

**Identifizierung und Charakterisierung zweier für die
Entwicklung essentieller Serin/Threonin-
Proteinkinasen in *Myxococcus xanthus***

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

SEBASTIAN WEIS
aus Heimbuchenthal

Marburg/Lahn im September 2007

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von August 2004 bis September 2007 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie unter der Leitung von PD Dr. Reiner Hedderich durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität als Dissertation am 29. Oktober 2007 angenommen.

Erstgutachter:	PD Dr. Reiner Hedderich
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Tag der mündlichen Prüfung am 5. November 2007.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Zusammenfassung	2
2 Einleitung.....	3
2.1 Gleitende Fortbewegung von <i>Myxococcus xanthus</i>	3
2.2 Lebenszyklus und Entwicklung von <i>Myxococcus xanthus</i>.....	5
2.3 TonB-abhängige Rezeptoren.....	11
2.4 Serin/Threonin-Proteinkinasen	13
2.5 Ziele dieser Arbeit.....	16
3 Material und Methoden.....	17
3.1 Materialien, Chemikalien und Medien	17
3.1.1 Enzyme.....	17
3.1.2 Nukleotide und Plasmide	17
3.1.3 Chemikalien und Medien.....	17
3.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide.....	20
3.3 Molekularbiologische Methoden.....	43
3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion.....	43
3.3.2 Gerichtete Mutagenese und Konstruktiou von Punktmutanten.....	44
3.3.3 Herstellung elektrokompetenter Zellen und Transformation von <i>Escherichia coli</i>	44
3.3.4 Herstellung elektrokompetenter Zellen und Transformation von <i>Myxococcus xanthus</i>	45
3.3.5 Konstruktion von Insertionsmutanten von <i>Myxococcus xanthus</i>	45
3.3.6 Konstruktion von in-frame Deletionsmutanten von <i>Myxococcus xanthus</i>	46
3.3.7 Präparation, Extraktion und Konzentrationsbestimmung von DNA	48
3.3.8 Restriktion und Ligation von DNA	49
3.3.9 Agarose-Gelelektrophorese	49
3.3.10 Sequenzierung doppelsträngiger DNA.....	49
3.3.11 Präparation von RNA	50
3.3.12 Synthese von cDNA.....	52
3.3.13 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion	52
3.4 Mikrobiologische Methoden.....	53
3.4.1 Kultivierung der Bakterien	53
3.4.2 Untersuchung der Entwicklung von <i>Myxococcus xanthus</i>	54
3.4.3 Bestimmung der Sporulationseffizienz von <i>Myxococcus xanthus</i>	54
3.4.4 Untersuchung der Motilität von <i>Myxococcus xanthus</i>	55
3.4.5 Makroskopische und mikroskopische Analyse von Phänotypen	55

3.5	Biochemische Methoden	56
3.5.1	Heterologe Produktion von Proteinen in <i>Escherichia coli</i>	56
3.5.2	Fraktionierung von Zellen.....	56
3.5.3	Reinigung von CsgA mittels Fast Protein Liquid Chromatography	57
3.5.4	Affinitätsreinigung von CsgA mittels Dynabeads	58
3.5.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	59
3.5.6	Fällung von Proteinen	59
3.5.7	Auftrennung von Proteingemischen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	60
3.5.8	Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot.....	61
3.5.9	Identifizierung von Proteinen und Peptiden durch Massenspektrometrie	63
3.6	Bioinformatische Methoden	63
3.6.1	Analyse von Sequenzen und Sequenzvergleiche	63
3.6.2	Strukturvorhersage von Domänen	64
4	Ergebnisse.....	65
4.1	Reinigung von CsgA	65
4.1.1	Biochemische Fraktionierung der Zellen	65
4.1.2	Chromatographische Reinigung.....	66
4.1.3	Analyse der gereinigten Fraktionen durch Massenspektrometrie	67
4.1.4	Reinigung mittels Immuno-Affinitätschromatographie	69
4.2	Komplementation der csgA-Mutante.....	71
4.2.1	Komplementation durch CsgA mit N- und C-terminalen Affinitäts-Tags	71
4.2.2	Komplementation mit AgIU- und Tgl-Fusionsproteinen	74
4.3	Auswahl verschiedener Ser/Thr-Proteinkinasen für die Mutagenese	76
4.4	Charakterisierung von Mutanten der Ser/Thr-Proteinkinase MXAN4557	78
4.4.1	Konstruktion der Mutanten	78
4.4.2	Untersuchung der Entwicklungs-Phänotypen der Mutanten von MXAN4557	79
4.4.3	Untersuchung der Sporulation	80
4.4.4	Untersuchung der Motilitäts-Phänotypen	81
4.4.5	Transkriptionelle Regulation der Kinase MXAN4557.....	82
4.4.6	Transkriptionelle Regulation von Marker-Genen	82
4.4.7	Produktion von Marker-Proteinen.....	84
4.4.8	Methylierung von FrzCD	85
4.4.9	Genetischer Kontext von <i>MXAN4557</i>	86
4.4.10	Charakterisierung benachbart kodierter Proteine.....	87
4.5	Charakterisierung von Mutanten der Ser/Thr-Proteinkinase MXAN6570	89

4.5.1	Konstruktion der Mutanten	89
4.5.2	Untersuchung der Entwicklungs-Phänotypen der Mutanten von MXAN6570	89
4.5.3	Untersuchung der Sporulation	91
4.5.4	Untersuchung der Motilitäts-Phänotypen	92
4.5.5	Transkriptionelle Regulation der Kinase MXAN6570.....	92
4.5.6	Transkriptionelle Regulation von Marker-Genen	93
4.5.7	Produktion von Marker-Proteinen.....	95
4.5.8	Methylierung von FrzCD	96
4.5.9	Genetischer Kontext von <i>MXAN6570</i>	97
4.5.10	Charakterisierung benachbart kodierter Proteine.....	97
4.6	Konstruktion und Charakterisierung von Doppelmutanten	98
4.6.1	Konstruktion der Mutanten	98
4.6.2	Untersuchung der Entwicklungs-Phänotypen.....	99
4.7	Charakterisierung weiterer Mutanten	99
4.7.1	Konstruktion der Mutanten	100
4.7.2	Untersuchung der Entwicklungs-Phänotypen von Insertionsmutanten anderer Ser/Thr-Kinasen.....	100
4.7.3	Untersuchung der Entwicklungs-Phänotypen von Deletionsmutanten anderer Ser/Thr-Kinasen und eines TonB-abhängigen Rezeptors.....	101
4.8	Überproduktion der Kinasen und anderer Proteine in <i>Escherichia coli</i>	102
4.8.1	Überproduktion von MXAN6570 (Ser/Thr-Proteinkinase).....	103
4.8.2	Überproduktion von MXAN6571 (FHA-Domänen-Protein)	104
5	Diskussion	105
5.1	Reinigung von CsgA aus <i>Myxococcus xanthus</i>	105
5.2	Komplementation der <i>csgA</i> -Mutante	106
5.3	Charakterisierung von Mutanten der Kinase MXAN4557 und deren mögliche Funktion	107
5.4	Charakterisierung von Mutanten der Kinase MXAN6570 und deren mögliche Funktion	112
5.5	Zusammenfassung und Ausblick	115
6	Literaturverzeichnis.....	117

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
LB	Luria-Bertani-Medium
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

1 Zusammenfassung

Die Fähigkeit von *Myxococcus xanthus*, zur Bildung von Fruchtkörpern und Myxosporen ist unter anderem vom Austausch interzellulärer Signale abhängig. Das C-Signal spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Die Erkennung dieses 17 kDa großen Proteins (CsgA) ist abhängig von direktem Zell-Zell-Kontakt, weshalb ein Rezeptor in der äußeren Membran vermutet wird, über den das Signal über die Zellhülle hinweg ins Zytoplasma weitergeleitet wird, wo es die Expression zahlreicher für die Entwicklung notwendiger Gene anschaltet. Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Proteinen, die an der Erkennung und Weiterleitung des C-Signals beteiligt sind, insbesondere des bislang unbekanntes CsgA-Rezeptors.

CsgA sollte zunächst als natives Protein gereinigt werden, um es für die Identifizierung seiner Interaktionspartner zu verwenden. Hierzu wurde versucht, CsgA mit N- und C-terminalen Affinitäts-Tags in *M. xanthus* zu produzieren. Dies gelang mit einem N-terminalen His-Tag, und mit diesem Konstrukt wurde die *csgA*-Mutante erfolgreich komplementiert.

Es gibt Hinweise darauf, daß Ser/Thr-Proteinkinasen an der Weiterleitung des C-Signals beteiligt sein könnten. Aufgrund einer bioinformatischen Analyse wurden für ein Mutagenese-Screening mehrere Ser/Thr-Proteinkinasen ausgewählt, die in möglichen Transkriptionseinheiten mit Proteinen der inneren und äußeren Membran kodiert werden. Durch Deletionsmutagenese dieser Kandidaten konnten zwei Kinasen (MXAN4557 und MXAN6570) identifiziert werden, die essentiell für die Fruchtkörperbildung sind. Ihre Inaktivierung führte zu einem kompletten Verlust der Fähigkeit zur Aggregation und Sporulation. MXAN4557 wird mit einem TonB-abhängigen Rezeptor ko-transkribiert und liegt in Nachbarschaft zu einer Ser/Thr-spezifischen Phosphatase. Diese beiden Proteine sind jedoch nicht essentiell für die Entwicklung. Die Kinase MXAN6570 bildet eine Transkriptionseinheit mit einem Protein, welches eine FHA-Domäne trägt und ebenfalls nicht für die Entwicklung notwendig ist.

Die Analyse charakteristischer Entwicklungsmarker in den Mutanten der beiden Kinasen zeigte, daß frühe Entwicklungsprozesse nicht beeinträchtigt sind und deutet darauf hin, daß beide Proteine downstream des C-Signals und vor dem Verzweigungspunkt von Aggregation und Sporulation essentiell für das Fortschreiten der Entwicklung sind.

2 Einleitung

Myxobakterien sind Gram-negative, stäbchenförmige Bodenmikroorganismen, welche zur Ordnung Myxococcales der δ -Proteobakterien gezählt werden. Die Zellen erreichen eine Länge von bis zu 15 μm und einen Durchmesser von bis zu 1,2 μm . Fast alle Vertreter der chemoorganotrophen Myxobakterien leben strikt aerob. Die einzige Ausnahme bildet *Anaeromyxobacter dehalogenans* (Sanford et al., 2002). Charakteristisch für Myxobakterien, welche keine Flagellen besitzen, ist außerdem ihre gleitende Fortbewegung auf Oberflächen. Myxobakterien sekretieren eine Vielzahl an Exoenzymen und anderen antibiotisch wirksamen Substanzen, mit denen sie Mikroorganismen töten und lysieren, um sie als Nahrungsquellen zu verwerten (Hart & Zahler, 1966). Dies erklärt ihr bemerkenswert hochentwickeltes „soziales“ Verhalten, welches bei Nahrungsmangel ausgelöst wird und in der Bildung eines Fruchtkörpers und der Differenzierung zu Myxosporen endet, die bei der Verfügbarkeit von Nährstoffen wieder gemeinsam auskeimen und der Population einen entscheidenden Vorteil verschaffen (Reichenbach, 1999).

Das Genom des Modellorganismus *Myxococcus xanthus* wurde vollständig sequenziert. Es hat eine Größe von 9,14 Millionen Basenpaaren und kodiert für 7331 Gene. *M. xanthus* ist genetisch manipulierbar und für viele etablierte Methoden zugänglich, was diesen Organismus zu einem idealen System für die Untersuchung dieser komplexen Prozesse in Myxobakterien macht.

2.1 Gleitende Fortbewegung von *Myxococcus xanthus*

Da Myxobakterien keine Flagellen besitzen, können sie sich nicht schwimmend in flüssigem Milieu fortbewegen. Stattdessen bewegen sie sich auf festen Oberflächen entlang ihrer Längsachse gleitend fort, wobei sie eine Geschwindigkeit von bis zu 6 μm pro Minute erreichen (Spormann & Kaiser, 1995). In Abständen von etwa sieben Minuten wechseln die Organismen ihre Zellpolarität, sodaß das Vorderende zum Hinterende wird und umgekehrt. Damit geht eine Änderung ihrer Bewegungsrichtung einher (Sliusarenko et al., 2007). Die Häufigkeit dieser Richtungswechsel wird durch das chemosensorische Frz-Transduktionssystem kontrolliert. Es ist das einzige bekannte chemosensorische System in *M. xanthus*, welches die Frequenz der Zellrichtungswechsel beeinflusst (Bustamante et al., 2004). Die Frz- („frizzy“) Proteine

besitzen Sequenzhomologien zum Che-Transduktionssystem aus *Escherichia coli* (McBride et al., 1989). Seine wichtigsten Komponenten sind das cytoplasmatische methyl-akzeptierende chemosensorische Protein FrzCD und die Histidin-Proteinkinase FrzE (Ward & Zusman, 1999). Die Methylierung von FrzCD reduziert die Häufigkeit der Wechsel der Bewegungsrichtung. Analysen von Frz-Mutanten zeigten, daß das Frz-System essentiell für die Ausbildung von Fruchtkörpern ist (Zusman, 1982).

Bei der Analyse von Mutanten, die Defekte in ihrer gleitenden Bewegung zeigen und sich somit nicht auf einer Oberfläche ausbreiten können, wurden zwei genetisch distinkte Systeme identifiziert, welche die Bewegung steuern – das A-System („adventurous“) und das S-System („social“) (Hodgkin & Kaiser, 1979; Hodgkin & Kaiser, 1979).

S-Mutanten bewegen sich nur mithilfe des A-Systems. Sie bilden kleinere Kolonien als der Wildtyp, an deren Rand nur einzelne Zellen, jedoch keine Zellgruppen zu finden sind (Kaiser, 2003). Weiterhin sind Schleimspuren am Kolonierand zu beobachten (Wolgemuth et al., 2002). An beiden Zellpolen konnten Strukturen („nozzle-like structures“) elektronenmikroskopisch identifiziert werden, welche möglicherweise Schleim sekretieren. Ein Modell besagt, daß dieser Schleim in einer dehydratisierten Form in diese Strukturen eingeleitet wird, anschließend durch Zufuhr von Wasser anquillt und ausgestoßen wird. Dadurch würde eine Schubkraft entstehen, welche der Zelle die Vorwärtsbewegung ermöglicht (Wolgemuth, et al., 2002). Die molekularen Zusammenhänge sind jedoch noch unbekannt. Einem anderen Modell zufolge dient der Schleim nur als Gleitmittel, um die Reibung zwischen Zelle und Oberfläche zu minimieren. Die eigentliche Bewegung würde durch spezielle Adhäsions-Komplexe („focal adhesion complexes“) vermittelt. Motor-Komplexe verknüpfen die extrazellulären Adhäsions-Komplexe mit dem Zytoskelett. Es entsteht eine Rotation der Zelle um ihre Längsachse, und die Zelle bewegt sich schraubenförmig nach vorne (Mignot, 2007; Mignot et al., 2007).

A-Mutanten, welche sich mithilfe des S-Systems fortbewegen, bilden am Rand einer Kolonie lange Fortsätze aus Gruppen von sich gemeinsam bewegenden Zellen. Es sind keine einzelnen Zellen zu beobachten. Typ-IV-Pili sind unipolar lokalisiert und essentiell für die S-Bewegung, da Mutanten ohne Typ-IV-Pili das S-Bewegungssystem nicht ausbilden können (Wu & Kaiser, 1995). Die Kraft, aus der die Bewegung resultiert, wird dadurch generiert, daß sich ein Typ-IV-Pilus assembliert und an eine feste

Oberfläche anheftet. Danach erfolgt die Disassemblierung des Pilus, wodurch die Zelle nach vorne gezogen wird (Skerker & Berg, 2001). Das S-System ist weiterhin auf extrazelluläre Matrix-Fibrillen angewiesen, welche aus Polysacchariden und Proteinen bestehen und die ganze Zelloberfläche umhüllen. Zellen können mit Typ-IV-Pili an die extrazelluläre Matrix einer anderen Zelle binden und sich durch deren Retraktion vorwärts ziehen (Li et al., 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Mutanten mit einem Defekt in der Synthese des Lipopolysaccharid O-Antigens ebenfalls nicht zur S-Bewegung in der Lage sind, obwohl sie Typ-IV-Pili besitzen (Bowden & Kaplan, 1998).

2.2 Lebenszyklus und Entwicklung von *Myxococcus xanthus*

Der Lebenszyklus von Myxobakterien, und somit auch von *M. xanthus*, besteht aus zwei Phasen. Bei ausreichender Versorgung mit Nährstoffen wächst *M. xanthus* vegetativ durch Zellteilung und ernährt sich kooperativ in Schwärmen, was bei der enzymatischen Lyse anderer Mikroorganismen von großem Vorteil ist, da die sekretierten Exoenzyme in wesentlich höherer Konzentration vorliegen. Unter limitierenden Bedingungen wird bei ausreichend hoher Zelldichte ein komplexes Entwicklungsprogramm eingeleitet, welches in der Bildung eines Fruchtkörpers und der Differenzierung von Myxosporen seinen Abschluß findet.

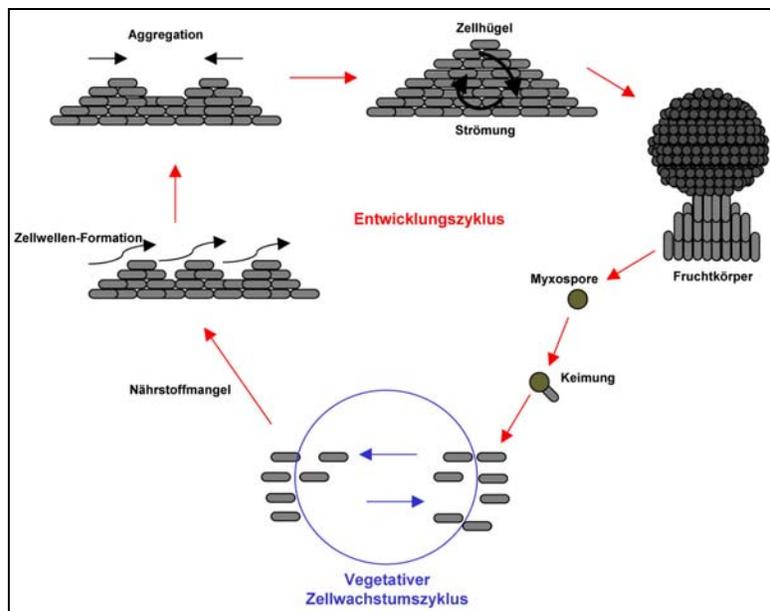


Abbildung 1: Lebenszyklus von *M. xanthus*. Die schwarzen Pfeile zeigen die Bewegungsrichtung der Zellen an.

In Abbildung 1 ist der Lebenszyklus von *M. xanthus* schematisch dargestellt. Im folgenden soll der Entwicklungszyklus näher erläutert werden. Etwa vier Stunden nach Beginn des Hungerzustands wird das expansive Schwärmen eingestellt und die Zellen beginnen mit der Bildung von Zellwellen („rippling“), was die Bewegung der Zellen synchronisiert und die Grundlage für die spätere Fruchtkörperbildung darstellt (Shimkets & Kaiser, 1982). Danach folgt allmählich die Bewegung der Zellen hin zu Aggregationszentren. Die Bildung dieser Aggregate hängt von fortwährendem Nahrungsmangel und der Fähigkeit zur gleitenden Bewegung ab. Durch Eintreten weiterer Zellen wachsen die Aggregationszentren an und werden zu Hügeln, in denen sich die Zellen weiter in kreisenden Bewegungen fortbewegen (Kaiser, 1999). Wenn ausreichend viele Zellen ihren Weg in die Aggregate gefunden haben, kommt es zur Bildung eines Fruchtkörpers. Diese Fruchtkörper sind artspezifisch. Im Fall von *M. xanthus* umfaßt ein Fruchtkörper etwa 100.000 Zellen, hat eine kugelförmige, gewölbte Gestalt und besitzt keinen Stiel (Quinlan & Raper, 1965). Nur maximal 10 Prozent der anfangs hungernden Population differenzieren sich nun innerhalb des Fruchtkörpers zu Myxosporen (Kim & Kaiser, 1990). Diese Dauerformen sind resistent gegenüber lebensfeindlichen Bedingungen wie Hitze und Austrocknung, und es konnte gezeigt werden, daß sie für mindestens 20 Jahre keimfähig bleiben. Nachdem die Umweltbedingungen wieder günstig sind, keimen die Sporen aus, d.h. sie differenzieren sich zu vegetativen Zellen zurück. Da alle Sporen eines Fruchtkörpers zur gleichen Zeit auskeimen, ist es den Zellen möglich, gemeinsam zu schwärmen und sich gemeinsam und effizient mit Nährstoffen zu versorgen, sodaß sie dadurch einen entscheidenden Vorteil gewinnen (Reichenbach, 1999).

Nicht alle Zellen einer hungernden Population sind direkt an der Bildung eines Fruchtkörpers beteiligt. Etwa 10 Prozent der Zellen bleiben außerhalb der Aggregationszentren. Diese „peripheral rods“ unterscheiden sich physiologisch von vegetativen Zellen und verhindern möglicherweise die Kolonisierung der Fruchtkörper durch andere Mikroorganismen (O'Connor & Zusman, 1991). Über 80 Prozent der anfangs hungernden Zellen lysieren während des Entwicklungsprozesses (Wireman & Dworkin, 1977). Die genaue Funktion dieser Autolyse ist nicht bekannt, man vermutet jedoch, daß sie Proteine und Energie für die überlebenden Zellen bereitstellt, welche für die Fruchtkörperbildung benötigt wird.

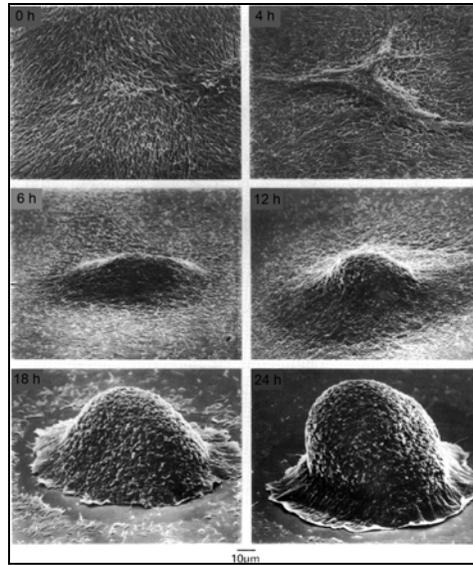


Abbildung 2: Entwicklung von *M. xanthus*. Links oben sind Zeitpunkte angegeben (0 Stunden stellt den Beginn des Hungerzustands dar). Nach 6 Stunden erkennt man ein frühes Aggregationszentrum, nach 24 Stunden den fertig ausgebildeten Fruchtkörper.

Die Bildung eines Fruchtkörpers stellt einen sehr komplexen Prozess dar, bei dem die Zellen zeitlich und räumlich sehr eng miteinander kooperieren müssen. Kommunikation zwischen den Zellen ist unabdingbar für eine erfolgreiche Entwicklung zum Fruchtkörper und die anschließende Differenzierung zu Myxosporen. In *M. xanthus* wurden zahlreiche Mutanten beschrieben, welche die Fähigkeit zur Fruchtkörperbildung verloren haben. Viele dieser Mutanten lassen sich komplementieren, indem sie zusammen mit dem Wildtyp oder einer anderen Mutante entwickelt wurden (Hagen et al., 1978). Hieraus ließen sich die Mutanten in sechs Klassen einteilen, und es wurde vermutet, daß jede Mutante aus einer dieser Klassen einen Defekt in der Bildung einer spezifischen extrazellulären Komponente zeigt, die für die Entwicklung essentiell ist (Chang & Dworkin, 1994; Downard et al., 1993; LaRossa et al., 1983). Eine dieser Klassen ist nicht zur Bildung extrazellulärer Fibrillen fähig, welche zur Entwicklung notwendig sind, weshalb die Phänotypen in dieser Klasse von Mutanten vermutlich auf einen Motilitäts-Defekt zurückzuführen sind (Yang et al., 2000). Die fünf verbleibenden extrazellulären Komponenten der verschiedenen Komplementationsklassen wurden als A-, B-, C-, D- und E-Signal bezeichnet.

Das B-, D- und E-Signal sind essentiell für die ersten fünf Stunden der Entwicklung. Ihre Funktion und ihre biochemische Natur sind allerdings noch unbekannt.

Das A-Signal fungiert als Sensor zur Bestimmung der Zelldichte innerhalb der ersten vier Stunden nach Beginn des Hungerzustands (Kaiser, 2004). Im Gegensatz zu den meisten anderen Gram-negativen Bakterien, welche mittels „quorum sensing“ auf der Grundlage von Homoserinlaktonen, Tetrahydrofuran-Derivaten (autoinducer 2) und spezifischen Peptiden kommunizieren (Bassler, 2002; Bassler & Losick, 2006), besteht das A-Signal aus einem Gemisch von Aminosäuren und kleinen Peptiden in Konzentrationen von 10 bis 50 μM , welche durch extrazelluläre Proteasen gebildet werden (Kaplan, 2003). An der Synthese des A-Signals scheinen mehrere Komponenten beteiligt zu sein – ein Zwei-Komponenten-Regulationssystem bestehend aus *AsgA* und *AsgD* (Cho & Zusman, 1999; Plamann et al., 1995), das DNA-Bindeprotein *AsgB* (Plamann et al., 1994) und der Sigma-Faktor *RpoD* (Davis et al., 1995). Mutationen in den *asg*-Genen reduzieren die Produktion des A-Signals auf fünf bis zehn Prozent, können jedoch von Wildtyp-Zellen oder Mutanten einer anderen Klasse extrazellulär komplementiert werden. Dieser Syntheseweg wird bei Nahrungsmangel durch die *RelA*-abhängige Akkumulierung der intrazellulären Signalmoleküle Guanosinpenta- und -tetraphosphat (p)ppGpp angeschaltet (Harris et al., 1998) und reguliert vermutlich die Expression derjenigen Gene, welche an der Produktion und Sekretion der A-Signal-Proteasen beteiligt sind (Kaplan, 2003).

Unter den oben erwähnten Signalen wird das C-Signal am spätesten aktiv. Es ist sechs Stunden nach Eintritt in die Hungerphase essentiell für das Voranschreiten der Entwicklung (Kroos & Kaiser, 1987). Es wird durch die Expression des *csgA*-Gens gebildet, und *csgA*-Mutanten sind nicht zu rippling, Aggregation und Sporulation fähig (Shimkets et al., 1983). Außerdem ist die Expression von Genen, die normalerweise nach 6 Stunden angeschaltet werden, stark reduziert oder unterbleibt komplett (Kroos & Kaiser, 1987). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß das C-Signal die Expression dieser Gene konzentrationsabhängig induziert (Kim & Kaiser, 1991; Kruse et al., 2001; Li et al., 1992). Mittlere Konzentrationen des C-Signals induzieren die Aggregation und die Expression der frühen C-Signal-abhängigen Gene, hohe Konzentrationen induzieren die Sporulation und die Expression der späten C-Signal-abhängigen Gene. Die Konzentration des C-Signals steigt während der Entwicklung stetig an und sichert

auf diese Weise die korrekte zeitliche Koordination dieses Prozesses. Da die Übertragung des Signals von direktem Zell-Zell-Kontakt abhängig ist, wird so auch die räumliche Koordination der Entwicklung sichergestellt (Kaiser, 2004; Kruse, et al., 2001).

CsgA kommt in zwei Formen vor – als Protein mit einer molekularen Masse von 25 kDa (p25), welches der aus dem *csgA*-Gen abgeleiteten Sequenz entspricht, und als Protein mit einer molekularen Masse von etwa 17 kDa (p17), welches dem C-terminalen Teil von p25 entspricht (Kruse, et al., 2001; Lobedanz & Søgaard-Andersen, 2003). Weiterhin entspricht p17 höchstwahrscheinlich dem ursprünglich aus *M. xanthus* gereinigten C-Faktor, welcher von *csgA* kodiert wird und eine Größe von etwa 17 kDa aufweist. Dafür spricht auch, daß sich Aggregation und Sporulation in einer hungernden *csgA*-Mutante durch äußerliche Zugabe des C-Faktors komplementieren lassen (Kim & Kaiser, 1990; Kim & Kaiser, 1990; Shimkets & Rafiee, 1990). Bei der Reinigung von CsgA konnte gezeigt werden, daß die Fraktionen, welche p17 enthalten, eine wesentlich höhere C-Signal-Aktivität nach äußerlicher Zugabe zu *csgA*-Mutanten aufweisen, als die Fraktionen mit p25. Dies deutet darauf hin, daß p17 der C-Faktor ist. In vegetativen Zellen ist ausschließlich p25 zu detektieren, jedoch akkumulieren beide Proteine während der Entwicklung. Die Expression von *csgA* führt zunächst zur Produktion von p25, welches durch die kürzlich identifizierte Protease PopC gespalten und zu p17 prozessiert wird (Rolbetzki, 2007). Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß p25 und p17 in der äußeren Membran lokalisiert sind (Lobedanz & Søgaard-Andersen, 2003). Im Gegensatz dazu wurde allerdings auch vorgeschlagen, daß p25 als ein Enzym fungiert, welches das C-Signal generiert. CsgA zeigt Sequenzhomologie zu Proteinen der Familie der kurzkettigen Alkoholdehydrogenasen (SCAD) (Baker, 1994; Lee et al., 1995). Enzyme der SCAD-Familie enthalten zwei konservierte Motive, die beide auch in p25 vorhanden sind. Nahe am N-Terminus findet man eine konservierte NAD(P)-Bindestelle und weiter C-terminal das konservierte Motiv des katalytischen Zentrums (Oppermann et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, daß p25 *in vitro* NAD⁺ bindet (Lee, et al., 1995). Ein in *E. coli* produziertes MalE-p25-Fusionsprotein zeigt C-Signal-Aktivität, es ist also in der Lage, den Entwicklungsdefekt von *csgA*-Mutanten zu komplementieren. Jedoch geht diese Fähigkeit zur Komplementation verloren, sobald man Aminosäuren in der NAD(P)-Bindestelle oder dem katalytischen Zentrum austauscht. Außerdem reduziert sich die Fähigkeit zur Bindung von NAD⁺ in p25 nach

Substitutionen in der NAD(P)-Bindestelle (Lee, et al., 1995). Eine enzymatische Aktivität von p25 konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden. Die C-Signal-Aktivität von p17 ist höher als die von p25, obwohl die NAD(P)-Bindestelle in p17 nicht vorhanden ist und p17 kein NAD⁺ binden kann (Lobedanz & Søgaard-Andersen, 2003). Diese Daten legen nahe, daß p17 der C-Faktor bzw. das C-Signal ist.

Eine Übersicht über den Transduktionsweg des C-Signals ist in Abbildung 3 aufgezeigt. Wie bereits erwähnt, führt Nahrungsmangel zur verstärkten Expression von *csgA* und zur Produktion von p25, welches anschließend von PopC gespalten und zu p17 prozessiert wird. Der Rezeptor des C-Signals ist bisher unbekannt. Der Response-Regulator FruA ist das erste charakterisierte Protein im Signaltransduktionsweg, welches downstream des postulierten CsgA-Rezeptors aktiv wird (Ellehaug et al., 1998). Die Transkription von *fruA* wird vom A- und E-signal induziert (Ogawa et al., 1996). Mutanten sind nicht zur Aggregation und Sporulation fähig und zeigen Defekte in der Expression C-Signal-abhängiger Gene (Ellehaug, et al., 1998; Horiuchi et al., 2002). Die zugehörige Histidin-Proteinkinase, welche FruA durch Phosphorylierung aktiviert, wurde bisher nicht identifiziert. Weiterhin ist die Expression von *fruA* abhängig von MrpC2, welches durch proteolytische Spaltung aus MrpC hervorgeht. Diese Spaltung wird durch die LonD-Protease katalysiert, was in Abbildung 5 gezeigt wird (Nariya & Inouye, 2006). Downstream von FruA verzweigen sich die Transduktionswege. Ein Weg führt zur Methylierung von FrzCD, was das Bewegungsverhalten der Zellen ändert und schließlich zur Aggregation führt (Søgaard-Andersen & Kaiser, 1996). Dieser Prozess wurde oben bereits näher beschrieben. Ein anderer Weg führt zur Expression des *devRS*-Operons und weiterer später C-Signal-abhängiger Gene und schließlich zur Sporulation (Kroos et al., 1990; Søgaard-Andersen et al., 1996). Einen weiteren Transduktionsweg findet man upstream von FruA. Man nimmt an, daß die Erkennung des C-Signals das *act*-Operon aktiviert und zu einer verstärkten Transkription von *csgA* führt (Gronewold & Kaiser, 2002; Kim & Kaiser, 1991).

Es konnten jedoch noch weitere Gene identifiziert werden, die für den Entwicklungsprozess essentiell sind. Diese liegen auf verschiedenen Seitenwegen innerhalb des Signaltransduktions-Netzwerks und führen vermutlich ebenfalls zur Phosphorylierung von FruA. Eines dieser Gene ist *sdeK*. Es kodiert für eine Histidin-Proteinkinase, deren genaue Funktion jedoch noch unbekannt ist. Eine Deletion von

Komponenten (Ferguson & Deisenhofer, 2002). Diese sind in Abbildung 4 gezeigt. Der TonB-abhängige Rezeptor ist in der äußeren Membran lokalisiert und besteht aus zwei Domänen – einer C-terminalen β -Barrel-Domäne, welche von einer N-terminalen Plug-Domäne verschlossen wird. Für den Transport der Substrate ist eine Interaktion des Rezeptors mit TonB nötig, einem periplasmatischen Protein, welches N-terminal in der inneren Membran verankert ist und über die TonB-Box, einem Heptapeptid am C-terminalen Ende seiner N-terminalen Extension, mit dem Rezeptor interagiert (Sean Peacock et al., 2005). Für den erfolgreichen Transport des Substrates muß der Rezeptor energetisiert werden, was durch die Interaktion von TonB mit dem ExbBD-Komplex in der Cytoplasmamembran gewährleistet wird (Braun & Braun, 2002). Der Rezeptor benötigt TonB jedoch nicht nur für seine Transportfunktion, sondern auch für die Weiterleitung des Signals über die Membran hinweg (Braun, et al., 2003). TonB-abhängige Rezeptoren benötigen für die Weiterleitung eines Signals eine N-terminale Extension, die in das Periplasma hinein reicht und mit einem anti-Sigma-Faktor der inneren Membran interagiert (Braun, et al., 2003; Schalk et al., 2004). Das Signal wird anschließend an einen cytoplasmatischen ECF-Sigma-Faktor weitergeleitet, welcher die Transkription entsprechender Zielgene initiiert (Braun & Endriss, 2007; Koebnik, 2005). Bisher wurde nur ein einziges System beschrieben, in dem ein TonB-abhängiger Rezeptor keine Transportfunktion besitzt, sondern ausschließlich für die Erkennung und Weiterleitung eines Signals verantwortlich ist. Der TonB-abhängige Rezeptor PrhA in *Ralstonia solanacearum* erkennt die Oberfläche einer Pflanzenzelle, was zur Initiierung einer Signaltransduktions-Kaskade führt, an der ein anti-Sigma-Faktor und ein ECF-Sigma-Faktor beteiligt sind, und die schließlich die Expression verschiedener Pathogenitätsfaktoren einleitet (Brito et al., 2002).

In den meisten Fällen werden die Gene für den TonB-abhängigen Rezeptor, den anti-Sigma-Faktor und den ECF-Sigma-Faktor auf demselben Operon kodiert, oder es liegen nur wenige offene Leseraster zwischen ihnen (Koebnik, 2005). Diese genomische Organisation ist im Fall der 20 TonB-abhängigen Rezeptoren in *M. xanthus* nicht zu finden. Darüberhinaus zeigen die N-terminalen Extensionen, welche in 13 TonB-abhängigen Rezeptoren von *M. xanthus* vorhanden sind, keine Sequenzhomologien zu den Extensionen der in anderen Gram-negativen Bakterien charakterisierten Proteine auf. Das Genom von *M. xanthus* kodiert für 37 ECF-Sigma-Faktoren, von denen 25 in Nachbarschaft zu einem anti-Sigma-Faktor kodiert werden.

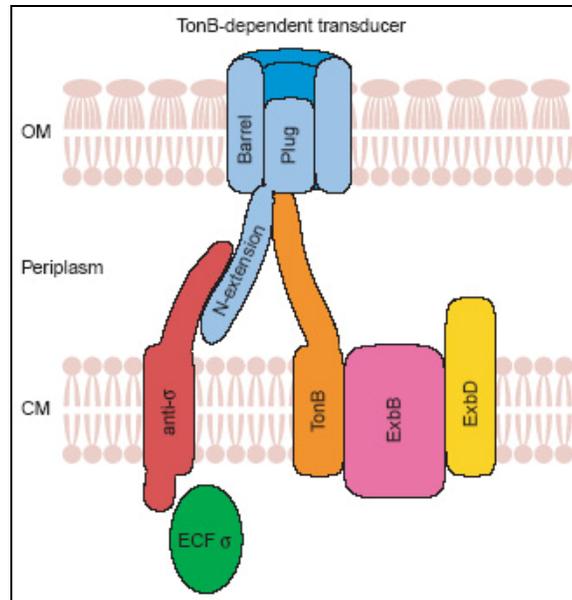


Abbildung 4: Organisation von TonB-abhängigen Regulationssystemen. Ein TonB-abhängiger Rezeptor der äußeren Membran (blau) wird durch den TonB-ExbBD-Komplex energetisiert (orange, pink, gelb). Die Signalweiterleitung erfolgt über einen Anti-Sigma-Faktor (rot) auf einen ECF-Sigma-Faktor (grün). OM steht für die äußere Membran, CM für die innere Membran. (Koebnik, 2005)

2.4 Serin/Threonin-Proteinkinasen

Die Weiterleitung von Signalen erfolgt in Eukaryoten und Prokaryoten oft durch Phosphorylierung von Proteinen, welche dadurch eine Konformationsänderung erhalten und somit aktiviert werden. Der Transfer von Phosphatgruppen und deren Bindung an Aminosäurereste der verschiedensten Proteine wird durch Kinasen katalysiert. In Bakterien und Archaeen erfolgen die Adaption an veränderte Umweltbedingungen und die damit einhergehenden Signaltransduktions-Prozesse häufig über Zwei-Komponenten-Regulationssysteme, die aus einer Histidin-Proteinkinase und einem Response-Regulator bestehen (Dutta et al., 1999). Hingegen waren Serin/Threonin-Proteinkinasen (STPK) ursprünglich nur aus eukaryotischen Organismen bekannt. Sie zeigen große Unterschiede in ihrer Sequenz und Struktur gegenüber den Histidin-Proteinkinasen. In den vergangenen Jahren wurden STPK jedoch vermehrt auch in prokaryotischen Organismen, darunter auch in *M. xanthus* (Munoz-Dorado et al., 1991) und *Streptomyces*-Spezies (Matsumoto et al., 1994), identifiziert (Han & Zhang, 2001; Kennelly, 2002). In einer Vielzahl von Prozessen

konnte eine entscheidende Beteiligung von STPK gezeigt werden (Galyov et al., 1993; Nadvornik et al., 1999; Udo et al., 1996).

Eine Vielzahl der bekannten STPK wird zur Gruppe der RD-Proteinkinase gezählt. Deren Regulation erfolgt durch Phosphorylierung von Serin- oder Threonin-Resten in der Aktivierungs-Domäne der Kinasen (Johnson et al., 1996). Die Kinasen, welche in der Aktivierungs-Domäne phosphoryliert werden, zeigen ein charakteristisches RD-Motiv in ihrem katalytischen Zentrum und einen stark konservierten Threonin-Rest in ihrer Aktivierungs-Domäne (Krupa & Srinivasan, 2005). Es konnte gezeigt werden, daß an diesem Threonin-Rest die Phosphorylierung erfolgt (Hanks et al., 1988). Daraufhin erfährt die Kinase eine Konformationsänderung, was das katalytische Zentrum für das entsprechende Substrat zugänglich macht. Einige Kinasen besitzen zwei hochkonservierte Threonin-Reste, und man vermutet, daß dann eine mehrfache Phosphorylierung zur Aktivierung der Kinasen, wie im Fall von PnkB aus *Mycobacterium tuberculosis*, führt (Boitel et al., 2003).

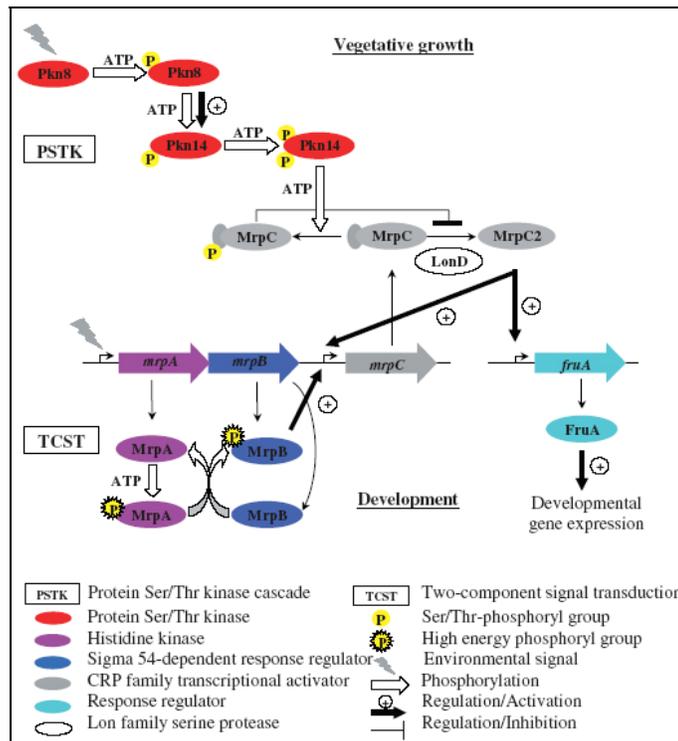


Abbildung 5: Modell der Regulation von MrpC und der Expression von fruA. Eine Phosphorylierungs-Kaskade führt bei vegetativem Wachstum zur Aktivierung von Pkn14 (rot) und inhibiert somit die Spaltung von MrpC durch LonD (grau). Die Expression von fruA (blau) unterbleibt. (Nariya & Inouye, 2006)

Das Genom von *M. xanthus* kodiert für 99 STPK, jedoch wurden bisher nur 16 davon in der Literatur beschrieben bzw. benannt. Pkn1 ist für die Sporulation notwendig und wird an einem Serin- und einem Threonin-Rest phosphoryliert (Munoz-Dorado, et al., 1991). Die Ser/Thr-Proteinkinase Pkn2 reguliert die Aktivität von β -Laktamase als Antwort auf ein externes Signal (Udo et al., 1995). Pkn3 ist eine STPK, die nicht näher charakterisiert wurde. Jedoch konnte gezeigt werden, daß Pkn4 für die Aktivierung der 6-Phosphofruktokinase verantwortlich ist, indem es diese an Thr226 während der Entwicklung phosphoryliert. Pkn4 ist für die Sporulation notwendig (Nariya & Inouye, 2002). Die beiden STPK Pkn5 und Pkn6 werden divergent kodiert. Mutanten von Pkn5 entwickeln schneller, solche von Pkn6 entwickeln langsamer als der Wildtyp. Möglicherweise fungiert die membrangebundene Kinase Pkn6 als Sensor für einen externen Stimulus (Zhang et al., 1996). Über Pkn7 ist wenig bekannt. Diese Kinase wird in einem vermutlichen Operon zusammen mit Pkn11 kodiert, welches ebenfalls noch nicht näher charakterisiert wurde. Hingegen sind die Kinasen Pkn8 und Pkn14 bereits gut charakterisiert. Sie sind essentiell für die koordinierte zeitliche Regulation der Aggregation, indem sie MrpC während des vegetativen Wachstums negativ regulieren. Während der frühen Aggregation werden 25 Aminosäure-Reste am N-Terminus von MrpC durch die Protease LonD proteolytisch gespalten, und es entsteht MrpC2 (Nariya & Inouye, 2006). Dieses bindet upstream des *fruA*-Promotors und aktiviert dessen Transkription (Ueki & Inouye, 2003). Jedoch wird MrpC während der vegetativen Phase durch Pkn14 phosphoryliert, was die Spaltung durch LonD inhibiert. Pkn14 ist Teil einer Kaskade von Phosphorylierungen und wird durch Pkn8 aktiviert (Nariya & Inouye, 2006). Dies ist in Abbildung 5 gezeigt. Eine weitere beschriebene STPK in *M. xanthus* ist Pkn9, welche während der frühen Entwicklung positiv reguliert wird. Pkn9 ist für die Synthese mehrerer Membranproteine und eine vollständige Aggregation und Sporulation notwendig (Hanlon et al., 1997). Pkn10, Pkn11, Pkn12 und Pkn13 sind nicht im Detail untersucht. Zwei weitere STPK sind PktA5 und PktB8, welche in Nachbarschaft zum *espAB*-Lokus kodiert und durch Interaktion mit EspA und EspB an der zeitlichen Koordination der Fruchtkörperbildung beteiligt und für die Sporulation notwendig sind (Stein et al., 2006).

2.5 Ziele dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation des bislang unbekanntem Rezeptors von CsgA und weiterer für die Weiterleitung des C-Signals notwendiger Proteine. Hierfür wurden verschiedene Ansätze gewählt. Zum einen sollte p17 nativ aus *M. xanthus* gereinigt und zur Identifikation seiner Interaktionspartner verwendet werden. Zum anderen wurde überlegt, welche Komponenten notwendig sind, um ein Signal an der Zelloberfläche zu erkennen und über die Zellhülle hinweg ins Cytoplasma zu leiten. Ausgewählte Kandidaten wurden inaktiviert und die Mutanten untersucht.

Zur Erkennung eines Signals an der Zelloberfläche (p17) bedarf es eines Rezeptors. Mögliche Kandidaten hierfür wären Proteine aus der Familie der TonB-abhängigen Rezeptoren. Bei der Analyse der genomischen Organisation der entsprechenden Gene fanden wir heraus, daß einige TonB-abhängige Rezeptoren in der Nähe von weiteren möglichen Komponenten eines solchen Signaltransduktions-Systems, wie z.B. Phosphatasen und Serin/Threonin-Proteinkinasen, kodiert werden. Deshalb wurden Gene, welche für TonB-abhängige Rezeptoren bzw. für Ser/Thr-Proteinkinasen kodieren, inaktiviert, um herauszufinden, welche Rolle diese Proteine während der Entwicklung von *M. xanthus* spielen.

Dieses Mutanten-Screening führt schließlich zur Identifikation von zwei Ser/Thr-Proteinkinasen, welche für die Fruchtkörperbildung essentiell sind. Diese und die benachbart kodierten Proteine wurden anschließend näher untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien, Chemikalien und Medien

3.1.1 Enzyme

Die verwendeten DNA-Polymerasen waren Taq-MasterMix der Firma Eppendorf (Hamburg) bzw. Pfu Ultra[®] II Fusion HS von Stratagene (Heidelberg). Weitere Enzyme, wie z.B. DNA-Ligase, alkalische Phosphatase und Restriktionsenzyme, wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen bzw. lagen den jeweiligen Kits bei.

3.1.2 Nukleotide und Plasmide

Desoxyribonukleotide wurden von Eppendorf (Hamburg) bezogen. Synthetische Oligonukleotide wurden von Sigma Genosys (Steinheim) bzw. von Thermo Electron (Ulm) hergestellt. Plasmide stammten von den Firmen Novagen (Schwalbach) und Invitrogen (Karlsruhe).

3.1.3 Chemikalien und Medien

Chemikalien und Antibiotika wurden von verschiedenen Herstellern bezogen, vor allem von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma Aldrich (Seelze). Medien für die Kultivierung von Mikroorganismen wurden gemäß den folgenden Tabellen zusammengesetzt. Die Komponenten der Kulturmedien wurden von den Firmen Difco (Heidelberg), Invitrogen (Karlsruhe), etc bestellt.

Tabelle 1: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	150 µg / mL
Chloramphenicol	50 µg / mL
Gentamycin	10 µg / mL
Kanamycin	40 µg / mL (für <i>Myxococcus xanthus</i>)

Kanamycin	100 µg / mL (für <i>Escherichia coli</i>)
Oxytetracyclin	5 µg / mL

Tabelle 2: CTT-Medium

Chemikalien pro Liter H ₂ O	Endkonzentration
10 g Casiton	1,0 %
10 mL 1,0 M Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
1 mL 1,0 M K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ (pH 7,6)	1 mM
10 mL 0,8 M MgSO ₄	8 mM

Tabelle 3: CTTYE-Medium

Chemikalien pro Liter H ₂ O	Endkonzentration
10 g Casiton	1,0 %
2 g Hefeextrakt	0,2 %
10 mL 1,0 M Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
1 mL 1,0 M K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ (pH 7,6)	1 mM
10 mL 0,8 M MgSO ₄	8 mM

Tabelle 4: Spurenelemente für *M. xanthus*. Die beschriebene Lösung ist 1000-fach konzentriert.

Chemikalien pro Liter H ₂ O	Endkonzentration
15 g Titriplex III	1,5 % (pH 7,0)
136 mg ZnCl ₂	1 mM
250 mg CuSO ₄ × 5 H ₂ O	1 mM
238 mg CoCl ₂ × 6 H ₂ O	1 mM
465 mg Na ₂ Mo ₄ × 2 H ₂ O	1 mM
169 mg MnSO ₄ × H ₂ O	1 mM
2,78 g FeSO ₄ × 7 H ₂ O	10 mM

Tabelle 5: SOC-Medium

Chemikalien pro Liter H ₂ O	Endkonzentration
20 g Trypton	2,0 %
5 g Hefeextrakt	0,5 %
584 mg NaCl	10 mM

186 mg KCl	2,5 mM
952 mg MgCl ₂	10 mM
20 mL Glukose-Lösung (50 %)	1,0 %

Tabelle 6: TP-Medium

Chemikalien pro Liter H ₂ O	Endkonzentration
15 g Hefeextrakt	1,5 %
20 g Casiton	2,0 %
2 g Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	11 mM
1 g KH ₂ PO ₄	7 mM
8 g NaCl	137 mM

Tabelle 7: TPM-Agar

Chemikalien pro Liter H ₂ O	Endkonzentration
15 g Agar	1,5 %
10 mL 1,0 M Tris-HCl (pH 7,6)	10 mM
1 mL 1,0 M K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ (pH 7,6)	1 mM
10 mL 0,8 M MgSO ₄	8 mM

Tabelle 8: CF-Agar

Chemikalien pro Liter H ₂ O	Endkonzentration
15 g Agar	1,5 %
10 mL 1,0 M Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
1 mL 1,0 M K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ (pH 7,6)	1 mM
10 mL 0,8 M MgSO ₄	8 mM
nach dem Autoklavieren durch Sterilfilter zugeben:	
15 mL 1% CTT-Medium	0,015 %
5 ml 4 % (NH ₄) ₂ SO ₄	0,02 %
5 ml 20% Natriumpyruvat	0,1 %
10 ml 20% Natriumcitrat	0,2 %

3.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

In den Versuchen dieser Arbeit wurden verschiedene Plasmide und Vektoren, Oligonukleotide, sowie unterschiedliche Bakterienstämme verwendet. Diese sind in den folgenden Tabellen aufgelistet.

Tabelle 9: Verwendete Plasmide. Die Nummer jedes Plasmids stimmt mit der laufenden Nummer des entsprechenden Stammes (*E. coli* TOP10) in den gentechnischen Aufzeichnungen überein.

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pSW101	pIntimin-Calmodulin	(Wentzel et al., 2001)
pSW102	pSW101-amb35Q	diese Arbeit
pSW103	pSW102 mit <i>npt</i>	diese Arbeit
pSW104	pSW102 mit <i>npt</i>	diese Arbeit
pSW105	<i>EcoRI-PpilA-XbaI</i> (1 kb upstream von <i>pilA</i> ; Promotor-Region) in pSWU19	diese Arbeit, (Wu & Kaiser, 1995)
pSW106	pSW105 mit <i>agIU</i> Signalpeptid-Sequenz	diese Arbeit, (White & Hartzell, 2000)
pSW107	<i>EcoRV-p25-BamHI-</i> TOPO2.1	diese Arbeit
pSW108	<i>EcoRV-p18,1-BamHI-</i> TOPO2.1	diese Arbeit
pSW109	<i>EcoRV-p17,8-BamHI-</i> TOPO2.1	diese Arbeit
pSW110	<i>SmaI-p25-BamHI-</i> TOPO2.1	diese Arbeit
pSW111	<i>SmaI-p18,1-BamHI-</i> TOPO2.1	diese Arbeit
pSW112	<i>SmaI-p17,8-BamHI-</i> TOPO2.1	diese Arbeit
pSW113	pSW105 mit <i>tgI</i> Signalpeptid-Sequenz	diese Arbeit, (Rodriguez-Soto & Kaiser, 1997)

pSW114	<i>EcoRV</i> -p25- <i>BamHI</i> pSW106	in	diese Arbeit
pSW115	<i>EcoRV</i> -p18,1- <i>BamHI</i> pSW106	in	diese Arbeit
pSW116	<i>EcoRV</i> -p17,8- <i>BamHI</i> pSW106	in	diese Arbeit
pSW117	EaeA γ -Intimin (aus pSW104) in pSW105		diese Arbeit
pSW118	<i>EcoRV</i> -p25- <i>BamHI</i> pSW113	in	diese Arbeit
pSW119	<i>EcoRV</i> -p18,1- <i>BamHI</i> pSW113	in	diese Arbeit
pSW120	<i>EcoRV</i> -p17,8- <i>BamHI</i> pSW113	in	diese Arbeit
pSW121	pSW114-Konkatamere		diese Arbeit
pSW122	pSW115-Konkatamere		diese Arbeit
pSW123	pSW116-Konkatamere		diese Arbeit
pSW124	pSW118-Konkatamere		diese Arbeit
pSW125	pSW119-Konkatamere		diese Arbeit
pSW126	pSW120-Konkatamere		diese Arbeit
pSW127	pSW117 $\Delta XbaI$ -Stelle		diese Arbeit
pSW128	pSW127 $\Delta SmaI$ -Stelle		diese Arbeit
pSW129	EaeA γ -Intimin-p25-Fusion in pSW128		diese Arbeit
pSW130	EaeA γ -Intimin-p18,1- Fusion in pSW128		diese Arbeit
pSW131	EaeA γ -Intimin-p17,8- Fusion in pSW128		diese Arbeit
pSW132	pSW114 mit AgIU-C24A		diese Arbeit
pSW133	pSW115 mit AgIU-C24A		diese Arbeit
pSW134	pSW116 mit AgIU-C24A		diese Arbeit
pSW135	pBGS18		(Spratt et al., 1986)
pSW136	<i>HindIII</i> - <i>XbaI</i> -Fragment von		diese Arbeit

	MXAN4557 in pBGS18	
pSW137	<i>HindIII-XbaI</i> -Fragment von MXAN3092 in pBGS18	diese Arbeit
pSW138	<i>HindIII-XbaI</i> -Fragment von MXAN2059 in pBGS18	diese Arbeit
pSW139	<i>HindIII-XbaI</i> -Fragment von MXAN0552 in pBGS18	diese Arbeit
pSW140	<i>HindIII-XbaI</i> -Fragment von MXAN6570 in pBGS18	diese Arbeit
pSW141	<i>HindIII-XbaI</i> -Fragment von MXAN6545 in pBGS18	diese Arbeit
pSW142	<i>HindIII-XbaI</i> -Fragment von MXAN6043 in pBGS18	diese Arbeit
pSW143	<i>NdeI-p25-AvrII</i> in pRSF Duet1 (Novagen)	diese Arbeit, Novagen (Schwalbach)
pSW144	<i>SacI-PcsgA-XbaI</i> (1 kb upstream von <i>csgA</i> ; Promotor-Region) in pSWU19	diese Arbeit, (Wu & Kaiser, 1995)
pSW145	<i>NdeI-p25-AvrII</i> ; <i>BamHI-popC-HindIII</i> in pRSF Duet1 (Novagen)	diese Arbeit, Novagen (Schwalbach)
pSW149	pET24b(+) (Novagen)	Novagen (Schwalbach)
pSW150	<i>csgA</i> (N-term. His-Tag) in pSW144	diese Arbeit
pSW151	<i>csgA</i> (N-term. Strep-Tag) in pSW144	diese Arbeit
pSW152	<i>csgA</i> (C-term. His-Tag) in pSW144	diese Arbeit
pSW153	<i>csgA</i> (C-term. Strep-Tag) in pSW144	diese Arbeit
pSW154	<i>XbaI-HindIII</i> -Fragmente von MXAN0552 in pBJ114	diese Arbeit

pSW155	<i>XbaI-HindIII</i> -Fragmente von MXAN4557 in pBJ114	diese Arbeit
pSW156	<i>XbaI-HindIII</i> -Fragmente von MXAN6043 in pBJ114	diese Arbeit
pSW157	<i>XbaI-HindIII</i> -Fragmente von MXAN6044 in pBJ114	diese Arbeit
pSW158	<i>XbaI-HindIII</i> -Fragmente von MXAN6545 in pBJ114	diese Arbeit
pSW159	<i>XbaI-HindIII</i> -Fragmente von MXAN6570 in pBJ114	diese Arbeit
pSW160	wie pSW150, mit optimierter codon-usage	diese Arbeit
pSW161	pGEX2T	GE Healthcare (München)
pSW162	<i>BamHI-p25-EcoRI</i> in pGEX2T	diese Arbeit
pSW164	pBJ114	(Julien et al., 2000)
pSW165	<i>csgA</i> (internes His-Tag 1) in pSW144	diese Arbeit
pSW166	<i>csgA</i> (internes His-Tag 2) in pSW144	diese Arbeit
pSW167	<i>csgA</i> (internes His-Tag 3) in pSW144	diese Arbeit
pSW168	<i>csgA</i> (internes His-Tag 4) in pSW144	diese Arbeit
pSW169	<i>XbaI-HindIII</i> -Fragmente von MXAN6090 in pBJ114	diese Arbeit
pSW170	<i>NdeI</i> -MXAN6570(1)-Strep-Tag- <i>NotI</i> -TOPO2.1	diese Arbeit
pSW171	<i>NdeI</i> -MXAN6570(2)-Strep-Tag- <i>NotI</i> -TOPO2.1	diese Arbeit
pSW172	<i>NdeI</i> -MXAN6571-His-Tag- <i>XhoI</i> -TOPO2.1	diese Arbeit
pSW173	<i>NdeI</i> -MXAN6570(1)-Strep-	diese Arbeit

	Tag- <i>NotI</i> in pET24b(+)	
pSW174	<i>NdeI</i> -MXAN6570(2)-Strep-Tag- <i>NotI</i> in pET24b(+)	diese Arbeit
pSW175	<i>NdeI</i> -MXAN6571-His-Tag- <i>XhoI</i> in pET24b(+)	diese Arbeit
pSW182	wie pSW170, Deletion von 28 aa N-terminal	diese Arbeit
pSW183	wie pSW171, Deletion von 28 aa N-terminal	diese Arbeit
pSW184	<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i> -Fragmente von MXAN4557-4559 in pBJ114	diese Arbeit
pSW185	<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i> -Fragmente von MXAN4562 in pBJ114	diese Arbeit
pSW186	<i>XbaI</i> - <i>HindIII</i> -Fragmente von MXAN6570-6571 in pBJ114	diese Arbeit
pSW187	<i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> -Fragmente von MXAN4559 in pBJ114	diese Arbeit
pSW188	wie pSW173, Deletion von 28 aa N-terminal	diese Arbeit
pSW189	wie pSW174, Deletion von 28 aa N-terminal	diese Arbeit
pSW194	<i>EcoRI</i> -PMXAN4559- <i>BamHI</i> (1 kb upstream von MXAN4559; Promotor-Region) in pSWU19	diese Arbeit, (Wu & Kaiser, 1995)
pSW195	<i>BamHI</i> -MXAN4557- <i>HindIII</i> in pSW194	diese Arbeit
pSW196	<i>XbaI</i> -MXAN4557- <i>HindIII</i> in pSW105	diese Arbeit

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
1000up-csgA-fwd(Sacl)	AAAGAGCTCACCACCGCGATGGGC GCATAGGCG	Klonierung
1000up-csgA-rev(Xbal)	AAATCTAGACATGCATGGCATTAAAC GCGCTGAATGCC	Klonierung
4557-4558-fwd	GGGCGCGTCCAGGTGGATGCG	Transkr.-Mapping
4557-4558-rev	GCGCGGCAGGTATAGGGCGCC	Transkr.-Mapping
4557-HindIII-rev	GGGAAGCTTTCAGTTTCGCGGTTGC GACTTCACTTCG	Klonierung
4557-seq-1	GGCGACGCTGCAAGCCATCG	Sequenzierung
4557-seq-2	GCCTCGGACGGAAGCGCCGC	Sequenzierung
4558-4559-fwd	GGTGGGCTCACGTTATGACCCGGG C	Transkr.-Mapping
4558-4559-rev	CCCCCAACAGGCGCGTCTCCC	Transkr.-Mapping
4559-4560-fwd	CGGTGGCGCCCTTCGATGCC	Transkr.-Mapping
4559-4560-rev	GCGCTGCCGCGCTCGAAGGG	Transkr.-Mapping
4560-4561-fwd	GGAGAAGGCCTTCAAGGCCGCGC	Transkr.-Mapping
4560-4561-rev	CGGCCGAAGCTCTTGCGGCC	Transkr.-Mapping
4561-4562-fwd	CGCGGGCAAGCTCTACGGCACCC	Transkr.-Mapping
4561-4562-rev	CGGCTGCACCCGGTCCACGG	Transkr.-Mapping
6567-6568-fwd	GAGGACCCCGACTTCACGTGGACG G	Transkr.-Mapping
6567-6568-rev	GGCATCGGCGCCTGGCTGTCTG	Transkr.-Mapping
6568-6569-fwd	GGTGGGCTCGCTCGACCGCG	Transkr.-Mapping
6568-6569-rev	CAGCAGCAGCACCGCCACCGC	Transkr.-Mapping
6569-6570-fwd	GCATTTCGTGCGTGGTGCTCGGCC	Transkr.-Mapping
6569-6570-rev	GGTGCGCAATGCCGAGCTCCG	Transkr.-Mapping
6570-6571-fwd	GCTTCTCGAACCCTGCGCCCCC	Transkr.-Mapping
6570-6571-rev	GGCGAGGACTCGATTGGGCGG	Transkr.-Mapping
6571-6572-fwd	GCACGCACGGTGATTGCGCCG	Transkr.-Mapping
6571-6572-rev	CGAGTCTCCGGCGACGAGTTGCCG	Transkr.-Mapping
6572-6573-fwd	CGCGGGTGTGCGCCACCGTCC	Transkr.-Mapping

6572-6573-rev	CACGTCCAGCAGCGCCTGGGG	Transkr.-Mapping
6573-6574-fwd	GCTACAGCCTGTCCGCGGACGCG	Transkr.-Mapping
6573-6574-rev	CCGTCCACCACGGCGATGTCGG	Transkr.-Mapping
attB left	CGGCACACTGAGGCCACATA	Kontrolle d. Insertion
attB right	GGAATGATCGGACCAGCTGAA	Kontrolle d. Insertion
attP left	GGGAAGCTCTGGGTGACGAA	Kontrolle d. Insertion
attP right	GCTTTCGCGACATGGAGGA	Kontrolle d. Insertion
BamHI-4557-fwd	AAAAAGGATCCATGAGGTCAGGGC CGGTGGATAGCC	Klonierung
BamHI-csgA	AAAGGATCCATGCGCTACGTCATCA CCGGAGCG	Klonierung
BamHI-popC	AAAGGATCCGATGAAGTCCTACCTG TTGGTTCCAAAGG	Klonierung
csgA(p25)-AvrII	AAACCTAGGCTACCAGGGCACTTCG GTCCCCTGG	Klonierung
csgA-BamHI	GGATCCCTACCAGGGCACTTCGGT CCCC	Klonierung
csgA-EcoRI	TTTGAATTCCTACCAGGGCACTTCG GTCCCC	Klonierung
csgA-HindIII	TTTAAGCTTCTACCAGGGCACTTCG GTCCCC	Klonierung
csgA-Linker-HisTag- HindIII	TTTAAGCTTCTAGTGGTGATGATGG TGATGGCCGGAGCCGGCGGCGGA GCCGGCCGATCCCCAGGGCACTTC GGTCCCC	Klonierung
csgA-Linker-StrepTag- HindIII	TTTAAGCTTCTATTTTTCGAACTGCG GGTGGCTCCAGCCGGAGCCGGCG GCGGAGCCGGCCGATCCCCAGGG CACTTCGGTCCCC	Klonierung
csgA-seq2	TGGCGCACGTCACCTCGCGG	Sequenzierung
Deletion-Agel	GGGCCTTTCGTTCCGTTTCATTCCGC	gezielte Mutagenese
Deletion-Dral	GAGTTAACAGTTTTGAATCCGAACC C	gezielte Mutagenese

Deletion-mut	CCCGTTGCAACCTTCTCTGAGGACC CCCATGATTACTCATGGTTGTTATAC CCG	gezielte Mutagenese
EcoRI-promotor4557- fwd	TTTGAATTCCCTCGCCACCACGCTC GCCG	Klonierung
EcoRV-csgA1	GATATCATGCGCTACGTATCACCG GAGC	Klonierung
EcoRV-csgA2	GATATCGACGACGACAGCGTGCGC G	Klonierung
EcoRV-csgA3	GATATCAGCGTGCGCGCGTTTCGC	Klonierung
exo ORF1 QPR forward	ATGAACCTCTATCCGGACATCGT	RT-PCR
exo ORF1 QPR reverse	AGCTCGAAGGCCGTCTCA	RT-PCR
int 4557-fwd	CGCTCGGCCAAGGTGTTGCCGG	Transkr.-Mapping
int 4557-rev	CGTCTGCACGACGTTCCGGGTGCG	Transkr.-Mapping
int 4558-fwd	GGTGGAGCAGGCGGCTCCCG	Transkr.-Mapping
int 4558-rev	CGGGAGCCGCCTGCTCCACC	Transkr.-Mapping
int 4559-fwd	CCTTCGCGGAGCCGACCCTGG	Transkr.-Mapping
int 4559-rev	GTGCCATGCAGACGCCACGTCTGG	Transkr.-Mapping
int 4560-fwd	CGGCGCCGAAGAAGGCCACGC	Transkr.-Mapping
int 4560-rev	CGGCACCCGGCCACTGCGG	Transkr.-Mapping
int 4561-fwd	GCTTCCCGGAGGCCGTGCCG	Transkr.-Mapping
int 4561-rev	CACCAGGCCCGGCTGGAGCTGG	Transkr.-Mapping
int 4562-fwd	CGCGCGAGCTGGGCCAGACG	Transkr.-Mapping
int 4562-rev	CCAGCGTCACCACCTCGCGGC	Transkr.-Mapping
int 6567-fwd	GCGGAGCCGAGCCCCAGGTGC	Transkr.-Mapping
int 6567-rev	CTCCCGGGAACCGGCGAGCC	Transkr.-Mapping
int 6568-fwd	GGTGGAGCCGTGGGTGGGACGC	Transkr.-Mapping
int 6568-rev	CGCCCGCGGACACCCACAGG	Transkr.-Mapping
int 6569-fwd	GGCACGGGCAAGAGCACGCTGC	Transkr.-Mapping
int 6569-rev	CCACGCTCCAGCACCTCGTTTCGC	Transkr.-Mapping
int 6570-fwd	CGTCCTCCAGCGCCTCGATGGGG	Transkr.-Mapping

int 6570-rev	GCGGGAAGAACCCGTTTCGACGGGG	Transkr.-Mapping
int 6571-fwd	CATCGACTCCACGCTGGCGTCACC C	Transkr.-Mapping
int 6571-rev	CCTGATGGCGAAGAACGTGCGCG	Transkr.-Mapping
int 6572-fwd	CGGCACGCTGCTCAAGGGCACC	Transkr.-Mapping
int 6572-rev	GCGGGGCCTGTGGATGAACAGGG	Transkr.-Mapping
int 6573-fwd	GACGCGGGACAGCCGGATGGC	Transkr.-Mapping
int 6573-rev	CCGTAGCGGTTGTTGCCTGCGTCG	Transkr.-Mapping
int 6574-fwd	GCCGGATGCAGGTACGGAGCCGG	Transkr.-Mapping
int 6574-rev	GGCGGTCTGCGGGAAGTCGGCC	Transkr.-Mapping
Int-seq-1	GGTTCGGCACCTCTTGTTGCTGC	Sequenzierung
Int-seq-2	CCCAGCAAATGGCTTCGATATCCG	Sequenzierung
Int-seq-3	TGACGGCTCGCGCCTATGACCG	Sequenzierung
Int-seq-4	GGACAGAACCCCACTGAAGCAGAG C	Sequenzierung
int-seq-6570-2	GCCGTCTTCTCCCGAGGACGCG	Sequenzierung
Intimin-HindIII	TTTTAAGCTTGCGAAGTGATCTTCC GTCACAGG	Klonierung
Intimin-Xbal	AAAATCTAGAATGATTACTCATGGTT GTTATACCCGG	Klonierung
Kontrolle N-His tag	CATGCATGTCTAGACACCACCACCA CCACC	Kontrolle d. Insertion
Loop1-fwd	GTACCGGTCCCCACCACCACCACC ACCACGTGGACGTGCTCATCAACAA CGC	Klonierung
Loop1-rev	GCACGTCCACGTGGTGGTGGTGGT GGTGGGGACCGGTACACACGTTGG	Klonierung
Loop2-fwd	CGTTGGGTGACCACCACCACCACC ACCACGTGGACTACGCGGACATGG C	Klonierung
Loop2-rev	CGTAGTCCACGTGGTGGTGGTGGT GGTGGTCACCCAACGCGCACCA AGCC	Klonierung

Loop3-fwd	GGCGAACACCCACCACCACCA CCACGACGGCGGGCCTATGCGTA CCG	Klonierung
Loop3-rev	CCCCGCCGTCGTGGTGGTGGTGGT GGTGGGTGTTCCGCCCAACGAGC C	Klonierung
Loop4-fwd	GGGCGGCCCGCACCACCACCA CCACGACGCCACGCTGCCGGCGCC GG	Klonierung
Loop4-rev	GCGTGGCGTCGTGGTGGTGGTGGT GGTGCGGGCCGCCATGTCCGTCT GC	Klonierung
M13 forward	GTAAAACGACGGCCAG	Sequenzierung
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGA	Sequenzierung
mut-agIU-C24A-1	GGCCAAGCATGGGCTGACGG	gezielte Mutagenese
mut-agIU-C24A-2m	CCCTGCTTGGCGCCCGTGCCC	gezielte Mutagenese
mut-agIU-C24A-3	GTTGTAAAACGACGGCCAGTGCC	gezielte Mutagenese
Mutation-SmaI	GATGACTTGGAGCCAGGGAGCGCT TCGG	gezielte Mutagenese
MXAN0552 A	TTTAAGCTTCCTGGAGCACGCGGGA GTGGC	in-frame Deletion
MXAN0552 B	ACTTGCCGCGGACGACAAGTCGCT CGAACCCCG	in-frame Deletion
MXAN0552 C	TTGTCGTCCGCGGCAAGTCCGTCC CGGGC	in-frame Deletion
MXAN0552 D	AAATCTAGACGACCAGTGAATCCCC CGACGCG	in-frame Deletion
MXAN0552 E	CACCAAGATTCAGGGCACCGTGGT GG	in-frame Deletion
MXAN0552 F	CGAAGCGCTTCTGTGTGTCCAGCG C	in-frame Deletion
MXAN0552 G	CGCTGGGCGTCGTCATGTGGG	in-frame Deletion
MXAN0552 H	CACGCCGCTGAGCGACGAGTTGG	in-frame Deletion

MXAN4557 A	TTTAAGCTTCATCAACGCCACCGGT GAGGCC	in-frame Deletion
MXAN4557 B	ATTCGTGCCGGGCTGGCGGACGTC AGTGGG	in-frame Deletion
MXAN4557 C	CGCCAGCCC GG CACGAATCGAAGC GGGCCG	in-frame Deletion
MXAN4557 D	AAATCTAGAGGGCTGGAGCTGGCC ACCGCC	in-frame Deletion
MXAN4557 E	GCGCCTGGTGCTCTTCGACGGG	in-frame Deletion
MXAN4557 F	GCGACCTCGGGTCTGAAGGCG	in-frame Deletion
MXAN4557 G	GCAGGTGGGCGTGAAGGGCTTCG	in-frame Deletion
MXAN4557 H	GCCGAAGTCACTCAGCTTGATGGC GC	in-frame Deletion
MXAN4557-323F	CCATGTTGGCGCCCTATACC	RT-PCR
MXAN4557-421R	GTGCACGTTCTCGGAGATG	RT-PCR
MXAN4557-4559 A	TTTAAGCTTCTTCAAGCTGGCCCCC GTGCCG	in-frame Deletion
MXAN4557-4559 A2	TTTAAGCTTCGGCGGACCCGAAGTT CGTCACCC	in-frame Deletion
MXAN4557-4559 B	CCGGCCCCGCCGACCCGGAGACGG GCTCGG	in-frame Deletion
MXAN4557-4559 C	TCCGGGTCGGCGGGCCGGGAGCT GGAAGTC	in-frame Deletion
MXAN4557-4559 D	AAATCTAGAGCCGTCTCGCCCCTCC AGCAGG	in-frame Deletion
MXAN4557-4559 E	GTGCAGTTGGGCGCGAAGGCG	in-frame Deletion
MXAN4557-4559 F	CCGCGAAGGCCTTGCGACGC	in-frame Deletion
MXAN4557-4559 G	GCGTCCAGGTGGATGCGTCCGG	in-frame Deletion
MXAN4557-4559 H	GCGCGGCAGGTATAGGGCGCC	in-frame Deletion
MXAN4559 A2	CCGGAATTCGTGCTCTTCCGCAGTG GC	in-frame Deletion
MXAN4559 B2	CTTGACTTCGAACAGAGTCGAGTGC ATCG	in-frame Deletion

MXAN4559 B3	CTTGACTTCCGGCTCACCGAACAGA GTCG	in-frame Deletion
MXAN4559 C2	ACTCTGTTCTGAAGTCAAGGTTTCGAT AC	in-frame Deletion
MXAN4559 C3	GGTGAGCCGGAAGTCAAGGTTTCGA TAC	in-frame Deletion
MXAN4559 D2	GCGGGATCCCTCTCGGACCTCGGA GCG	in-frame Deletion
MXAN4559 E	GCGTGGTGAAGGACCTCG	in-frame Deletion
MXAN4559 F	GACTTCCAACCACATGCG	in-frame Deletion
MXAN4559 G	GTGAGAACGATGCACTCG	in-frame Deletion
MXAN4559 G2	GCGCGGCCTGGGCTCCAAC	in-frame Deletion
MXAN4559 H	CTCAGCACGCGGTTGACG	in-frame Deletion
MXAN4559 H2	CGCCTGGCCGAAGAGGCGC	in-frame Deletion
MXAN4562 A	TTTAAGCTTGCCATTCCGTGCAGC TCGATTTCG	in-frame Deletion
MXAN4562 B	ACGCAGCGCGGTGACTTCCTGGGT GCCTGTCCGC	in-frame Deletion
MXAN4562 C	GAAGTCACCGCGCTGCGTGACGCG GTGCTG	in-frame Deletion
MXAN4562 D	AAATCTAGAGGCCGTGGCCACCCG CTCC	in-frame Deletion
MXAN4562 E	GCGCGCACCCAGGTCCGCC	in-frame Deletion
MXAN4562 F	GCTCCAGCACCTGCGCCAGGCC	in-frame Deletion
MXAN4562 G	GGACAAGGAGGACGTGCGGCCG	in-frame Deletion
MXAN4562 H	GTCTCCTGCACGGTGCGCGCG	in-frame Deletion
MXAN6043 A	TTTAAGCTTCCGGCTTCAGCTCCAG GATGCGC	in-frame Deletion
MXAN6043 B	GCTCTTCGGGCGTCTCCAGGATGC GGAAGCGC	in-frame Deletion
MXAN6043 C	TGGAGACGCCCGAAGAGCGCTTCA CGCAGAAGCTC	in-frame Deletion
MXAN6043 D	AAATCTAGAGGAATGGTGGCGCTCC	in-frame Deletion

	CCACGG	
MXAN6043 E	CCGCTCCAGGTTTCGCGGTCAGC	in-frame Deletion
MXAN6043 F	CGCCCAGGGCCATGACGTCCG	in-frame Deletion
MXAN6043 G	GGCCTGGTGAAGTCCTTCATCGGC G	in-frame Deletion
MXAN6043 H	CGAAGCGTGCGCCACTGAAGGC	in-frame Deletion
MXAN6044 A	TTTAAGCTTGCCTCCTCGCGATGTG TCTGTGCG	in-frame Deletion
MXAN6044 B	CTTGACGGCCGCGTCACCACGCG CTCTTCG	in-frame Deletion
MXAN6044 C	GTGACGGCGGCCGTCAAGGACACC GTCACCGTC	in-frame Deletion
MXAN6044 D	AAATCTAGAGCTGCGCCACCCACGT CACCC	in-frame Deletion
MXAN6044 E	CGCCCCTGAACCTCGAGGTGGC	in-frame Deletion
MXAN6044 F	CCGTCGTGGAGGGACAGCGGC	in-frame Deletion
MXAN6044 G	GTACACCTTCGCCGAAGGGCGCC	in-frame Deletion
MXAN6044 H	CCAGCGCCAGCGGCTCCACG	in-frame Deletion
MXAN6090 A	TTTAAGCTTCGGACCTCATCCAGGC TCTTGGCG	in-frame Deletion
MXAN6090 B	GAGCCCCACGGCGCGCTCCTCCAC GCTGAGG	in-frame Deletion
MXAN6090 C	GAGCGCGCCGTGGGGCTCACCAAG CAGCTGTGCG	in-frame Deletion
MXAN6090 D	AAATCTAGAGAACATGCGCGAGGA GCACCACGG	in-frame Deletion
MXAN6090 E	GCTCCAGGTTCGATGCCACCTCCG	in-frame Deletion
MXAN6090 F	CGGTCTACTTCTGCGCGACGGCCC	in-frame Deletion
MXAN6090 G	CCGCCACCGACAAGAAGCAGGGG	in-frame Deletion
MXAN6090 H	CGTCCGGCAGGTTTCATCCGCG	in-frame Deletion
MXAN6545 A	TTTAAGCTTGTGGAGGACCGCGAC GAGCCCC	in-frame Deletion
MXAN6545 B	GAGGTGCTGGAGAACCCGTCGGGG	in-frame Deletion

	CCGTCCG	
MXAN6545 C	CGGGTTCTCCAGCACCTCCGCGGC AACGC	in-frame Deletion
MXAN6545 D	AAATCTAGACTGGACGGAGCGGGC GGGAGC	in-frame Deletion
MXAN6545 E	GCCGGAAGCTGGACTCCGTCTGGC	in-frame Deletion
MXAN6545 F	GCTCGGCGGTGAGGTCGCGG	in-frame Deletion
MXAN6545 G	GGCCGGGTGGTAGGGACTCGCG	in-frame Deletion
MXAN6545 H	GGGAAGTCGGGCGTCCCCTCGG	in-frame Deletion
MXAN6570 A	TTTAAGCTTCCCTCTTCGGCGTTCC CTACGCG	in-frame Deletion
MXAN6570 B	GGCGTACCGCAGGAGCGTGTACCG GCCAAAGGGC	in-frame Deletion
MXAN6570 C	ACGCTCCTGCGGTACGCCGAGGTG AAGAGCGAGG	in-frame Deletion
MXAN6570 D	AAATCTAGACTGCACCAGTCCTCGC GCCAGC	in-frame Deletion
MXAN6570 E	GAGGCCCAGAAGCAGGGCGGC	in-frame Deletion
MXAN6570 F	GCCCGTAGAGCGTTTCCAGGGAGC C	in-frame Deletion
MXAN6570 G	CGCGCGAGGTCCAGATGACGTCG	in-frame Deletion
MXAN6570 H	CCTCAACGGCCGGCATCGACTCC	in-frame Deletion
MXAN6570-1-Strep- NotI	AAAGCGGCCGCCTATTTTTTCGAACT GCGGGTGGCTCCAAGCGCTGTCCT CGTCTCCGGCAGCCCC	Klonierung
MXAN6570-2-Strep- NotI	AAAGCGGCCGCCTATTTTTTCGAACT GCGGGTGGCTCCAAGCGCTGATGC GCTCAGCCGAGCGCG	Klonierung
MXAN6570-6571 A	TTTAAGCTTCCCTGGTGGAGCATCC CGCGC	in-frame Deletion
MXAN6570-6571 B	AGGCCGAGCGCGTGAGACGAGATC GCCGCC	in-frame Deletion
MXAN6570-6571 C	GTCTCACGCGCTCGGCCTCTGGTG	in-frame Deletion

	CACGCG	
MXAN6570-6571 D	AAATCTAGAGCGCTCGCCTCCAGAG AGGGCC	in-frame Deletion
MXAN6570-6571 E	GAAGCGGCTCCCGCCACGGC	in-frame Deletion
MXAN6570-6571 F	CGTCATGCAGCACCGCCACCG	in-frame Deletion
MXAN6570-6571 G	CCGGCAAGGTCCTGGCCACCG	in-frame Deletion
MXAN6570-6571 H	GGCCCATGTCCAGCACCTGGGC	in-frame Deletion
MXAN6570 STPK- 104F	CCTTTGGCCGGTACACGCT	RT-PCR
MXAN6570 STPK- 205R	CGCAGAGCTTCTCGAACCC	RT-PCR
MXAN6571-His-XhoI	AAACTCGAGTCAGTGGTGGTGGTG GTGGTGACGGAAGCCGGGATTGG	Klonierung
MXAN_6570 D177N 1	GGACGGCAAGGACCTGCGCAAGG	gezielte Mutagenese
MXAN_6570 D177N 2x	GGATGTTCTGCGGCGAGATGTTCC GGTGGACGAGCTTCAGG	gezielte Mutagenese
MXAN_6570 D177N 3	GGCAATCACGCTCGGGCTCGCC	gezielte Mutagenese
NdeI-csgA(p25)	AAACATATGATGCGCTACGTCATCA CCGGAGCG	Klonierung
NdeI-MXAN6570	AAACATATGTACCGGGAAAGGGTTC AATACGG	Klonierung
NdeI-MXAN6570-sp	AAACATATGCCCTTCCGGCCCCAGC CCTTTGG	Klonierung
NdeI-MXAN6571	AAACATATGTGGCAGATCATCATCA ACGGGC	Klonierung
NsiI/AvallI-csgA	TTTATGCATGCGCTACGTCATCACC GGAGCG	Klonierung
omega 4521 (spi) QPCR forward	GGCTGTCTCCCGCTTTCTTC	RT-PCR
omega 4521 (spi) QPCR reverse	TGGATGTCGATCTGATGGTTCT	RT-PCR
oNH063	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung
oPpilA-1	CGGAATTCGCGGCGTTGAACGAGG	Klonierung

	GG	
oPpilA-2	GCTCTAGACATGGGGGTCCTCAGA GAAGG	Klonierung
ORF01430-HindIII	TTTAAGCTTGGAGTACGTGCGCGG GCCGG	Insertionsmutation
ORF01430-neg-fwd	CCTCGCCAAGCAGGTGGGCG	Insertionsmutation
ORF01430-neg-rev	CGGACACGGAGATGCCGGGG	Insertionsmutation
ORF01430-pos	ACACGTCGTTGCGCGCGTCC	Insertionsmutation
ORF01430-Xbal	AAATCTAGACCCACTGCCGATGTTG CCGC	Insertionsmutation
ORF03147-HindIII	TTTAAGCTTGGAGTCGCTGCTGGAC GCGC	Insertionsmutation
ORF03147-neg-fwd	GCCACGTCCTCCGCGGATGC	Insertionsmutation
ORF03147-neg-rev	CACCACAGGCCGCGGCATGG	Insertionsmutation
ORF03147-pos	AGTGCGATTGCGCGGACGCG	Insertionsmutation
ORF03147-Xbal	AAATCTAGACGCGCCAGCCGCTGG AGTCC	Insertionsmutation
ORF04342-HindIII	TTTAAGCTTTGCTGCAAGGCGCTCC CGCC	Insertionsmutation
ORF04342-neg-fwd	CCTGGCCGCCTTCATCGTCC	Insertionsmutation
ORF04342-neg-rev	GGAGCGCTGAGGCCACAGCC	Insertionsmutation
ORF04342-pos	GCGTCTGAGACGTCGCGGGC	Insertionsmutation
ORF04342-Xbal	AAATCTAGATGCGTTCGGTCTGGAGC ACGC	Insertionsmutation
ORF06080-HindIII	TTTAAGCTTCCACCGGCGTCCTCAA GGGC	Insertionsmutation
ORF06080-neg-fwd	CATCCTCCGCATCATCGCGG	Insertionsmutation
ORF06080-neg-rev	TCCAGCTCCAGGCGCAGCGG	Insertionsmutation
ORF06080-pos	GCGCGTAGTCCTCCAGCGCC	Insertionsmutation
ORF06080-Xbal	AAATCTAGAAGAAGACGATGCCCGC GCC	Insertionsmutation
ORF07820-HindIII	TTTAAGCTTCGACCGAGCTGGCGAT GCCG	Insertionsmutation

ORF07820-neg-fwd	GACGGACGGTGAGACGCGCC	Insertionsmutation
ORF07820-neg-rev	GCAGGGGCAACGGGGATGGC	Insertionsmutation
ORF07820-pos	GACTCCAGCGCCGACGTGCG	Insertionsmutation
ORF07820-Xbal	AAATCTAGAGGCGTCATGCCAGCCT GGGC	Insertionsmutation
ORF07846-HindIII	TTTAAGCTTGGTGGACGTGGGGCTC GCGG	Insertionsmutation
ORF07846-neg-fwd	GCGTCCTGCCGAGTACGCC	Insertionsmutation
ORF07846-neg-rev	CGTTGCCGCGGAGGTGCTGC	Insertionsmutation
ORF07846-pos	GTCGCGCTTGAACAGGCGGC	Insertionsmutation
ORF07846-Xbal	AAATCTAGAGGCGGAGTTGCTGCCA TGGG	Insertionsmutation
ORF08408-HindIII	TTTAAGCTTACCGCGACCTCAAGCC CGCC	Insertionsmutation
ORF08408-neg-fwd	GCTGCGCCACCCGAACACCG	Insertionsmutation
ORF08408-neg-rev	GGGGCGTCTCGCCCAGGTCC	Insertionsmutation
ORF08408-pos	CGTCGATGCTCTGCGCGGCC	Insertionsmutation
ORF08408-Xbal	AAATCTAGAGCCACCATCAGGGCCA CGCC	Insertionsmutation
pASKInt100Cal-amber-fwd	CCATCGAATGGCCAGATGATTAATT CC	gezielte Mutagenese
pASKInt100Cal-amber-mut	GCAAATGAATTCTGATTAACATAAAA AAACAATCC	gezielte Mutagenese
pASKInt100Cal-amber-rev	CCACTCTGCAGATTAACCTCTGCCG	gezielte Mutagenese
pASKInt100Cal-Smal-fwd	CAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGC C	gezielte Mutagenese
pASKInt100Cal-Smal-mut	CACCACTGCGATCCCCGGCAAAC AGC	gezielte Mutagenese
pASKInt100Cal-Smal-rev	CCGTTATTCATTCGTGATTGCGCC	gezielte Mutagenese
pBGS18-upHindIII-pos	AAGGGCGATCGGTGCGGGCC	Insertionsmutation
pBJ114-fwd	CCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGC	in-frame Deletion

	G	
pBJ114-rev	CCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTC CGGC	in-frame Deletion
pET24b(+)-230	CCCACGCCGAAACAAGCGC	Sequenzierung
pGEX2T-seq	GACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCC	Sequenzierung
popC-HindIII	TTTAAGCTTTCACCTGAATACGGCC AGGCC	Klonierung
promotor4557-BamHI-rev	TTTTTGGATCCCATCGTTCTCACATC CAAGGGTGGAGC	Klonierung
pSL626-agIU	ACTGGTAAGCTTTTCGTATGGATCC AACGTATGATATCATTTCGCCCTG CTTGCAGCCCGTGCCCGCCATCAC CAGCGAGGCCATCAGGCCCGCGGT CCACAGCCGCCCTGCCGCATCCG CATGGGGGTCTCAGAGAAGGTTG C	Klonierung
pSL626-SmaI	GACTTGGAGCCCGGGAGCGC	Klonierung
pSL626-tgl	ACTGGTAAGCTTTTCGTATGGATCC AACGTATGATATCCGTGGGCGTGTG GGAGCAACCGGAGGACACCAGCAG CAGCGCGAGCGAACAGGACGCGGT GGAAAGGCGGAACATGGGGGTCTC CAGAGAAGGTTGC	Klonierung
pSW105-seq1	CCAGCCAGAAAGTGAGGGAGCCAC GG	Sequenzierung
pSW144-seq-1	GAATTCGAGCTCACCACCGCGATG G	Sequenzierung
pSW144-seq-2	GAACAGTTCGCCAGCGACGCGC	Sequenzierung
pSW144-seq-3	CGCGTGTTTTGCCAGCGGAAGGC	Sequenzierung
pSW145-seq-1	CCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCG C	Sequenzierung
pSW145-seq-2	ATGTCCTCGCTGGCCGAGCGCG	Sequenzierung
pSW145-seq-3	GCATCTCGGAGGCGGACTACAACC	Sequenzierung

sdeK QPCR forward	GGTCGTCTTGCGGAACGT	RT-PCR
sdeK QPCR reverse	TGGCGGAGACACACTCGAA	RT-PCR
SmaI-csgA1	CCCGGGATGCGCTACGTCATCACC GGAGC	Klonierung
SmaI-csgA2	CCCGGGGACGACGACAGCGTGCGC G	Klonierung
SmaI-csgA3	CCCGGGAGCGTGCGCGCGTTTCGC	Klonierung
XbaI-4557-fwd	AAAAATCTAGAATGAGGTCAGGGCC GGTGGATAGCC	Klonierung
XbaI-csgA	AAATCTAGAATGCGCTACGTCATCA CCGGAGCG	Klonierung
XbaI-HisTag-csgA	AAATCTAGACATCACCATCATCACC ACATGCGCTACGTCATCACCGGAG CG	Klonierung
XbaI-HisTag-csgA neu	AAATCTAGACACCACCACCACCACC ACATGCGCTACGTCATCACCGGAG CG	Klonierung
XbaI-StrepTag-csgA	AAATCTAGATGGAGCCACCCGCAGT TCGAAAAAATGCGCTACGTCATCAC CGGAGCG	Klonierung

Tabelle 11: Verwendete Stämme von *E. coli*. Es werden nur die Stämme aufgeführt, die kein in Tabelle 9 aufgelistetes Plasmid als TOP10-Stämme tragen. So liegt zum Beispiel das Plasmid pSW105 im Stamm SW105 vor usw.

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
DH5 α	F' Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r_K^- m_K^+) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1</i>	(Hanahan, 1983)
TOP10	F' <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-</i> <i>mcrBC</i>) Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)

SW146	pSW143 in Rosetta2 (DE3)	diese Arbeit
SW147 = Rosetta2 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1</i> (DE3) pRARE ⁶ (Cm ^R)	Novagen (Schwalbach)
RosettaGami2 (DE3)	Δ (<i>ara-leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> <i>ΔphoAPvull phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'</i> <i>[lac⁺(lacI^q)pro] gor522</i> <i>::Tn10 (Tc^R) trxB::kan</i> (DE3) pRARE ⁶ (Cm ^R)	Novagen (Schwalbach)
SW148	pSW145 in Rosetta2 (DE3)	diese Arbeit
SW163	pSW162 in RosettaGami2 (DE3)	diese Arbeit
SW176	pSW173 in RosettaGami2 (DE3)	diese Arbeit
SW177	pSW174 in RosettaGami2 (DE3)	diese Arbeit
SW178	pSW175 in RosettaGami2 (DE3)	diese Arbeit
SW179	pSW173 in Rosetta2 (DE3)	diese Arbeit
SW180	pSW174 in Rosetta2 (DE3)	diese Arbeit
SW181	pSW175 in Rosetta2 (DE3)	diese Arbeit
SW190	pSW188 in Rosetta2 (DE3)	diese Arbeit
SW191	pSW188 in RosettaGami2 (DE3)	diese Arbeit
SW192	pSW189 in Rosetta2 (DE3)	diese Arbeit
SW193	pSW189 in RosettaGami2 (DE3)	diese Arbeit

Tabelle 12: Verwendete Stämme von *M. xanthus*. (att) bedeutet eine homologe Rekombination des entsprechenden Plasmids in die Mx8-Phagen-Bindestelle, (Ins) kennzeichnet eine Insertionsmutante, (Del) kennzeichnet eine in-frame-Deletionsmutante.

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
DK1622	Wildtyp	(Kaiser, 1979)
DK5208	<i>csgA::Tn5-132</i> Ω LS205	(Kroos & Kaiser, 1987)
SA1098	<i>attB::pTK98-10</i> (zusätzliche Kopien von <i>csgA</i>)	(Kruse et al., 2001)
DK1217	<i>aglB1</i>	(Hodgkin & Kaiser, 1979)
DK1300	<i>sglG1</i>	(Hodgkin & Kaiser, 1979)
SA1465	<i>fruA::Tc^R</i>	(Kruse, et al., 2001)
RH1001	pSW114 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1002	pSW115 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1003	pSW116 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1004	pSW118 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1005	pSW119 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1006	pSW120 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1007	pSW114 in DK1622 (att)	diese Arbeit
RH1008	pSW115 in DK1622 (att)	diese Arbeit
RH1009	pSW116 in DK1622 (att)	diese Arbeit
RH1010	pSW118 in DK1622 (att)	diese Arbeit
RH1011	pSW119 in DK1622 (att)	diese Arbeit
RH1012	pSW120 in DK1622 (att)	diese Arbeit
RH1013	pSW121 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1014	pSW122 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1015	pSW123 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1016	pSW124 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1017	pSW125 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1018	pSW126 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1019	pSW129 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1020	pSW130 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1021	pSW131 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1022	pSW132 in DK5208 (att)	diese Arbeit

RH1023	pSW133 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1024	pSW134 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1025	<i>MXAN4557</i> ::pSW136 (Ins)	diese Arbeit
RH1026	<i>MXAN3092</i> ::pSW137 (Ins)	diese Arbeit
RH1027	<i>MXAN2059</i> ::pSW138 (Ins)	diese Arbeit
RH1028	<i>MXAN0552</i> ::pSW139 (Ins)	diese Arbeit
RH1029	<i>MXAN6570</i> ::pSW140 (Ins)	diese Arbeit
RH1030	<i>MXAN6545</i> ::pSW141 (Ins)	diese Arbeit
RH1031	<i>MXAN6043</i> ::pSW142 (Ins)	diese Arbeit
RH1032	pSW150 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1033	pSW151 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1034	pSW152 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1035	pSW153 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1036	<i>MXAN0552</i> ::pSW154 (Ins)	diese Arbeit
RH1037	<i>MXAN4557</i> ::pSW155 (Ins)	diese Arbeit
RH1038	<i>MXAN6043</i> ::pSW156 (Ins)	diese Arbeit
RH1039	<i>MXAN6044</i> ::pSW157 (Ins)	diese Arbeit
RH1040	<i>MXAN6545</i> ::pSW158 (Ins)	diese Arbeit
RH1041	<i>MXAN6570</i> ::pSW159 (Ins)	diese Arbeit
RH1042	Δ <i>MXAN0552</i> (Del)	diese Arbeit
RH1043	Δ <i>MXAN4557</i> (Del)	diese Arbeit
RH1044	Δ <i>MXAN6043</i> (Del)	diese Arbeit
RH1045	Δ <i>MXAN6044</i> (Del)	diese Arbeit
RH1046	Δ <i>MXAN6545</i> (Del)	diese Arbeit
RH1047	Δ <i>MXAN6570</i> (Del)	diese Arbeit
RH1048	pSW160 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1049	pSW165 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1050	pSW166 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1051	pSW167 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1052	pSW168 in DK5208 (att)	diese Arbeit
RH1053	<i>MXAN6090</i> ::pSW169 (Ins)	diese Arbeit
RH1054	Δ <i>MXAN6090</i> (Del)	diese Arbeit
RH1055	DK5208	diese Arbeit

	<i>MXAN6570::pSW159</i> (Ins)	
RH1056	<i>csgA::Tn5-132 ΩLS205</i> Δ <i>MXAN6570</i> (Del)	diese Arbeit
RH1057	DK5208 <i>MXAN4557::pSW155</i> (Ins)	diese Arbeit
RH1058	<i>csgA::Tn5-132 ΩLS205</i> Δ <i>MXAN4557</i> (Del)	diese Arbeit
RH1059	SA1465 <i>MXAN4557::pSW155</i> (Ins)	diese Arbeit
RH1060	SA1465 <i>MXAN6570::pSW159</i> (Ins)	diese Arbeit
RH1061	<i>fruA::Tc^R ΔMXAN4557</i> (Del)	diese Arbeit
RH1062	<i>fruA::Tc^R ΔMXAN6570</i> (Del)	diese Arbeit
RH1063	<i>MXAN4557-4559::pSW184</i> (Ins)	diese Arbeit
RH1064	Δ <i>MXAN4557-4559</i> (Del)	diese Arbeit
RH1065	<i>MXAN4562::pSW185</i> (Ins)	diese Arbeit
RH1066	Δ <i>MXAN4562</i> (Del)	diese Arbeit
RH1067	<i>MXAN6570-6571::pSW186</i> (Ins)	diese Arbeit
RH1068	Δ <i>MXAN6570-6571</i> (Del)	diese Arbeit
RH1069	<i>MXAN4559::pSW187</i> (Ins)	diese Arbeit
RH1070	Δ <i>MXAN4559</i> (Del)	diese Arbeit
RH1071	DK5208 <i>MXAN4562::pSW185</i> (Ins)	diese Arbeit
RH1072	<i>csgA::Tn5-132 ΩLS205</i> Δ <i>MXAN4562</i> (Del)	diese Arbeit
RH1073	DK5208 <i>MXAN4559::pSW187</i> (Ins)	diese Arbeit
RH1074	<i>csgA::Tn5-132 ΩLS205</i> Δ <i>MXAN4559</i> (Del)	diese Arbeit

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation von DNA erfolgte mittels PCR im 20 μ L-Ansatz oder im 50 μ L-Ansatz. Die Ansätze enthielten 10 bis 100 ng chromosomaler DNA bzw. verschiedener Plasmide als Matrizen, 20 pmol jedes Oligonukleotids, 250 μ M jedes Desoxyribonukleotidtriphosphats, 0,2 bis 2 U DNA-Polymerase sowie den entsprechenden Reaktionspuffer und eventuelle Zusätze. Die Durchführung erfolgte im eppgradient Mastercycler der Firma Eppendorf (Hamburg), wobei das Programm jeder PCR-Reaktion individuell erstellt wurde. Das Grundprinzip eines Programms ist jedoch in Tabelle 13 aufgezeigt.

Tabelle 13: Programm der Polymerase-Kettenreaktion. Die Schritte 2 bis 4 wurden je nach Versuch 25- bis 40-mal wiederholt.

Schritt 1: Denaturierung	95°C	5 Minuten
Schritt 2: Denaturierung	95°C	1 Minute
Schritt 3: Primer-Anlagerung	50°C bis 72°C (i.d.R. etwa 5°C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer)	1 Minute
Schritt 4: Polymerisation	72°C	1 Minute pro 1000 bp
Schritt 5: Polymerisation	72°C	5 Minuten
Schritt 6: Aufbewahrung	4°C	

Zur Verifikationen von Insertionen bzw. von homologen Rekombinationen bei der Konstruktion von Mutanten wurde anstelle von präparierter chromosomaler DNA der Überstand einer Lyse'n'go-Reaktion als Matrize in die PCR eingesetzt. Hierfür wurden 5 μ L einer Bakterienkultur aus der stationären Phase mit 5 μ L Lyse'n'go-Reagenz der Firma Pierce (Bonn) vermischt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Der Überstand einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 13000 Upm diente als Matrize in der PCR.

3.3.2 Gerichtete Mutagenese und Konstruktioon von Punktmutanten

Zur ortsgerichteten Mutagenese wurde eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. In diese wurden ein Vektor mit dem zu mutierenden Gen als Matrize und Oligonukleotide, welche die mutierte DNA-Sequenz enthielten und eine Fehlpaarung an der betreffenden Stelle verursachten, eingesetzt. Die Ansätze entsprachen denen einer normalen PCR, jedoch wurde die Pfu Ultra[®] II Fusion HS Polymerase von Stratagene (Heidelberg) eingesetzt, welche eine Proofreading-Aktivität besitzt. Es wurde in einer ersten Reaktion ein möglichst kurzes Fragment um die zu mutierende Stelle amplifiziert und per Gelextraktion aufgereinigt. Dieses kurze Fragment enthielt bereits die Punktmutation und diente in einer zweiten Reaktion als einer der Primer, um ein Fragment zu amplifizieren, welches nach entsprechender Aufreinigung mit geeigneten Restriktionsendonukleasen heraus geschnitten und in den Vektor ligiert werden konnte, um die ursprüngliche Sequenz zu ersetzen. Es erfolgte eine Transformation in TOP10, und die Plasmide wurden präpariert und sequenziert, um die Mutation zu verifizieren.

3.3.3 Herstellung elektrokompenter Zellen und Transformation von *Escherichia coli*

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen von *E. coli* wurde LB-Medium zunächst mit einer Übernachtskultur der entsprechenden Zellen auf eine OD₅₇₈ von etwa 0,1 inokuliert. Diese Kultur ließ man bei 37°C bis zu einer OD₅₇₈ von etwa 0,6 wachsen und stellte sie dann für 15 Minuten auf Eis. Die Kultur wurde anschließend für 20 Minuten bei 4°C und 5000 Upm abzentrifugiert und dreimal in jeweils 500 mL eiskaltem Wasser gewaschen. Danach wurde sie in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt und erneut gewaschen. Je nach Größe des Pellets wurden die Zellen in 2 bis 3 mL 10%-igem Glycerin resuspendiert und zu jeweils 60 µL aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -75°C bis zur Benutzung aufbewahrt.

Zur Transformation wurden elektrokompente Zellen auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA (0,1 bis 1 µg) auf einem Membranfilter für mindestens 30 Minuten dialysiert. 50 µL Zellen wurden in eine sterile und gekühlte Elektroporationsküvette der Firma BTX (San Diego, USA) mit 1 mm Spaltbreite überführt, und die dialysierte DNA wurde zugegeben. Die Transformation erfolgte im Gen Pulser Xcell der Firma BioRad (München) bei 250 Ω, 25 µFd und 1,8 kV. Sofort

wurde 1 μ L vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und die Suspension bei 37°C im Thermoblock schüttelnd inkubiert. Nach etwa 2 Stunden wurden die Zellen auf Selektivagarplatten, welche bei Bedarf zusätzlich 30 μ g/mL X-Gal enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle der erhaltenen Transformanden wurde Plasmid-DNA isoliert und eine Restriktionsanalyse durchgeführt.

3.3.4 Herstellung elektrokompetenter Zellen und Transformation von *Myxococcus xanthus*

Zur Elektroporation von DNA in *M. xanthus* wurde der entsprechende Stamm frisch in 100 mL CTTYE-Medium angeimpft und über Nacht zu einer OD₅₅₀ von 0,4 bis 0,7 kultiviert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 4700 Upm und 25°C, das Pellet wurde in Wasser resuspendiert, gewaschen und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt, bevor das Pellet in 100 bis 300 μ L Wasser resuspendiert und in Aliquots von 50 μ L in sterile Elektroporationsküvetten gegeben wurde. Es wurde 1 μ g dialysierter Plasmid-DNA hinzugegeben und bei 400 Ω , 25 μ Fd und 0,65 kV in einem Gene Pulser Xcell der Firma BioRad (München) elektroporiert. Danach wurde 1 μ L CTTYE-Medium zu dem Ansatz gegeben und in einem 2 mL Eppendorf-Gefäß für 6 Stunden bzw. über Nacht bei 32°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 250 μ L und 750 μ L des Ansatzes mit 4 mL auf 55°C vorgewärmten CTTYE-Softagar (0,75 %) vermischt, gevortext und zügig auf eine CTTYE-Agarplatte gegossen, welche das entsprechende Antibiotikum enthielt. Es erfolgte eine Inkubation für 3 bis 5 Tage bei 32°C. Zur Kontrolle der homologen Rekombination des transformierten Plasmids in das Genom wurde nach einer Lyse'n'go-Reaktion eine PCR mit entsprechenden Primern durchgeführt.

3.3.5 Konstruktion von Insertionsmutanten von *Myxococcus xanthus*

Zur Konstruktion von Insertionsmutanten in *M. xanthus* wurde zunächst ein Fragment des zu mutierenden Gens mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pBGS18 kloniert. Das daraus resultierende Plasmid trägt außer dem Fragment des Zielgens noch ein Resistenzgen gegen Kanamycin. Das Plasmid wurde wie in 3.3.4 beschrieben in *M. xanthus* Wildtyp transformiert. Da *M. xanthus* nicht in der Lage ist, Plasmide zu

replizieren, bleibt die Resistenz nur erhalten, wenn das Plasmid in das Genom integriert, was durch homologe Rekombination ins Zielgen erfolgt (siehe Abbildung 6). Transformanten werden nach etwa einer Woche vereinzelt, in Reinkultur genommen und deren Genotyp durch PCR mit spezifischen Primern auf das Fragment des Zielgens bzw. auf pBGS18 überprüft. Es wurden die Phänotypen von mindestens zwei genotypisch identischen Mutanten getestet.

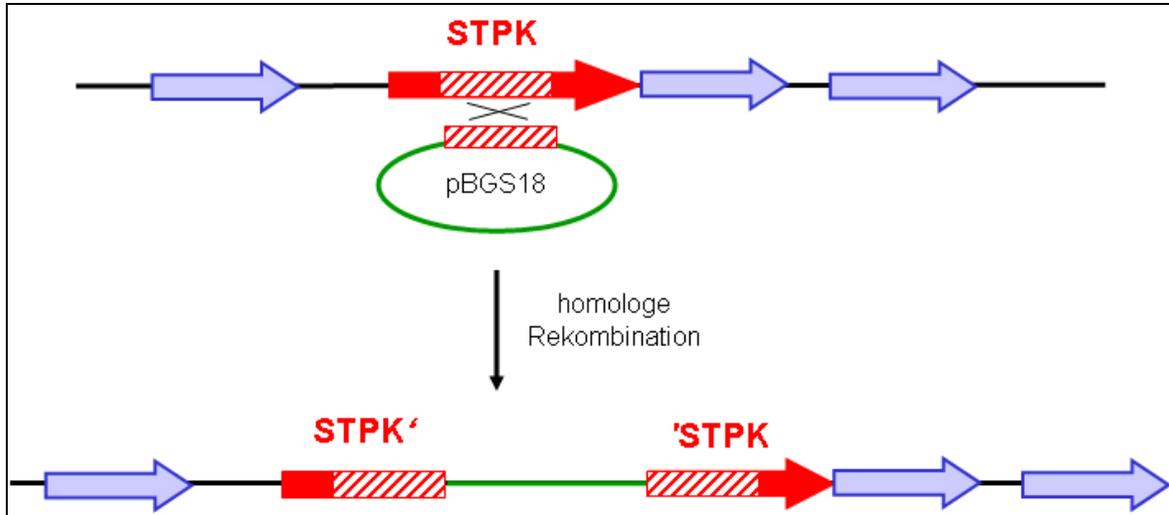


Abbildung 6: Homologe Rekombination

3.3.6 Konstruktion von in-frame Deletionsmutanten von *Myxococcus xanthus*

Die Konstruktion von in-frame Deletionsmutanten ist in Abbildung 7 dargestellt. Sie erfolgte im ersten Teil ähnlich der Konstruktion von Insertionsmutanten. Es wurden zunächst zwei Fragmente, die das zu mutierende Gen flankierten per PCR amplifiziert. Die Primer waren so gewählt, dass die beiden PCR-Produkte als Templates in einer zweiten PCR dienen konnten, um so ein Fusionsprodukt aus beiden zu amplifizieren. Dieses wurde in den Vektor pBJ114 kloniert, welcher neben einer Resistenz gegen Kanamycin noch das Gen für ein Protein trägt, welches in Anwesenheit von Galaktose ein toxisches Produkt synthetisiert. Der resultierende Vektor wurde in den entsprechenden Stamm von *M. xanthus* transformiert, wo es zu einer homologen Rekombination in einer der beiden flankierenden Regionen des Zielgens kam. Nach einer Inkubation bei 32°C wurden Transformanten vereinzelt und deren Genotyp durch die Resistenz gegen Kanamycin und durch PCR (Primer E + fwd bzw. F + rev) bestätigt.

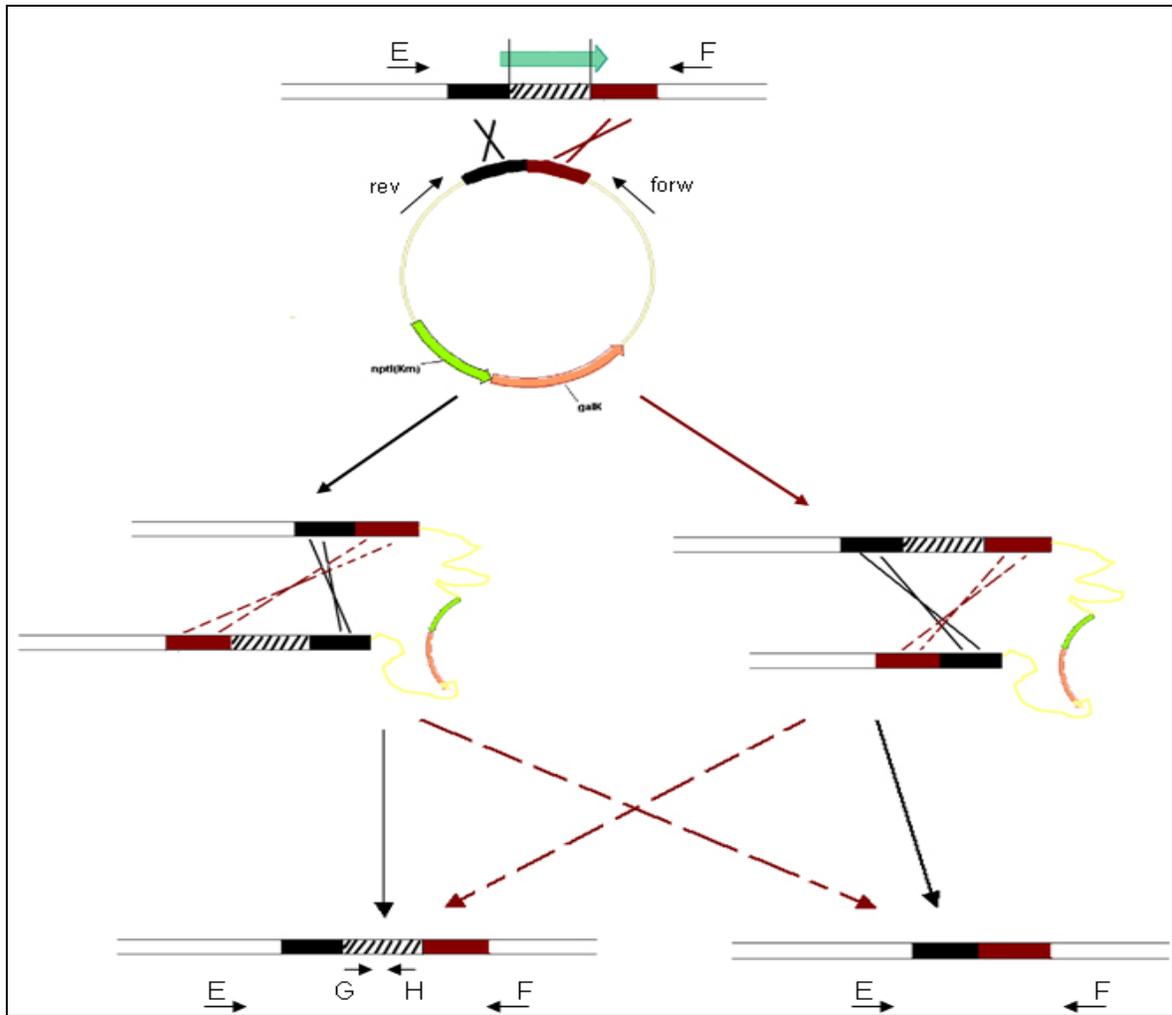


Abbildung 7: Konstruktion von in-frame Deletionsmutanten

Die so erzeugte Insertionsmutante wurde in CTTYE-Medium unter dem Selektionsdruck von Kanamycin bei 32°C kultiviert, zentrifugiert, gewaschen und in CTTYE-Medium aufgenommen, um eine OD_{550} von 0,5 einzustellen. Von dieser Suspension wurden 100 μL und 200 μL in 55°C warmen CTTYE-Softagar gegeben, gevortext und auf CTTYE-Agarplatten mit 1% Galaktose plattiert. Es erfolgte eine erneute Inkubation bei 32°C, Kolonien wurden vereinzelt und deren Genotyp durch entsprechende PCR (Primer E + F bzw. G + H), sowie die Resistenz gegenüber Galaktose bzw. Sensitivität gegenüber Kanamycin bestätigt. Es wurden die Phänotypen von mindestens zwei genotypisch identischen Mutanten getestet.

3.3.7 Präparation, Extraktion und Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Präparation chromosomaler DNA aus *M. xanthus* erfolgte durch Zentrifugation einer 80 mL Übernachtkultur für 10 Minuten bei 10000 Upm bei 4°C. Danach wurde das Pellet in 4 mL TE-Puffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0) resuspendiert und 800 µL Pronase (2,5 mg/mL) sowie 800 µL Lyse-Puffer (500 mM Tris-HCl (pH 9,4); 5% SDS; 125 mM EDTA) zugegeben und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Lysat wurde zehnmal durch eine Kanüle gezogen, danach mit einem Volumen Phenol versetzt und mindestens 20-mal durch Invertieren gemischt. Nach einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 10000 Upm wurde die obere, wässrige Phase in einem neuen Reaktionsgefäß mit einem Volumen Phenol/Chloroform (3:1) versetzt und gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation erfolgten zwei Extraktionsschritte mit jeweils einem Volumen Chloroform. Es wurden dann zwei Volumen Ethanol (96%) zugegeben, gemischt und für 10 Minuten bei 10000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 mL Ethanol (70%) gewaschen und an der Luft getrocknet. Nach Zugabe von 200 µL TE-Puffer wurde die DNA über Nacht bei 4°C geschüttelt und ihre Konzentration bestimmt.

Präparationen von Plasmid-DNA erfolgten im kleinen Maßstab aus 3 mL- bis 10 mL-Kulturen mit Hilfe des QIAprep Plasmid Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden) bzw. des Zyppy Plasmid Miniprep Kit der Firma Zymo (Orange, USA). Das Prinzip ist in beiden Kits dasselbe. Es wurden die geernteten Zellen zunächst in 200 µL Puffer 1 (enthält RNase) resuspendiert, dann wurden 200 µL Puffer 2 (Lyse-Puffer) hinzugegeben und für 5 Minuten inkubiert. Schließlich wurden 400 µL Puffer 3 hinzugegeben und für 10 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann auf eine Silica-Säule aufgetragen, mehrfach gewaschen und mit 50 µL Elutionspuffer eluiert.

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Hilden) bzw. dem Gel DNA Recovery Kit der Firma Zymo (Orange, USA). Die Agarose, welche die DNA enthielt, wurde ausgeschnitten, mit Guanidinthiocyanat-haltigem Puffer verflüssigt und auf eine Silica-Säule aufgetragen. Nach mehrmaligem Waschen wurde die DNA eluiert.

Die Konzentration und Reinheit von DNA wurde mit dem Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer der Firma Peqlab (Erlangen) bestimmt. Hierzu wurde der Blindwert mit 1 µL Puffer oder Wasser gemessen, danach wurde 1 µL DNA-Lösung aufgetragen

und ein Absorptionsspektrum von 220 bis 350 nm aufgezeichnet. Aus der Absorption bei 260 nm wurde die Konzentration der DNA bestimmt, aus dem Quotienten der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm wurde gleichzeitig deren Reinheit berechnet.

3.3.8 Restriktion und Ligation von DNA

Restriktionsverdau von Plasmid- oder linearer DNA erfolgten nach Angaben des Herstellers in 20 µL- bis 50 µL-Ansätzen. Je nach Anforderungen wurden ein oder zwei Restriktionsenzyme in eine Reaktion eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in der Regel bei 37°C für mindestens 2 Stunden oder über Nacht. Bei Bedarf wurden die Restriktionsendonukleasen anschließend durch Hitze (65°C für 20 Minuten) inaktiviert, und es wurde 1 µL alkalische Phosphatase und entsprechender Puffer hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte dann für 1 bis 2 Stunden ebenfalls bei 37°C. Der Erfolg jedes Verdau wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Zur Ligation von DNA wurden Insert und Vektor im stöchiometrischen Verhältnis 3:1 gemischt. Die Reaktion erfolgte üblicherweise im 10 µL-Ansatz mit 8 µL DNA, 1 µL 10-fachem Reaktionspuffer und 1 µL T4-DNA-Ligase (4 U). Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

3.3.9 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden diese mit 10-fachem Ladepuffer (60 % Glycerin; 50 mM EDTA; je eine kleine Spatelspitze Bromphenolblau, Xylencyanol und Orange G) versehen und auf ein 1,0 bis 1,5 %-iges Agarosegel aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 80 bis 130 V wurden diese Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Als Gel- bzw. Laufpuffer diente TBE-Puffer (89 mM Tris-Base; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA; pH 8,0). Zum Größenvergleich wurden 4 µL eines geeigneten Markers – GeneRuler 100bp DNA Ladder oder GeneRuler 1kb DNA Ladder der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) – aufgetragen.

3.3.10 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte in einem 3130 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) nach dem Kettenabbruchverfahren nach

Sanger. Die Sequenzierreaktion wurde mit dem ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems (Darmstadt) wie folgt durchgeführt: In einen Ansatz wurden 3 μL BigDye Terminator Cycle Mix, 2 μL 5-facher Dilution Buffer, 3 μL Plasmid-DNA, 1 μL Primer (5 pmol/ μL) und 11 μL Wasser gegeben. Nach dem in Tabelle 14 angegebenen Programm wurde eine PCR im 20 μL -Ansatz durchgeführt. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von jeweils 10 μL 125 mM EDTA, 9 μL 3M Natriumacetat (pH 4,6 bis 4,8), 80 μL Wasser und 400 μL 96%-igem Ethanol für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 13000 Upm und 20°C, wonach das Pellet zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und für 5 Minuten zentrifugiert wurde. Der Ethanol wurde vollständig abgenommen, das Pellet an der Luft getrocknet und in 20 μL Formamid aufgenommen. Das Beladen und Starten der Anlage erfolgte durch technisches Personal, und die Chromatogramme bzw. Sequenzen konnten am Computer ausgewertet werden.

Tabelle 14: PCR-Programm zur DNA-Sequenzierung. Die Schritte 2 und 3 wurden 25-mal wiederholt.

Schritt 1: Denaturierung	96°C	1 Minute
Schritt 2: Denaturierung	96°C	10 Sekunden
Schritt 3: Primer-Anlagerung und Polymerisation	60°C	4 Minuten
Schritt 4: Aufbewahrung	4°C	

3.3.11 Präparation von RNA

Die Präparation von RNA erfolgte nach der Methode mit heißem Phenol. Hierfür wurden die Zellen zunächst geerntet und bis zur RNA-Präparation bei -75°C eingefroren. Das Zellpellet wurde in 2,5 mL eiskalter Lösung 1 (300 mM Saccharose; 10 mM Natriumacetat; pH 4,5) resuspendiert und in ein 15 mL-Reaktionsgefäß überführt, in welchem sich 2,5 mL heiße (65°C) Lösung 2 (2% SDS; 10 mM Natriumacetat; pH 4,5) befinden. Es wurde durch Invertieren gemischt und sofort 5 mL heißes Phenol zugegeben. Nach erneutem Mischen wurde für mindestens 5 Minuten bei 65°C inkubiert, wobei jede Minute gemischt wurde. Anschließend wurde der Ansatz kurz in Stickstoff gefroren und für 5 Minuten bei 4°C und 4700 Upm zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit 5 mL heißem Phenol überführt und eine weitere Extraktion durchgeführt. Anschließend wurde die wässrige

Phase in ein neues Reaktionsgefäß mit 5 mL eiskaltem sauren Phenol/Chloroform (Verhältnis 5:1; pH 4,5) gegeben, gemischt und für 5 Minuten bei 4°C und 4700 Upm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde danach mit 5 mL eiskaltem Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1) versetzt, gemischt und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden 4 mL der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß mit 400 mL 3M Natriumacetat (pH 4,5) und 9 mL 96%-igem Ethanol gegeben, durch Invertieren gemischt und für mindestens 30 Minuten bei -20°C gefällt. Der Ansatz wurde für 25 Minuten bei 4°C und 4700 Upm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde zweimal mit 2 mL eiskaltem 75%-igem Ethanol gewaschen und jeweils für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde sämtlicher Überstand abgenommen, das Pellet an der Luft getrocknet und in 200 µL bis 400 µL RNase- freiem Wasser aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -75°C.

Im Anschluß erfolgte ein DNase-Verdau, um Kontaminationen durch DNA zu entfernen. Zu 100 µg RNA wurden 10 µL DNase I (1 U/µL) und 10 µL des 10-fach konzentrierten Puffers gegeben, auf ein Gesamtvolumen von 100 µL mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

Nach diesem Verdau wurde der Ansatz mit Hilfe des RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden) aufgereinigt, was zu einer höheren Reinheit der RNA führt. Die RNA wurde erst mit 350 µL Puffer RLT (enthält 2-Mercaptoethanol) und dann mit 250 µL 96%-igem Ethanol gemischt. Der Ansatz wurde auf ein RNeasy-Säulchen aufgetragen und für 15 Sekunden bei 13000 Upm zentrifugiert. Die gebundene RNA wurde zweimal mit jeweils 500 µL Puffer RPE gewaschen und für 15 Sekunden bei 13000 Upm zentrifugiert. Die RNA wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 30 µL Wasser versetzt und nach einer 5-minütigen Inkubation durch Zentrifugation für 1 Minute bei 13000 Upm eluiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, um die Ausbeute zu erhöhen.

Die Qualität der RNA wurde zum einen mittels PCR überprüft. Es wurden verwendet, die an die 5'-Region von σ -54 (*rpoN*) binden und bei Kontamination durch DNA ein PCR-Produkt liefern. Zum anderen wurden 100 ng der RNA auf ein Agarosegel aufgetragen. Bei RNA von hoher Reinheit sind zwei Banden der beiden Untereinheiten der ribosomalen RNA zu erkennen.

3.3.12 Synthese von cDNA

Für die Synthese von cDNA wurde das cDNA Archive Kit der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) verwendet. Dazu wurde 1 µg RNA nach Angaben des Herstellers mit 10 µL Puffer (10-fach), 4 µL dNTP (25-fach), 10 µL random primers (10-fach), 5 µL MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µL) und 61 µL Nuklease-freiem Wasser vermischt. Der Ansatz wurde zunächst für 10 Minuten bei 25°C und anschließend für 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Verwendung für weitere Experimente (real-time PCR) wurde der Ansatz im Verhältnis 1:10 verdünnt, um eine Konzentration von 1 ng/µL zu erhalten.

3.3.13 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion

In diesen Experimenten wurden Primer verwendet, die ein Fragment mit einer Länge von etwa 100 Basenpaaren aus dem Zielgen amplifizierten. Die Effizienz jedes Primerpaares wurde zunächst folgendermaßen bestimmt. Als Template wurde jeweils 1 µL genomischer DNA in den Konzentrationen 10 ng/µL, 1 ng/µL, 100 pg/µL und 10 pg/µL eingesetzt. In den Ansatz wurden außerdem 12,5 µL SybrGreen PCR Master Mix der Firma Applied Biosystems (Darmstadt), 0,25 µL Primer 1 (10 µM), 0,25 µL Primer 2 (10 µM) und 11 µL Wasser gegeben. Es erfolgte eine qPCR im 7300 Real Time PCR System von Applied Biosystems (Darmstadt) gemäß dem in Tabelle 15 angegebenen Programm. Die Ct-Werte entsprechen der Zyklenzahl, bei der ein definierter Schwellenwert der DNA-Konzentration erreicht wird. Diese Ct-Werte wurden linear gegen den Logarithmus der Kopienzahl aufgetragen, wodurch man eine Gerade mit negativer Steigung erhielt. Aus dieser Steigung wurde nach der Formel $E = 10^{-\frac{1}{m}}$ die Effizienz berechnet (E = Primereffizienz; m = Steigung der Geraden). Ab einer Effizienz von 1,6 wurden die Primerpaare verwendet.

Tabelle 15: Programm der qPCR. Die Schritte 2 und 3 wurden 40-mal wiederholt.

Schritt 1: Denaturierung	95°C	10 Minuten
Schritt 2: Denaturierung	95°C	15 Sekunden
Schritt 3: Primer-Anlagerung und Polymerisation	60°C	1 Minute
Schritt 4: Denaturierung	95°C	15 Sekunden
Schritt 5: Aufzeichnung der Dissoziationskurve	60°C	20 Sekunden

Schritt 6: Denaturierung	95°C	15 Sekunden
Schritt 7: Aufbewahrung	4°C	

Nun erfolgte die eigentliche real-time Polymerase-Kettenreaktion. Der Ansatz entsprach dem oben genannten. Als Template wurde 1 µL cDNA eingesetzt, welche wie in 3.3.12 beschrieben aus Zellen präpariert wurde, die nach verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung in Flüssigkultur geerntet wurden. Als Negativkontrollen dienten 1 µL RNA bzw. 1 µL Wasser. Es wurde eine qPCR gemäß Tabelle 15 durchgeführt. Die Dissoziationskurve wurde als Kontrolle aufgezeichnet, um die Schmelztemperatur des entstandenen Produkts zu überprüfen.

Die Auswertung erfolgte durch Berechnung der Differenzen der mittleren Ct-Werte von cDNA aus entwickelten Zellen und cDNA aus vegetativen Zellen, welche als Referenz dienten. Aus den so erhaltenen ΔCt -Werten konnte die relative Transkriptmenge gemäß der Formel $T_{rel} = E^{\Delta Ct}$ errechnet werden (T_{rel} = relative Transkriptmenge; E = Effizienz des Primerpaars). Die relative Transkriptmenge hatte für vegetative Zellen stets den Wert 1 und für Zellen aus Zeitpunkten der Entwicklung entsprechend vielfache Werte.

3.4 Mikrobiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung der Bakterien

Zellen von *E. coli* wurden in LB-Medium bei 37°C aerob kultiviert. Dies erfolgte entweder im Reagenzglas auf dem Roller oder im Erlenmeyerkolben auf dem Schüttler. Antibiotika wurden bei Bedarf wie in Tabelle 1 beschrieben hinzugegeben. Zur Überproduktion von Proteinen in *E. coli* wurden die Zellen in TP-Medium bei 37°C auf dem Schüttler kultiviert.

M. xanthus wurde in CTTYE-Medium bei 32°C aerob kultiviert. Dies erfolgte stets auf dem Schüttler in Erlenmeyerkolben mit dem 10-fachen Kulturvolumen. Antibiotika wurden bei Bedarf wie in Tabelle 1 beschrieben hinzugegeben. Zur Kultivierung auf Festmedien wurden Stämme von *M. xanthus* zunächst aus der Glycerin-Stammhaltung

auf CTTYE-Agar ohne Antibiotikum ausgestrichen. Die Zellen auf diesen Platten dienten dann als Ausgangsmaterial für Ausstriche auf CTTYE-Agarplatten mit Antibiotikum.

3.4.2 Untersuchung der Entwicklung von *Myxococcus xanthus*

Für den Ansatz von Entwicklungs-Assays für *M. xanthus* wurde der zu testende Stamm in CTTYE-Medium angeimpft und bei 32°C über Nacht inkubiert. Bei Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,5 bis 0,9 wurden die Zellen mittels Zentrifugation für 10 Minuten bei 4700 Upm geerntet und der Überstand vollständig abgenommen. Das Zellpellet wurde in einem definierten Volumen TPM-Puffer (10 mM Tris-HCl, (pH 7,6); 1 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH 7,6); 8 mM MgSO₄) bzw. MC7-Puffer (10 mM MOPS (pH 7,0); 1 mM CaCl₂) gründlich resuspendiert, um eine OD₅₅₀ von 7,0 einzustellen.

Für Assays auf TPM- bzw. CF-Agar wurden jeweils 20 µL der Suspension auf eine zuvor getrocknete Agarplatte getropft. Nach dem Antrocknen der Tropfen wurden diese bei 32°C inkubiert. Für Assays in Flüssigkultur wurden 50 µL der Suspension in 24-er Mikrotiterplatten gegeben und mit 350 µL MC7-Puffer versetzt. Die Platten wurden ebenfalls bei 32°C inkubiert, und die Entwicklung wurde mikroskopisch über einen Zeitraum von bis zu 5 Tagen verfolgt und in regelmäßigen Zeitabständen photographisch festgehalten.

3.4.3 Bestimmung der Sporulationseffizienz von *Myxococcus xanthus*

Um die Sporulationseffizienz von *M. xanthus* zu bestimmen, wurden Zellen vegetativ kultiviert und anschließend wie oben beschrieben auf TPM- und CF-Agar, sowie in Flüssigkultur für 120 Stunden entwickelt. Es wurden die Zellen aus 5 Tropfen zu jeweils 20 µL von den Agarplatten bzw. aus 2 Wells der Flüssigkultur-Ansätze vollständig geerntet und in 800 µL TPM-Puffer aufgenommen. Es erfolgte ein Ultraschall-Aufschluß mit einem Branson Sonifier 250 der Firma Heinemann (Schwäbisch Gmünd) bei 20 kHz und 30 W für 15 Sekunden. Die Zellen wurden dabei auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Ansätze bei 50°C für 2 Stunden inkubiert, um danach in 10er-Schritten mit TPM- bzw. MC7-Puffer verdünnt zu werden. Von diesen Verdünnungsstufen wurden jeweils 10 µL auf CTTYE-Platten getropft und bei 32°C

inkubiert. Die Platten wurden regelmäßig überprüft, und Kolonien der entsprechenden Verdünnungsstufen wurden ausgezählt. Da jede Kolonie aus einer Spore hervorging, konnte somit die Anzahl der Sporen in den entwickelten und geernteten Zellen berechnet werden, wobei die Sporulationseffizienz des Wildtyps immer als Referenz genommen wurde und somit 100% betrug.

3.4.4 Untersuchung der Motilität von *Myxococcus xanthus*

Die zu testenden Stämme wurden in CTTYE-Medium kultiviert und bei Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,5 bis 0,9 durch eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 4700 Upm geerntet. Das Pellet wurde in einem definierten Volumen CTTYE-Medium gründlich resuspendiert, um eine OD₅₅₀ von 5,0 einzustellen. Jeweils 5 µL der Zellsuspensionen wurden auf Softagar (0,5% CTTYE; 0,5% Agar) bzw. auf Hartagar (0,5% CTTYE; 1,5% Agar) getropft und trocknen gelassen. Es erfolgt eine Inkubation bei 32°C, und nach 24 Stunden bzw. nach 48 Stunden werden die Morphologien der Kolonieränder photographisch dokumentiert.

3.4.5 Makroskopische und mikroskopische Analyse von Phänotypen

Die makroskopische Untersuchung von Phänotypen erfolgte mit Entwicklungs-Ansätzen auf TPM- bzw. CF-Agar. Kulturen wurden wie in 3.4.2 beschrieben auf Agarplatten getropft und nach bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung unter einem MZ7₅ Binokular von Leica Microsystems (Wetzlar) bei bis zu 5-facher Vergrößerung beobachtet. Es wurden gleichzeitig photographische Aufnahmen der Kulturen mit einer DFC280 CCD-Kamera von Leica Microsystems (Wetzlar) gemacht.

Entwicklungs-Ansätze in Flüssigkultur wurden unter dem inversen Mikroskop DMIRE2 von Leica Microsystems (Wetzlar) mikroskopisch im Phasenkontrast betrachtet. Die Vergrößerungen waren 100-, 200-, 400- und 630-fach. Hierbei wurde die Mikrotiterplatte direkt auf den Objektisch gestellt, und das Objektiv wurde von unten an diese herangefahren. Dies ermöglichte es, die Zellen unangetastet zu belassen, sodaß diese nach dem Betrachten weiter inkubiert werden konnten. Die photographischen Aufnahmen erfolgten mit einer DFC350 FX CCD-Kamera von Leica Microsystems (Wetzlar).

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Heterologe Produktion von Proteinen in *Escherichia coli*

Um Proteine heterolog in *E. coli* zu produzieren, wurden der Stamm Rosetta2 (DE3) verwendet. Es handelt sich dabei um ein T7-Polymerase-abhängiges System, das mit IPTG induzierbar ist und ein Plasmid trägt, welches die Gene für einige seltene tRNAs exprimiert. Die Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden transformiert, was mittels PCR bestätigt wurde.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte auf LB-Medium, welchem Chloramphenicol sowie das dem transformierten Plasmid entsprechende Antibiotikum zugegeben wurde, bei 37°C in einer Vorkultur. Diese wurde zum Beimpfen einer Hauptkultur in TP-Medium verwendet, deren OD bei 578 nm photometrisch verfolgt wurde. Beim Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,6 wurde eine Probe der uninduzierten Kultur genommen, zentrifugiert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Danach wurde die Hauptkultur mit 0,1 mM bis 1,0 mM IPTG versetzt und bei 18°C oder 37°C weiter inkubiert. Nach 2 Stunden bzw. nach 24 Stunden wurde eine weitere Probe genommen, zentrifugiert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Kultur wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 8000 Upm geerntet und durch Ultraschall aufgeschlossen. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation für 10 Minuten bei 1000 Upm, um Einschlusskörper von der löslichen Fraktion zu trennen. Die verschiedenen Proben wurden dann elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

3.5.2 Fraktionierung von Zellen

Zellen von *M. xanthus* wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 10000 Upm geerntet und in 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mittels Ultraschall mit einem Branson Sonifier 250 der Firma Heinemann (Schwäbisch Gmünd) bei 20 kHz und 120 W in 50%-Impulsen für maximal 15 Minuten. Nach einer Zentrifugation für 15 Minuten bei 8000 Upm und 4°C in einer Sorvall Ultra Pro 80 Ultrazentrifuge der Firma DuPont (Bad Homburg) erhielt man im Übertand einen zellfreien Extrakt, welcher wiederum für 2 Stunden bei 40000 Upm und 4°C zentrifugiert wurde, um die lösliche Fraktion von der Membranfraktion zu trennen. Das

Membranpellet wurde mithilfe eines Teflon-Potters der Firma B. Braun (Melsungen) in Tris-TritonX100-Puffer (50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 2% Triton X-100; pH 7,6) resuspendiert, über Nacht schüttelnd solubilisiert und erneut für 2 Stunden bei 40000 Upm und 4°C zentrifugiert. Im Überstand erhielt man eine in Triton X-100 solubilisierte Fraktion, welche hauptsächlich aus Proteinen der inneren Membran besteht, im Pellet befanden sich vor allem Proteine der äußeren Membran. Das Pellet wurde schließlich in MOPS-CHAPS-Puffer (10 mM MOPS; 4 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂; 1,2% CHAPS; pH 7,2) resuspendiert, über Nacht solubilisiert und nochmals für 2 Stunden bei 40000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit einer Amicon Ultra Zelle von Millipore (Schwalbach) mit einer Ausschlußgröße von 10000 Da ankonzentriert und gewaschen.

Zellen von *E. coli* wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 10000 Upm geerntet, in 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) resuspendiert und mittels Ultraschall wie oben beschrieben aufgeschlossen. Anschließend erfolgte lediglich ein Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 10000 Upm und 4°C, um Einschlusskörper und Zelltrümmer von der löslichen Fraktion abzutrennen.

3.5.3 Reinigung von CsgA mittels Fast Protein Liquid Chromatography

Die Reinigung erfolgte an einem ÄKTApurifier von Amersham Biosciences (München). Die verwendeten Säulen und anderes Material waren ebenfalls von dieser Firma. Zunächst wurde die Fraktion der äußeren Membran wie in 3.5.2 beschrieben angereichert und in CHAPS solubilisiert. Aus diesem Solubilisat wurde CsgA folgendermaßen gereinigt.

Zunächst wurde das Solubilisat auf eine MonoQ HR 10/10-Säule (7,85 mL), die zuvor mit Puffer A1 (20 mM MOPS; 2 mM CaCl₂; 0,4% CHAPS; pH 7,0) äquilibriert wurde, aufgetragen. Gebundenes Protein wurde mit NaCl in Puffer A1 entweder in linearem Gradient bis 350 mM NaCl oder in einem Gradient mit folgenden Stufen mit einer Flußrate von 2 mL/min und 20 mL pro Stufe eluiert. 0 mM NaCl; 250 mM NaCl; 300 mM NaCl; 400 mM NaCl; 1000 mM NaCl. Es wurden Fraktionen zu jeweils 4 mL gesammelt und mittels Western Blot auf Vorhandensein von CsgA getestet. Die Fraktionen, welche CsgA (p17 und p25) enthielten wurden mit einer Amicon Ultra Zelle von Millipore (Schwalbach) mit einer Ausschlußgröße von 10000 Da ankonzentriert und

mit Puffer A2 (10 mM MOPS; 1 mM CaCl_2 ; 4 mM MgCl_2 ; 100 mM NaCl; pH 7,2) gewaschen.

Im nächsten Schritt wurde die Probe auf eine Superose 12 10/300-Säule aufgetragen, welche zuvor mit Puffer A2 äquilibriert wurde. Es erfolgte eine Gelfiltration bei einer Flußrate von 0,5 mL/min, wobei Fraktionen zu jeweils 1 mL gesammelt und mittels Western Blot auf Vorhandensein von CsgA getestet wurden. Die entsprechenden Fraktionen wurden über eine Amicon Ultra Zelle ankonzentriert und mit Puffer A2 gewaschen. Die Proben wurden anschließend massenspektrometrisch untersucht, um CsgA (p17) zu detektieren.

3.5.4 Affinitätsreinigung von CsgA mittels Dynabeads

Als Alternative zur Anionenaustausch- und Gelfiltrations-Chromatographie wurde CsgA mithilfe von magnetischen Beads, welche mit Protein A und spezifischem anti-CsgA-Antiserum gekoppelt waren, gereinigt. Hierzu wurden 100 μL Beads zweimal mit jeweils 500 μL Waschpuffer (100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$; pH 8,0) gewaschen, das Reaktionsgefäß auf einen Magneten gestellt und der Überstand abgenommen. Die Beads wurden in 90 μL Waschpuffer aufgenommen und mit 10 μL Primärantikörper (anti-CsgA-Serum) versetzt. Es erfolgte eine Inkubation unter leichtem Schütteln für 10 Minuten bei Raumtemperatur, der Überstand wurde abgenommen und die Beads dreimal mit jeweils 500 μL Waschpuffer gewaschen. Die Komplexe aus Beads und IgG wurden nun zweimal mit jeweils 1 mL 200 mM Triethanolamin (pH 8,0) gewaschen, anschließend in 1 mL 20 mM Dimethylpimelimidat aufgenommen und zum Crosslinken schüttelnd für 30 Minuten bei 20°C inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Reaktion durch Zugabe von 1 mL 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 15-minütiger Inkubation gestoppt. Die gecrosslinkten Dynabeads-IgG-Komplexe wurden dreimal mit jeweils 1 mL PBS (10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$; 70 mM NaCl; pH 7,4) gewaschen, um anschließend in der CHAPS-solubiliserten Fraktion der äußeren Membran aufgenommen zu werden, um das Antigen (CsgA) an die Beads zu binden. Es erfolgte eine Inkubation unter Schütteln für 1 Stunde bei 4°C, gefolgt von dreimaligem Waschen mit jeweils 1 mL PBS.

Die Möglichkeiten zur Elution von CsgA von den Beads-IgG-Antigen-Komplexen waren die Inkubation unter Bedingungen wie niedrigem pH-Wert oder hoher

Salzkonzentration. Diese Methoden waren jedoch nicht erfolgreich. Die Elution erfolgte deshalb durch Kochen der Beads-IgG-Antigen-Komplexe in SDS-Probenpuffer, Zentrifugation und direktem Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamidgel.

3.5.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Protein-Konzentrationen erfolgte mit Roti-Quant-Reagenz der Firma Roth (Karlsruhe). Das Prinzip beruht auf der Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Zu jedem Testansatz wurde, wie in unten stehender Tabelle beschrieben, zuerst die entsprechende Menge Wasser und 200 μL Roti-Quant-Reagenz, und dann die Probe bzw. der Proteinstandard (Rinderserumalbumin) gegeben. Die Ansätze wurden gemischt und für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Messung der Extinktion bei 595 nm mit einem Ultrospec 2100 pro Spektrophotometer der Firma Amersham Biosciences (München), woraus durch Vergleich mit der Eichgeraden die Proteinkonzentrationen errechnet werden konnten.

Tabelle 16: Proteinbestimmung

1. Wasser	800 μL	...	700 μL	780 μL
2. Roti-Quant	200 μL	...	200 μL	200 μL
3. Probe bzw. Standard (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA)	0 μL BSA	...	100 μL BSA	20 μL Probe

3.5.6 Fällung von Proteinen

Nach einer Konzentrationsbestimmung wurde die gewünschte Menge an Protein mit 4 Volumen eiskaltem Aceton versetzt und für 5 Minuten in einer Tischzentrifuge bei 13000 Upm zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde getrocknet und in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Zur Konzentrationsbestimmung von in SDS-Probenpuffer aufgenommenem Protein wurden 15 μL des Lysats mit 40 μL Wasser und 50 μL Trichloressigsäure versetzt und gefällt. Dazu wurde der Ansatz für 10 Minuten auf Eis präzipitiert und anschließend für 5 Minuten bei 4°C und 13000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde

anschließend in 100 μ L 10%-iger Trichloressigsäure gewaschen und erneut zentrifugiert, danach in 20 μ L 1M NaOH gelöst und in eine Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzt.

3.5.7 Auftrennung von Proteingemischen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Größenbestimmung von Polypeptiden wurden Polyacrylamid-Gelelektrophoresen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Laemmli, 1970; Schagger & von Jagow, 1987). Dazu wurden 14%-ige bzw. 16%-ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet, welche in der MiniProtean II Elektrophoreseapparatur der Firma BioRad (München) gegossen wurden. Die Zusammensetzungen der Gele sind in den Tabellen 17 und 18 aufgezeigt. Vor der Elektrophorese wurden die Proteinproben bei Bedarf gefällt und in 20 μ L SDS-Probenpuffer (62,5 mM Tris-HCl; 2% SDS; 10% Glycerin; eine Spatelspitze Bromphenolblau; pH 6,8; 5 μ g/mL Leupeptin; 0,7 μ g/mL Pepstatin; 0,6 mM Phenylmethylsulfonylfluorid) aufgenommen. Nach Zugabe von 1/100 Volumen 2,6 M 1,4-Dithiothreitol wurden diese für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Proben zusammen mit dem Molekularmassenstandard – PageRuler Protein Ladder bzw. PageRuler Prestained Protein Ladder von Fermentas (St. Leon-Rot) – aufgetragen und es erfolgte die Elektrophorese in der oben beschriebenen und mit entsprechendem Puffer (für Laemmli-Gele: 25 mM Tris; 190 mM Glycin; 0,1% SDS bzw. für Schagger-Gele: 100 mM Tris-HCl; 100 mM Tricin; 0,1% SDS; pH 8,25 auf der Kathodenseite und 200 mM Tris-HCl; pH 8,9 auf der Anodenseite) gefüllten Apparatur bei einer Spannung zwischen 80 V und 160 V, sodaß die Stromstärke ca. 123456789 mA betrug. Die Elektrophorese wurde gestoppt, nachdem der Marker aus Bromphenolblau den unteren Rand des Gels erreicht hat. Um die Polypeptidbanden sichtbar zu machen, wurden die Gele nach dem Lauf für 2 Stunden oder über Nacht in Färbelösung (25% 2-Propanol; 10% Essigsäure; 0,5% CuSO₄; 0,05% Coomassie R250; 0,05% Crocein Scarlet) auf dem Schüttler gefärbt. Das Entfernen von nicht an Protein gebundenem Farbstoff erfolgte anschließend in Entfärbelösung (12% 2-Propanol; 7% Essigsäure; 0,5% CuSO₄), welche mehrmals gewechselt wurde. Danach konnten die Gele gescannt werden.

Tabelle 17: Zusammensetzung von SDS-Gelen nach Laemmli

Lösung	Trenngel		Sammelgel	
	eingesetztes Volumen	Endkonzentration	eingesetztes Volumen	Endkonzentration
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,50 mL	375 mM	-	-
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	-	2,50 mL	125 mM
37,5:1 Acrylamid/Bisacrylamid (40%)	3,50 mL	14%	1,00 mL	4%
Wasser	4,00 mL	-	6,50 mL	-
100% TEMED	10 µL	0,10%	50 µL	0,50%
10% APS	60 µL	0,06%	120 µL	0,12%

Tabelle 18: Zusammensetzung von SDS-Gelen nach Schägger

Lösung	Trenngel		Sammelgel	
	eingesetztes Volumen	Endkonzentration	eingesetztes Volumen	Endkonzentration
3,0 M Tris-HCl (pH 8,45)	3,33 mL	1000 mM	2,48 mL	745 mM
10% SDS	0,10 mL	0,1%	0,10 mL	0,1%
55% (w/v) Glycerin	2,42 mL	13,3%	-	-
Wasser	0,04 mL	-	6,31 mL	-
37,5:1 Acrylamid/Bisacrylamid (40%)	4,00 mL	16%	1,00 mL	4%
100% TEMED	8 µL	0,08%	10 µL	0,10%
10% APS	100 µL	0,10%	100 µL	0,10%

3.5.8 Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot

Die durch Western-Blot zu untersuchenden Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer so verdünnt, daß folgende Proteinmengen auf das entsprechende SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen werden konnten: Für Gesamtzellextrakt aus *M. xanthus* 3,0 µg bis 10 µg und für gereinigte Proteine bzw. angereicherte Membranfraktionen 0,5 µg bis 2,0 µg. Als Molekularmassenstandart diente PageRuler Prestained Protein Ladder von Fermentas (St. Leon-Rot). Es wurde eine Elektrophorese wie in 3.5.6 beschrieben durchgeführt und die Proteine vom ungefärbten Gel durch Elektroblothing in einer Hoefer TE 77 semi-dry transfer unit der Firma Amersham Biosciences (München)

auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Als Transferpuffer wurde ein diskontinuierliches Tris/Glycin-Puffersystem nach Tabelle 19 verwendet. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Membran für 1,5 bis 2 Stunden.

Tabelle 19: Transferpuffer für Western-Blot

Membranseite (Anode)		Gelseite (Kathode)	
Chemikalien pro Liter H₂O	Endkonzentration	Chemikalien pro Liter H₂O	Endkonzentration
3,03 g Tris	25 mM	6,06 g Tris	50 mM
14,4 g Glycin	192 mM	28,8 g Glycin	384 mM
0,1 g SDS	0,01%	2,0 g SDS	0,2%
250 mL Methanol	25%	100 mL Methanol	10%

Im Anschluß daran wurde die Membran zum Absättigen bei Raumtemperatur für mindestens 30 Minuten oder bei 4°C über Nacht mit 5% Milchpulver in PBS-T (10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄; 70 mM NaCl; 0,05% Tween-20; pH 7,2) unter schüttelnd inkubiert. Danach erfolgte die Bindung des spezifischen Primärantikörpers, welcher üblicherweise aus Kaninchen-Serum gewonnen wurde. Dieser wurde im Verhältnis 1:2500 bis 1:10000 in 2,5% Milchpulver in PBS-T gelöst, und die Membran darin bei Raumtemperatur für 2 Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für jeweils 15 Minuten erfolgte die Bindung des Sekundärantikörpers - anti-Kaninchen-IgG aus der Ziege als Konjugat mit Peroxidase aus Meerrettich von der Firma Pierce (Bonn). Dieser wurde im Verhältnis 1:10000 ebenfalls in 2,5% Milchpulver in PBS-T gelöst. Die Inkubation dauerte erneut 2 Stunden, und die Membran wurde dreimal mit PBS-T für jeweils 15 Minuten gewaschen.

Um die Proteinbanden zu detektieren, wurde die Membran zunächst mit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate von Pierce (Bonn) benetzt und etwa 1 Minute inkubiert. Beim Umsetzen des Substrates durch die Peroxidase wird Licht emittiert, weshalb in einer Kassette ein CL-Xposure Film von Pierce (Bonn) auf die Membran gelegt und je nach Signalstärke zwischen 10 Sekunden und 30 Minuten

belichtet wurde. Die Entwicklung des Films erfolgte dann in einer FPM-100A Entwicklungsmaschine von Fujifilm Europe (Düsseldorf).

3.5.9 Identifizierung von Proteinen und Peptiden durch Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der molekularen Masse von Proteinen wurden massenspektrometrische Analysen mittels Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight (MALDI-TOF)-MS durchgeführt. Dabei wurden Proteinlösungen in einer Verdünnungsreihe mit gesättigter Sinapinsäurelösung (in 0,1% Trifluoressigsäure; 67% Acetonitril) in mehreren Schritten im Verhältnis 1:1 gemischt, auf einen Probenträger aufgetragen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die anschließende Messung erfolgte bei einer Beschleunigungsspannung von 25000 V und einer Verzögerung von 300 nsec in einem PerSeptive Biosystems Voyager-DE RP Spectrometer von Applied Biosystems (Darmstadt). Die Auswertung der Spektren erfolgte durch die entsprechende Software.

Um Proteine weiter zu identifizieren, wurden die entsprechenden Proben durch Zugabe verschiedener spezifischer Proteasen (v. a. Trypsin) proteolytisch gespalten und die molekularen Massen der so erhaltenen Peptide wiederum mit MALDI-TOF gemessen. Anhand spezifischer Massen („Peptidmassen-Fingerprint“) konnten ein Vergleich mit einem theoretischen, virtuellen Verdau und ein anschließender Abgleich mit der entsprechenden Datenbank durchgeführt werden.

3.6 Bioinformatische Methoden

3.6.1 Analyse von Sequenzen und Sequenzvergleiche

Die Suche nach Protein- oder DNA-Sequenzen aus sequenzierten Organismen erfolgte online über die Datenbanken von TIGR (<http://www.tigr.org/cmr>) bzw. NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Recherchen nach Proteinsequenzen mit Verwandtschaft zu einer bekannten Sequenz wurden online durch BLASTp auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> durchgeführt. Alternativ wurde auch die Datenbank des EBI auf <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/> verwendet.

Die Analyse und der Vergleich verschiedener Protein- und DNA-Sequenzen, sowie die Erstellung von Alignments erfolgte mit dem Programm Vector NTI Suite 9 der Firma InforMax (Oxford, Großbritannien). Dieses diente darüber hinaus zur graphischen Darstellung der Sequenz-Alignments, zur Archivierung von Sequenzen in der persönlichen Vector NTI Datenbank und zur Planung von Klonierungen. Nach erfolgter DNA-Sequenzierung wurden die erhaltenen Chromatogramme ebenfalls mit Vector NTI Suite 9 ausgewertet und die Sequenzen bestimmt. Weiterhin wurden damit verschiedene Berechnungen und Vorhersagen (zum Beispiel für Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen, Schmelztemperaturen von Primern usw.) durchgeführt.

3.6.2 Strukturvorhersage von Domänen

Die Vorhersage von Domänen aufgrund der Proteinsequenz erfolgte mit dem SMART-Server (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Speziellere Server zur Vorhersage bestimmter Domänen waren der TMHMM-Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) bzw. der TMpred-Server (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) zur Vorhersage von Transmembran-Helices, der PRED-TMBB-Server (<http://bioinformatics2.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/index.jsp>) zur Vorhersage von Beta-Barrel-Strukturen in Proteinen der äußeren Membran und der SignalP-Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) zur Vorhersage von Signalpeptiden.

4 Ergebnisse

4.1 Reinigung von CsgA

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung des bislang unbekanntes Rezeptors von CsgA. Hierzu wurden verschiedene Ansätze gewählt, einer davon war die Reinigung von p17. Dieses sollte dann verwendet werden, um den Rezeptor bzw. andere Interaktionspartner zum Beispiel durch Cross-linking-Experimente zu identifizieren.

4.1.1 Biochemische Fraktionierung der Zellen

Zellen des CsgA-Überproduktionsstamms SA1098 wurden zunächst in bis zu 10 L CTTYE Medium kultiviert, und es erfolgte eine Entwicklung für 21 Stunden in Flüssigkultur. Die Zellen bzw. Fruchtkörper wurden geerntet. Wie in 3.5.2 beschrieben wurden die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen und zentrifugiert. Die Membranfraktion wurde durch Zentrifugation abgetrennt und in Triton X-100 solubilisiert. Das unlösliche Pellet enthielt Proteine der äußeren Membran und wurde in CHAPS solubilisiert. Um CsgA (p25 und p17) in den Fraktionen nachzuweisen, wurden diese einer Western-Blot Analyse unterzogen. Wie in Abbildung 8 zu sehen, ist CsgA in der CHAPS-solubilisierten Fraktion der äußeren Membran zu finden. Jedoch verblieb auch ein Anteil von CsgA in dem CHAPS-unlöslichen Pellet nach der letzten Zentrifugation und konnte mit n-Dodecyl- β -D-Maltosid erneut solubilisiert werden.

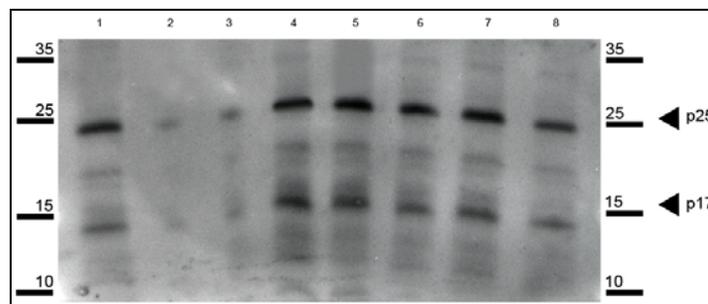


Abbildung 8: CsgA in fraktionierten Zellen. Zellen wurden wie oben beschrieben behandelt. Es wurde jeweils 3 μ g Gesamtprotein pro Fraktion aufgetragen, mit CsgA-Antiserum wurden p25 und p17 nachgewiesen. 1: Zellextrakt; 2: lösliche Fraktion; 3: Triton-lösliche Fraktion; 4: Triton-unlösliche Fraktion; 5: CHAPS-Solubilisat; 6: CHAPS-unlösliche Fraktion; 7: DM-Solubilisat; 8: DM-unlösliche Fraktion.

4.1.2 Chromatographische Reinigung

Zur weiteren Reinigung wurde die in CHAPS solubilisierete Fraktion der äußeren Membran verschiedenen chromatographischen Reinigungsschritten unterzogen. Zunächst wurde die Probe mittels Anionenaustausch-Chromatographie an einer FPLC-Säule des Typs MonoQ HR 10/10 fraktioniert. Die Elution erfolgte durch einen NaCl-Gradienten (linearer Gradient bzw. Stufengradient). CsgA wurde mittels Western-Blot-Analyse detektiert. Es zeigte sich, daß p17 bei einer NaCl-Konzentration zwischen 100 und 300 mM eluierte, während p25 erst bei 300 bis 400 mM NaCl eluierte. Das Chromatogramm und der entsprechende Western Blot sind in Abbildung 9 gezeigt.

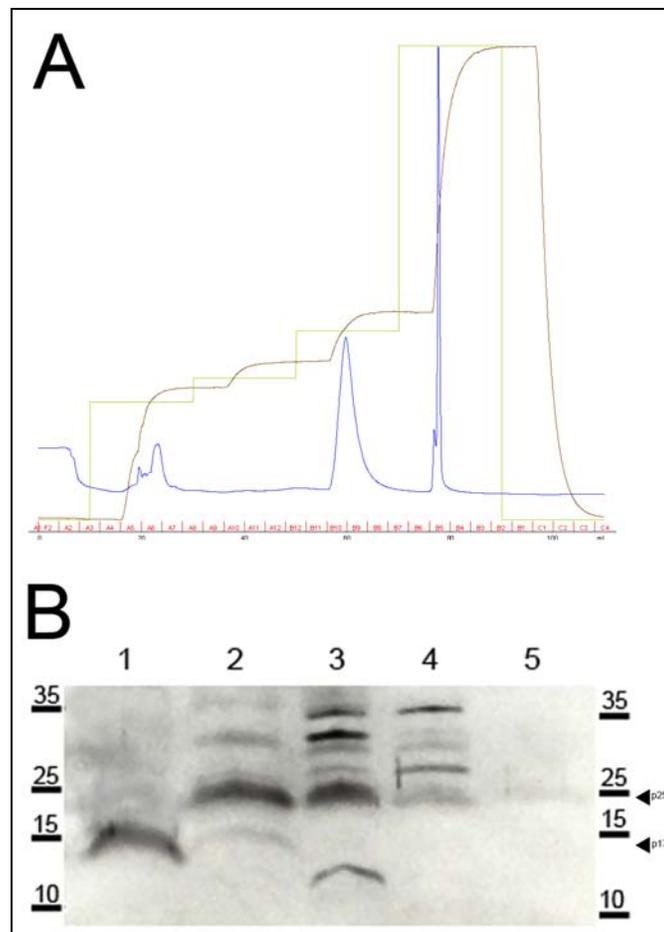


Abbildung 9: CsgA-Reinigung durch Anionenaustausch-Chromatographie. Die Triton X-100-unlösliche Fraktion wurde auf eine MonoQ HR 10/10 aufgetragen und in einem Stufengradienten mit NaCl eluiert. A: Chromatogramm der Reinigung. Die blaue Linie zeigt die Proteinkonzentration anhand der Absorption bei 280 nm, die braune Linie zeigt die elektrische Leitfähigkeit, und die grüne Linie zeigt den Gradienten. B: Western-Blot der vereinigten Fraktionen. 1: 250 mM NaCl-Eluat; 2: 300 mM NaCl-Eluat; 3: 400 mM NaCl-Eluat; 4: 1000 mM NaCl-Eluat; 5: Durchfluß.

Die p17-haltige Fraktion (250 mM NaCl-Eluat) wurde anschließend mittels Gelfiltration über eine FPLC-Säule des Typs Superose 12 10/300 weiter aufgetrennt. Die aufgetragene Probe eluierte in drei größeren Peaks, wobei der zweite Peak der erwarteten molekularen Masse von p17 entsprach. Die entsprechenden Fraktionen wurden wiederum im Western-Blot analysiert, und es konnte gezeigt werden, daß p17 in dem zweiten der drei Peaks vorhanden war.

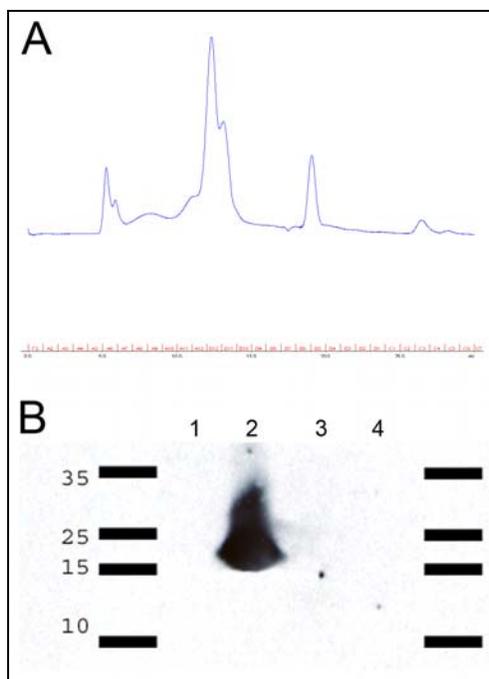


Abbildung 10: CsgA-Reinigung durch Gelfiltration. Die Fraktion 1 nach Chromatographie an der MonoQ-Säule wurde auf eine Superose 12 10/300 aufgetragen und die Proteine nach ihrer Größe getrennt. A: Chromatogramm der Reinigung. Die blaue Linie zeigt die Proteinkonzentration anhand der Absorption bei 280 nm. B: Western-Blot der Fraktionen der vier Peaks der Gelfiltration. Wie erwartet, wurde p17 im zweiten Peak detektiert. Das entsprechende Coomassie-gefärbte Gel ist in Abbildung 11 B zu sehen.

4.1.3 Analyse der gereinigten Fraktionen durch Massenspektrometrie

Die Fraktionen nach den Reinigungsschritten der Anionenaustausch-Chromatographie bzw. nach der Gelfiltration wurden auf SDS-Gele aufgetragen und aufgetrennt. Nach einer Coomassie-Färbung wurden Banden bzw. Bereiche der entsprechenden Größe ausgeschnitten, um anschließend massenspektrometrisch untersucht zu werden.

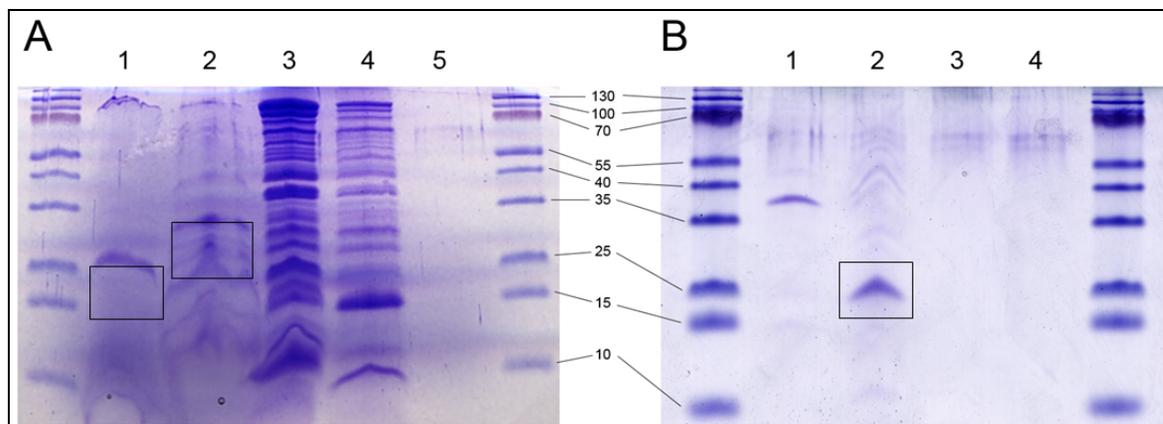


Abbildung 11: Gele der Fraktionen nach MonoQ und Superose 12. A: Fraktionen nach Anionenaustausch-Chromatographie an MonoQ. 1: 250 mM NaCl-Eluat; 2: 300 mM NaCl-Eluat; 3: 400 mM NaCl-Eluat; 4: 1000 mM NaCl-Eluat; 5: Durchfluß. B: Fraktionen der vier Peaks der Gelfiltration an Superose 12 (vgl. Abbildungen 9 B und 10 B). Die markierten Bereiche wurden ausgeschnitten und die enthaltenen Proteine proteolytisch verdaut und analysiert.

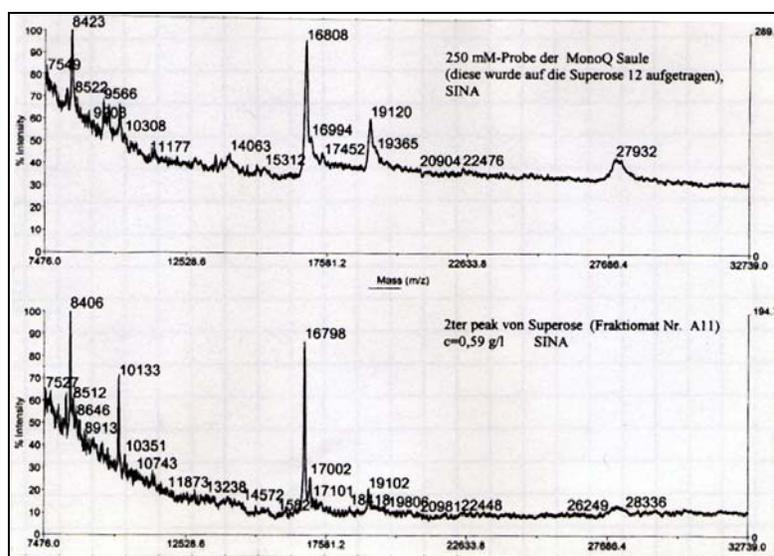


Abbildung 12: Massenspektrometrische Analyse. Oben: Analyse einer ausgeschnittenen Bande aus dem 250 mM NaCl-Eluat nach Anionenaustausch-Chromatographie; unten: Analyse einer ausgeschnittenen Bande aus Peak 2 nach Gelfiltration. In beiden Proben wurden Proteine mit einer molekularen Masse von ca. 16,98 kDa (nach interner Kalibrierung) detektiert.

Es konnten jeweils Proteine mit einer molekularen Masse von etwa 16,98 kDa identifiziert werden (siehe Abbildung 12). Um zu überprüfen, ob es sich um p17 handelt, wurde ein proteolytischer Verdau und eine Peptidmassen-Fingerprint-Analyse durchgeführt. Die Massen passten jedoch nicht zu p25 oder p17, und es konnte kein

Peptidfragment aus CsgA nachgewiesen werden. Für das Protein mit der molekularen Masse von 16,98 kDa konnten 4 Cystein-Reste nachgewiesen werden. CsgA enthält aber nur 2 Cystein-Reste. Analysierte Proteinbanden aus späteren Wiederholungen des Experiments ergaben zwar Treffer, jedoch nie das erwartete CsgA. Die detektierten Peptide und Proteine sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20a: Durch MS nachgewiesene Proteine nach Anionenaustausch-Chromatographie und SDS-PAGE, p17-Fraktion (Spur 1 aus Abbildung 11 A). Proteine wurden im Gel tryptisch verdaut und mittels MS/MS analysiert.

Akzessionsnummer	Annotation	Mascot-score	Signalpeptid	molekulare Masse (kDa)
MXAN6090	hypothetisches Protein	175	nein	34,8
MXAN5931	hypothetisches Protein	86	nein	74,3
MXAN1450	TonB-abhängiger Rezeptor	73	nein	122,4

Tabelle 20b: Durch MS nachgewiesene Proteine nach Anionenaustausch-Chromatographie und SDS-PAGE, p25-Fraktion (Spur 2 aus Abbildung 11 A). Proteine wurden im Gel tryptisch verdaut und mittels MS/MS analysiert.

Akzessionsnummer	Annotation	Mascot-score	Signalpeptid	molekulare Masse (kDa)
MXAN2215	putatives Lipoprotein	1049	nein	53,5
MXAN7089	putatives Lipoprotein	371	ja	22,0
MXAN4860	hypothetisches Protein	313	nein	33,5
MXAN2462	hypothetisches Protein	208	nein	31,1
MXAN7039	putatives Lipoprotein	120	ja	107,3

4.1.4 Reinigung mittels Immunoaffinitäts-Chromatographie

Da die oben beschriebene chromatographische Reinigung von p17 zum einen in einer sehr niedrigen Ausbeute resultierte und zum anderen in den angereicherten Fraktionen kein CsgA durch Massenspektrometrie nachweisbar war, wurde versucht, das Protein alternativ mittels Affinitäts-Chromatographie zu reinigen. Dies wurde wie in Kapitel 3.5.4 beschrieben mit Hilfe von Dynabeads durchgeführt. Verschiedene

Elutionsverfahren wurden ausprobiert, zum Beispiel Elution durch hohe Salzkonzentration und Elution durch einen niedrigen pH-Wert. Jedoch konnte durch keines dieser Elutionsverfahren CsgA im Western-Blot nachgewiesen werden. Deshalb wurden die Beads nach der Inkubation in SDS-Puffer gekocht und das Eluat untersucht. Es konnten unter anderem Proteine mit molekularen Massen von ca. 25 kDa und 17 kDa im SDS-Gel und auch im Western-Blot sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung 13). Durch die anschließende massenspektrometrische Untersuchung der ausgeschnittenen Banden und die Analyse der Peptidfragmente nach einem proteolytischen Verdau konnten jedoch auch hier keine Fragmente von CsgA nachgewiesen werden.

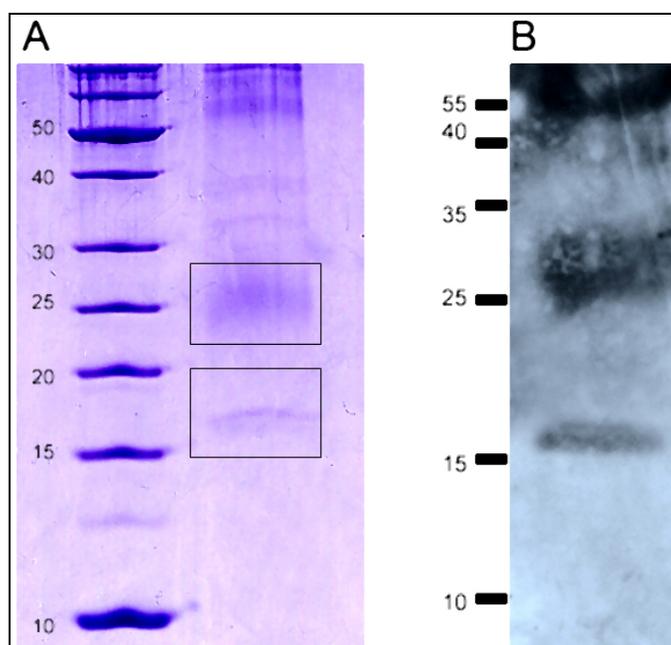


Abbildung 13: Reinigung von CsgA mittels Affinitäts-Chromatographie. Antiserum gegen CsgA wurde mit Protein-A-Dynabeads inkubiert, anschließend wurde eine Fraktion der äußeren Membran hinzugegeben und erneut inkubiert. Die Elution erfolgte durch Kochen der Beads in SDS-Probenpuffer. A: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel; B: Western-Blot mit CsgA-Antikörper. Die markierten Bereiche wurden ausgeschnitten und die enthaltenen Proteine proteolytisch verdaut und analysiert.

Tabelle 21a: Durch MS nachgewiesene Proteine nach Immunoaffinitäts-Chromatographie und SDS-PAGE, p25-Fraktion. Proteine wurden im Gel tryptisch verdaut und mittels MS/MS analysiert.

Akzessionsnummer	Annotation	Mascot-score	Signalpeptid	molekulare Masse (kDa)
MXAN5684	putatives Lipoprotein	147	ja	25,0

MXAN3300	ribosomales Protein RpID	116	nein	22,8
MXAN3556	hypothetisches Protein	50	nein	32,5

Tabelle 21b: Durch MS nachgewiesene Proteine nach Immunoaffinitäts-Chromatographie und SDS-PAGE, p17-Fraktion. Proteine wurden im Gel tryptisch verdaut und mittels MS/MS analysiert.

Akzessionsnummer	Annotation	Mascot-score	Signalpeptid	molekulare Masse (kDa)
MXAN3313	ribosomales Protein RpsH	144	nein	15,3
MXAN7407	hypothetisches Protein	132	nein	21,6
MXAN3305	ribosomales Protein RpsC	109	nein	24,8
MXAN1994	ribosomales Protein RpsL	64	nein	14,9

4.2 Komplementation der *csgA*-Mutante

Um zu untersuchen, welcher Teil von CsgA für die Funktion als C-Signal und für die Translokation notwendig ist, wurden Fusionsproteine mit unterschiedlich langem CsgA-Anteil (entsprechend p25, p18,1 und p17,8) in DK5208 produziert. Da der Export in die äußere Membran auch in den verkürzten CsgA-Konstrukten sichergestellt werden muß, wurden andere Translokations-Signale verwendet. Die CsgA-Konstrukte wurden als Fusionen mit den Signalpeptiden der Lipoproteine AgIU und Tgl produziert (Rodriguez-Soto & Kaiser, 1997; White & Hartzell, 2000).

4.2.1 Komplementation durch CsgA mit N- und C-terminalen Affinitäts-Tags

Zum Zweck einer einfacheren Reinigung von CsgA als nativem Protein aus *Myxococcus xanthus* wurden Fusionen mit verschiedenen Affinitätstags konstruiert. Die Gene wurden jeweils am N- oder am C-Terminus mit einem His- bzw. einem Strep-Tag versehen und in einem Vektor unter Kontrolle des *csgA*-Promotors exprimiert (pSW150-pSW153). Die Integration in das Genom von DK5208 erfolgte über die Mx8-Stelle. Die entsprechenden Stämme wurden auf ihre Fähigkeit zur Aggregation und Fruchtkörperbildung sowie auf die Produktion von CsgA untersucht.

Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, war die Mutante RH1032 (bzw. RH1048, welche RH1032, bis auf die angepasste Codon-Usage für das His-Tag, entspricht) zur

Fruchtkörperbildung auf TPM-Agar und in Flüssigkultur fähig, nicht jedoch auf CF-Agar. Bei dieser Mutante handelt es sich um eine Komplementation durch *csgA* mit einem N-terminalen His-Tag. Die anderen drei Mutanten waren auf keinem der getesteten Medien in der Lage, Fruchtkörper zu bilden. Die Sporulationseffizienz von RH1048 nach einer Entwicklung in Flüssigkultur für 120 Stunden betrug 86% der Effizienz des Wildtyps. Die Produktion von CsgA wurde getestet und es konnte gezeigt werden, daß nur eine Komplementation mit einem N-terminalen His-Tag zur Produktion von CsgA führte (siehe Abbildung 15). Um sicherzugehen, daß CsgA in RH1048 korrekt lokalisiert ist, wurden Zellen in Flüssigkultur für 18 Stunden dem Hungerzustand ausgesetzt und anschließend geerntet, um wie in 3.5.2 beschrieben fraktioniert zu werden. Die einzelnen Fraktionen wurden auf die Anwesenheit von CsgA untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß p25 und p17 in dem Zellextrakt und in der Fraktion der äußeren Membran vorhanden war. Somit erfolgen also die Produktion und die Lokalisation von CsgA wie im Wildtyp.

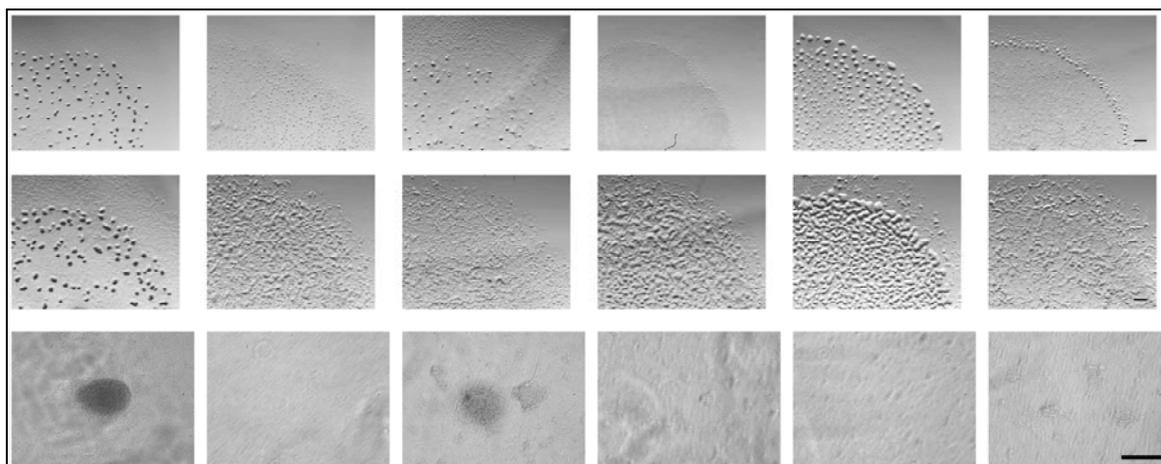


Abbildung 14: Phänotypen von RH1032 bis RH1035. obere Reihe: Entwicklung auf TPM-Agar; mittlere Reihe: Entwicklung auf CF-Agar; untere Reihe: Entwicklung in Flüssigkultur; V.l.n.r.: DK1622 (Wildtyp), DK5208 (*csgA*), RH1032 (N-term. His-Tag), RH1033 (N-term. Strep-Tag), RH1034 (C-term. His-Tag), RH1035 (C-term. Strep-Tag); Die Maßstabsbalken entsprechen 500 µm (obere und mittlere Reihe) bzw. 100 µm (untere Reihe). Die Bilder wurden 24 Stunden nach Beginn des Hungerzustands aufgenommen.

Da die Komplementation mit C-terminalen Affinitäts-Tags keinen Erfolg brachte, und N-terminale Tags nicht zur Reinigung von p17 geeignet sind, wurden zusätzlich Komplementationsmutanten mit internen His-Tags hergestellt. Hierzu wurde in einem Homologie-Modell von CsgA nach Loops gesucht, in die man zusätzliche Aminosäuren

einbauen kann, ohne möglicherweise die Funktion des Proteins zu beeinträchtigen. Die Mutanten waren aber allesamt nicht zur Aggregation fähig, weshalb nicht weiter auf deren Charakterisierung eingegangen wurde.

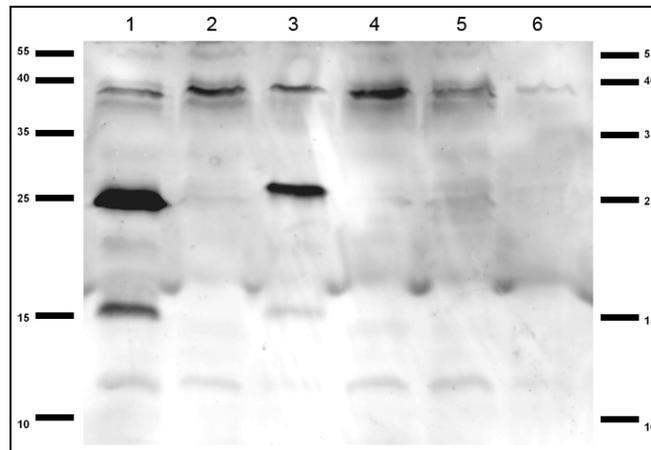


Abbildung 15: Produktion von CsgA in Komplementationsmutanten. Zellen wurden für 18 Stunden entwickelt, geerntet und in SDS-Probenpuffer lysiert. Die Detektion erfolgte mit CsgA-Antiserum. 1: DK1622 (Wildtyp); 2: DK5208 (*csgA*⁻); 3: RH1048 (N-term. His-Tag); 4: RH1033 (N-term. Strep-Tag); 5: RH1034 (C-term. His-Tag); 6: RH1035 (C-term. Strep-Tag).

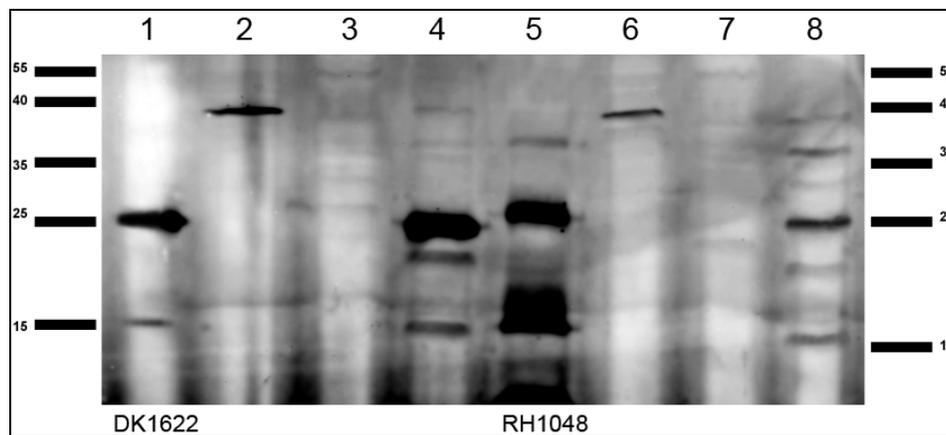


Abbildung 16: Produktion von CsgA in Fraktionen von RH1048. Zellen wurden für 18 Stunden entwickelt, geerntet und wie in 3.5.2 beschrieben fraktioniert. 1-4: DK1622 (Wildtyp); 5-8: RH1048 (N-term. His-Tag); 1+5: Gesamt-Zellextrakt; 2+6: lösliche Fraktion; 3+7: Triton X-100-lösliche Fraktion (innere Membran); 4+8: Triton X-100-unlösliche Fraktion (äußere Membran). Es wurden 3 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen.

Tabelle 22: Loops für die Insertion von His-Tags.

Interner Loop	Stamm	Aminosäure-Sequenz
1	RH1049	...VCTGP-HHHHHH-VDVLI...
2	RH1050	...CALGD-HHHHHH-VDYAD...
3	RH1051	...LAANT-HHHHHH-DGGAY...
4	RH1052	...DMGGP-HHHHHH-DATLP...

4.2.2 Komplementation mit AgIU- und Tgl-Fusionsproteinen

Es wurde zunächst ein Vektor konstruiert, welcher die Expression eines Zielgens unter Kontrolle des konstitutiv aktiven *pilA*-Promotors ermöglichte. Hierzu wurde die Region von 1000 bp upstream von *pilA* in den Vektor pSWU19 kloniert, welcher für die Neomycin-Phosphotransferase kodiert und die Mx8-Phagen-Integrationsstelle trägt. Der entstandene Vektor war pSW105. Die Sequenzen für die Signalpeptide von AgIU und von Tgl waren auf Primern vorhanden und wurden über diese in pSW105 eingefügt. Danach erfolgte die Klonierung der verschieden langen Versionen von *csgA*. Die so konstruierten Vektoren wurden in DK5208 transformiert und integrierten über die Phagen-Attachmentsite in das Genom. Die Mutanten wurden auf ihre Fähigkeit zur Entwicklung und mittels Western-Blot auf die Produktion von CsgA untersucht.

Die einzige der Fusionen, welche die Entwicklung in DK5208 komplementieren konnte, war die des AgIU-Signalpeptids mit p25. Alle Fusionsproteine mit dem Signalpeptid aus Tgl und alle Fusionsproteine mit p18,1 oder p17,8 konnten den Entwicklungsdefekt nicht komplementieren. Lediglich die Komplementation mit SP_{Tgl}-p25 zeigte eine leichte Aggregation, allerdings nur auf TPM-Agar. In Abbildung 17 sind die entsprechenden Phänotypen der Mutanten zu sehen.

Dieselben Komplementationen wurden auch mit Konkatameren der entsprechenden Plasmide durchgeführt, die durch Transformation in *Escherichia coli* TG1 entstanden sind (RH1013 bis RH1018). Dadurch lagen die Gene, welche für die Fusionsproteine kodieren, in mehrfacher Kopienzahl vor. Die Phänotypen dieser Mutanten entsprachen denen der gezeigten Mutanten, die die entsprechenden Gene nur in einfacher Kopie trugen. Weiterhin wurden Mutanten erzeugt, in denen die konservierten Cystein-Reste am C-terminalen Ende der Signalpeptide von AgIU bzw.

Tgl durch Alanin-Reste ersetzt waren. Jedoch hatte die Substitution der Cystein-Reste keine Änderung der Phänotypen zur Folge.

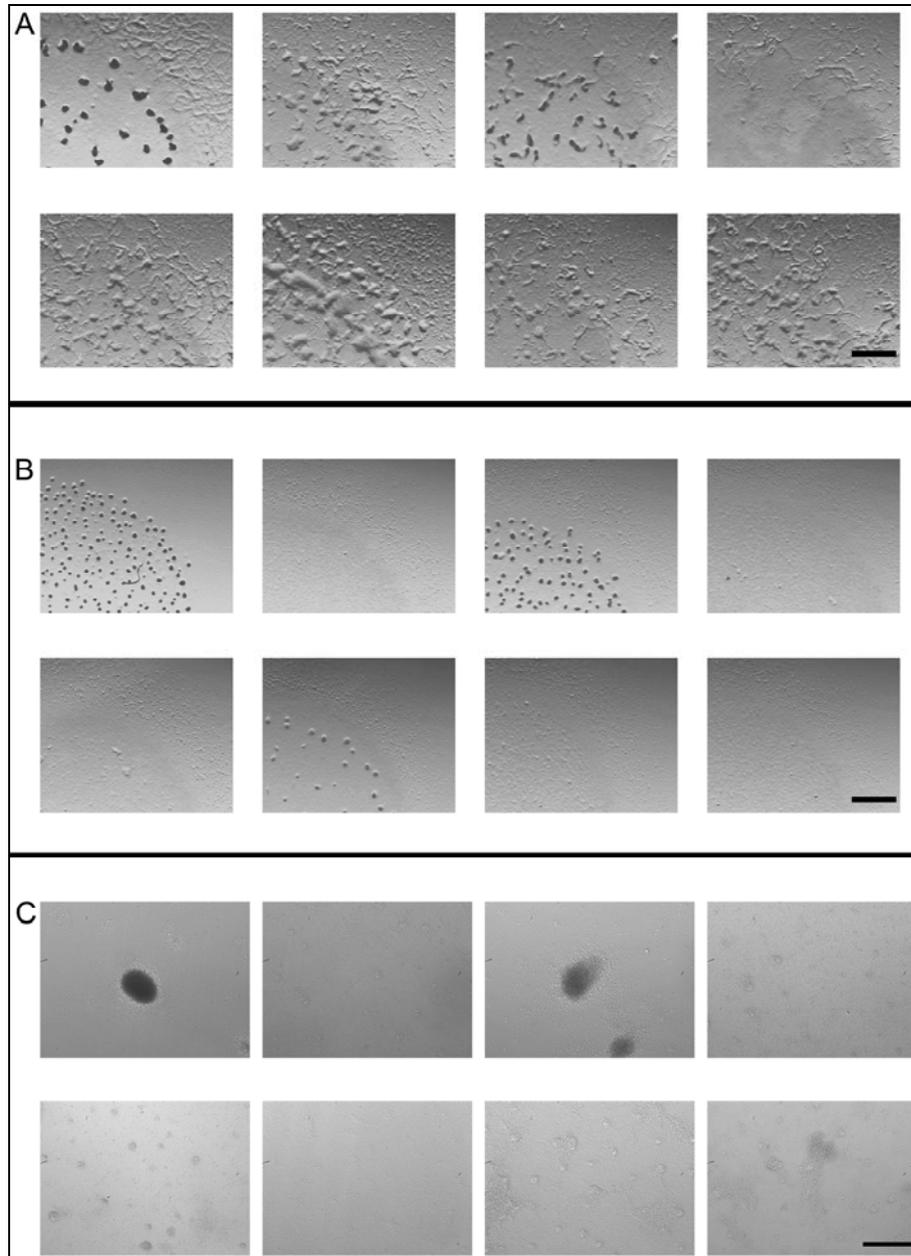


Abbildung 17: Phänotypen von RH1001 bis RH1006. A: Entwicklung auf CF-Agar. Obere Reihe v.l.n.r.: DK1622 (Wildtyp), DK5208 (*csgA*), RH1001 (SP_{AglU} -p25), RH1002 (SP_{AglU} -p18). Untere Reihe v.l.n.r.: RH1003 (SP_{AglU} -p17,8), RH1004 (SP_{Tgl} -p25), RH1005 (SP_{Tgl} -p18,1), RH1006 (SP_{Tgl} -p17,8); B: Entwicklung auf TPM-Agar. Die Maßstabsbalken in A und B entsprechen 500 μ m; C: Entwicklung in Flüssigkultur. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Die Bilder wurden 72 Stunden nach Beginn des Hungerzustands aufgenommen.

Neben den Phänotypen wurde auch die Produktion der CsgA-Fusionsproteine untersucht (siehe Abbildung 18). Es konnte gezeigt werden, daß CsgA in den meisten Mutanten gebildet wurde, unter anderem auch als p25 in RH1013 (SP_{AglU}-p25). Dies war zu erwarten, da diese Mutante zur Fruchtkörperbildung fähig war. Jedoch konnte hier kein p17 detektiert werden. In RH1014 (SP_{AglU}-p18,1) und RH1015 (SP_{AglU}-p17,8) konnte kein CsgA nachgewiesen werden. In den Stämmen, die CsgA als Fusion mit dem Signalpeptid von Tgl trugen, konnte CsgA in den Größen von ca. 25 kDa, ca. 18 kDa und ca. 17 kDa nachgewiesen werden.

Da mit diesem Experiment nicht gezeigt werden konnte, daß verkürzte Versionen von CsgA die Fruchtkörperbildung komplementieren können, wurden keine weiteren Experimente hierzu durchgeführt. Die Lokalisation von CsgA in den Mutanten wurde nicht untersucht.

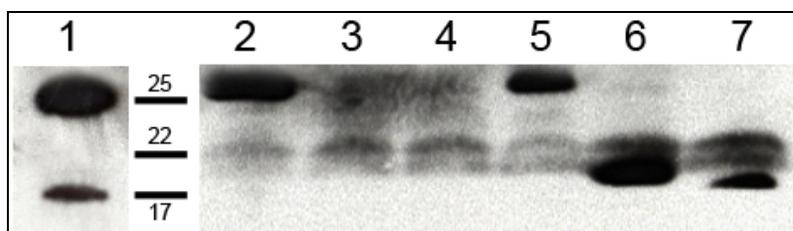


Abbildung 18: Produktion von CsgA in Komplementations-Mutanten. Zellen wurden nach 21-stündiger Entwicklung geerntet und in SDS-Probenpuffer lysiert. 1: DK1622 (Wildtyp); 2: RH1013 (SP_{AglU}-p25); 3: RH1014 (SP_{AglU}-p18,1); 4: RH1015 (SP_{AglU}-p17,8); 5: RH1016 (SP_{Tgl}-p25); 6: RH1017 (SP_{Tgl}-p18,1); 7: RH1018 (SP_{Tgl}-p17,8).

4.3 Auswahl verschiedener Ser/Thr-Proteinkinasen für die Mutagenese

Ausgehend von der Möglichkeit, daß Ser/Thr-Proteinkinasen eine Funktion in der Weiterleitung eines Signals über die Zellhülle hinweg besitzen könnten, wurde der genetische Kontext der 99 Ser/Thr-Proteinkinasen in *M. xanthus* genauer betrachtet. Dabei wurde überprüft, welche Gene in der Nachbarschaft zu Genen für Ser/Thr-Proteinkinasen kodieren, und in welchem Abstand die entsprechenden offenen Leserahmen zueinander liegen, da Proteine, die in einer gemeinsamen Transkriptionseinheit kodiert werden, oft auch funktionell am selben zellulären Prozeß beteiligt sind. Daraus wurde auf mögliche Transkriptionseinheiten geschlossen. Die

Sequenzen der entsprechenden Proteine wurden mit verschiedenen Vorhersage-Programmen untersucht, um herauszufinden, ob es sich um Proteine der inneren (aufgrund Transmembran-Helices) oder der äußeren (aufgrund der Vorhersage von β -Barrel-Strukturen) Membran handelt. Die ausgewählten Kandidaten und die Gene in möglichen Transkriptionseinheiten mit diesen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 23: Kandidaten-Gene von Ser/Thr-Proteinkinasen für die Mutagenese. STPK steht für Ser/Thr-Proteinkinase. TMH steht für Transmembran-Helix. OMP steht für Protein der äußeren Membran.

STPK-Gene	TM-Helices	Gene in möglichen Transkriptionseinheiten
MXAN4557	1 (?)	Tetratricopeptid-Repeat-Protein (1 TMH?) TonB-abhängiger Rezeptor (OMP) Ser/Thr-Phosphatase, HAMP-Domäne (2 TMH) 5 hypothetische Proteine (eines davon mit 1 TMH)
MXAN3092	keine	Oligopeptid-Transporter, OPT-Familie (13 TMH) STPK 2 hypothetische Proteine
MXAN2059	1	Hydrolase LysM-Domänen-Protein HAMP/HD-Domänen-Protein 2 hypothetische Proteine (eines davon mit 1 OMP?)
MXAN0552	1	Transkriptions-Regulator GntR Ser/Thr-Phosphatase ABC-Transporter, Permease (6 TMH) und ABC-Transporter, ATP-Bindeprotein (OMP?) 3 hypothetische Proteine
MXAN6570	1	Eisen-Bindeprotein (1 TMH) Eisen-Transportprotein, FecCD-Familie (8 TMH) Fe-S-Cluster-Bindeprotein, Rieske-Familie FHA/GAF-Domänen-Protein ABC-Transporter, Permease (13 TMH) und ABC-Transporter, ATP-Bindeprotein 3 putative Lipoproteine

MXAN6545	1	Ser/Thr-Phosphatase TonB-abhängiger Rezeptor (OMP) Transkriptions-Regulator / Repressor, ROK-Familie Glycosyl-Hydrolase ABC-Transporter, Permease (6 TMH, OMP?) und ABC-Transporter, ATP-Bindeprotein (5 TMH) 3 hypothetische Proteine (eines davon mit 1 TMH)
MXAN6043	1 (?)	TonB-abhängiger Rezeptor (OMP) Response-Regulator Putatives Lipoprotein

4.4 Charakterisierung von Mutanten der Ser/Thr-Proteinkinase MXAN4557

Nach Inaktivierung der oben erwähnten und für die Mutagenese ausgewählten Gene durch Insertions- und Deletionsmutagenese und Untersuchung der resultierenden Phänotypen stellten sich zwei der entsprechenden Proteine als essentiell für die Fruchtkörperbildung heraus – MXAN4557 und MXAN6570. Die Kinase MXAN4557, welche in einem möglichen Operon mit einem TonB-abhängigen Rezeptor kodiert wird, soll im folgenden näher beschrieben werden.

4.4.1 Konstruktion der Mutanten

Um MXAN4557 zu inaktivieren, wurde zum einen eine Insertionsmutante wie in 3.3.5 beschrieben hergestellt. Das entsprechende Plasmid pSW136 wurde in DK1622 transformiert, wo es in das Gemon rekombinierte. Der resultierende Stamm war RH1025. Zum anderen wurde auch eine in-frame-Deletionsmutante von MXAN4557 konstruiert. Das Plasmid pSW155 wurde in DK1622 transformiert und die Mutante wie in 3.3.6 beschrieben konstruiert. Der entstandene Stamm mit der Deletion von MXAN4557 trägt die Bezeichnung RH1043.

4.4.2 Untersuchung der Entwicklungs-Phänotypen der Mutanten von MXAN4557

Die Insertionsmutante RH1025 wurde wie in 3.4.5 beschrieben auf ihre Fähigkeit zur Fruchtkörperbildung untersucht. Der Stamm konnte sowohl auf CF- und TPM-Agar als auch in Flüssigkultur normale Fruchtkörper bilden. Darüberhinaus fand die Entwicklung nicht zeitlich verzögert oder beschleunigt statt.

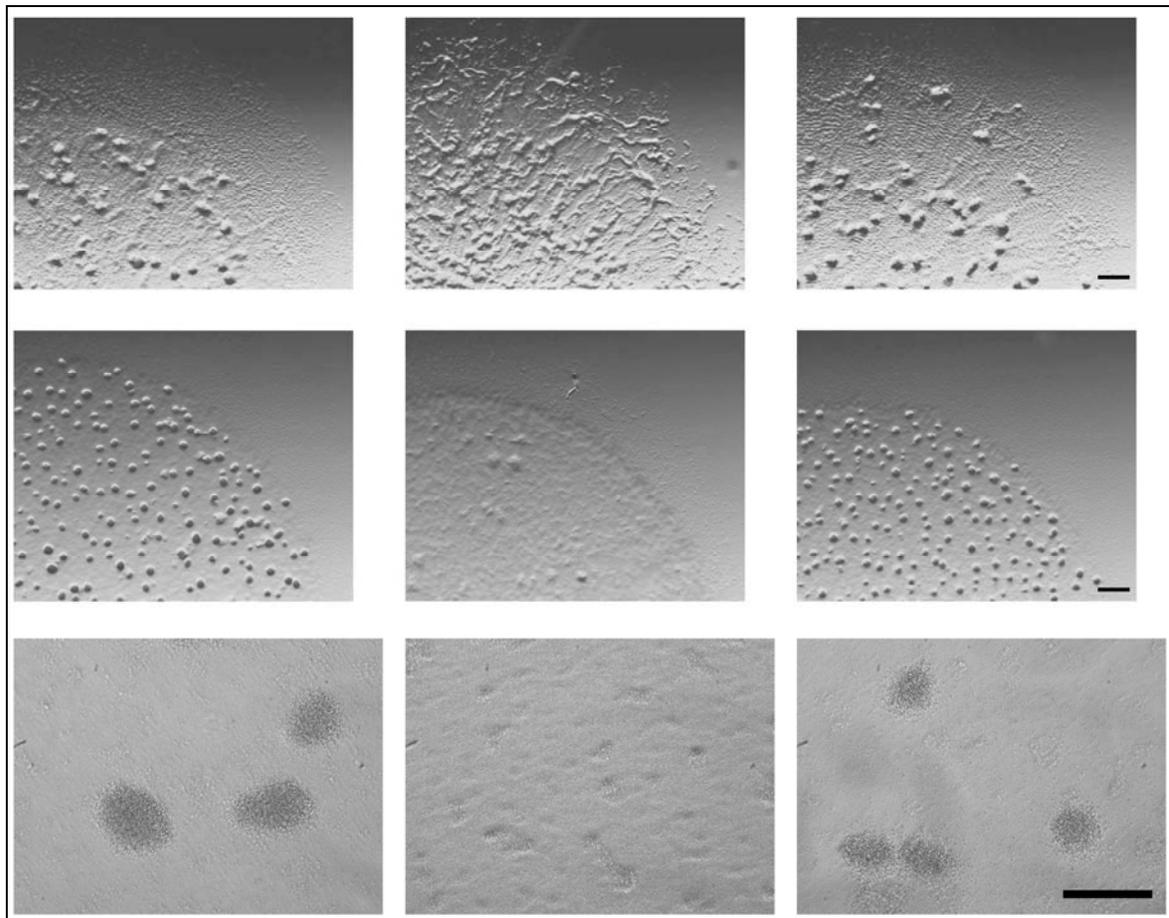


Abbildung 19: Phänotypen der Insertionsmutante von MXAN4557. Obere Reihe: Entwicklung auf CF-Agar; mittlere Reihe: Entwicklung auf TPM-Agar; untere Reihe: Entwicklung in Flüssigkultur; links: DK1622 (Wildtyp); mitte: DK5208 (*csgA*⁻); rechts: RH1025 (*MXAN4557*). Der Maßstabsbalken entspricht 500 μ m (obere und mittlere Reihe) bzw. 100 μ m (untere Reihe). Die Bilder wurden 24 Stunden nach Beginn des Hungerzustands aufgenommen.

Die in-frame-Deletionsmutante RH1043 wurde ebenfalls auf ihre Fähigkeit zur Fruchtkörperbildung untersucht. Der Stamm war auf keinem der getesteten Medien in der Lage, normale Fruchtkörper zu bilden. Auch nach einer längeren Inkubationsdauer (bis zu 120 Stunden) erfolgte keine Aggregation.

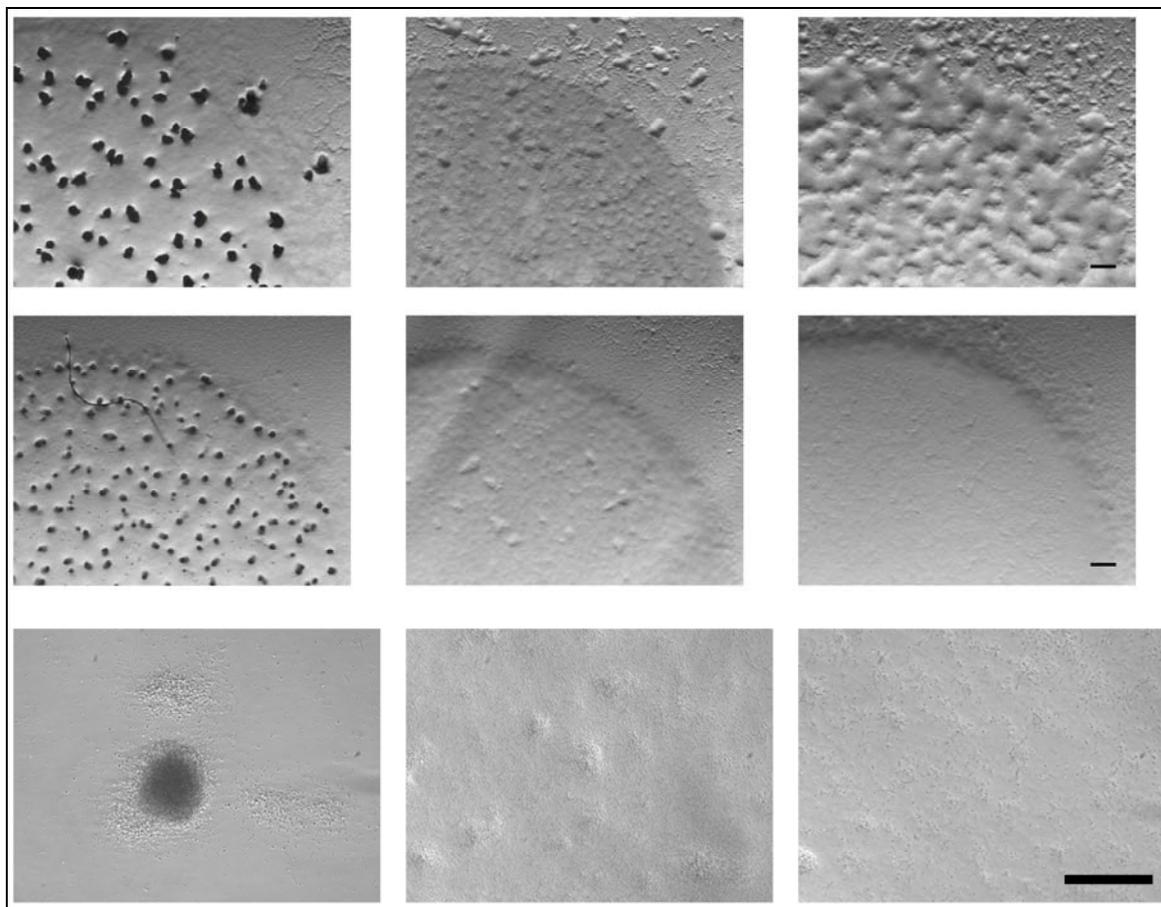


Abbildung 20: Phänotypen der Deletionsmutante von MXAN4557. Obere Reihe: Entwicklung auf CF-Agar; mittlere Reihe: Entwicklung auf TPM-Agar; untere Reihe: Entwicklung in Flüssigkultur; links: DK1622 (Wildtyp); mitte: DK5208 (*csgA*); rechts: RH1043 (Δ *MXAN4557*). Der Maßstabsbalken entspricht 500 μ m (oben und mitte) bzw. 100 μ m (unten). Die Bilder wurden 120 Stunden nach Beginn des Hungerzustands aufgenommen.

4.4.3 Untersuchung der Sporulation

Die Bestimmung der Sporulationseffizienz erfolgte nach der Beschreibung in Kapitel 3.4.3. Da die Zellernte aus Flüssigkultur deutlich besser und vollständiger funktionierte als das Abkratzen von einer Agaroberfläche, wurden die Assays zur Untersuchung der Sporulation mit Zellen durchgeführt, die in Flüssigkultur dem Nährstoffmangel ausgesetzt waren. Die Sporulationseffizienz von DK1622 wurde auf den Wert 100% festgesetzt und die Werte der Mutanten relativ dazu angegeben. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst.

Tabelle 24: Sporulationseffizienz nach 72 Stunden. 100% entsprechen $5,6 \times 10^3$ ausgekeimten Sporen von $6,25 \times 10^6$ in den Assay eingesetzten und auf das Volumen eines Tropfen bezogenen Zellen.

Stamm	DK1622 (Wildtyp)	DK5208 (<i>csgA</i>)	RH1025 (Insertion)	RH1043 (Deletion)
Sporulations-effizienz	100%	< 0,1%	nicht bestimmt	< 0,1%

Tabelle 25: Sporulationseffizienz nach 120 Stunden. 100% entsprechen $1,1 \times 10^4$ ausgekeimten Sporen von $6,25 \times 10^6$ in den Assay eingesetzten und auf das Volumen eines Tropfen bezogenen Zellen.

Stamm	DK1622 (Wildtyp)	DK5208 (<i>csgA</i>)	RH1025 (Insertion)	RH1043 (Deletion)
Sporulations-effizienz	100%	< 0,1%	7%	< 0,1%

4.4.4 Untersuchung der Motilitäts-Phänotypen

Da sich Defekte in der Motilität auch auf die Fähigkeit zur Aggregation und Fruchtkörperbildung auswirken, musste ausgeschlossen werden, daß der beobachtete Entwicklungsphänotyp auf Beeinträchtigungen der Motilität zurückzuführen sind. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Mutanten von MXAN4557 dieselbe Motilität zeigten wie der Wildtyp, also A- und S-System normal funktionierten.

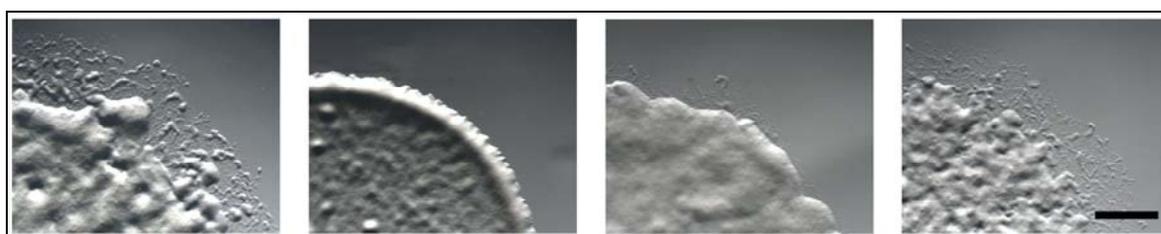


Abbildung 21: Phänotyp der Motilität von RH1043. Zellen wurden in einem Motilitäts-Assay auf Hartagar untersucht. Nach einer 24-stündigen Wachstumsphase wurden die Ränder der Kolonien fotografiert. V.l.n.r.: DK1622 (Wildtyp); DK1217 (A-Mutante); DK1300 (S-Mutante); RH1043 (Δ MXAN4557). Der Maßstabsbalken entspricht 500 μ m.

4.4.5 Transkriptionelle Regulation der Kinase MXAN4557

Um die Transkription der Kinase MXAN4557 selbst zu untersuchen, wurde cDNA aus Zellen, die nach bestimmten Zeitpunkten während des Entwicklungsprozesses geerntet wurden, hergestellt. Es erfolgte eine quantitative real-time PCR, mit der die Transkriptmengen bestimmt wurden. Die Messwerte wurden auf die Transkriptmenge von vegetativen Zellen bezogen, welche den Wert 1 erhielten. Es konnte gezeigt werden, daß MXAN4557 während des Hungerzustands weder im Wildtyp, noch in der *csgA*-Mutante signifikant reguliert wird.

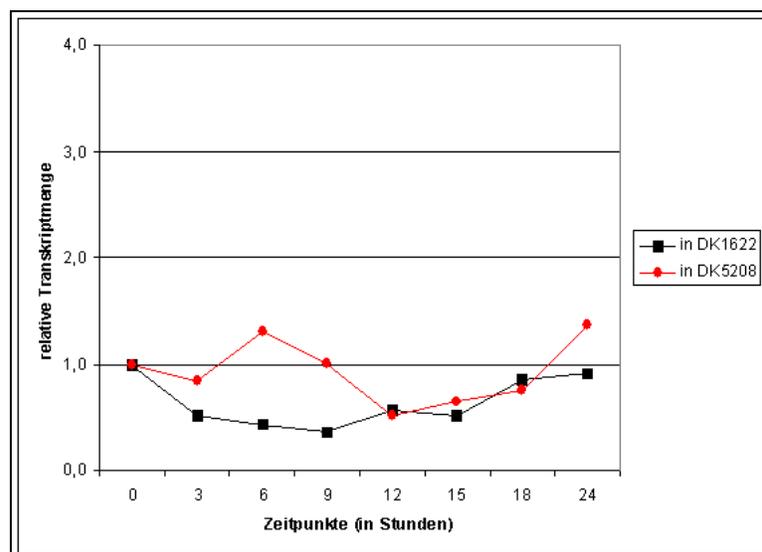


Abbildung 22: Transkriptionelle Regulation von MXAN4557. cDNA von Zellen aus verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Hungerzustands wurde untersucht. Die schwarzen Quadrate kennzeichnen die Transkriptmengen in DK1622 (Wildtyp), die roten Kreise kennzeichnen die Transkriptmengen in DK5208 (*csgA*).

4.4.6 Transkriptionelle Regulation von Marker-Genen

Um einzugrenzen, in welchem Teil des Signaltransduktions-Netzwerks die Ser/Thr-Proteinkinase MXAN4557 aktiv ist, wurde die Transkription verschiedener Marker-Gene getestet. Es handelte sich dabei um *spi*, einem frühen A-Signal-abhängigen Gen, um den Sporulations-Marker *exo* und um *sdeK*, eine Histidin-Proteinkinase, die in einem Seitenweg der Signaltransduktion beteiligt ist und vermutlich in der Phosphorylierung von FruA mündet.

Die Transkription des Gens *spi* wird bereits kurz nach Eintritt in die Hungerphase deutlich hoch reguliert und fällt danach nur leicht ab. Diese Regulation ist im Wildtyp (DK1622) am stärksten, jedoch auch in der *csgA*-Mutante (DK5208) und in RH1043 (Δ *MXAN4557*) zu beobachten. Somit ist *MXAN4557* nicht vom A-Signal abhängig.

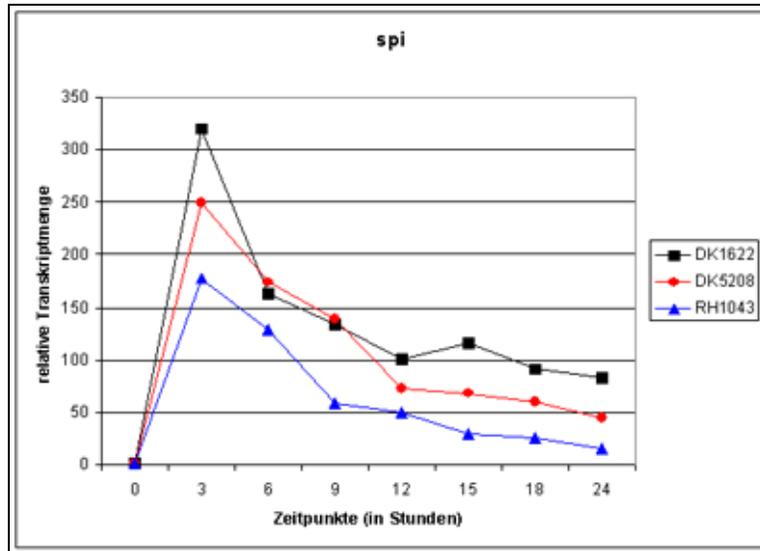


Abbildung 23: Transkription von *spi* in RH1043. Schwarze Quadrate repräsentieren die Transkription im Wildtyp, rote Kreise die in der *csgA*-Mutante (DK5208) und blaue Dreiecke zeigen die Transkription in der Deletionsmutante von *MXAN4557* (RH1043).

Die Transkription von *exo* wird erst in einem späten Entwicklungsstadium hoch reguliert. Jedoch geschieht dies nur im Wildtyp. In RH1043 unterbleibt die Regulation von *exo*, genauso auch in DK5208 (*csgA*). Dies ist in Abbildung 24 gezeigt.

sdeK wird im Wildtyp in den ersten 15 Stunden nach Eintritt in die Hungerphase kontinuierlich hoch, später dann leicht nach unten reguliert. In RH1043 ist nach Beginn des Hungerzustands zwar auch eine höhere Transkriptmenge von *sdeK* zu beobachten, allerdings ist diese noch deutlich unter dem Niveau im Wildtyp. Überraschenderweise trifft dies auch für die *csgA*-Mutante DK5208 zu (siehe Abbildung 25).

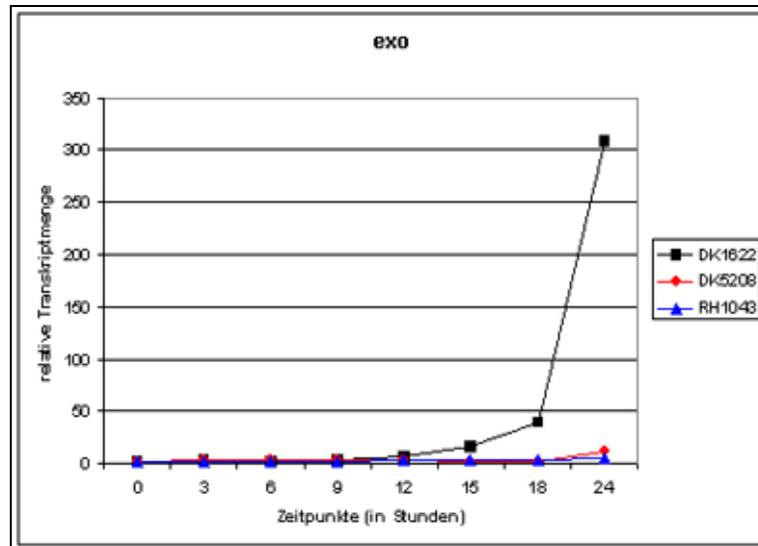


Abbildung 24: Transkription von *exo* in RH1043. Schwarze Quadrate repräsentieren die Transkription im Wildtyp, rote Kreise die in der *csgA*-Mutante (DK5208) und blaue Dreiecke zeigen die Transkription in der Deletionsmutante von MXAN4557 (RH1043).

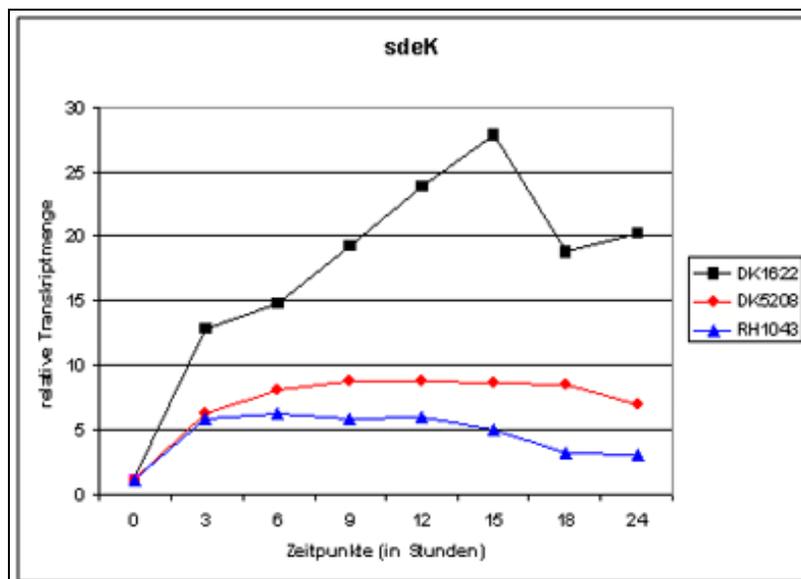


Abbildung 25: Transkription von *exo* in RH1043. Schwarze Quadrate repräsentieren die Transkription im Wildtyp, rote Kreise die in der *csgA*-Mutante (DK5208) und blaue Dreiecke zeigen die Transkription in der Deletionsmutante von MXAN4557 (RH1043).

4.4.7 Produktion von Marker-Proteinen

Neben der bereits erwähnten Transkription von bestimmten Genen wurde auch die Produktion von CsgA und FruA in den Deletionsmutanten untersucht. Es konnte für

RH1043 gezeigt werden, daß CsgA (p25 und p17) in etwas niedrigerer Konzentration vorliegt als im Wildtyp. FruA hingegen wird normal produziert, lediglich der leichte Rückgang von FruA in der späten Phase der Entwicklung ist in RH1043 nicht zu beobachten. Die Lokalisation von CsgA wurde ebenfalls getestet und es konnte gezeigt werden, daß p25 und p17 in der äußeren Membran lokalisiert sind (nicht gezeigte Daten).

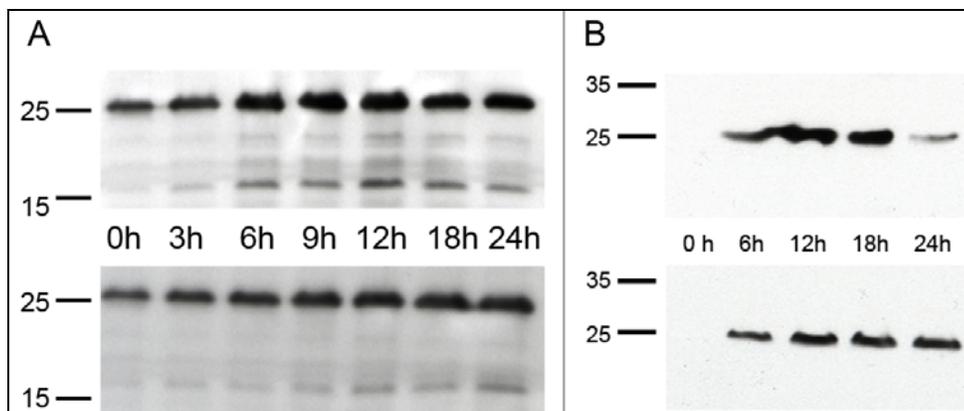


Abbildung 26: Produktion von Marker-Proteinen in RH1043. A: Produktion von CsgA; B: Produktion von FruA; Es wurden Zellen in Flüssigkultur entwickelt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Hungerzustands geerntet, in SDS-Probenpuffer lysiert und mittels Western-Blot untersucht. Jeweils obere Reihe: DK1622 (Wildtyp); untere Reihe: RH1043 (Δ MXAN4557).

4.4.8 Methylierung von FrzCD

Da die Methylierung von FrzCD entscheidenden Einfluß auf das Bewegungsverhalten der Zellen hat, indem sie die Häufigkeit der Zellrichtungswechsel verringert und somit essentiell für die Fruchtkörperbildung ist, wurde sie in den Kinase-Mutanten untersucht.

In Abbildung 27 sind diese Western-Blots gezeigt. Man erkennt verschiedene Banden, welche den unterschiedlichen Methylierungsgraden von FrzCD entsprechen. Methyliertes Protein wandert schneller durch das Gel, weshalb die unteren Banden dem einfach bzw. mehrfach methylierten FrzCD entsprechen.

Zu erkennen sind die verschiedenen Methylierungsgrade und das Verschwinden von unmethyliertem FrzCD nach etwa 6 Stunden Entwicklung in DK1622. Dies ist in der *fruA*-Mutante als Negativkontrolle und in RH1043 erst ab etwa 9 Stunden zu erkennen. Man erkennt auch, daß die untere Bande, welche dem methylierten FrzCD entspricht,

im Wildtyp geringfügig stärker ist als in SA1465 und in RH1043. Da die Trennung der einzelnen Banden schwer zu bewerkstelligen ist, wäre zu überlegen, ob das Experiment nochmals durchgeführt werden sollte.

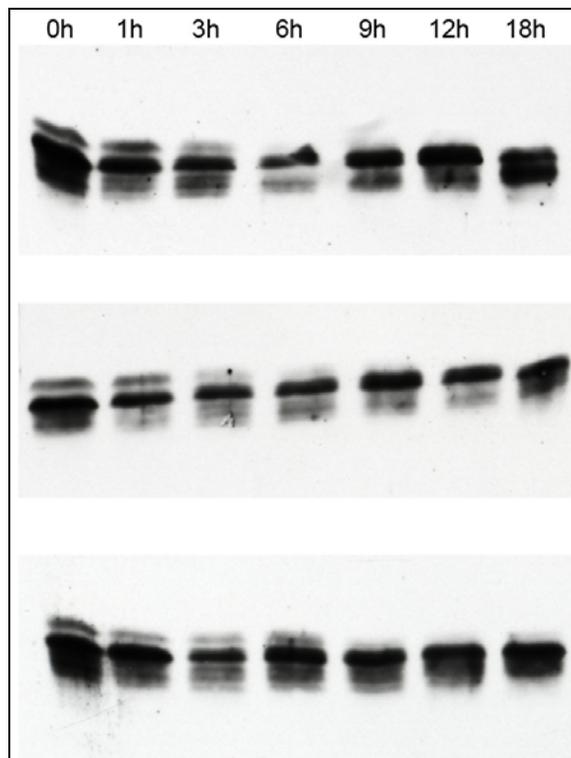


Abbildung 27: FrzCD-Methylierung in RH1043. obere Reihe: Wildtyp; mittlere Reihe: SA1465 (*fruA*); untere Reihe: RH1043 (*MXAN4557*); Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Eintritt in die Hungerphase geerntet, in SDS-Probenpuffer lysiert, wie in (McCleary et al., 1990) beschrieben auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und FrzCD mit spezifischen Antikörpern detektiert.

4.4.9 Genetischer Kontext von *MXAN4557*

Die genomische Organisation wurde mittels PCR auf cDNA aus Zellen vor und während der Entwicklung untersucht. Diese wurde wie in 3.3.12 beschrieben hergestellt. Es wurden Primer abgeleitet, um Fragmente innerhalb eines Leserahmens und Fragmente, die überlappende Bereiche zwischen zwei Leserahmen abdecken, amplifizieren zu können. Anschließend wurde eine PCR durchgeführt. Falls zwei Gene auf demselben Transkript liegen, muß es möglich sein, den Bereich zwischen den beiden offenen Leserahmen zu amplifizieren. Liegen die beiden Gene auf verschiedenen Transkripten, wäre keine Amplifikation möglich.

Das Gen, welches für die Kinase MXAN4557 kodiert, bildet eine Transkriptionseinheit mit dem Gen für den TonB-abhängigen Rezeptor MXAN4559 sowie mit dem Gen für das hypothetische Protein MXAN4558. Somit bilden diese drei Gene eine Transkriptionseinheit. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß sich upstream davon ein weiteres Operon befindet, welches für das hypothetische Protein MXAN4560 und das Tetratricopeptid-Protein MXAN4561 kodiert. Dieses ist möglicherweise an der Bildung von Multi-Protein-Komplexen beteiligt. Weiterhin kodiert dieses Operon für die Ser/Thr-spezifische PP2C-Phosphatase MXAN4562 (siehe Abbildung 28).

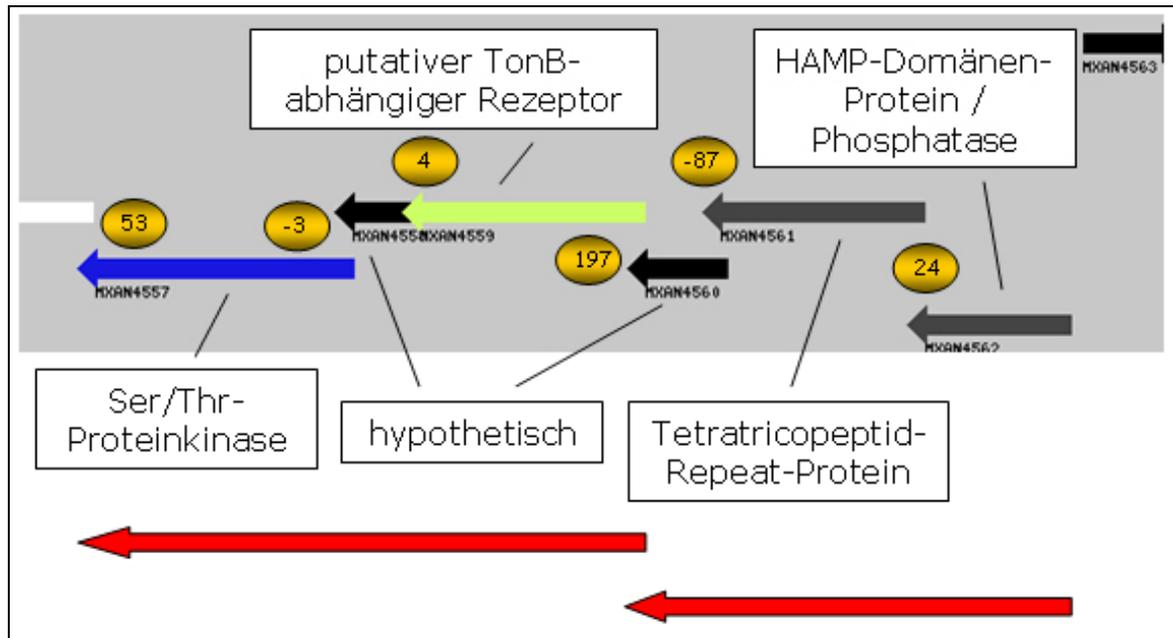


Abbildung 28: Genetischer Kontext von MXAN4557. Die bunten Pfeile symbolisieren die offenen Leserahmen, die roten Pfeile repräsentieren Transkriptionseinheiten. Die gelb hinterlegten Zahlen geben den Abstand zwischen den offenen Leserahmen in Basenpaaren an (aus www.tigr.org).

4.4.10 Charakterisierung benachbart kodierter Proteine

Die in-frame-Deletionsmutanten der Phosphatase MXAN4562 (RH1066) und des TonB-abhängigen Rezeptors MXAN4559 (RH1070) wurden hergestellt und auf ihr Verhalten bei Nährstoffmangel untersucht. Es konnte beobachtet werden, daß beide Stämme normale Aggregation und Fruchtkörperbildung auf CF- und TPM-Agar sowie in Flüssigkultur zeigten. Auch der zeitliche Verlauf der Entwicklung dieser Mutanten erfolgte normal. Die Motilität der Mutanten entsprach ebenfalls der Situation im Wildtyp.

Die Sporulationseffizienzen der Deletionsmutanten nach einer Entwicklung für 72 Stunden bzw. 120 Stunden in Flüssigkultur sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 26: Sporulationseffizienz nach 72 Stunden. 100% entsprechen $5,6 \times 10^3$ ausgekeimten Sporen von $6,25 \times 10^6$ in den Assay eingesetzten und auf das Volumen eines Tropfen bezogenen Zellen.

Stamm	DK1622	DK5208	RH1066	RH1070
Sporulations-effizienz	100%	< 0,1%	30%	47%

Tabelle 27: Sporulationseffizienz nach 120 Stunden. 100% entsprechen $1,1 \times 10^4$ ausgekeimten Sporen von $6,25 \times 10^6$ in den Assay eingesetzten und auf das Volumen eines Tropfen bezogenen Zellen.

Stamm	DK1622	DK5208	RH1066	RH1070
Sporulations-effizienz	100%	< 0,1%	37%	87%

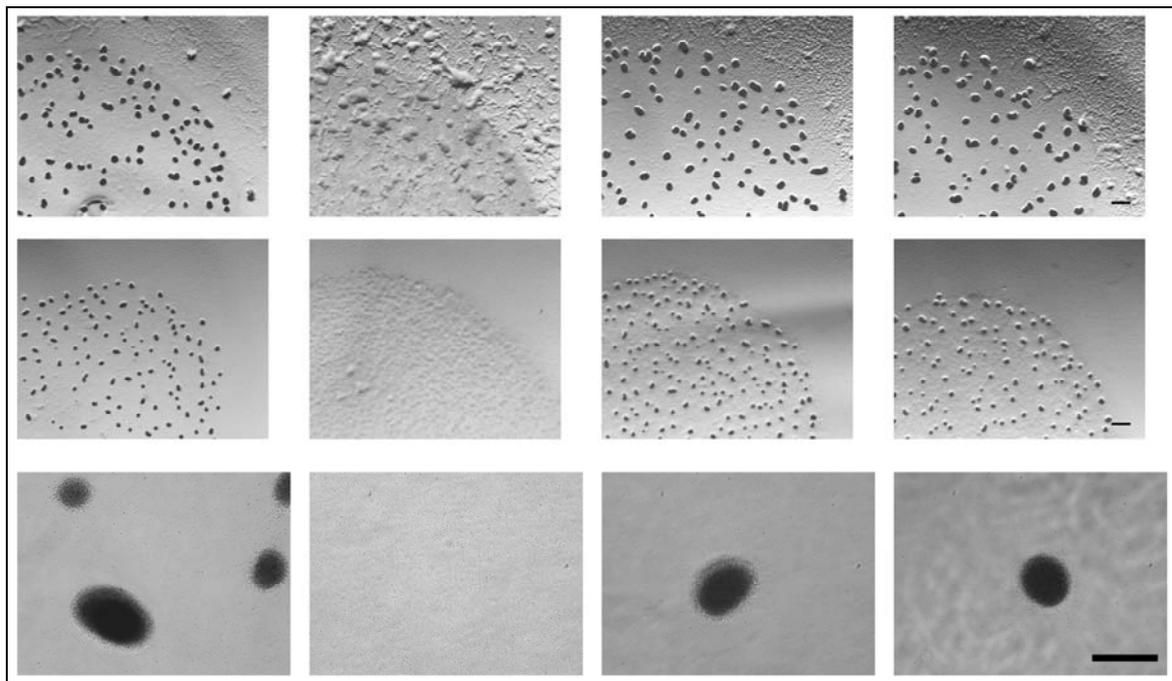


Abbildung 29: Phänotypen der Deletionsmutanten von *MXAN4559* und *MXAN4562*. Obere Reihe: Entwicklung auf CF-Agar; mittlere Reihe: Entwicklung auf TPM-Agar; untere Reihe: Entwicklung in Flüssigkultur; V.l.n.r.: DK1622 (Wildtyp), DK5208 (*csgA*), RH1066 (Δ *MXAN4562*), RH1070 (Δ *MXAN4559*). Der Maßstabsbalken entspricht 500 μ m (obere und mittlere Reihe) bzw. 100 μ m (untere Reihe). Die Bilder wurden 72 Stunden nach Beginn des Hungerzustands aufgenommen.

4.5 Charakterisierung von Mutanten der Ser/Thr-Proteinkinase MXAN6570

Die Gründe für die Auswahl verschiedener Ser/Thr-Proteinkinasen wurden bereits oben erwähnt. Die membrangebundene Kinase stellte sich als essentiell für die Fruchtkörperbildung heraus. Sie wird etwas entfernt von einem TonB-abhängigen Rezeptor, dafür aber in einem möglichen Operon mit einem FHA-Domänen-Protein kodiert. Diese Kinase wurde in die Mutagenese mit einbezogen und stellte sich nach der Untersuchung der Phänotypen als essentiell für die Entwicklung heraus. Diese Kinase soll im folgenden näher beschrieben werden.

4.5.1 Konstruktion der Mutanten

Für die Inaktivierung von MXAN6570 wurde ebenfalls zunächst eine Insertionsmutante hergestellt. Hierzu wurde das Plasmid pSW140 in DK1622 transformiert, wo es in das Gemon rekombinierte. Der daraus entstandene Stamm war RH1029. Weiterhin wurde auch von MXAN6570 eine in-frame-Deletionsmutante konstruiert. Das Plasmid pSW159 wurde in DK1622 transformiert und die Mutante wie in 3.3.6 beschrieben konstruiert. Der Stamm, welcher die Deletion von MXAN6570 enthält, wurde RH1047 genannt.

4.5.2 Untersuchung der Entwicklungs-Phänotypen der Mutanten von MXAN6570

Die Insertionsmutante RH1029 wurde auf ihre Fähigkeit zur Fruchtkörperbildung untersucht. Der Stamm war auf CF-Agar und in Flüssigkultur nicht zur Aggregation fähig. Auch nach mehrtägiger Inkubation wurden keine Fruchtkörper gebildet. Jedoch zeigte sich, daß RH1029 auf TPM-Agar Aggregationzentren bilden konnte, welche allerdings nicht zu fertigen Fruchtkörpern differenzierten, sondern in einem mittleren Entwicklungsstadium arretiert waren.

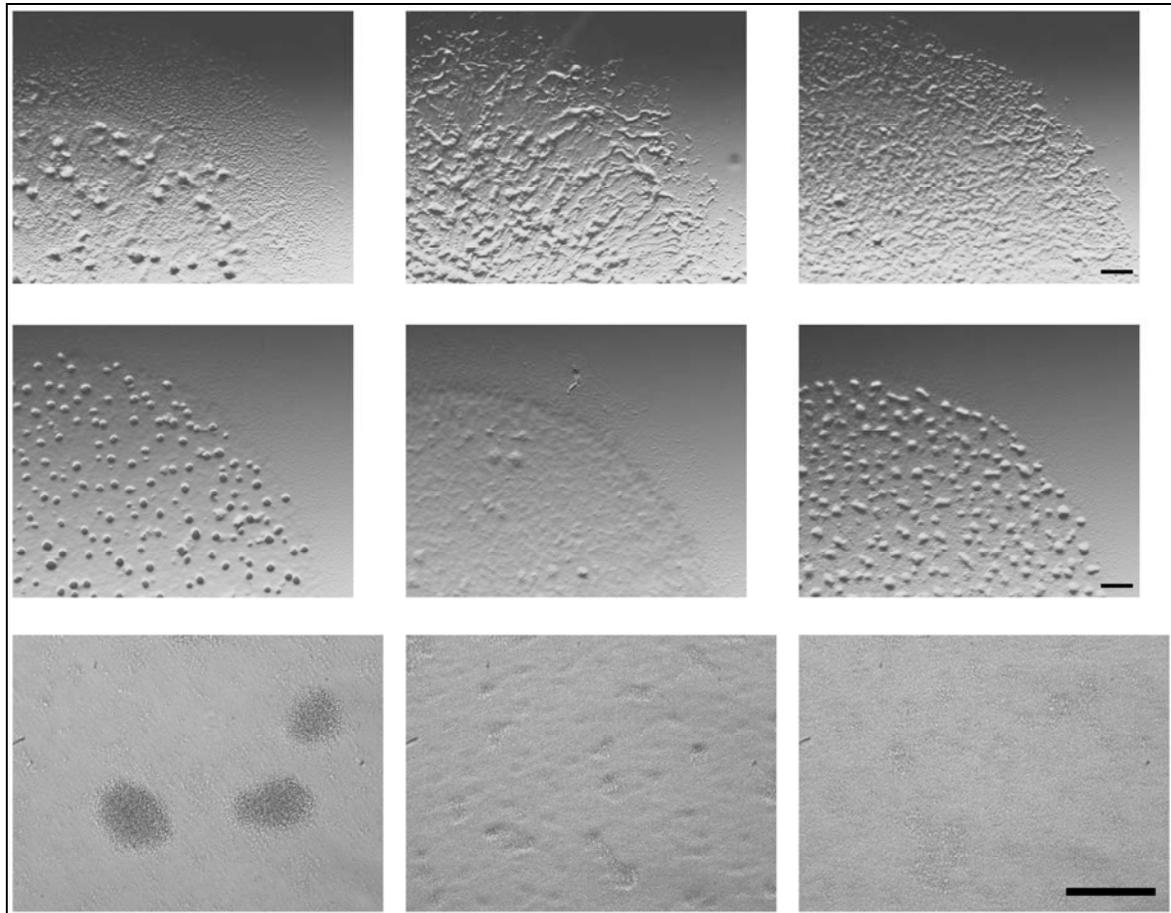


Abbildung 30: Phänotypen der Insertionsmutante von *MXAN6570*. Obere Reihe: Entwicklung auf CF-Agar; mittlere Reihe: Entwicklung auf TPM-Agar; untere Reihe: Entwicklung in Flüssigkultur; links: DK1622 (Wildtyp); mitte: DK5208 (*csgA*⁻); rechts: RH1029 (*MXAN6570*). Der Maßstabsbalken entspricht 500 μm (oben und mitte) bzw. 100 μm (unten). Die Bilder wurden 24 Stunden nach Beginn des Hungerzustands aufgenommen.

Auch die in-frame-Deletionsmutante RH1047 wurde auf ihre Fähigkeit zur Fruchtkörperbildung untersucht. Auch dieser Stamm war auf keinem der getesteten Medien in der Lage, normale Fruchtkörper zu bilden. Selbst nach einer längeren Inkubationsdauer (bis zu 120 Stunden) erfolgte keinem der getesteten Medien eine Aggregation.

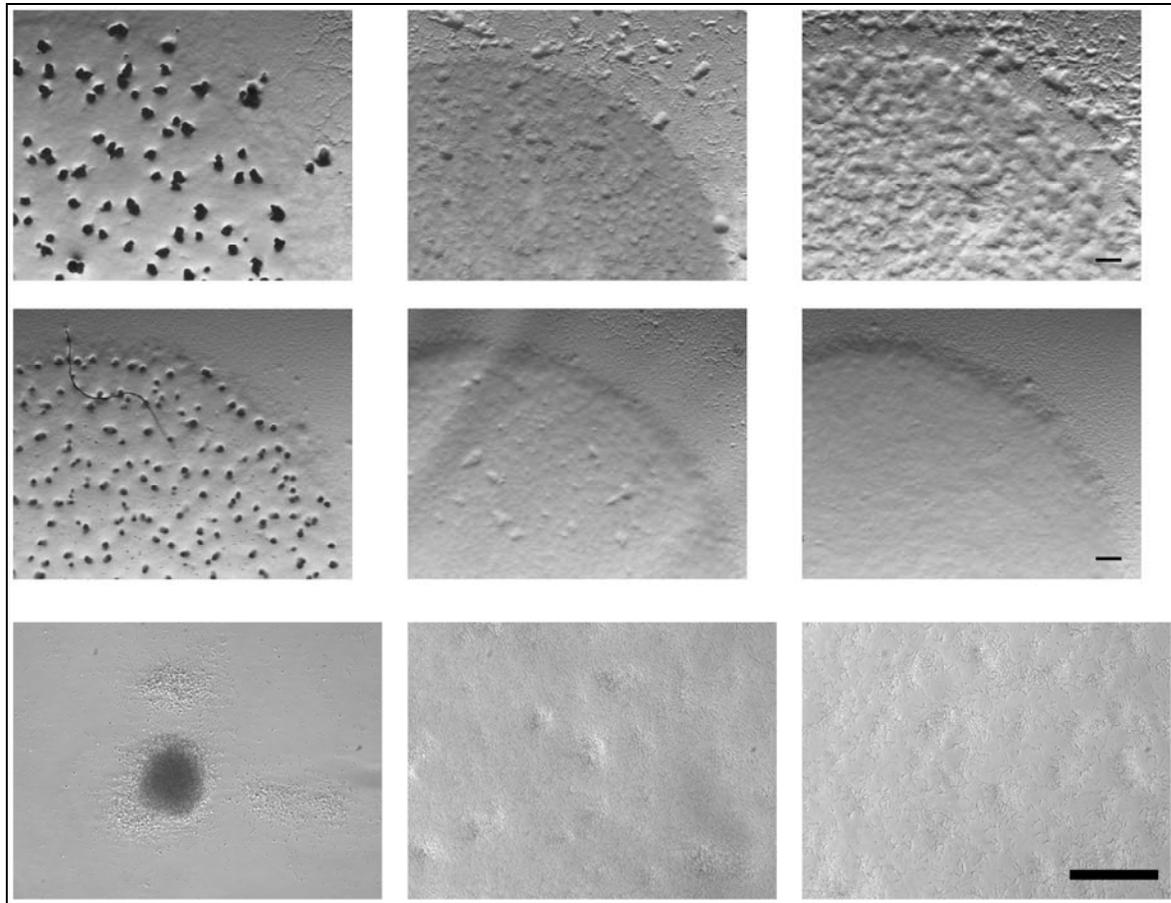


Abbildung 31: Phänotypen der Deletionsmutante von *MXAN6570*. Obere Reihe: Entwicklung auf CF-Agar; mittlere Reihe: Entwicklung auf TPM-Agar; untere Reihe: Entwicklung in Flüssigkultur; links: DK1622 (Wildtyp); mitte: DK5208 (*csgA*); rechts: RH1047 (Δ *MXAN6570*). Der Maßstabsbalken entspricht 500 μ m (oben und mitte) bzw. 100 μ m (unten). Die Bilder wurden 120 Stunden nach Beginn des Hungerzustands aufgenommen.

4.5.3 Untersuchung der Sporulation

Die Bestimmung der Sporulationseffizienz erfolgte wie oben beschrieben. Die Sporulationseffizienz des Wildtyps (DK1622) wurde wieder auf den Wert 100% festgesetzt und die Werte der Mutanten relativ dazu angegeben. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst.

Tabelle 28: Sporulationseffizienz nach 72 Stunden. 100% entsprechen $5,6 \times 10^3$ ausgekeimten Sporen von $6,25 \times 10^6$ in den Assay eingesetzten und auf das Volumen eines Tropfen bezogenen Zellen.

Stamm	DK1622 (Wildtyp)	DK5208 (<i>csgA</i>)	RH1029 (Insertion)	RH1047 (Deletion)
Sporulations-effizienz	100%	< 0,1%	nicht bestimmt	< 0,1%

Tabelle 29: Sporulationseffizienz nach 120 Stunden. 100% entsprechen $1,1 \times 10^4$ ausgekeimten Sporen von $6,25 \times 10^6$ in den Assay eingesetzten und auf das Volumen eines Tropfen bezogenen Zellen.

Stamm	DK1622 (Wildtyp)	DK5208 (<i>csgA</i>)	RH1029 (Insertion)	RH1047 (Deletion)
Sporulations-effizienz	100%	< 0,1%	< 0,1%	< 0,1%

4.5.4 Untersuchung der Motilitäts-Phänotypen

Auch im Falle der Mutante von MXAN6570 musste ausgeschlossen werden, daß die beobachteten Phänotypen auf Beeinträchtigungen der Motilität zurückzuführen sind. Es konnte gezeigt werden, daß die Mutanten von MXAN6570 dieselbe Motilität zeigten wie der Wildtyp, also A- und S-System normal funktionierten.

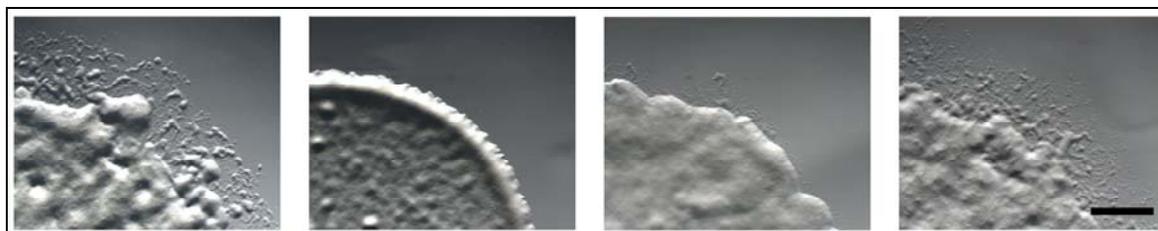


Abbildung 32: Phänotyp der Motilität von RH1047. Zellen wurden in einem Motilitäts-Assay auf Hartagar untersucht. Nach einer 24-stündigen Wachstumsphase wurden die Ränder der Kolonien fotografiert. V.l.n.r.: DK1622 (Wildtyp); DK1217 (A-Mutante); DK1300 (S-Mutante); RH1047 (Δ MXAN6570). Der Maßstabsbalken entspricht 500 μ m

4.5.5 Transkriptionelle Regulation der Kinase MXAN6570

Um die Transkription der Kinase MXAN6570 zu untersuchen, wurde genauso vorgegangen wie im Falle von MXAN4557. Es erfolgte eine quantitative real-time PCR,

mit der die Transkriptmengen bestimmt wurden. Die Messwerte wurden wiederum auf die Transkriptmenge von vegetativen Zellen bezogen. Es konnte gezeigt werden, daß *MXAN6570* bereits 3 Stunden nach Beginn des Hungerzustands hoch reguliert wird. Zum Zeitpunkt 12 Stunden erfolgt eine leichte Regulation nach unten, wonach *MXAN6570* anschließend weiter hoch reguliert wird. Dasselbe Muster ist auch bei der Regulation von *MXAN6570* in DK5208 zu erkennen, was darauf hinweist, daß *MXAN6570* nicht abhängig von *csgA* ist.

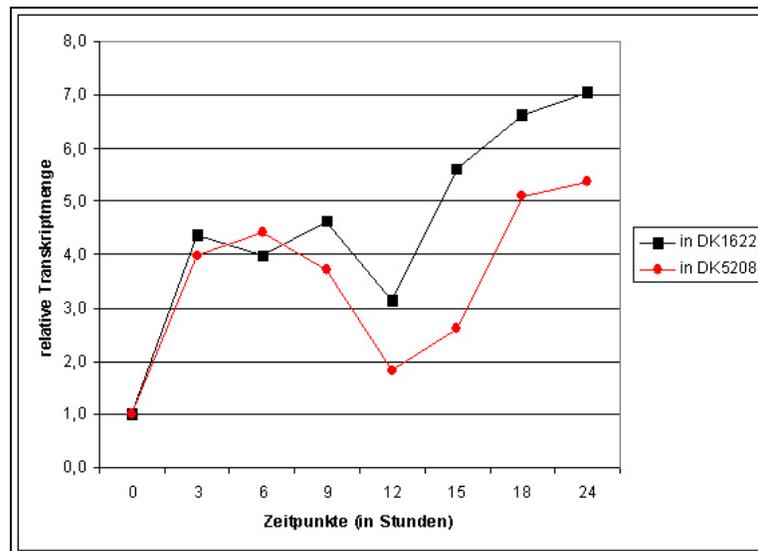


Abbildung 33: Transkriptionelle Regulation von *MXAN6570*. cDNA von Zellen aus verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Hungerzustands wurde untersucht. Die schwarzen Quadrate kennzeichnen die Transkriptmengen in DK1622 (Wildtyp), die roten Kreise kennzeichnen die Transkriptmengen in DK5208 (*csgA*).

4.5.6 Transkriptionelle Regulation von Marker-Genen

Auch im Falle von *MXAN4557* sollte eingegrenzt werden, an welcher Stelle im Entwicklungszyklus das Protein involviert ist. Es wurden hier dieselben Markergene getestet wie bereits in Kapitel 4.3.7 beschrieben.

Die Regulation von *spi* ist in RH1047 (Δ *MXAN6570*) vergleichbar mit der oben beschriebenen Regulation von *spi* in den Kontrollstämmen und in RH1043 (Δ *MXAN4557*). Daraus folgt, daß auch *MXAN6570* unabhängig vom A-Signal ist.

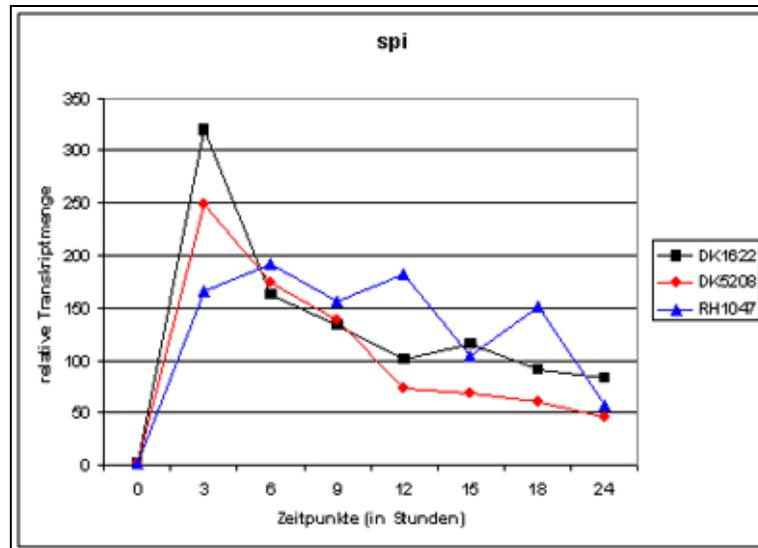


Abbildung 34: Transkription von *spi* in RH1047. Schwarze Quadrate repräsentieren die Transkription im Wildtyp, rote Kreise die in der *csgA*-Mutante (DK5208) und blaue Dreiecke zeigen die Transkription in der Deletionsmutante von MXAN4557 (RH1043).

In Abbildung 35 ist zu erkennen, daß *exo* nur im Wildtyp hoch reguliert wird. In RH1043 wird dieser Marker, wie auch in DK5208, nicht reguliert.

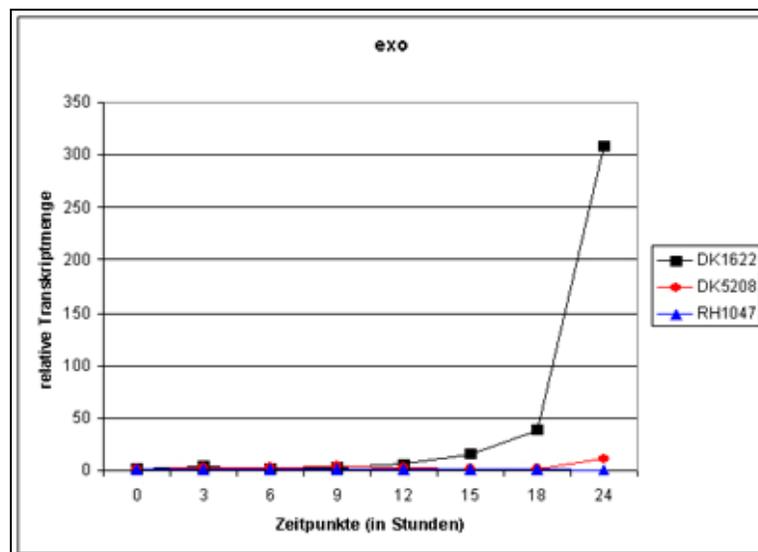


Abbildung 35: Transkription von *exo* in RH1047. Schwarze Quadrate repräsentieren die Transkription im Wildtyp, rote Kreise die in der *csgA*-Mutante (DK5208) und blaue Dreiecke zeigen die Transkription in der Deletionsmutante von MXAN4557 (RH1043).

In RH1047 ist nach Beginn des Hungerzustands ebenfalls eine leicht erhöhte Transkriptmenge von *sdeK* zu beobachten, allerdings ist diese deutlich unter dem Niveau im Wildtyp. Folglich ist vermutlich auch MXAN6570 upstream von *sdeK* aktiv.

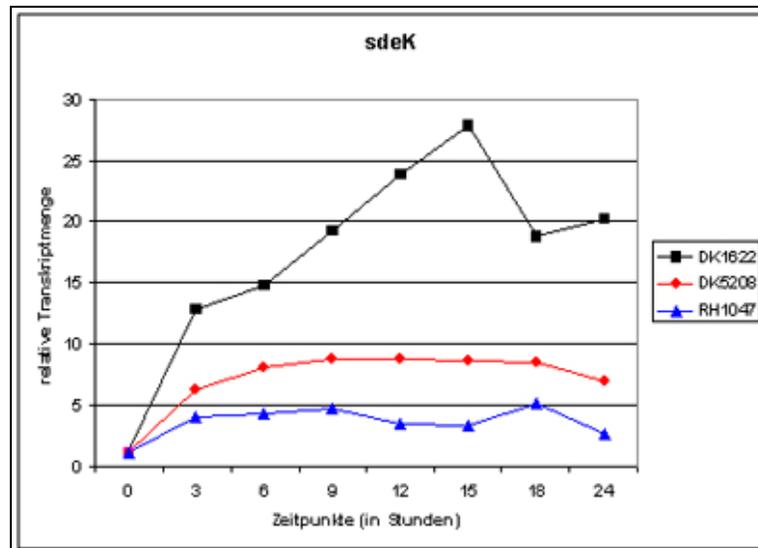


Abbildung 36: Transkription von *sdeK* in RH1047. Schwarze Quadrate repräsentieren die Transkription im Wildtyp, rote Kreise die in der *csgA*-Mutante (DK5208) und blaue Dreiecke zeigen die Transkription in der Deletionsmutante von MXAN4557 (RH1043).

4.5.7 Produktion von Marker-Proteinen

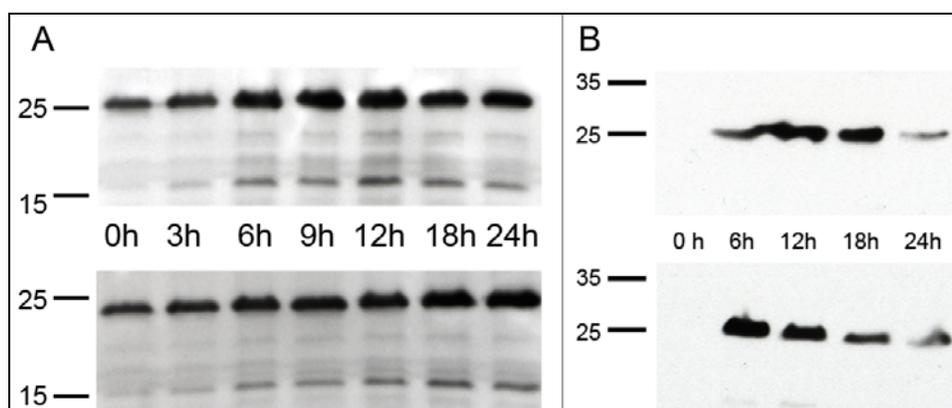


Abbildung 37: Produktion von Marker-Proteinen in RH1047. A: Produktion von CsgA; B: Produktion von FruA; Zellen wurden in Flüssigkultur entwickelt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Hungerzustands geerntet, in SDS-Probenpuffer lysiert und mittels Western-Blot untersucht. Jeweils obere Reihe: DK1622 (Wildtyp); untere Reihe: RH1047 (Δ MXAN6570).

Für die Deletionsmutante von MXAN6570 wurde die Produktion von CsgA und FruA untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl CsgA (p25 und p17) als auch FruA normal produziert werden. Die Lokalisation von CsgA wurde ebenfalls getestet und es konnte gezeigt werden, daß p25 und p17 in der äußeren Membran lokalisiert sind (nicht gezeigte Daten).

4.5.8 Methylierung von FrzCD

Aus den oben erwähnten Gründen wurde die Methylierung von FrzCD auch in der Mutante RH1047 untersucht. Die entsprechenden Western-Blots sind in Abbildung 38 gezeigt. Man erkennt die verschiedenen Banden von FrzCD und das Verschwinden der oberen Bande nach etwa 6 Stunden Entwicklung im Wildtyp, was in der *fruA*-Mutante und auch in RH1047 etwas später geschieht. Methyliertes FrzCD (untere Bande) ist im Wildtyp etwas mehr zu erkennen als in der Negativkontrolle und in RH1047.

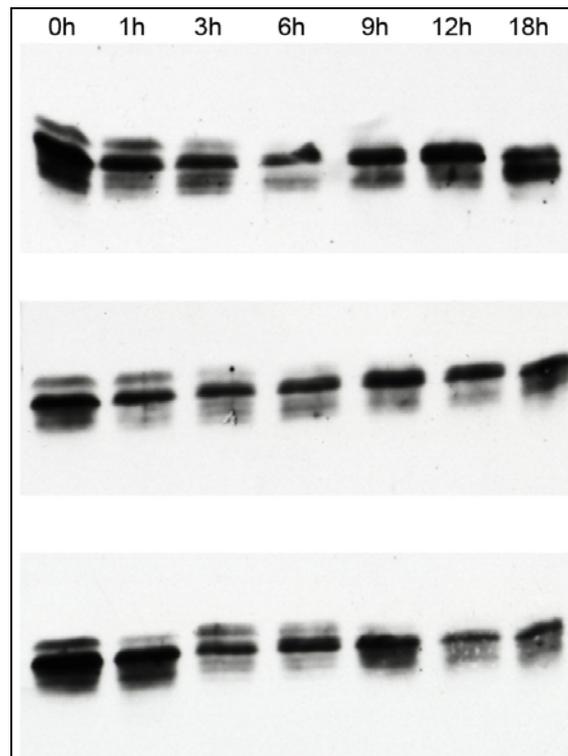


Abbildung 38: FrzCD-Methylierung in RH1047. obere Reihe: Wildtyp; mittlere Reihe: SA1465 (*fruA*); untere Reihe: RH1047 (*MXAN6570*); Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Eintritt in die

Hungerphase geerntet, in SDS-Probenpuffer lysiert, wie in (McCleary, et al., 1990) beschrieben auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und FrzCD mit spezifischen Antikörpern detektiert.

4.5.9 Genetischer Kontext von *MXAN6570*

Für *MXAN6570* wurde die genomische Organisation mittels PCR untersucht. Die Methode entsprach der zuvor beschriebenen.

Das Gen, welches für die Kinase *MXAN6570* kodiert, liegt auf einer Transkriptionseinheit mit dem Gen für das Protein *MXAN6571*. Dieses enthält an seinem N-Terminus eine FHA-Domäne. Solche Domänen sind üblicherweise für die Erkennung phosphorylierter Threonin-Reste verantwortlich und in vielen regulatorischen Proteinen zu finden. Weiterhin enthält *MXAN6571* eine GAF-Domäne und eine putative Adenylat- bzw. Guanylat-Zyklase-Domäne.

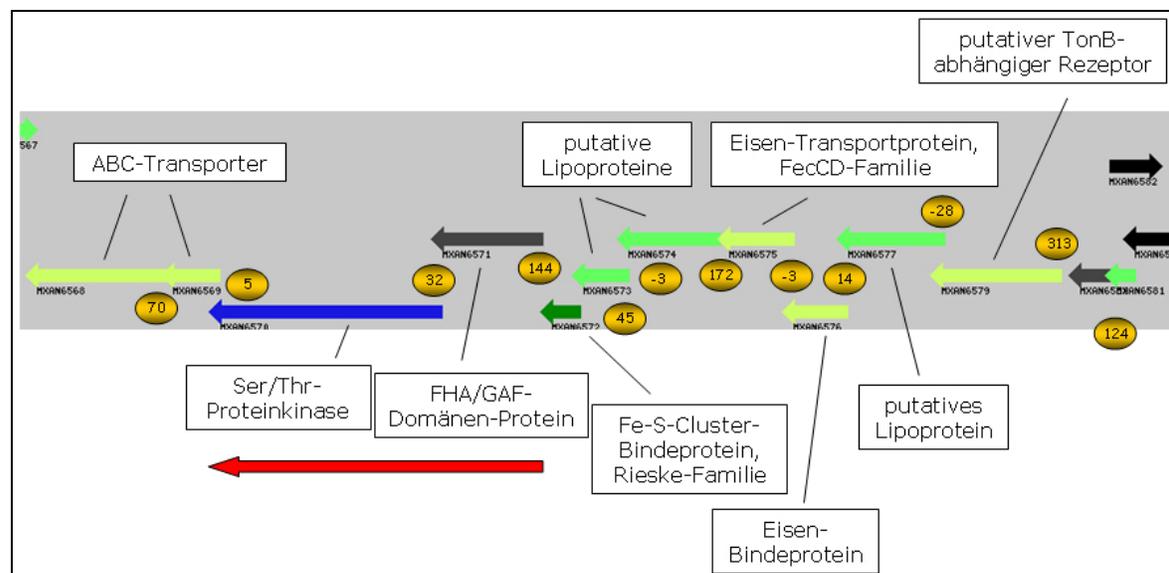


Abbildung 39: Genetischer Kontext von *MXAN6570*. Die bunten Pfeile symbolisieren die offenen Leseraster, der rote Pfeil repräsentiert eine Transkriptionseinheit. Die gelb hinterlegten Zahlen geben den Abstand zwischen den offenen Leseraster in Basenpaaren an (aus www.tigr.org).

4.5.10 Charakterisierung benachbart kodierter Proteine

Die in-frame-Deletionsmutante des FHA-Domänen-Proteins *MXAN6571* (RH4001) wurde auf ihre Fähigkeit zur Entwicklung untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Mutante eine normale Aggregation und Fruchtkörperbildung auf CF-

und TPM-Agar sowie in Flüssigkultur zeigt, welche auch zeitlich keine Unterschiede zur Entwicklung des Wildtyps zeigte. Der Stamm zeigte ebenfalls eine normale Motilität. Die Sporulationseffizienz von RH4001 beträgt 19% nach 72 Stunden Entwicklung und 31% nach 120 Stunden.

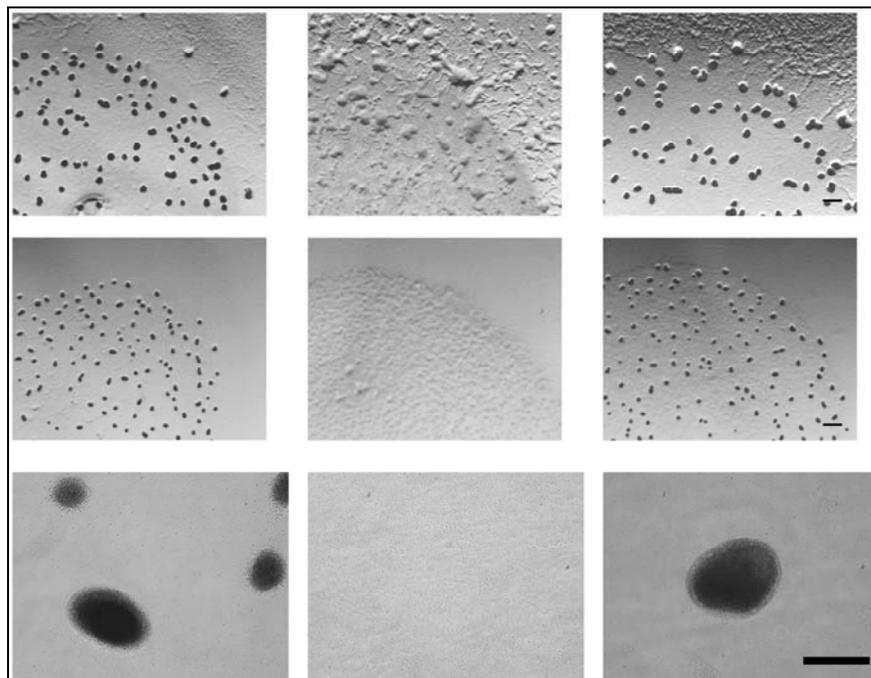


Abbildung 40: Phänotypen der Deletionsmutante von *MXAN6571*. Obere Reihe: Entwicklung auf CF-Agar; mittlere Reihe: Entwicklung auf TPM-Agar; untere Reihe: Entwicklung in Flüssigkultur; V.l.n.r.: DK1622 (Wildtyp), DK5208 (*csgA*), RH4001 (Δ *MXAN6571*). Der Maßstabsbalken entspricht 500 μ m (obere und mittlere Reihe) bzw. 100 μ m (untere Reihe). Die Bilder wurden 72 Stunden nach Beginn des Hungerzustands aufgenommen.

4.6 Konstruktion und Charakterisierung von Doppelmutanten

4.6.1 Konstruktion der Mutanten

Für die Durchführung von Epistasis-Experimenten wurden einige Doppelmutanten konstruiert. Dies geschah analog zur Konstruktion der in-frame-Deletionsmutanten, mit dem Unterschied, daß entweder die entsprechenden Plasmide in DK5208 (*csgA*-Mutante) transformiert wurden, oder es wurden Plasmide gewählt, welche zu Deletionen von jeweils mehreren auf einer Transkriptionseinheit liegenden

Genen führten. Die entstandenen Mutanten waren RH1056 (*csgA*⁻; Δ *MXAN6570*), RH1058 (*csgA*⁻; Δ *MXAN4557*), RH1068 (Δ *MXAN6570*; Δ *MXAN6571*) und RH1072 (*csgA*⁻; Δ *MXAN4562*). Weitere Mutanten (RH1074 (*csgA*⁻; Δ *MXAN4559*), RH1061 (*fruA*⁻; Δ *MXAN4557*) und RH1062 (*fruA*⁻; Δ *MXAN6570*)) sind zur Zeit in Arbeit, wurden jedoch noch nicht charakterisiert.

4.6.2 Untersuchung der Entwicklungs-Phänotypen

Die Doppelmutanten wurden auf ihr Verhalten in Reaktion auf Nährstoffmangel untersucht. Es zeigte sich, daß nur eine der Doppelmutanten, nämlich RH1068 (Δ *MXAN6570*; Δ *MXAN6571*), zur Aggregation und Fruchtkörperbildung in der Lage war. Die zeitliche Organisation der Entwicklung stimmte mit der im Wildtyp überein. Die anderen getesteten Doppelmutanten waren nicht zur Entwicklung fähig. Die Phänotypen sind in der folgenden Abbildung zusammengefasst.

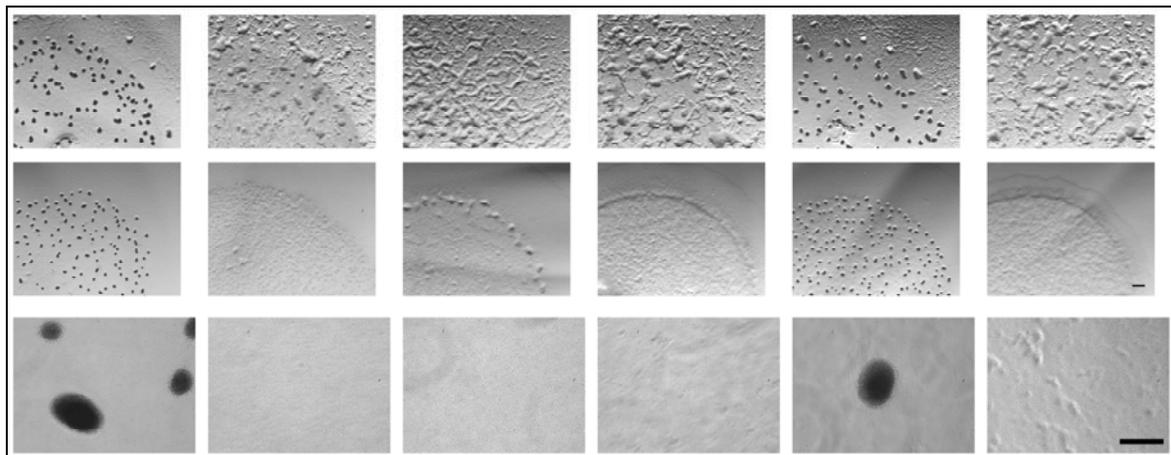


Abbildung 41: Phänotypen der Doppelmutanten. Obere Reihe: Entwicklung auf CF-Agar; mittlere Reihe: Entwicklung auf TPM-Agar; untere Reihe: Entwicklung in Flüssigkultur; V.l.n.r.: DK1622 (Wildtyp), DK5208 (*csgA*⁻), RH1056 (*csgA*⁻; Δ *MXAN6570*), RH1058 (*csgA*⁻; Δ *MXAN4557*), RH1068 (Δ *MXAN6570*; Δ *MXAN6571*), RH1072 (*csgA*⁻; Δ *MXAN4562*). Der Maßstabsbalken entspricht 500 μ m (obere und mittlere Reihe) bzw. 100 μ m (untere Reihe). Die Bilder wurden 72 Stunden nach Beginn des Hungerzustands aufgenommen.

4.7 Charakterisierung weiterer Mutanten

Wie oben bereits erwähnt, wurden auch andere Kinasen ausgewählt und mittels Mutagenese inaktiviert (siehe Tabelle 23 auf Seite 77). *MXAN4557* und *MXAN6570*

sind nur die beiden, welche einen gravierenden Phänotyp zeigen und essentiell für die Fruchtkörperbildung sind. Die Phänotypen der entsprechenden Mutanten von anderen Kinasen werden im folgenden kurz vorgestellt.

4.7.1 Konstruktion der Mutanten

Es wurden Insertionsmutanten von fünf weiteren Kinasen durch Insertion entsprechender Plasmide in das Genom von DK1622 hergestellt. Diese waren MXAN3092, MXAN2059, MXAN0552, MXAN6545 und MXAN6043. Die Insertionsmutanten tragen die Bezeichnungen RH1026, RH1027, RH1028, RH1030 und RH1031.

Von den Kinasen MXAN0552 (RH1042), MXAN6043 (RH1044), MXAN6545 (RH1046) und dem TonB-abhängigen Rezeptor MXAN6044 (RH1045) wurden darüberhinaus in-frame-Deletionsmutanten hergestellt. In Klammern sind jeweils die Bezeichnungen der entsprechenden Stämme angegeben.

4.7.2 Untersuchung der Entwicklungs-Phänotypen von Insertionsmutanten anderer Ser/Thr-Proteinkinasen

Die Insertionsmutanten RH1026, RH1027, RH1028, RH1030 und RH1031 wurden auf ihre Fähigkeit zur Aggregation und Fruchtkörperbildung auf Agar und in Flüssigkultur untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Insertionsmutanten von MXAN0552 und MXAN6043 auf keinem der getesteten Medien zur Aggregation fähig waren. Die Phänotypen der Mutanten von MXAN3092, MXAN2059 und MXAN6545 waren dem Wildtyp vergleichbar. In Motilitäts-Assays konnte gezeigt werden, daß alle Insertionsmutanten normale Motilität besaßen.

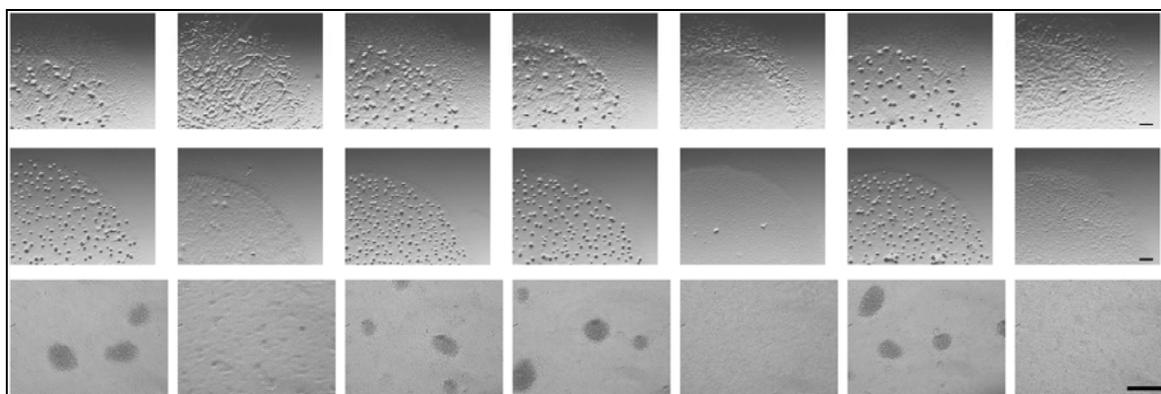


Abbildung 42: Phänotypen der Insertionsmutanten von anderen Ser/Thr-Proteinkinasen. Obere Reihe: Entwicklung auf CF-Agar; mittlere Reihe: Entwicklung auf TPM-Agar; untere Reihe: Entwicklung in Flüssigkultur; V.l.n.r.: DK1622 (Wildtyp), DK5208 (*csgA*⁻), RH1026 (*MXAN3092*⁻), RH1027 (*MXAN2059*⁻), RH1028 (*MXAN0552*⁻), RH1030 (*MXAN6545*⁻), RH1031 (*MXAN6043*⁻). Der Maßstabsbalken entspricht 500 µm (obere und mittlere Reihe) bzw. 100 µm (untere Reihe). Die Bilder wurden 24 Stunden nach Beginn des Hungerzustands aufgenommen.

Weiterhin wurden die Sporulationseffizienzen der Insertionsmutanten nach einer Entwicklung für 120 Stunden in Flüssigkultur getestet. Die Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 30: Sporulationseffizienz nach 120 Stunden. 100% entsprechen $6,0 \times 10^4$ ausgekeimten Sporen von $6,25 \times 10^6$ in den Assay eingesetzten und auf das Volumen eines Tropfen bezogenen Zellen. Die Zahlen in Klammern sind die MXAN-Nummern der inaktivierten Gene.

Stamm	DK1622	DK5208	RH1026 (3092)	RH1027 (2059)	RH1028 (0552)	RH1030 (6545)	RH1031 (6043)
Sporulations-effizienz	100%	< 0,1%	14%	38%	< 0,1%	31%	0,1%

4.7.3 Untersuchung der Entwicklungs-Phänotypen von Deletionsmutanten anderer Ser/Thr-Proteinkinasen und eines TonB-abhängigen Rezeptors

Die Deletionsmutanten RH1042 (Δ *MXAN0552*), RH1044 (Δ *MXAN6043*), RH1045 (Δ *MXAN6044*) und RH1046 (Δ *MXAN6545*) wurden auf ihre Fähigkeit zur Aggregation und Fruchtkörperbildung untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß alle getesteten Mutanten (außer RH1046) zur Aggregation fähig waren. Die Aggregationszentren von RH1046 auf CF-Agar traten nach 48 Stunden auf und entsprechen in ihrer Morphologie

nicht denen des Wildtyps. Jedoch lag die Deletionsmutante RH1046 auch stets als sogenannte „tan“- (braungefärbte) Mutante vor und konnte nicht zurück in die gelbe Form überführt werden. Zellen mutieren manchmal spontan zur braunen Form und sind dann generell nicht zur Fruchtkörperbildung fähig, weshalb hier über den beobachteten Phänotyp keine Aussage gemacht werden kann.

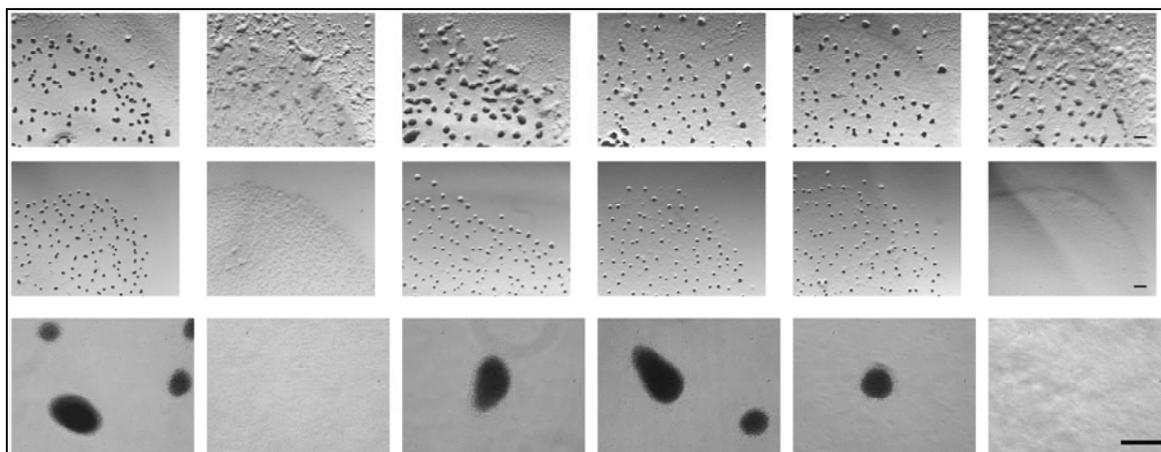


Abbildung 43: Phänotypen der Deletionsmutanten von anderen Ser/Thr-Proteinkinasen und einem TonB-abhängigen Rezeptor. Obere Reihe: Entwicklung auf CF-Agar; mittlere Reihe: Entwicklung auf TPM-Agar; untere Reihe: Entwicklung in Flüssigkultur; V.l.n.r.: DK1622 (Wildtyp), DK5208 (*csgA*), RH1042 (Δ *MXAN0552*), RH1044 (Δ *MXAN6043*), RH1045 (Δ *MXAN6044*), RH1046 (Δ *MXAN6545*). Der Maßstabsbalken entspricht 500 μ m (obere und mittlere Reihe) bzw. 100 μ m (untere Reihe). Die Bilder wurden 72 Stunden nach Beginn des Hungerzustands aufgenommen.

4.8 Überproduktion der Kinasen und anderer Proteine in *Escherichia coli*

Um eine Interaktion zwischen den Kinasen und der in ihrer Nachbarschaft kodierten Proteine zu untersuchen, wurden diese Gene in pET24b(+) kloniert und in *E. coli* exprimiert. Anschließend sind Phosphorylierungs-Assays geplant, um die Autophosphorylierung der Kinasen bzw. die Phosphorylierung des FHA-Domäne-Proteins MXAN6571 nachzuweisen. Die Experimente sind jedoch zur Zeit noch in Bearbeitung.

Die Kinase MXAN4557 und die Phosphatase MXAN4562 werden ebenfalls in *E. coli* überproduziert, um anschließend über angehängte Affinitäts-Tags aufgereinigt zu werden. Da die Experimente jedoch noch nicht weit genug fortgeschritten und noch in

Bearbeitung sind, wird hier nicht näher auf die Produktion dieser beiden Proteine eingegangen.

4.8.1 Überproduktion von MXAN6570 (Ser/Thr-Proteinkinase)

Um MXAN6570 zu überproduzieren, wurde der Teil des entsprechenden Gens kloniert, welcher die ersten 628 Aminosäure-Reste und somit die N-terminale Kinase-Domäne umfasste (siehe Abbildung 44). Die Transmembran-Helix am C-Terminus des Proteins wurde ausgespart, um eine möglichst hohe Löslichkeit des Proteins zu erreichen. Ein C-terminales Strep-Tag wurde angehängt, um die Reinigung mittels Affinitäts-Chromatographie zu ermöglichen.

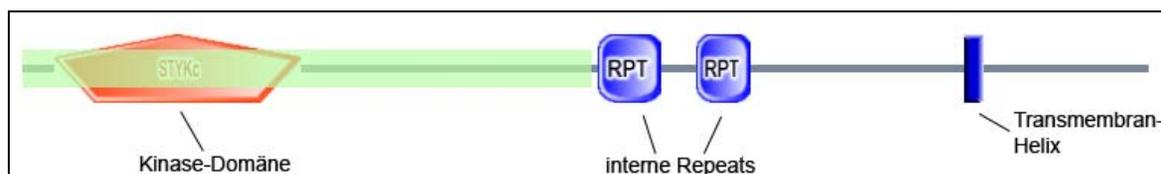


Abbildung 44: Domänen in MXAN6570. Die N-terminale Kinase-Domäne ist in orange gekennzeichnet, die C-terminale Transmembranhelix ist in blau dargestellt. Der grün hinterlegte Bereich entspricht dem Teil des Proteins, welcher in *E. coli* produziert wurde.

Es erfolgte eine Kultivierung des Stamms SW190 in TP-Medium (Tabelle 6) und eine Induktion mit 0,5 mM IPTG über Nacht bei 18°C. Die entsprechende Bande konnte im Coomassie gefärbten Gel nicht gesehen werden, jedoch im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen den Strep-Tag. Der Grund liegt in der schwachen Produktionsrate des Proteins. Die lösliche Fraktion wurde jedoch über eine Streptactin-Säule gereinigt, und die massenspektrometrische Analyse bestätigte, daß es sich um MXAN6570 handelte.

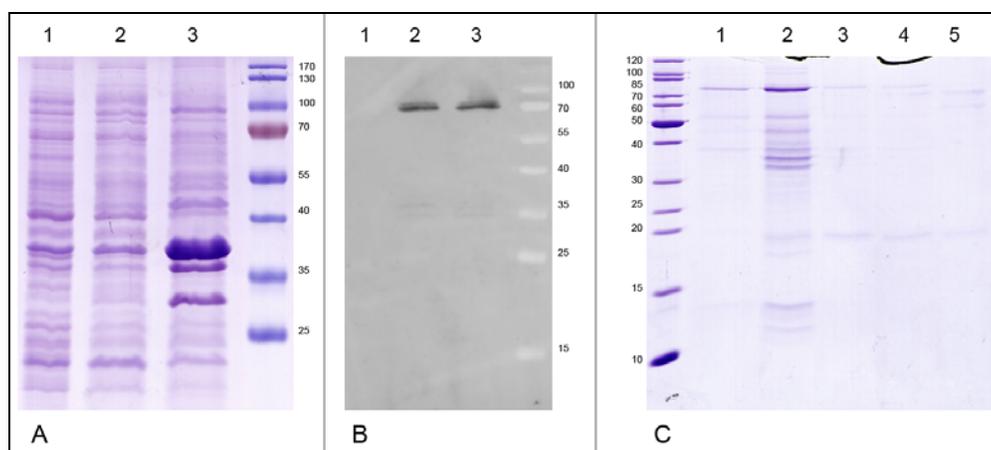


Abbildung 45: Überproduktion von MXAN6570 in *E. coli*. A: Überproduktion in SW190 nach Induktion mit 0,5 mM IPTG über Nacht bei 18°C; 1: Zellextrakt vor Induktion mit IPTG; 2: lösliche Fraktion (Überstand von 10000 Upm für 15 Minuten); 3: Pellet (enthält Zelltrümmer und evtl. gebildete Einschlußkörper); B: Western-Blot des Gels aus A mit Antikörper gegen Strep-Tag; C: 1-5: Fraktionen zu jeweils 1,5 mL nach Elution von der Streptactin-Säule. Die Bande von ca. 70 kDa entspricht dem Fragment von MXAN6570.

4.8.2 Überproduktion von MXAN6571 (FHA-Domänen-Protein)

Die Überproduktion von MXAN6571 erfolgte in dem Stamm SW181, welcher MXAN6571 mit einem C-terminalen His-Tag in pET24b(+) enthält. Nach der Kultivierung im oben beschriebenen Expressionsmedium erfolgte die Induktion mit 1,0 mM IPTG über Nacht bei 18°C. Die lösliche Fraktion wurde auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen und mit Imidazol eluiert.

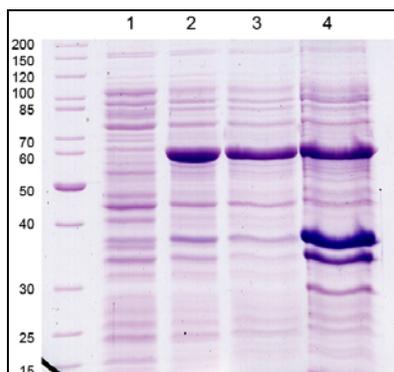


Abbildung 46: Überproduktion von MXAN6571 in *E. coli*. SW181 wurde mit 1,0 mM IPTG über Nacht bei 18°C induziert. 1: Zellextrakt vor Induktion; 2: Zellextrakt nach Induktion über Nacht; 3: lösliche Fraktion (Überstand von 10000 Upm für 15 Minuten); 4: Pellet (enthält Zelltrümmer und evtl. gebildete Einschlußkörper); Die Bande von ca. 60 kDa entspricht MXAN6571.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung des bislang unbekanntem Rezeptors von CsgA und weiterer Proteine, die an der Erkennung und Weiterleitung des C-Signals beteiligt sind. Dazu wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt, zum einen die Reinigung von nativem CsgA mit dem Ziel einer anschließenden Identifizierung seiner Interaktionspartner, zum anderen eine Auswahl von Kandidaten-Genen, die für Proteine kodieren, welche möglicherweise an der CsgA-Rezeption und Signalweiterleitung beteiligt sein könnten. Die Ergebnisse dieser beiden Ansätze sollen im folgenden Kapitel diskutiert werden.

5.1 Reinigung von CsgA aus *Myxococcus xanthus*

Die Strategie der Reinigung erfolgte in Anlehnung an die ursprüngliche Reinigung des C-Signals von (Kim & Kaiser, 1990), jedoch mit dem zusätzlichen Schritt der Solubilisierung der Membranfraktion durch Triton X-100 (Lobedanz & Søgaard-Andersen, 2003). Dies sollte den Anreicherungsgrad der CsgA-haltigen Fraktion der äußeren Membran erhöhen. Die chromatographischen Reinigungsschritte erfolgten wiederum wie in (Kim & Kaiser, 1990) beschrieben. Um p25 und p17 in den Reinigungsschritten zu verfolgen, wurde nicht der in der Literatur erwähnt Bioassay gewählt, sondern dies wurde aufgrund der einfacheren Handhabung mittels Western-Blot mit einem spezifischen Antiserum durchgeführt. Diese Veränderung gegenüber der in der Literatur beschriebenen Methode sollte jedoch keinen Einfluß auf die Reinigung selbst haben. p25 und p17 eluierten wie erwartet bei der in der Literatur beschriebenen Konzentration von NaCl bzw. der der molekularen Masse des Proteins entsprechenden Retentionszeit. Jedoch konnte in keiner der angereicherten Fraktionen (sowohl nach Anionenaustausch-Chromatographie als auch nach Gelfiltration) ein Peptidfragment aus CsgA mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Eine Analyse des Proteins mit der molekularen Masse von 16,98 kDa, welches wiederholt gefunden wurde, ergab einen Peptidmassen-Fingerprint, der in keiner Weise mit dem von p17 übereinstimmt. Ein Vergleich mit der Proteom-Datenbank von *M. xanthus* ergab jedoch auch keinen Treffer für ein anderes Protein aus *M. xanthus*. Im Nachhinein stellt sich die Frage, ob p17 nicht möglicherweise eine große Anzahl an posttranslationalen Modifikationen trägt und deshalb nicht mittels Peptidmassen-Fingerprint erkannt wird. In zukünftigen

Experimenten ist die direkte Sequenzierung des Proteins bzw. interner Peptide mittels Edman-Abbau vorgesehen.

5.2 Komplementation der *csgA*-Mutante

Das Ziel der Komplementation von DK5208 (*csgA*⁻) mit N- und C-terminalen Affinitäts-Tags an CsgA war eine bessere Möglichkeit der Reinigung von nativem CsgA. Die Fusion von Tags an den C-Terminus von CsgA führt nicht zu aktivem CsgA, da die Fähigkeit zur Aggregation in der *csgA*-Mutante nicht wiederhergestellt werden konnte. Darüberhinaus konnten die entsprechenden Proteine nicht nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, daß der C-Terminus wichtig für die Translokation und/oder die Funktion von CsgA ist. Die N-terminale Fusion eines Strep-Tags an CsgA war ebenfalls nicht erfolgreich. Die Komplementation mit N-terminal His-getaggttem CsgA war jedoch erfolgreich, da diese Mutante zur Fruchtkörperbildung auf TPM-Agar und in Flüssigkultur in der Lage war, sowie p25 und p17 produziert und korrekt lokalisiert waren. Dies müsste eine Reinigung des nativen Proteins (zumindest p25) aus *M. xanthus* wesentlich erleichtern. Die Experimente hierzu werden zurzeit durchgeführt.

Die Komplementation von DK5208 (*csgA*⁻) mit verschiedenen Bereichen von CsgA sollte zeigen, ob auch verkürztes CsgA in der Lage war, die Fähigkeit zur Fruchtkörperbildung zu komplementieren. Verschiedene Signalpeptide wurden an den N-Terminus der jeweiligen Sequenz fusioniert, um die korrekte Lokalisation des Proteins zu gewährleisten. AgIU trägt eine Signalpeptid-Sequenz für eine Signalpeptidase des Typs II mit einer typischen Lipobox an deren C-Terminus, welche einen konservierten Cystein-Rest trägt (White & Hartzell, 2000). Neben der Lipobox kodiert die Signalsequenz für 5 bis 7 N-terminale, zum Teil positiv geladene Aminosäure-Reste (Lysin oder Arginin) und für 7 bis 22 meist hydrophobe und ungeladene Aminosäure-Reste zwischen dem N-Terminus und der Lipobox (Inouye et al., 1977). In *Escherichia coli* entscheidet der Aminosäure-Rest direkt nach dem konservierten Cystein, in welche Membran das Protein transloziert wird. Folgt dem Cystein- ein Aspartat-Rest, so erfolgt die Lokalisation des Proteins in die innere Membran, bei anderen Resten wird es in die äußere Membran transloziert (Narita & Tokuda, 2006). Falls dies auch in *M. xanthus* der Fall ist, deutet das darauf hin, daß AgIU durch Fettsäure-Acylierung an dem erwähnten konservierten Cystein-Rest in der

äußeren Membran verankert wird. Das entsprechende Signalpeptid wurde an die unterschiedlichen CsgA-Versionen fusioniert und konnte im Falle von p25 die Entwicklung in der *csgA*-Mutante komplementieren. Jedoch war diese Komplementation bei p18,1 und p17,8 nicht möglich, und CsgA selbst konnte im Western-Blot in diesen Mutanten nicht nachgewiesen werden. Entweder wurde es nicht produziert oder direkt nach der Synthese abgebaut, möglicherweise durch das Fehlen des N-terminalen Sequenzbereichs. Da Punktmutanten, in denen der konservierte Cystein-Rest gegen einen Alanin-Rest ausgetauscht wurde, keine Unterschiede in der Entwicklung und der Produktion von CsgA zeigten, ist es denkbar, daß das fusionierte Signalpeptid keinen Effekt besitzt, und die Lokalisation des SP_{AgIU}-p25-Fusionsproteins durch einen in der Sequenz von p25 kodierten und bislang unbekanntem Mechanismus erfolgte.

Der N-Terminus von Tgl trägt die Sequenz eines Signalpeptids des Typs II, welches ebenfalls einen konservierten Cystein-Rest trägt. Das Lipoprotein Tgl konnte in der Membranfraktion von *M. xanthus* nachgewiesen werden. Jedoch zeigten Fraktionierungs- und Lokalisationsstudien, daß Tgl nicht an der Zelloberfläche lokalisiert ist, sondern ins Periplasma hinein ragt (Rodriguez-Soto & Kaiser, 1997). Dies könnte erklären, warum die Fusionen von CsgA (p25, p18,1 und p17,8) mit dem Signalpeptid von Tgl zwar produziert und im Western-Blot nachgewiesen werden konnten, jedoch keine Komplementation der Fruchtkörperbildung möglich war, da das C-Signal zur Übertragung auf eine Nachbarzelle auf der Zelloberfläche verankert sein muss.

5.3 Charakterisierung von Mutanten der Kinase MXAN4557 und deren mögliche Funktion

Die Ser/Thr-Proteinkinase MXAN4557 wurde in dieser Arbeit als essentiell für die Fruchtkörperbildung und Sporulation identifiziert. Das Protein enthält eine Kinase-Domäne im Zentrum seiner Sequenz und gehört zur Familie der RD-Kinasen. Diese besitzen eine Aktivierungs-Domäne, welche einen konservierten Threonin-Rest trägt. Nach dessen Phosphorylierung erfährt das Protein eine Änderung seiner Konformation, was das katalytische Zentrum für das Substrat zugänglich macht (Hanks et al., 1988; Johnson et al., 1996). Am C-Terminus wird vom TMHMM-Server eine putative Transmembran-Helix vorhergesagt, jedoch nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 50%. Weiterhin enthält MXAN4557 kein Signalpeptid. Vermutlich handelt es sich um ein

lösliches Protein. Die Stelle, an der das Plasmid integriert wurde, um die Insertionsmutante zu konstruieren, ist in Abbildung 47 mit einem grünen Dreieck markiert. Sie wurde so gewählt, daß die Kinase-Domäne noch produziert wird. Die Insertionsmutante von MXAN4557 zeigt normale Aggregation und Fruchtkörperbildung. Dies zeigt, daß der C-terminale Bereich des Proteins für die Aggregation nicht essentiell ist. Die Sporulationseffizienz beträgt in der Insertionsmutante nur 7% des Wildtyps. CsgA reguliert die Expression verschiedener Gene konzentrationsabhängig durch Erreichen bestimmter Schwellenwerte. Die Aggregation wird durch niedrige C-Signal-Konzentration induziert, die Sporulation durch eine höhere Konzentration (Søgaard-Andersen et al., 2003). Würde MXAN4557 ähnlich konzentrationsabhängig agieren, könnte dies bedeuten, daß eine möglicherweise niedrigere Aktivität dieser Kinase in der Insertionsmutante ausreicht, um die Aggregation zu initiieren, jedoch zu niedrig ist, um eine vollständige Sporulation zu gewährleisten. Hierfür scheint ein intakter C-Terminus notwendig zu sein.

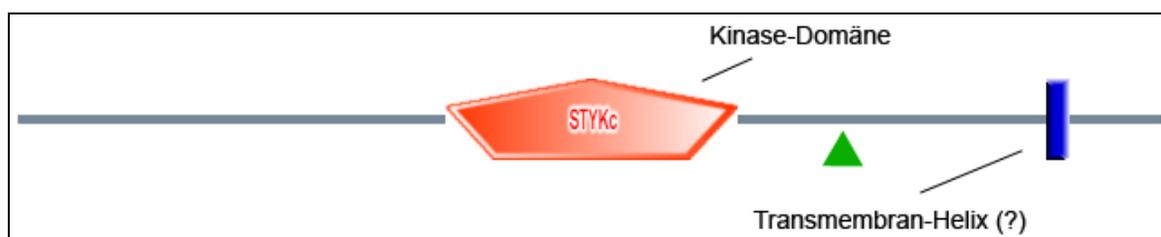


Abbildung 47: Domänenstruktur von MXAN4557. Die zentrale Kinase-Domäne ist in orange gekennzeichnet. Die putative Transmembran-Helix ist als blauer Balken dargestellt. Das grüne Dreieck kennzeichnet die Stelle, an der pSW136 integrierte, was zur Insertionsmutante führte (aus <http://smart.embl-heidelberg.de/>).

Die Ser/Thr-Proteinkinase MXAN4557 wird in einer Transkriptionseinheit zusammen mit dem TonB-abhängigen Rezeptor MXAN4559 und einem hypothetischen Protein kodiert. Eine benachbarte Transkriptionseinheit kodiert unter anderem für eine Ser/Thr-spezifische Phosphatase des PP2C-Typs (siehe Abbildung 28 auf Seite 87). TonB-abhängige Rezeptoren sind üblicherweise für die Erkennung und den Transport von Substraten verantwortlich, welche nicht durch die Porine der äußeren Membran diffundieren können bzw. nur in sehr niedriger Konzentration vorliegen. Sie haben in der Regel eine Transportfunktion und in einigen Fällen eine zusätzliche Funktion in der Detektion der zu transportierenden Substanz und der Initiation einer

Signaltransduktions-Kaskade (Koebnik, 2005). Eine Ausnahme bildet PrhA in *R. solanacearum*, welches über keine Transportfunktion verfügt, sondern ausschließlich an der Erkennung und Weiterleitung eines Signals beteiligt ist (Brito et al., 2002). MXAN4559 besitzt eine N-Terminale Extension mit einer Länge von 122 Aminosäure-Resten, welche nicht zu den Extensionen anderer TonB-abhängiger Rezeptoren aus Gram-negativen Bakterien homolog ist. MXAN4559 wird auch nicht in einer Transkriptionseinheit mit Genen für Sigma- oder Anti-Sigma-Faktoren kodiert. Man könnte sich für *M. xanthus* ein System vorstellen, in welchem der TonB-abhängige Rezeptor MXAN4559 keine klassische Transportfunktion besitzt, sondern für die Erkennung eines Signals und dessen Weiterleitung verantwortlich ist.

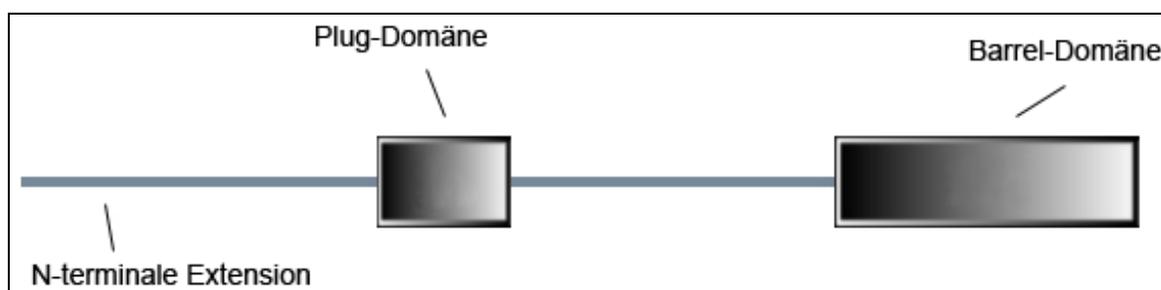


Abbildung 48: Domänenstruktur von MXAN4559. Hervorgehoben sind die lange N-terminale Extension, welche ins Periplasma hinein ragt, die Plug-Domäne und die C-terminale Barrel-Domäne des TonB-abhängigen Rezeptors. Vgl. auch Abbildung 4 auf Seite 13 (aus <http://smart.embl-heidelberg.de/>).

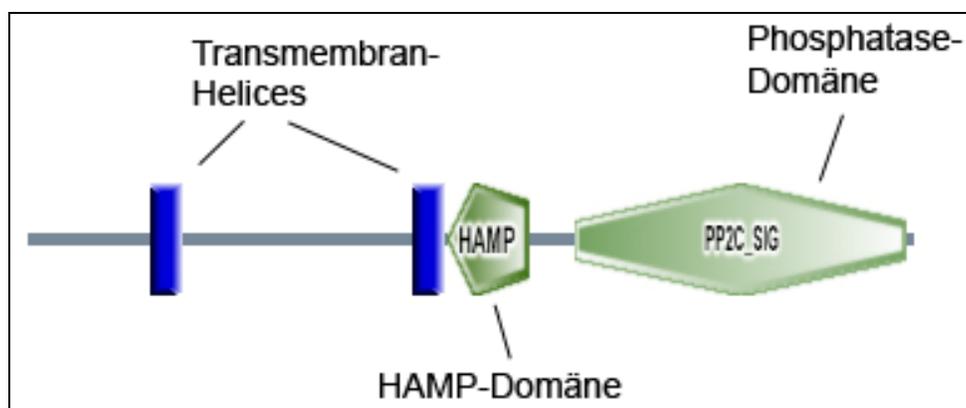


Abbildung 49: Domänenstruktur von MXAN4562. Hervorgehoben sind die beiden N-terminalen Transmembran-Helices, die HAMP-Domäne und die C-terminale Phosphatase-Domäne (aus <http://smart.embl-heidelberg.de/>).

Ein weiteres Gen ist *MXAN4562*, welches für die bereits erwähnte Phosphatase kodiert. Die Domänenstruktur des Proteins ist in Abbildung 49 dargestellt. Es besitzt zwei Transmembran-Helices an seinem N-Terminus, über die es in der inneren Membran verankert ist. Eine Analyse der Sequenz mit dem TMHMM-Server ergibt, daß der Bereich zwischen den beiden Helices dem periplasmatischen Teil des Proteins entspricht. Direkt nach dem C-terminalen Ende der zweiten Transmembran-Helix befindet sich eine HAMP-Domäne. Solche Domänen wurden ursprünglich als „Linker“-Regionen in Histidin-Proteinkinasen und Chemotaxis-Rezeptoren identifiziert (Jin & Inouye, 1994). Man findet HAMP-Domänen in einer Vielzahl verschiedener Proteine, wie zum Beispiel in Histidin-Proteinkinasen, Adenylat-Zyklasten, Methyl-akzeptierenden chemosensorischen Proteinen und Phosphatasen, wo sie stets an einem Signaltransduktions-Prozeß beteiligt sind und meist durch Konformationsänderungen zur Aktivierung bestimmter Domänen führen (Hulko et al., 2006). Der C-Terminus von *MXAN4562* kodiert für eine Phosphatase des PP2C-Typs. Diese Gruppe von Phosphatasen war ursprünglich nur in Eukaryoten bekannt (Cohen, 1990). Jedoch sind in den letzten Jahren eine Reihe von Proteinen dieser Familie in Bakterien identifiziert und charakterisiert worden, wie zum Beispiel RsbU (Delumeau et al., 2004; Hardwick et al., 2007) und SpoIIE (Carniol et al., 2005) in *Bacillus subtilis*, oder auch SP-STP in *Streptococcus pyogenes* (Jin & Pancholi, 2006). Für die PP2C-Phosphatase Pph1, das einzige in *M. xanthus* näher charakterisierte Mitglied dieser Familie, konnte gezeigt werden, daß das Protein sowohl im vegetativen Wachstum als auch in der Fruchtkörperbildung und der Sporulation eine Rolle spielt (Treuner-Lange et al., 2001).

Ein gut charakterisiertes System, welches an der Erkennung und Weiterleitung eines Stress-Signals beteiligt ist, ist die Regulation von σ^B , einem Sigma-Faktor der Streß-Antwort in *B. subtilis*. σ^B wird durch die Phosphatase RsbU positiv reguliert, indem diese den Sigma-Faktor-Antagonisten RsbV dephosphoryliert. RsbV bindet daraufhin RsbW, welches in einem Komplex mit σ^B vorliegt und setzt somit den Sigma-Faktor frei (Delumeau, et al., 2004). RsbU selbst wird durch die Kinase RsbT aktiviert, welche in einer ungestressten Zelle im sogenannten Stressosom inaktiv vorliegt. Ausgelöst durch Umweltstreß dissoziiert RsbT vom Stressosom und aktiviert RsbU mittels einem noch nicht vollständig bekannten Mechanismus (Hardwick, et al., 2007). RsbU besitzt eine C-terminale Phosphatase-Domäne mit hoher Sequenzähnlichkeit zur Phosphatase-Domäne aus *MXAN4562*.

Man könnte sich ein ähnliches System in *M. xanthus* vorstellen, welches durch Streßbedingungen, wie zum Beispiel Nährstoffmangel aktiviert, wird und über die Interaktion einer Kinase mit einer Phosphatase die Expression entsprechenden Gene steuert. In diesem Fall würde der TonB-abhängige Rezeptor MXAN4559 ein Signal an der Zelloberfläche erkennen und dieses über seine N-terminale Extension auf ein Protein der inneren Membran übertragen. Hier wäre denkbar, daß dieses Signal an die periplasmatische Domäne der Phosphatase MXAN4562 weitergeleitet wird, worauf das Protein eine Änderung seiner Konformation erfahren würde. Die so aktivierte Phosphatase-Domäne könnte mit der zuvor autophosphorylierten Ser/Thr-Proteinkinase MXAN4557 interagieren und somit das Signal ins Cytoplasma leiten, wo schließlich die Expression der entsprechenden Zielgene erfolgt.

Diesem Modell zufolge sollten jedoch die Deletionsmutanten des TonB-abhängigen Rezeptors MXAN4559 bzw. der Phosphatase MXAN4562 nicht zur Aggregation in der Lage sein. Entweder sind andere Proteine an der Aktivierung der für die Aggregation essentiellen Kinase MXAN4557 verantwortlich oder die mit ihr in derselben bzw. der benachbarten Transkriptionseinheit kodierten Proteine MXAN4559 und MXAN4562 haben eine andere Funktion. TonB-abhängige Rezeptoren können an der Erkennung weiterer hochmolekularer und nicht durch Porine diffundierbarer Substanzen beteiligt sein. Man könnte sich vorstellen, daß der TonB-abhängige Rezeptor an einer ähnlichen Funktion beteiligt ist wie das bereits erwähnte PrhA aus *R. solanacearum* und ganze Zellen erkennt, welche *M. xanthus* als Nahrung dienen. Dann könnte oben gezeigtes Modell als eine Art Checkpoint dienen, welcher während der frühen Entwicklung als Sensor für Beute-Organismen dient und über das Fortschreiten oder die Einstellung des Entwicklungs-Prozesses entscheidet, indem die Phosphatase aktiviert wird, und die für das Fortschreiten der Entwicklung essentielle Ser/Thr-Proteinkinase inaktiviert wird. Es gibt Hinweise für eine direkte Erkennung von Beute-Organismen durch *M. xanthus* (Berleman & Kirby, 2007). Um diese Hypothese zu testen, werden zur Zeit Beute-Assays durchgeführt, in denen das Entwicklungs-Verhalten der Mutanten des TonB-abhängigen Rezeptors MXAN4559 und der Phosphatase MXAN4562 auf das Vorhandensein unterschiedlicher Beute-Organismen getestet wird.

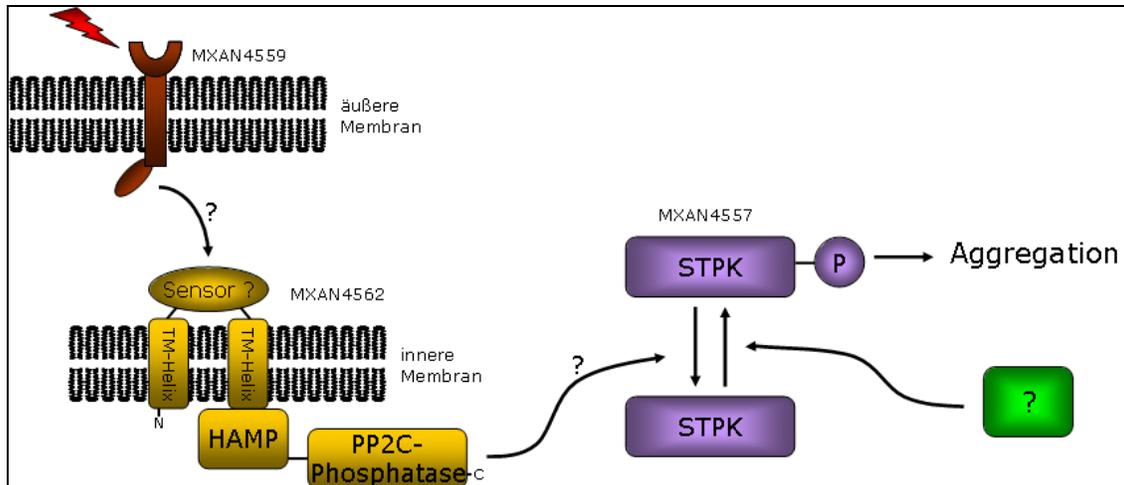


Abbildung 50: Modell einer möglichen Signaltransduktion. Die Erkennung eines Signals (Beute-Organismen) ist durch einen roten Pfeil dargestellt und würde durch den Rezeptor MXAN4559 erfolgen. Die Weiterleitung erfolgt über die N-terminale Extension auf die Phosphatase MXAN4562, dessen Phosphatase-Domäne aktiviert wird und zur Dephosphorylierung der Kinase (MXAN4557) führt.

5.4 Charakterisierung von Mutanten der Kinase MXAN6570 und deren mögliche Funktion

Es konnte gezeigt werden, daß die Kinase MXAN6570 für die Aggregation und Sporulation essentiell ist. Das Protein besitzt eine N-terminale Kinase-Domäne und ist über eine Transmembran-Helix an seinem C-Terminus in der inneren Membran verankert. Weiterhin findet man zwei Sequenz-Repeats, deren Funktion jedoch nicht bekannt ist.

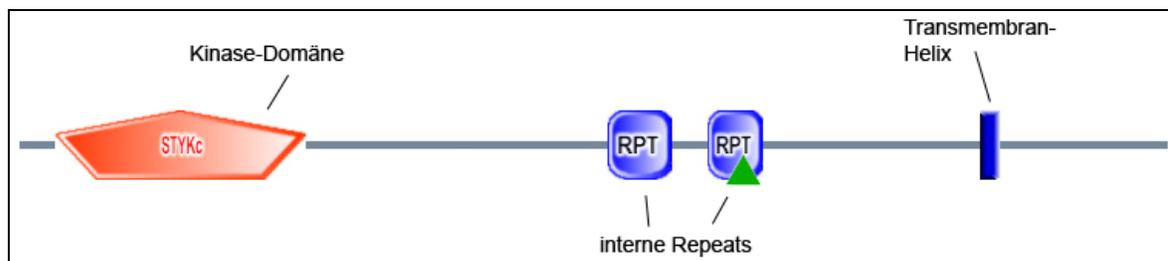


Abbildung 51: Domänenstruktur von MXAN6570. Die N-terminale Kinase-Domäne ist in orange gekennzeichnet. Die C-terminale Transmembran-Helix ist als blauer Balken dargestellt. Das grüne Dreieck kennzeichnet die Stelle, an der pSW140 integriert wurde, was zur Insertionsmutante führte (aus <http://smart.embl-heidelberg.de/>).

Die Insertionsmutante von MXAN6570 war nicht in der Lage, Fruchtkörper zu bilden. Lediglich auf TPM-Agar konnten die Zellen unvollständig aggregieren. Zwar ist die Kinase-Domäne von der Insertion nicht betroffen. Doch der Phänotyp wird dadurch erklärt, daß die Transmembran-Helix nicht mehr gebildet wird und der C-terminale, periplasmatische Teil des Proteins mit einer Länge von 181 Aminosäure-Resten für die Funktion des Proteins essentiell ist.

Die Kinase MXAN6570 wird in einem Operon zusammen mit dem Protein MXAN6571 kodiert. Dieses enthält eine N-terminale FHA („forkhead-associated“)-Domäne, eine GAF-Domäne und eine C-terminale Adenylat- oder Guanylat-Zyklase-Domäne. Die Zyklase-Domäne ist möglicherweise inaktiv, da ihr die beiden konservierten und essentiellen Aminosäure-Reste Asparagin497 und Arginin501 fehlen (Baker & Kelly, 2004). Diese beiden Reste fehlen auch in dem homologen Protein STIAU6333 aus *Stigmatella aurantiaca*. Es konnte gezeigt werden, daß die Konzentration von cAMP während der Entwicklung ansteigt und daß cAMP die Fruchtkörperbildung auch induzieren kann (Campos & Zusman, 1975; Manoil & Kaiser, 1980). GAF-Domänen findet man in verschiedenen Proteinen, und sie fungieren als Sensoren, in dem sie unterschiedliche niedermolekulare Liganden binden, wie zum Beispiel Bilin-Chromophore in Pflanzen und Cyanobakterien (Fischer et al., 2005), Häm im DosS-Sensor von *Mycobacterium tuberculosis* (Sardiwal et al., 2005), Stickstoffmonoxid im NorR-Sensor von *E. coli* (D'Autreaux et al., 2005), 2-Oxoglutarat in NifA von *Azotobacter vinelandii* (Little & Dixon, 2003) oder die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP in einer Vielzahl von Organismen (Kanacher et al., 2002; Rybalkin et al., 2003). FHA-Domänen sind sowohl in eukaryotischen als auch in einigen prokaryotischen Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen zu finden. Sie sind für die Erkennung von Phosphothreonin-Resten verantwortlich und an vielen regulatorischen Prozessen beteiligt (Durocher & Jackson, 2002).

Die Transkription vieler während der Entwicklung regulierter Gene wird von σ^{54} -abhängigen Promotoren gesteuert, welche oft Enhancer-Bindeproteine benötigen. Das Genom von *M. xanthus* kodiert für 53 Enhancer-Bindeproteine (Jakobsen et al., 2004). Darunter konnte eine Gruppe von zwölf solcher σ^{54} -abhängigen Enhancer-Bindeproteinen identifiziert werden, die alle eine FHA-Domäne als N-terminale Sensor-Domäne besitzen. Für eines dieser Proteine, MXAN4899, konnte gezeigt werden, daß es für eine vollständige Aggregation und Sporulation essentiell ist. Mutanten bilden nur

unregelmäßige und unvollständige Aggregationszentren. Die FHA-Domäne ist essentiell für die Funktion des Proteins (Jelsbak et al., 2005). Die Autoren vermuten einen regulatorischen Zusammenhang zwischen FHA-Domänen-Proteinen und den in *M. xanthus* häufig vorkommenden Ser/Thr-Proteinkinasen.

Die Histidin-Proteinkinase EspA aus *M. xanthus* besitzt eine N-terminale FHA-Domäne. Mutanten in EspA resultieren in verfrühter Sporulation, und man geht davon aus, daß das Protein als Teil eines Zwei-Komponenten-Signaltransduktions-Systems an der zeitlichen Koordination der Entwicklung beteiligt ist, indem es als Inhibitor der Sporulation fungiert (Cho & Zusman, 1999). Die Gene für die beiden Ser/Thr-Proteinkinasen PktA5 und PktB8 flankieren den *espAB*-Lokus. Mutanten der beiden Kinasen bilden jeweils unvollständige Aggregationszentren und sporulieren nur gering. Durch die Untersuchung von Doppelmутanten konnte gezeigt werden, daß EpsA mit den beiden Kinasen interagiert und daß EspA bezüglich der Aggregation epistatisch über die beiden Kinasen PktA5 und PktB8 ist (Stein et al., 2006).

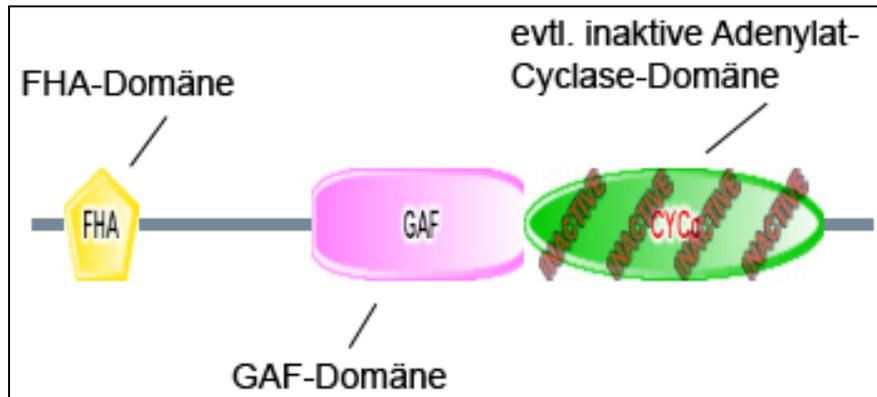


Abbildung 52: Domänenstruktur von MXAN6571. Die N-terminale FHA-Domäne ist in gelb gekennzeichnet. Die GAF-Domäne ist roséfarben dargestellt, und die C-terminale putative Adenylat-Zyklase-Domäne ist grün dargestellt (aus <http://smart.embl-heidelberg.de/>).

Die Frage, inwieweit die Ser/Thr-Proteinkinase MXAN6570 und das FHA-Domänen-Protein MXAN6571 interagieren könnten, um ein Signal von der Zelloberfläche ins Cytoplasma weiterzuleiten, führte zu folgendem Modell. Die membrangebundene Kinase müsste das Signal entweder direkt oder von einem Rezeptor der äußeren Membran empfangen, was zur ihrer Autophosphorylierung führen würde. Die *in vitro* Autophosphorylierung von MXAN6570 wird zurzeit getestet. Der

phosphorylierte Threonin-Rest würde von der FHA-Domäne von MXAN6571 erkannt werden, was zur Aktivierung des Proteins führen würde. MXAN6571 könnte in vegetativen Zellen als Inhibitor der Aggregation fungieren. Das Protein MXAN6571 könnte nach Eintritt in die Hungerphase durch die Ser/Thr-Proteinkinase MXAN6570 seinerseits inhibiert werden, wodurch die Fruchtkörperbildung erfolgen kann. Im Fall der Deletionsmutante der Ser/Thr-Proteinkinase würde das FHA-Domänen-Protein kontinuierlich die Entwicklung inhibieren, da seine Abschaltung ausbliebe. Dieses Modell würde auch erklären, warum die Doppelmutante der beiden Proteine zur Fruchtkörperbildung in der Lage ist. Ein solches Modell hätte Ähnlichkeit zur Funktion von EspA, welches ebenfalls eine Funktion in der Hemmung der Entwicklung besitzt, jedoch nicht zur vollständigen Unterbrechung des Entwicklungsprozesses führt.

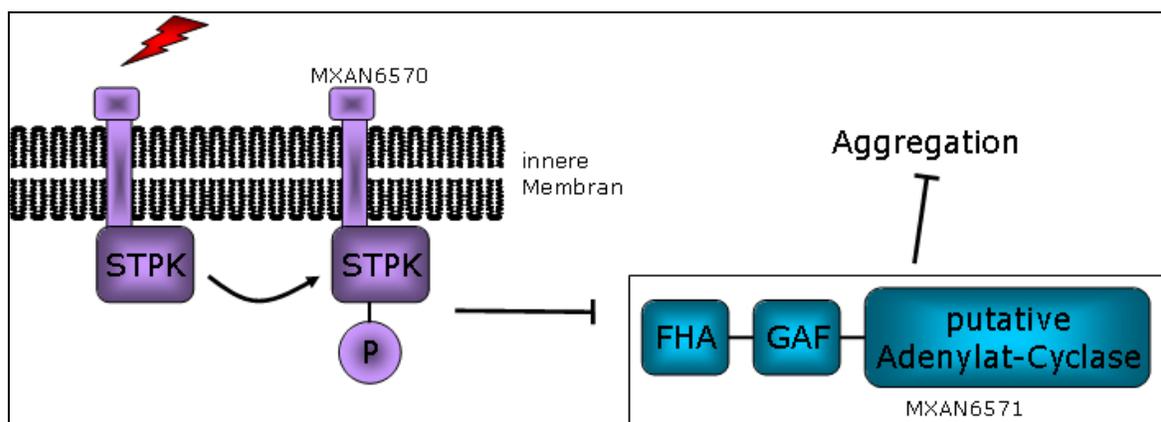


Abbildung 53: Modell einer möglichen Signaltransduktion. Die Erkennung eines Signals durch MXAN6570 ist durch einen roten Pfeil dargestellt. Dies würde zur Autophosphorylierung und zur Inhibition des FHA-Domänen-Proteins MXAN6571 führen. Da die Hemmung der Aggregation dann ausbliebe, könnte der Entwicklungsprozeß beginnen.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden zwei Ser/Thr-Proteinkinasen identifiziert, die jeweils beide für die Entwicklung von *M. xanthus* essentiell sind. Die Mutanten der beiden Gene zeigen den stärksten Phänotyp aller bislang charakterisierten Mutanten von Ser/Thr-Proteinkinasen in *M. xanthus*. Beide könnten möglicherweise neue Checkpoints in der Entwicklungsphase repräsentieren. Die Proteine sind nicht an der Produktion von CsgA oder FruA beteiligt und sind möglicherweise Teil eines Signaltransduktionswegs, der in

der Phosphorylierung von FruA resultiert. Die Interaktionspartner der beiden Kinasen sind bisher nicht identifiziert worden.

Um herauszufinden, ob Beute-Zellen das Signal für MXAN4559 darstellen, werden Assays durchgeführt, in denen das Verhalten der Mutanten des TonB-abhängigen Rezeptors MXAN4559 und der Phosphatase MXAN4562 auf die Anwesenheit von Beute-Zellen untersucht wird. Man würde erwarten, daß die Entwicklung in den Mutanten trotz der Verfügbarkeit von Beute-Zellen fortschreiten würde. Weiterhin wurde eine Komplementationsmutante der Kinase MXAN4557 konstruiert, welche zurzeit untersucht wird. Diese soll auch als Grundlage dienen, um die Deletionsmutante mit Punktmutanten von MXAN4557 zu komplementieren, wodurch die Funktion der konservierten Aminosäure-Reste im RD-Motiv und des konservierten Threonin-Restes in der Aktivierungs-Domäne geklärt werden soll.

Um mögliche Ziel-Proteine der beiden Ser/Thr-Proteinkinasen MXAN4557 und MXAN6570 zu identifizieren, ist ein Vergleich des Phospho-Proteoms von Wildtyp und der jeweiligen Mutante geplant. Außerdem wird die Autophosphorylierung der Kinasen untersucht. Anschließend sind Assays geplant, um die Phosphorylierung des FHA-Domänen-Proteins MXAN6571 durch die Kinase MXAN6570, sowie die Phosphorylierung des FHA-Domänen-Proteins MXAN4899 durch beide Kinasen zu testen. Eine mögliche Interaktion von MXAN4557 mit der Phosphatase MXAN4562 wird ebenfalls getestet. Hierzu werden die entsprechenden Proteine derzeit in *E. coli* überproduziert.

Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung von Interaktionspartnern wäre eine Inkubation von in *E. coli* heterolog überproduzierter Kinase mit einem Zellextrakt der entsprechenden Deletionsmutante und radioaktiv markiertem ATP. Eine anschließende Analyse durch zweidimensionale Gelelektrophorese und anschließender Massenspektrometrie könnte phosphorylierte Proteine als Interaktionspartner identifizieren.

6 Literaturverzeichnis

Baker, D. A. & Kelly, J. M. (2004). Structure, function and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases. *Mol Microbiol* **52**, 1229-1242.

Baker, M. E. (1994). *Myxococcus xanthus* C-factor, a morphogenetic paracrine signal, is similar to *Escherichia coli* 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase and human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem J* **301 (Pt 1)**, 311-312.

Bassler, B. L. (2002). Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* **109**, 421-424.

Bassler, B. L. & Losick, R. (2006). Bacterially speaking. *Cell* **125**, 237-246.

Berleman, J. E. & Kirby, J. R. (2007). multicellular development in *Myxococcus xanthus* is stimulated by predator-prey interactions. *J Bacteriol* **189**, 5675-5682.

Boitel, B., Ortiz-Lombardia, M., Duran, R., Pompeo, F., Cole, S. T., Cervenansky, C. & Alzari, P. M. (2003). PknB kinase activity is regulated by phosphorylation in two Thr residues and dephosphorylation by PstP, the cognate phospho-Ser/Thr phosphatase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **49**, 1493-1508.

Bowden, M. G. & Kaplan, H. B. (1998). The *Myxococcus xanthus* lipopolysaccharide O-antigen is required for social motility and multicellular development. *Mol Microbiol* **30**, 275-284.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.

Braun, V. (2003). Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front Biosci* **8**, 1409-1421.

Braun, V. & Braun, M. (2002). Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **529**, 78-85.

Braun, V. & Endriss, F. (2007). Energy-coupled outer membrane transport proteins and regulatory proteins. *Biometals* **20**, 219-231.

Braun, V., Mahren, S. & Ogierman, M. (2003). Regulation of the Fecl-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. *Curr Opin Microbiol* **6**, 173-180.

Brito, B., Aldon, D., Barberis, P., Boucher, C. & Genin, S. (2002). A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum hrp* genes. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 109-119.

Bustamante, V. H., Martinez-Flores, I., Vlamakis, H. C. & Zusman, D. R. (2004). Analysis of the Frz signal transduction system of *Myxococcus xanthus* shows the importance of the conserved C-terminal region of the cytoplasmic chemoreceptor FrzCD in sensing signals. *Mol Microbiol* **53**, 1501-1513.

Cadieux, N., Bradbeer, C., Reeger-Schneider, E., Koster, W., Mohanty, A. K., Wiener, M. C. & Kadner, R. J. (2002). Identification of the periplasmic cobalamin-binding protein BtuF of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**, 706-717.

Campos, J. M. & Zusman, D. R. (1975). Regulation of development in *Myxococcus xanthus*: effect of 3':5'-cyclic AMP, ADP, and nutrition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 518-522.

Carniol, K., Ben-Yehuda, S., King, N. & Losick, R. (2005). Genetic dissection of the sporulation protein SpoIIIE and its role in asymmetric division in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **187**, 3511-3520.

Chang, B. Y. & Dworkin, M. (1994). Isolated fibrils rescue cohesion and development in the Dsp mutant of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **176**, 7190-7196.

Chimento, D. P., Mohanty, A. K., Kadner, R. J. & Wiener, M. C. (2003). Substrate-induced transmembrane signaling in the cobalamin transporter BtuB. *Nat Struct Biol* **10**, 394-401.

Cho, K. & Zusman, D. R. (1999). AsgD, a new two-component regulator required for A-signalling and nutrient sensing during early development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **34**, 268-281.

Cho, K. & Zusman, D. R. (1999). Sporulation timing in *Myxococcus xanthus* is controlled by the *espAB* locus. *Mol Microbiol* **34**, 714-725.

Cohen, P. (1990). The structure and regulation of protein phosphatases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **24**, 230-235.

D'Autreaux, B., Tucker, N. P., Dixon, R. & Spiro, S. (2005). A non-haem iron centre in the transcription factor NorR senses nitric oxide. *Nature* **437**, 769-772.

Davis, J. M., Mayor, J. & Plamann, L. (1995). A missense mutation in *rpoD* results in an A-signalling defect in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **18**, 943-952.

Delumeau, O., Dutta, S., Brigulla, M., Kuhnke, G., Hardwick, S. W., Völker, U., Yudkin, M. D. & Lewis, R. J. (2004). Functional and structural characterization of RsbU, a stress signaling protein phosphatase 2C. *J Biol Chem* **279**, 40927-40937.

Downard, J., Ramaswamy, S. V. & Kil, K. S. (1993). Identification of *esg*, a genetic locus involved in cell-cell signaling during *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol* **175**, 7762-7770.

Durocher, D. & Jackson, S. P. (2002). The FHA domain. *FEBS Lett* **513**, 58-66.

Dutta, R., Qin, L. & Inouye, M. (1999). Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol Microbiol* **34**, 633-640.

Ellehaug, E., Norregaard-Madsen, M. & Søgaard-Andersen, L. (1998). The FruA signal transduction protein provides a checkpoint for the temporal co-ordination of intercellular signals in *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol* **30**, 807-817.

Ferguson, A. D. & Deisenhofer, J. (2002). TonB-dependent receptors-structural perspectives. *Biochim Biophys Acta* **1565**, 318-332.

Ferguson, A. D., Hofmann, E., Coulton, J. W., Diederichs, K. & Welte, W. (1998). Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* **282**, 2215-2220.

Fischer, A. J., Rockwell, N. C., Jang, A. Y., Ernst, L. A., Waggoner, A. S., Duan, Y., Lei, H. & Lagarias, J. C. (2005). Multiple roles of a conserved GAF domain tyrosine residue in cyanobacterial and plant phytochromes. *Biochemistry* **44**, 15203-15215.

Galyov, E. E., Hakansson, S., Forsberg, A. & Wolf-Watz, H. (1993). A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**, 730-732.

Garza, A. G., Pollack, J. S., Harris, B. Z., Lee, A., Keseler, I. M., Licking, E. F. & Singer, M. (1998). SdeK is required for early fruiting body development in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **180**, 4628-4637.

Gronewold, T. M. & Kaiser, D. (2002). *act* operon control of developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **184**, 1172-1179.

Hagen, D. C., Bretscher, A. P. & Kaiser, D. (1978). Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*. *Dev Biol* **64**, 284-296.

Han, G. & Zhang, C. C. (2001). On the origin of Ser/Thr kinases in a prokaryote. *FEMS Microbiol Lett* **200**, 79-84.

Hanks, S. K., Quinn, A. M. & Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**, 42-52.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.

Hanks, S. K., Quinn, A. M. & Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**, 42-52.

Hanlon, W. A., Inouye, M. & Inouye, S. (1997). Pkn9, a Ser/Thr protein kinase involved in the development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **23**, 459-471.

Hardwick, S. W., Pane-Farre, J., Delumeau, O., Marles-Wright, J., Murray, J. W., Hecker, M. & Lewis, R. J. (2007). Structural and functional characterization of partner switching regulating the environmental stress response in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **282**, 11562-11572.

Harris, B. Z., Kaiser, D. & Singer, M. (1998). The guanosine nucleotide (p)ppGpp initiates development and A-factor production in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev* **12**, 1022-1035.

Hart, B. A. & Zahler, S. A. (1966). Lytic enzyme produced by *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **92**, 1632-1637.

Hodgkin, J. & Kaiser, D. (1979). Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): Genes controlling movement of single cells. *Mol. Gen. Genet.* **171**, 167-176.

Hodgkin, J. & Kaiser, D. (1979). Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): Two gene systems control movement. *Mol. Gen. Genet.* **171**, 177-191.

Horiuchi, T., Taoka, M., Isobe, T., Komano, T. & Inouye, S. (2002). Role of *fruA* and *csgA* genes in gene expression during development of *Myxococcus xanthus*. Analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem* **277**, 26753-26760.

Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J. U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J. E., Lupas, A. N. & Coles, M. (2006). The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell* **126**, 929-940.

Inouye, S., Wang, S., Sekizawa, J., Haleboua, S. & Inouye, M. (1977). Amino acid sequence for the peptide extension on the prolipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 1004-1008.

Jakobsen, J. S., Jelsbak, L., Welch, R. D., Cummings, C., Goldman, B., Stark, E., Slater, S. & Kaiser, D. (2004). Sigma54 enhancer-binding proteins and *Myxococcus xanthus* fruiting body development. *J Bacteriol* **186**, 4361-4368.

Jelsbak, L., Givskov, M. & Kaiser, D. (2005). Enhancer-binding proteins with a forkhead-associated domain and the sigma54 regulon in *Myxococcus xanthus* fruiting body development. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 3010-3015.

Jin, H. & Pancholi, V. (2006). Identification and biochemical characterization of a eukaryotic-type serine/threonine kinase and its cognate phosphatase in *Streptococcus pyogenes*: their biological functions and substrate identification. *J Mol Biol* **357**, 1351-1372.

Jin, T. & Inouye, M. (1994). Transmembrane signaling. Mutational analysis of the cytoplasmic linker region of Taz1-1, a Tar-EnvZ chimeric receptor in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **244**, 477-481.

Johnson, L. N., Noble, M. E. & Owen, D. J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**, 149-158.

Julien, B., Kaiser, A. D. & Garza, A. (2000). Spatial control of cell differentiation in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9098-9103.

Kaiser, D. (1979). Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5952-5956.

- Kaiser, D. (1999).** Cell fate and organogenesis in bacteria. *Trends Genet* **15**, 273-277.
- Kaiser, D. (2003).** Coupling cell movement to multicellular development in myxobacteria. *Nat Rev Microbiol* **1**, 45-54.
- Kaiser, D. (2004).** Signaling in myxobacteria. *Annu Rev Microbiol* **58**, 75-98.
- Kanacher, T., Schultz, A., Linder, J. U. & Schultz, J. E. (2002).** A GAF-domain-regulated adenylyl cyclase from *Anabaena* is a self-activating cAMP switch. *Embo J* **21**, 3672-3680.
- Kaplan, H. B. (2003).** Multicellular development and gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Curr Opin Microbiol* **6**, 572-577.
- Kennelly, P. J. (2002).** Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. *FEMS Microbiol Lett* **206**, 1-8.
- Kim, S. K. & Kaiser, D. (1990).** Cell motility is required for the transmission of C-factor, an intercellular signal that coordinates fruiting body morphogenesis of *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev* **4**, 896-904.
- Kim, S. K. & Kaiser, D. (1990).** C-factor: a cell-cell signaling protein required for fruiting body morphogenesis of *M. xanthus*. *Cell* **61**, 19-26.
- Kim, S. K. & Kaiser, D. (1990).** Purification and properties of *Myxococcus xanthus* C-factor, an intercellular signaling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3635-3639.
- Kim, S. K. & Kaiser, D. (1991).** C-factor has distinct aggregation and sporulation thresholds during *Myxococcus* development. *J Bacteriol* **173**, 1722-1728.
- Koebnik, R. (2005).** TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule? *Trends Microbiol* **13**, 343-347.

Kroos, L. & Kaiser, D. (1987). Expression of many developmentally regulated genes in *Myxococcus* depends on a sequence of cell interactions. *Genes Dev* **1**, 840-854.

Kroos, L., Kuspa, A. & Kaiser, D. (1990). Defects in fruiting body development caused by Tn5 lac insertions in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **172**, 484-487.

Krupa, A. & Srinivasan, N. (2005). Diversity in domain architectures of Ser/Thr kinases and their homologues in prokaryotes. *BMC Genomics* **6**, 129.

Kruse, T., Lobedanz, S., Berthelsen, N. M. & Søgaard-Andersen, L. (2001). C-signal: a cell surface-associated morphogen that induces and co-ordinates multicellular fruiting body morphogenesis and sporulation in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **40**, 156-168.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

LaRossa, R., Kuner, J., Hagen, D., Manoil, C. & Kaiser, D. (1983). Developmental cell interactions of *Myxococcus xanthus*: analysis of mutants. *J Bacteriol* **153**, 1394-1404.

Lee, B. U., Lee, K., Mendez, J. & Shimkets, L. J. (1995). A tactile sensory system of *Myxococcus xanthus* involves an extracellular NAD(P)(+)-containing protein. *Genes Dev* **9**, 2964-2973.

Li, S., Lee, B. U. & Shimkets, L. J. (1992). *csgA* expression entrains *Myxococcus xanthus* development. *Genes Dev* **6**, 401-410.

Li, Y., Sun, H., Ma, X., Lu, A., Lux, R., Zusman, D. & Shi, W. (2003). Extracellular polysaccharides mediate pilus retraction during social motility of *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5443-5448.

Little, R. & Dixon, R. (2003). The amino-terminal GAF domain of *Azotobacter vinelandii* NifA binds 2-oxoglutarate to resist inhibition by NifL under nitrogen-limiting conditions. *J Biol Chem* **278**, 28711-28718.

Lobedanz, S. & Søgaard-Andersen, L. (2003). Identification of the C-signal, a contact-dependent morphogen coordinating multiple developmental responses in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev* **17**, 2151-2161.

Locher, K. P., Rees, B., Koebnik, R., Mitschler, A., Moulinier, L., Rosenbusch, J. P. & Moras, D. (1998). Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell* **95**, 771-778.

Manoil, C. & Kaiser, D. (1980). Purine-containing compounds, including cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, induce fruiting of *Myxococcus xanthus* by nutritional imbalance. *J Bacteriol* **141**, 374-377.

Matsumoto, A., Hong, S. K., Ishizuka, H., Horinouchi, S. & Beppu, T. (1994). Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene* **146**, 47-56.

McBride, M. J., Weinberg, R. A. & Zusman, D. R. (1989). "Fizzy" aggregation genes of the gliding bacterium *Myxococcus xanthus* show sequence similarities to the chemotaxis genes of enteric bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 424-428.

McCleary, W. R., McBride, M. J. & Zusman, D. R. (1990). Developmental sensory transduction in *Myxococcus xanthus* involves methylation and demethylation of FrzCD. *J Bacteriol* **172**, 4877-4887.

Mignot, T. (2007). The elusive engine in *Myxococcus xanthus* gliding motility. *Cell Mol Life Sci.* (Epub ahead of print)

Mignot, T., Shaevitz, J. W., Hartzell, P. L. & Zusman, D. R. (2007). Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility. *Science* **315**, 853-856.

Munoz-Dorado, J., Inouye, S. & Inouye, M. (1991). A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell* **67**, 995-1006.

Nadvornik, R., Vomastek, T., Janecek, J., Technikova, Z. & Branny, P. (1999). Pkg2, a novel transmembrane protein Ser/Thr kinase of *Streptomyces granaticolor*. *J Bacteriol* **181**, 15-23.

Narita, S. & Tokuda, H. (2006). An ABC transporter mediating the membrane detachment of bacterial lipoproteins depending on their sorting signals. *FEBS Lett* **580**, 1164-1170.

Nariya, H. & Inouye, S. (2002). Activation of 6-phosphofructokinase via phosphorylation by Pkn4, a protein Ser/Thr kinase of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **46**, 1353-1366.

Nariya, H. & Inouye, S. (2006). A protein Ser/Thr kinase cascade negatively regulates the DNA-binding activity of MrpC, a smaller form of which may be necessary for the *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol* **60**, 1205-1217.

O'Connor, K. A. & Zusman, D. R. (1991). Analysis of *Myxococcus xanthus* cell types by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J Bacteriol* **173**, 3334-3341.

Ogawa, M., Fujitani, S., Mao, X., Inouye, S. & Komano, T. (1996). FruA, a putative transcription factor essential for the development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **22**, 757-767.

Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B. & Jornvall, H. (2003). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact* **143-144**, 247-253.

Plamann, L., Davis, J. M., Cantwell, B. & Mayor, J. (1994). Evidence that *asgB* encodes a DNA-binding protein essential for growth and development of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **176**, 2013-2020.

Plamann, L., Li, Y., Cantwell, B. & Mayor, J. (1995). The *Myxococcus xanthus asgA* gene encodes a novel signal transduction protein required for multicellular development. *J Bacteriol* **177**, 2014-2020.

Pollack, J. S. & Singer, M. (2001). SdeK, a histidine kinase required for *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol* **183**, 3589-3596.

Quinlan, M. S. & Raper, K. B. (1965). Development of the myxobacteria. *Hdb. Pflanzenphysiol.* **15**, 596-611.

Rasmussen, A. A., Porter, S. L., Armitage, J. P. & Søggaard-Andersen, L. (2005). Coupling of multicellular morphogenesis and cellular differentiation by an unusual hybrid histidine protein kinase in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **56**, 1358-1372.

Rasmussen, A. A. & Søggaard-Andersen, L. (2003). TodK, a putative histidine protein kinase, regulates timing of fruiting body morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **185**, 5452-5464.

Reichenbach, H. (1999). The ecology of the myxobacteria. *Environ Microbiol* **1**, 15-21.

Rodriguez-Soto, J. P. & Kaiser, D. (1997). Identification and localization of the Tgl protein, which is required for *Myxococcus xanthus* social motility. *J Bacteriol* **179**, 4372-4381.

Rolbetzki, A. (2007). unpublished data.

Rybalkin, S. D., Rybalkina, I. G., Shimizu-Albergine, M., Tang, X. B. & Beavo, J. A. (2003). PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. *Embo J* **22**, 469-478.

Sanford, R. A., Cole, J. R. & Tiedje, J. M. (2002). Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halorespiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl Environ Microbiol* **68**, 893-900.

Sardiwal, S., Kendall, S. L., Movahedzadeh, F., Rison, S. C., Stoker, N. G. & Djordjevic, S. (2005). A GAF domain in the hypoxia/NO-inducible *Mycobacterium tuberculosis* DosS protein binds haem. *J Mol Biol* **353**, 929-936.

Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-379.

Schalk, I. J., Yue, W. W. & Buchanan, S. K. (2004). Recognition of iron-free siderophores by TonB-dependent iron transporters. *Mol Microbiol* **54**, 14-22.

Sean Peacock, R., Weljie, A. M., Peter Howard, S., Price, F. D. & Vogel, H. J. (2005). The solution structure of the C-terminal domain of TonB and interaction studies with TonB box peptides. *J Mol Biol* **345**, 1185-1197.

Shimkets, L. J., Gill, R. E. & Kaiser, D. (1983). Developmental cell interactions in *Myxococcus xanthus* and the *spoC* locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1406-1410.

Shimkets, L. J. & Kaiser, D. (1982). Induction of coordinated movement of *Myxococcus xanthus* cells. *J Bacteriol* **152**, 451-461.

Shimkets, L. J. & Rafiee, H. (1990). CsgA, an extracellular protein essential for *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol* **172**, 5299-5306.

Skerker, J. M. & Berg, H. C. (2001). Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6901-6904.

Sliusarenko, O., Zusman, D. R. & Oster, G. (2007). Aggregation during fruiting body formation in *Myxococcus xanthus* is driven by reducing cell movement. *J Bacteriol* **189**, 611-619.

Søgaard-Andersen, L. & Kaiser, D. (1996). C factor, a cell-surface-associated intercellular signaling protein, stimulates the cytoplasmic Frz signal transduction system in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2675-2679.

Søgaard-Andersen, L., Slack, F. J., Kimsey, H. & Kaiser, D. (1996). Intercellular C-signaling in *Myxococcus xanthus* involves a branched signal transduction pathway. *Genes Dev* **10**, 740-754.

Søgaard-Andersen, L., Overgaard, M., Lobedanz, S., Ellehauge, E., Jelsbak, L. & Rasmussen, A. A. (2003). Coupling gene expression and multicellular morphogenesis during fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **48**, 1-8

Spormann, A. M. & Kaiser, A. D. (1995). Gliding movements in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **177**, 5846-5852.

Spratt, B. G., Hedge, P. J., te Heesen, S., Edelman, A. & Broome-Smith, J. K. (1986). Kanamycin-resistant vectors that are analogues of plasmids pUC8, pUC9, pEMBL8 and pEMBL9. *Gene* **41**, 337-342.

Stein, E. A., Cho, K., Higgs, P. I. & Zusman, D. R. (2006). Two Ser/Thr protein kinases essential for efficient aggregation and spore morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **60**, 1414-1431.

Treuner-Lange, A., Ward, M. J. & Zusman, D. R. (2001). Pph1 from *Myxococcus xanthus* is a protein phosphatase involved in vegetative growth and development. *Mol Microbiol* **40**, 126-140.

Udo, H., Inouye, M. & Inouye, S. (1996). Effects of overexpression of Pkn2, a transmembrane protein serine/threonine kinase, on development of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **178**, 6647-6649.

Udo, H., Munoz-Dorado, J., Inouye, M. & Inouye, S. (1995). *Myxococcus xanthus*, a gram-negative bacterium, contains a transmembrane protein serine/threonine kinase that blocks the secretion of beta-lactamase by phosphorylation. *Genes Dev* **9**, 972-983.

Ueki, T. & Inouye, S. (2003). Identification of an activator protein required for the induction of *fruA*, a gene essential for fruiting body development in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8782-8787.

Ward, M. J. & Zusman, D. R. (1999). Motility in *Myxococcus xanthus* and its role in developmental aggregation. *Curr Opin Microbiol* **2**, 624-629.

Wentzel, A., Christmann, A., Adams, T. & Kolmar, H. (2001). Display of passenger proteins on the surface of Escherichia coli K-12 by the enterohemorrhagic E. coli intimin EaeA. *J Bacteriol* **183**, 7273-7284.

White, D. J. & Hartzell, P. L. (2000). AglU, a protein required for gliding motility and spore maturation of *Myxococcus xanthus*, is related to WD-repeat proteins. *Mol Microbiol* **36**, 662-678.

Wireman, J. W. & Dworkin, M. (1977). Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **129**, 798-802.

Wolgemuth, C., Hoiczky, E., Kaiser, D. & Oster, G. (2002). How myxobacteria glide. *Curr Biol* **12**, 369-377.

Wu, S. S. & Kaiser, D. (1995). Genetic and functional evidence that Type IV pili are required for social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **18**, 547-558.

Yang, Z., Ma, X., Tong, L., Kaplan, H. B., Shimkets, L. J. & Shi, W. (2000). *Myxococcus xanthus dif* genes are required for biogenesis of cell surface fibrils essential for social gliding motility. *J Bacteriol* **182**, 5793-5798.

Zhang, W., Inouye, M. & Inouye, S. (1996). Reciprocal regulation of the differentiation of *Myxococcus xanthus* by Pkn5 and Pkn6, eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases. *Mol Microbiol* **20**, 435-447.

Zusman, D. R. (1982). "Frizzy" mutants: a new class of aggregation-defective developmental mutants of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **150**, 1430-1437.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Reiner Hedderich für die sehr intensive Betreuung während dieser Arbeit, seine ständige Erreichbarkeit und Diskussionsbereitschaft. Sein Engagement hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Prof. Dr. Lotte Søgaard-Andersen danke ich für die Erlebnisse beim Aufbau der neuen Abteilung, für die vielen interessanten Diskussionen und Seminare und für eine neue Sicht für viele Dinge.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Jürgen Koch für die Unterstützung bei zahlreichen Experimenten. Seine Erfahrung und seine Fachkenntnis haben mir sehr geholfen.

Frau Meike Ammon danke ich für die Konstruktion und die großzügige Bereitstellung der Deletionsmutante RH4001.

Herrn Jörg Kahnt danke ich für die Durchführung der Messungen am Massenspektrometer und für viele hilfreiche Ratschläge.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Marie Anders und bei Frau Steffi Lindow für die Durchführung der DNA-Sequenzierungen.

Frau Dr. Sigrun Wegener-Feldbrügge danke ich für die Hilfestellung bei der real-time PCR.

Ganz besonders danke ich den Mitgliedern meiner IMPRS-Kommission, Herrn PD Dr. Reiner Hedderich, Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl, Frau Prof. Dr. Lotte Søgaard-Andersen und Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch. Die jährlichen Treffen mit ihnen haben viele interessante, neue Ideen hervorgebracht.

Bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hedderich, Herrn PD Dr. Reiner Hedderich, Herrn Jürgen Koch, Herrn Dr. Nils Hamann, Frau Meike Ammon, Herrn Patrick Rose und Frau Carina Mengel, bedanke ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Herrn PD Dr. Reiner Hedderich und Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl danke ich für die Übernahme der Gutachten.

Ich bedanke mich darüber hinaus bei Herrn Dr. Henning Seedorf, Frau Sonja Vogt, Frau Anne Rolbetzki, Frau Marie Anders, Herrn Jörg Kahnt, Herrn Dr. Gerald Freyemark, Frau Steffi Lindow und allen weiteren Mitgliedern der Abteilungen Ökophysiologie und Biochemie für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung. Insbesondere danke ich ihnen auch für die angenehme Zeit außerhalb des Laboralltags. Anne und Meike danke ich für die nette Gesellschaft während den Kaffeepausen.

Außerdem danke ich Frau Dr. Astrid Brandis-Heep für die gute Betreuung während des Grund- und Hauptstudiums und für die Organisation des Praktikums in Paris.

Mein Dank gilt auch der Max-Planck-Gesellschaft, durch deren Mittel diese Arbeit gefördert wurde.

Zu guter letzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Freundin Sabine und bei meiner Familie für die dauerhafte Unterstützung bedanken.

Lebenslauf

Name: Sebastian Peter Konrad Weis
Geburtsdatum: 13. Juli 1979
Geburtsort: Erlenbach am Main
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung: 09/85-07/88 Grundschule „Elsavatal“ in Heimbuchenthal
09/88-07/97 „Hanns-Seidel-Gymnasium“ in Hösbach,
allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst: 09/97-06/98 Grundwehrdienst bei 2./FmBtl230 in Dillingen
an der Donau
ab 09/99 Ausbildung zum Reserveoffizier

Studium: 10/98-09/00 Grundstudium der Biologie an der Philipps-
Universität Marburg, Vordiplom
10/00-09/02 Hauptstudium an der Philipps-Universität
Marburg in den Fächern Mikrobiologie,
Entwicklungsbiologie und Biochemie/Virologie
09/02-12/02 Praktikum am „Institut de Génétique et
Microbiologie“ der Université Paris-Sud XI
(Arbeitsgruppe Dr. Mark Blight) im Rahmen
des SOKRATES-Programms
04/03 mündliche Diplomprüfung an der Philipps-
Universität Marburg
06/03-03/04 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe PD Dr.
Reiner Hedderich am Max-Planck-Institut für
terrestrische Mikrobiologie (Abteilung Prof. Dr.
Rudolf K. Thauer)
05/04-07/04 Arbeit als studentische Hilfskraft in der
Arbeitsgruppe PD Dr. Reiner Hedderich am
Max-Planck-Institut für terrestrische
Mikrobiologie (Abteilung Prof. Dr. Rudolf K.
Thauer)
08/04-09/07 Promotion in der Arbeitsgruppe PD Dr. Reiner
Hedderich am Max-Planck-Institut für
terrestrische Mikrobiologie (Abteilung Prof. Dr.
Lotte Søgaard-Andersen)

Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation mit dem Titel „Identifizierung und Charakterisierung zweier für die Entwicklung essentieller Serin/Threonin-Proteinkinasen in *Myxococcus xanthus*“ selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei in keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 25. September 2007

Sebastian Weis

Einverständniserklärung

Ich erkläre mich damit einverstanden, daß die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Identifizierung und Charakterisierung zweier für die Entwicklung essentieller Serin/Threonin-Proteinkinasen in *Myxococcus xanthus*“ in Bibliotheken allgemein zugänglich gemacht wird. Dazu gehört, daß sie

- von der Bibliothek der Einrichtung, in der ich meine Arbeit angefertigt habe, zur Benutzung in ihren Räumen bereitgehalten wird,
- in konventionellen und maschinenlesbaren Katalogen, Verzeichnissen und Datenbanken verzeichnet wird,
- der Universitätsbibliothek für die lokale Nutzung und für Fernleihzwecke zur Verfügung steht und
- im Rahmen der urheberrechtlichen Bestimmungen für Kopierzwecke genutzt werden kann.

Marburg, den 25. September 2007

Sebastian Weis,
Verfasser

PD Dr. Reiner Hedderich,
betreuender Hochschullehrer