes H ₂ O	5 - 10 min.
Eis	einige Minuten

Da in diesem Fall das radioaktiv markierte Triphosphat Cytosin verwendet wurde, kommt es aus dem Kit zum Einsatz von Mix C, der alle dNTPs außer Cytosin enthält.

Zugabe zum Reaktionsansatz:

Mix C	3 μ l
[α - ³² P]-dCTP (Hartmann Analytik, 370 MBq / ml)	6 μ l
Klenow Fragment, exo ⁻ (5u)	1 μ l

Nach einer Inkubation von 5 min. bei 37°C wurden 4 μ l dNTP-Mix hinzu gegeben und weitere 5 min. bei 37°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 1 μ l EDTA (0,5 M, pH 8,0) hinzu gegeben. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 100 μ l TNE-Puffer verdünnt. Um die Sonde zu reinigen, wurde der Ansatz über eine Sephadex G50-Säule gegeben, die vorher mit TNE-Puffer äquilibriert wurde. Im Anschluss wurde die Sonde 5 min. bei 100°C im Wasserbad inaktiviert und auf Eis abgekühlt.

Beide PCR-Fragmente wurden getrennt gelabelt und am Ende für die Hybridisierung vereint. Um die Sonde fertig zu stellen, wurde sie mit 10 ml Vorhybridisierungspuffer versetzt.

<i>TNE-Puffer:</i>	Tris-HCl pH 7,5	10 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA	1 mM
<i>Vorhybridisierungspuffer:</i>	100x Denhard	5 %
	20x SSPE	25 %
	10% SDS	2 %
	Heringssperm/Lachs DNA (10 mg/ml)	2 %

Material und Methoden

<i>100x Denhard:</i>	PVP 10	2%
	BSA (steril filtrieren)	2%
	Ficoll 400	2%
	in autoklaviertem Wasser	
<i>20x SSPE:</i>	NaCl	3,6 M
	Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	0,2 M
	EDTA	20 mM
	pH 7,4	
<i>20x SSC:</i>	Natrium-Zitrat pH 7,0	0,3 M
	NaCl	3 M

2.31.2 Durchführung der Hybridisierung und bildliche Darstellung

Die Membran wurde zunächst unter Rollen für 2 Stunden bei 60°C in 50 ml Vorhybridisierungspuffer inkubiert. Nach Entfernen des Vorhybridisierungspuffers wurde sie über Nacht bei 50°C mit der Sonde (s. 2.31.1) hybridisiert. Die Membran wurde zwei Mal mit 50 ml Waschpuffer I für 15 min. bei Raumtemperatur und dann mindestens zwei Mal für 15 min. mit 50 ml Waschpuffer II bei 60°C gewaschen.

Die Sonde wurde nach dem Entfernen von der Membran bei -20°C für weitere Verwendungen gelagert.

Zum Detektieren wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt, auf die Filmplatte des Phosphor Imagers gelegt, welche über Nacht belichtet wurde. Am folgenden Tag konnte die Filmplatte ausgelesen werden. Hierzu wurde der Phosphor Imager (Raytest Isotopenmessgerät, Abt. Pflanzenmolekularbiologie, Inst. f. Pflanzengenetik der Leibniz Universität Hannover) verwendet.

<i>Sonde:</i>	Sonde (s. 2.31.1)	
	Vorhybridisierungs-Puffer (s. 2.31.1)	10 ml
<i>Waschpuffer I:</i>	2x SSC	
	SDS	0,2 %
<i>Waschpuffer II:</i>	1x SSC	
	SDS	0,2 %

2.32 DNA-Sequenzierung der identifizierten Klone

2.32.1 DNA-Sequenzierung von Plasmid-Präparationen

Für die Sequenzierung von Plasmid-Präparationen wurden die Plasmide aus Bakterien isoliert, wie unter 2.18.2 beschrieben. Die Sequenzierung wurde durch die Firma SeqLab in Göttingen durchgeführt.

2.32.2 DNA-Sequenzierung aus Bakterien-Kolonien

Zum Sequenzieren wurden Bakterien-Kolonien auf LB-Agar mit Ampicillin (100 µg/ml) in 96-Well-Microtiter-Platten angeimpft. Die Sequenzierung inkl. Plasmid-Präparation wurde von IIT Biotech in Bielefeld durchgeführt.

2.33 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *P. fluorescens* Bk3

Für den Erhalt von elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden Bakterienzellen vom Stamm *P. fluorescens* Bk3 in LB-Flüssigmedium kultiviert. Am folgenden Tag wurden sie unter sterilen Bedingungen 3 Mal mit autoklaviertem, destilliertem Wasser gewaschen, in Wasser aufgenommen und auf sterile *in vitro* Pflanzen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox gesprüht. Nach 2 bis 3 Tagen wurden sie in Form verschiedener Fixierungsschritte für das Elektronenmikroskop aufgearbeitet. Die Aufarbeitung, sowie die Durchführung der Mikroskopie wurde freundlicherweise von Dr. U. Kahmann an der Universität Bielefeld übernommen.

Zusätzlich wurden ebenso beimpfte Pflanzen zur nativen Elektronenmikroskopie eingesetzt. Die Mikroskopie (an einem Rasterelektronenmikroskop, Typ FEI Quanta 600 FEG) wurde freundlicherweise von Herrn D. Klosa (Referat: Technische Mineralogie, Sedimentologie) in der Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe, Hannover durchgeführt.

3. Ergebnisse

Bei dem hier verwendeten Bakterien-Stamm *P. fluorescens* Bk3 handelt es sich um ein Isolat, was aus der Phyllosphäre von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox stammt (Fiss, 2001). Bei einer späteren Arbeit durch Singh et al. (2004) konnte eine extrazelluläre Esterase-Aktivität detektiert werden, die verschiedene Rückschlüsse auf eine vom Bakterium gebildete Cutinase zulässt. Cutinasen sind Cutin spaltende Enzyme, die bereits von verschiedenen Mikroorganismen bekannt sind. Cutin ist neben Pektin, Zellulose und verschiedenen Wachsen Bestandteil der Cuticula. Da es sich bei Cutin um ein mit Esterbindungen versetztes Heteropolymer handelt, besteht die Möglichkeit, dass es sich bei der bereits beschriebenen Esterase-Aktivität um eine solche Cutinase handelt. Der erste Teil der vorliegenden Arbeit ist die Reinigung und partielle Charakterisierung dieses Proteins anhand der Esterase-Aktivität mit dem künstlichen Substrat para-Nitrophenyl-Butyrat.

Ein weiterer Teil beschäftigt sich mit der Reaktion von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox nach Applikation des isolierten Proteins. Untersucht wurden hier die Protein-Antwort innerhalb der Apoplastenflüssigkeit, sowie die Veränderungen auf Transkriptebene.

Außerdem wurden Untersuchungen zur Anpassung von *P. fluorescens* Bk3 an unterschiedliche Umweltbedingungen durchgeführt. Dabei wurden die Bakterien unterschiedlichen Lichtbedingungen ausgesetzt, wonach einer Analyse über ihr Wachstum, sowie die vorhandene Esterase-Aktivität im Überstand durchgeführt wurde. Darüber hinaus wurden nach Etablierung auf der Blattoberfläche von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox Veränderungen auf Transkriptebene untersucht.

3.1 Aufreinigung der extrazellulären Esterase aus *P. fluorescens* Bk3

Um das zu charakterisierende Enzym zu isolieren, wurden verschiedene Reinigungs-Schritte durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurde der Wachstums-Überstand einer Flüssigkultur von *P. fluorescens* Bk3 (in LB-Medium, Kultivierung: 7 Tage bei 28°C und 155 rpm) verwendet, der durch Zentrifugation (10 min. bei 10000 rpm, Sorvall-Zentrifuge, GS-3 Rotor) gewonnen wurde. Der so erhaltene Kulturüberstand wurde mit einer Ammonium-Sulfat-Fällung bei verschiedenen Konzentrationen (0 - 30 %, 30 - 55 % und 55 - 90 %) präzipitiert, wie unter 2.10 beschrieben. Um die Fraktion mit dem zu isolierenden Enzym zu identifizieren, wurde eine Esterase-Aktivitäts-Test durchgeführt, dessen Ergebnisse in Abb. 3.1 prozentual dargestellt sind.

Ergebnisse

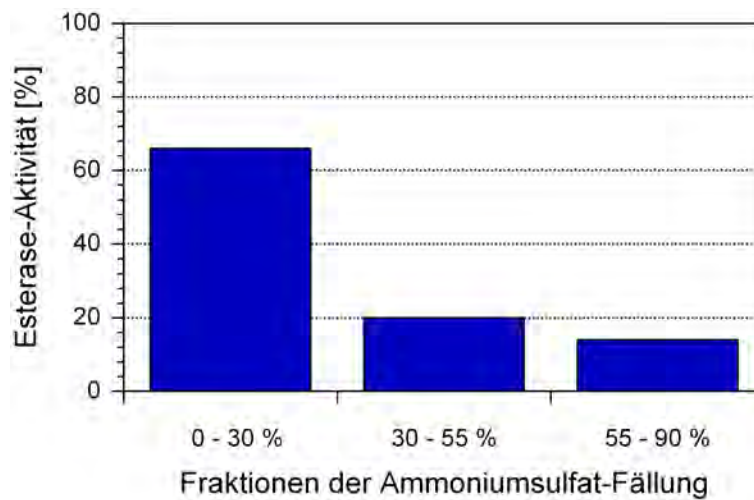


Abb. 3.1 Prozentuale Verteilung der Esterase-Aktivität in den einzelnen Fraktionen der Ammonium-Sulfat-Fällung aus dem Wachstums-Überstand von *P. fluorescens* Bk3 in LB-Medium; 66 % Aktivität in Fraktion 0 - 30 %, 20 % Aktivität in Fraktion 30 - 55 % und 14 % Aktivität in Fraktion 55 - 90 %, Esterase-Aktivität durchgeführt, wie unter 2.5 beschrieben

Nach einer zum Entsalzen dienenden Dialyse (20 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 8,0) konnte die höchste Aktivität mit 66 %, ausgehend von der Gesamtmenge, in der ersten Fraktion (0 - 30 %) detektiert werden. Daher wurde diese Fraktion zur weiteren Isolierung des gewünschten Enzyms auf die mit Kalium-Phosphat-Puffer (20 mM, pH 8,0) äquilibrierte DEAE-Sephacel-Säule aufgebracht.

Während hier nicht relevante Proteine gebunden werden konnten, zeigte das zu charakterisierende Enzym keine Bindung. Es handelte sich um eine Negativ-Chromatographie. Der Durchlauf wurde in drei Fraktionen zu 50 ml gesammelt. Wie in Abb. 3.2 zu sehen ist, konnte das Enzym bereits in Fraktion I des Durchlaufs detektiert werden.

Für Fraktion I ergab sich, bezogen auf den gesamten Durchlauf von insgesamt 150 ml, eine Aktivität von 98,8 %. In Fraktion II befanden sich 0,5 % und in Fraktion III 0,7 %.

Ergebnisse

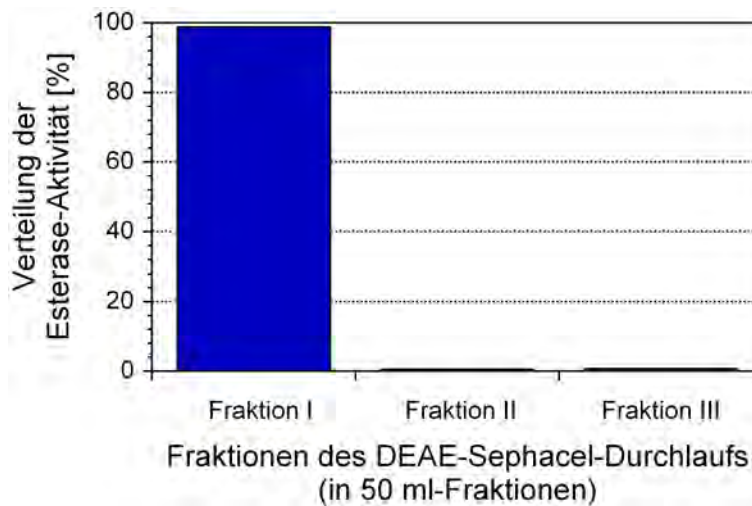


Abb. 3.2 Prozentuale Verteilung der Esterase-Aktivität im Durchlauf der DEAE-Sepharose-Säule (20 mM, pH 8,0); 98,8 % Aktivität in Fraktion I, 0,5 % Aktivität in Fraktion II und 0,7 % Aktivität in Fraktion III. Esterase-Aktivitäts-Messung mit 200 µl Probe, wie unter 2.5 beschrieben

Fraktion I wurde zum Ändern des pH-Wertes umdialysiert (20 mM CHES-Puffer, pH 11,0), und auf eine mit entsprechendem Puffer äquilibrierte DEAE-Sepharose-Säule aufgebracht. Unter diesen Bedingungen konnte das Protein gebunden werden.

Zum Eluieren wurde ein Salzgradient (NaCl, 0 - 0,5 M, Gesamtvolumen 2 x 50 ml) angelegt, wobei sich nach der quantitativen Proteinbestimmung (vgl. 2.4) der einzelnen Fraktionen ein Protein-Peak bei einer NaCl-Konzentration zwischen 0,08 und 0,25 M abzeichnete. Die Fraktionen dieses Peaks wurden in einen Esterase-Aktivitäts-Test (vgl. 2.5) eingesetzt, nachdem sie gegen Kalium-Phosphat-Puffer (20 mM, pH 8,0) umdialysiert wurden, um das NaCl aus dem Gradienten zu entfernen, und den pH-Wert der Proben dem des Tests anzugleichen. Hier zeigte sich, dass das Enzym innerhalb des Protein-Peaks bei einer NaCl-Konzentration von 0,07 - 0,10 M eluiert wurde. Dieser Elutions-Verlauf ist mit Protein-Konzentration und enzymatischen Aktivität innerhalb der gesammelten Fraktionen in Abb. 3.3 graphisch dargestellt.

Ergebnisse

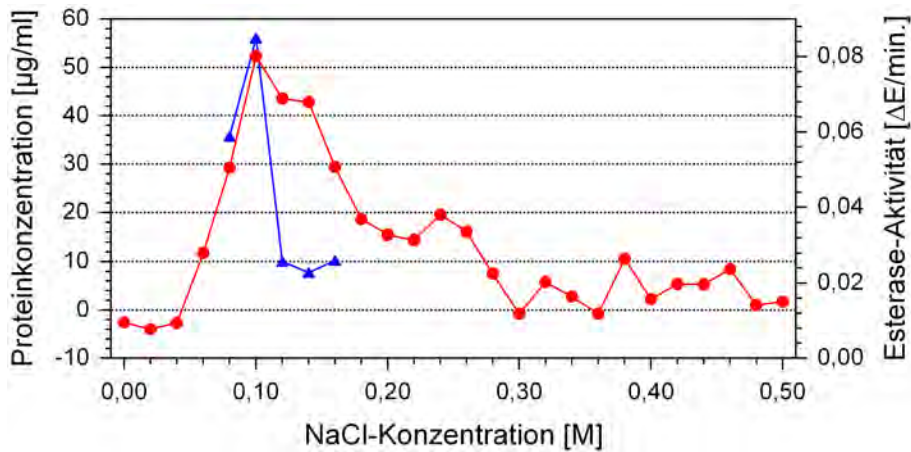


Abb. 3.3 Darstellung der ● Proteinkonzentration und ▲ Esterase-Aktivität innerhalb des Elutionslaufs nach Säulenchromatographie mit einer DEAE-Sephacel-Säule (pH 11,0) und anschließender Elution durch einen Salzgradienten (0 - 0,5 M, Gesamt-Elutionsvolumen 2 x 50 ml). Proteinkonzentration nach Lowry (vgl. 2.4), Esterase-Aktivität (vgl. 2.5), je 200 µl Probe in den Test eingesetzt

Die Enzym-haltigen Fraktionen wurden zur weiteren Reinigung auf eine Gelfiltrationssäule (Superose 12) aufgetragen, wobei der Durchlauf der Gelfiltrations-Säule photometrisch bei 280 nm durch einen Detektor gemessen wurde. Hier macht man sich das natürliche Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm zu Nutze. Auf diese Weise wurde der Verlauf der Protein-Konzentration detektiert. In Abb. 3.4 ist das Absorptions-Diagramm der Gelfiltration, sowie das dazugehörige Diagramm der Esterase-Aktivität in den einzelnen Fraktionen dargestellt.

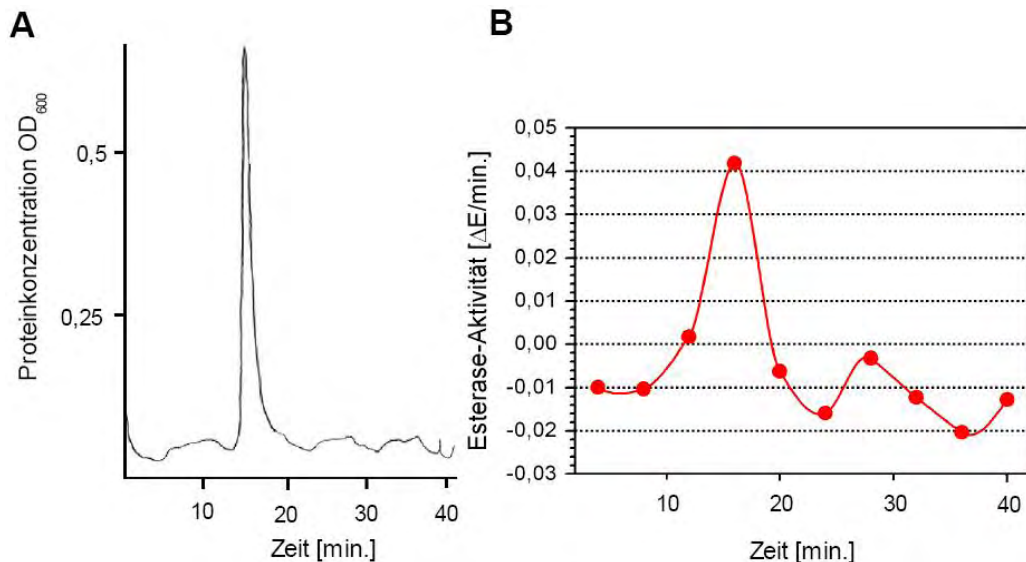


Abb. 3.4. Chromatographie-Diagramm des gereinigten Enzyms während der Gelfiltration auf einer Superose 12 Säule, Fließgeschwindigkeit 0,5 ml/min., A = Wellenlänge 280 nm als Proteindetektion, Peak bei ca. 16 min., B = entsprechendes Diagramm zum Esterase-Aktivitäts-Nachweis der einzelnen Fraktionen, Peak bei 16 min. Esterase-Test mit 200 µl Probe (vgl. 2.5)

Ergebnisse

Nach dem Esterase-Aktivitäts-Test, der (vgl. 2.5) mit den Fraktionen der Gelfiltration durchgeführt wurde, konnte festgestellt werden, dass innerhalb des Protein-Peaks auch die Enzym-Aktivität zu finden ist.

Im Folgenden sind die einzelnen Reinigungsschritte in einem Flussdiagramm nochmals zusammenfassend dargestellt (Abb. 3.5).

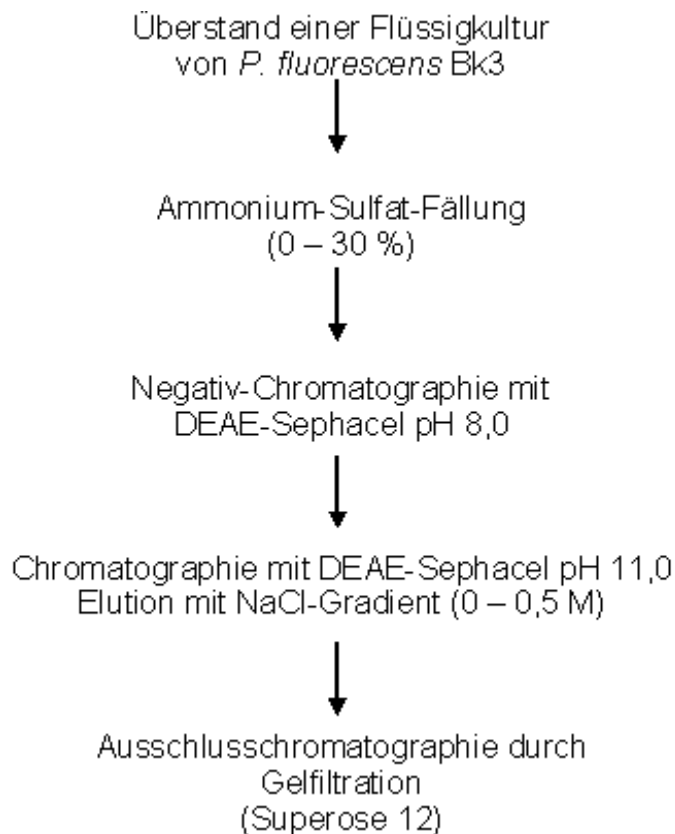


Abb. 3.5 Zusammenfassendes Flussdiagramm der einzelnen Aufreinigungsschritte der Esterase, gewonnen aus dem Wachstumsüberstand von *P. fluorescens* Bk3

Die aufeinander folgenden Reinigungsschritte sind in einer Reinigungstabelle in Tab. 3.1 zusammengefasst dargestellt. Die höchste Zunahme des Reinigungsgrades zeigten sowohl die Ammonium-Sulfat-Fällung mit einem Reinigungsgrad von 18, als auch die DEAE-Chromatographie bei pH 11,0 mit einem Reinigungsgrad von 24.

Ergebnisse

Tab. 3.1: Reinigungstabelle des isolierten Proteins mit Esterase-Aktivität. Esterase-Aktivitäts-Bestimmung mit 200 µl Probe (vgl. 2.5), Proteinnachweis nach Lowry mit 200 µl Probe (vgl. 2.4)

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Protein-Konzentration [mg/ml]	Gesamtprotein [mg]	Esterase-Aktivität [$\Delta E/\text{min.} \times \text{ml}$]	Gesamt-Esterase-Aktivität [$\Delta E/\text{min.}$]	Spezifische Esterase-Aktivität [$\Delta E/(\text{mg Protein} \times \text{min.})$]	Reinigungsgrad	Ausbeute [%]
1) Wachstumsüberstand <i>P. fluorescens</i> Bk3	1000	3,65	3645	0,46	458	0,13	1	100
2) Ammonium-Sulfat-Fällung (0 – 30 %)	20	1,29	25,84	2,98	59,62	2,31	18	13
3) DEAE-Sephacel (pH 8,0)	65	0,27	17,81	0,44	28,28	1,59	13	6
4) DEAE-Sephacel (pH 11,0) und Elution (NaCl-Gradient 0 - 0,5 M)	3	0,12	0,36	0,36	1,08	3	24	0,2
5) Ausschluss-Chromatographie (Superose 12)	2	0,016	0,032	0,04	0,08	2,5	20	0,02

Es wird definiert, dass 1 unit des Enzyms 1 mmol p-Nitrophenyl-Butyrat / min. im beschriebenen Esterase-Aktivitäts-Nachweis umsetzt.

Ergebnisse

Die einzelnen Reinigungsschritte wurden außerdem in einer SDS-PAGE mit Tris-Tricin (vgl. 2.6) dargestellt, und sind in Abb. 3.6 abgebildet.

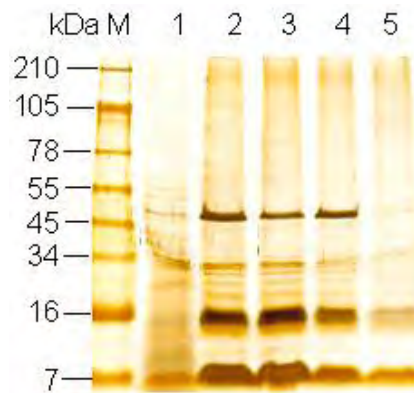


Abb. 3.6 Tris-Tricin-PAGE (vgl. 2.6) der Esterase-Reinigung von *P. fluorescens* Bk3, M = SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen), 1 = Wachstumsüberstand von *P. fluorescens* Bk3, 2 = Ammonium-Sulfat-Fällung (0 - 30 %), 3 = Durchlauf DEAE (pH 8,0), 4 = Chromatographie und Elution DEAE (pH 11,0, NaCl-Gradient 0 – 0,5 M), 5 = Ausschlusschromatographie (Gelfiltration, Superose 12), aufgetragene Proteinmenge: 13 µg (1), 2 µg (2 - 4) und 3 µg (5), Silberfärbung (vgl. 2.7.1)

Während im Wachstumsüberstand (1) noch mehrere Protein-Banden in einem Molekulargewichts-Bereich von 210 bis 7 kDa zu erkennen sind, nehmen diese nach der Ammonium-Sulfat-Fällung (2) bereits deutlich ab. Es bleiben vier Banden mit apparenten molaren Massen von 47 kDa, 29 kDa, 17 kDa und 11 kDa. Diese wurden berechnet nach der Formel $y = 216,98e^{-3,3457x}$, die sich aus der Eichgeraden der Standardproteine (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen) in Abb. 3.7 ergibt. Aufgetragen ist die Retentionszeit bzw. der Retentionsfaktor (R_F), der den Quotienten zwischen Laufstrecke des jeweiligen Proteins und der Gesamtlaufstrecke bildet.

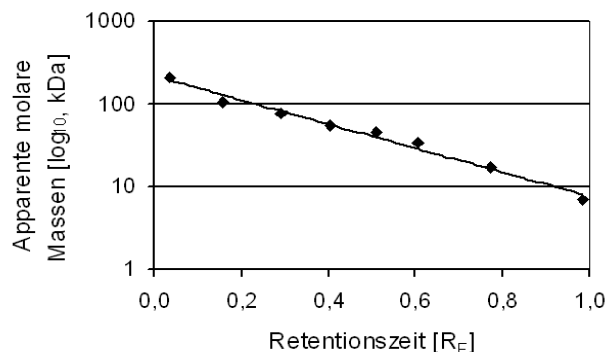


Abb. 3.7 Eichgerade des Markers SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen) aus der PAGE mit Tris-Tricin (vgl. Abb. 3.6) zur Berechnung apparenter molarer Massen der Untereinheiten der aufgetragenen Proteinproben. Resultierende Formel: $y = 216,98e^{-3,3457x}$

Ergebnisse

Trotz Veränderung der Reinheitsgrade während der Aufreinigung bleibt ein charakteristisches Banden-Muster mit vier Banden mit den Größen 47 kDa, 29 kDa, 17 kDa und 11 kDa, durch alle Reinigungsstufen bestehen. Nach Ausschusschromatographie (5) sind die Banden deutlich abgeschwächt, aber noch immer als bekanntes Banden-Muster zu erkennen.

3.2 Sequenzierung der Protein-Untereinheiten durch ESI-QToF MS

Am Ende der Reinigung zeigten sich vier diskrete Banden, die sich bereits während des gesamten Verlaufs der Reinigung nicht veränderten (vgl. 3.1). Es handelte sich hierbei um Untereinheiten mit apparenten molaren Massen von 47 kDa, 29 kDa, 17 kDa und 11 kDa (vgl. Abb. 3.8). Diese wurde, wie unter 2.13 beschrieben, aus dem Gel isoliert und mit Trypsin für die *de novo*-Sequenzierung mittels Q-ToF vorbereitet.

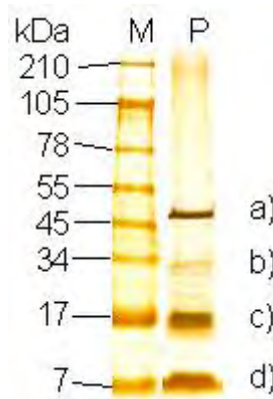


Abb. 3.8 SDS-PAGE mit Tris-Tricin (vgl. 2.6), die der Protein-Sequenzierung zugrunde lag. M = SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen), P = gereinigter Protein-Komplex nach DEAE-pH 11 (vgl. 3.1). Das Ergebnis ist in Tab. 3.2 zusammengefasst. Proteinmenge: 2 µg

In Abb. 3.9 sind exemplarisch zwei Diagramme der Sequenzierung dargestellt. Dabei handelt es sich in A) um die Detektion des Ionenstrahls, der in B) nach einer weiteren Fragmentierung in der Stoßzelle die analysierten Aminosäuren enthält.

Ergebnisse

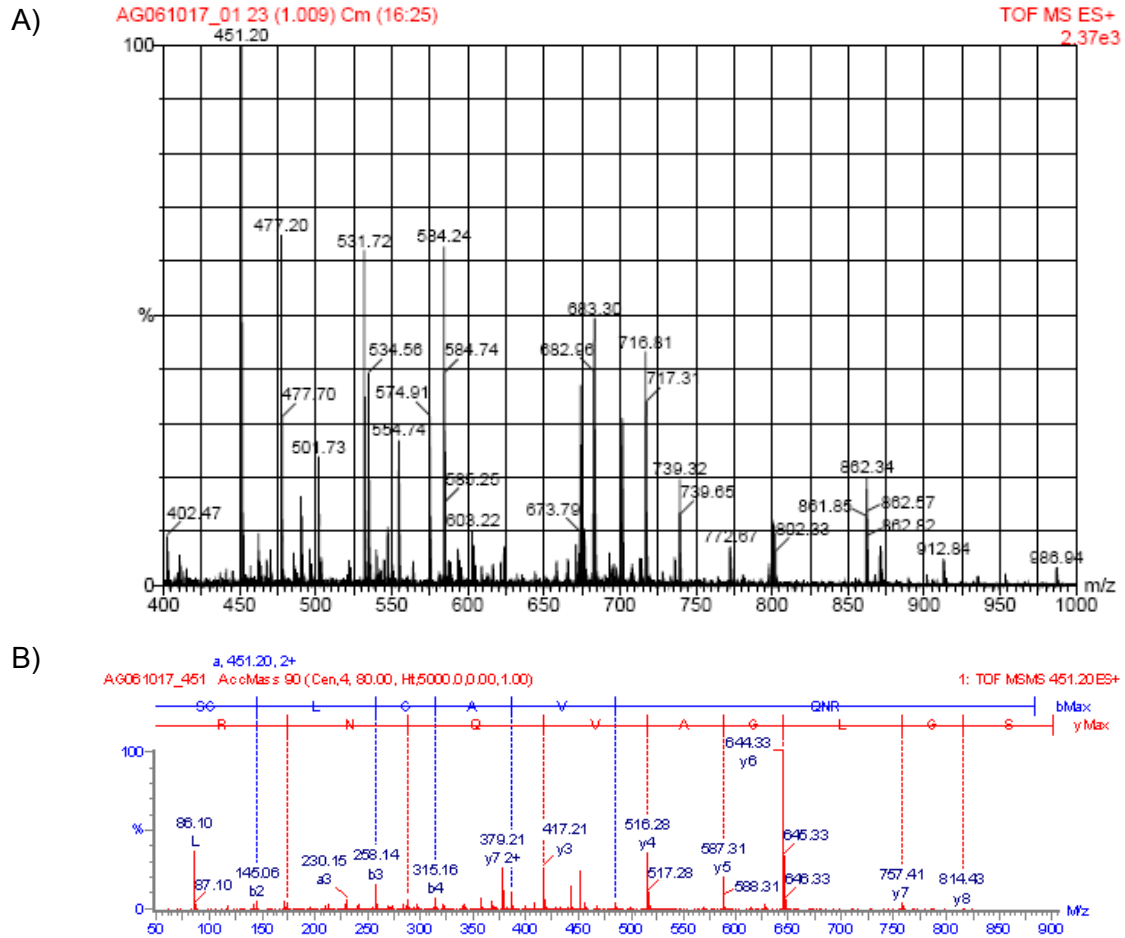


Abb. 3.9 A) Darstellung des Übersichtsspektrogramm MS-, und B) der *de novo*-Abfolge, freundlicherweise durchgeführt von PD Dr. Markus Piotrowski, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Ruhr-Universität Bochum

Die Ergebnisse der erhaltenen Sequenzen, sowie die dazugehörigen Recherchen aus der Datenbank <http://www.expasy.org/tools/blast/> über bereits bekannte Homologien befinden sich zusammengefasst in Tab. 3.2.

Ergebnisse

Tab. 3.2 *De novo*-Sequenzierung und Homologiensuche von den trypsin-behandelten Fragmenten des gereinigten Protein-Komplexes

Bande	Rel. Masse [Da]	Ladung	Masse [Da]	abgeleitete Aminosäure-Sequenz	Sequenzähnlichkeit [Position Sequenz Position]	e-value	mögliche Funktion	Organismus	Accession-Nummer*
a	682,96	3+	2048,88	LTSTVDNLSNLQKNTTAA R	1 LTSTVDNLSNLQKNTTAAAR 19 LTSTVDNL N QKNTT AR 132 LTSTVDNLTNIQKNTTSAR 150	3e ⁻⁰⁶	Flagellin (Fragment) [fliC]	<i>P. fluorescens</i>	Q9WXC5_PSEFL
a	912,84	2+	1825,68	(ST)LQDVDFASEAAELTK	1 STLQDVDFASEAAELTK 17 ST QDVDFASE AELTK 398 STVQDVDFASETAELTK 414	5e ⁻⁰⁵	Flagellin (Fragment) [fliC]	<i>P. fluorescens</i>	Q9FCQ6_PSEFL
a	674,28	2+	1348,56	MTSQLDGLGQAVK	1 MTSQLDGLGQAVK 13 MTSQ +GLGQAVK 10 MTSQINGLGQAVK 22	0,078	Flagellin (Fragment) [fliC]	<i>P. fluorescens</i>	Q9WXC4_PSEFL
a	716,81	2+	1433,62	LTSTVDNLSNLQK	1 LTSTVDNLSNLQK 13 LTSTVDNL N QK 132 LTSTVDNLTNIQK 144	0,11	Flagellin (Fragment) [fliC]	<i>P. fluorescens</i>	Q9WXC5_PSEFL
a	531,72	2+	1063,44	AGGALATSMQR	1 AGGALATSMQR 11 AGGALATSMQR 1 AGGALATSMQR 11	0,19	Flagellin (Fragment) [fliC]	<i>P. fluorescens</i>	A2VC35_PSEFL
a	584,24	2+	1168,48	LSQTTTFGGQK	2 SQTTTFGGQK 11 SQTTTFGGQK 83 SQTTTFGGQK 92	1,1	Flagellin (Fragment) [fliC]	<i>P. fluorescens</i>	Q9WXC4_PSEFL
a	477,20	2+	954,40	LLDGSYGTK	1 LLDGSYGTK 9 LLDGSYGTK 93 LLDGSYGTK 101	7,9	Flagellin (Fragment) [fliC]	<i>P. fluorescens</i>	Q9WXC4_PSEFL
a	986,94	2+	1973,88	(AL)TVNTNLASLTTQGNL NK	1 ALTVNTNLASLTTQGNL 19 ALTVNTN AS TTQGNL K 2 ALTVNTNIASITTTQGNLTK 20	2e ⁻⁰⁵	Flagellin	<i>P. putida</i>	Q52080_PSEPU
a	801,32	2+	1602,64	LNSA(Q/K)DDAAGLGLSN R	2 NSAQKDDAAGLGLSNR 17 NSA KDDAAGL SNR 39 NSA-KDDAAGLQISNR 53	0,81	B-type flagellin [fliC]	<i>P. aeruginosa</i>	FLICB_PS EAE

Ergebnisse

Bande	Rel. Masse [Da]	Ladung	Masse [Da]	abgeleitete Aminosäure-Sequenz	Sequenzähnlichkeit [Position Sequenz Position]	e-value	mögliche Funktion	Organismus	Accession-Nummer
b	658,74	2+	1317,48	ATVDNNALGQGTR	1 ATVDNNALGQGTR 13 ATVDNNALGQGTR 158 ATVDNNALGQGTR 170	0,004	OprG protein (Fragment) [oprG]	<i>P. fluorescens</i>	A2VC30_PS EFL
c	657,59	3+	1972,77	ADSSSVkvdQGPLAGANLGGK	1 ADSSSVKVDQGPLAGANLGGK 21 ADSSSVKVDQGPL G NLGGK 41 ADSSSVKVDQGPLSGTNLGGK 61	4e ⁻⁰⁸	OmpW precursor [PflO1_5029]	<i>P. fluorescens</i> (strain PfO-1)	Q3K638_PS EPF
c	985,90	2+	1971,80	ADSSSVKVDQGPLAGANLGGK	1 ADSSSVKVDQGPLAGANLGGK 21 ADSSSVKVDQGPL G NLGGK 41 ADSSSVKVDQGPLSGTNLGGK 61	4e ⁻⁰⁸	OmpW precursor [PflO1_5029]	<i>P. fluorescens</i> (strain PfO-1)	Q3K638_PS EPF
c	670,24	3+	2010,72	ADSSSVKVDQ	1 ADSSSVKVDQ 10 ADSSSVKVDQ 41 ADSSSVKVDQ 50	2,0	OmpW precursor [PflO1_5029]	<i>P. fluorescens</i> (strain PfO-1)	Q3K638_PS EPF
c	712,94	3+	2138,82	YLDLSTKATVDNNALGQGTR	1 YLDLSTKATVDNNALGQGTR 20 Y D STKATVDNNALGQGTR 151 YIDISTKATVDNNALGQGTR 170	6e ⁻⁰⁸	OprG protein (Fragment) [oprG]	<i>P. fluorescens</i>	A2VC30_PS EFL
c	648,76	2+	1297,52	VDQGPLAGANLGGK	1 VDQGPLAGANLGGK 14 VDQGPLAGANLGGK 6 VDQGPLAGANLGGK 19	7e ⁻⁰⁴	OprG protein (Fragment) [oprG]	<i>P. fluorescens</i>	A2VC30_PS EFL
c	658,75	2+	1317,50	ATVDNNALGQGTR	1 ATVDNNALGQGTR 13 ATVDNNALGQGTR 158 ATVDNNALGQGTR 170	0,002	OprG protein (Fragment) [oprG]	<i>P. fluorescens</i>	A2VC30_PS EFL

* Accession-Nummer zu UniProtKB/TrEMBL

3.3 Aktivitäts-Test von renaturierten Proteinen nach SDS-PAGE

Die Aktivitäts-Färbung innerhalb einer SDS-PAGE wurde angefertigt, um zu ermitteln, welche der Untereinheiten aus dem gereinigten Komplex (vgl. 3.1) über die Esterase-Aktivität verfügt. Daher wurde das gereinigte Protein auf eine Tris-Tricin SDS-PAGE aufgetragen. Ein paralleler Ansatz, der später mit Silber gefärbt wurde, diente als Referenz, um die Untereinheiten, die eine Esterase-Aktivität zeigen, den bereits bekannten Untereinheiten zuordnen zu können. Die PAGE wurde nach dem Lauf zunächst in einem Renaturierungs-Puffer inkubiert (vgl. 2.8), um die zuvor denaturierten Proteine zu renaturieren. Anschließend wurden die Proteine innerhalb des Gels einem Aktivitäts-Test unterzogen. In Abb. 3.10 sind beide Gele zum Vergleich nebeneinander dargestellt.

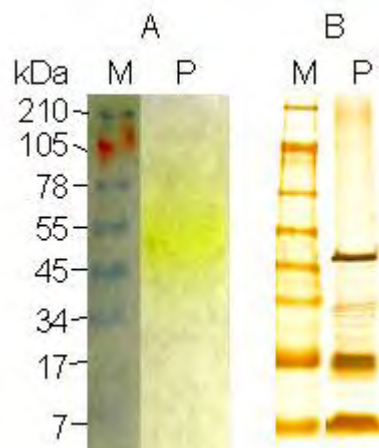


Abb. 3.10 SDS-PAGE mit Tris-Tricin; A = nachgewiesene Esterase-Aktivität mit Gelbfärbung bei 47 kDa, 30 μ g Protein aufgetragen, B = aufgetrennte Untereinheiten des gereinigten Protein-Komplexes, 2 μ g Protein aufgetragen; Protein-Standard = SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen)

Aufgrund der Methode kommt es nicht zu einer scharfen Bande nach Anwendung des Aktivitäts-Tests, sondern zu einem gelb gefärbten Bereich. Allerdings ist auf dem Referenz-Gel mit Silberfärbung an dieser Stelle eine kräftige Bande zu erkennen, so dass es sich hier um die Untereinheit mit einer apparenten molaren Masse von 47 kDa mit der zu charakterisierenden Enzym-Aktivität handelt. Diese Bande wurde bereits im Voraus als die Untereinheit FliC des Flagellins identifiziert (vgl. 3.2).

3.4 Partielle Charakterisierung des gereinigten Proteins

Mit der Analyse verschiedener Eigenschaften des isolierten Protein-Komplexes wurde eine partielle Charakterisierung vorgenommen. Dazu gehörten neben der Größen-Bestimmung des Komplexes auch biochemische Eigenschaften.

An dieser Stelle wird definiert, dass 1 unit des Enzyms 1 mmol p-Nitrophenyl-Butyrat / min. umsetzt.

3.4.1 Größenbestimmung des Protein-Komplexes

Mit Hilfe der Ausschlusschromatographie konnte der Enzym-Komplex nicht nur weiter aufgereinigt werden (vgl. 3.1), zusätzlich konnten noch Informationen zu seiner Größe bekannt werden. Um die Laufgeschwindigkeiten zu standardisieren, wurden verschiedene Eichproteine auf die Gelfiltrations-Säule aufgetragen. Diese sind in Tab. 3.3 zusammen mit den dazugehörigen Molekulargewichten und ermittelten Elutionsgeschwindigkeiten angegeben. Zusätzlich ist der Retentionsfaktor (R_F) angegeben, der den Quotienten aus der minimalen Laufzeit, also vom größten Protein Bluedextran, und der jeweiligen Laufzeit der einzelnen Proteine bildet.

Tab. 3.3 Zur Kalibrierung der Gelfiltrations-Säule verwendete Eichproteine mit den dazugehörigen Molekulargewichten und den jeweiligen Elutionszeiten zur Passage der Gelfiltrationssäule, sowie dem berechneten Elutionsvolumen und dem Retentionsfaktor (R_F), Superose 12-Säule, Fließgeschwindigkeit: 0,5 ml / min., Elutionszeit berechnet aus dem Peak des erhaltenen Diagramms (Detektion der Proteine bei 280 nm)

Protein	Molare Masse	Elutionszeit	Elutionsvolumen	Retentionsfaktor (R_F)
Bluedextran	2000 kDa	17 min.	8,5 ml	1,00
Ferritin	400 kDa	21 min.	10,5 ml	0,81
Katalase	240 kDa	23 min.	11,5 ml	0,74
Rinderserum-Albumin (BSA)	66 kDa	25 min.	12,5 ml	0,68
Ovalbumin	45 kDa	27 min.	13,5 ml	0,63
Carboanhydrase	30 kDa	31 min.	15,5 ml	0,55
Myoglobin	17 kDa	32 min.	16 ml	0,53
Cytochrom C	12,7 kDa	29 min.	14,5 ml	0,59

Ergebnisse

Der Durchlauf der Gelfiltrations-Säule wurde mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert, um die darin befindlichen Proteine zu ermitteln. Das Elutionsvolumen lässt sich aus der Tatsache berechnen, dass die Fließgeschwindigkeit 0,5 ml / min. betrug. Die aus diesen Daten resultierende Eichgerade ist in Abb. 3.11 dargestellt. Das Diagramm der Ausschlusschromatographie des Proteinkomplexes befindet sich in Abb. 3.12.

Aus der Eichgerade lässt sich die Formel $y = 0,0525e^{10,756x}$ zur Berechnung der molaren Masse ableiten.

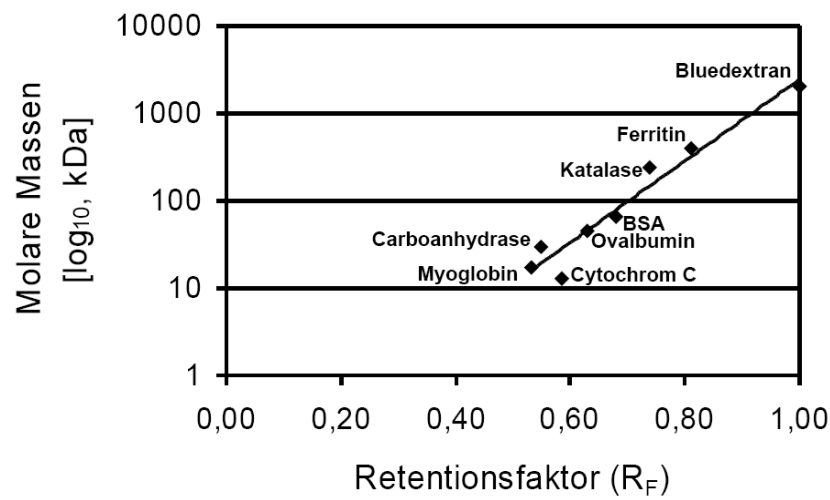


Abb. 3.11 Eichgerade zur Gelfiltration mit der Superose 12-Säule, Fließgeschwindigkeit: 0,5 ml/min., Standardproteine: Cytochrom C (12,4 kDa), Myoglobin (17 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Ovalbumin (45 kDa), BSA (67 kDa), Katalase (240 kDa), Ferritin (450 kDa) und Blueextran (2000 kDa)

Das zu untersuchende Protein zeigte mit 16 min. eine Elutionsgeschwindigkeit, die höher war, als die des Blueextran (17 min.). Daher konnte, auch in Verbindung mit den Kalkulationen über die Standardproteine, darauf geschlossen werden, dass es sich hier um ein extrem großes Molekül oder möglicherweise auch einen Komplex handelt.

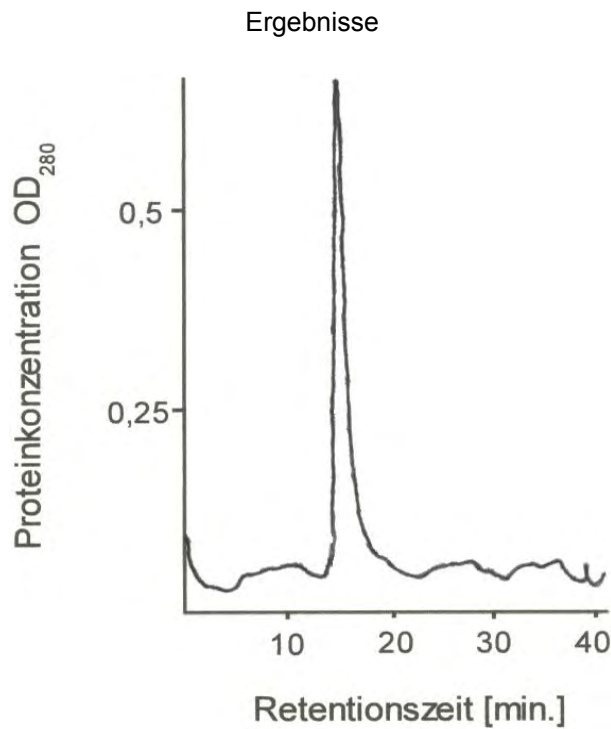


Abb. 3.12 Gelfiltration des isolierten Protein-Komplexes aus 3.1, detektiert bei einer Wellenlänge von 280 nm

Aus einer Elutionszeit von 16 min. lässt sich ein R_F von 1,06 errechnen. Wie bereits an der kürzeren Retentionszeit verglichen mit der des Bluedextran, aber auch anhand der Eichgerade aus Abb. 3.11 und der daran ermittelten Formel ($y = 0,0525e^{10,756x}$) zu erkennen, könnte für den Proteinkomplex eine molare Masse von 4800 kDa ermittelt werden. Damit wäre er größer als der Standard Bluedextran, der mit mit 2000 kDa zum Ermitteln des Totvolumens verwendet wurde. Die Berechnung kann also lediglich als Anhaltspunkt für eine ungefähre Größenannahme gelten.

Da es sich bei dieser Größe des Proteins höchstwahrscheinlich um einen Komplex handelt, was auch durch das Gelbild der Aufreinigungsschritte (vgl. Abb. 3.6) bestätigt wird, wurde er im Folgenden mit dem Detergenz Dodecyl- β -D-Maltosid (β -DM) in den Endkonzentrationen 1, 2,5, 5, 10, 20 und 40 mM versetzt, um hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb des Komplexes zu lösen, und damit den Komplex in seine Untereinheiten aufzuspalten. Mit diesen Proben wurde im Folgenden eine Gelfiltration durchgeführt. Die Graphen dafür sind in Abb. 3.13 dargestellt.

Ergebnisse

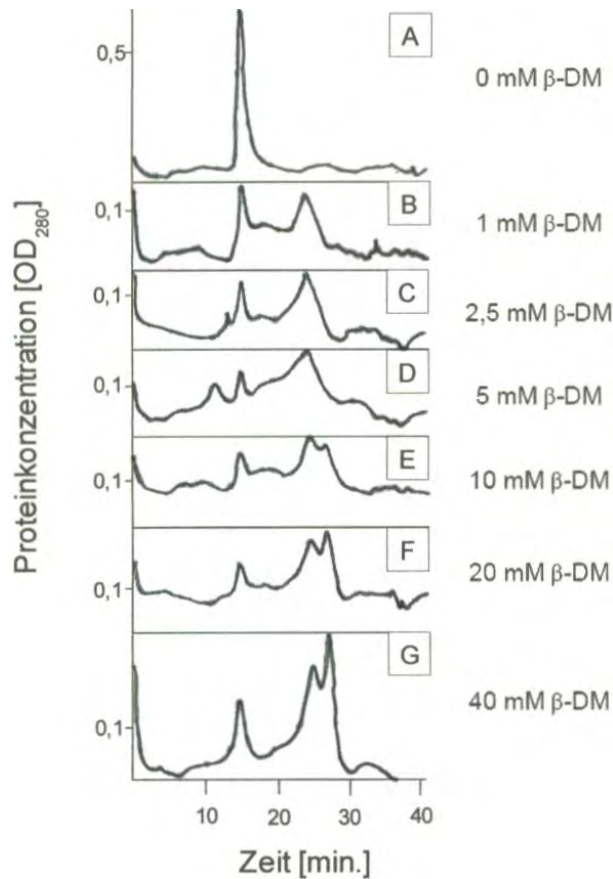


Abb. 3.13 Gelfiltration des Protein-Komplexes unter Anwesenheit verschiedener Konzentrationen Dodecyl-β-D-Maltosid (β-DM). A = Protein-Komplex nativ, B = 1 mM β-DM, C = 2,5 mM β-DM, D = 5 mM β-DM, E = 10 mM β-DM, F = 20 mM β-DM, G = 40 mM β-DM, aufgetragene Menge Protein: 500 µg, Superose 12-Säule, Fließgeschwindigkeit: 0,5 ml / min.

Auch die Standard-Proteine wurden mit Dodecyl-β-D-Maltosid (40 mM) versetzt, um die Eichgerade an die neuen Bedingungen anzugleichen. Daraus ergibt sich eine neue Eichgerade, wie in Abb. 3.14 dargestellt.

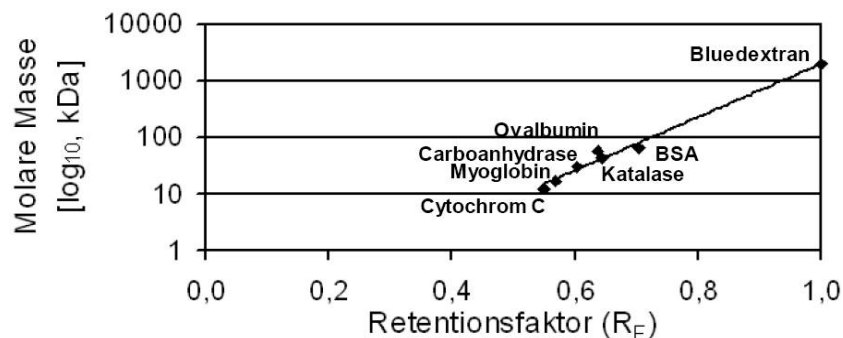


Abb. 3.14 Eichgerade zur Gelfiltration mit den Standardproteinen mit einer Konzentration an β-DM von 40 mM; Cytochrom C (12,4 kDa), Myoglobin (17 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Ovalbumin (45 kDa), BSA (67 kDa) und Katalase (240 kDa mit 4 identischen Untereinheiten à 60 kDa), aufgetragene Proteinkonzentration: 1 mg/ml, 500 µl, resultierende Gleichung: $y = 0,04e^{10,848x}$

Ergebnisse

Bei den Standardproteinen ist zu berücksichtigen, dass Katalase aus vier identischen Untereinheiten zu je 60 kDa besteht, und daher durch den Verlust von hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb des Komplexes zu einem anderen Laufverhalten führt. Aus der Eichgerade lässt sich die neue Formel zur Berechnung der molaren Masse ermitteln ($y = 0,04e^{10,848x}$). In Tab. 3.4 sind die R_F -Werte der erhaltenen Peaks zusammen mit der Berechnung der Molaren Massen, die anhand der erhaltenen Formel durchgeführt werden kann, angegeben.

Als Peak 1 wurde der Peak definiert, der sich bei der nativen Probe (A) bei einem R_F von 1,06 erhebt. Die Peaks mit den aufsteigenden Zahlen drücken die entstandenen Peaks mit sich verringerndem R_F aus, die Peaks mit den negativen Zahlen benennen die Peaks, die sich mit größeren R_F vor dem ursprünglichen Peak (Peak 1) erheben.

Tab. 3.4 R_F -Werte und errechnete Molare Massen der erhaltenen Peaks des Proteinkomplexes unter Anwesenheit verschiedener Konzentration an Dodecyl- β -D-Maltosid (β -DM) nach Gelfiltration, Superose 12-Säule, Fließgeschwindigkeit: 0,5 ml/min.

Konzentration von β -DM	Peak -3		Peak -2		Peak -1		Peak 1		Peak 2		Peak 3		Peak 4	
	R_F	Mol. Masse [kDa]	R_F	Mol. Masse [kDa]	R_F	Mol. Masse [kDa]	R_F	Mol. Masse [kDa]	R_F	Mol. Masse [kDa]	R_F	Mol. Masse [kDa]	R_F	Mol. Masse [kDa]
A) 0 mM							1,06	3944						
B) 1 mM							1,06	3944	0,89	624	0,68	64		
C) 2,5 mM			1,21	20074			1,06	3944			0,68	64		
D) 5 mM	1,42	195885					1,13	8428			0,68	64		
E) 10 mM							1,06	3944	0,85	404	0,68	64		
F) 20 mM							1,06	3944			0,68	64	0,63	37
G) 40 mM							1,13	8428			0,68	64	0,63	37

Der Peak mit einem R_F von 1,06 wird im Verlauf der ansteigenden Detergenz-Konzentration immer kleiner, während sich bereits bei einer Konzentration von 1 mM zwei neue Peaks mit R_F -Werten von 0,89 (624 kDa) und 0,68 (64 kDa) erheben, die sich im weiteren Verlauf ab 10 mM Dodecyl- β -D-Maltosid noch teilen mit R_F -Werten von 0,85 (404 kDa), 0,68 (64 kDa) und 0,61 (30 kDa) und auf

Ergebnisse

die Spaltung in weitere Untereinheiten schließen lassen. Insgesamt ist eine Rechtsverschiebung der Peaks zu erkennen, bis auf Ausnahmen (beim ersten Peak mit 2,5 mM, 5 mM und 40 mM Dodecyl- β -D-Maltosid, und beim zweiten Peak bei 5 mM Dodecyl- β -D-Maltosid).

Die R_F -Werte des ersten Peaks variieren in den unterschiedlichen Konzentration an Dodecyl- β -D-Maltosid recht stark zwischen 1,06 und 1,42. Eine Berechnung der molaren Massen wurde zwar vorgenommen, wird allerdings nicht berücksichtigt, da es sich dabei, wie bereits erwähnt, um Passagegeschwindigkeiten außerhalb des kalibrierten Bereiches handelt (rascher als das zum Totvolumen bestimmte Bluedextran).

3.4.2 Hemmung der enzymatischen Aktivität

Zunächst wurden verschiedene Salze eingesetzt, um anhand dieser Behandlung zu analysieren, ob verschiedene Ionen einen inhibierenden Einfluss auf die Enzym-Aktivität des Proteins haben. In Tab. 3.5 sind alle verwendeten Ionen mit ihren Verbindungen aufgelistet.

Tab. 3.5 Eingesetzte Salzverbindungen zur Untersuchung des Hemmverhaltens der Enzym-Aktivität

Lithium-Chlorid	LiCl	Natrium-Fluorid	NaF
Natrium-Chlorid	NaCl	Natrium-Chlorid	NaCl
Kalium-Chlorid	KCl	Natrium-Bromid	NaBr
Magnesium-Chlorid	MgCl ₂	Natrium-Iodid	NaI
Kalzium-Chlorid	CaCl ₂	Natrium-Nitrat	NaNO ₃
Cobalt-Chlorid	CoCl ₂	Natrium-Azetat	C ₂ H ₃ NO ₂
Ammonium-Chlorid	NH ₄ Cl		
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA		

Das Enzym wurde mit dem jeweiligen Salz für 30 min. auf Eis inkubiert und dann in den Esterase-Aktivitätstest (vgl. 2.5) eingesetzt. Die prozentuale Aktivität des Enzyms nach Behandlung mit den jeweiligen Salzen ist in Tab. 3.6 zusammengefasst.

Ergebnisse

Tab. 3.6 Zusammenfassung der ermittelten Esterase-Aktivitäten unter Anwesenheit verschiedener Salze (1 mM), Mittelwerte mit Standardabweichungen (n = 3), Esterase-Test mit 200 µl Probe (vgl. 2.5)

	Aktivität [%]	Standardabweichung		Aktivität [%]	Standardabweichung
LiCl	184	± 103	NaF	150	± 66
NaCl	121	± 56	NaCl	121	± 56
KCl	227	± 70	NaBr	218	± 56
MgCl ₂	229	± 86	NaI	218	± 72
CaCl ₂	189	± 66	NaNO ₃	140	± 34
CoCl ₂	237	± 121	C ₂ H ₃ NaO ₂	274	± 19
NH ₄ Cl	334	± 45			
EDTA	182	± 72			

Als eine Aktivität von 100 % wurde die Aktivität des Enzyms im nativen Zustand definiert. Als Blank diente jeweils der entsprechende Ansatz unter Anwesenheit des jeweiligen Salzes mit H₂O anstelle des Enzyms.

Die Enzym-Aktivität konnte mit allen Salzen gesteigert werden, wobei die geringste Steigerung durch NaCl mit 121 % Aktivität erreicht wurde, die höchste durch NH₄Cl mit 334 % Aktivität. Allerdings kam es zu extrem unterschiedlichen und teilweise sehr hohen Standardabweichungen, um bis zu 121 unter Anwesenheit von CoCl₂.

Nachfolgend wurden Untersuchungen zur Hemmung durch bekannte Protease-Inhibitoren, wie Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF) und Diisopropylfluorophosphat (DFP) durchgeführt. Hierfür wurden je nach Wirkstoff unterschiedliche Konzentrationen gewählt. Die Ergebnisse dazu sind in Abb. 3.15 graphisch dargestellt.

Durch PMSF konnte die Aktivität der Esterase bis zu einer Konzentration von 20 µM kontinuierlich bis auf eine Aktivität von 78 % gesenkt werden. Bei höherer Konzentration von PMSF kam es erneut zu einer Steigerung der Aktivität.

Eine geringe Konzentration an AEBSF von 100 µM führte zu keinen nennenswerten Veränderung der Enzym-Aktivität (101 %). Bei einer Konzentration von 2 mM kam es allerdings zu einer Aktivitäts-Steigerung von 23 %.

Die Behandlung von DFP führte bis zu einer Konzentration von 150 µM zu einem leichten Aktivitäts-Verlust von 20 %. Die Aktivität stieg dennoch unter steigender Konzentration des Wirkstoffs wieder leicht an und erreichte bei einer Konzentration von 500 µM wieder eine Aktivität von 88 %.

Ergebnisse

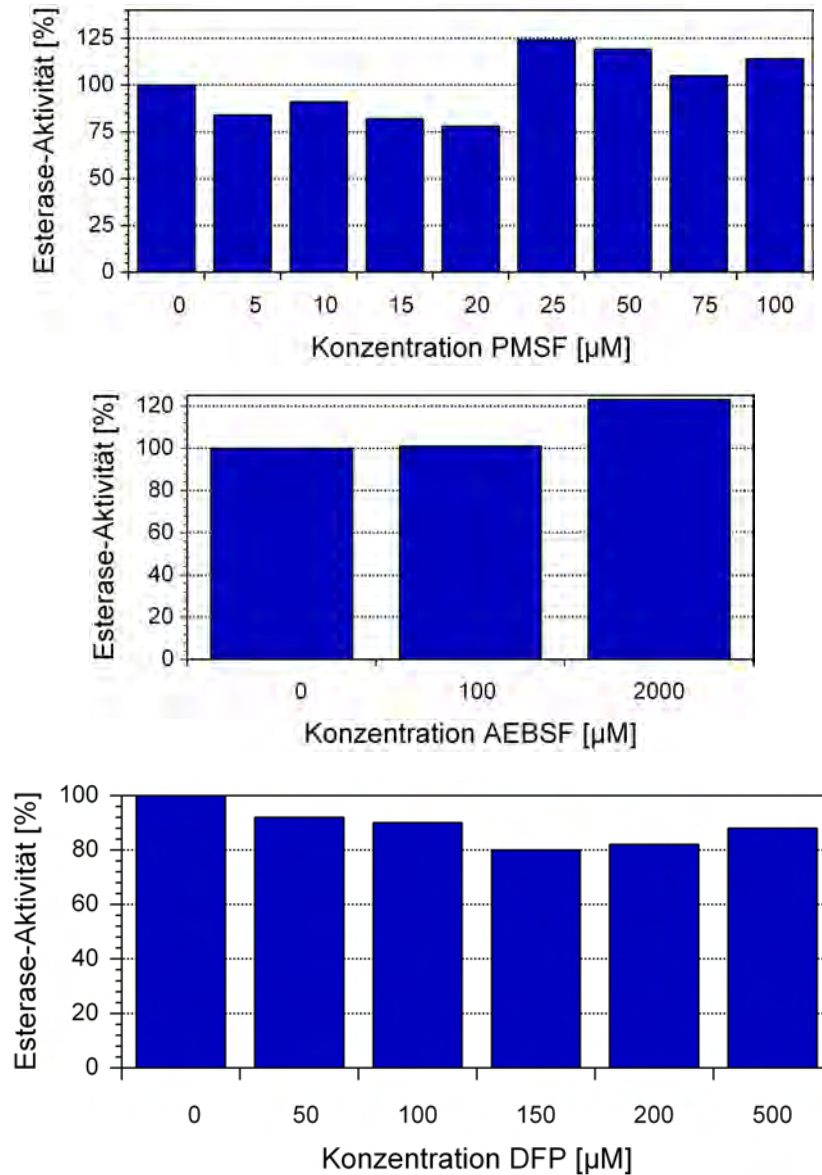


Abb. 3.15 Analysen zum Hemmverhalten der Esterase nach Zugabe von PMSF, AEBSF und DFP. Esterase-Test mit 200 µl Probe (vgl. 2.5)

Im Anschluss an die Gelfiltration in Kombination mit Dodecyl- β -D-Maltosid (s. 2.11.2 bzw. Abb. 3.13) stellte sich heraus, dass die Aktivität des Protein-Komplexes deutlich gesunken war. Daher wurde ein Hemmtest mit Konzentrationen an Dodecyl- β -D-Maltosid von 1, 2,5, 5, 10 und 20 μ M durchgeführt. Nach einer Inkubation von 1 Stunde auf Eis wurde der Esterase-Aktivitäts-Test (vgl. 2.5), unter Anwesenheit der entsprechenden Menge Dodecyl- β -D-Maltosid im Testansatz durchgeführt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse ist in Abb. 3.16 gezeigt.

Ergebnisse

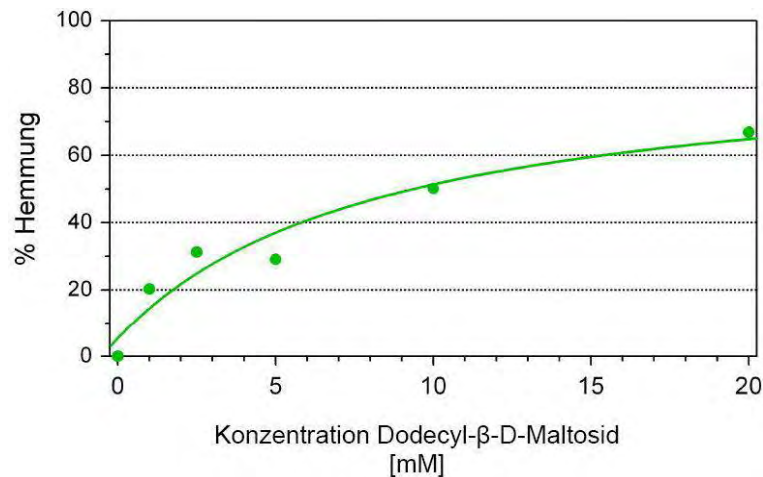


Abb. 3.16 Einfluss von Dodecyl-β-D-Maltosid auf die Esterase-Aktivität nach einer Inkubation von 60 min. auf Eis, Esterase-Aktivitäts-Test durchgeführt, wie unter 2.5 beschrieben

Die Esterase-Aktivität des Enzyms sinkt unter steigender Konzentration von Dodecyl-β-D-Maltosid. Schon bei einer geringen Menge von 1 mM Detergenz gibt es einen Aktivitäts-Verlust von ca. 20 %. Bei einer Konzentration von 20 mM hat das Enzym noch eine Aktivität von etwas mehr als 30 % im Vergleich zum nativen Protein-Komplex.

3.4.3 Temperatur-Stabilität

Um die Temperatur-Stabilität des Protein-Komplexes zu untersuchen, wurde das Protein für je 30 min. in der jeweiligen Temperaturstufe (von 20°C - 100°C in 10°C-Schritten) inkubiert, sofort hochtourig (12000 rpm, Eppendorf-Zentrifuge, Rotor F45-24-11) für 10 min. abzentrifugiert und der Überstand separiert. Mit den gesammelten Überständen wurden Esterase-Aktivitäts-Tests bei Raumtemperatur durchgeführt (vgl. 2.5). Die Daten dafür sind in Abb. 3.17 dargestellt.

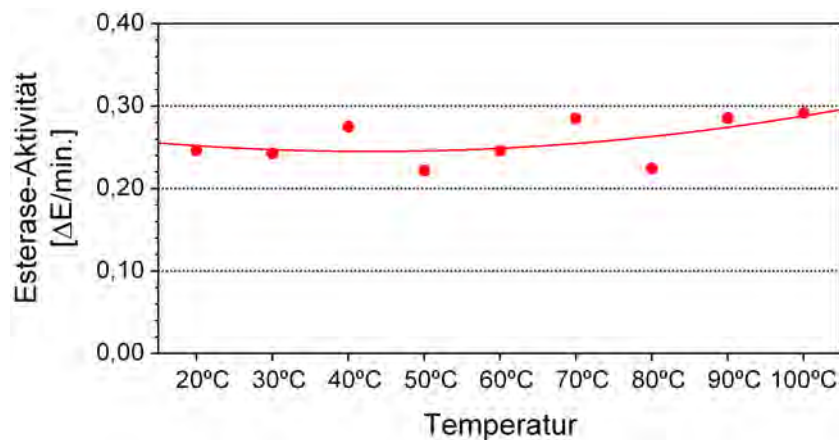


Abb. 3.17 Analyse zur Temperatur-Stabilität, eingesetzte Menge Protein: 700 µg, Esterase-Test mit 200 µl Probe (vgl. 2.5)

Ergebnisse

Obwohl die Temperatur kontinuierlich anstieg, blieb das Enzym stabil. Nachdem die denaturierten Proteine nach der jeweiligen Inkubation durch hochtouriges Abzentrifugieren entfernt wurden, blieb das Enzym in Lösung, so dass es später im Esterase-Aktivitäts-Test mit Schwankungen zwischen 0,2 und 0,9 $\Delta E/\text{min.}$ detektierbar war.

3.4.4 pH-Optimum

Durch die Änderung des pH-Wertes kommt es zu Änderungen des Ladungszustandes und der Konformation, was mit Änderungen der Aktivität einher geht.

Um das pH-Optimum des Protein-Komplexes zu ermitteln, wurde das Protein gegen den jeweiligen pH-Wert dialysiert, wobei eine Spanne von pH 5,5 – 9 gewählt wurde. Für pH 5,5 wurde Natrium-Azetat-Puffer (20 mM) verwendet, die pH-Werte 6 – 9 wurden mit Kalium-Phosphat-Puffer (20 mM) durchgeführt. Der anschließende Esterase-Aktivitäts-Test erfolgte im entsprechenden Puffer-Milieu.

In Abb. 3.18 ist die Esterase-Aktivität bei unterschiedlichen pH-Werten dargestellt.

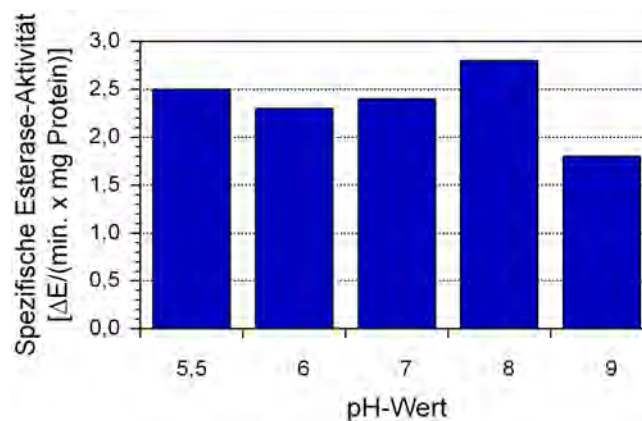


Abb. 3.18 Spezifische Esterase-Aktivität in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte von 5,5 bis 9. Esterase-Aktivitäts-Test mit 200 μl Probe (vgl. 2.5)

Die Enzym-Aktivität schwankte bei pH 5,5, bis 7,0 zwischen 2,3 und 2,5 $\Delta E/(\text{min.} \times \text{mg Protein})$, stieg dann bei pH 8,0 auf 2,8 $\Delta E/(\text{min.} \times \text{mg Protein})$, bevor sie bei pH 9,0 auf 1,8 $\Delta E/(\text{min.} \times \text{mg Protein})$ absank. Daraufhin wurde das pH-Optimum auf pH 8,0 festgelegt.

3.4.5 Substratabhängigkeit

Die Substrat-Abhängigkeit wurde analysiert, indem das Substrates p-Nitrophenol-Butyrat in steigender Konzentration bis 9 μM in den Aktivitäts-Test eingesetzt wurde (vgl. 2.5).

Geht die Konzentration des Substrates über die maximale Umsatzkapazität des Enzyms hinaus, so hängt die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr von der Substrat-, sondern von der Enzym-Konzentration ab. Das Enzym ist dann mit dem Substrat gesättigt.

In Abb. 3.19 ist die Sättigungskurve der Enzym-Aktivität mit einer steigenden Substratkonzentration in Form einer Michaelis-Menten-Kurve dargestellt.

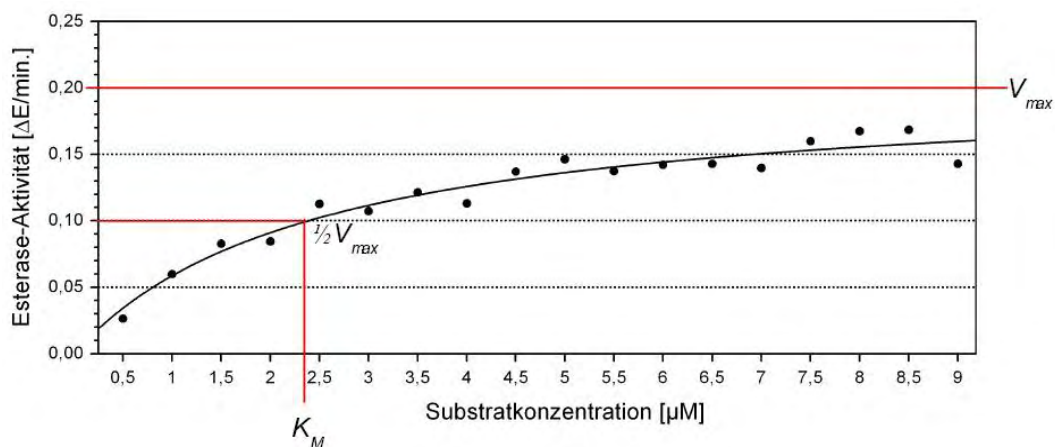


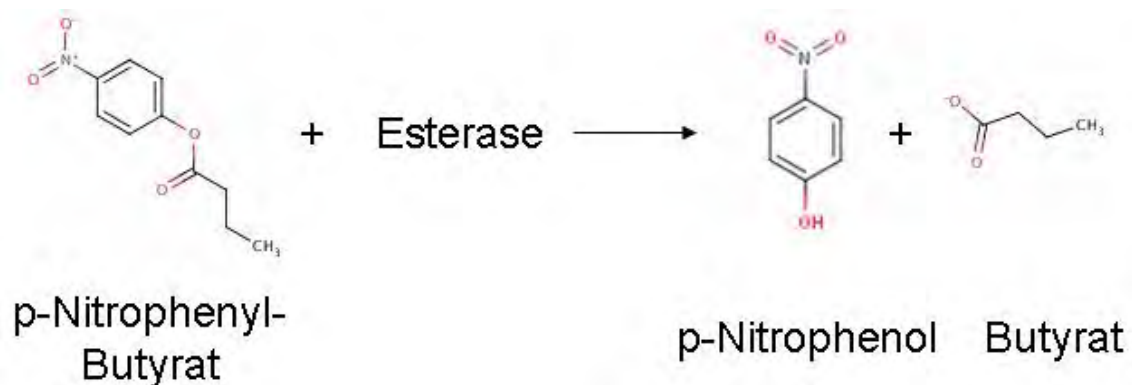
Abb. 3.19 Sättigungs-Kurve der Esterase mit steigender Substrat-Konzentration, Michaelis-Menten-Kinetik, $V_{max} = 0,2 \Delta\text{E}/\text{min.}$, $1/2 V_{max} = 0,1 \Delta\text{E}/\text{min.}$, $K_M = 2,3 \mu\text{M}$, Esterase-Aktivitäts-Tests mit 200 μl Probe (vgl. 2.5)

Die Michaelis-Menten-Kinetik kann beschreibend für enzymatische Reaktionen eingesetzt werden. Dabei liegt folgende Reaktion zu Grunde:



Ergebnisse

Für die hier angewendete Reaktion ergibt sich daraus folgende Formel:



Die Teilreaktion des Enzym-Substrat-Komplexes ist, der Theorie zu Folge, bestimmend für die Geschwindigkeit der Gesamt-Reaktion. Ist das Enzym gesättigt, nimmt die Geschwindigkeit der Reaktion nicht weiter zu, so dass sich aus der Verlaufskurve eine Sättigungskurve ergibt. Man spricht dann auch vom stationären Zustand des Enzyms aus der sich die Geschwindigkeits-Konstante für das jeweilige Enzym ableiten lässt, wobei es sich dabei um die Hälfte des maximalen Geschwindigkeitswerts handelt.

Dem liegt folgende Formel zu Grunde:

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Dabei gilt: V = Geschwindigkeit

$[S]$ = Substrat-Konzentration

K_m = Michaelis-Konstante

Unter Verwendung der Michaelis-Menten-Kinetik ergeben sich hier folgende Parameter:

$$V_{\max} = 0,2$$

$$\frac{1}{2} V_{\max} = 0,1$$

$$K_M = 2,3 \mu\text{M}$$

Ergebnisse

Da es sich bei der Michaelis-Menten-Kurve um eine Sättigungskurve handelt, unterliegt die Bestimmung von V_{max} einer gewissen Ungenauigkeit, da dieser Wert abgeschätzt wird. Um die für ein Protein charakteristischen Werte präziser bestimmen zu können, wurden die ermittelten Daten zusätzlich in einem Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt. Auf diese Weise kann man den Wert V_{max} nicht nur annäherungsweise bestimmen, sondern exakt berechnen, da die ermittelten Werte doppelt-reziprok aufgetragen werden, und es so zu einer Geraden mit Schnittpunkten an der x- und an der y-Achse kommt.

Zu Grunde liegt die Lineweaver-Burk-Gleichung:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Die graphische Darstellung der ermittelten Daten ist als Lineweaver-Burk-Diagramm in Abb. 3.20 dargestellt.

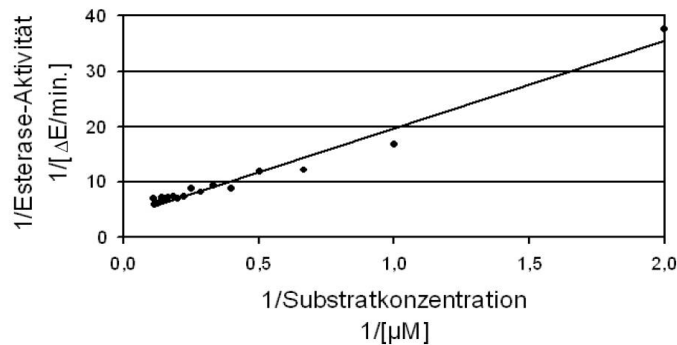


Abb. 3.20 Lineweaver-Burk-Diagramm der ermittelten Daten nach Analyse der Substratabhängigkeit.

Anhand der Geraden konnte hier die Formel $y = 15,78x + 3,95$ ermittelt werden.

$1/V_{max}$ ist anhand des Schnittpunktes der Geraden mit der y-Achse zu berechnen:

$$V_{max} = 0,25$$

$$1/2 V_{max} = 0,13$$

Für $1/K_M$ ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse:

$$K_M = 4 \mu\text{M}$$

3.5 Esterase-Aktivität verschiedener Flagellinhaltiger Bakterien

Verschiedene Bakterienstämme (s. Tab. 3.7), die ein Flagellum besitzen, wurden auf ihre Esterase-Aktivität überprüft. Dazu wurden die Bakterien jeweils in M9 Mangel-Medium über Nacht bei 155 rpm (Kultivierungs-Temperatur, s. Tab. 3.7) angezogen. Um den Wachstums-Überstand zu gewinnen, wurden die Flüssig-Kulturen 10 min. bei 10000 rpm (Jouan Zentrifuge; Rotor AC50.10) und 4°C zentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wurde verworfen. Der Überstand wurde in den Esterase-Aktivitäts-Test (vgl. 2.5) eingesetzt.

Tab. 3.7 Verwendete Bakterienstämme zur Analyse von Esterase-Aktivität im Wachstums-Überstand als Resultat aus vorhandenem Flagellin

Bakterienstamm	Wachstumstemperatur
<i>Escherichia coli</i> SCS110	37°C
<i>Escherichia coli</i> DH5 α mcr	37°C
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Ba10	28°C
<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506	28°C
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Bk3	28°C
<i>Pseudomonas syringae</i> Bi56	28°C
<i>Pseudomonas syringae</i> Ba24	28°C
<i>Pseudomonas syringae</i> Bb31	28°C

Nach Gewinnung des Wachstums-Überstandes wurden sowohl der Protein-Gehalt (vgl. 2.4), wie auch die Esterase-Aktivität (vgl. 2.5) bestimmt. Die sich daraus ergebende spezifische Esterase-Aktivität ist in Abb. 3.21 graphisch dargestellt.

Ergebnisse

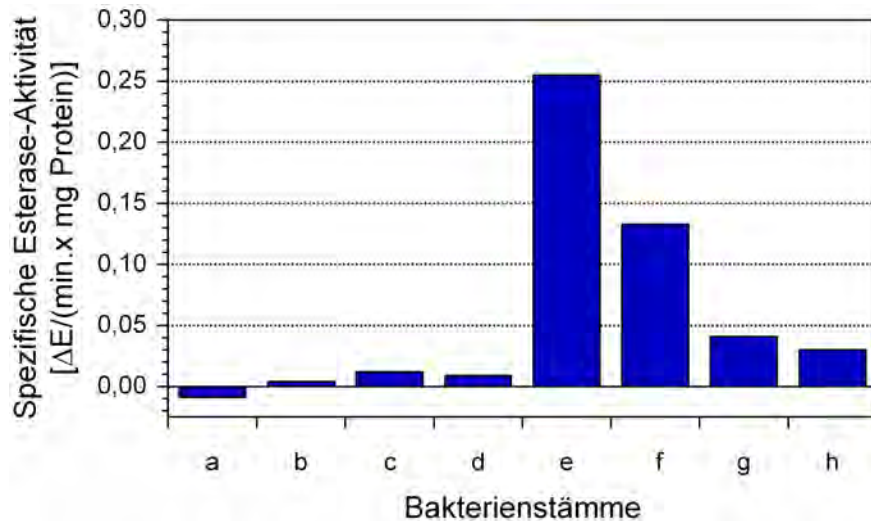


Abb. 3.21 Graphische Darstellung der spezifischen Esterase-Aktivität in Bakterien-Wachstums-Überständen von verschiedenen Bakterienstämmen nach Anzucht in Mangelmedium, a = *E. coli* SCS110, b = *E. coli* DH5α mcr, c = *P. fluorescens* Ba10, d = *P. fluorescens* A506, e = *P. fluorescens* Bk3, f = *P. syringae* Bi56, g = *P. syringae* Ba24, h = *P. syringae* Bb31, Quantitative Proteinbestimmung und Esterase-Aktivitäts-Test mit je 200 µl Probe (vgl. 2.4 und 2.5)

Während die meisten Bakterien-Stämme hier eine sehr geringe Esterase-Aktivität von unter 0,025 $\Delta E/(\text{min.} \times \text{mg Protein})$ zeigen, sind die Aktivitäten von *P. fluorescens* Bk3 mit über 0,25 $\Delta E/(\text{min.} \times \text{mg Protein})$ und *P. syringae* Bi56 mit 0,13 $\Delta E/(\text{min.} \times \text{mg Protein})$ deutlich erhöht.

3.6 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Lichtintensitäten auf das Wachstum von *P. fluorescens* Bk3

P. fluorescens Bk3 wurde ursprünglich aus der Phyllosphäre von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox isoliert. In diesen Lebensbedingungen sind Mikroorganismen je nach Position und Orientierung des Blattes unterschiedlichen und auch extremen Strahlenbedingungen ausgesetzt. Im folgenden Versuch wurde untersucht, welchen Einfluss verschiedene Lichtintensitäten auf die Zellen von *P. fluorescens* Bk3 haben.

Dafür wurden zunächst 400 ml LB-Medium mit 100 µl einer Übernachtskultur von *P. fluorescens* Bk3 in drei parallelen Ansätzen beimpft. Die Kulturen wurden mit 155 rpm bei 28°C für 3 Tage bei Lichtintensitäten von 0, 100 und 1000 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ inkubiert. Nachdem die Kultur bei 1000 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ nicht bewachsen war, wurde sie für drei weitere Tage bei 100 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ inkubiert, um zu ermitteln, ob noch vorhandene Zellen noch lebensfähig sind. Das Wachstum der Bakterien wurde anhand von Konzentrationsmessungen

Ergebnisse

(OD₆₀₀) dokumentiert. Zusätzlich wurde von diesen Kulturen der Wachstumsüberstand gewonnen, um daraus durch die Bestimmung des Protein-Gehalts und der Esterase-Aktivität die spezifische Esterase-Aktivität zu errechnen. Die Daten sind in Abb. 3.22 graphisch zusammengefasst.

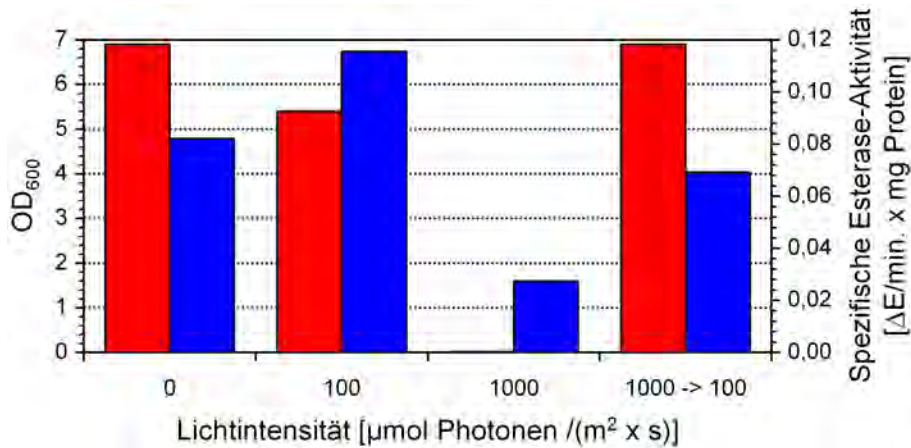


Abb. 3.22 ■ Zellmenge bestimmt durch die Messung der OD₆₀₀, ■ Spezifische Esterase-Aktivität aus den Wachstums-Überständen der Bakterien-Kulturen, Inkubation der Kulturen bei den Lichtintensitäten 0, 100 und 1000 $\mu\text{mol Photonen} / (\text{m}^2 \times \text{s})$, Versuchsansatz bei 1000 $\mu\text{mol Photonen} / (\text{m}^2 \times \text{s})$ wurde nachträglich zur Kontrolle auf Vitalität der Zellen für drei Tage bei 100 $\mu\text{mol Photonen} / (\text{m}^2 \times \text{s})$ inkubiert, Quantitative Proteinbestimmung und Esterase-Aktivitäts-Test mit je 200 μl Probe (vgl. 2.4 und 2.5)

Die Bakterien wuchsen bei Kultivierung unter Lichtabschluss deutlich besser (abschließende OD₆₀₀ von 6,9) als bei einer Lichtintensität von 100 $\mu\text{mol Photonen} / (\text{m}^2 \times \text{s})$ (abschließende OD₆₀₀ von 5,4). Bei 1000 $\mu\text{mol Photonen} / (\text{m}^2 \times \text{s})$ waren zunächst nahezu keine Bakterien gewachsen (OD₆₀₀ von 0,02), so dass hier anschließend die Vitalität der Zellen durch eine weitere Inkubation bei 100 $\mu\text{mol Photonen} / (\text{m}^2 \times \text{s})$ für drei Tage überprüft wurde. Die Zellen waren hier noch lebensfähig, was sich durch einen deutlichen Anstieg der Konzentration von OD₆₀₀ 0,02 nach Inkubation bei 1000 $\mu\text{mol Photonen} / (\text{m}^2 \times \text{s})$ auf OD₆₀₀ 6,9 bei nachfolgender Inkubation unter 100 $\mu\text{mol Photonen} / (\text{m}^2 \times \text{s})$ zeigte.

Obwohl die Zellzahl nach einer Kultivierung unter Lichtabschluss am höchsten war (vgl. Abb. 3.22), konnte nur eine spezifische Esterase-Aktivität von 0,08 $\Delta E / (\text{min} \cdot \text{mg Protein})$ nachgewiesen werden. Dagegen ist die spezifische Esterase-Aktivität nach einer Kultivierung bei 100 $\mu\text{mol Photonen} / (\text{m}^2 \times \text{s})$ mit 0,12 $\Delta E / (\text{min} \cdot \text{mg Protein})$ am höchsten, wobei hier lediglich eine OD₆₀₀ von 5,4, also 22 % weniger, als bei der Kultivierung unter Lichtabschluss vorlag. Und obgleich nach einer Inkubation bei 1000 $\mu\text{mol Photonen} / (\text{m}^2 \times \text{s})$ kaum Bakterienzellen vorhanden waren (OD₆₀₀ von 0,02), ist hier eine vergleichsweise hohe Esterase-Aktivität von

Ergebnisse

0,03 $\Delta E/(\text{min.} \times \text{mg Protein})$ nachgewiesen worden. Nach weiterer Inkubation bei 100 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$, stieg sie weiter an auf 0,07 $\Delta E/(\text{min.} \times \text{mg Protein})$, erreichte aber nicht die Aktivität der Ansätze unter Lichtintensitäten von 0 oder 100 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss von Starklicht mittels einer Lichtintensität von 1000 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ genauer analysiert. Es wurden parallel zwei Fernbach-Kolben mit LB-Flüssigmedium mit Zellen einer Übernachtskultur aus *P. fluorescens* Bk3 beimpft, wobei ein Kolben (Ansatz 1) mit 100 μl inokuliert und der andere Kolben (Ansatz 2) mit der Übernachtskultur auf eine Optische Dichte von 0,1 eingestellt wurde. Die Kultivierung erfolgte über drei Tage. Im Anschluss wurden beide Kolben für weitere vier Tage einer Lichtintensität von 100 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ ausgesetzt. In Abb. 3.23 ist jeweils die Bakterienkonzentration innerhalb der Kulturen durch Bestimmung der OD dargestellt.

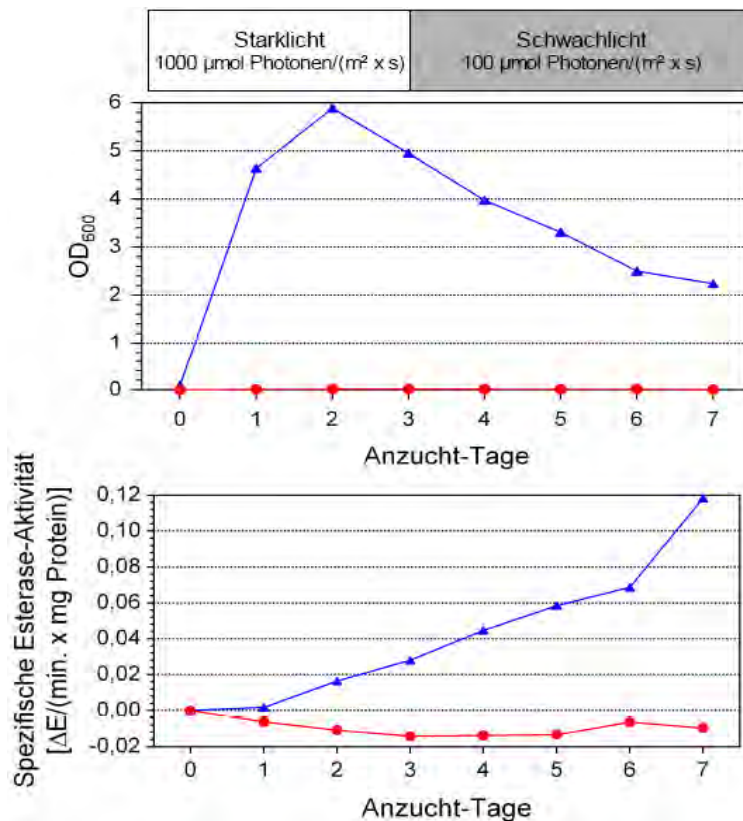


Abb. 3.23 Bakterienkonzentration und Spezifische Esterase-Aktivität von *P. fluorescens* Bk3 in den Flüssigkulturen bei einer Lichtintensität von 1000 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ in den ersten drei Tage, und bei 100 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ in den folgenden vier Tage, —●— Ansatz 1 = 400 ml LB-Medium inokuliert mit 100 μl Übernachtskultur von *P. fluorescens* Bk3, —▲— Ansatz 2 = 400 ml LB-Medium mit einer Übernachtskultur von *P. fluorescens* Bk3 eingestellt auf eine OD₆₀₀ von 0,1. Konzentration der ausgehenden Übernachtskultur: 3×10^9 Zellen / ml, Quantitative Proteinbestimmung und Esterase-Aktivitäts-Test mit je 200 μl Probe (vgl. 2.4 und 2.5)

Ergebnisse

Während die Startkonzentration bei Ansatz 1 eine OD_{600} von 0,0003 hatte, wurde eine maximale OD_{600} von 0,018 an Anzucht-Tag 6 erreicht. Dagegen stieg die Zellzahl in Ansatz 2 bereits innerhalb des ersten Anzucht-Tages deutlich an auf eine OD_{600} von 4,6, hatte ihr Maximum an Anzucht-Tag 2 mit OD_{600} 5,9 und fiel dann kontinuierlich wieder ab auf einen abschließenden Wert von 2,2.

Im Vergleich dazu ist die spezifische Esterase-Aktivität gezeigt. Während diese in der Kultur mit geringer Bakterien-Zellzahl (Ansatz 1) praktisch unter der Nachweisgrenze war, und auch über den gesamten Verlauf des Experiments nicht anstieg, kam es in Ansatz 2 mit einer Startkonzentration von OD_{600} 0,1 zu einem kontinuierlichen Anstieg der spezifischen Esterase-Aktivität von 0,12 $\Delta E/(\text{min.} \times \text{mg Protein})$ an Anzucht-Tag 7, wobei der Wechsel der Lichtintensität keine Veränderung im stetig ansteigenden Kurvenverlauf zur Folge hatte.

In einem weiteren Experiment sollten verschiedene Kulturen mit gleichen Startbedingungen unterschiedlichen Lichtintensitäten ausgesetzt werden. Daher wurden drei Ansätze, wie bereits zuvor mit 400 ml LB-Medium in Fernbach-Kolben vorbereitet und mit einer Übernachtskultur von *P. fluorescens* Bk3 auf eine OD_{600} von 0,1 eingestellt. Alle drei Ansätze wurde über 11 Tage bei Lichtintensitäten von 0, 100 und 1000 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$, 28°C und 155 rpm kultiviert. Dabei wurde täglich die Zellzahl anhand der OD_{600} überprüft. Außerdem wurde aus dem Wachstumsüberstand der Proteingehalt und die Esterase-Aktivität bestimmt, um daraus die spezifische Esterase-Aktivität zu berechnen. Die Ergebnisse dazu sind zusammenfassend in Abb. 3.24 dargestellt.

Ergebnisse

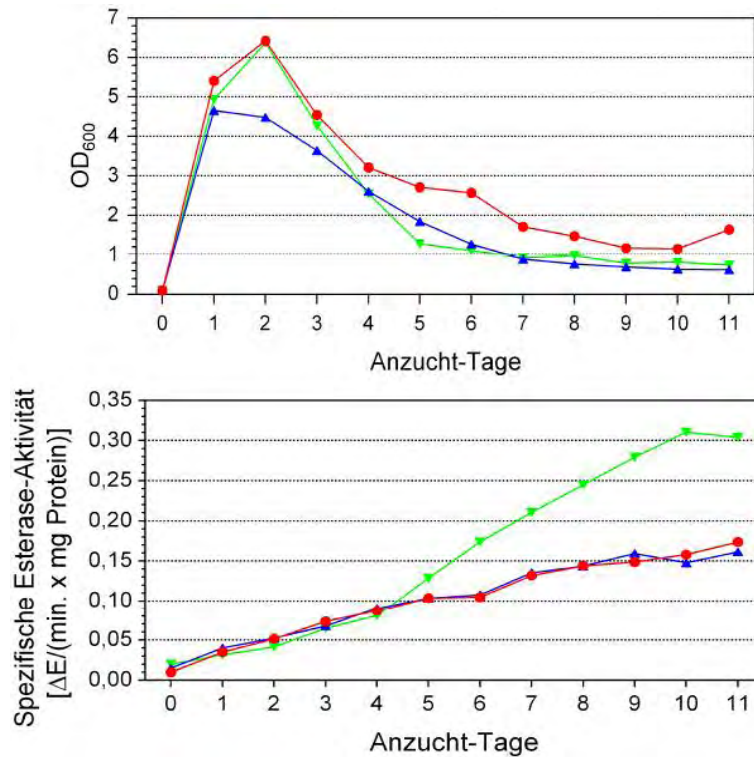


Abb. 3.24 Verlauf des Zellzahl (OD_{600}) und der spezifischen Esterase-Aktivität über 11 Tage bei unterschiedlichen Lichtintensitäten, Anfangskonzentration von OD_{600} 0,1; —●— Ansatz 1 = 0 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$, —▲— Ansatz 2 = 100 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$, —▼— Ansatz 3 = 1000 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$, Quantitative Proteinbestimmung und Esterase-Aktivitäts-Test mit je 200 μl (vgl. 2.4 und 2.5)

Die Zellzahl stieg hier bei allen Ansätzen innerhalb des ersten Tages deutlich an auf eine OD_{600} von 4,7 bis 5,4. Bei einer Inkubation unter 100 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ fiel sie dann zunächst langsam auf eine OD_{600} von 4,5, ab dem dritten Tag steiler wieder ab bis zu einer abschließenden Bakterienkonzentration von einer OD_{600} von 0,6. Bei den jeweiligen Kultivierungen unter Lichtausschluss und unter 1000 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ gab es noch eine leichte Steigerung der Zellzahl vom ersten zum zweiten Tag um eine OD_{600} von 1 (Ansatz 1) bzw. von 1,5 (Ansatz 3), bevor auch dann die jeweiligen Kurven mit ähnlichen Verläufen wieder abfielen auf einen abschließenden Wert von OD_{600} 1,6 in Ansatz 1 bzw. 0,8 in Absatz 3.

Die spezifische Esterase-Aktivität stieg unter Lichtabschluss und bei einer Lichtintensität von 100 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ kontinuierlich an von einem Startwert um 0,04 $\Delta\text{E}/(\text{min.} \times \text{mg Protein})$ bis zu einer abschließenden Aktivität von 0,17 $\Delta\text{E}/(\text{min.} \times \text{mg Protein})$, während bei der Inkubation unter Starklicht die spezifische Esterase-Aktivität bis zum vierten Tag vergleichbar mit der der anderen Ansätze war, dann deutlich stärker anstieg bis zu einem Maximum von 0,31 $\Delta\text{E}/(\text{min.} \times \text{mg Protein})$ an Anzucht-Tag 10, und dann wieder leicht zurück ging auf einen abschließenden Aktivitäts-Wert von 0,30 $\Delta\text{E}/(\text{min.} \times \text{mg Protein})$.

3.7 Supression-Subtraktions-Hybridisierung mit RNA aus Bakterienpopulationen von *P. fluorescens* Bk3 aus unterschiedlicher Anzucht

Um zu untersuchen, welchen Einfluss unterschiedliche Lebensräume auf das Transkriptom von *P. fluorescens* Bk3 haben, sollte eine Supression-Subtraktions-Hybridisierung (SSH) durchgeführt werden. Diese Methode mit Reagenzien der Firma Clontech Laboratories ist bislang für eukaryontische Zellen konzipiert, und sollte nun durch verschiedene Vorarbeiten auch für prokaryontische Zellen etabliert werden.

Nach der Isolierung der Gesamt-RNA aus den Bakterienzellen wurde mittels Hybridisierung zunächst mit biotinierten Primern gegen Sequenzen der 16S- bzw. 23S-RNA, und im Anschluss mit Streptavidin-Magnet-Partikeln die ribosomale RNA entfernt. In einem weiteren Schritt wurde eine Polyadenylierung vorgenommen, um entsprechenden Primern innerhalb der Methode eine Startsequenz zu gewährleisten. Es erfolgte die Reverse-Transkription zur Synthese der cDNA aus der RNA, mit deren Hilfe dann die SSH durchgeführt wurde. In Abb. 3.25 ist zur Übersicht über diese Schritte ein Fließschema dargestellt.

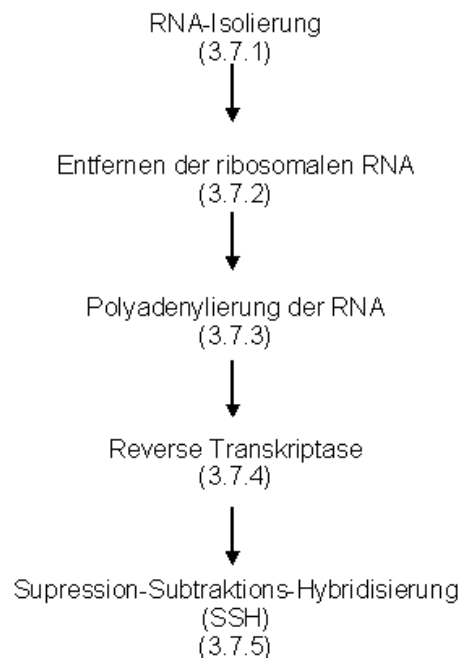


Abb. 3.25 Übersichtsdigramm für die Vorbereitung der prokaryontischen RNA zum Einsatz in die SSH

Zur Optimierung der Methode wurden einzelne Schritte variiert.

3.7.1 Isolierung von prokaryontischer RNA mit unterschiedlichen Methoden

Die RNA aus Bakterien wurde, wie bereits unter 2.16 beschrieben, mit unterschiedlichen Methoden isoliert. Hier kam eine manuelle Methode nach Reddy et al. (1990) zum Einsatz, bei der es aufgrund der großen Zellmenge, die anfänglich eingesetzt wurde, zu einer hohen Ausbeute an RNA kam. Außerdem wurde das RNA-Isolierungs-Kit NucleoSpin® RNA II von Macherey-Nagel zur Isolierung bakterieller RNA angewendet. Die Ergebnisse in Form von Agarose-Gelen sind in Abb. 3.26 dargestellt.

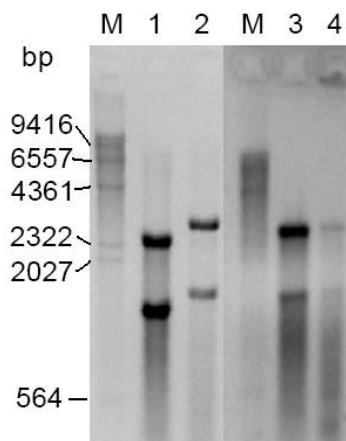


Abb. 3.26 Isolierung prokaryontischer Gesamt-RNA; 1 = aus *P. fluorescens* Bk3 angezogen in LB-Flüssig-Kultur, 2 = aus *P. fluorescens* Bk3 isoliert von Blättern von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox (*in vitro*), jeweils nach manueller Methode (Reddy et al., 1990), 3 = aus *P. fluorescens* Bk3 angezogen in LB-Flüssig-Kultur, 4 = aus *P. fluorescens* Bk3 isoliert von Blättern von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox (*in vitro*), je mit NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel), M = λ DNA/*Hind*III-Marker (Fermentas), aufgetragene Menge RNA: 0,9 μ g pro Spur

Zu erwarten waren die charakteristischen rRNA Banden bei 2901 bp (23S-rRNA) und 1539 bp (16S-rRNA). Diese Daten beziehen sich auf das Genom von *P. fluorescens* Pf-5. Auffallend war das unterschiedliche Migrationsverhalten in der elektrophoretischen Auftrennung der RNA, die auf manuellem Wege isoliert wurde. Die RNA aus den Bakterien, die von Pflanzen-Blättern isoliert wurde, lief im Gegensatz zu der aus den Bakterien der Flüssigkultur etwas verzögert.

Folgende RNA-Konzentrationen konnten in den Proben photometrisch gemessen werden (vgl. 2.20):

	manuelle Methode	Isolierungs-Kit
<i>P. fluorescens</i> Bk3 aus Flüssigkultur	9 mg/ml	216 μ g/ml
<i>P. fluorescens</i> Bk3 isoliert von <i>in vitro</i> -Apfelbaum-Blättern	358 μ g/ml	101 μ g/ml

Ergebnisse

Durch die manuelle Methode konnte eine deutlich größere Menge an RNA isoliert werden, als durch das Isolierungs-Kit, wobei zu berücksichtigen bleibt, dass bei der manuellen Methode deutlich mehr Bakterien-Zellen eingesetzt wurden. Während hier 50 ml LB-Flüssigkultur bzw. alle gewonnenen Zellen aus der Reisolierung von den Pflanzenblättern eingesetzt wurden (vgl. 2.16.2.2), wurden bei der Methode mit Isolierungskit NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel) maximal 10^9 Zellen eingesetzt.

3.7.2 Entfernen der ribosomalen RNA aus prokaryontischer Gesamt-RNA

Da für den Einsatz in die SSH die messenger RNA (mRNA) von Bedeutung ist, diese allerdings nur ca. 5 - 10 % der Gesamt-RNA bei Prokaryonten ausmacht, sollte, zunächst durch eine Hybridisierung mit biotinierten Primern gegen ribosomale 16S- und 23S-RNA (16SL_Biotin Primer, 16 SR_Biotin Primer, 23S_118R-biotin Primer, 23S_1370V_biotin Primer, je 1 μ l bei einer Konzentration von 10 pmol/ μ l), und im Folgenden durch die Behandlung mit Streptavidin-Magnet-Partikeln, die hybridisierte ribosomale RNA entfernt werden. In Abb. 3.27 ist ein Agarose-Gel mit der Gesamt-RNA vor Hybridisierung, und der RNA ohne ribosomale RNA nach Hybridisierung dargestellt. Es wurde die Gesamt-RNA (20 μ g) eingesetzt, die zuvor mit der manuellen Methode (s. 2.16.2.2) isoliert wurde.

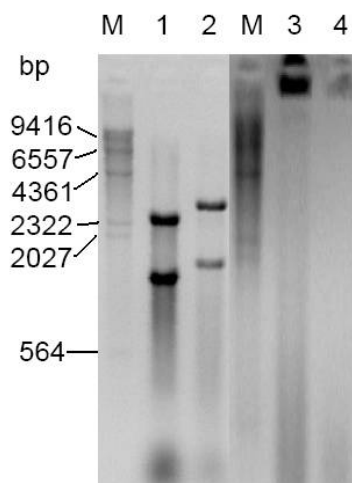


Abb. 3.27 Agarose-Gel vor und nach Entfernen der rRNA, Gesamt-RNA vgl. 3.7.1, M = λ DNA/*Hind*III-Marker (Fermentas), 1 = aus *P. fluorescens* Bk3 kultiviert in LB-Flüssigkultur, 2 = aus *P. fluorescens* Bk3 isoliert von Blättern von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox (*in vitro*), 3 = RNA nach Entfernen der rRNA (aus *P. fluorescens* Bk3 kultiviert in LB-Flüssigkultur), 4 = RNA nach Entfernen der rRNA (aus *P. fluorescens* Bk3 isoliert von Blättern von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox (*in vitro*)), aufgetragene Menge RNA: 1 μ g pro Spur

Ergebnisse

Die photometrische Bestimmung (vgl. 2.20) ergab folgende Konzentrationen:

	Gesamt-RNA	nach Hybridisierung zum Entfernen der 16S- und 23S-RNA
<i>P. fluorescens</i> Bk3 aus Flüssigkultur	9 mg/ml	107 µg/ml
<i>P. fluorescens</i> Bk3 isoliert von <i>in vitro</i> -Apfelbaum- Blättern	358 µg/ml	111 µg/ml

Ein Großteil der RNA konnte aus der Gesamt-RNA entfernt werden. Da die charakteristischen rRNA-Banden im Gel ebenfalls nicht mehr sichtbar sind (vgl. Abb. 3.27), kann davon ausgegangen werden, dass die ribosomale RNA entfernt wurde.

3.7.3 Polyadenylierung der prokaryontischen mRNA

Da für die Herstellung der cDNA mittels SMART™ PCR cDNA Synthese Kit (Clontech Laboratories) RNA mit einem Poly(A)-Schwanz benötigt wird, damit der entsprechende CDS-Primer zur cDNA-Synthese binden kann, wurde eine Polyadenylierung durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgte eine Aufreinigung der erhaltenen RNA mit Hilfe von Oligo(dT)-Cellulose-Partikeln. Die Methoden zur Polyadenylierung und zur Reinigung der RNA erfolgten nach 2.22 und 2.23. Folgende RNA-Konzentrationen wurden photometrisch ermittelt:

RNA aus <i>P. fluorescens</i> Bk3 kultiviert in einer Flüssigkultur, nach Polyadenylierung	13 µg/ml
RNA aus <i>P. fluorescens</i> Bk3 isoliert von <i>in vitro</i> - Pflanzen, nach Polyadenylierung	7 µg/ml

Bei der RNA aus den Zellen aus Flüssigkultur sind in diesem Schritt bereits 88 %, bei der RNA aus den auf den Pflanzen etablierten Zellen 94 % der Nucleinsäuren entfernt.

3.7.4 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Zum Einsatz der Proben in die SSH muss die RNA zuvor in cDNA umgeschrieben werden. Zu diesem Zweck wurde die Methode der Reversen Transkription angewandt, bei der mit Hilfe der Reversen Transkriptase ein cDNA-Strang synthetisiert wird. Dieser steht dann für folgende PCR zur Verfügung.

3.7.4.1 Transkription durch LD-PCR mit SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit

Die vorbereitete RNA (vgl. 3.7.2 und 3.7.3) wurde zur cDNA-Synthese in das SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech Laboratories) eingesetzt (vgl. 2.24.3). Bei dieser Methode kommt es zunächst zur Einzelstrang-Synthese durch Verwendung von CDS-Primern, die an den Poly(A)-Schwanz binden. In einer anschließenden PCR wird der Strang komplementiert und amplifiziert. In Abb. 3.28 zeigt das Kontrollgel zur Ermittlung der optimalen Zyklenzahl für diese PCR.

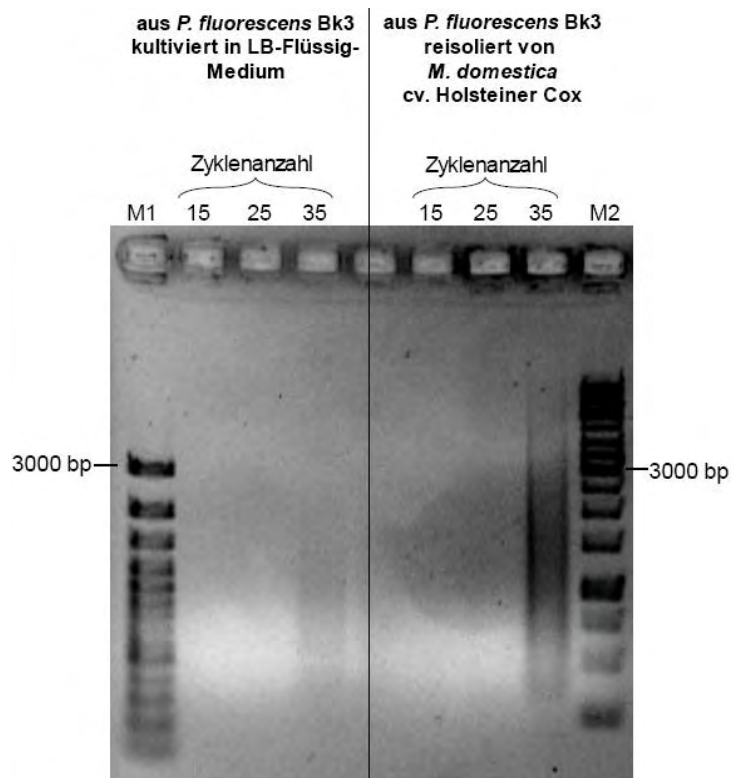


Abb. 3.28 PCR zur Ermittlung der optimalen Anzahl an Zyklen, M1 = GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas), M2 = GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas), PCR-Produkte nach unterschiedlichen Zyklenzahlen wie angegeben, DNA-Menge pro Spur: 5 µl PCR-Produkt

Ergebnisse

Die Anzahl der Zyklen wurde hier entgegen der Beschreibung aus 2.24.3 erhöht, da zunächst nach den angegebenen Zyklen (15, 18, 21 und 24) keine cDNA auf dem Gel sichtbar war (Daten nicht gezeigt). Die hier erhaltene cDNA wurde in die SSH eingesetzt, wie unter 2.25 beschrieben. Das Ergebnis dieser SSH blieb erfolglos.

3.7.4.2 Reverse Transkription mittels High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix und anschließender Doppelstrang-Synthese mit PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit

Nachdem die SSH mit vorheriger Verwendung des SMART™ PCR cDNA Synthesis Kits (Clontech Laboratories) erfolglos blieb, wurde zur cDNA-Synthese aus prokaryontischer RNA der High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems) verwendet (vgl. 2.24.2). Bei dieser Methode kann auf eine vorangegangene Polyadenylierung verzichtet werden, da dieser Master Mix einen Random-Primer enthält, so dass nicht zwingend ein Poly(A)-Schwanz zur Hybridisierung der Primer erforderlich ist. In diesen Ansatz wurde daher die unbehandelte Gesamt-RNA (isoliert mit RNA-Isolierungs-Kit NucleoSpin® RNA II von Macherey-Nagel) eingesetzt.

Um eine unerwünschte RNA-Degradierung vor der Transkription zu vermeiden, wurde auch auf die Entfernung der ribosomalen RNA verzichtet.

Zur Kontrolle der erfolgreichen cDNA-Synthese wurde eine PCR mit bekannten Primern (*flic_fwd* und *flic_rev*, amplifiziert innerhalb des *flic*-Gens 272 bp) angeschlossen. Das dazugehörige Gelbild ist in Abb. 3.29 dargestellt.

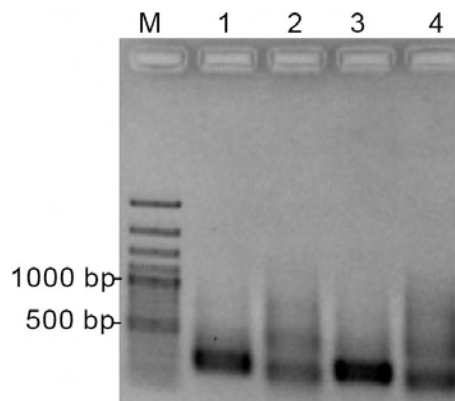


Abb. 3.29 Kontroll-PCR nach cDNA-Synthese mittels High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems), M = GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas), 1 = aus cDNA von *P. fluorescens* Bk3 aus Flüssigkultur, 2 = Negativ-Kontrolle der cDNA-Synthese (Master-Mix ohne Transkriptase), 3 = aus cDNA von *P. fluorescens* Bk3 isoliert von *in vitro*-Pflanzen-Blättern, 4 = Negativ-Kontrolle der cDNA-Synthese (Master-Mix ohne Transkriptase), DNA-Menge: 4 µl PCR-Ansatz pro Spur

Ergebnisse

Bei der Negativ-Kontrolle handelt es sich um den Einsatz des High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Negative Control), der kein Enzym enthält. Hier sollte also keine cDNA synthetisiert werden. Innerhalb der Kontroll-PCR kommt es zur Amplifikation von FliC, wodurch eine starke Bande entsteht. Die deutlich abgeschwächte Bande bei der Negativ-Kontrolle ist auf die noch vorhandene RNA innerhalb des Ansatzes zurück zu führen. Da hier jedoch keine cDNA synthetisiert wurde, ist die Bande schwächer ausgeprägt. Daraus ist zu schließen, dass die cDNA-Synthese der eingesetzten RNA erfolgreich war. Um eine ausreichende Menge an cDNA zu erhalten, wurden für beide Populationen vier parallele Ansätze der Transkription durchgeführt.

Anschließend wurde die cDNA zur Doppelstrang-Synthese in das PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech Laboratories) eingesetzt, wie bereits unter 2.24.2 beschrieben.

3.7.5 SSH von *P. fluorescens* Bk3 aus Flüssig-Kultur und reisoliert von der Blattoberfläche von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox

Nachdem die Bakterien von den Blättern von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox und aus der Flüssigkultur geerntet wurden, erfolgte sofort die RNA-Isolierung. Diese beiden RNA-Populationen wurden im weiteren Verlauf zur Transkription in cDNA eingesetzt. Es erfolgte die Methode der SSH, wie bereits beschrieben. Eingesetzt wurde die erhaltene cDNA aus 3.7.4.2. Zum Erhalt kleinerer cDNA-Fragmente mit blunt ends, die für die spätere Ligation der Adaptoren von Bedeutung sind, wurde eine Restriktionsenzym-Spaltung mit *RsaI* durchgeführt (vgl. 2.25.1). Der Erfolg dieser Restriktions-Spaltung wurde mit Hilfe eines Agarose-Gels kontrolliert und ist in Abb. 3.30 abgebildet.

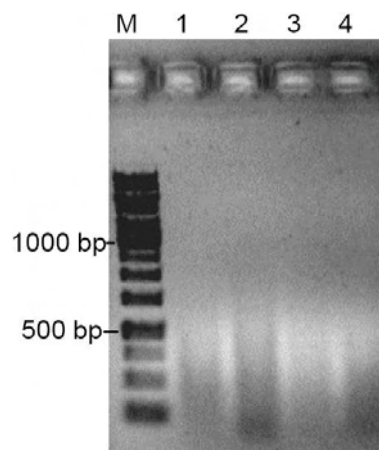


Abb. 3.30 Kontroll-Gel nach *RsaI*-Spaltung, M = GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas), 1 = ungespaltene cDNA aus *P. fluorescens* Bk3 nach Kultivierung in Flüssigmedium, 2 = *RsaI*-gespaltene cDNA aus *P. fluorescens* Bk3 nach Kultivierung in Flüssigmedium, 3 = ungespaltene cDNA aus *P. fluorescens* Bk3 isoliert von *in vitro*-Pflanzen, 4 = *RsaI*-gespaltene cDNA aus *P. fluorescens* Bk3 isoliert von *in vitro*-Pflanzen; aufgetragene DNA-Menge (ungespalten): 5 µl, aufgetragene DNA-Menge (gespalten): 8 µl pro Spur

Ergebnisse

Die *RsaI*-gespaltene cDNA weist kleinere DNA-Fragmente auf, als die ungespaltene, wie man an dem sich verlagernden Schmier erkennen kann. Dieser besteht nach der Spaltung aus kleineren Fragmenten und verändert daher sein Migrationsverhalten in den niedermolekularen Bereich. Dieses Resultat ist auf dem gezeigten Gelbild sichtbar, so dass davon auszugehen war, dass die *RsaI*-Restriktionsenzym-Spaltung erfolgreich war.

Die cDNA, die aus *P. fluorescens* Bk3, kultiviert in Flüssigmedium, hergestellt wurde, diente in dieser SSH als Driver. Dabei handelt es sich um die Population, die unbehandelt bleibt und als Standard dient. Dagegen fungierte die cDNA, die aus *P. fluorescens* Bk3, isoliert von *in vitro*-Pflanzen, gewonnen wurde, als Tester.

Der Restriktions-Ansatz wurde gereinigt (vgl. 2.25.2) und, nach der Ligation der Adaptoren an den Tester (vgl. 2.25.3), miteinander hybridisiert (vgl. 2.25.4 und 2.25.5). Es erfolgten zwei Amplifikationsschritte (s. 2.25.6), bei denen die nicht hybridisierten Tester-Fragmente angereichert wurden, um später in den pGEM-T Vector ligiert zu werden (vgl. 2.26). Das Kontroll-Gel der abschließenden Amplifizierung befindet sich in Abb. 3.31.

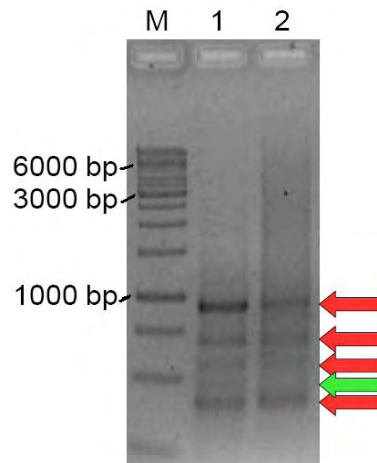


Abb. 3.31 Kontrollgel der abschließenden PCR zur Amplifizierung der erhaltenen, nicht hybridisierte Tester-Fragmente, M = GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas), 1 = SSH-Endprodukt, 2 = Obligation-Kontrolle des Ligations-Ansatzes (s. 2.25.6), aufgetragene DNA-Menge: 8 µl pro Spur, roter Pfeil: Übereinstimmungen zwischen Obligations-Kontrolle des Ligations-Ansatzes und dem SSH-Endprodukt, grüner Pfeil: Unterschied zwischen Obligations-Kontrolle des Ligations-Ansatzes und dem SSH-Endprodukt

Ergebnisse

Die Obligations-Kontrolle wurde durchgeführt, um falsch-positive PCR-Produkte der nicht hybridisierten Tester-Fragmente von den positiven PCR-Produkten zu unterscheiden. Daher sollten die Banden-Muster des PCR-Produktes nach SSH und der Obligations-Kontrolle nicht identisch sein.

In diesem Fall gab es Banden-Übereinstimmungen, die mit einem roten Pfeil gekennzeichnet sind. Jedoch war auch eine Bande im SSH-Ansatz sichtbar, die in der Obligations-Kontrolle nicht zu beobachten war (grüner Pfeil). Aufgrund dieser Tatsache wurde mit dem SSH-Ansatz weiter gearbeitet.

Im Folgenden wurden die so erhaltenen PCR-Produkte nach einer Ligation in das Vector-System pGEM-T in *E. coli* TOP10 kloniert und zur Blau-Weiß-Selektion auf LB-Agar in Anwesenheit von Ampicillin ausplattiert.

Diese SSH wurde zum Nachweis der Reproduzierbarkeit wiederholt. Insgesamt konnten dabei nach der Blau-Weiß-Selektion 438 Klone isoliert werden.

3.7.5.1 Kolonie-PCR

Zur Kontrolle der isolierten Klone (vgl. 3.7.5) und dem Detektieren der Inserts wurde von einem Teil der Klone eine Kolonie-PCR durchgeführt. In den Abb. 3.32 bis 3.34 sind die dazugehörigen Agarose-Gelbilder dargestellt.

Die Klone beginnend mit 1-... stammen aus der ersten SSH. Nach Wiederholung der SSH wurden die Klone beginnend mit den Ziffern 3-... und 4-... erzeugt.

Ergebnisse

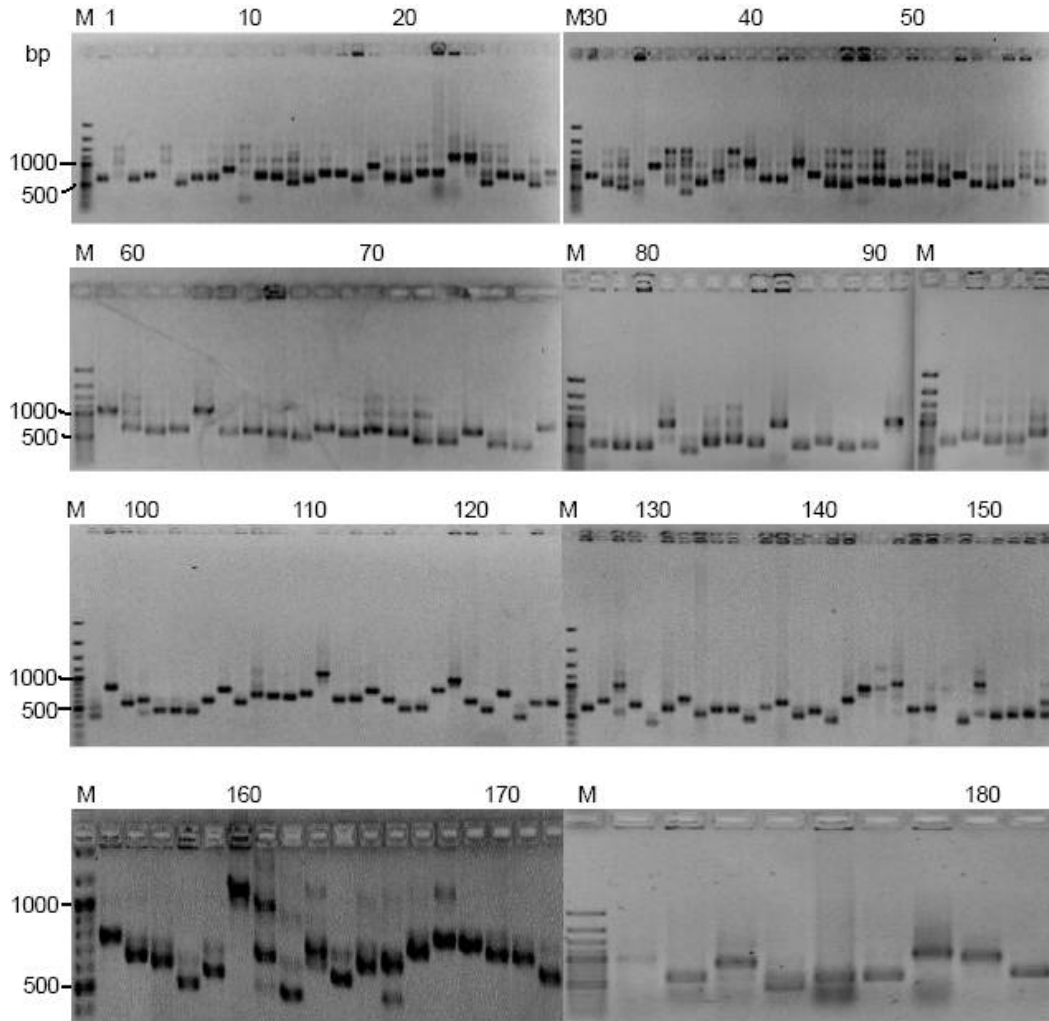


Abb. 3.32 Darstellung der PCR-Produkte (Kolonie-PCR) aller Klone der Serie 1 (1-1 bis 1-181) erhalten aus der ersten SSH mit *P. fluorescens* Bk3, Anzucht in LB-Flüssigmedium vs. nach Etablierung auf der Blattoberfläche von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox, M = GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas). Aufgetragene DNA Menge pro Spur: 3 µl PCR-Produkt

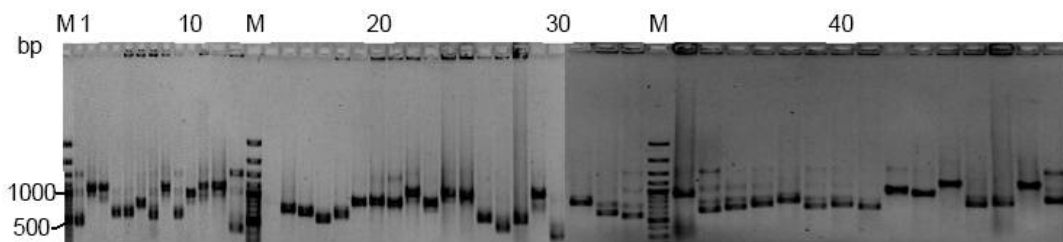


Abb. 3.33 Darstellung der PCR-Produkte (Kolonie-PCR) der Klone 3-1 bis 3-48 (erhalten aus der wiederholten SSH), M = GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas). Aufgetragene DNA Menge pro Spur: 3 µl PCR-Produkt

Ergebnisse

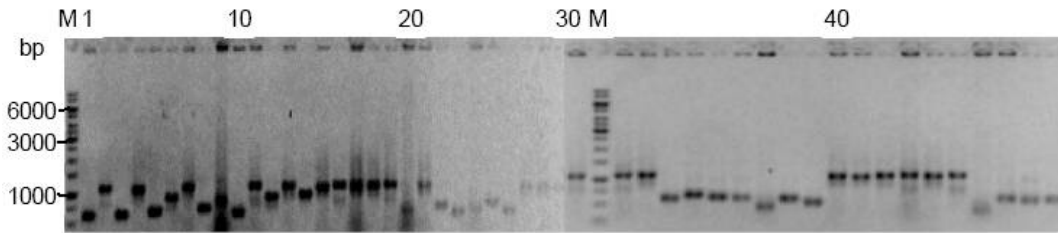


Abb. 3.34 Darstellung der PCR-Produkte (Kolonie-PCR) der Klone 4-1 bis 4-49 (erhalten aus der wiederholten SSH), M = GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas). Aufgetragene DNA Menge pro Spur: 3 µl PCR-Produkt

Die dargestellten Gelbilder zeigen PCR-Produkte in verschiedenen Größen zwischen 300 und 1500 bp, die auf unterschiedliche Inserts schließen lassen.

3.7.5.2 Alkalische Lyse einiger SSH-Klone

Um mit einer anderen Methode eine weitere Abklärung der isolierten Klone durchzuführen, wurde von einem Teil der Klone eine alkalische Lyse durchgeführt. Die dazu gehörigen Agarose-Gele mit den erhaltenen Plasmiden sind in der Abb. 3.35 zu sehen.

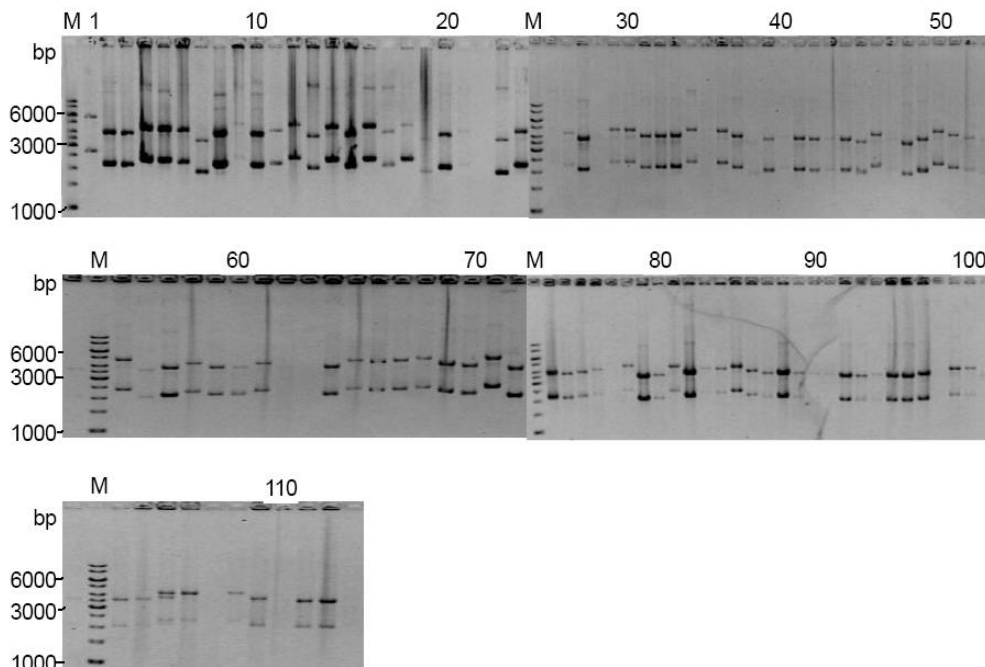


Abb. 3.35 Darstellung der durch alkalische Lyse isolierte Plasmide 6-1 bis 6-113 im Agarose-Gel, M = GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas). Aufgetragene DNA Menge pro Spur: 3 µl Plasmid-Isolat

Bei den hier dargestellten Plasmiden handelt es sich um die Klone beginnend mit der Nummer

Ergebnisse

6-..., die aus der Wiederholung der SSH (*P. fluorescens* Bk3 Kultivierung in LB-Flüssigkultur vs. nach Etablierung auf *in vitro*-Pflanzenblättern von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox) erzeugt wurden.

3.7.5.3 PCR und Restriktionsenzym-Spaltung zur Kontrolle der isolierten Plasmide

Um die isolierten Plasmide auf ein vorhandenes Insert zu überprüfen, wurde sowohl eine PCR mit den Universal-Primern T7-forward und M13-reverse durchgeführt, als auch eine Restriktionsenzym-Spaltung mit den flankierenden Restriktions-Enzymen *Nco*I und *Sac*I vorgenommen. Die Amplifikate der PCR, sowie die Spaltprodukte sind anhand eines Agarose-Gels in den Abb. 3.36 und 3.37 dargestellt.

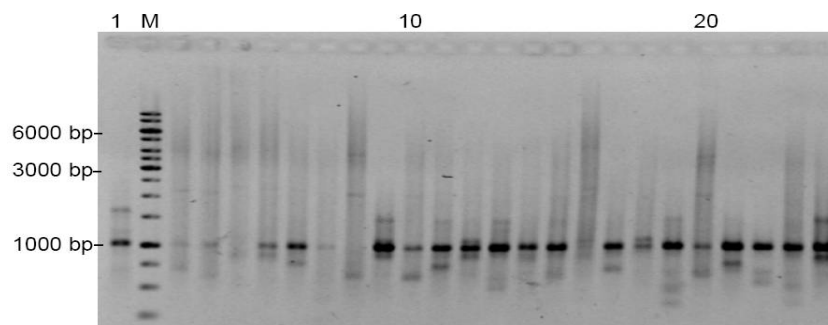


Abb. 3.36 PCR-Produkte der Kontroll-PCR isolierter Plasmide 6-1 bis 6-24; Primer: T7-forward und M13-reverse, M = GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas). Aufgetragene DNA Menge pro Spur: 3 µl PCR-Produkt

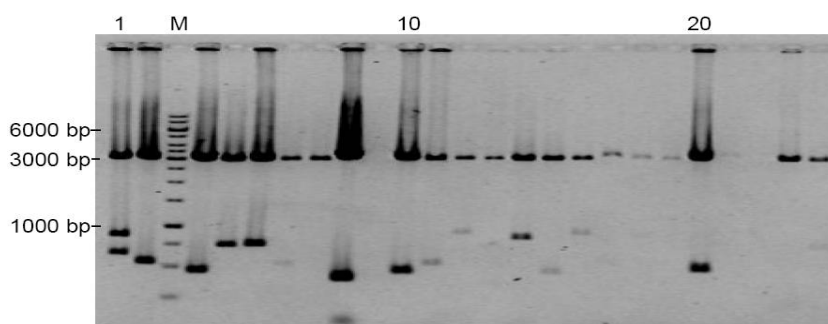


Abb. 3.37 Darstellung der Spaltprodukte aus den Plasmiden 6-1 bis 6-24 gespalten mit *Sac*I und *Nco*I; M = GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas). Aufgetragene DNA Menge pro Spur: 3 µl Spalt-Produkt

Bei der PCR (Abb. 3.36) wurden neben Amplifikaten mit einer Größe von 1000 bp auch PCR-

Ergebnisse

Produkte mit Größen zwischen 1000 und 250 bp amplifiziert. Für ein klareres Bild wurde eine Restriktionsenzym-Spaltung durchgeführt, nach der Spaltprodukte in einer Größenordnung zwischen 1000 und 100 bp detektiert werden konnten.

3.7.5.4 Dot Blot-Hybridisierung

Da bei ersten Sequenzierungen ausgewählter Klone eine Vielzahl an Ergebnissen Homologien zu ribosomaler 16S-RNA aufwiesen, wurde eine Dot Blot-Hybridisierung durchgeführt. Auf diese Weise sollten die Klone identifiziert werden, die nicht die redundante 16S-rRNA enthielten. Die dafür hergestellte Sonde setzte sich aus zwei Fragmenten dieser RNA zusammen, die vorher durch eine PCR amplifiziert wurden (s. 2.31.1.2). Als Template für diese PCR diente genomische DNA aus *P. fluorescens* Bk3 (s. 2.31.1.1). Ein Agarose-Gel, was zur Kontrolle der erfolgreichen PCR angefertigt wurde, befindet sich in Abb. 3.38. Die erwarteten Fragmentgrößen sind 725 bp für das Amplifikat mit dem Primer-Paar B785- und SR-Primer, und 517 bp für das Amplifikat mit dem Primer-Paar U522- und SL-Primer.

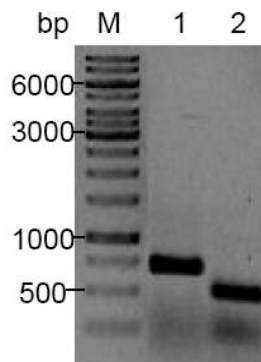


Abb. 3.38 Kontroll-Gel zur Darstellung der Amplifikate nach PCR mit Primern zu Sequenzen der 16S-RNA, M = GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas), 1 = Amplifikat mit dem Primer-Paar B785- und SR-Primer, 2 = Amplifikat mit dem Primer-Paar U522- und SL-Primer. Aufgetragene DNA Menge pro Spur: 3 µl PCR-Produkt

Die Amplifikate entsprachen den erwarteten Größen und wurden zur Herstellung der Sonde eingesetzt (vgl. 2.31.1).

Die Dot Blot-Hybridisierung wurde durchgeführt, wie unter 2.31 beschrieben. Dabei wurden als Target-DNA 2 µl bestehend aus PCR-Produkt bzw. Plasmid (mit 100 µl H₂O verdünnt) durch ein Vakuum auf die Membran aufgebracht und mit Hilfe von UV-Strahlen fixiert.

Als Positiv-Kontrolle wurde je 1 µl der PCR-Produkte verwendet, die zur Herstellung der Sonde

Ergebnisse

amplifiziert wurden. Als Negativ-Kontrolle wurden 2 µl Wasser anstelle von Target-DNA verwendet. Die Dot Blot-Membranen aller getesteten Proben sind in den Abb. 3.39 dargestellt. Dabei gilt, dass die dunklen Spots mit der Sonde aus 16S-RNA hybridisiert haben, und daher nicht für eine weitere Sequenzierung in Frage kamen.

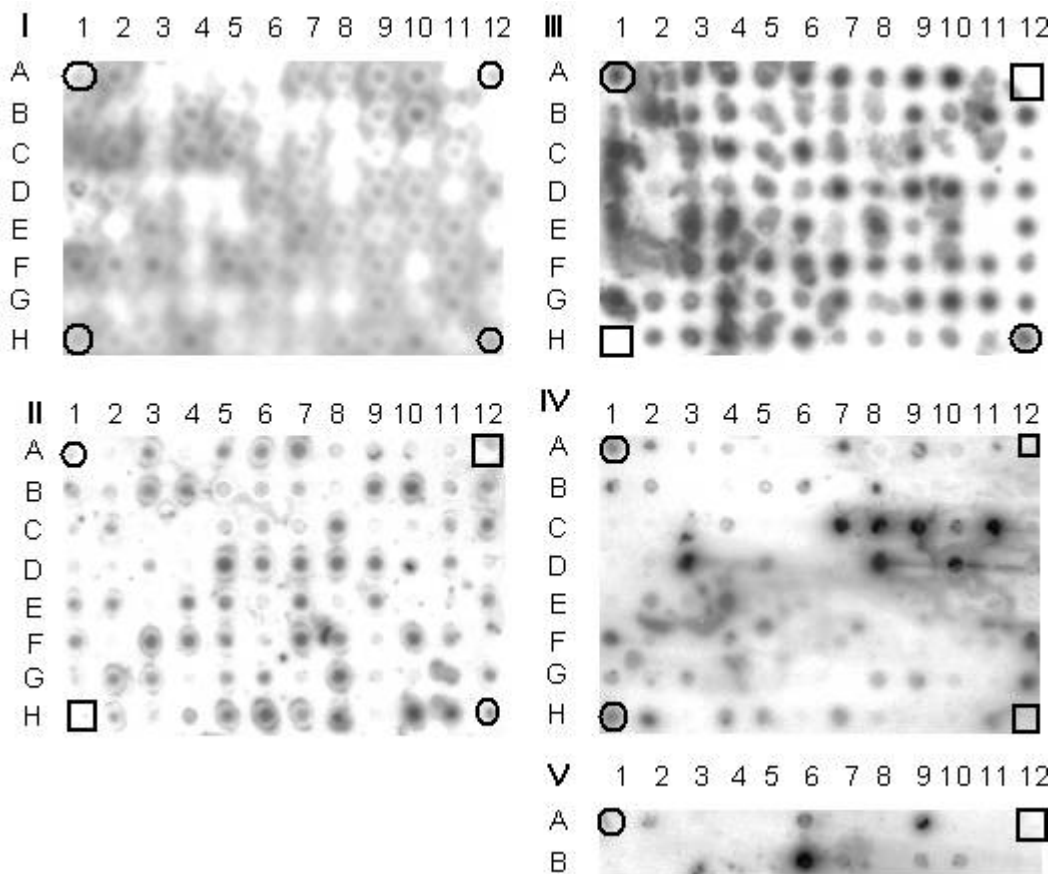


Abb. 3.39 Darstellung der Dot Blot-Membranen nach Hybridisierung mit einer radioaktiven Sonde erstellt aus PCR-Produkten mit 16S-Untereinheiten, aufgetragene Menge DNA: 2 µl PCR-Produkte bzw. isolierte Plasmide, ○ = Positiv-Kontrolle bestehend aus je 1 µl der PCR-Produkte, die zur Herstellung der Sonde amplifiziert wurden, ◻ = Negativ-Kontrolle bestehend aus Wasser anstelle der Target-DNA,

Membran I: Reihe A: Klone 1-1 bis 1-10, Reihe B: Klone 1-11 bis 1-22; Reihe C: Klone 1-23 bis 1-34; Reihe D: Klone 1-35 bis 1-46; Reihe E: Klone 1-47 bis 1-58; Reihe F: Klone 1-59 bis 1-70; Reihe G: Klone 1-71 bis 1-82, Reihe H: Klone 1-83 bis 1-92

Membran II: Reihe A: Klone 1-93 bis 1-102, Reihe B: Klone 1-103 bis 1-114; Reihe C: Klone 1-115 bis 1-126; Reihe D: Klone 1-127 bis 1-138; Reihe E: Klone 1-139 bis 1-150; Reihe F: Klone 1-151 bis 1-162; Reihe G: Klone 1-163 bis 1-174; Reihe H: Klone 1-175 bis 1-181, Klone 3-1 bis 3-3

Membran III: Reihe A: Klone 3-4 bis 3-13; Reihe B: Klone 3-14 bis 3-25; Reihe C: Klone 3-26 bis 3-37; Reihe D: Klone 3-38 bis 3-48, Klone 4-1; Reihe E: Klone 4-2 bis 4-13; Reihe F: Klone 4-14 bis 4-22, Klone 4-30 bis 4-32; Reihe G: Klone 4-33 bis 4-44; Reihe H: Klone 4-45 bis 4-49, (5 freie Positionen)

Membran IV: Reihe A: Klone 6-1 bis 6-10; Reihe B: Klone 6-11 bis 6-22; Reihe C: Klone 6-23 bis 6-34; Reihe D: Klone 6-35 bis 6-46; Reihe E: Klone 6-47 bis 6-58; Reihe F: Klone 6-59 bis 6-70; Reihe G: Klone 6-71 bis 6-82; Reihe H: Klone 6-83 bis 6-92

Membran V: Reihe A: Klone 6-93 bis 6-102; Reihe B: Klone 6-103 bis 6-113, (eine freie Position)

Ergebnisse

Insgesamt wurden 387 Proben durch die Dot Blot-Hybridisierung analysiert, von denen 191 Klone negativ waren. Diese sind in Tab. 3.8 aufgeführt.

Tab. 3.8 Auflistung der erhaltenen Klone, die nach der Dot Blot-Hybridisierung negativ waren.

Serie 1-									Serie 3-		Serie 4-	Serie 6-								
2	21	38	66	82	102	117	129	159	1	30	3	2	20	36	52	64	76	96	110	
3	25	39	68	86	104	118	130	161	4	32	6	3	21	38	53	65	80	98	113	
4	28	42	71	87	107	119	138	162	13	33	8	4	22	40	54	66	81	99		
5	29	45	72	88	108	120	141	163	14	35	10	5	23	41	55	67	84	101		
10	30	47	73	92	109	121	144	166	18	37	34	7	24	43	56	68	87	102		
12	31	48	74	93	110	123	146	169	19	39	35	9	25	45	57	69	89	103		
13	32	50	75	95	113	124	148	171	20	40	37	13	27	46	58	72	90	104		
15	33	55	77	99	114	125	149	172	21	41	38	14	28	47	60	73	91	105		
16	34	58	78	100	115	127	152	175	23	43	40	17	34	49	61	74	94	106		
17	37	62	80	101	116	128	156	176	27	48		19	35	51	63	75	95	109		

3.7.5.5 Sequenzanalyse

In einer vorangegangenen SSH wurde nach Isolierung der RNA die ribosomale 16S- und 23S-rRNA entfernt, und zusätzlich eine Polyadenylierung vorgenommen. Die hier erhaltenen Klone zeigten nach Sequenzierung ausschließlich Vector-Sequenzen. Um die Methode zu optimieren, wurde bei den beiden folgenden SSHs das Entfernen der ribosomalen 16S- bzw. 23S-rRNA ausgelassen, da diese RNA-Population im gleichen Umfang im Tester und Driver vorhanden sein sollte, und somit davon auszugehen war, dass sie miteinander hybridisieren und später fast nicht mehr detektierbar sind. Um dennoch Klone, die die ribosomale RNA enthielten, nachträglich auszuschließen, wurde die Dot Blot-Hybridisierung durchgeführt.

Von den 191 Klonen, die bei der Dot Blot-Hybridisierung negativ erschienen, wurden 46 sequenziert, um Erkenntnisse darüber zu bekommen, wie sich das Transkriptom von *P. fluorescens* Bk3 nach Etablierung auf Pflanzenblättern von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox verändert, im Gegensatz zur Anzucht in LB-Flüssig-Kultur.

Es wurden die entsprechenden Bakterien-Kulturen, wie in 2.32.2 beschrieben, dem Sequenzier-Service IIT Biotech in Bielefeld übersandt. Die mit den erhaltenen Sequenzen durchgeführte Datenbankrecherche ergab folgende Ergebnisse (s. Tab. 3.9):

Ergebnisse

Tab. 3.9 Ergebnisse der Sequenzanalysen nach Sequenzierung der erhaltenen Klone nach SSH

Klone der 16S-rRNA			Klone der 23S-rRNA				Klon der 16S-bzw. 23S-rRNA	genomische DNA	keine Homologien
6-9	6-52	6-68	6-2	6-21	6-40	6-54	6-14	6-38	6-7
6-19	6-55	6-69	6-3	6-22	6-41	6-56			
6-25	6-57		6-4	6-23	6-45	6-58			
6-34	6-60		6-5	6-24	6-46	6-61			
6-35	6-64		6-13	6-27	6-49	6-63			
6-43	6-65		6-17	6-28	6-51	6-66			
6-47	6-67		6-20	6-36	6-53				

3.8 Einfluss des isolierten Protein-Komplexes aus *P. fluorescens* Bk3 nach Applikation auf *M. domestica* cv. Holsteiner Cox

Der Apoplast gilt als der wichtigste Ort für Abwehr-Reaktionen gegenüber Pathogenen, da er die Gesamtheit der Zellzwischenräume bildet, was zur Folge hat, dass hier als erstes Reaktionen ausgelöst werden, wenn die Pflanze neuen oder anderen äußeren Einflüssen ausgesetzt ist. Daher wurde untersucht, ob der Kontakt des aus Wachstumsüberständen von *P. fluorescens* Bk3 isolierten Protein-Komplexes (vgl. 3.1) mit der Blattoberfläche von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox zu Veränderungen in der Zusammensetzung der Proteine innerhalb des Apoplasten führt.

Die *in vitro*-Pflanzen wurde also mit dem isolierten Protein-Komplex, gelöst in Kalium-Phosphat-Puffer (pH 8,0), inokuliert. Als Negativ-Kontrolle wurden gleiche Pflanzen ausschließlich dem Puffer ausgesetzt. Die Inkubation erfolgte über 5 Tage (vgl. 2.14.2), bevor es zur Ernte und damit zur Isolierung der Apoplasten-Flüssigkeit kam (wie in 2.15 beschrieben).

3.8.1 Analyse der Apoplastenflüssigkeit von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox

Nach Isolierung der Apoplastenflüssigkeit wurde eine SDS-PAGE mit Tris-Tricin angefertigt, wie in Abb. 3.40 dargestellt.

Ergebnisse

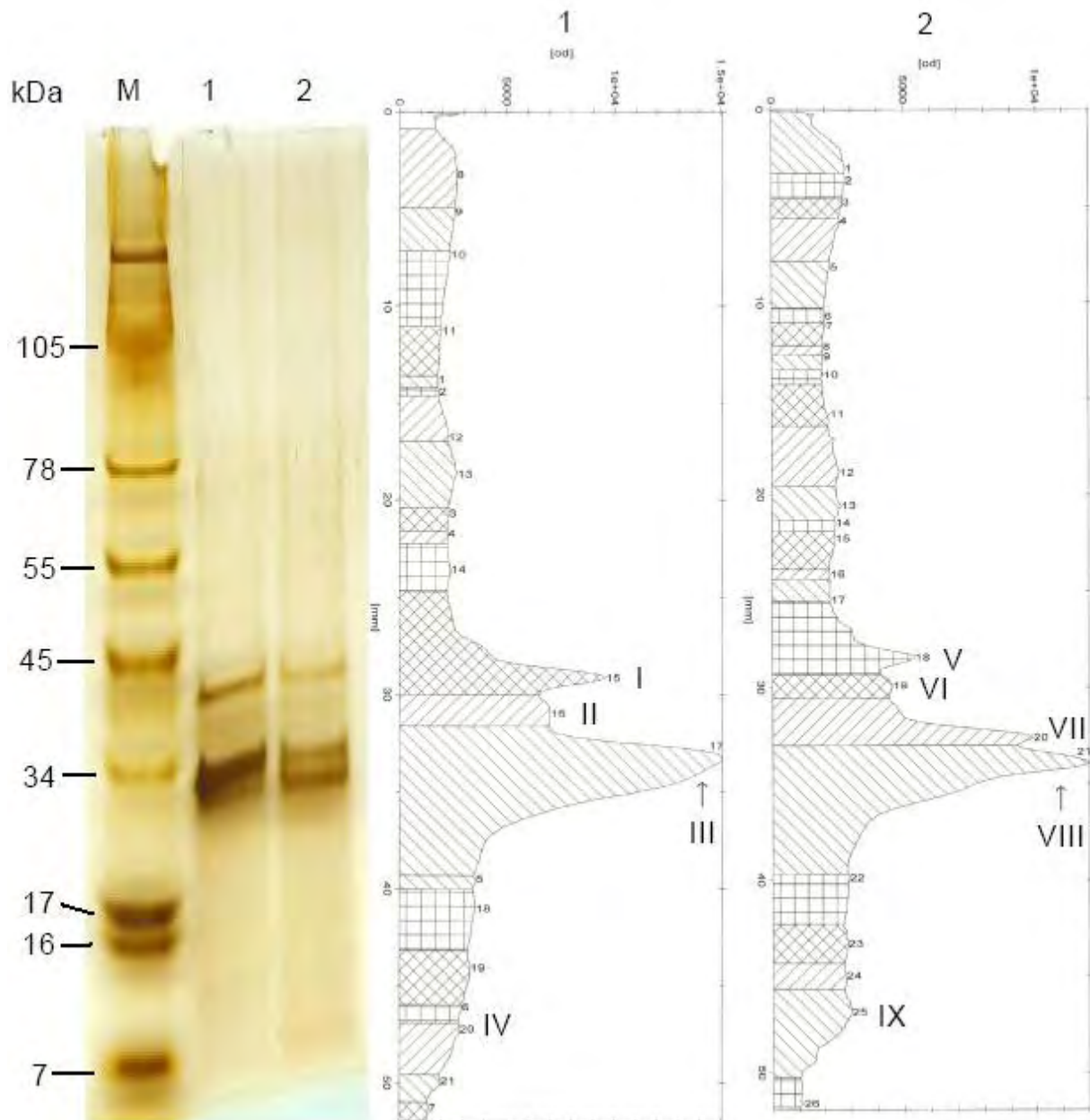


Abb. 3.40 Isolierte Apoplastenflüssigkeit aus *M. domestica* cv. Holsteiner Cox aufgetragen auf eine SDS-PAGE mit Tris-Tricin, Silberfärbung. M = SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen), 1 = Apoplastenflüssigkeit aus den Kontrollpflanzen (mit Kalium-Phosphat-Puffer, pH 8,0 inokuliert), 2 = Apoplastenflüssigkeit aus der behandelten Pflanze (mit isoliertem Protein-Komplex gelöst in Kalium-Phosphat-Puffer, pH 8,0, inokuliert), aufgetragene Protein-Menge: 10 µg; Graphische Darstellung der Intensität der Banden, ausgewertet mit TINA2.0 (Raytest), I - IX: Benennung der einzelnen Peaks

Mit Hilfe der Software TINA2.0 (Raytest) konnte die Intensität der in der Elektrophorese gelaufenen Proteine ermittelt werden. In Abb. 3.40 sind neben der SDS-PAGE die dazugehörigen Intensitäts-Diagramme dargestellt. Dabei wurde die OD gegen die Laufstrecke im Gel aufgetragen.

Ergebnisse

Nach Anfertigen einer Eichgerade (Abb. 3.41) basierend auf den Standard-Proteinen aus dem Gel (vgl. Abb. 3.40), konnte eine Formel zur Berechnung der apparenten, molaren Massen ermittelt werden, die sich nach der PAGE detektieren ließen.

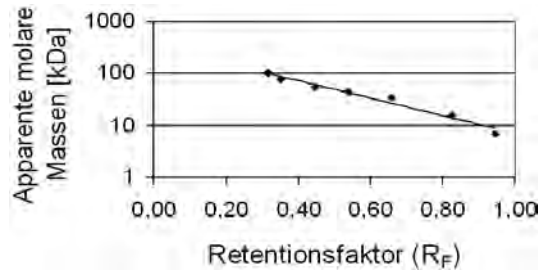


Abb. 3.41 Eichgerade basierend auf den Standard-Proteinen aus der PAGE (s. Abb. 3.40, SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen). Zum Berechnen der molaren Massen ergibt sich daraus folgende Formel:
 $y = 345,72e^{-3,8865x}$.

Aus der Eichgerade in Abb. 3.41 konnte die Formel $y = 345,72e^{-3,8865x}$ zur Berechnung der apparenten molaren Massen abgeleitet werden. Die im Gel sichtbaren Proteinbanden konnten nun berechnet werden, und sind zusammenfassend in Tab. 3.10 dargestellt.

Tab. 3.10 Zusammenfassung der erhaltenen Daten bezüglich der Protein-Banden aus der Apoplastenflüssigkeit von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox mit und ohne Behandlung durch den isolierten Protein-Komplex (s. Abb. 3.39)

Kontroll-Pflanze			Behandelte Pflanze		
Peak	Apparente molare Massen	Intensität ermittelt durch OD	Peak	Apparente molare Massen	Intensität ermittelt durch OD
I	44 kDa	376715	V	45 kDa	206864
II	36 kDa	172371	VI	39 kDa	84062
III	27 kDa	1017265	VII	33 kDa	255760
IV	10 kDa	104108	VIII	24 kDa	626825
			IX	11 kDa	163853

Während bei der Kontroll-Pflanze zwei Banden mit Größen von 44 kDa (Peak I) und 27 kDa (Peak III), sowie eine schwache Bande bei 36 kDa (Peak II) auftraten, konnten bei der behandelten Pflanze vier Banden mit den Größen 45 kDa (Peak V), 33 kDa (Peak VII), 24 kDa (Peak VIII) und 11 kDa (Peak IX), sowie eine schwache Bande, die sich erst durch die Auswertung bei 39 kDa (Peak VI) zeigte, detektiert werden.

Ergebnisse

Aufgrund der Intensität, die durch die OD ermittelt wurde, ist bei dem Protein mit einer Größe von 44 bzw. 45 kDa eine Abnahme um 45 % nach Behandlung der Pflanze mit dem isolierten Protein-Komplex zu erkennen. Die Protein-Bande aus der Apoplastenflüssigkeit der Kontroll-Pflanze mit 27 kDa entspricht möglicherweise den beiden Protein-Banden mit 35 kDa und 27 kDa aus der Apoplastenflüssigkeit der behandelten Pflanze, stellt sich allerdings als eine stärkere Bande dar, weil die Intensität deutlich höher ist (75 % höher als die Intensität der Bande bei 33 kDa, 38 % höher als die Intensität der Bande bei 24 kDa). Ein weiteres Protein, was nach der Behandlung der Pflanzen mit dem isolierten Protein-Komplex detektiert werden konnte, hat eine Größe von 11 kDa. Bei der Kontroll-Pflanze konnte bei 10 kDa eine deutlich abgeschwächte Bande (Intensität um 36 % verringert) detektiert werden.

Aufgrund dieser zu beobachtenden Unterschiede auf Protein-Ebene wurde eine RT-PCR (s. 3.8.2) und eine SSH (s. 3.8.3) durchgeführt, um eine genauere Auskunft zu einer Reaktion von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox auf den Kontakt mit dem isolierten Protein-Komplex von *P. fluorescens* Bk3 (vgl. 3.1) zu erhalten.

3.8.2 Semiquantitative Analyse von ausgewählten Transkripten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox

Zunächst wurde aus der isolierten RNA (vgl. 2.16.2.1) durch RT-PCR (s. 2.24.1) cDNA synthetisiert, die im weiteren Verlauf für die PCR eingesetzt wurde. Dabei wurden Primer verwendet, die bereits in einer vorangegangenen Arbeit aus einer Proteinantwort nach Stresssituation erstellt wurden.

In Abb. 3.42 ist das Agarose-Gel der PCR-Produkte, sowie eine graphische Darstellung ihrer Intensitäten (ausgewertet mit TINA2.0) dargestellt.

Ergebnisse

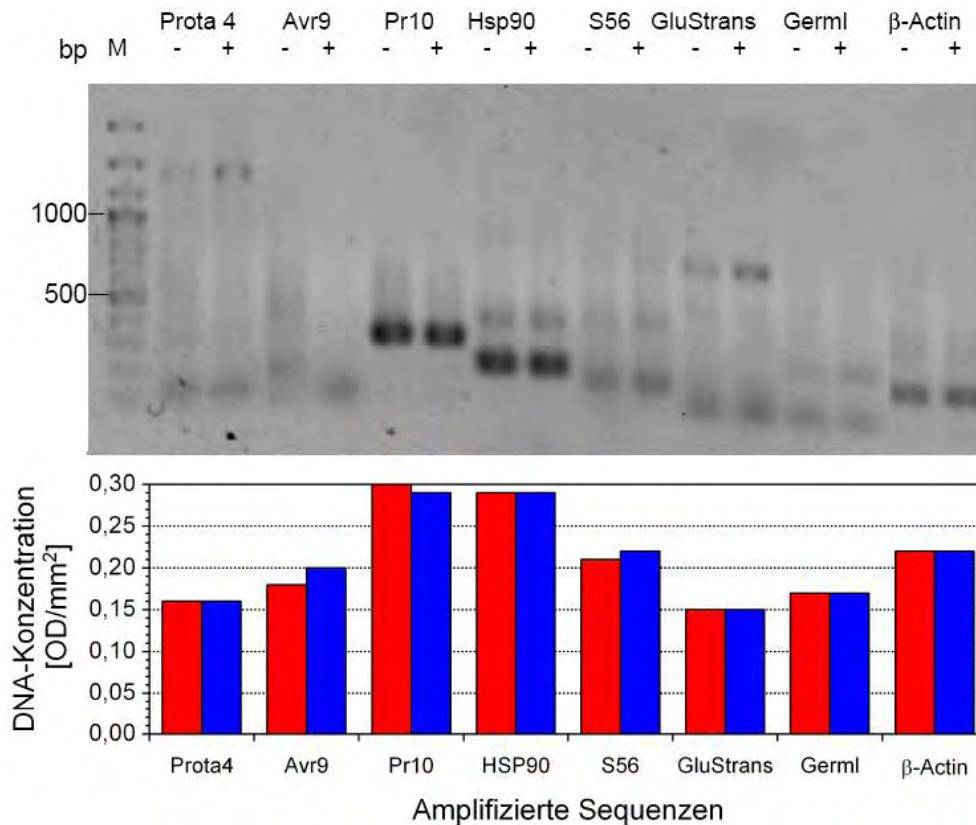


Abb. 3.42 Agarose-Gel der PCR-Produkte nach RT-PCR der isolierten RNA aus *M. domestica* cv. Holsteiner Cox; PCR-Produkte der Kontroll-Pflanze jeweils mit - gekennzeichnet, PCR-Produkte aus der RNA der behandelten Pflanze mit einem +; M = GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas), Prot4 = Protease Subunit Alpha Type 4, Avr9 = Avr9/Cf - 9rapidly elicited Protein 284, Pr10 = Ribonuclease-ähnliches Protein PR10b, HSP90 = Heat Shock Protein 90, S56 = Transmembrane CLPTM1 family, GluStrans = Glutathion-S-transferase, Germl = Germin-ähnliches Protein, β-Actin, aufgetragene DNA-Menge: 3 µl des PCR-Ansatzes, ■ = Kontroll-Pflanze, ■ = behandelte Pflanze

Aufgrund dieses Diagramms sind Unterschiede in der Expression verschiedener Proteine zu erkennen. So wurde nach Behandlung der Apfelpflanzen mit dem isolierten Protein-Komplex aus *P. fluorescens* Bk3 eine Hochregulation bei den Proteinen Avr9/Cf-rapidly elicited Protein von einem Unterschied in der OD von 0,02/mm², und beim Transmembrane Protein der CLPTM1 family mit einer OD von 0,01/mm² sichtbar, wogegen der Transkriptlevel für das Ribonuclease-ähnliche Protein leicht zurück gegangen ist, um eine OD von 0,01/mm². Die PCR-Produkte von β-Actin dienen hier als Kontrolle, um zu zeigen, dass es sich bei der eingesetzten DNA-Menge um gleiche Konzentrationen handelt. Nur so ist zu gewährleisten, dass erkannte Unterschiede in der DNA-Menge innerhalb der verschiedenen Banden auf Unterschiede in der Expression der Pflanze zurückzuführen sind. Da hier bereits Unterschiede zwischen den beiden Pflanzen zu erkennen waren, wurde zur weiteren Abklärung eine SSH angeschlossen.

3.8.3 SSH von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox

Bei der hier durchgeführten SSH wurden die Kontroll-Pflanzen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox, die lediglich mit dem Kalium-Phosphat-Puffer (pH 8,0) inokuliert wurden, als Driver eingesetzt. Als Tester wurde isolierte RNA aus den Pflanzen verwendet, die zuvor mit dem isolierten Protein-Komplex von *P. fluorescens* Bk3 (s. 3.1) inokuliert wurden. Die abschließende PCR ergab einen Schmier in der Größenordnung 2500 bp bis 400 bp. Das dazugehörige Gelbild ist in Abb. 3.43 dargestellt.

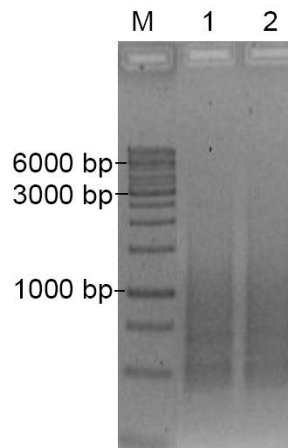


Abb. 3.43 Kontroll-PCR nach SSH mit Pflanzenmaterial aus *M. domestica* cv. Holsteiner Cox nach Applikation des in 3.1 isolierten Protein-Komplexes. M = GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas), 1 = SSH-Ansatz, 2 = Obligations-Kontrolle des Ligations-Ansatzes (s. 2.25.6), aufgetragene DNA-Menge: 8 µl

Insgesamt wurden nach der SSH 186 Klone isoliert. Zur weiteren Analyse wurde von einem Teil der Klone eine Kolonie-PCR durchgeführt. Von den restlichen wurden durch eine alkalische Lyse Plasmide isoliert, die anschließend zur Kontrolle für eine Restriktionsenzym-Spaltung eingesetzt wurden.

3.8.3.1 Kolonie-PCR der erhaltenen SSH-Klone

Zur Kontrolle auf vorhandene Inserts wurde von den ersten 47 Klonen eine Kolonie-PCR mit den Universal-Primern T7-forward und M13-reverse durchgeführt. In Abb. 3.44 ist das dazugehörige Agarose-Gel dargestellt.

Bei dieser SSH entstanden die Klone beginnend mit 2-... und 7-... .

Ergebnisse

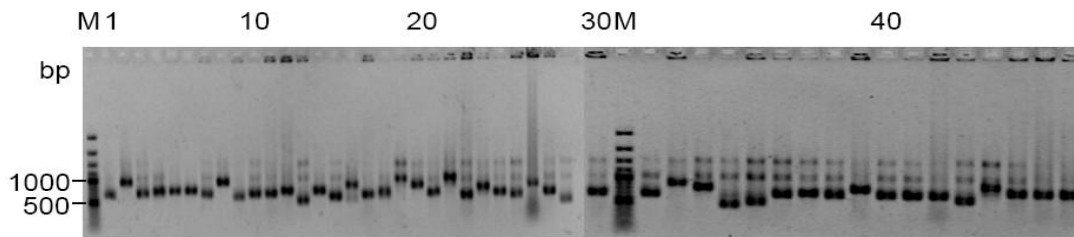


Abb. 3.44 Darstellung der PCR-Produkte der Klone 2-1 bis 2-47 nach Kolonie-PCR, M = GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas). Aufgetragene DNA Menge pro Spur: 3 µl PCR-Produkt

Darüber hinaus wurden von weiteren Klonen mittels alkalischer Lyse (s. 2.18.1) Plasmide isoliert (s. 3.8.3.2).

3.8.3.2 Plasmide der isolierten Klone nach SSH

Von den Klonen, die nicht durch eine Kolonie-PCR kontrolliert wurden, wurden die Plasmide durch alkalische Lyse isoliert und mit einem Agarose-Gel in Abb. 3.45 dargestellt.

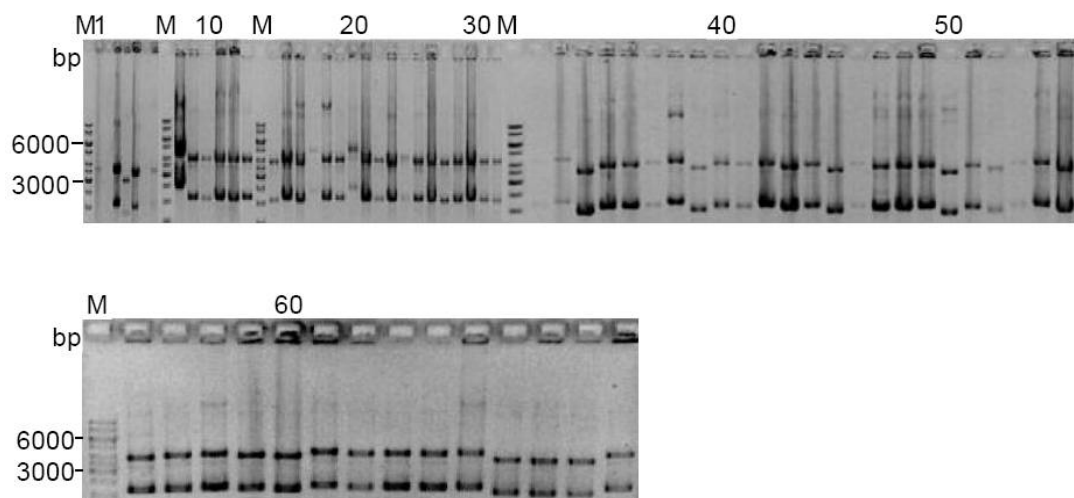


Abb. 3.45 Darstellung der isolierte Plasmide 7-1 bis 7-69 im Agarose-Gel, M = GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas). Aufgetragene DNA Menge pro Spur: 3 µl Plasmid-Isolat

Um die Plasmide auf ein vorhandenes Insert zu analysieren, wurde eine Restriktionsenzym-Spaltung (s. 3.8.3.3) mit flankierenden Schnittstellen vorgenommen, wie in 2.30 beschrieben.

3.8.3.3 Restriktionsenzym-Spaltung der Plasmide nach SSH

Von den isolierten Plasmiden wurde zur Kontrolle eine Restriktionsenzym-Spaltung mit den Enzymen *Nco*I und *Sac*I gemacht, um nachzuweisen, dass in den Plasmiden Inserts enthalten sind, die zur späteren Sequenzierung verwendet werden können. Die Agarose-Gele mit den Spaltprodukten sind in Abb. 3.46 dargestellt.

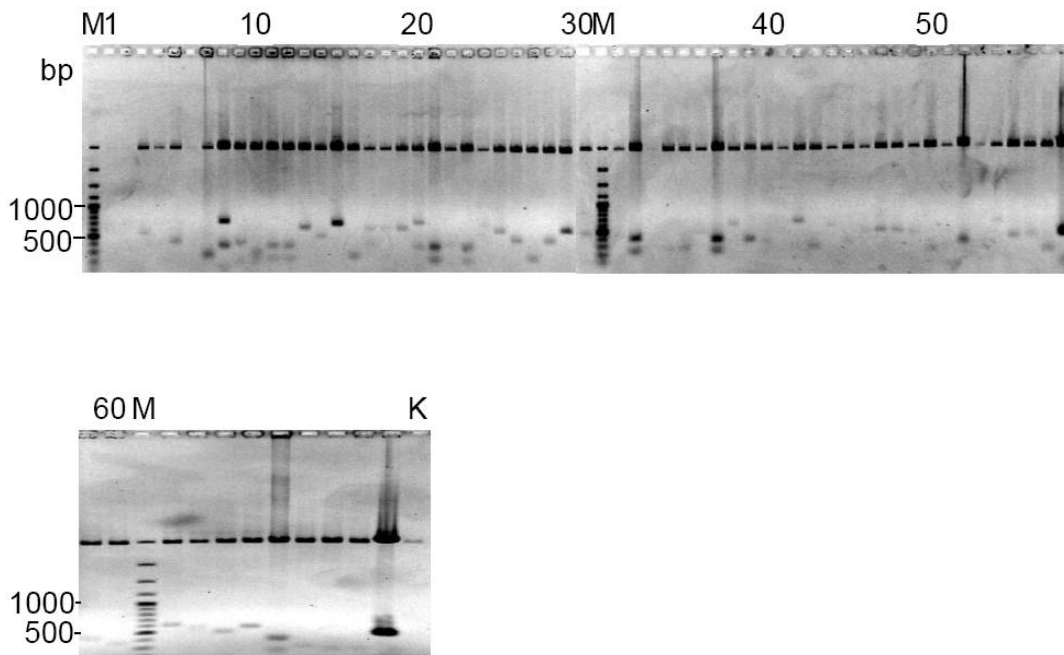


Abb. 3.46 Restriktions-Spalt-Produkte der Klone 7-1 bis 7-69 nach Kolonie-PCR, M = GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas), K = gespaltener Vector pGEM®-T (Promega) ohne Insert, Aufgetragene DNA Menge pro Spur: 5 µl Spaltansatz

Neben der Bande bei 3000 bp, die den gespaltene Vector darstellt, konnten Spaltprodukte in einer Größenordnung von 100 bis 800 bp detektiert werden. Anhand dieser Resultate nach Kolonie-PCR (vgl. 3.8.3.1) und Spaltung der isolierten Plasmide wurden Klone ausgewählt, die sequenziert wurden (s. 3.8.3.4).

3.8.3.4 Sequenzanalyse der erhaltenen Klone nach SSH

Sowohl die Kolonie-PCR als auch die Kontroll-Spaltung wurden durchgeführt, um falsch positive Klone zu identifizieren. Insgesamt wurden 47 Klone sequenziert. Die Sequenzen mit der entsprechende Recherche nach Homologien sind in Tab. 3.11 zusammengefasst.

Ergebnisse

Tab. 3.11 Ergebnisse der Identifizierung verschiedener Klone nach Sequenzierung

Klon Nr.	Anzahl identischer Klone	Accession-Nummer homologer Sequenzen	Bester e-value	Herkunft der homologen Sequenzen	Mögliche Funktion	Kommentar
7-13	4	gb EB148870.1	0,0	<i>Malus domestica</i>	unbekannt	Sämlinge infiziert mit <i>Venturia inaequalis</i>
7-42	1	gb DT000458.1	0,0	<i>Malus domestica</i>	unspezifischen Monoxygenase	EST von <i>Malus domestica</i> cv. GoldRush Apfelblätter erkrankt an Apfelschorf (<i>Venturia inaequalis</i>)
7-50	1	gb EB150143.1	2e ⁻⁵⁷	<i>Malus domestica</i> cv. Royal Gala	unbekannt	Keimlingsblätter infiziert mit <i>Venturia inaequalis</i>
7-15	1	gb DY300089.1	0,0	<i>Citrus clementina</i>	unbekannt	Harpin-behandelte Blätter
7-3	6	gb DN828086.1	0,0	<i>Gossypium hirsutum</i>	unbekannt	nach Inokulation mit <i>Xanthomonas campestris</i> pv. malvacearum 3631
7-38	1	gb DN827106.1	0,0	<i>Gossypium hirsutum</i>	unbekannt	inokuliert mit <i>Xanthomonas campestris</i> pv. malvacearum 3631
7-59	1	gb DT001488.1	1e ⁻¹⁶¹	<i>Nicotiana tabacum</i> und <i>Psilotum nudum</i> und <i>Anthoceros formosae</i>	ATP synthase CF0 C chain und ATPase III subunit	Blätter erkrankt an Feuerbrand (<i>Erwinia amylovora</i>)
7-9	7	gb DR996754.1	0,0	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	unbekannt	EST von <i>Malus domestica</i> cv. GoldRush nach Erkrankung an Apfelschorf (<i>Venturia inaequalis</i>)
7-47	1	gb DR996766.1	4e ⁻¹⁵⁷	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	unbekanntes Protein	EST von <i>Malus domestica</i> cv. GoldRush Apfelblätter erkrankt an Apfelschorf (<i>Venturia inaequalis</i>)
7-26	2	gb DR991484.1	0,0	<i>Gallus gallus</i>	unbekannt	EST von <i>Malus domestica</i> cv. GoldRush Blätter befallen mit <i>Choristoneura rosaceana</i>

Ergebnisse

Klon Nr.	Anzahl identischer Klone	Accession-Nummer homologer Sequenzen	Bester e-value	Herkunft der homologen Sequenzen	Mögliche Funktion	Kommentar
7-8	2	gb EB144137.1	0,0	<i>Malus domestica</i> cv. Royal Gala	unbekannt	unter hohen Sauerstoff- und niedrigen CO ₂ -Bedingungen
7-52	1	gb EX673998.1	2e ⁻¹¹⁴	<i>Fragaria vesca</i> (strain Hawaii-4)	unbekannt	nach Hitze-Stress
7-61	1	gb EX677623.1	2e ⁻¹¹⁷	<i>Fragaria vesca</i> (strain Hawaii-4)	unbekannt	nach Trockenstress
7-57	1	gb DY530043.1	0,0	<i>Salicornia bigelovii</i> Torr.	unbekannt	nach Salz-Stress
7-60	1	gb FC556818.1	1e ⁻¹³¹	<i>Cucumis sativus</i>	unbekannt	nach Lichtmangel
7-17	1	gb CN581982.1	4e ⁻⁸⁴	<i>Malus domestica</i> cv. GoldRush	mutmaßlichen Esterase	
7-28	6	gb CV524269.1	0,0	<i>Malus domestica</i>	hypothetischen 6,9 KD Protein APES063	
7-7	4	gb DT000150.1	0,0	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Flagellar-Protein	EST von <i>Malus domestica</i> cv. GoldRush
7-25	1	gb EB118396.1	0,0	<i>Malus domestica</i> cv. Royal Gala	unbekannt	
7-32	1	gb CN933449.1	0,0	<i>Malus domestica</i> cv. Royal Gala 24 DAFB	unbekannt	
7-67	1	gb EB114707.1	2e ⁻⁶²	<i>Malus domestica</i> cv. Royal Gala	unbekannt	
7-39	1	gb CF923998.1	4e ⁻¹³⁶	<i>Eleutherococcus sessiliflorus</i>	unbekannt	
7-66	1	gb EY254937.1	1e ⁻⁸⁴	<i>Vitis vinifera</i> var. Thomson	unbekannt	

3.9 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *P. fluorescens* Bk3

Um Aufschluss über die Kontaktaufnahme zwischen dem Bakterium *P. fluorescens* Bk3 und den Zellen der Wirtspflanze *M. domestica* cv. Holsteiner Cox zu erhalten, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Hierfür wurden die Bakterienzellen nach der Anzucht in einer LB-Flüssigkultur unter sterilen Bedingungen mit autoklaviertem, destilliertem Wasser gewaschen und dann durch eine Sprühflasche auf *in vitro*-Pflanzen aufgebracht. In den folgenden Abb. 3.47 und 3.48 sind die dabei entstandenen Bilder dargestellt. Hierbei handelt es sich jeweils um die Aufsicht.

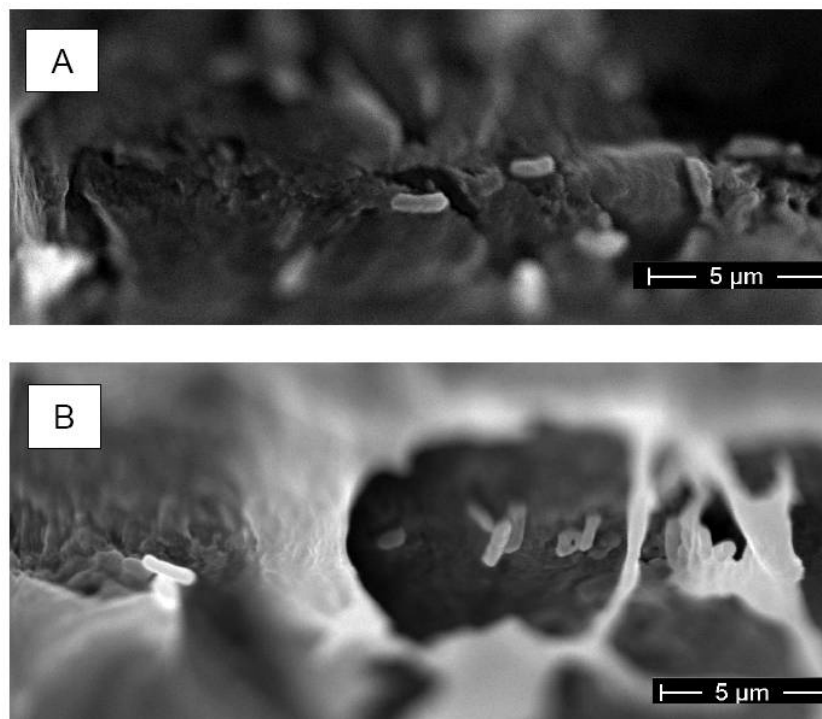


Abb. 3.47 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *P. fluorescens* Bk3 auf *in vitro*-Pflanzen von *M. domestica* cv Holsteiner Cox, A und B = Aufnahmen nach herkömmlichen Fixierungstechniken und unter Vakuum

Ergebnisse

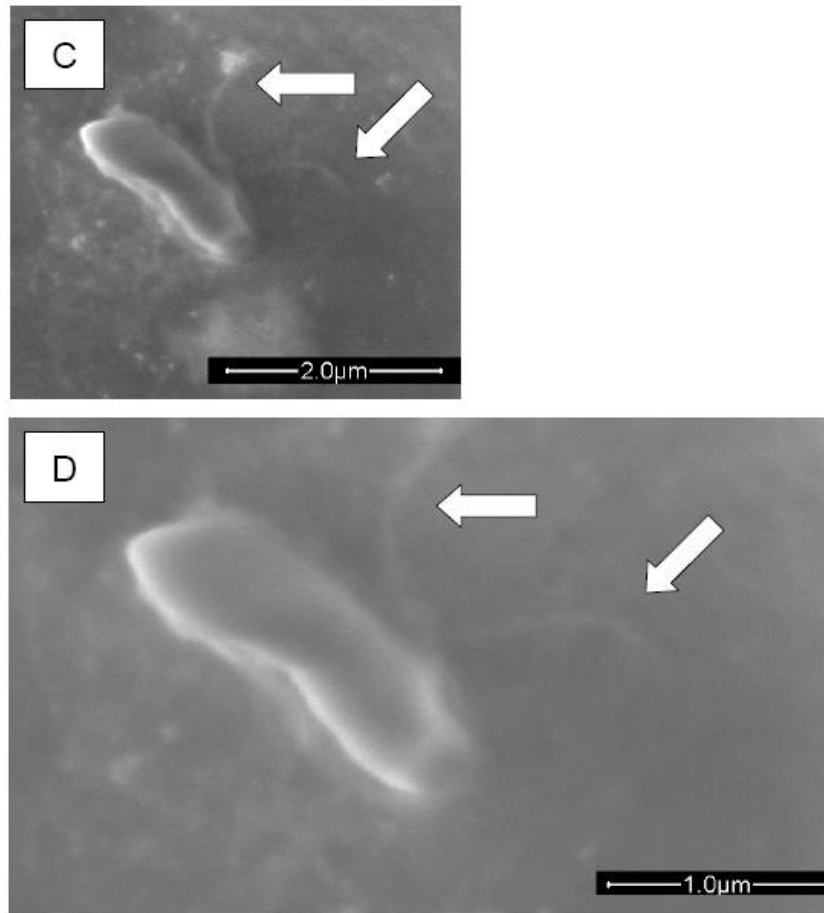


Abb. 3.48 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *P. fluorescens* Bk3 auf *in vitro*-Pflanzen von *M. domestica* cv Holsteiner Cox, C und D = im nativen Zustand ohne vorherige Fixierung, der Pfeil markiert mögliche Flagellum-Strukturen

Auf allen Bildern sind die Bakterien als aufliegende Organismen zu erkennen. Während bei den Aufnahmen A und B deutliche Risse innerhalb der Cuticula zu erkennen sind, ist in den Bildern C und D eine intakte Cuticula zu sehen. Daher kann man davon ausgehen, dass die Cuticula hier nicht aufgrund einer cutinolytischen Reaktion seitens der Bakterien defekt ist, sondern durch die Vorgänge der Fixierung beeinträchtigt wurde.

Bei den Bildern C und D handelt es sich jeweils um den gleichen Bildausschnitt mit unterschiedlichen Vergrößerungen. Durch den Pfeil ist eine Struktur markiert, bei der es sich möglicherweise um ein Flagellum handeln könnte.

Zusätzlich wurden Querschnittpräparate angefertigt, bei denen das Bakterium quer zur Blattoberfläche angeschnitten wurde. Diese Aufnahmen sollten Aufschluss über mögliche Haftmechanismen oder das Vorhandensein von Pili geben und befinden sich in Abb. 3.49.

Ergebnisse



Abb. 3.49 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *P. fluorescens* Bk3 auf der Blattoberfläche von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox im Querschnitt, mögliche Haftstrukturen durch den Kreis markiert

Die Aufnahmen in Abb. 3.49 zeigen jeweils eine einzelne Zelle von *P. fluorescens* Bk3 auf *M. domestica* cv. Holsteiner Cox im Querschnitt. Vor den Zellen ist jeweils eine Struktur zu erkennen, bei der es sich möglicherweise um Haftstrukturen, wie beispielsweise Pili handelt. Pili sind bereits seit längerem mit der Funktion als Adhäsine bei *P. fluorescens* und *P. syringae* pv. *phaseolicola* HB10Y bzw. *P. syringae* pv. *syringae* bekannt (Vesper, 1987, Romantschuk et al., 1993).

4. Diskussion

Wie bereits bekannt, sind verschiedene Mikroorganismen, die epiphytisch auf Wirtspflanzen leben, in der Lage, Resistenzen gegen Pathogene innerhalb der Pflanze zu induzieren, wodurch ein Schutz vor möglichen Krankheiten resultiert (Chin-A-Woeng et al., 1998, Maurhofer et al., 1994 und 1998). Es wurde bereits gezeigt, dass das epiphytisch lebende Bakterium *P. fluorescens* Bk3, ursprünglich isoliert aus der Phyllosphäre von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox, eine antagonistische Wirkung gegen *V. inaequalis*, den Erreger der Schorf-Erkrankung an Apfelbäumen, zeigt (Fiss, 2001, Kürkcüoglu et al., 2004 und Kürkcüoglu, 2006). Darüber hinaus ist es in der Lage, die Pathogenabwehr in der Wirtspflanze zu fördern (Kürkcüoglu et al., 2004).

Um die Mechanismen innerhalb der Wechselwirkungen zwischen dem nicht-pathogenen Bakterium *P. fluorescens* Bk3 und der Wirtspflanze *M. domestica* besser verstehen zu können, sollte in dieser Arbeit eine zuvor gefundene, extrazelluläre, enzymatische Esterase-Aktivität von *P. fluorescens* Bk3 (Singh et al., 2004) näher charakterisiert und aufgereinigt werden. Es wurde im Vorfeld die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei der detektierbaren Esterase-Aktivität um eine Cutinase handeln könnte.

Die Cuticula bildet für Pflanzen die äußere Schutzschicht. Es handelt sich dabei um ein Polymer, bestehend aus langen Kohlenwasserstoff-Ketten (25 - 33 C-Atome), die durch Esterbindungen miteinander verknüpft sind (Sitte et al., 1998). Diese cuticuläre Polymerstruktur kann durch Cutinasen hydrolysiert werden, wodurch es zur Freisetzung von Monomeren kommt (Purdy und Kolattukudy, 1975, Van Kan et al., 1996, Wang et al., 2000). Die entstandenen Monomere dienen im Bezug auf den Kontakt zwischen Pflanzen und Pathogenen als Auslöser für eine Signalantwort (Fauth et al., 1998, Francis et al., 1996, Gilbert et al., 1996, Kolattukudy et al., 1995).

Cutinasen gehören zu den Esterasen (Kolattukudy, 1985, Stahl und Schäfer, 1992, Pascholati et al., 1993), da sie in der Lage sind, die Esterverbindung innerhalb des Cutins zu lösen und ein Polymer so in Monomere zu zerteilen. Sie haben aber im Gegensatz zu Esterasen, die Esterase-Verbindungen aufspalten, ein eingeschränktes Substrat-Spektrum, da sie sich ausschließlich auf Cutin beschränken.

Da bereits erforscht wurde, dass die Applikation von *P. fluorescens* Bk3 auf der Wirtspflanze *M. domestica* ein Proteinmuster in Apfelschorf-anfälligen Apfelkultivaren induziert, welches man bei resistenten Apfelsorten findet (Gau et al., 2004, Kürkcüoglu, 2006), sollte die Esterase nach

ihrer Isolierung mit der Wirtspflanze *M. domestica* in Kontakt gebracht werden, um der Fragestellung nachzugehen, ob diese einen Einfluss auf den Wirtsorganismus hat, und so möglicherweise eine Pflanzenabwehr induziert werden kann.

Darüber hinaus sollte im zweiten Teil ein vergleichendes Transkriptomprofil von *P. fluorescens* Bk3 erstellt werden. Zum Vergleich stand hier die Etablierung auf der Blattoberfläche von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox gegenüber der Kultivierung in einem Vollmedium (LB-Flüssigmedium).

Mit diesem Ansatz sollte der Fragestellung nachgegangen werden, welche Auswirkungen eine Anpassung an veränderte Lebenssituationen auf die Genexpression des Organismus hat. Wie bereits erwähnt, unterliegen die in der Phyllosphäre lebenden Mikroorganismen extremen Situationen ausgehend von den abiotischen Faktoren, wie Temperaturschwankungen, Sonneneinstrahlung, starke Schwankungen zwischen Feuchtigkeit nach einem Regenereignis und Trockenheit bei trockenen klimatischen Bedingungen, aber auch einem eingeschränkten Nahrungsangebot.

Im Vergleich dazu stehen Bakterienzellen des gleichen Stammes, die in einem Vollmedium unter optimalen Bedingungen kultiviert wurde. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde die Methode der Suppression-Subtraktions-Hybridisierung (SSH) heran gezogen. Sie ist in dieser Anwendung bislang lediglich für Eukaryonten eingesetzt worden. Durch Modifikationen sollte sie nun auch als Anwendung für Prokaryonten etabliert werden.

4.1 Isolierung und Charakterisierung einer extrazellulären Esterase von *P. fluorescens* Bk3

In dieser Arbeit wurden verschiedene Eigenschaften des extrazellulären Enzyms aus *P. fluorescens* Bk3 untersucht. Dabei erfolgte der Nachweis der Aktivität jeweils mit einem gebräuchlichen Esterase-Aktivitäts-Test durch Einsatz des künstlichen Substrats p-Nitrophenyl-Butyrat (Fett et al., 1992, Metin et al., 2006, Kolattukudy, 1985, Wang et al., 2000,).

Es konnte festgestellt werden, dass die Esterase aus *P. fluorescens* Bk3 ein pH-Optimum von pH 8,0 besitzt (s. 3.4.4). Dies ist vergleichbar mit anderen Esterasen, wie beispielsweise von *Streptomyces scabies* mit einem Optimum von pH 8,0 (McQueen und Schottel. 1987), von *S. diastatochromogenes* mit pH 8,0 bis 9,0 (Tesch et al., 1996) oder von *Acinetobacter Iwoffii* I6C-1 mit pH 8,0 (Kim und Park, 2002).

Darüber hinaus konnte bei der Esterase aus *P. fluorescens* Bk3 eine große Temperatur-Stabilität ermittelt werden (s. 3.4.3). Obwohl das Protein hohen Temperaturen bis zu 100°C ausgesetzt war,

Diskussion

ist es nicht denaturiert und zeigte im Anschluss bei 20°C die herkömmliche Aktivität. Ähnliches findet man auch bei einer Esterase von *Geobacillus sp.* HBB-4, die noch bei 65°C aktiv ist und hier auch ihr Temperatur-Optimum hat (Metin et al., 2006). McQueen und Schottel (1987) konnten eine Temperaturstabilität von bis zu 60°C bei der Esterase von *S. scabies* ermitteln, wogegen die Esterase von *A. Iwoffii* I6C-1 ihr Temperatur-Optimum bei 37°C und bereits bei 40°C einen starken Aktivitäts-Abfall hat (Kim und Park, 2002).

Bei *P. putida* konnte eine Cutinase identifiziert werden, die wie alle Cutinasen zu den Esterasen gehört, und eine Temperaturstabilität von bis zu 60°C besitzt. Auch nach einer Inkubation bei 70°C hat sie noch eine Aktivität von 85 % (Sebastian et al., 1987). Eine Hitze-Stabilität des Proteins mit bleibender Enzym-Aktivität ist unter den Esterasen also durchaus verbreitet, wobei es zu variablen Ergebnissen bei den verschiedenen Herkunftsorganismen kommt.

Bei der Untersuchung des Hemmverhaltens der Esterase konnte eine maximal 20 %ige Hemmung mit 150 µM Diisopropylfluorophosphat (DFP) erreicht werden, ebenso mit 20 µM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), allerdings nicht mit 100 µM und 2000 µM 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF oder Pefabloc®). Verglichen damit konnte auch bei einer Esterase aus *S. diastatochromogenes* durch 1 mM PMSF und 5 mM DFP ein Rückgang der Aktivität von 2 und 10 % beobachtet werden (Tesch et al., 1996). Da es noch ungeklärt ist, ob es sich bei dem untersuchten Enzym um eine Cutinase handelt, werden zusätzlich Vergleiche mit anderen Cutinasen herangezogen. So konnten pilzliche Cutinasen von *Alternaria brassicicola*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum graminicola* und *Venturia inaequalis* mit DFP gehemmt werden. Diese Cutinasen gehören zur Klasse der Serin-Esterasen, bei denen die Hemmung mit DFP durch eine Anlagerung an die Serinketten innerhalb des aktiven Zentrums des Enzyms erfolgt (Köller und Parker, 1989, Pascholati et al., 1993, Trail und Köller, 1990).

Eine Behandlung mit ausgewählten Ionen in einer Konzentration von 1 mM konnte bei der hier isolierten Esterase nicht zu einer Verringerung der Aktivität führen. Beim Vergleich mit anderen Esterasen und auch Cutinasen stellt sich hier ein sehr heterogenes Bild dar. So wurde zwar bei einer Esterase von *S. diastatochromogenes* keine signifikante Hemmung durch die Kationen Kupfer, Zink, Mangan, Magnesium und Calcium (je 1 mM), und auch nicht durch den Komplexbildner EDTA (1 mM) festgestellt (Tesch et al., 1996). Auch bei einer Esterase von *Geobacillus sp.* konnte durch Calcium, Magnesium und Cobalt (je 1, 5 und 10 mM) keine Hemmung erreicht werden, jedoch durch 1 mM Quecksilber bei einer Konzentration und Kupfer mit den Konzentrationen 1 mM und 5 mM, wie auch durch 1 mM EDTA (Metin et al., 2006).

Diskussion

Metin et al., (2006) testete auch die Aktivität der Esterase von *Geobacillus sp.* unter Einfluss verschiedener Detergenzien, wobei unterschieden wurde zwischen ionischen, zwitterionischen und nicht-ionischen. Eine Hemmung konnte durch die Anwesenheit von ionischen Detergenzien, wie Natriumdeoxycholat, Natriumtaurocholat und Cetrimid (je 2,5 bis 20 mM), aber auch durch zwitterionischen Detergenzien, wie CHAPS (2,5 bis 20 mM), erreicht werden. Dagegen führten nichtionische Detergenzien, wie Brij 35, Tween-20 und Tween-80, bei angewendeten Konzentrationen von 2,5 - 20 mM zu einer leichten Förderung der Aktivität, wogegen das nichtionische Detergenz n-Octyl- β -D-Glucopyranosid bis zu einer Konzentration von 5 mM zu einer leichten Förderung, ab 10 mM zu einer Hemmung der Esterase von *Geobacillus sp.* führte (Metin et al., 2006). Dies steht im Gegensatz zu den in dieser Arbeit ermittelten Daten der Esterase aus *P. fluorescens* Bk3, denn die Aktivität wurde unter Anwesenheit des nicht-ionischen Detergenzes Dodecyl- β -D-Maltosid bei 20 mM bis zu 67 % gehemmt.

Für die Isolierung der Esterase von *P. fluorescens* Bk3 wurde eine Methode etabliert, die es erlaubt, das Enzym bis zur Homogenität zu reinigen. Hierfür wurden nach einer Fällung durch Ammonium-Sulfat zwei Chromatographie-Schritte mit DEAE-Sephacel-Säulen angeschlossen. Da es sich bei DEAE-Sephacel um einen schwachen Anionentauscher handelt, kommt es hier zur Bindung von Anionen. Dabei ist zu beachten, dass der Ladungszustand der Proteine vom pH-Wert abhängt, und die Esterase von *P. fluorescens* Bk3 bei einem pH-Wert von 11,0 gebunden hat, unter diesen Bedingungen also als Anion vorlag. Da das Enzym durch eine eher geringe Natrium-Chlorid-Konzentration von 70 - 100 mM wieder eluiert werden konnte (s. Abb. 3.3), ist unter den gewählten Bedingungen von einer eher schwachen Ladung des Proteins auszugehen, denn je stärker die Proteine geladen, desto stärker binden sie. Umso höher muss die Konzentration der Salzionen zum Konkurrieren um die Bindestellen sein, um die Proteine zu eluieren. Im Vergleich dazu sei nochmal darauf hingewiesen, dass es bei einem pH-Wert von 8,0 zu keiner Bindung kam. Das Protein war also hier noch nicht negativ geladen.

Der Ladungszustand des Proteins hängt vom pH-Wert ab, wobei der isoelektrische Punkt entscheidend ist. Dabei handelt es sich um den pH-Wert, bei dem das Protein mit neutraler Ladung vorliegt. Ausschlaggebend dafür sind die Seitenketten verschiedener Aminosäuren. Bei einem basischen pH überwiegt die negative Ladung von Asparaginsäure und Glutaminsäure, während im sauren Bereich die Seitenketten von Lysin und Arginin ausschlaggebend sind. Je nach Zusammensetzung der Aminosäuren innerhalb des Proteins entscheidet sich, ob es sich um ein saures oder ein basisches Protein handelt. Da die Wechselwirkungen mit Ionenaustauschern nahe des isoelektrischen Punktes sehr schwach sind, und bei der hier gereinigten Esterase aus *P. fluorescens* Bk3 bei pH 11,0 eine schwache Wechselwirkung mit DEAE-Sephacel bestand, ist

Diskussion

davon auszugehen, dass der isoelektrische Punkt des Proteins unterhalb von pH 11,0 liegt, da es bei pH 8,0 nicht als Anion vorlag.

Im Vergleich zu der hier etablierten Reinigungs-Methode wurden ähnliche Vorgehensweisen bei verschiedenen Esterasen angewendet. So wurde beispielsweise auch die Esterase von *S. diastatochromogenes* ebenfalls aus einer Kombination aus Ammonium-Sulfat-Fällung und Ionenaustausch-Chromatographie mit DEAE gereinigt, genauso wie die Esterase von *A. Iwoffii* I6C-1 (Tesch et al., 1996, Kim und Park, 2002).

Durch die Ausschlusschromatographie stellte sich heraus, dass es sich bei der isolierten Esterase aus *P. fluorescens* Bk3 um ein extrem großes Protein handelt. Eine genaue Berechnung der Größe anhand der mitgeführten Standardproteine konnte nicht durchgeführt werden, da das Protein die Gelfiltrationssäule schneller passierte als die Substanz Bluedextran, die mit einer Molekülgröße von 2000 kDa zur Bestimmung des Totvolumens entsprechend des Ausschlusslimits diente (vgl. 3.4.1). Aufgrund der Größe und gestützt durch das Bild der vier charakteristischen Protein-Banden mit den apparenten molaren Massen von 47 kDa, 29 kDa, 17 kDa und 11 kDa, was sich bis zum letzten Reinigungsschritt nicht änderte (s. Abb. 3.6), ist davon auszugehen, dass es sich bei dem isolierten Protein mit der nachgewiesenen Esterase-Aktivität um einen oligomeren Protein-Komplex handelt. Aus diesem Grund wurde das Protein mit dem Detergenz Dodecyl- β -D-Maltosid versetzt (vgl. 3.4.1), um hydrophobe Wechselwirkungen der Untereinheiten aufzubrechen. An dieser Stelle konnte festgestellt werden, dass es sich tatsächlich um einen Komplex handelt, da sich das Diagramm der Ausschlusschromatographie (s. Abb. 3.13) deutlich zu kleineren Proteinen, mit molaren Massen von 624 kDa, 404 kDa, 64 kDa und 37 kDa (vgl. Tab. 3.4) verschiebt, was einen Hinweis auf die Aufspaltung des Protein-Komplexes gibt.

Die Aktivitäts-Färbung einer SDS-PAGE mit den aufgetrennten Untereinheiten der Esterase aus *P. fluorescens* Bk3, die nach Renaturierung der Proteine durch den Zusatz des Substrates *p*-Nitrophenyl-Butyrat angefertigt wurde, zeigte, dass es sich bei der Bande mit der apparenten molaren Masse von 47 kDa um die Untereinheit mit der katalytische Esterase-Aktivität handelt. Damit ist sie vergleichbar zu den Größen anderer Esterasen, wie beispielsweise von *A. Iwoffii* I6C-1 mit 45 kDa oder von *S. scabies* mit 38 kDa und von *S. diastatochromogenes* mit knapp 31 kDa (McQueen und Schottel, 1987, Tesch et al., 1996, Kim und Park, 2002).

Die Sequenzierung der Protein-Untereinheiten ergab nach Analyse und Homologienvergleich, entgegen der Erwartungen, keinen Hinweis auf schon identifizierte Cutinasen. In dem Fall der Untereinheit mit Esterase-Aktivität handelte es sich um eine Flagellin-Untereinheit (FliC),

die bereits bekannt war aus anderen *P. fluorescens*-Stämmen. Außerdem konnten weitere Untereinheiten den Familien OprG, Vertreter der Porine, und OmpW, zugehörig zu den outer membrane proteins, zugeordnet werden.

Die Tatsache, dass der isolierte Protein-Komplex aus einer Flagellin-Untereinheit, sowie zwei membranassoziierten Proteinen besteht, wobei eines zu den Porinen gehört, also einem porenformenden Protein, lässt nun die Vermutung zu, dass es sich bei dem isolierten Protein-Komplex um einen Teil des Typ III Sekretions-Systems (TTSS) handelt.

Dieser ist bereits bekannt durch Pflanzenpathogene, wie *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Ralstonia* und *Xanthomonas* und setzt sich aus ca. 20 Proteinen zusammen. Teile dieses Sekretions-Apparats sind dem Basalkörper des Flagellin genetisch und morphologisch sehr ähnlich (Bonas, 1994, Van Gijsegem et al., 1995, Kubori et al., 1997, Alfano und Collmer, 1997). Wie auch bereits in Abb. 1.5 dargestellt, variiert die Protein-Zusammensetzung bei den einzelnen Organismen, wobei eine starke Ähnlichkeit zum Flagellum vorhanden bleibt. Nach Roine et al. (1997) kann ein Hrp-Pilus eine Länge von mehreren Mikrometern haben und einen Durchmesser von 8 nm, wie an *P. syringae* pv. *syringae* festgestellt wurde. Verglichen dazu hat eine Geißel der Pseudomonadaceae eine Länge bis 20 µm und einen Durchmesser von 12 - 18 nm (Schlegel, 1992), und ist somit etwas größer.

4.2 Analysen zur Reaktion der Wirtspflanze *M. domestica* cv. Holsteiner Cox auf den isolierten Protein-Komplex von *P. fluorescens* Bk3

Es sollte untersucht werden, ob der isolierte Protein-Komplex mit detektierbarer Esterase-Aktivität aus *P. fluorescens* Bk3 nach Applikation auf die Wirtspflanze *M. domestica* bei dieser eine Stress-Antwort induzieren kann.

Daher wurde der zuvor isolierte Enzym-Komplex unter sterilen Bedingungen auf *in vitro*-Pflanzen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox aufgebracht. Bereits nach Isolierung der Apoplastenflüssigkeit mit den darin beinhaltenen Proteinen konnte anhand einer SDS-PAGE festgestellt werden, dass es, hinsichtlich der Proteinzusammensetzung und -konzentration, zu Unterschieden zwischen der behandelten und der Kontrollpflanze kam (vgl. 3.8.1).

Daraufhin wurde eine semiquantitative RT-PCR abgeschlossen, die weitere Anzeichen zur Reaktion der Pflanze auf Kontakt mit dem isolierten Enzym-Komplex ergab. Wie in 3.8.2 bereits dargestellt, konnte gezeigt werden, dass das Avr9/Cf-9 rapidly elicited Protein, sowie das Transmembrane Protein aus der CLPTM1 family leicht hoch reguliert wurden (11 % bzw. 5 %), während das Ribonuclease-ähnliche Protein PR10b um 3 % zurück ging. Bei all diesen Proteinen handelt es sich um Proteine der Pflanzenabwehr gegenüber Pathogenen, die auch schon bei

Kürkcüoglu (2006) Veränderungen innerhalb der Apfelpflanze nach Applikation von *P. fluorescens* Bk3 zeigten.

Das Avr9/Cf-9 rapidly elicited Protein ist Bestandteil der hypersensitive response (HR), die bereits in 1.3.1 erläutert wurde. Kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen den Avirulenzgenen (*Avr*) der Pathogene und den Resistenzgenen (*Cf*) des Wirts, so wird eine Pflanzenabwehr induziert, wie Beispiele an Tabak zeigen (Hammond-Kosack et al., 1994, Romeis et al., 1999). Es handelt sich dabei um eine Reaktion gegen Pathogene.

Eine spezifische Funktion von CLPTM1 ist nicht bekannt (Yoshiura et al., 1998). Man kennt es als menschliches Lippen-Kiefer-Gaumenspalten assoziiertes Transmembran-Protein, konnte es aber auch schon bei *Lotus japonicus*, sowie bei *Arabidopsis thaliana* identifizieren (Endo et al., 2002, Guo et al., 2008).

Im Vergleich dazu stehen Ergebnisse aus einer Arbeit von Kürkcüoglu (2006). Hier wurde *M. domestica* direkt mit dem nicht-pathogenen Bakterium *P. fluorescens* Bk3 inokuliert. Es konnte im Vergleich zur Kontroll-Pflanze eine deutliche Hochregulation von Avr9/Cf-9 und eine weniger starke vom Transmembrane Protein CLPTM1 family detektiert werden. Diese wurden berechnet nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Für Avr9/Cf-9 ergab sich ein relativer Expressionsunterschied ($\Delta\Delta CT$ -Wert) von 31, im Gegensatz zu einer Zunahme von 11 % in dieser Arbeit. Für Transmembrane Protein CLPTM1 family ergab sich nach Inokulation mit *P. fluorescens* Bk3 ein relativer Expressionsunterschied von 17 ($\Delta\Delta CT$ -Wert), wogegen es in dieser Arbeit zu einer Zunahme von 5 % kam. Nach der Inokulation mit *P. fluorescens* Bk3 kam es bei Kürkcüoglu (2006) zu einem relativen Expressionsunterschied von 6 ($\Delta\Delta CT$ -Wert) beim Ribonuclease-ähnlichen PR10b, wogegen nach Kontakt der isolierten Esterase aus *P. fluorescens* Bk3 mit der Pflanze eine Expressionsabnahme von 3 % ergab.

Es handelt sich beim Ribonuclease-ähnlichen PR10b um ein Protein aus der Gruppe der Pathogenesis-Related-Proteins, die nach Pathogen-Kontakt produziert werden, wobei die Klasse der PR10-Proteine Homologien zu einer Ribonuclease aufweist, und damit als Ribonuclease-ähnlich bezeichnet wird (Antoniw et al., 1980, Moiseyev et al., 1994).

Entgegen der Erwartungen und auch der Ergebnisse aus der Arbeit von Kürkcüoglu (2006), bei dem es auch neben anderen Abwehrproteinen zu einer Hochregulation vom PR10b-Protein kam, geht hier nach Applikation des isolierten Protein-Komplexes aus *P. fluorescens* Bk3 auf *M. domestica* die Konzentration vom PR10b-Protein leicht zurück.

Diese Ergebnisse wurden als Anlass genommen, zur genaueren Analyse der Pflanzenantwort nach Applikation des isolierten Protein-Komplexes, mit dem Pflanzenmaterial von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox über die Transkript-Ebene eine genauere Untersuchung mittels SSH durchzuführen. Die Ergebnisse dazu sind bereits ausführlich in 3.8.3 dargestellt.

Diskussion

Obwohl der überwiegende Teil der gefundenen Homologien zu den erhaltenen DNA-Sequenzen unbekannt ist, gibt es doch auch Übereinstimmungen, wie eine mutmaßliche Esterase, ein hypothetisches 6,9 kDa Protein APES063 und eine unspezifische Monooxygenase, alle bekannt aus *M. domestica*.

Bei Monooxygenasen handelt es sich um Enzyme, die zur Reduktion von molekularem Sauerstoff dienen, indem ein Sauerstoff-Atom in das Substrat eingefügt wird, während das andere Sauerstoff-Atom in Wasser übergeht.

Darüber hinaus fanden sich bei den erhaltenen Klonen der SSH noch eine ATP-Synthase CF0 C-Untereinheit aus *Nicotiana tabacum* / *Psilotum nudum* bzw. eine ATPase III-Untereinheit aus *Anthoceros formosae*, nach Erkrankung an Feuerbrand, sowie ein Flagellar-Protein aus *Trypanosomas cruzi*, was allerdings auch bei *M. domestica* cv. GoldRush identifiziert wurde, nachdem die Blätter Kontakt mit *Choristoneura rosaceana*, einem Schädling aus der Familie der Schmetterlinge (Lepidoptera), hatten.

Von 23 Sequenzen gab es Homologien zu 13 bereits sequenzierte EST-Klonen aus *M. domestica*. Die Organismen der gefundenen Ergebnisse wurden biotischem oder abiotischem Stress ausgesetzt. Zu den biotischen Stressoren gehörten *X. campestris*, *E. amylovora* und Harpin. Außerdem ergab die SSH Klone, die mit fünf verschiedenen Ergebnissen von Pflanzen nach abiotischem Stress durch Hitze, Trockenheit, Salz und Lichtmangel, in Verbindung gebracht werden konnten.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass in den Pflanzen, die in diese SSH eingesetzt wurden, eine Abwehr-Reaktion induziert wurde. So wird die Hypersensitive Response (HR) durch Elicitoren ausgelöst, die unter anderem auch hitze-stabile und Glycin-reiche Proteine sind, wie Harpin von *E. amylovora* und *P. syringae*, aber auch PopA von *Ralstonia solanacearum* (Wei et al., 1992, He, et al., 1993, Arlat et al., 1994). Zusätzlich haben Finlay und Falkow (1997) darauf hingewiesen, dass Flagellin von Bakterien ein wichtiger Virulenzfaktor gegenüber Tieren und Pflanzen ist. Es wurde auch beschrieben, dass Flagellin als potentieller Elicitor in Zellen unterschiedlicher Pflanzen-Arten fungiert. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass gereinigte Flagellin-Peptide von *Agrobacterium tumefaciens* und *Rhizobium meliloti* neben einer Hemmung auf das Wachstum von *Arabidopsis thaliana* auch eine Callose-Ablagerung sowie die Produktion von PR-Proteinen induzieren (Gómez-Gómez et al., 1999). Später konnte gezeigt werden, dass ein Flagellin eines nicht kompatiblen Stammes von *P. avenae* eine Resistenz-Antwort, wie den Zelltod als hypersensitive response, in Zellen einer Reis-Zell-Kultur induzieren kann (Che et al., 2000). An dieser Stelle wurde auch postuliert, dass Flagelline als generelle Elicitoren in einigen Pflanzen-Familien agieren können.

Diskussion

Ein bestehender Zusammenhang zwischen Flagellin und der Virulenz, ausgehend von pathogenen Bakterien, konnte auch durch Herstellung von Mutanten gezeigt werden (Tans-Kersten et al., 2001). Nachdem Mutanten von *R. solanacearum* ohne das Flagellin-Filament FliC bzw. ohne das Motor-Schalt-Protein FliM zum Inokulieren von normalerweise anfälligen Tomaten-Pflanzen verwendet wurden, stellte sich heraus, dass sie in ihrer Virulenz eine deutliche Einschränkung zeigten, allerdings weiterhin virulent waren, wenn sie durch einen angeschnittenen Stängel direkt in den Organismus eingebracht wurden. Daraus wurde postuliert, dass neben dem Flagellin auch die Beweglichkeit der Bakterien eine wesentliche Rolle spielt, da die unbeweglichen Mutanten zur Infektion nur dann in der Lage waren, wenn sie direkt in die Pflanze eingebracht wurden.

Auch bei anderen Organismen, wie *E. amylovora*, *P. phaseolicola* und *P. syringae* konnte gezeigt werden, dass die Motilität einen erheblichen Einfluss auf die Virulenz des Pathogens besitzt (Bayot und Ries, 1986, Hattermann und Ries, 1989, Panopoulos und Schroth, 1974).

Bestätigt wurde dies zusätzlich durch eine Arbeit von Felix et al. (1999), in der eine hoch sensitive Chemo-Perzeption gegen das untersuchte Flagellin festgestellt wurde. Bereits das Entfernen weniger Aminosäuren des Flagellins führte dazu, dass die ausgelöste Reaktion nicht mehr stattfand. Hier konnte weiterhin festgestellt werden, dass präparierte Flagelline anderer pflanzenassoziierter Bakterien keine Antwort auf den Kontakt mit der Pflanze induzieren, was auf eine hohe Spezifität des Flagellins zurückgeführt wurde.

Bezug nehmend auf die Ergebnisse aus dieser Arbeit, kann der hier isolierte Protein-Komplex aus *P. fluorescens* Bk3, der das Flagellin-Filament FliC beinhaltet, in die Reihe der beschriebenen Flagelline aus verschiedenen pflanzenassozierten Bakterien, und deren Wechselwirkungen mit den Wirtsorganismen, eingefügt werden .

Darüber hinaus kann eine Parallele gezogen werden zum Type III Sekretions-System (TTSS), welches neben dem FliC weitere Proteine enthält, und durch die Einschleusung von virulente Proteinen in den Wirtsorganismus ebenfalls Wechselwirkungen mit diesem zeigt. Hier ist allerdings anzumerken, dass offensichtlich nicht alle Stämme von *P. fluorescens* über ein TTSS verfügen. Die Gene, die für die benötigten Proteine codieren, konnte zwar in *P. fluorescens* SBW25, allerdings nicht in den Stämmen *P. fluorescens* Pf0-1 und Pf-5 sequenziert werden (Preston und Collmer, 2004).

4.3 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *P. fluorescens* Bk3 auf der Blattoberfläche von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox

Wie bereits unter 4.2 erläutert, besteht die Möglichkeit, dass der hier isolierte Protein-Komplex aus *P. fluorescens* Bk3 Teil des Typ III Sekretions-Systems (TTSS) ist. Aus diesem Grunde wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von *P. fluorescens* Bk3 auf den Blattoberflächen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox (*in vitro*-Pflanzen) angefertigt, um mögliche Verbindungsstrukturen, wie einen *Hrp*-codierte Harpin-Effektor-Proteine oder das Flagellum, zu erkennen.

Die Größe eines *Hrp*-Pilus von *P. syringae* pv. *syringae* wird mit einem Durchmesser von 8 nm und einer Länge von einigen Mikrometern beschrieben (Roine et al., 1997). Verglichen damit besitzt ein Flagellum eine Länge von ca. 20 µm und einen Durchmesser von 12 - 18 nm (Schlegel, 1992). Daher besteht die Möglichkeit, diese in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar zu machen. Obwohl die Bakterien trotz der Fixierungs-Schritte auf den Blättern haften blieben, konnte nicht mit Sicherheit gezeigt werden, ob Strukturen, die auf einen Sekretions-Mechanismus hinweisen, zu erkennen sind. In den Bildern C und D (Abb. 3.48), bei denen es sich um Aufnahmen aus nativen Präparaten handelt, weist ein Pfeil auf eine fadenförmige, geschwungene Struktur hin, bei der es sich möglicherweise um ein *Hrp*-Pilus handeln könnte.

Auch in den Querschnittaufnahmen waren Strukturen zu erkennen (vgl. Abb. 3.49), die möglicherweise Haftstrukturen darstellen. Bereits 1987 wurde bekannt, dass Pili als Adhäsine bei *P. fluorescens* fungieren können (Vesper, 1987). Dabei wurde auch festgestellt, dass die Anzahl der Pili, sowie die Verteilung über die Zelle je nach Anzuchtmedium variiert, wobei eine Vielzahl an Pili bei Kultivierung in Minimal-Medium identifiziert werden konnte, während nach Anzucht in einem Vollmedium weniger Pili vorhanden waren. Diese Entdeckungen konnten später durch DeFlaun et al. (1990) bestätigt werden. Zusätzlich wurde hier heraus gefunden, dass die Bakterien innerhalb der exponentiellen Phase, also der Wachstumsphase, ein höheres Haftverhalten zeigen, als in der stationären Phase.

Vesper (1987) konnte zwei Sorten Kolonien von *P. fluorescens* unterscheiden, die auf Luria Agar mukös waren, im Gegensatz zu anderen, die hier nicht mukös waren. Die nicht-mukösen Kolonien wiesen verstärkt Pili auf, während die mukösen Kulturen kaum Pili zeigten. Durch einen Hämagglutinationstest wurde die Fähigkeit zur Adhäsion bei den nicht-mukösen, Pili-reichen Kolonien nachgewiesen, während die mukösen, Pili-armen Kolonien keine Agglutination zeigten, was als weiterer Nachweis für die Funktion der Pili als Adhäsine zeigte.

4.4 Untersuchungen zur Anpassung von *P. fluorescens* Bk3 auf Lebensraumveränderungen

Wie bereits erwähnt, wurde der Bakterienstamm *P. fluorescens* Bk3 aus der Phyllosphäre einer Apfelpflanze isoliert (Fiss, 1996). Innerhalb dieses Habitats herrschen für Mikroorganismen deutlich extremere Bedingungen, wie vergleichsweise in einer Flüssigkultur mit einem Vollmedium (vgl. 1.2), oder auch in der Rhizosphäre, den im Boden liegenden Lebensraum an und um die Wurzel. Um diese Unterschiede genauer zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Versuchsansätze ausgewählt. Zunächst wurde der Einfluss von verschiedenen Lichtintensitäten auf *P. fluorescens* Bk3 untersucht. Man geht bei normaler Sonneneinstrahlung zur Mittagszeit ohne Bewölkung von einer Lichtintensität von 2000 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ aus (Kutschera, 2002). In diesem Versuchsansatz wurden verschiedene Intensitäten bis maximal 1000 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ eingesetzt.

Zusätzlich wurden Bakterien-Zellen von *P. fluorescens* Bk3, die sich auf Apfel-Pflanzen (*in vitro*) etabliert hatten, mit Zellen aus einer Flüssigkultur in Vollmedium auf Transkriptom-Ebene verglichen. Dadurch sollten Rückschlüsse auf die Anpassung auf unterschiedliche Umweltbedingungen geschlossen werden.

Da die hier angewandte Methode der Suppression-Subtraktions-Hybridisierung allerdings für Eukaryonten entwickelt wurde, sollte sie durch eine Modifikation für Prokaryonten etabliert werden.

4.4.1 Kultivierung von *P. fluorescens* Bk3 unter verschiedenen Lichtbedingungen

Es konnte gezeigt werden, dass eine Lichtintensität von 1000 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ einen negativen Einfluss auf die Bakterienzahl innerhalb der Kultur hat (vgl. 3.6), da es entweder zur Hemmung der Zellteilung kommt, oder ein Großteil der Bakterien unter diesen Bedingungen zu Grunde geht. Das Wachstum konnte allerdings unter diesen Bedingungen begünstigt werden, wenn die Konzentration der Bakterien zu Beginn bereits eine OD_{600} von 0,1 hatte. Offensichtlich bestand unter diesen Konditionen eine gewissen Beschattung der Bakterien untereinander, die den Stress der Lichteinstrahlung teilweise minimierte.

Die ermittelte Esterase-Aktivität zeigte zusätzlich erhebliche Einbußen, und stieg auch nach einer zusätzlichen Inkubation bei 100 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$, die die Vitalität der Bakterien-Zellen nach Inkubation unter 1000 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ überprüfen sollte, nicht auf die erwartete Größe an,

wie bei dem Ansatz, der ohne Vorinkubation bei 1000 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ direkt bei 100 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ inkubiert wurde (s. Abb. 3.22).

Bei einem Verlaufsexperiment zeigte sich, dass die Bakterienzahl, ermittelt durch die OD_{600} , rasch anstieg, allerdings dann kontinuierlich wieder sank, während bei der gleichen Kultur die Esterase-Aktivität über den gesamten Zeitverlauf kontinuierlich anstieg. Dieser Verlauf war allerdings nur bei einer Start- OD_{600} von 0,1 zu erkennen, nicht aber bei einer deutlich niedriger konzentrierten Bakterienkultur (vgl. 3.23). Auch hier ist davon auszugehen, dass die Bakterien unter starkem Lichteinfluss ohne Abschattung eine starke Hemmung bei der Zellteilung erfahren.

Die steigende Esterase-Aktivität ist entweder damit zu begründen, dass das Enzym kontinuierlich produziert wird, und an Aktivität nicht verliert, oder als Zellabfallprodukt freigesetzt wird. Sollte also das Enzym tatsächlich, wie bereits diskutiert, zum TTSS gehören, würde es sich nach dem Zelltod innerhalb der Zellrückstände befinden. Dann wäre allerdings zu erwarten, dass die Esterase-Aktivität nach der Inkubation bei 1000 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ eher etwas niedriger wäre, oder die maximale OD_{600} , die am Tag 2 mit 6,4 erreicht wurde, etwas höher, im Vergleich zu den beiden anderen Lichtbedingungen bei 100 bzw. 0 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ (vgl. Abb. 3.24). Hier ist allerdings die OD_{600} der Bakterien-Zellen bei allen drei Ansätzen unter verschiedenen Lichteinflüssen nahezu gleich, während die Esterase-Aktivität bei 1000 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ deutlich ansteigt. Dies könnte auch als Indikator für Stress, den die Bakterien unter dem starken Lichteinfluss haben, gewertet werden.

Zunächst überraschend war die schlechte Kultivierbarkeit der Bakterien bei einer Lichtintensität von 1000 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$, herrschen doch an einem wolkenlosen Tag zur Mittagszeit Einstrahlungsverhältnisse von 2000 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ (Kutschera, 2002). Wie bereits in der Einleitung beschrieben (vgl. 1.2), siedeln sich epiphytisch lebende Mikroorganismen überwiegend auf der Blattunterseite und zusätzlich in Zellverbänden an (Andrews, 1992, Andrews et al., 1980, Andrews und Kenerley, 1978, Beattie und Lindow, 1999, Costerton et al., 1999, Kinkel, 1997, Normander et al., 1998). Neben dem dort beschriebenen Vorteil des horizontalen Gentransfers durch die bestehenden Zellverbände, besteht allerdings auch der Vorteil des gegenseitigen Schutzes gegen äußere Einflüsse, wie beispielsweise starke Lichteinstrahlung. Unter kontrollierten Bedingungen konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die gemessene Lichtintensität an der Blattunterseite nur 2 - 10 % der an der Blattoberfläche ermittelten Lichtintensität ausmacht, je nach Alter des Blattes, wobei die Lichtintensität an der Blattunterseite von älteren Blättern geringer ist. Auch wenn die hier gewählte Einstrahlungsstärke von 1000 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ um die Hälfte geringer war, als an einem Sonnentag in der Mittagszeit, so handelt es sich doch insgesamt um eine recht hohe Intensität unter Berücksichtigung der Einstrahlungsdauer.

Während die Strahlungssituation in der Natur einem Tag-Nacht-Rhythmus unterliegt, wurde in dem beschriebenen Experiment Dauerlicht eingesetzt. Darüber hinaus ist die höchste Strahlungsintensität in der Natur auch nur in den Stunden der Mittagszeit vorhanden. Die Definition der Dosis besagt allerdings die Kombination aus Konzentration und Einwirkungsdauer (Fent, 2003), so dass die Dosis der Strahlung als Stressfaktor im Experiment bei 1000 $\mu\text{mol Photonen}/(\text{m}^2 \times \text{s})$ insgesamt deutlich höher ist, als die Dosis der Einstrahlung unter natürlichen Bedingungen. Als die Bakterienzellen durch eine erhöhte Konzentration der Zellzahl in der Kultur eine Abschattung erfuhren, war die einzelne Bakterienzelle durch die permanente Bewegung nicht kontinuierlich der Einstrahlung ausgesetzt. Die Dosis der Einstrahlung war reduziert. Bisher ist der Einfluss verschiedener Lichtintensitäten auf epiphytisch lebende Bakterien weitgehend unerforscht.

4.4.2 Transkriptom-Analysen nach Etablierung von *P. fluorescens* Bk3 auf Blattoberflächen im Vergleich zur Kultivierung in Vollmedium

Wie bereits beschrieben, wurde der Stamm *P. fluorescens* Bk3 aus der Phyllosphäre von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox isoliert. In der Einleitung wurde schon näher darauf eingegangen (vgl. 1.2), dass davon auszugehen ist, dass sich die Bakterien in der Phyllosphäre im Gegensatz zu einer Flüssigkultur in einem Vollmedium, durch die bestehende abiotische Situation und ein eingeschränktes Angebot an Nahrungsquellen eher in einer Stresssituation befinden. Aus diesem Grunde sollte auf Transkript-Ebene untersucht werden, welche Unterschiede die Bakterien in den unterschiedlichen Lebensräumen aufweisen, um Rückschlüsse auf den Anpassungsprozess ziehen zu können.

Da die bereits beschriebene Methode der SSH (s. 2.25) bisher ausschließlich für eukaryontische RNA etabliert war, sollte die Methode zur Anwendung für Prokaryonten modifiziert werden. So wurde aus der zunächst isolierten Gesamt-RNA die ribosomalen RNA (16S- und 23S-rRNA) durch Hybridisierung mit entsprechenden Primern entfernt, und in einem weiteren Schritt eine Polyadenylierung zum Anhaften eines Poly(A)-Schwanzes als Bindestelle für entsprechende Primer vorgenommen, um im Anschluss eine SSH durchzuführen.

Die Auswertung der Sequenzierung erhaltener Klone blieb ohne verwertbare Sequenzen, was auf ein nicht optimales Ausgangsmaterial zurück geführt wurde. Aufgrund der hohen Instabilität der prokaryontischen RNA wurde davon ausgegangen, dass sowohl die manuelle Methode nach Reddy et al. (1990), aber auch die weiteren Anwendungen zum Entfernen der ribosomalen RNA, als auch die Polyadenylierung, dazu beigetragen haben, dass die RNA noch vor der cDNA-Synthese so stark degradiert wurde, dass sie sich als optimales Ausgangsmaterial für den Einsatz in die SSH nicht mehr eignete.

Um deshalb möglichst rasch eine cDNA-Synthese aus der RNA durchführen zu können, wurde sowohl auf die Entfernung der ribosomalen RNA, als auch auf die Polyadenylierung und die damit verbundenen Aufreinigungsschritte verzichtet, und statt dessen ein Random-Primer verwendet, der bei der cDNA-Synthese nicht mehr auf den Poly(A)-Schwanz angewiesen ist. Auf diese Weise wurde auf zwei Schritte verzichtet, um aus der eher instabilen RNA möglichst rasch die deutlich stabilere cDNA zu synthetisieren.

Der Homologien-Abgleich der erhaltenen Sequenzen nach einer weiteren durchgeführten SSH ergab, dass ausschließlich ribosomale RNA detektiert wurde. Aufgrund der Kenntnis nach einer stichprobenartigen Sequenzierung der erhaltenen EST-Klone wurde mit einem Anteil an ribosomaler RNA gerechnet. Dennoch war dieses abschließende Ergebnis eher unerwartet, da die Zahl der Klone mit ribosomaler RNA durch die Durchführung der Dot Blot-Hybridisierung eingegrenzt schien. Ein systematischer Fehler in der Durchführung der SSH konnte ausgeschlossen werden, da bei einer parallel durchgeführten SSH unter gleichen Bedingungen mit pflanzlichem Material (vgl. 3.8.3) keine ribosomale RNA detektiert wurde. Dieses Ergebnis ist möglicherweise auf die molekularen Unterschiede zwischen der RNA aus Prokaryonten und Eukaryonten zurück zu führen. Um dieses zu verdeutlichen, ist die Protein-Synthese schematisch in Abb. 4.1 dargestellt.

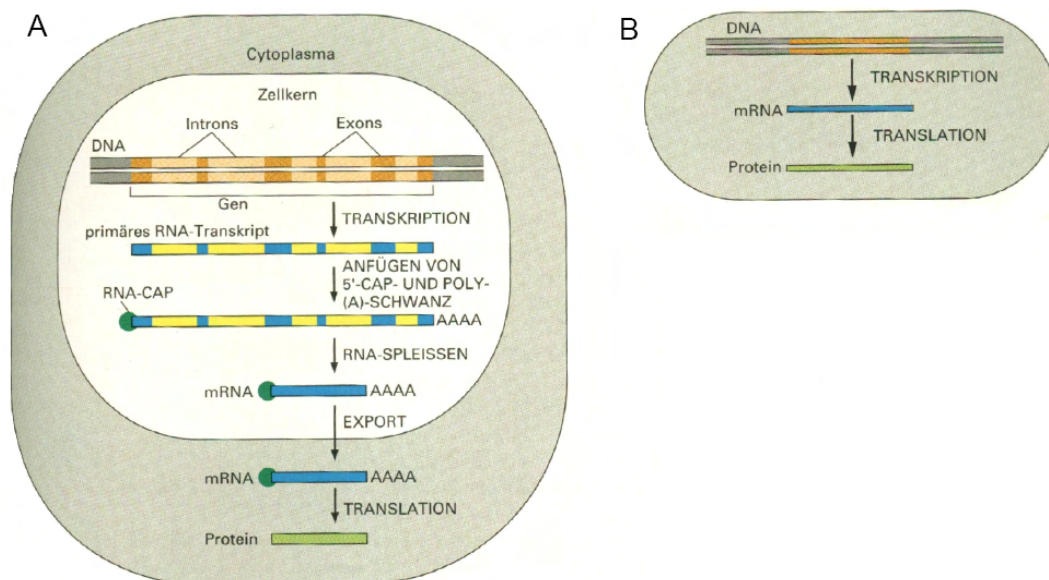


Abb. 4.1 Zusammenfassung der Schritte der Proteinsynthese. A) Darstellung einer eukaryotischen Zelle, die Transkription findet im Zellkern statt, sowie das Anfügen von 5'-Cap und Poly(A)-Schwanz und das RNA-Spleissen, bevor diese mRNA dann für die Translation in das Cytoplasma abgegeben wird. B) Darstellung einer prokaryotischen Zelle, in der kein Zellkern vorhanden ist und die Transkription und die Translation ohne die Polyadenylierung und das Anfügen eines 5'-Caps im Cytoplasma stattfinden, in dem auch die DNA frei vorliegt. (Entnommen aus Alberts et al., 1999)

Wie in Abb. 4.1 zu sehen ist, erfolgt die Transkription der DNA in RNA bei den Eukaryonten innerhalb des Zellkerns, während bei den Prokaryonten, auf Grund des fehlenden Zellkerns, dieser Vorgang im Cytoplasma abläuft. Da die mRNA innerhalb der Eukaryonten zunächst aus dem Zellkern transportiert werden muss und zusätzlich, wahrscheinlich zur Erhöhung der Stabilität, über ein RNA-Cap und einen Poly(A)-Schwanz verfügt, besteht eine größere Zeitspanne, in der die mRNA ohne gebundene Ribosomen vorliegt.

Im Gegensatz dazu binden die Ribosomen innerhalb der Prokaryonten direkt nach oder bereits während der Transkription an die mRNA, die darüber hinaus auch deutlich weniger stabil ist als die der Eukaryonten, so dass der Zeitraum, in dem sie ohne gebundene Prokaryonten in der Zelle vorliegt, kürzer ist (Alberts et al., 1999). Auf diese Tatsache ist wohl hauptsächlich zurückzuführen, dass durch die hier angewendete Methode zur Durchführung der SSH ein so hoher Anteil an ribosomaler RNA innerhalb der erhaltenen Sequenzen vorlag.

Bereits in einem Vorversuch war abzusehen, dass der Anteil an ribosomaler RNA bei den erhaltenen Sequenzen nach SSH sehr hoch war, wobei deutlich mehr 16S-rRNA als 23S-rRNA sequenziert wurde. Aus diesem Grund wurde eine Dot Blot-Hybridisierung durchgeführt, um die 16S-rRNA zu detektieren, und diese Klone vorzeitig aus der Auswertung zu entfernen. Da die Ergebnisse dieser Dot Blot-Hybridisierung deutlich auswertbar waren, ist es um so überraschender, dass dennoch ein so hoher Anteil an 16S-rRNA vorhanden war.

Von der Gesamt-Sequenz der ribosomalen 16S-RNA wurden 81 % durch die Amplifikation zur Herstellung der Sonde abgedeckt, während lediglich 19 % nicht durch die Dot Blot-Hybridisierung detektiert werden konnten. Die Dot Blot-Hybridisierung allein reicht also nicht aus, um die ribosomale 16S-RNA zu detektieren. Wie bereits beschrieben, wurde bei der SSH auf den zuvor durchgeführten Hybridisierungsschritt zum Entfernen der ribosomalen RNA verzichtet, um die extrem instabile prokaryontische RNA möglichst rasch in cDNA zu überführen. Es ist nun allerdings davon auszugehen, dass dieser Schritt zum Entfernen der ribosomalen RNA für das weitere Gelingen der SSH sehr relevant ist.

4.5 Ausblick

Um weiterhin der Fragestellung nachzugehen, ob *P. fluorescens* Bk3 als Pflanzenstärkungsmittel eingesetzt werden kann, ist es von großer Bedeutung, die Mechanismen, die angestoßen werden, um eine Reaktion in der Wirtspflanze zu induzieren, möglichst präzise aufzuklären.

Daher sollte zunächst die Reaktionen der Wirtspflanze auf *P. fluorescens* Bk3 genauer untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Kontakt mit dem isolierte Protein-Komplex

aus *P. fluorescens* Bk3, der eine Untereinheit des Flagellins (FliC) beinhaltet, eine Reaktion bei *M. domestica* cv. Holsteiner Cox hervor ruft, die vergleichbar ist mit Antworten auf Stress-Situationen, sowohl biotischer als auch abiotischer Herkunft.

Darüber hinaus bestätigt diese Arbeit, dass Flagellin als ein wichtiger Elicitor für die Wechselwirkungen zwischen pathogenen Bakterien und dem Wirtsorganismus fungieren kann. An dieser Stelle wäre zu klären, was isolierte Flagelline anderer Bakterien-Stämme für einen Einfluss auf *M. domestica* cv. Holsteiner Cox haben. Bereits in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zumindest die Esterase-Aktivität innerhalb der Wachstums-Überstände verschiedene Flagellin-haltiger Bakterien sehr variabel ist (vgl. 3.5), was auf deutliche Unterschieden zwischen den einzelnen Bakterien-Arten und Stämmen hinweist.

Wie bekannt ist, handelt es sich bei dem hier verwendeten *M. domestica* cv. Holsteiner Cox um eine anfällige Sorte gegenüber Apfelkrankheiten. Daher sollte untersucht werden, welche Reaktionen bei resistenten Apfelsorten durch den hier isolierten Protein-Komplex aus *P. fluorescens* Bk3 ausgelöst werden, und ob es einen ähnlichen Einfluss auf die Reaktion anderer Cultivare von *M. domestica*, speziell der Re-Sorten, wie beispielsweise Remo oder Rewena, gibt. Durch vergleichende Analysen können Rückschlüsse über die Wirkung auf den Wirtsorganismus gezogen werden.

Einen wichtigen Aspekt hinsichtlich der Virulenz von pathogenen Bakterien gegenüber ihren Wirtsorganismen bildet das Typ III Sekretions-System (TTSS). Dieser Protein-Komplex hat die Aufgabe, virulente Proteine in die Wirtszellen zu injizieren. Wie bereits beschrieben, handelt es sich um einen Protein-Komplex, der neben anderen Proteinen auch die Flagellin-Untereinheit FliC beinhaltet (Tampakaki et al., 2004), welche innerhalb des isolierten Komplexes aus *P. fluorescens* Bk3 in dieser Arbeit identifiziert werden konnte. Außerdem weiß man bereits, dass einige *P. fluorescens*-Stämme die dafür codierenden Gene besitzen, während sie bei anderen nicht identifiziert werden konnten (Preston und Collmer, 2004). Es ist also Tatsache, dass nicht alle *P. fluorescens*-Stämme über das TTSS verfügen. Um abschließend klären zu können, ob *P. fluorescens* Bk3 über ein TTSS verfügt, und ob es sich bei der Flagellin-Untereinheit FliC, die in dem hier isolierten Protein-Komplex identifiziert werden konnte, um einen Teil davon handelt, sollte das Vorhandensein des dafür codierenden *hrp*-Gen-Clusters innerhalb des Genoms von *P. fluorescens* Bk3 überprüft werden.

Diskussion

Um verschiedene Bakterien-Populationen auf Transkript-Ebene miteinander vergleichen zu können, sollte eine Methode zur SSH bei Prokaryonten etabliert werden. Das Ziel war hier, Aufschlüsse über Anpassungen an unterschiedliche Umwelteinflüsse zu erhalten, die *P. fluorescens* Bk3 nach einer Etablierung auf Pflanzenoberflächen im Gegensatz zur Kultivierung in einem Vollmedium erfährt. Bereits unter 4.4.2 konnte aufgezeigt werden, warum die hier durchgeführte Methode der SSH mit RNA aus verschiedenen Populationen von *P. fluorescens* Bk3 möglicherweise nicht zu dem gewünschten Erfolg geführt hat.

Um die Etablierung dieser Methode abzuschließen, wäre es daher ratsam, einen erneuten Ansatz durchzuführen, bei dem die Hybridisierung mit ribosomaler 16S- bzw. 23S-rRNA nicht durchgeführt wird, während sich das Probenmaterial noch im Stadium der RNA befindet, sondern erst nach cDNA-Synthese. An dieser Stelle kommt es nicht mehr zum Umgang mit der deutlich instabileren RNA, sondern der widerstandsfähigeren cDNA innerhalb der Methode. Dennoch kommt es hier noch nicht zu einer Hybridisierung der beiden Populationen untereinander. Auf diese Weise kann ribosomale Anteil frühzeitig, aber sicher aus dem System entfernt werden.

5. Literaturverzeichnis

- Agrios, G.N.** (2005) Plant Pathology. *Elsevier Academic Press*
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.** (1999) Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. *Wiley-VCH Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto*
- Alfano, J.R., Collmer, A.** (1997) The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria trafficking harpins, Avr proteins, and death. *Journal of Bacteriology* **179**: 5655-5662
- Andrews J.H.** (1992) Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* **30**: 603-635
- Andrews, J.H., Harris, R.F.** (2000) The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology* **38**: 145-180
- Andrews, J.H., Kenerley, C.M.** (1978) The effect of a pesticide program on non-target epiphytic microbial populations of apple leaves. *Canadian Journal of Microbiology* **24**: 1058-1072
- Andrews, J.H., Kenerley, C.M., Nordheim, E.V.** (1980) Positional variation in phylloplane microbial populations within an apple tree canopy. *Microbial Ecology* **6**: 71-84
- Andrews, J.H., Kinkel, L.L., Berbee, F.M., Nordheim, E.V.** (1987) Fungi, leaves, and the theory of island biogeography. *Microbial Ecology* **14**: 277-290
- Antoniw, J.F., Ritter, C.E., Pierpoint, W.S., Van Loon, L.C.** (1980) Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of *Tobacco* infected with TMV. *Journal of General Virology* **47**: 79-87
- Arlat, M., van Gijsegem, F., Huet, J.C., Pernollet, J.C., Boucher, C.A.** (1994) PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *The EMBO Journal* **13**: 543-553
- Bayot, R.G., Ries, S.M.** (1986) Role of motility in apple blossom infection by *Erwinia amylovora* and studies of fire blight control with attractant and repellent compounds. *Phytopathology* **76**: 441-445
- Beattie, G. A., Lindow, S.E.** (1999) Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology* **89**: 353-359
- Bickel-Sandkötter, S.** (2003) Nutzpflanzen und ihre Inhaltsstoffe. *Quelle & Meyer Verlag Wiebelsheim*

- Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA)** (2005) Pflanzenschutz im Ökologischen Landbau - Probleme und Lösungsansätze - Zehntes Fachgespräch am 22. Februar 2005 in Kleinmachnow.
- Bonas, U.** (1994) *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **192**: 79-98
- Boone, D.M.** (1971) Genetics of *Venturia inaequalis*. *Annual Review of Phytopathology* **9**: 297-318
- Brock, T.D.** (1971) Microbial growth rates in nature. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **35**: 39-58
- Buchanan, B.C., Gruissem, W., Jones, R.L.** (2001) Biochemistry & Molecular Biology of plants. *American Society of Plant Physiologists Rockville, Maryland*
- Burr, T.J., Matteson, M.C., Smith, C.A., Corral-Garcia, M.R., Huang, T.-C.** (1996) Effectiveness of bacteria and yeast from apple orchards as biological control agents of apple scab. *Biological Control* **6**: 151-157
- Che, F.-S. Nakajima, Y., Tanaka, N., Iwano, M., Yoshida, T., Takayama, S., Kadota, I., Isolgai, A.** (2000) Flagellin from an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* induces a resistance response in cultured rice cells. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 32347-32356
- Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V.A., van der Bij, J., van der Drift, K.M.G.M., Schripsema, J., Kroon, B., Scheffer, R.J., Keel, C., Bakker, P.A.H.M., Tichy, H.-V., de Bruijn, F.J., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J.J** (1998) Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersic*. *Molecular Plant - Microbe Interactions* **11**: 1069-1077
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P.** (1999) Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322
- DeFlaun M.F., T.A., McAteer, A.L., Marshall, B., Levy, S.B.** (1990) Development of an adhesion assay and characterization of an adhesion-deficient mutant of *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 112-119
- Ellis, M.B., Ellis, J.P.** (1985) Microfungi on land plants. An identification handbook. *Croom Helm: London & Sydney*
- Ellis, R.J., Timms-Wilson, T.M., Bailey, M.J.** (2001) Identification of conserved traits in fluorescent pseudomonads with antifungal activity. *Environmental Microbiology* **2**: 274-284
- Endo, M., Hakozaiki, H., Kokubun, T., Masuko, H., Takahata, Y., Tsuchiya, T., Higashitani, A., Tabata, S., Watanabe, M.** (2002) Generation of 919 expressed sequence tags from immature flower buds and gene expression analysis using expressed sequence tags in the model plant *Lotus japonicus*. *Genes and Genetic Systems* **77**: 277-282

- Epple, P., Apel, K., Bohlmann, H.** (1995) An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiology* **109**: 813-820
- FAO** (2001) Food and agriculture organisation of the United Nations. Progress made towards reducing risks of pesticides and industrial chemicals in developing countries. *Press Release* 01/67
- Fauth M., Schweizer, P., Buchala, A., Markstädter, C., Riederer, M., Kato, T., Kauss, H.** (1998) Cutin monomers and surface wax constituents elicit H₂O₂ in conditioned cucumber hypocotyl segments and enhance the activity of other H₂O₂ elicitors. *Plant Physiology* **117**: 1373-1380
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., Boller, T.** (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal* **18**: 265-276
- Fent, K.** (2003) Ökotoxikologie. Umweltchemie - Toxikologie - Ökologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York*
- Fett W.F., Gérard H.C., Moreau R.A., Osman S.F., Jones L.E.** (1992) Cutinase Production by *Streptomyces* spp. *Current Microbiology* **25**: 165-171
- Finlay, B.B., Falkow, S.** (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 136-169
- Fischer, M., Fischer, C.** (1999) Evaluation of *Malus* species and cultivars at the fruit genebank Dresden-Pillnitz and its use for apple resistance breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution* **46**: 235-241
- Fischer, M., Fischer, C.** (2002) Long-term apple breeding program and its results. *The Compact Fruit Tree* **35**: 21-25
- Fiss, M.** (1996) Antagonistische Wirkung von pilzlichen Apfelblattepiphyten aus dem Niederelbischen Obstbaugebiet gegen den Apfelschorferreger *Venturia inaequalis*. *Diplomarbeit, Universität Hannover*
- Fiss, M.** (2001) Evaluierung von epiphytischen Antagonisten zur biologischen Kontrolle des Apfelschorferregers *Venturia inaequalis*. *Dissertation, Universität Hannover*
- Francis, S.A., Dewey, F.M., Gurr, S.J.** (1996) The role of cutinase in germling development an infection by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **49**: 201-211
- García-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., Moreno, M.** (1995) The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology* **3**: 72-74
- Gau, A.E., Dietrich, C., Kloppstech, K.** (2002) Non-invasive determination of plant-associated bacteria in the phyllosphere of plants. *Environmental Microbiology* **4**: 744-752

- Gau, A.E., Koutb, M., Piotrowski, M. Klopstech, K.** (2004) Accumulation of pathogenesis-related proteins in the apoplast of a susceptible cultivar of apple (*Malus domestica* cv. Elstar) after infection by *Venturia inaequalis* and constitutive expression of PR genes in the resistant cultivar Remo. *European Journal of Plant Pathology* **110**: 703-711
- Gilbert, R.D., Johnson, A.M., Dean, R.A.** (1996) Chemical signals responsible for appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Physiological and Molecular Plant Physiology* **48**: 335-346
- Ginocchio, C.C., Olmsted, S.B., Wells, C.L., Galán, J.E.** (1994) Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell* **76**: 717-724
- Godfrey, B. E. S.** (1976) Leachates from aerial parts of plants and their relation to plant surface microbial populations. *Microbiology of aerial plant surfaces*. Academic Press, London, UK. S. 433-439
- Gómez-Gómez, L., Felix, G., Boller, T.** (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **18**: 277-284
- Green, T.R., Ryan, C.A.** (1972) Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against insects. *Science* **18**: 776-777
- Guo, L., Chen, S., Liu, K., Liu, Y., Ni, L., Zhang, K., Zhang, L.** (2008) Isolation of heat shock factor HsfA1a-binding sites in vivo revealed variations of heat shock elements in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **49**: 1306-1315
- Haas, D., Keel, C.** (2003) Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Reviews in Phytopathology* **41**: 117-153
- Hammond-Kosack, K.E., Harrison, K., Jones, J.D.G.** (1994) Developmentally regulated cell death on expression of the fungal avirulence gene *Avr9* in tomato seedlings carrying the disease-resistance gene *Cf-9*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**: 10445-10449
- Harris, P.A., Stahlman, P.W.** (1996) Soil bacteria as selective biological control agents of winter annual grass weeds in winter wheat. *Applied Soil Ecology* **3**: 275-281
- Hattermann, D.R., Ries, S.M.** (1989) Motility of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in infection. *Phytopathology* **79**: 284-289
- He, S.Y.** (1998) Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **36**: 363-392
- He, S.Y., Huang, H.-C., Collmer, A.** (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin_{PSS}: A protein that is secreted via the hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* **73**: 1255-1266

- He, S.Y., Schoedel, C., Chatterjee, A.K., Collmer, A.** (1991) Extracellular secretion of pectate lyase by *Erwinia chrysanthemi* out pathway is dependent upon Sec-mediated export across the inner membrane. *Journal of Bacteriology* **173**: 4310-4317
- Heinen, W., de Vries, H.** (1966) Stages during the breakdown of plant cutin by soil microorganisms. *Archives of Microbiology* **54**: 331-338
- Hirano, S. S., Upper, C. D.** (2000) Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* - a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 624-653
- Hueck, C.J.** (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 379-433
- Hunt, M.D., Neuenschwander, D.H., Delaney, T.P., Weymann, K.B., Friedrich, L.B., Lawton, K.A., Steiner, H.Y., Ryals, J.** (1996) Recent advances in systemic acquired resistance research - A review. *Gene* **178**: 89-95
- Hwang, J., Benson, D.M.** (2002) Biocontrol of rhizoctonia stem and root rot of poinsettia with *Burkholderia cepacia* and binucleate *Rhizoctonia*. *Plant disease* **86**: 47-53
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28
- Jensen, O.N., Wilm, M., Schevchenko, A., Mann, M.** (1998) Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2D gels. 2-D proteome Analysis Protocols, Methods in Molecular Biology (Link, A. J. ed.). *Humana Press, Inc. Totowa, N.J.* **112**:513-530
- Kim, H.E., Park, K.R.** (2002) Purification and characterization of an esterase from *Acinetobacter lwoffii* 16C-1. *Current Microbiology* **44**: 401-405
- Kinkel, L.L.** (1997) Microbial population dynamics on leaves. *Annual Review of Phytopathology* **35**: 327-347
- Köller, W., Parker, D.M.** (1989) Purification and characterization of cutinase from *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **79**: 278-283
- Kolattukudy, P.E.** (1985) Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **23**: 223-250
- Kolattukudy P.E., Rogers, L.M., Li, D., Hwang, C.-S., Flaishman, M.A.** (1994) Surface signaling in pathogenesis. *National Academy of Sciences* **9**: 4080-4087
- Kremer, B.P.** (2001) Steinbachs Naturführer - Bäume - Erkennen & bestimmen. *Mosaik Verlag München*
- Kreuzer, J.** (1997) Kreuzers Gartenpflanzen-Lexikon; 3. Beerenobst, Kernobst, Steinobst, Schalenobst. *Bernhard Thalacker Verlag GmbH Co. KG, Braunschweig*

- Kubori, T., Yamaguchi, S., Aizawa, S.** (1997) Assembly of the switch complex onto the MS ring complex of *Salmonella typhimurium* does not require any other flagellar proteins. *Journal of Bacteriology* **179**: 813-817
- Kürkcüoğlu, A.-S.** (2006) Eine Strategie zur biologischen Kontrolle von Pflanzenkrankheiten durch den Einsatz natürlicher, nicht pathogener mikrobieller Antagonisten am Modellsystem *Malus domestica* (Apfel) / *Venturia inaequalis* (Apfelschorferreger) / *Pseudomonas fluorescens* Bk3 (mikrobieller Antagonist). *Dissertation, Universität Hannover*
- Kürkcüoğlu, S., Degenhardt, J., Lensing, J., Al-Masri, A.N., Gau, A.E.** (2007) Identification of differentially expressed genes in *Malus domestica* after application of the non-pathogenic bacterium *Pseudomonas fluorescens* Bk3 to the phyllosphere. *Journal of Experimental Botany* **58**: 733-741
- Kürkcüoğlu, S., Piotrowski, M., Kloppstech, K., Gau, A.E.** (2004) Up-regulation of pathogenesis-related proteins in the apoplast of *Malus domestica* cv. Holsteiner Cox after application of a non-pathogenic bacterium *Pseudomonas fluorescens* Bk3 to the plant phyllosphere. *Zeitschrift für Naturforschung* **59c**: 843-848
- Kutschera, Ulrich** (2002) Prinzipien der Pflanzenphysiologie. *Spektrum Akademischer Verlag*
- Lagrimini, L.M., Burkhart, W., Moyer, M., Rothstein, S.** (1987) Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: Molecular analysis and tissue-specific expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **84**: 7542-7546
- Legard, D.E., McQuilken, M.P., Whipps, J.M., Fenlon, J.S., Fermor, T.R., Thompson, I.P., Bailey, M.J., Lynch, J.M.** (1994) Studies of seasonal changes in the microbial populations on the phyllosphere of spring wheat as a prelude to the release of a genetically modified microorganism. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **50**: 87-101
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275
- Madigan, T.M., Martinko, J.M.** (2006) Brock - Mikrobiologie. *Pearson Education München - Bosten - San Francisco - Harlow, England - Don Mills, Ontario - Sydney - Mexico City - Madrid - Amsterdam*
- Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Métraux, J.-P., Défago, G.** (1994) Induction of systemic resistance of tobacco necrosis virus by the root colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* **89**: 139-146
- Maurhofer, M., Reimann, C., Schmidli-Sacherer, P., Heeb, S., Haas, D., Défago, G.** (1998) Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology* **88**: 678-684

- McKeen, W.E.** (1974) Mode of penetration of epidermal cell walls of *Vicia faba* by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **64**: 461-467
- McQueen, D.A., Schottel, J.L.** (1987) Purification and characterization of a novel extracellular esterase from pathogenic *Streptomyces scabies* that is inducible by zinc. *Journal of Bacteriology* **169**: 1967-1971
- Melchers, L.S., Apotheker-de Groot, M., van der Knaap, J.A., Ponstein, A.S., Sela-Buurlage, M.B., Bol, J.F., Cornelissen, B.J.C, van der Elzen, P.J.M., Linthorst, H.J.M.** (1994) A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exochitinases displays antifungal activity. *Plant Journal* **5**: 469-480
- Metin, K., Ateslier, Z.B.B., Basbulbul, G, Biyik, H.H.** (2006) Characterization of esterase activity in *Geobacillus* sp. HBB-4. *Journal of Basic Microbiology* **46**: 400-409
- Metraux, J.P., Streit, L., Staub, T.** (1988) A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **33**: 1-9
- Moiseyev, G.P., Beintema, J.J., Fedoreyeva, L.I., Yakovlev, G.I.** (1994) High sequence similarity between a ribonuclease from *ginseng* calluses and fungus-elicited proteins from parsley indicates that intracellular pathogenesis-related proteins are ribonucleases. *Planta* **193**: 470-472
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimann, C., Duffy, B., Défago, G.** (2003) Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiology Ecology* **45**: 71-81
- Nesternko, M.V., Tilley, M., Upton, S.J.** (1994) A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **28**: 239-242
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W.** (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**: 255-262
- Ng, K.W., Roberts, E.T.** (1974) Pathogenicity of *Nectria galligena* (Bres.). *Plant Pathology* **23**: 49-50
- Normander, B., Christensen, B.B., Molin, S., Kroer, N.** (1998) Effect of bacterial distribution and activity on conjugal gene transfer on the phylloplane of the bush bean (*Phaseolus vulgaris*). *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 1902-1909
- Okushima, Y., Koizumi, N., Kusano, T., Sano, H.** (2000) Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* **42**: 479-488
- Panopoulos, N.J., Schroth, M.N.** (1974) Role of flagellar motility in the invasion of bean leaves by *Pseudomonas phaseolicola*. *Phytopathology* **64**: 1389-1397

- Parisi, L., Lespinasse, Y., Guillaumes, J., Krüger, J.** (1993) A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the Vf gene. *Phytopathology* **83**: 533-537
- Pascholati, S.F., Deising, H., Leite, B., Anderson, D., Nicholson, R.L.** (1993) Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **42**: 37-51
- Pieterse, C.M.J., van Pelt, J.A., Verhagen, B.W.M., Ton, J., van Wees, S.C.M., Leon-Kloostziel, K.M., van Loon, L.C.** (2003) Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Symbiosis* **35**: 39-54
- Preston G.M., Collmer, A.** (2004) The type III secretion systems of plant-associated pseudomonads: genes and proteins on the move. *Pseudomonas - Vol. 2 - Virulence and Gene Regulation, Kluwer Academic / Plenum Publishers New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow*, S. 181-219
- Pugsley, A.P.** (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **57**: 50-108
- Purdy, R.E., Kolattukudy, P.E.** (1973) Depolymerization of a hydroxy fatty acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from *Fusarium solani f. pisi*: Isolation and some properties of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **159**: 61-69
- Purdy, R.E., Kolattukudy, P.E.** (1975) Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Purification, amino acid composition, and molecular weight of two isoenzymes of cutinase and a nonspecific esterase from *Fusarium solani f. pisi*. *Biochemistry* **14**: 2824-2831
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M., de Souza, J.T.** (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 537-547
- Reddy, K.J., Webb, R., Sherman, L.A.** (1990) Bacterial RNA isolation with one hour centrifugation in a table-top ultra-centrifuge. *Biotechniques* **8**: 250-251
- Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiäho-Lassila, E.L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M. He, S.Y.** (1997) Hrp pilus: an hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**: 3459-3464
- Romantschuk, M., Nurmiäho-Lassila, E.L., Roine, E., Suoniemi, A.** (1993) Pilus-mediated adsorption of *Pseudomonas syringae* to the surface of host and non-host plant leaves. *Journal of General Microbiology* **139**: 2251-2260
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H., Jones, J.D.G.** (1999) Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: Convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *The Plant Cell* **11**: 273-287
- Ros, B.A.** (2004) Analyse der differentiellen Genexpression der Kartoffel gegenüber biotischen und abiotischen Stressoren. *Dissertation, TU München*

- Rothmaler, W.** (2000) Exkursionsflora von Deutschland. Band 3 Gefäßpflanzen: Atlasband. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg - Berlin*
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y., Hunt, M.D.** (1996) Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **8**: 1809-1819
- Schägger H., van Jagow G.** (1987) Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**: 368-379
- Schlegel, H.G.** (1992) Allgemeine Mikrobiologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York*
- Schroth, M.N., Thomson, S.V., Hildebrand, D.C., Moller, W.J.** (1974) Epidemiology and control of fire blight. *Annual Review of Phytopathology* **12**: 389-412
- Sebastian, J., Chandra, A.K., Koattukudy, P.E.** (1987) Discovery of a cutinase-producing *Pseudomonas* sp. cohabiting with an apparently nitrogen-fixing *Corynebacterium* sp. in the phyllosphere. *Journal of Bacteriology* **169**: 131-136
- Sharfi-Tehrani, A., Zala, M., Natsch, A., Moëne-Loccoz, Y., Défago, G.** (1998) Biocontrol of soil-borne fungal plant diseases by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 631-643
- Singh, P., Piotrowski, M., Kloppstech, K., Gau, A.E.** (2004) Investigations on epiphytic living *Pseudomonas* species from *Malus domestica* with an antagonistic effect to *Venturia inaequalis* on isolated plant cuticle membranes. *Environmental Microbiology* **6**: 1149-1158
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A.** (1998) Strasburger. Lehrbuch der Botanik. *Gustav Fischer Stuttgart - Jena - Lübeck - Ulm*
- Somssich, I.E., Schmelzer, E., Bollmann, J., Hahlbrock, K.** (1986) Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding „pathogenesis-related“ proteins in cultured parsley cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **83**: 2427-2430
- Stahl, D.J., Schäfer, W.** (1992) Cutinase is not required for fungal pathogenicity on pea. *The Plant Cell* **4**: 621-629
- Tampakaki, A.P., Fadouloglou, V.E., Gazi, A.D., Panopoulos, N.J., Kokkinidis, M.** (2004) Conserved features of type III secretion. *Cellular Microbiology* **6**: 805-816
- Tans-Kersten, J., Huang, H., Allen, C.** (2001) *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology* **183**: 3597-3605
- Terras, F.R., Schoofs, H.M., de Bolle, M.F., van Leuven, F., Rees, S.B., Vanderleyden, J., Cammune, B.P., Broekaert, W.F.** (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 15301-15309

- Tesch, C., Nikoleit, K., Gnau, V., Götz, F., Bormann, C.** (1996) Biochemical and molecular characterization of the extracellular esterase from *Streptomyces diastatochromogenes*. *Journal of Bacteriology* **178**: 1858-1865
- Thompson, I.P., Mayley, M.J., Fenlon, J.S., Fermor, T.R., Lilley, A.K., Lynch, J.M., McCormack, P.J., McQuilken, M.P., Purdy, K.J., Rainey, P.B., Whipps, J.M.** (1993) Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant and Soil* **150**: 177-191
- Toyoda, H., Hashimoto, H., Utsumi, R., Kobayashi, H., Ouchi, S.** (1988) Detoxification of fusaric acid by a fusaric acid-resistant mutant of *Pseudomonas solanacearum* and its application to biological control of fusarium wilt of tomato. *Phytopathology* **78**: 1307-1311
- Trail, F., Koeller, W.** (1990) Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: Evidence for a relationship between enzyme properties and tissue specificity. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **36**: 495-508
- Vallad, G.E., Goodman, R.M.** (2004) Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science Society of America* **44**: 1920-1934
- Van Gijsegem, F., Gough, C., Zischek, C., Niqueux, E., Arlat, M., Genin, S., Barberis, P., Germin, S., Castello, P., Boucher, C.** (1995) The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Molecular Microbiology* **15**: 1095-1114
- Van Kan, J.A.L., Van't Klooster, J.W., Wagemakers, C.A.M., Dees, D.C.T., Van der Vlugt-Bergmans, C.J.B.** (1997) Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of Gerbera and Tomato. *Molecular Plant - Microbe Interactions* **10**: 30-38
- Van Loon, L.C.** (1982) Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defense against virus infection, in active defense mechanisms in plants. Wood RKS (Hrsg.). *New York, Plenum Press*
- Vera, P., Conejero, V.** (1988) Pathogenesis-related proteins of tomato, P-69 as an alkaline endoproteinase. *Plant Physiology* **87**: 58-63
- Vesper, S.J.** (1987) Production of pili (fimbriae) by *Pseudomonas fluorescens* and correlation with attachment to corn roots. *Applied and Environmental Microbiology* **53**: 1397-1405
- Vinatzer, B.A., Patocchi, A., Gianfranceschi, L., Tartarini, S., Zhang, H.-B., Gessler, C., Sansavini, S.** (2001) Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with Vf apple scab resistance. *Molecular Plant - Microbe Interactions* **14**: 508-515

- Wang G.-Y., Michailides T.J., Hammock B.D., Lee Y.-M., Bostock R.M.** (2000) Affinity purification and characterisation of a cutinase from the fungal plant pathogen *Monilinia fructicola* (Wint.) honey. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **382**: 31-38
- Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, CH., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A., Beer, S.V.** (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* **257**: 85-88
- Wei, Y., Zhang, Z., Andersen, C.H., Schmelzer, E., Gregersen, P.L., Collinge, D.B., Smedegaard-Petersen, V., Thordal-Christensen, H.** (1998) An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew. *Plant Molecular Biology* **36**: 101-112
- Williams, E.B., Kuc, J.** (1969) Resistance in *Malus* to *Venturia inaequalis*. *Annual Review of Phytopathology* **7**: 223-246
- Xu, W.M., Butt, D.J., Ridout, M.S.** (1995) Temporal patterns of airborne conidia of *Podospheera leucotricha*, causal agent of apple powdery mildew. *Plant Pathology* **44**: 944-955
- Yoshiura, K.-i., Machida, J., Daack-Hirsch, S.** (1998) Characterization of a novel gene disrupted by a balanced chromosomal translocation t(2;19)(q11.2;q13.3) in a family with cleft lip and palate. *Genomics* **54**: 231-240
- Zehnder, G., Kloepper, J., Tuzun, S., Yao, C.B., Wei, G., Chambliss, O., Shelby, R.** (1997) Insect feeding on cucumber mediated by rhizobacteria-induced plant resistance. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **83**: 81-85
- Zhang, Z., Collinge, D.B., Thordal-Christensen, H.** (1995) Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Journal* **8**: 139-145

6. Anhang

Primer-Liste

Primer-Name	Sequenz
16SL_Biotin	5' - TTGGGATCCA...TCAGAT - 3'
16SR_Biotin	5' - CACGACTTCT...CACCCC - 3'
23S_118R_biotin	5' - GTTBCCCCATTTCGCA - 3'
23S_1370V_biotin	5' - ATAGGCGTAGGCGARGG - 3'
T7forward	5' - GTAAAACGACGGCCAG - 3'
M13reverse	5' - AACAGCTATGACCATG - 3'
SL	5' - TTGGGATCCAGAGTTTGATCATGGCTCAGAT - 3'
U522	5' - GTATTACCGCGGCTG - 3'
SR	5' - CACGAATTCTACCTTGTTACGACTTCACCCC - 3'
B785	5' - GGATTAGATACCCTGGTAG - 3'
Proteasome Subunit Alpha Type 4 forward	5' - GACATTATACCAGCCACTGC - 3'
Proteasome Subunit Alpha Type 4 reverse	5' - GGATACAAGAACACACCTGC - 3'
Avr9/Cf - 9 rapidly elicited Protein 284 forward	5' - AAGACAGCACGACAATCACC - 3'
Avr9/Cf - 9 rapidly elicited Protein 284 reverse	5' - TAGATGAAGTTGCGAGGAGG - 3'
Ribonuclease-ähnliches Protein PR10b forward	5' - CCTGCTAGGTTGTTCAATGC - 3'
Ribonuclease-ähnliches Protein PR10b reverse	5' - CTCTTGATGACAGAACCGCT - 3'
Heat Shock Protein 90 forward	5' - GATTCGAGAGCTTGACTGAC - 3'
Heat Shock Protein 90 reverse	5' - TAACATCAGCACCAGCAGAC - 3'
Transmembrane CLPTM1 family forward	5' - GGCAGGTA CTTCGCTTCCAA - 3'
Transmembrane CLPTM1 family reverse	5' - AAGTTCACGTTCACTGCCGA - 3'
Glutathion-S-transferase forward	5' - CAGGTACAAGGCGAGTGATT - 3'
Glutathion-S-transferase reverse	5' - GGAATGTGGTGAAGATCAGC - 3'
β -Actin forward	5' - TGGTGAGGCTCTATTCCAAC - 3'
β -Actin reverse	5' - TGGCATATACTCTGGAGG - 3'

Anhang

Germin-ähnliches Protein forward	5' - TCCTCCTCTCCTCCTCCAAT - 3'
Germin-ähnliches Protein reverse	5' - ATGACTCCACCAACAGCCAG - 3'
Lipid-Transfer-Protein forward	5' - GTTGCCATGGCCATAAC - 3'
Lipid-Transfer-Protein reverse	5' - CGG CAG CAT CAG TGG TGT TA - 3'
flic_fwd	5' - ATG ACT AGC CAA ATC AAC GG - 3'
flic-rev	5' - GTA CCG TAC GAA CCG TCC A - 3'

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation

Untersuchungen zum epiphytisch lebenden Bakterium *Pseudomonas fluorescens*
Bk3 und dessen Wechselwirkungen mit der Wirtspflanze *Malus domestica* cv.

Holsteiner Cox

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung
herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 18.11.2008

(Unterschrift)

Name: Annabel Steinfelder

Lebenslauf

Name: Annabel Steinfelder

Geburtsdatum / Geburtsort: 05. August 1974, Springe

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1994 Abitur
Otto-Hahn-Gymnasium, Springe

Berufsausbildung:

1994 - 1997 Ausbildung zur Medizinisch-technische Laboratoriums-Assistentin
Staatlich anerkannte Lehranstalt für technische Assistenten in der Medizin der von Bodelschwingschen Anstalten Bethel in Bielefeld

Beruflicher Werdegang:

1997 - 2001 Medizinisch-technische Laboratoriums-Assistentin
Herz- und Diabetes-Zentrum NRW, Bad Oeynhausen

2001 - 2006 Technische Assistentin
Universität Bielefeld; Ökologie der Pflanzen, Zelluläre Genetik, Molekulare Zellphysiologie

Studium:

1999 -2005 Universität Bielefeld
Biologie auf Diplom

16.07.2003 Vordiplom
Allgemeine Botanik, Cytologie, Physik, Chemie

25.04.2005 Diplom
Tierphysiologie, Neurobiologie, Ökologie, Physik
Thema Diplomarbeit: Der Einfluss eines Stressfaktors auf die Entwicklung von *Caenorhabditis elegans*

2006 - 2009 Promotionsstudiengang Biologie
Leibniz Universität Hannover

2006 - 2009 DFG-Projekt:
Kommunikation zwischen dem epiphytisch lebenden, nicht-pathogenen *Venturia inaequalis*-Antagonisten *Pseudomonas fluorescens* Bk3 und der Wirtspflanze *Malus domestica*

November 2008 Abgabe der Dissertation

Danke...

- ... *PD Dr. Achim E. Gau* für das spannende Thema, den kontinuierlichen Dialog, viele Tipps in Theorie und Praxis, interessante Denkanstöße und die gute Betreuung
- ... *Prof. Dr. K. Wydra* für die Übernahme des Korreferats
- ... an die *DFG* für die finanzielle Unterstützung dieses Projekts
- ... *PD Dr. Markus Piotrowski* von der Ruhr-Universität Bochum für die Protein-Sequenzierung
- ... *Dr. Uwe Kahmann* von der Universität Bielefeld und *Detlef Klosa* vom Geozentrum Hannover für tolle elektronenmikroskopische Aufnahmen
- ... *Julia Lensing*, die mir nicht nur beruflich beigestanden hat, und mir einfach oft mit Rat und Tat zur Seite stand
- ... *Dr. Anna-Sophia Kürkcüoglu* für ihre immer währende Diskussions-Bereitschaft und spontane Hilfestellungen
- ... *AG Gau*, die immer für eine gute Atmosphäre gesorgt hat und in vielerlei Hinsicht Unterstützung geboten hat
- ... *Stephanie Sunderhaus* für die freundliche und praktische Beratung in Bezug auf Gelfiltration
- ... *PD Dr. Klaus-Peter Michel, Anja Döbbe, Julia Beckmann* und *Dr. Natalija Hohnjec* für die Hilfsbereitschaft und die vielen Tipps und Tricks, die mich des öfteren vor der absoluten Verzweiflung gerettet haben
- ... *Fabian Rochner*, der dankenswerterweise bei allen Computerproblemen immer ganz schnell „Erste Hilfe“ geleistet hat
- ... *Simone Jacob, Dr. Regine Schmalhorst, Dr. Iris Finkemeier, Dr. Maik Bartelheimer, Nils Hasenbein, Gerd Drexler, Ullrich Richhard, Elisabeth Detring, Elke Fuhrkröger, Silvia Verwiebe*, und ... jeder zu seiner Zeit... denn dazu sind Freunde da ...
- ... *Marcus Höpfner*, ohne den ich oft verzweifelt wäre, der mir Rückhalt und Motivation gegeben hat, und der mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen zurück geholt hat