

**Regulierung der Polarität des
A-Bewegungssystems in
*Myxococcus xanthus***

Dissertation

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

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Simone Leonardy
aus Trier

Marburg / Lahn, April 2009

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2005 bis März 2009 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. MD Lotte Søgaard-Andersen durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. MD Lotte Søgaard-Andersen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Tag der mündlichen Prüfung:

Die während der Promotion erzielten Ergebnisse sind zum Teil in folgender Originalpublikation veröffentlicht:

Leonardy, S., G. Freymark, S. Hebener, E. Ellehaug & L. Søgaard-Andersen, (2007) Coupling of protein localization and cell movements by a dynamically localized response regulator in *Myxococcus xanthus*. *EMBO J* **26**: 4433-4444.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, wie auch anderer Arbeiten auf demselben Gebiet, wurden während der Dissertation in folgendem Review diskutiert:

Leonardy, S., I. Bulyha & L. Søgaard-Andersen, (2008) Reversing cells and oscillating motility proteins. *Mol Biosyst* **4**: 1009-1014.

Ergebnisse aus in dieser Dissertation nicht erwähnten Projekten sind in der folgenden Originalpublikation veröffentlicht:

Jakovljevic, V., **S. Leonardy**, M. Hoppert & L. Søgaard-Andersen, (2008) PilB and PilT are ATPases acting antagonistically in type IV pilus function in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **190**: 2411-2421.

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	7
1 Zusammenfassung	8
2 Einleitung	11
2.1 Lebenszyklus von <i>M. xanthus</i>	11
2.2 Gleitende Fortbewegung von <i>M. xanthus</i>	16
2.3 Das S-Bewegungssystem	17
2.4 Das A-Bewegungssystem	19
2.5 Richtungswechsel und Polarität in <i>M. xanthus</i> Zellen	21
2.6 Regulierung der Richtungswechsel durch das Frz chemosensorische System	23
2.7 Der Response Regulator RomR	27
2.8 Das MglA Protein („mutual gliding A“)	30
2.9 Zielsetzung der Doktorarbeit	32
3 Material und Methoden	34
3.1 Chemikalien und Materialien	34
3.2 Enzyme	35
3.3 Medien	35
3.4 Verwendete Bakterienstämme und mikrobiologische Methoden	36
3.4.1 Bakterienstämme	36
3.4.2 Kultivierung der Bakterien	40
3.4.3 Lagerung von transformierter <i>M. xanthus</i> und <i>E. coli</i> Stämme.....	41
3.4.4 Untersuchung der Bewegungsfähigkeit von <i>M. xanthus</i> Stämmen	41
3.5 Molekularbiologische Methoden	42
3.5.1 Verwendete Oligonukleotide und Plasmide.....	42
3.5.2 Präparation von DNA aus <i>E. coli</i> und <i>M. xanthus</i>	46
3.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	47
3.5.4 Restriktion und Klonierung von DNA.....	48
3.5.5 Herstellung von chemischkompetenten <i>E. coli</i> Zellen	49
3.5.6 Herstellung von elektrokompenten <i>E. coli</i> Zellen	50
3.5.7 Transformation von <i>E. coli</i> Zellen.....	50
3.5.8 DNA-Sequenzierung	51
3.5.9 Elektroporation von <i>M. xanthus</i>	51
3.5.10 Herstellung der Plasmidkonstrukte	53
3.5.11 Konstruktion einer <i>romR</i> „in frame“ Deletionsmutante in <i>M. xanthus</i>	55
3.5.12 Herstellung verschiedener Insertionsmutanten	56

3.6	Mikroskopie	57
3.6.1	Durchführung der Mikroskopie	57
3.6.2	Vorbereitung der Proben für die Zeitrafferaufnahmen	58
3.6.3	Anfertigung von Zeitrafferaufnahmen	58
3.6.4	Anfärben von Typ-IV-Pili	59
3.6.5	Immunfluoreszenz Mikroskopie	60
3.6.6	Dekonvolutions-Mikroskopie	61
3.7	Biochemische Methoden	61
3.7.1	Überproduktion und Aufreinigung verschiedener MglA Proteine	61
3.7.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	63
3.7.3	Protein-Auftrennung: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	63
3.7.4	Nachweis von Proteinen durch Western Blot Analyse	64
3.7.5	GTP Bindungsversuch/ GTPase Aktivierungsversuch	66
4	Ergebnisse	67
4.1	RomR („<u>r</u>required for <u>m</u>otility <u>r</u>esponse <u>r</u>egulator“) Protein	67
4.1.1	Untersuchung der RomR Lokalisierung in <i>M. xanthus</i> Zellen	67
4.1.2	Betrachtung der RomR-GFP Lokalisierung während der zellulären Fortbewegung	70
4.1.3	Dynamische Lokalisierung von RomR-GFP während eines Richtungswechsels in der zellulären Bewegung	72
4.1.4	Bestimmung der verantwortlichen Domänen für die RomR Lokalisierung in <i>M. xanthus</i> Zellen	75
4.1.5	Untersuchung der Abhängigkeit der dynamischen RomR Lokalisierung von dem Frz chemosensorischen System	78
4.1.6	Überprüfung der Phänotypen der RomR D53N und D53E Proteine in den <i>frz</i> Mutanten	79
4.1.7	Analyse der Lokalisierung von RomR und FrzS in <i>M. xanthus</i> Zellen	83
4.2	MglA („<u>m</u>utual <u>g</u>liding <u>A</u>“) Protein	86
4.2.1	Analyse der MglA Primärstruktur und des <i>mgI</i> Lokus	86
4.2.2	Analyse des Phänotyps der MglA-G21V und MglA-T26/27N Mutationen in <i>M. xanthus</i>	89
4.2.3	Untersuchung des Zusammenhangs der Stimulierung von Richtungswechsel durch das Frz-System und durch MglA	95
4.2.4	Untersuchung der Lokalisierung von MglA ⁺ , MglA ^{9of} und MglA ^{lof} Proteine in <i>M. xanthus</i>	97
4.2.5	Betrachtung der YFP-MglA ⁺ Lokalisierung während der zellulären Fortbewegung	102
4.2.6	Untersuchung der YFP-MglA ^{9of} Lokalisierung während der zellulären Bewegung	105
4.2.7	Untersuchung der RomR-GFP Lokalisierung in verschiedenen <i>mgI</i> A Mutanten	108
4.2.8	Analyse des Signalwegs für die Induzierung der Richtungswechsel der Zellen	110
4.2.9	Untersuchung des Zusammenspiels der MglA und RomR Proteine für die Induzierung von Richtungswechseln	112

4.2.10	Betrachtung des Einflusses von MglA auf die Lokalisierung des A-Bewegungssystems Protein AglZ	116
4.2.11	Überproduktion und Aufreinigung von MglA ⁺ , MglA ^{gof} und MglA ^{lof} Proteine.....	119
4.2.12	Nachweis der GTP Bindungsfähigkeit des MglA ⁺ , MglA ^{gof} und MglA ^{lof} Proteins.....	120
5	Diskussion	122
5.1	Die polare asymmetrische Lokalisierung von RomR ist wichtig für die Aktivität der A-Bewegung.....	123
5.2	Die Phosphorylierung der RomR Receiver Domäne beeinflusst die dynamische RomR Lokalisierung.....	125
5.2.1	Mechanismus der dynamischen RomR Lokalisierung	128
5.3	Die dynamische RomR Lokalisierung beeinflusst die Richtungswechsel der Zellen	130
5.4	Die beiden Bewegungsmaschinerien in <i>M. xanthus</i> wechseln synchron ihre Polarität während eines Richtungswechsels.....	132
5.5	Das MglA Protein zeigt <i>in vivo</i> die Aktivität einer kleinen GTPase der Ras/Rac/Rho Superfamilie.....	133
5.6	Der Transfer des MglA Proteins zum hinteren Zellpol leitet einen Richtungswechsel ein.....	135
5.7	MglA arbeitet stromabwärts des Frz-Systems um zelluläre Richtungswechsel zu stimulieren.....	140
5.8	MglA stimuliert die Richtungswechsel durch die Festlegung der RomR Lokalisierung in den Zellen	142
5.9	Modell für die Stimulierung der Richtungswechsel in dem A- Bewegungssystem.....	150
6	Anhang	157
6.1	Phänotyp einer <i>romR</i> „in frame“ Deletionsmutante	157
	Literaturverzeichnis	159
7	Dank.....	167
	Lebenslauf	169
	Erklärung	171

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
Bp	Basenpaare
Cm	Chloramphenicol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GDP/GTP	Guanosindi- /Guanosintriphosphat
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GST	Glutathione-S-transferase
IPTG	Isoproyl-b-Thiogalaktopyranoid
Kb	Kilobasenpaare
Km	Kanamycin
LB	Luria-Bertani-Medium
mDsRed	monomeres fluoreszierendes Protein, Mutante des rot-fluoreszierendes Protein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehung pro Minute („rounds per minute“)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TE	Tris-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyclin
YFP	Gelb-fluoreszierendes Protein

1 Zusammenfassung

Die Zellen des stäbchenförmigen Bakteriums *Myxococcus xanthus* bewegen sich mit einer Flagellen-unabhängigen, gleitenden Bewegung auf festen Oberflächen vorwärts. Hierfür verwenden die Zellen zwei verschiedene, synergistisch- arbeitende Fortbewegungssysteme. Die S-Bewegung („social“) stellt eine Zell-Zellkontakt-abhängige Bewegung dar, welche durch die Retraktion von unipolar lokalisierten Typ IV Pili vermittelt wird. Dagegen befähigt die A-Bewegung („adventurous“) die Zellen eine individuelle und von anderen Zellen unabhängige Vorwärtsbewegung auszuführen.

M. xanthus Zellen wechseln regelmäßig die Richtung ihrer Bewegung, wobei der alte vordere Pol zum neuen hinteren Zellpol wird. Während eines Richtungswechsels müssen die beiden Bewegungsmaschinerien synchron ihre Polarität innerhalb der Zelle ändern, um eine erneute Vorwärtsbewegung in die entgegengesetzte Richtung zu garantieren. Um den molekularen Mechanismus, welcher den Polaritätswechsel der Bewegungsmaschinerien vermittelt, zu erforschen wurden das RomR Protein und das MglA Protein genauer analysiert.

Der Response Regulator RomR besteht aus einer N-terminalen Receiver Domäne und einer C-terminalen Prolinreichen Output Domäne. Das Protein ist essentiell für die A-Bewegung der Zellen. Diese Arbeit demonstriert, dass das RomR-GFP Fusionsprotein in einer asymmetrischen Verteilung an beiden Zellpolen lokalisiert. Wobei eine verstärkte Ansammlung des RomR-GFP Proteins am hinteren Zellpol lokalisiert, wenn die Zelle sich vorwärts bewegt. Parallel mit einem Richtungswechsel in der Bewegung wechselt die verstärkte Ansammlung von RomR-GFP von dem alten hinteren Pol zum neuen hinteren Zellpol. Dies deutet an, dass RomR am hinteren Zellpol stimulierend auf eine Komponente der A-Bewegungsmaschinerie einwirkt. Zusätzlich konnte auf genetischer Ebene gezeigt werden, dass die dynamische RomR Lokalisierung zwischen den Polen auf der Phosphorylierung der Receiver Domäne basiert und durch das Frz chemosensorische System, welches die Richtungswechsel in der Zelle steuert, reguliert wird. Analysen verschiedener RomR Mutantenproteine in einer *frz* Mutante, die keine Richtungswechsel vollzieht,

weisen daraufhin, dass RomR stromabwärts des Frz-Systems agiert, um Richtungswechsel im A-Bewegungssystem einzuleiten.

Das MglA Protein weist in der Primärstruktur Ähnlichkeiten zu eukaryontischen kleinen GTPasen der Ras/Rac/Rho Superfamilie auf und wird für die A-Bewegung benötigt. Eine inaktive, im GDP gebundene MglA Form (MglA^{of}) ist nicht fähig, die A-Bewegung zu stimulieren, während eine konstitutiv aktive MglA Form, gebundenen im GTP Zustand (MglA^{gof}), die A-Bewegung der Zellen anregt und die Durchführung häufiger Richtungswechsel stimuliert.

Das native YFP-MglA Protein lokalisiert am vorderen Zellpol und wechselt zwischen den beiden Polen, während die Zelle einen Richtungswechsel vollzieht. Das YFP-MglA^{gof} Protein hingegen oszilliert ständig zwischen den Zellpolen, während sich das YFP-MglA^{of} Protein homogen in der gesamten Zelle verteilt.

Aufgrund dieser Beobachtungen, nehmen wir an, dass eine mittlere Menge an MglA im GTP gebundenen Zustand am vorderen Zellpol lokalisiert und die A-Bewegung stimuliert. Wird ein erhöhter Level an MglA im GTP gebundenen Zustand erreicht, so wird das MglA Protein an dem vorderen Zellpol freigesetzt und gelangt von dort zum hinteren Zellpol. Sobald die erhöhte Menge an MglA im GTP gebundenen Zustand den hinteren Zellpol erreicht, wechselt die Zelle ihre Bewegungsrichtung. Dieser Zusammenhang weist daraufhin, dass der Transfer eines erhöhten Levels an MglA in der GTP gebundenen Form, gefolgt von der vollständigen Lokalisierung am hinteren Zellpol einen Richtungswechsel in der A-Bewegung induziert. Auf genetischer Ebene wurden Hinweise gefunden, dass MglA stromabwärts des Frz-Systems in demselben Signalweg agiert, um Richtungswechsel in dem A-Bewegungssystem einzuleiten. Weiterhin scheint RomR stromabwärts von MglA zu agieren, bezüglich der Richtungswechsel, jedoch gibt es ebenfalls eine Rückkopplung zwischen diesen beiden Proteinen, da beide die jeweilige Lokalisierung des anderen Proteins beeinflussen.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit nehmen wir an, dass das Frz-System ein Signal wahrnimmt und daraufhin eine GTP Bindung an MglA stimuliert. Die vermehrte GTP Bindung führt zu einem Transfer des MglA-GTP

Proteins vom vorderen Pol zum hinteren Zellpol. Sobald die erhöhte Menge an MglA im GTP gebundenen Zustand den hinteren Zellpol erreicht, interagiert MglA-GTP mit dem unphosphorylierten RomR Protein. Gleichzeitig wird RomR phosphoryliert und die GTP Hydrolyse von MglA wird stimuliert. Das phosphorylierte RomR wechselt zum neuen hinteren Zellpol, durch die GTP Hydrolyse wird erneut eine mittlere Menge an MglA im GTP gebundenen Zustand erreicht, welche an dem neuen vorderen Pol der Zelle lokalisiert.

Folglich reguliert die prokaryontische kleine GTPase MglA der Ras/Rac/Rho Familie die Zellpolarität über die Festlegung der RomR Lokalisierung in der Zelle.

2 Einleitung

In ihrer natürlichen Umgebung sind Bakterien ständig wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt. Die Bakterien haben verschiedene Strategien entwickelt, um sich an die wechselnden Bedingungen anzupassen und ihr Überleben zu sichern. Die Zellen besitzen Signaltransduktionssysteme für die Wahrnehmung von Veränderungen in ihrem natürlichen Habitat. Diese Wahrnehmung ermöglicht es den Bakterien die Information weiterzuverarbeiten und zum einen, mit einer veränderten Genexpression auf die neuen Bedingungen zu reagieren. Zum anderen befähigt diese Wahrnehmung die Zellen direkt durch eine Abwandlung ihres Bewegungsverhaltens den veränderten Bedingungen zu begegnen. Aufgrund der entscheidenden Bedeutung der Fortbewegung für das Überleben der Bakterien erklärt sich die Entstehung von verschiedenen Bewegungsformen. Diese Arbeit behandelt das Bewegungsverhalten und die Regulierung der Fortbewegung des Bakteriums *Myxococcus xanthus*.

Myxobacteria sind eine Gruppe Gram-negativer, stäbchenförmiger Bodenorganismen, welche zu den δ -Proteobakterien zählen. Der Metabolismus der chemoorganotrophen Myxobakterien ist, mit Ausnahme von *Anaeromyxobacter dehalogenans* (Sanford *et al.*, 2002), strikt aerob. Charakteristisch für diese Bakterien ist eine gleitende Fortbewegung auf festen Oberflächen und ein hochentwickeltes, mehrzelliges, „soziales“ Verhalten (Reichenbach, 1999). Die Etablierung von verschiedenen molekularbiologischen Methoden in dem Modellorganismus *Myxococcus xanthus* ermöglicht die Untersuchung dieser komplexen Prozesse in diesem Bakterium.

2.1 Lebenszyklus von *M. xanthus*

Der myxobakterielle Lebenszyklus besteht aus zwei Teilen (Abb. 1a), dem vegetativen Zellwachstumszyklus und dem Entwicklungszyklus. Unter nährstoffreichen Bedingungen bewegen sich die vegetativen Zellen auf festen Oberflächen in koordinierten Zellgruppen vorwärts und teilen sich. Diese Zellgruppen können aus Tausenden von Zellen bestehen, welche hydrolytische Enzyme in ihre Umgebung sekretieren. Diese Enzyme lysieren andere

prokaryotische Zellen und überführen unlösliche Proteine in lösliche, transportierbare Aminosäuren. Diese gemeinschaftliche Ernährungsstrategie wird als „Wolfsrudel-Ernährung“ bezeichnet (Rosenberg *et al.*, 1977) und erhöht die Nährstoffumsetzung im Vergleich zu einer einzelnen Zelle erheblich.

Die koordinierte Fortbewegung vegetativer Zellen in Zellgruppen bietet ebenfalls die Basis für das Überleben der Bakterien unter nährstoffarmen Bedingungen. Der Entwicklungszyklus wird als Antwort auf Nährstoffmangel bei hoher Zelldichte auf festen Oberflächen initiiert. Vier bis sechs Stunden nach Beginn des Hungerzustands wechselt das Bewegungsverhalten der Bakterien von der expansiven Fortbewegung hinzu einer gerichteten Bewegung in Zellaggregate (Abb. 1b). Durch das Eintreten weiterer Zellen vergrößern sich die Zellaggregate und es entstehen kleine Hügel. Innerhalb dieser anwachsenden Hügel beginnen die Zellen sich strömend in Kreisen fortzubewegen (Abb. 1a). Letztendlich kommt es zu einer Formation von art-spezifischen multizellularen Fruchtkörpern (McCurdy, 1974). Die domförmig-gewölbten *M. xanthus* Fruchtkörper (Abb. 1b) bestehen aus ungefähr 10^5 -Zellen. Von der anfänglichen, hungernden Gesamtpopulation differenzieren ca. 1 bis 3% zu Sporen (Søgaard-Andersen *et al.*, 1996, Wireman & Dworkin, 1977). Diese ruhenden, sphärischen Myxosporen (Abb. 1a) ermöglichen es den Bakterien Hitze und Trockenheit zu widerstehen, um dann unter nährstoffreichen Bedingungen zu keimen und wieder in den Zellwachstumszyklus überzugehen. Die Anordnung zu Fruchtkörpern erleichtert es den Zellen sich nach der Keimung erneut in koordinierten Zellgruppen fortzubewegen und damit eine effizientere, gemeinschaftliche Ernährung zu gewährleisten.

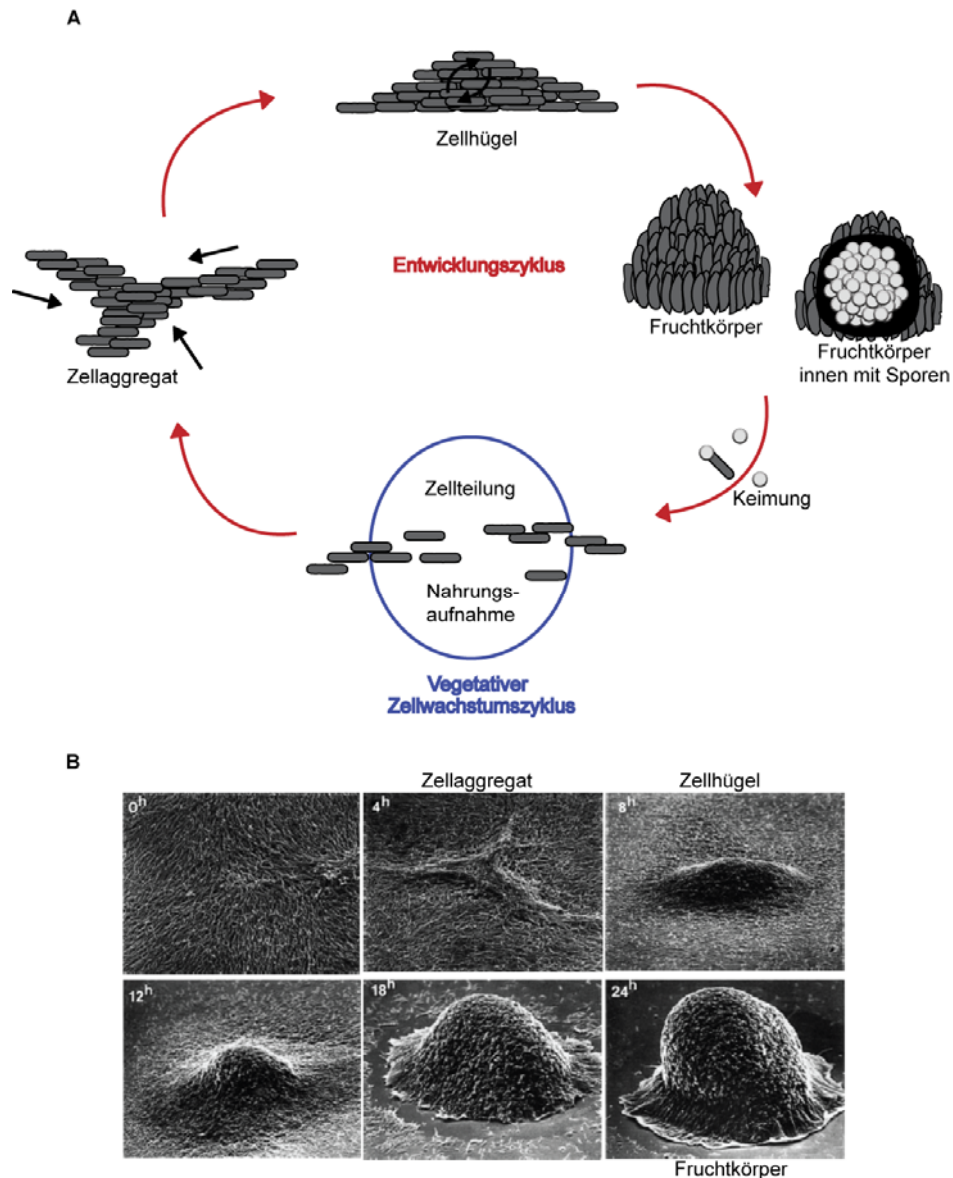


Abbildung 1: Vegetativer Zellwachstumszyklus und Entwicklungszyklus von *Myxococcus xanthus*. **A]** Schematische Darstellung der einzelnen Schritte im myxobakteriellen Lebenszyklus. Eine detaillierte Beschreibung ist im Text zu finden. Die schwarzen Pfeile deuten die Zellbewegungsrichtung an. **B]** Dargestellt sind die verschiedenen morphologischen Stadien im Entwicklungszyklus (Kuner & Kaiser, 1982) bis zur Bildung des Fruchtkörpers. Links oben in der Ecke befindet sich eine Zeitangabe, die Auskunft über die Dauer des Hungerzustandes gibt.

Die Tatsache, dass myxobakterielle Fruchtkörper überall auf der Erde isoliert werden konnten, zeigt wie erfolgreich diese Überlebensstrategie ist (Reichenbach, 1999, Dawid, 2000). Jedoch nehmen nicht alle *M. xanthus* Zellen an der Formation von Fruchtkörper teil. Zehn Prozent der hungernden Zellen bleiben außerhalb der Zellaggregate. Diese stäbchenförmigen Bakterien („peripheral rods“) unterscheiden sich physiologisch von den vegetativen Zellen (O'Connor & Zusman, 1991). Möglicherweise verhindern die peripheren

Stäbchen eine Kolonisation der ruhenden Fruchtkörper durch andere Mikroben. Am Anfang des Entwicklungszyklus begehen über 80% der initialen Zellpopulation eine Zellyse (Wireman & Dworkin, 1977, Nariya & Inouye, 2008). Die Funktion dieser Autolyse ist unbekannt, sie könnte Energiequellen und Strukturproteine bereitstellen, die von den überlebenden Zellen für den Entwicklungszyklus benötigt werden.

Die Fruchtkörperausbildung benötigt eine sehr hohe Dichte von koordinierten Zellen. Interzelluläre Signaltransduktion ermöglicht es Zellen oder Zellgruppen, die Physiologie anderer Zellen unter Verwendung von löslichen oder kontaktvermittelten Signalmolekülen zu beeinflussen. Extrazelluläre Komplementationsexperimente konnten zeigen, dass *M. xanthus* Zellen eine Reihe verschiedener extrazellulärer Signale untereinander austauschen, um die Initiation und Koordination der Fruchtkörperformation und Sporendifferenzierung zu steuern (Hagen *et al.*, 1978). In *M. xanthus* werden insgesamt fünf Signalklassen unterschieden, das A-, B-, C-, D- und E-Signal (Kaiser & Kroos, 1993a).

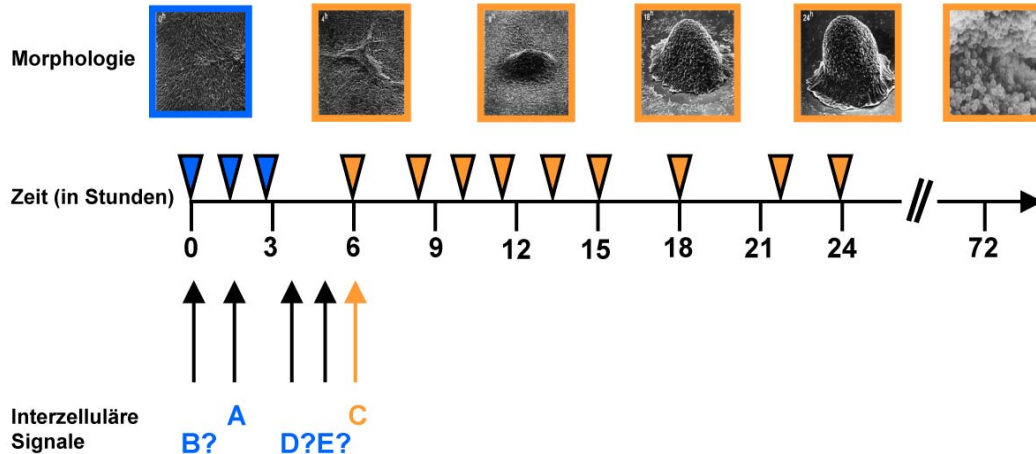


Abbildung 2: Interzelluläre Signale während des Entwicklungszyklus und Morphogenese der multizellulären Fruchtkörper in *M. xanthus*. Auf der Zeittafel (in Stunden) der Entwicklung indizieren die blauen Dreiecke die Genexpression in allen Zellen, vor der Initiierung des C-Signals. Die orangefarbenen Dreiecke sollen die Expressionszeit derjenigen Gene anzeigen, welche C-Signal-abhängig sind. Die Zeitpunkte der verschiedenen Signalübermittlungen sind mit den schwarzen bzw. orangefarbenen Pfeilen dargestellt. Über der Zeittafel befinden sich die verschiedenen Stadien der Fruchtkörperausbildung, arrangiert in ihrer zeitlichen Abfolge. Nach 72 Stunden Hungerzustand haben sich die Zellen innerhalb des Fruchtkörpers zu Sporen differenziert. Die Abbildung wurde modifiziert nach Søgaaard-Andersen, 2003.

Die B-, D- und E-Signale spielen eine Rolle in den ersten Stadien des Entwicklungszyklus (Abb. 2), sind aber weitgehend unbekannt (Cheng & Kaiser, 1989, Downard *et al.*, 1993, Kroos & Kaiser, 1987). Das A-Signal ist ein Gemisch aus Aminosäuren und Peptiden, welches durch Proteolyse in der frühen Phase der Entwicklung als Antwort auf den Nahrungsmangel gebildet wird. Das Signal fungiert als Kontrollelement der Zelldichte (Abb. 2) (Kaiser & Kroos, 1993b). Das aktive C-Signal ist ein 17 kDa großes Zelloberflächen assoziiertes Protein. Es wird aus dem Proteinprodukt von *csgA* durch die Serinprotease PopC prozessiert (Rolbetzki *et al.*, 2008). Die Signalübermittlung wird über Zell-Zell-Kontakte vermittelt, wobei jede Zelle als Sender und zu gleich als Empfänger des Signals fungiert (Sager & Kaiser, 1994, Kim & Kaiser, 1990b, Kim & Kaiser, 1990c, Lobedanz & Søgaard-Andersen, 2003). Wird das Signal von einer Zelle empfangen, erfolgt die Aktivierung des C-Signal Transduktionsweges. Nach sechs Stunden (Abb. 2) unter Nahrungsmangel leitet das C-Signal die gerichtete Zellbewegung ein (Jelsbak & Søgaard-Andersen, 2002, Jelsbak & Søgaard-Andersen, 1999), welche zur Ausbildung der Aggregate und Fruchtkörper führt. Zusätzlich induziert das C-Signal konzentrationsabhängig die Expression der C-Signal-abhängigen Gene, die ab sechs Stunden Hungerzustand hochreguliert sind (Abb. 2). Ab einer gewissen C-Signalkonzentration wird schließlich die Sporulation induziert (Li *et al.*, 1992, Kim & Kaiser, 1990a, Kruse *et al.*, 2001). Demnach wird die zeitliche und räumliche Koordination des Entwicklungsprozesses durch das C-Signal reguliert.

Die koordinierte Bewegung der Zellen ist absolut notwendig für die Bereitstellung hoher Zelldichten als Voraussetzung für die Aggregation und die Fruchtkörperformation. Beweis hierfür sind zahlreiche Bewegungsmutanten die unfähig sind Fruchtkörper auszubilden (Hodgkin & Kaiser, 1979a). Der vegetative Zellwachstums- und der Entwicklungszyklus existieren demnach nicht unabhängig voneinander und die gleitende Bewegung ist für beide essentiell, um das Überleben der Bakterien zu sichern.

2.2 Gleitende Fortbewegung von *M. xanthus*

M. xanthus-Zellen besitzen keine Flagellen und können nicht in Flüssigmedium schwimmen. Die Zellen bewegen sich auf festen Oberflächen mit einer gleitenden Bewegungen in Richtung ihrer Längsachse fort (Henrichsen, 1972). Die Geschwindigkeit dieser gleitenden Fortbewegung beträgt bis zu 6 μm pro Minute, was ungefähr einer Zelllänge pro Minute entspricht (Spormann & Kaiser, 1995, Jelsbak & Sørensen, 1999, Jelsbak & Sørensen, 2000). Die Studien an dem Fortbewegungssystem in *M. xanthus* begannen mit der Isolierung von sich nicht ausbreitenden Mutantenzellen. Die Mutanten offenbarten zwei verschiedene Systeme, welche die Bewegung kontrollieren (Hodgkin & Kaiser, 1979a, Hodgkin & Kaiser, 1979b). Aufgrund einer gemeinschaftlichen Bewegungsart bezeichnete Hodgkin das eine Bewegungssystem als S für „social“. Am Kolonierand von S-Bewegungsmutanten sind hauptsächlich einzelne Zellen zu beobachten, während große, mobile Zellgruppen fehlen (Abb. 3, A^+S^-). Im Vergleich zum Wildtyp (A^+S^+) bilden S-Mutanten deutlich kleinere Kolonien. Zusätzlich können im Phasenkontrastmikroskop Schleimspuren am Kolonierand beobachtet werden (Wolgemuth *et al.*, 2002, Hodgkin & Kaiser, 1979b, Burchard, 1982).

Wegen ihrer individuellen Zellbewegungsfähigkeit nannte Hodgkin das zweite System A, für „adventurous“. A-Mutanten bilden am Rand der Kolonie lange speerförmige Zellgruppen. Wie in Abbildung 3 dargestellt, sind keine einzelnen Zellen am Kolonienrand der A-Mutante zu beobachten, und es sind keine Schleimspuren im Phasenkontrastmikroskop sichtbar.

In Wildtyp-Zellen (A^+S^+) arbeiten die beiden Systeme synergistisch. Am Rand der Wildtyp-Kolonie befinden sich sowohl mobile Zellgruppen als auch bewegliche Einzelzellen (Abb. 3). Kaiser und Crosby zeigten, dass die kombinierte Ausbreitungsrate der Wildtyp-Zellen (A^+S^+) 50% größer ist, als die Summe der beiden einzelnen Ausbreitungsraten (A^+S^- und A^-S^+), die jeweils nur von einem System gestellt wird (Kaiser & Crosby, 1983b). Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass die beiden Bewegungssysteme nicht unabhängig voneinander arbeiten. Zellen mit einer Mutation in beiden Systemen (A^-S^-) können keine gleitenden Bewegungen ausführen. Sie bilden Kolonien mit

glatten Rändern (Abb. 3) und sind nicht fähig, Fruchtkörper auszubilden. Experimentelle Ergebnisse konnten zeigen, dass beide Bewegungssysteme den Ablauf des Entwicklungszyklus beeinflussen.

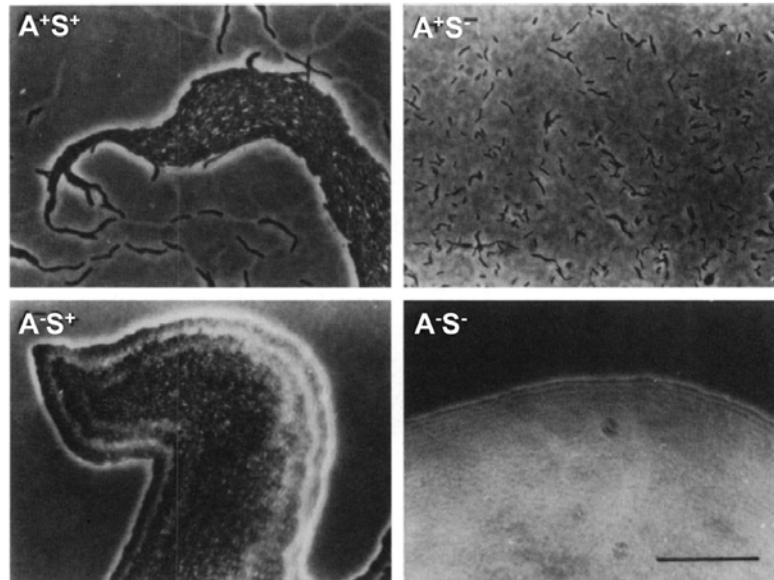


Abbildung 3: Kolonierand-Morphologie verschiedener *M. xanthus*-Stämme. A^+S^+ Zellen sind Wildtyp-Zellen, welche sich mit beiden Systemen fortbewegen. A^+S^- Zellen bewegen sich ausschließlich mittels des A-Systems vorwärts. A^-S^+ Zellen zeigen nur Bewegung, die von dem S-Bewegungssystem generiert wird. A^-S^- Zellen sind nicht bewegungsfähig. Die Abbildung wurde nach Shimkets, 1986a modifiziert. Der schwarze Balken repräsentiert 50 μm .

Die meisten Bakterien besitzen ausschließlich ein Bewegungssystem. In dieser Hinsicht ist das Bakterium *M. xanthus* besonders. Die Zellen müssen neben der Aktivierung der Bewegung, ebenfalls die Koordination der beiden Systeme regulieren, damit die beiden Systeme eine Bewegung in dieselbe Richtung generieren. Demnach ist die Regulierung der beiden Bewegungssysteme essentiell für die gleitende und koordinierte Fortbewegung der Zellen.

2.3 Das S-Bewegungssystem

Die S-Bewegung basiert auf einer Typ-IV-Pili abhängigen Fortbewegung, welche äquivalent zu „twitching motility“ in *Neisseria* und *Pseudomonas* Arten ist. Typ-IV-Pili sind dünne (5-8 nm), mehrere Mikrometer lange, flexible Filamente (Mattick, 2002). Diese Filamente sind aufgebaut aus tausenden Kopien der Proteinuntereinheit Pilin, welche von dem Gen *pilA* kodiert werden. Die Typ-IV-Pili Maschinerie umfasst 10-15 stark konservierte Proteine (Pil

Proteine), die für die Biogenese und Funktion der Pili benötigt werden. Diese Proteine befinden sich im Zytoplasma, in der inneren Membran, dem Periplasma und der äußeren Membran und bilden so einen membrandurchspannenden Komplex, die Typ-IV-Pili Maschinerie (Mattick, 2002). Weiterhin sind Typ-IV-Pili hoch dynamische Strukturen. Sie vollziehen Zyklen der Verlängerung, der Anheftung an das umgebende Medium oder andere Zellen und des Zurückziehens der Pili. Wobei das Austrecken gefolgt von dem Zurückziehen der Pili die Kraft für die Bewegung generiert (Merz *et al.*, 2000, Skerker & Berg, 2001, Sun *et al.*, 2000).

Funktionsfähige Typ-IV-Pili sind essentiell für die S-Bewegung in *M. xanthus* (Kaiser, 1979, Wu & Kaiser, 1995). Gewöhnlich bewegen sich A⁻S⁺ Zellen nur dann in Abwesenheit des A-Systems vorwärts, wenn sie in einem Pilus-Kontaktabstand (ca. 10 µm) zu einer anderen Zelle stehen (Kaiser & Crosby, 1983a). *M. xanthus* Zellen besitzen 5 bis 10 Typ IV Pili pro Zelle (Kaiser, 1979, Jakovljevic *et al.*, 2008), wobei diese ausschließlich am vorderen Zellpol lokalisieren (Abb. 4) (Sun *et al.*, 2000, Mignot *et al.*, 2005).

Neben den Typ-IV-Pilli ist die S-Bewegung abhängig von extrazellulären Matrix-Fibrillen (Shimkets, 1986, Arnold & Shimkets, 1988b). Diese Fibrillen bestehen zu gleichen Anteilen aus Polysacchariden und Proteinen. Sie umhüllen die gesamte Zelloberfläche und bilden eine extrazelluläre Matrix aus durch die die Nachbarzellen untereinander und mit ihrem Substrat verbunden sind (Behmlander & Dworkin, 1994). Die Typ-IV-Pili werden an einem Pol verlängert, binden an die extrazellulären Matrix-Fibrillen einer Nachbarzelle (Li *et al.*, 2003), und die darauf folgende Retraktion, bewirkt die Vorwärtsbewegung der Pili besitzenden Zelle. Beweis hierfür sind *dsp* Mutanten („dispersed growth“), die obwohl sie Typ IV Pili besitzen nicht zur S-Mobilität fähig sind. Ihnen fehlen die extrazellulären Matrix-Fibrillen (Arnold & Shimkets, 1988b, Arnold & Shimkets, 1988a, Behmlander & Dworkin, 1994). Neben den *Dsp* Proteinen werden ebenfalls die *Dif* Proteine für die Synthese der extrazellulären Matrix-Fibrillen benötigt und sind demnach essentiell für die S-Bewegung (Yang *et al.*, 2000). Bowden und Kaplan konnten zeigen, dass Mutanten mit einem Defekt in der Lipopolysaccharid (LPS) O-Antigen Synthese ebenfalls nicht S-mobil sind, obwohl sie Typ-IV-Pili besitzen (Bowden & Kaplan, 1998). Das LPS

O-Antigen besteht aus dem Lipid A, welches in die äußere Membran eingebettet ist, einem Kernpolysaccharid und einem O-spezifischen Polysaccharid. Die genaue Rolle des LPS O-Antigens im S-Bewegungssystem ist noch unklar, jedoch scheinen sie die Funktion der Typ IV Pili zu beeinflussen.

Neben den bereits genannten Proteinen (Typ-IV-Pili Proteine, Dsp und Dif Proteine) gibt es zahlreiche weitere, welche für die Fortbewegung mit dem S-System benötigt werden (Youderian & Hartzell, 2006).

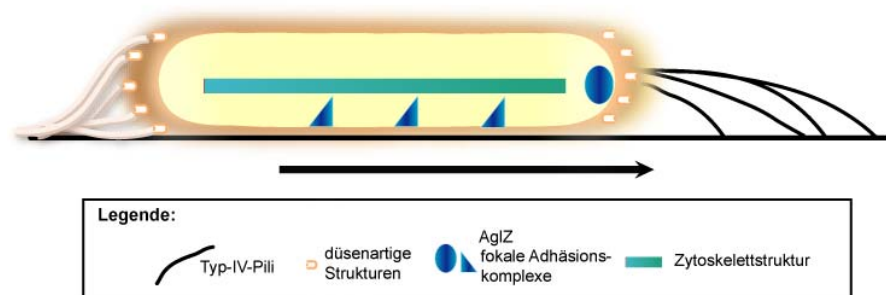


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer *M. xanthus* Zelle. Anordnung und Lokalisation der beiden Bewegungsmaschinerien in einer Zelle, die sich auf einer festen Oberfläche vorwärts bewegt. Auf der rechten Seite befinden sich die Typ-IV-Pili. Links ist die Schleimsekretion mittels weißer Bänder dargestellt. Die fokalen AgIZ Adhäsionskomplexe und deren Polarität ist in blau gezeigt. Der Pfeil unterhalb der Zelle deutet die Zellbewegungsrichtung an. Modifiziert nach Leonardy *et al.*, 2008.

2.4 Das A-Bewegungssystem

Das A-Bewegungssystem in *M. xanthus* ermöglicht es einer Zelle unabhängig von anderen Zellen eine Bewegung auszuführen (Hodgkin & Kaiser, 1979b). Der molekulare Mechanismus, mit dem die Bewegung mittels des A-Systems generiert wird, ist weitgehend unbekannt. Derzeit sind zwei verschiedene Modelle für das A-Bewegungssystem beschrieben.

In dem einen Modell wird die A-Bewegung mittels Schleimsekretion von kleinen düsenartigen Strukturen diskutiert. Diese „nozzle-like structures“ konnten an beiden Zellpolen (Abb. 4) mithilfe der Elektronenmikroskopie identifiziert werden (Wolgemuth *et al.*, 2002). Die Struktur ähnelt den „junctional pore complexes“ in gleitenden Cyanobakterien, welche Schleim sekretieren, um derart die Bewegung der Zellen zu ermöglichen. *M. xanthus* Zellen die sich mit

dem A-System fortbewegen, hinterlassen eine Schleimspur auf festen Oberflächen. Beobachtungen an A^+S^+ , A^-S^+ und A^+S^- Stämmen offenbarten, dass die Schleimsekretion mit dem A-Bewegungssystem assoziiert ist (Wolgemuth *et al.*, 2002). Die Elektronenmikroskopie zeigte zusätzlich, dass die Schleimspuren aus mehreren Bändern bestehen und an Bereichen der Zelle hervorgebracht werden, an denen die düsenartigen Strukturen lokalisiert sind, wobei der Schleim ausschließlich an einem Zellpol erzeugt wird (Abb. 4) (Wolgemuth *et al.*, 2002). Die chemischen Bestandteile des Schleims sind noch nicht identifiziert. Es wird angenommen, dass es sich um ein polyelektrolytisches Gel handelt. Nach einem mathematischen Modell wird der Schleim in einer dehydratisierten Form an einem Zellpol in die düsenartigen Strukturen eingeleitet. Eine darauffolgende Wasserzufuhr bewirkt ein Anschwellen des Schleims, wodurch dieser dann aus den Strukturen ausgestoßen wird. Auf festen Oberflächen entsteht durch den vermehrten Schleimausstoß am hinteren Zellpol eine Schubkraft, welche die Zelle vorwärts schiebt. Nach diesem Modell könnte die Schleimsekretion ausreichend viel Energie für eine Vorwärtsbewegung der Zelle bereitstellen (Wolgemuth *et al.*, 2002). Eine derartige Fortbewegung könnte ebenfalls die auffallend große Anzahl von Genen des A-Bewegungssystems erklären, welche für Proteine kodieren, die in die Polymersynthese und den Polymerexport involviert sind (Youderian *et al.*, 2003, Yu & Kaiser, 2007).

Dem anderen Modell zufolge sind fokale Adhäsionskomplexe in die Generierung der A-Bewegung involviert, welche sich entlang der gesamten Zelle verteilen (Mignot *et al.*, 2007). Diese Komplexe werden durch das AglZ Protein definiert, ein Pseudoresponse Regulator (kein konservierter Asp-Rest) mit einer „Coiled-coil“ Domäne, der essentiell für die Fortbewegung mit dem A-System ist. Unter Verwendung eines AglZ Proteins, fusioniert zu YFP, konnte Mignot *et al.*, 2007 zeigen, dass die Fusionsproteine neben einer verstärkten Ansammlung am vorderen Zellpol (Abb. 4, blauer Kreis) kleinere Ansammlungen entlang der Zelle formen (Abb. 4, blaue Dreiecke). Diese kleinen AglZ-YFP Ansammlungen verbleiben, relativ zum umgebenden Medium, an fixierten Positionen in der Zelle, wenn sich das Bakterium vorwärts bewegt. Nach dem Modell werden die kleinen AglZ Ansammlungen, welche

entlang der Zelle lokalisieren, an dem vorderen Zellpol von der verstärkten Ansammlung des AglZ-YFP Proteins gebildet und an dem hinteren Pol erneut aufgelöst. Die Vorwärtsbewegung der Zellen soll durch einen Proteinkomplex generiert werden, der die Zellhülle durchspannt, so an das Substratum bindet und gleichzeitig an einer Zytoskelettstruktur in der Zelle zieht (Abb. 4). Neben AglZ soll der Proteinkomplex andere, noch nicht identifizierte Adhäsionsproteine und Motorproteine beinhalten (Mignot *et al.*, 2007). Die fokalen Adhäsionskomplexe sollen auf eine ähnlichen Art und Weise die Bewegung generieren, wie Adhäsionskomplexe in eukaryontischen Zellen (Mignot, 2007). Eine A-Bewegung, vermittelt durch mehrere Motoren entlang des Zellkörpers, wird gestützt durch die Beobachtung, dass die Bewegungsgeschwindigkeit der Zellen unabhängig von ihrer Länge ist. Dies ist nicht der Fall für Zellen die sich ausschließlich mit dem S-Bewegungssystem fortbewegen und die treibende Kraft an einem Pol generieren (Sun *et al.*, 2000, Sliusarenko *et al.*, 2007).

Beiden Modellen mangelt es an experimentellen Beweisen und zurzeit kann keines der beiden ausgeschlossen werden. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass die beiden Maschinerien/Mechanismen nebeneinander existieren und funktionieren, um die Zellen vorwärts zu bewegen (Leonardy *et al.*, 2007).

2.5 Richtungswechsel und Polarität in *M. xanthus* Zellen

Die gleitende Bewegung der *M. xanthus* Zellen erfolgt mittels zwei verschiedener Systeme. Die S-Bewegung wird durch das Zurückziehen von Typ-IV-Pili, welche ausschließlich am vorderen Pol lokalisiert sind, angetrieben (Kaiser, 1979). Die treibende Kraft des A-Bewegungsmotors wird vermutlich von polaren düsenartigen Strukturen und/oder von Motorproteinen, lokalisiert an fokalen Adhäsionkomplexen in der Zelle, generiert (Abb. 4).

Für den vegetativen Zellzyklus, wie auch für die Ausbildung von Fruchtkörpern, ist die Ausübung einer gerichteten Zellbewegung notwendig. In Wildtyp-Zellen (A^+S^+) arbeiten die beiden Systeme synergistisch (Kaiser & Crosby, 1983b). Die Bakterien müssen, neben der Aktivierung der Bewegung, ebenfalls die Koordination der beiden Systeme regulieren, damit die beiden Systeme eine Vorwärtsbewegung in dieselbe Richtung generieren.

Neben den zwei Bewegungssystemen weisen *M. xanthus* Zellen eine weitere Besonderheit in ihrer Fortbewegung auf. Von Zeit zu Zeit ändern die Zellen ihre Bewegungsrichtung (Richtungswechsel). Während dieser Richtungswechsel stoppen die Zellen zunächst ihre Vorwärtsbewegung und setzen anschließend die Bewegung in die entgegengesetzte Richtung fort, wobei der alte vordere Pol zum neuen hinteren Zellpol wird (Abb. 5) (Spormann, 1999, Jelsbak & Sørensen, 1999, Blackhart & Zusman, 1985). Die Zellen vollziehen im Durchschnitt alle 5 bis 10 Minuten einen Richtungswechsel. Jedoch oszillieren die Zellen in ihrer Bewegung nicht regelmäßig vor und zurück. Manche Zellen wechseln innerhalb von 15 Minuten nicht einmal ihre Bewegungsrichtung, während andere Zellen in dieser Zeit zweimal einen Richtungswechsel vollziehen (Spormann, 1999, Jelsbak & Sørensen, 1999, Blackhart & Zusman, 1985). Dies spiegelt sich in einer sehr variablen Richtungswechselperiode wieder. Mutanten, welche nicht fähig sind, die Richtungswechselfrequenz zu regulieren, weisen eine abnormale Kolonienmorphologie auf und können keine Fruchtkörper ausbilden (Zusman, 1982, Bustamante *et al.*, 2004). Es wird angenommen, dass die Durchführung von Richtungswechseln den Zellen ermöglicht sich in ihrer Umgebung ständig neu zu orientieren (Zusman *et al.*, 2007).

Die zuvor beschriebene räumliche Organisation der beiden Bewegungssysteme ermöglicht es den Zellen eine Vorwärtsbewegung auszuführen (Abb. 4). Um einen Richtungswechsel zu vollziehen müssen die beiden Bewegungsmaschinerien synchron die Richtung in der sie die Bewegung generieren wechseln. Demnach müssen die Bewegungsmaschinerien ihre Polarität innerhalb der Zelle ändern, um eine erneute Vorwärtsbewegung in die entgegengesetzte Richtung zu garantieren (Abb. 5 B). Die Typ-IV-Pili, welche am vorderen Zellende lokalisiert sind, müssen an diesem Pol abgebaut und am gegenüberliegenden, neuen vorderen Zellpol erneut aufgebaut werden. Die Sekretion des Schleimes muss an dem hinteren Ende der Zelle stoppen und an dem neuen hinteren Pol wieder aktiviert werden. Ebenfalls muss die Lokalisation der AglZ Proteine geändert und die Polarität der fokalen Adhäsionskomplexe umgekehrt werden (Abb. 5 B) (Leonardy *et al.*, 2008).

Offen bleibt, wie die Zellen synchron die Polarität der Bewegungsmaschinerien wechseln. Bekannt ist jedoch, dass das Frz chemosensorische System einen Einfluss auf die Richtungswechsel in den Zellen ausübt (Blackhart & Zusman, 1985).

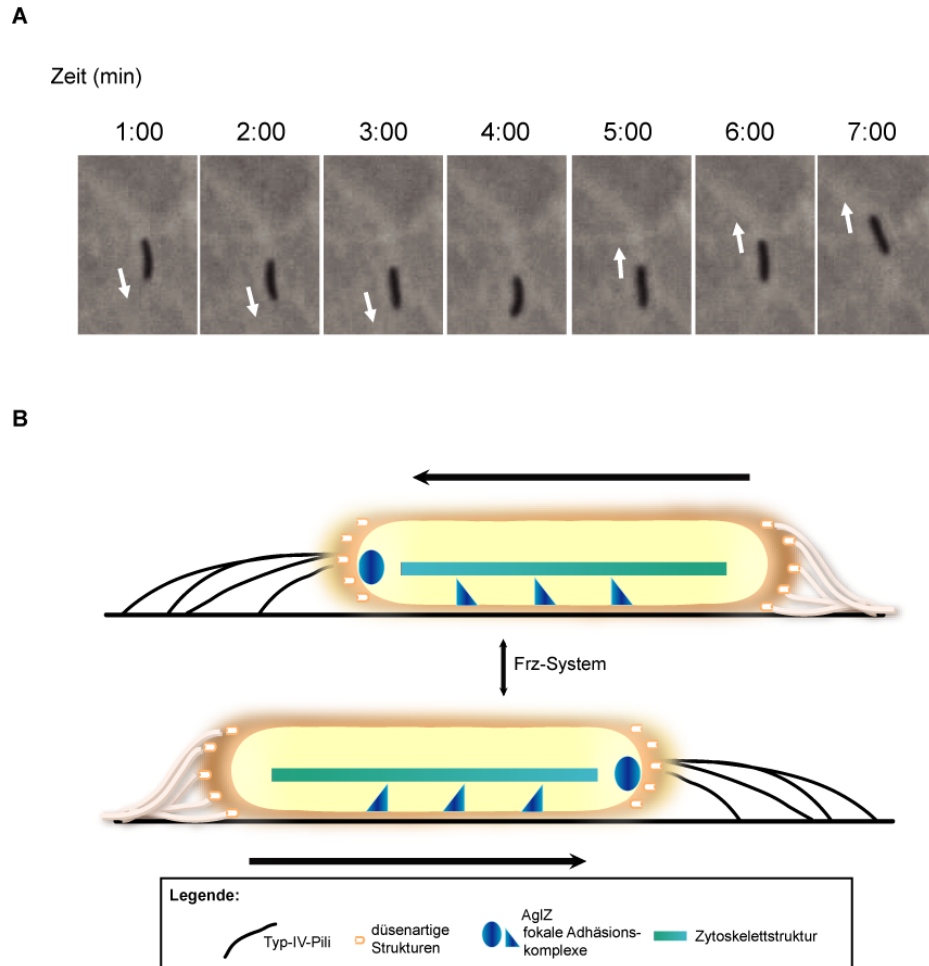


Abbildung 5: Richtungswechsel in *M. xanthus* Zellen. A| Mikroskopische Zeitrafferaufnahme einer *M. xanthus* Zelle, die ihre Bewegungsrichtung wechselt. Oberhalb der Phasenkontrastbilder ist die Zeit der Aufnahmen angegeben. Die weißen Pfeile deuten die Bewegungsrichtung an. In Minute 4:00 bis 5:00 vollzieht die Zelle einen Richtungswechsel. **B|** Schematische Darstellung einer Zelle, die ihre Bewegungsrichtung wechselt und somit ebenfalls die Polarität der beiden Bewegungssysteme. Die schwarzen Pfeile zeigen die Bewegungsrichtung an. Abbildungen modifiziert nach Leonardy *et al.*, 2008.

2.6 Regulierung der Richtungswechsel durch das Frz chemosensorische System

Die Richtungswechselfrequenz der *M. xanthus* Zellen, welche sich mit dem A- und S-System bewegen, wird durch das Frz chemosensorische System reguliert (Blackhart & Zusman, 1985). Zellen mit einer *frz* Mutation vollziehen

sehr selten einen Richtungswechsel. Eine Ausnahme stellt eine spezielle Mutation in *frzCD* dar, welche zu einem konstitutiv aktiven Frz-System führt. Zellen mit einem konstitutiv aktiven Frz-System zeigen sehr häufig einen Richtungswechsel (Blackhart & Zusman, 1985, Bustamante *et al.*, 2004).

Das Frz-System besteht aus 7 verschiedenen Proteinen (Abb. 6) und deren Primärstruktur ist sehr ähnlich zu der von Proteinen der Che chemosensorischen Transduktionssysteme (Zusman *et al.*, 2007). Wie andere chemosensorische Systeme ist das Frz-System ein modifiziertes Zweikomponentensystem. Das *M. xanthus* Frz-System besteht aus dem FrzCD-Protein, ein zytoplasmatisches methyl-akzeptierendes chemosensorisches Protein (MCP), das durch Methylierung und Demethylierung modifiziert wird; FrzE, eine Histidin-Protein-Kinase mit einer Receiver Domäne (CheA-CheY Hybrid); FrzF, eine Methyltransferase, die FrzCD methyliert; FrzG, eine Methylesterase, welche FrzCD demethyliert; FrzA und FrzB, welche ähnlich zu CheW-Proteine sind und als Adaptor zwischen FrzCD und FrzE fungieren (Inclan *et al.*, 2007) und FrzZ, einem Tandem CheY-Response Regulator (Abb. 6) (Bustamante *et al.*, 2004).

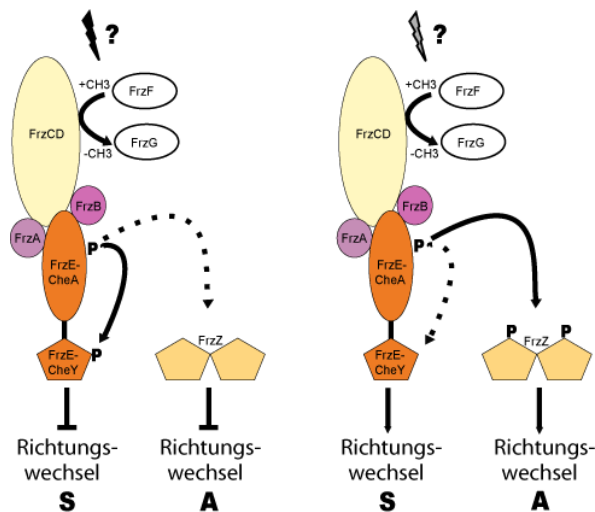


Abbildung 6: Modell des Frz chemosensorischen System. Abgebildet ist das Modell des Frz-Systems, wobei der Transfer der Phosphorylgruppe von der FrzE Kinase Domäne zum einem zur FrzE Receiver Domäne (links) und zum anderen zu dem FrzZ Receiver dargestellt ist (rechts). Das unbekannte Signal ist mit einem Fragezeichen angedeutet. Eine detaillierte Erläuterung der Abläufe ist im Text beschrieben. Modifiziert nach Leonardy *et al.*, 2008.

Das eingehende Signal, welches die Aktivität des Frz-Systems reguliert, ist unbekannt. Mithilfe einer FrzCD-GFP Fusion konnte gezeigt werden, dass FrzCD-GFP dynamische Lokalisierungsstrukturen innerhalb der Zelle formt.

Treffen zwei Zellen Seite an Seite aufeinander, richten sich die Lokalisierungskomplexe beider Zellen aneinander aus. Diese Seite an Seite Zellkontakte beeinflussen neben der Ausrichtung der FrzCD Proteine die Richtungswechsel der Zellen. Diese kontaktabhängigen Richtungswechsel könnten eine entscheidende Rolle in der Ausübung einer gerichteten Zellbewegung haben (Mauriello *et al.*, 2009).

Nach den derzeitigen Modellen wird das unbekannte Signal von FrzCD oder FrzF wahrgenommen (Zusman *et al.*, 2007) und resultiert letztendlich in einer Änderung der Autokinaseaktivität von FrzE (Abb. 6). FrzE autophosphoryliert einen konservierten Histidinrest, wobei in *in vivo* Experimenten gezeigt wurde, dass die Phosphorylgruppe zu beiden FrzZ Receiver Domänen transferiert wird (Inclan *et al.*, 2007). Weiterhin existieren auf genetischer Ebene Beweise, dass die Phosphorylgruppe ebenfalls zur Receiver Domäne von FrzE (FrzE-CheY) transferiert wird (Li *et al.*, 2005). Demnach konkurrieren drei Receiver Domänen um die Phosphorylgruppe am konservierten Histidinrest von FrzE (Abb. 6). Nach dem Modell basiert die Regulierung der Richtungswechsel durch das Frz-System auf dieser Konkurrenz um die Phosphorylgruppe (Li *et al.*, 2005, Inclan *et al.*, 2007, Leonardy *et al.*, 2008). Eine phosphorylierte FrzE Receiver Domäne führt zu einer Inhibition der Richtungswechsel in dem S-Bewegungssystem, während eine nicht phosphorylierte FrzE Receiver Domäne die Richtungswechsel stimuliert. Dagegen resultiert eine Phosphorylierung des FrzZ Proteins in einer Stimulierung der Richtungswechsel in dem A-Bewegungssystem und wenn keine Phosphorylierung erfolgt werden die Wechsel in der A-Bewegungsrichtung unterdrückt. Demnach erfolgt eine Stimulierung der Richtungswechsel in beiden Systemen, wenn die Phosphorylgruppe von der FrzE Kinase zur Receiver Domäne von FrzZ transferiert wird. Entsprechend führt der Transfer der Phosphorylgruppe von der FrzE Kinase zur Receiver Domäne von FrzE zu einer Inhibition der Richtungswechsel in beiden Systemen. Dieses Modell könnte erklären, wie die Richtungswechsel und somit der Polaritätswechsel der beiden Bewegungsmaschinerien parallel vollzogen werden könnten (Leonardy *et al.*, 2008). Unklar ist weiterhin, wie der Transfer der Phosphorylgruppe in der Zelle reguliert wird und welche Proteine sich

stromabwärts des Frz-Systems befinden, um den Polaritätswechsel der Bewegungsmaschinerien zu vollziehen.

Es wurden einige Proteine identifiziert, welche essentiell für die Fortbewegung sind und deren dynamische Lokalisierung von dem Frz-System reguliert wird. Das bereits beschriebene Protein AglZ wechselt in Abhängigkeit von dem Frz-System seine Lokalisierung (Mignot *et al.*, 2007). Während eines Richtungswechsels verteilt sich AglZ-YFP zunächst diffus in der Zelle. Setzt die Zelle ihre Bewegung in die entgegengesetzte Richtung fort, so lokalisieren die Proteine erneut verstärkt am neuen vorderen Zellpol und mit kleinen Lokalisierungsmustern innerhalb der Zelle (Abb. 5 B). Mignot *et al.* konnte zeigen, dass diese dynamische Lokalisierung auf dem Frz-System beruht. In *frz* Mutanten mit einem inaktiven Frz-System zeigen die AglZ-YFP Proteine keine dynamische Lokalisierung, während die Fusionproteine eine gesteigerte Dynamik in Zellen mit einem konstitutiv aktiven Frz-System aufweisen. Weiterhin ist das FrzS Protein zu erwähnen. Zellen mit einem deletierten *frzS* Gen besitzen zwar funktionelle Typ-IV-Pili, jedoch können sich diese Mutanten nicht mehr mit dem S-System fortbewegen (Ward *et al.*, 2000) (Mignot *et al.*, 2005). Das FrzS Protein besteht aus einer N-terminalen Pseudoreceiver Domäne, in der kein konservierter Aspartatrest vorhanden ist, und einer C-terminalen „Coiled-coil“ Domäne. Eine C-terminal GFP-Fusion lokalisiert an beiden Zellpolen, wobei die verstärkte Ansammlung des Fusionsproteins am vorderen Zellpol, an welchem sich die Typ-IV-Pili befinden, zu finden ist (Mignot *et al.*, 2005). Nachdem eine Zelle einen Richtungswechsel in ihrer Bewegung vollzogen hat, lokalisiert FrzS-GFP ausschließlich am neuen vorderen Zellpol. Während der zellulären Bewegung wird ein geringerer Anteil an FrzS-GFP ebenfalls am hintern Pol sichtbar. Wechselt die Zelle erneut ihre Richtung, so wandert das FrzS-GFP Signal vom alten vorderen Pol zum neuen vorderen Zellpol. Die dynamische FrzS Lokalisierung wird demnach parallel mit dem Richtungswechsel der Zelle vollzogen und durch das Frz System reguliert (Mignot *et al.*, 2005).

Mutanten, welche nicht fähig sind, die Richtungswechselfrequenz zu regulieren, weisen eine abnormale Kolonienmorphologie auf und können keine Fruchtkörper ausbilden (Zusman, 1982, Bustamante *et al.*, 2004). Demnach ist

das Frz-System essentiell für die Ausbildung von Zellaggregaten und Fruchtkörpern während des Entwicklungszykluses. Das C-Signal beeinflusst das Frz-System in einer FruA-abhängigen (FruA: Response-Regulator involviert in den C-Signalweg) Art und Weise. Die FrzCD Methylierung wird stimuliert während des Entwicklungszykluses (Søgaard-Andersen & Kaiser, 1996, Ellehauge *et al.*, 1998). Diese verstärkte FrzCD Methylierung steht in Zusammenhang mit einer verminderten Richtungswechselfrequenz der Zellen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das C-Signal die Richtungswechsel der Zellen unterdrückt, vermutlich indem das C-Signal das Frz-System inhibiert (Jelsbak & Søgaard-Andersen, 1999). Die reduzierte Richtungswechselfrequenz ermöglicht es den Zellen zu aggregieren und Fruchtkörper auszubilden. Demnach haben Richtungswechsel einen entscheidenden Einfluss auf das Bewegungsverhalten der *M. xanthus* Zellen und deren Überlebensstrategie.

2.7 Der Response Regulator RomR

Zweikomponentensysteme spielen eine entscheidene Rolle in bakteriellen Signaltransduktionswegen. Ein Zweikomponentensystem besteht typischerweise aus einer Histidinproteinkinase und einem Response Regulator. Die Sensor Domäne der Histidinproteinkinase nimmt ein intra- oder interzelluläres Signal wahr, woraufhin die Kinase Domäne an einem konservierten Histidinsäurerest autophosphoryliert wird. Anschließend wird die Phosphorylgruppe zu der Receiver Domäne des entsprechenden Response Regulators transferiert. Die Phosphorylierung des Regulators führt schließlich zu Aktivierung der Funktion der Output Domäne und dementsprechend zu einer Antwort. Nachdem das stimulierende Signal nicht mehr anwesend ist, wird die Phosphorylgruppe an der Receiver Domäne durch die Phosphatase Aktivität der zugehörigen Histidinproteinkinase oder einer separaten Phosphatase hydrolysiert.

Response Regulatoren bestehen im klassischen Fall aus einer N-terminalen hoch konservierten Receiver Domäne und einer C-terminalen variablen Output Domäne. Die Receiver Domäne beinhaltet einen konservierten Asparaginsäurerest, welcher die Phosphorylierungsstelle darstellt. An diese

Aminosäure wird die Phosphorylgruppe von einer Histidinkinase Domäne transferiert. Die Phosphorylierung bewirkt eine Konformationsänderung, welche die Aktivität der Output Domäne, wie zum Beispiel die Regulierung der Genexpression, enzymatische Aktivitäten oder Protein-Protein Interaktionen, beeinflusst. Die meisten Output Domänen besitzen eine DNA-Bindungsaktivität, während andere eine RNA-Bindungsaktivität oder enzymatische Aktivitäten aufweisen. Manche Output Domänen besitzen zum Beispiel eine CheW Domäne, welche in Protein-Protein Interaktionen involviert ist (Galperin, 2006).

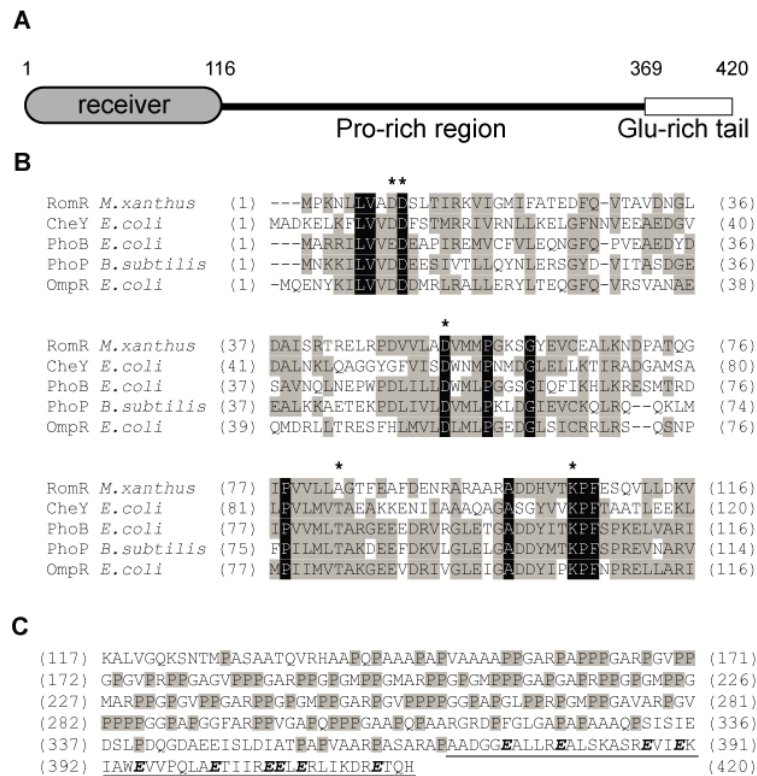


Abbildung 7: Aufbau und Primärstruktur von RomR. **A)** Schematische Darstellung der RomR Domänen. **B)** Sequenzvergleich der N-terminal Receiver Domäne von RomR mit anderen charakterisierten Receiver Domänen. Sterne weisen auf charakteristische und konservierte Reste in Receiver Domänen hin (Stock *et al.*, 2000). Schwarz unterlegte Aminosäuren sind in allen Sequenzen 100% identisch, grau unterlegte sind ausschließlich zu 60-100% konserviert. **C)** Primärstruktur der Output Domäne von RomR. Die Prolinreste sind grau unterlegt. Die Glu-reiche Region ist unterstrichen, wobei die Glutaminsäurereste in dieser Region mit dicken kursiven Buchstaben dargestellt sind (Leonardy *et al.*, 2007).

Der Response Regulator RomR (MXAN4461) besteht aus einer N-terminalen konservierten Receiver Domäne und einer C-terminalen Output Domäne. RomR besitzt einen konservierten Asparaginsäurerest an der Position 53 in der Receiver Domäne (Abb. 7 B). Die Output Domäne kann in eine prolinreiche Region und einen glutaminreichen Schwanz unterteilt werden und

enthält keine der oben angeführten Domänen (Abb. 7). In Sequenzanalysen konnte gezeigt werden, dass verschiedene Bakterien der δ -Proteobacteria für Proteine mit einer ähnlichen Domänenstruktur wie RomR kodieren (Leonardy *et al.*, 2007). Jedoch ist die Funktion dieser Response Regulatoren unbekannt (Leonardy *et al.*, 2007).



Abbildung 8: Organisation des *romR* Locus in *M. xanthus*. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung der jeweiligen Gene an. Die Abstände in Bp sind relativ zum *romR* Startkodon. Dargestellt ist *romR* (MXAN4461) und die flankierenden offenen Leserahmen, welche für die Proteine mit folgenden Domänen kodieren: MXAN4460 ähnlich zu Val-tRNA Synthetase; MXAN4462 enthält 2 CheW Domänen; MXAN4463 ein Response Regulator mit GGDEF Output Domäne. Modifiziert nach Leonardy *et al.*, 2007.

In der unmittelbaren Nähe von *romR* auf dem *M. xanthus* Chromosom ist kein Gen lokalisiert, welches für eine Histidinproteinkinase kodiert. (Abb. 8). Demnach ist die zugehörige Histidinproteinkinase von RomR noch nicht identifiziert.

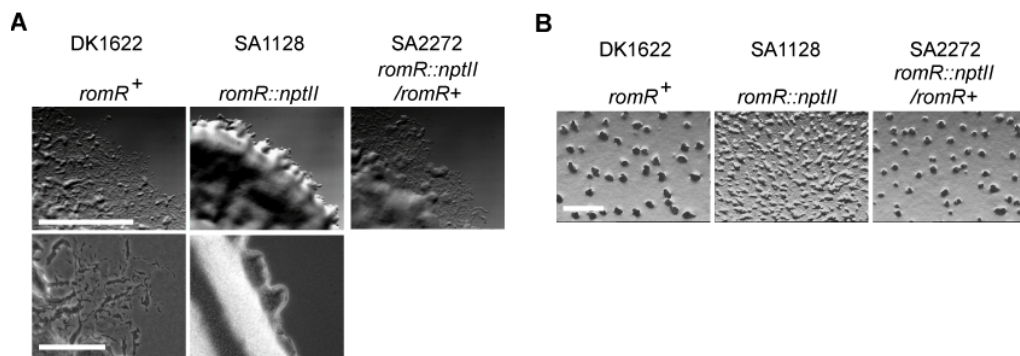


Abbildung 9: Phänotyp einer *romR* Insertionsmutante. **A|** Bewegungsanalyse der angegebenen Stämme auf 0,5% CTT-1,5% Agar-Platten. Der weiße Balken auf der Abbildung des Wiltyp Stammes entspricht 5 mm (oben) bzw. 50 μ m (unten). **B|** Analyse der Entwicklung der gekennzeichneten Stämme nach 72 h auf CF Agarplatten. Der weiße Balken auf der Abbildung des Wiltyp Stammes entspricht 50 μ m. Erläuterungen sind im Text zu finden. Modifiziert nach Leonardy *et al.*, 2007.

Wird eine *romR* Insertionsmutante hergestellt (*romR::nptII*, SA1128) so wirkt sich dies auf die A-Bewegungsfähigkeit der Zellen aus. Auf einer 1,5% Agaroberfläche, welche die Bewegung mit dem A-System begünstigt, sind am Kolonienrand der *romR* Mutante keine einzelnen Zellen zu erkennen wie sie bei Wildtyp Kolonien zu beobachten sind (Abb.9 a). Ohne den nahen Kontakt zu anderen Zellen sind diese Zellen nicht fähig sich fortzubewegen (Leonardy *et al.*, 2007). Auf einer 0,5% Agaroberfläche, welche die S-Bewegung begünstigt,

sind dagegen keine Einwirkungen auf die Bewegung durch die *romR* Mutation erkennbar. Zusätzlich wurde festgestellt, dass die Zellen der Mutante, verglichen mit den Wildtyp Zellen, sehr viele kleine abnormal geformte Fruchtkörper bilden und einen Sporulationsdefekt in dem Entwicklungszyklus zeigen. (Abb.9b). Durch Einbringen einer *romR* Kopie in die „phage Mx8 *attB*-site“ auf dem Chromosom der *romR* Mutante kann der Defekt in der A-Bewegung und in der Entwicklung komplementiert werden (Abb. 9). Folglich ist RomR notwendig für die Fortbewegung der Zellen mittels des A-Bewegungssystems und der Defekt in der Entwicklung resultiert vermutlich aus der A-Bewegungsunfähigkeit (Leonardy *et al.*, 2007). Die genaue Funktion des RomR Proteins in dem A-Bewegungssystem ist unbekannt. Ziel dieser Arbeit ist es unter anderem die Funktion und die Lokalisierung des RomR Proteins in den *M. xanthus* Zellen zu analysieren.

2.8 Das MglA Protein („mutual gliding A“)

Vor ungefähr 30 Jahren identifizierten Hodgkin und Kaiser das Protein MglA, welches sowohl für die A- wie auch für die S-Bewegung benötigt wird (Hodgkin & Kaiser, 1979b). Mutationen in *mgl* führen zur Bildung glattrandiger Kolonien, die nicht unterscheidbar von A⁻S⁻ Doppelmutanten sind (Abb. 3) (Hodgkin & Kaiser, 1979a). Spormann und Kaiser erklären die glattrandigen Kolonien der *mglA* Mutante mit einer stark gesteigerten Richtungswechselfrequenz, welche den Zellen nicht ermöglicht, ausbreitende Kolonien zu bilden (Spormann & Kaiser, 1999). Weitere Studien ergaben, dass *mglA* Mutanten nicht fähig sind Fruchtkörper auszubilden und einen Sporulationsdefekt aufweisen (Stephens *et al.*, 1989).

Das *mglA* Gen wird zusammen mit dem *mglB* Gen transkribiert, welches sich stromaufwärts von *mglA* auf dem Chromosom befindet (Hartzell & Kaiser, 1991). In der Literatur wird beschrieben, dass MglB benötigt wird, um normale Mengen an MglA Protein in *M. xanthus* Zellen zu erhalten, vermutlich indem sie die MglA Proteine stabilisieren (Hartzell & Kaiser, 1991). MglB wird aufgrund der Aminosäuresequenz zur Familie der Roadblock Proteine (Robl_LC7) gezählt. Die Roadblock bzw. LC7 Proteine modulieren spezifische Dyneinfunktionen in *Drosophila* bzw. *Chlamydomonas* (Bowman *et al.*, 1999).

Der *mgIBA* Locus ist in verschiedenen Bakterien konserviert (Koonin & Aravind, 2000), aber hauptsächlich in den δ -Proteobakterien. Vermutlich übernehmen die beiden Proteine in den anderen Bakterien ähnliche Funktionen, wie MglA und MglB in *M. xanthus*. Einen Hinweis darauf gibt die Identifikation eines MglA Proteins in dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum*, welches für die gleitende Bewegung dieser Bakterien benötigt wird. Neben *mgIA* ist der gesamte *mgIBA* Locus in dem *Sorangium cellulosum* Chromosom konserviert (Zirkle *et al.*, 2004).

Aufgrund der Primärstruktur von MglA wird das Protein zu der Ras/Rab/Rho Superfamilie von eukaryontischen kleinen GTPasen gezählt (Hartzell, 1997). In eukaryontischen Systemen sind diese kleinen GTPasen Schlüsselregulatoren bzw. molekulare Schalter in Signalwegen, welche in die Regulierung der Zellpolarität, der Zellbewegung und in die Organisation des Zytoskeletts involviert sind. Die molekulare Signalaktivität der GTPasen variiert je nach GTP oder GDP gebundenem Zustand, was den molekularen Schaltermechanismus der kleinen GTPasen darstellt. Im Allgemeinen werden GTPasen in einem GTP gebundenen Zustand als aktiv und in einer GDP gebundenen Form als inaktiv bezeichnet (Bourne *et al.*, 1991). Der Guanin-Nukleotid Bindungszustand der GTPase wird moduliert durch Interaktionen mit verschiedenen Effektorproteinen bzw. -molekülen. GTPase aktivierende Proteine (GAPs) begünstigen die GDP gebundene Form, indem sie die Aktivität der GTPase und somit die GTP Hydrolyse stimulieren. Dagegen fördern „guanine exchange factors“ (GEFs) den GTP gebundenen Zustand der GTPase, indem sie den Austausch von GDP zu GTP erleichtern.

Die kleine GTPase Sar1 von *Saccharomyces cerevisiae* gehört ebenfalls zu der Ras/Rab/Rho Superfamilie. Wird das *sar1* Gen in einer *mgIA* Mutante exprimiert, so wird der Sporulationsdefekt der Zellen aufgehoben, der Bewegungsdefekt bleibt jedoch erhalten (Hartzell, 1997). Wird hingegen ein mutiertes *sar1* Gen (*sar1K36T*), welches für eine inaktive Sar1 GTPase kodiert, in eine *mgIA* Mutante eingebracht, so bleibt der Sporulationsdefekt der Zellen erhalten (Hartzell, 1997). Demnach komplementiert die GTPase Aktivität des Sar1 Proteins den Sporulationsdefekt in der *mgIA* Mutante (Hartzell, 1997). Diese Beobachtung deutet an, dass gewisse Gemeinsamkeiten, nicht nur auf

Sequenzebene, zu den eukaryontischen kleinen GTPasen bestehen und dass vermutlich die GTPase Aktivität von MglA wichtig für Funktion des Proteins in der Zelle ist. Andere Hinweise auf eine mögliche GTPase Aktivität des MglA Proteins existieren derzeit nicht.

In *M. xanthus* sind derzeit keine GAPs oder GEFs bekannt, die die GTPase Aktivität von MglA beeinflussen. Jedoch wurden Proteine identifiziert, die mit MglA in Wechselwirkung treten. In „Yeast Two Hybrid“ Versuchen konnte gezeigt werden, dass MglA mit dem A-Bewegungsprotein AglZ interagiert (Yang *et al.*, 2004).

Zusätzlich scheint es eine Verbindung zwischen MglA und dem S-Bewegungssystem zu geben, vermittelt durch die Tyrosin-Kinase Mask (Thomasson *et al.*, 2002). Denn das Einführen einer *mask* Mutation in einer *mglA* Mutante unterdrückt den S-Bewegungsphänotyp der *mglA* Mutante (Thomasson *et al.*, 2002).

2.9 Zielsetzung der Doktorarbeit

M. xanthus Zellen wechseln von Zeit zu Zeit die Richtung ihrer Bewegung. Um einen Richtungswechsel zu vollziehen, müssen die beiden Bewegungsmaschinerien synchron die Richtung in der sie die Bewegung generieren, wechseln. Demnach müssen die Bewegungsmaschinerien ihre Polarität innerhalb der Zelle ändern, um eine erneute Vorwärtsbewegung in die entgegengesetzte Richtung zu garantieren. Der molekulare Mechanismus, welcher es den Zellen ermöglicht, die Polarität der Bewegungsmaschinerien zu wechseln, ist noch weitgehend unbekannt.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Mechanismus für die Änderung der Polarität der A-Bewegungsmaschinerie während eines Richtungswechsels zu identifizieren. Hierzu wird zunächst das für das A-Bewegungssystem essentielle Protein RomR näher betrachtet. Das RomR Protein ist ein Response Regulator. Üblicherweise sind Response Regulatoren Teil eines Zweikomponentensystems, welche in Regulierungsprozesse und in die Signaltransduktion involviert sind.

Neben RomR wird das Protein MglA in dieser Arbeit analysiert. MglA ist vermutlich eine kleine GTPase der Ras/Rac/Rho Superfamilie. In der Literatur wird beschrieben, dass MglA für die Aktivität beider Bewegungssysteme von Bedeutung ist (Hodgkin 1989) und in die Regulierung der zellulären Richtungswechsel involviert ist (Spormann, 1999).

Aus diesen Gründen wird die Rolle und Funktion der beiden Proteine in dem A-Bewegungssystem und in den zellulären Richtungswechseln in *M. xanthus* auf genetischer Ebene analysiert. Ziel ist es den Einfluss verschiedener Mutationen in RomR bzw. MglA auf die Lokalisierung der Proteine und auf die Aktivität der A-Bewegung zu testen. Hierzu werden verschiedene RomR bzw. MglA Substitutionsmutanten ausgewählt, welche in der Literatur als wichtig für die Aktivität von Response Regulatoren bzw. kleinen GTPasen beschrieben werden. Zusätzlich wird die Lokalisierung von RomR-GFP und YFP-MglA während der zellulären Fortbewegung untersucht, um mögliche Zusammenhänge zwischen einem Polaritätswechsel der A-Bewegungsmaschinerie und der jeweiligen Proteinlokalisierung zu identifizieren.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Materialien

Die verwendeten Chemikalien und Antibiotika waren, wenn nicht gesondert im Text angeführt von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen), Fluka (Buchs, Schweiz), Difco (Heidelberg), und Invitrogen (Karlsruhe). Die Aufreinigung von PCR-Produkten sowie die DNA-Isolierung aus Agarosegelen erfolgte mit dem „DNA Clean & Concentrator-5 Kit“ bzw. dem „Gel DNA Recovery Kit“ von Zymo Research (HiSS-Diagnostics, Freiburg). Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden die „Mini- und Maxi-Prep-Kits“ von Qiagen (Hilden) verwendet. Die verwendeten DNA-Marker stammten von der Firma Bioline (Luckenwalde). Synthetische Oligonukleotide wurden von Invitrogen (Karlsruhe) hergestellt. Die DNA-Sequenzierung wurde mit dem 3130 Genetic Analyser von Applied Biosystem im Max-Planck-Institut Abteilung Ökophysiologie (Marburg) durchgeführt. Für die DNA-Konzentrationsbestimmungen wurde das Nano-Drop ND-10000 Spectrophotometer verwendet. Elektrophoresegele wurden mit dem 2UV Transilluminator (UVP BioDoc-It-System) und dem Videoprintgerät Mitsubishi Electric B93E dokumentiert. Die mikroskopischen Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen erfolgten an dem DM6000B Mikroskop von Leica (Wetzlar). Die Bilder wurden mit der Leica DFC 350FX Kamera oder mit der Photometrics® Cascade II 1024 Kamera aufgenommen. Die Bildaufnahmen erfolgten mit dem Leica FW4000 Programm oder dem Image-Pro® 6.2 Programm (MediaCybernetics). Die Koloniemorphologie wurde an dem Leica MZ75 Stereomikroskop und dem Leica IRE2 Inversen Mikroskop beobachtet und fotografiert. Der Prestained Page-Ruler von Fermentas (St. Leon-Rot) wurden als Proteinmarker verwendet.

Tabelle 1: In dieser Arbeit meist verwendete Geräte

Geräte	Typ	Hersteller
Zentrifugen mit Rotoren	Multifuge 1 S-R	Thermo Electron (Dreieich)
	Biofuge fresco	
	Biofuge pico	
	Sorvall RC 5B Plus	
Elektroporationsgerät	Gene Pulser Xcell Electroporation System	BioRad (München)
PCR-Maschinen	Master Cycler	Eppendorf (Hamburg)
UV-Tisch	UVT_20 LE	Herolab (Wiesloch)
Thermomixer	Thermomix compact	Eppendorf (Hamburg)
SDS-Page-Apparat	Mini Protein 3 Cell	BioRad (München)
Elektrotransfer-Apparat	Consort Power Supply E865	PeqLab (Erlangen)
UV/Visible Photometer	Ultrospec	Amersham (Freiburg)

3.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen und andere DNA-modifizierende Enzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt a. M.) und Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Die verwendeten DNA-Polymerasen waren die *PfuUltra*TMII-Polymerase von der Firma Stratagene (Amsterdam) und die im Eppendorf[®] MasterMix enthaltene *Taq*-DNA-Polymerase der Firma Eppendorf (Hamburg). Weitere Enzyme waren den jeweiligen Kits beigelegt.

3.3 Medien

Die verwendeten Stämme von *Escherichia coli* wurden zur Gewinnung von Plasmiden auf Luria-Bertani-Medium (1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 0,5% NaCl; pH 7,2) kultiviert. Für die Überexpression von MglA wurde *E. coli* in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) mit 0,2% Glukoselösung angezogen. Die *Myxococcus xanthus* Stämme wurden auf 1% CTT-Medium (1% Casiton, 10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM KH₂PO₄ pH 7,6; 8 mM MgSO₄, pH 7.6) kultiviert. Je nach Bedarf wurde Ampicillin-Natriumsalz (100 µg/ml), Kanamycinsulfat (50 µg/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und Tetrazyclin-Hydrochlorid bzw.

Oxytetracyclin-Dihydrat (10 µg/ml) aus 1000-fach (letzteres 100-fach) konzentrierten Stammlösungen in die jeweiligen Medien zugegeben. Für Festmedien wurden zusätzlich 1,5% Agar hinzugefügt.

3.4 Verwendete Bakterienstämme und mikrobiologische Methoden

3.4.1 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurde mit den in Tabelle 2 aufgeführten *Myxococcus xanthus* und *Escherichia coli* Stämmen gearbeitet.

Tabelle 2: Verwendete Stämme

<i>M. xanthus</i> Stämme	Genotyp	Referenz
DK1622	Wildtyp	(Kaiser, 1979)
DK1300	<i>sglG1</i>	(Hodgkin & Kaiser, 1979b)
DK1217	<i>aglB1</i>	(Hodgkin & Kaiser, 1979b)
DK6204	Δ <i>mglBA</i>	(Hartzell & Kaiser, 1991)
DZ4041	<i>sglA1</i> , <i>frzE::Tn5(Tet^r)</i> Ω 231	(D. Zusman)
DZ4042	<i>sglA1</i> , <i>frzCD::Tn5(Tet^r)</i> Ω 224	(D. Zusman)
DK8505	<i>frzCD::Tn5lac</i> Ω 536	(Sager & Kaiser, 1993)
DK8506	<i>frzCD::Tn5(Tet^r)</i> Ω 224	(Sager & Kaiser, 1993)
DK10410	Δ <i>pilA</i>	(Wu & Kaiser, 1997)
MxH2265	Δ <i>aglZ</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2004)
ASX1	Δ <i>cglB</i>	(Rodriguez & Spormann, 1999)
TM18	Δ <i>frzS</i>	T. Mignot
DK3685	<i>mglA9 Tn5-132</i> Ω 1901	(Kroos <i>et al.</i> , 1988)
SA1128	<i>romR::nptII</i>	(Leonardy <i>et al.</i> , 2007)
SA2028	<i>frzS-gfp</i>	Diese Arbeit
SA2036	<i>frzS-gfp</i> , <i>romR-mDsRed</i> (pSL113)	Diese Arbeit
SA2041	<i>frzS-gfp</i> , <i>romR::nptII</i>	Diese Arbeit
SA2042	<i>mglA9 Tn5-132</i> Ω 1901/ <i>P_{nat}-romR-gfp</i> (pSH1208)	Diese Arbeit

SA2048	<i>frzCD::Tn5(Tet^r)</i> Ω224, <i>romR::nptII</i>	Diese Arbeit
SA2049	<i>frzE::Tn5(Tet^r)</i> Ω231, <i>romR::nptII</i>	Diese Arbeit
SA2054	<i>frzE::Tn5(Tet^r)</i> Ω231, <i>romR::nptII/P_{pilA}-romRD53E-gfp</i> (pGFy166)	Diese Arbeit
SA2055	<i>frzE::Tn5(Tet^r)</i> Ω231, <i>romR::nptII/P_{pilA}-romRD53E</i> (pGFy165)	Diese Arbeit
SA2056	<i>frzCD::Tn5(Tet^r)</i> Ω224, <i>romR::nptII/P_{pilA}-romRD53E-gfp</i> (pGFy166)	Diese Arbeit
SA2057	<i>frzCD::Tn5(Tet^r)</i> Ω224, <i>romR::nptII/P_{pilA}-romRD53E</i> (pGFy165)	Diese Arbeit
SA2058	<i>romR::nptII/P_{pilA}-romR-gfp</i> (pGFy177)	Diese Arbeit
SA2059	<i>romR::nptII/P_{pilA}-romR</i> (pGFy175)	Diese Arbeit
SA2060	<i>romR::nptII/P_{pilA}-romRD53E-gfp</i> (pGFy166)	Diese Arbeit
SA2061	<i>romR::nptII/P_{pilA}-romRD53E</i> (pGFy165)	Diese Arbeit
SA2062	<i>romR::nptII/P_{pilA}-romRD53N-gfp</i> (pGFy178)	Diese Arbeit
SA2063	<i>romR::nptII/P_{pilA}-romRD53N</i> (pGFy176)	Diese Arbeit
SA2064	<i>frzCD::Tn5(Tet^r)</i> Ω224, <i>romR::nptII/P_{pilA}-romRD53N-gfp</i> (pGFy178)	Diese Arbeit
SA2065	<i>frzCD::Tn5(Tet^r)</i> Ω224, <i>romR::nptII/P_{pilA}-romRD53N</i> (pGFy176)	Diese Arbeit
SA2066	<i>frzCD::Tn5(Tet^r)</i> Ω224, <i>romR::nptII/P_{pilA}-romR-gfp</i> (pGFy177)	Diese Arbeit
SA2067	<i>frzCD::Tn5(Tet^r)</i> Ω224, <i>romR::nptII/P_{pilA}-romR</i> (pGFy176)	Diese Arbeit
SA2068	<i>frzE::Tn5(Tet^r)</i> Ω231, <i>romR::nptII/P_{pilA}-romRD53N-gfp</i> (pGFy178)	Diese Arbeit
SA2069	<i>frzE::Tn5(Tet^r)</i> Ω231, <i>romR::nptII/P_{pilA}-romRD53N</i> (pGFy176)	Diese Arbeit
SA2070	<i>frzE::Tn5(Tet^r)</i> Ω231, <i>romR::nptII/P_{pilA}-romR-gfp</i> (pGFy177)	Diese Arbeit
SA2088	<i>aglZ-gfp</i> (pGFy148)	Diese Arbeit
SA2092	<i>aglZ-gfp</i> (pGFy148)/ <i>P_{nat}-romR-mDsRed</i> (pSL113)	Diese Arbeit
SA2096	<i>mglA9/mglA</i> (pSL49)	Diese Arbeit
SA2210	<i>romR::nptII/pSWU30</i>	(Leonardy <i>et al.</i> , 2007)
SA2244	<i>romR::nptII/P_{pilA}-receiver</i> (pSH1210)	(Leonardy <i>et al.</i> , 2007)

SA2256	<i>romR::nptII/P_{pilA}-output</i> (pSH1211)	(Leonardy <i>et al.</i> , 2007)
SA2259	<i>romR::nptII/P_{pilA}-receiver-gfp</i> (pSH1201)	(Leonardy <i>et al.</i> , 2007)
SA2260	<i>romR::nptII/P_{pilA}-output-gfp</i> (pSH1202)	(Leonardy <i>et al.</i> , 2007)
SA2268	Δ <i>frzS/P_{nat}-romR-gfp</i> (pSH1208)	(Leonardy <i>et al.</i> , 2007)
SA2271	<i>romR::nptII/P_{nat}-romR-gfp</i> (pSH1208)	(Leonardy <i>et al.</i> , 2007)
SA2272	<i>romR::nptII/P_{nat}-romR</i> (pSH1206)	(Leonardy <i>et al.</i> , 2007)
SA2273	<i>P_{nat}-romR-gfp</i> (pSH1208)	(Leonardy <i>et al.</i> , 2007)
SA2289	Δ <i>pilA</i> , <i>romR::nptII/P_{nat}-romR-gfp</i> (pSH1208)	(Leonardy <i>et al.</i> , 2007)
SA3300	Δ <i>romR</i>	Diese Arbeit
SA3302	Δ <i>mgIB/mgIB⁺A⁺</i> (pSL44)	Diese Arbeit
SA3303	Δ <i>mgIB/mgIB⁺A-G21V</i> (pSL45)	Diese Arbeit
SA3304	Δ <i>mgIB/mgIB⁺A-T26/27N</i> (pSL46)	Diese Arbeit
SA3306	<i>mgIB⁺A⁺</i> (pSL44)	Diese Arbeit
SA3307	<i>mgIB⁺A-G21V</i> (pSL45)	Diese Arbeit
SA3308	<i>mgIB⁺A-T26/27N</i> (pSL46)	Diese Arbeit
SA3317	Δ <i>romR</i> , <i>P_{nat}-romR-gfp</i> (pSH1208)	Diese Arbeit
SA3318	<i>frzCD::Tn5lacΩ536</i> , Δ <i>mgIB/mgIBAgof</i> (pSL45)	Diese Arbeit
SA3319	<i>frzCD::Tn5Ω224</i> , Δ <i>mgIB/mgIB⁺A-G21V</i> (pSL45)	Diese Arbeit
SA3321	<i>frzCD::Tn5lacΩ536</i> , Δ <i>mgIB/mgIB⁺A-T26/27N</i> (pSL46)	Diese Arbeit
SA3324	<i>frzCD::Tn5Ω224</i> , Δ <i>mgIBA</i>	Diese Arbeit
SA3325	<i>frzCD::Tn5lacΩ536</i> , Δ <i>mgIBA</i>	Diese Arbeit
SA3334	<i>mgIA-G21V</i> (pSL51)	Diese Arbeit
SA3335	<i>mgIA-T26/27N</i> (pSL52)	Diese Arbeit
SA3336	<i>mgIA-G21V / P_{nat}-romR-gfp</i> (pSH1208)	Diese Arbeit
SA3337	<i>mgIA-T26/27N/ P_{nat}-romR-gfp</i> (pSH1208)	Diese Arbeit
SA3339	<i>mgIA-G21V</i> , <i>romR::nptII/ P_{pilA}-romR^{D53N}-gfp</i> (pGFy178)	Diese Arbeit

SA3338	<i>mglA-G21V, romR::nptII/ P_{pilA}⁻ romR^{D53E}-gfp</i> (pGFy166)	Diese Arbeit
SA3344	<i>mglA-G21V, aglZ-gfp</i> (pGFy148)	Diese Arbeit
SA3345	<i>mglA-T26/27N, romR::nptII/ P_{pilA}⁻ romR^{D53N}-gfp</i> (pGFy178)	Diese Arbeit
SA3347	<i>frzCD::Tn5lacΩ536, mglA-T26/27N/ P_{nat}-romR-gfp</i> (pSH1208)	Diese Arbeit
SA3348	<i>mglA-G21V, romR::nptII</i>	Diese Arbeit
SA3350	<i>mglA-T26/27N, aglZ-gfp</i> (pGFy148)	Diese Arbeit
SA3351	<i>mglA-T26/27N, romR::nptII</i>	Diese Arbeit
SA3352	<i>mglA-T26/27N, romR::nptII/ P_{pilA}⁻ romR^{D53E}-gfp</i> (pGFy166)	Diese Arbeit
SA3354	<i>mglA-T26/27N, aglZ-gfp</i> (pGFy148)/ <i>P_{nat}-romR-mDsRed</i> (pSL113)	Diese Arbeit
SA3355	<i>frzCD::Tn5Ω224, mglA-G21V</i>	Diese Arbeit
SA3357	<i>mglA-G21V, aglZ-gfp</i> (pGFy148)/ <i>P_{nat}- romR-mDsRed</i> (pSL113)	Diese Arbeit
SA3358	<i>frzCD::Tn5lacΩ536, mglA-G21V/ P_{nat}- romR-gfp</i> (pSH1208)	Diese Arbeit
SA3359	<i>mglA9/ yfp-linker-mglA⁺</i> (pSL60)	Diese Arbeit
SA3360	<i>mglA9/ yfp-linker-mglA-G21V</i> (pSL61)	Diese Arbeit
SA3361	<i>mglA9/ yfp-linker-mglA-T26/27N</i> (pSL61)	Diese Arbeit
SA3362	<i>ΔmglBA, aglZ-gfp</i> (pGFy148)/ <i>P_{nat}- romR-mDsRed</i> (pSL113)	Diese Arbeit
SA3364	<i>yfp-linker-mglA⁺</i> (pSL60)	Diese Arbeit
SA3365	<i>yfp-linker-mglA-G21V</i> (pSL61)	Diese Arbeit
SA3366	<i>yfp-linker-mglA-T26/27N</i> (pSL61)	Diese Arbeit
SA3367	<i>ΔromR/ yfp-linker-mglA⁺</i> (pSL60)	Diese Arbeit
SA3370	<i>ΔmglBA, aglZ-gfp</i> (pGFy148)	Diese Arbeit
SA3371	<i>ΔaglZ/ yfp-linker-mglA</i> (pSL60)	Diese Arbeit

<i>E. coli</i>- Stämme	Genotyp	Referenz
Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), <i>80lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>arsD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
Rosetta 2(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B -m _B) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE2(Cm ^R)	Novagen/Merck (Darmstadt)

3.4.2 Kultivierung der Bakterien

Die verwendeten Medien, Lösungen und Kunststoff-Laborbedarf wurden mittels feuchter Hitze bei 121°C und 1 bar Überdruck für 20 Minuten autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen (Antibiotika, Spurenelementlösung) wurden mit Sterilfilter (0,22 bzw. 0,45 µm Porendurchmesser) der Firma Millipore (Schwalbach) sterilisiert und nach dem Abkühlen der Medien hinzugegeben. Hitzeunempfindlicher Laborbedarf (Glaskolben, Metall, Keramik) wurden im Sterilisationsschrank 4 Stunden bei 180°C sterilisiert.

Die *M. xanthus* Kulturen wurden aerob bei 32°C auf 1% CTT-Medium im Dunkeln gezüchtet. Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben auf Horizontal-Kreisschütteltischen bei 230 rpm bis zu einer gewünschten optischen Dichte kultiviert. Die verwendeten *E. coli* Stämme wurden aerob bei 37°C auf LB-Medium kultiviert. *E. coli* Flüssigkulturen wurden auf dem Schüttler bei 200-220 rpm inkubiert. Die optische Zelldichte der Bakterienkulturen wurde photometrisch durch Absorptionsmessung an einem Photometer (Ultrospec 3100) bestimmt. Die Absorptionsmessung der *M. xanthus* Kulturen erfolgte bei 550 nm. Bei *E. coli* Kulturen erfolgte die Messung bei 600 nm.

Für das Animpfen von *M. xanthus* Flüssigkulturen wurde zunächst eine Einzelkolonie in einem sterilen 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml 1% CTT-Medium resuspendiert und anschließend wurde dieser Milliliter in einen Erlenmeyerkolben mit 1% CTT-Medium überführt. *E. coli* Flüssigkulturen wurden direkt mit einer Einzelkolonie angeimpft.

3.4.3 Lagerung von transformierter *M. xanthus* und *E. coli* Stämme

Kulturen transformierter *M. xanthus* und *E. coli* Stämme wurden maximal vier Wochen auf den entsprechenden Festmedien bei 18°C bzw. 4°C aufbewahrt. Die Lagerung der *M. xanthus* Stämmen, bei -80°C erfolgte nach Zugabe einer 10 M Glycerinlösung in 1 ml frische Bakterienkultur (0,5 M Glycerinendkonzentration), welche eine $OD_{550} > 1$ hatte. *E. coli* Stämme wurden ebenfalls bei -80°C gelagert nach Zugabe von Glycerin in 1 ml gutbewachsene Bakterienkultur (2 M Glycerinendkonzentration).

3.4.4 Untersuchung der Bewegungsfähigkeit von *M. xanthus* Stämmen

Für die Untersuchung des S-Bewegungssystem in *M. xanthus* nach Hodgkin und Kaiser (Hodgkin & Kaiser, 1977) wurden 20 ml 0,5% CTT-Agar-Platten (0,5 % Casiton; 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM KH_2PO_4 pH 7,6; 8 mM $MgSO_4$; 0,5% Agar; pH 7,6) angefertigt. Das A-Bewegungssystem wurde ebenfalls auf diesem Medium überprüft, jedoch wurden hier 1,5 % Agar verwendet. Die Platten wurden über Nacht bei Raumtemperatur gelagert und vor der Benutzung 10 bis 15 Minuten bei 32°C inkubiert, wobei die Platten ohne Deckel mit der Agarseite nach unten platziert wurden. Die zu überprüfenden *M. xanthus* Stämme wurden in 1% CTT-Medium ohne Antibiotikum bis zu einer optischen Dichte (OD_{550}) von 0,5 bis 0,9 kultiviert und die Zellen anschließend bei 4700 rpm 10 Minuten lang bei Raumtemperatur herunter zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zentrifugat mit 1% CTT-Medium ohne Antibiotikum auf eine kalkulierte OD_{550} von 7 resuspendiert. Von diesen Zellsuspensionen wurden jeweils 2 mal 5 μ l auf die zuvor beschriebenen Platten getropft. Die Platten wurden mit der Agarseite nach unten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bei 32°C inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Betrachtung der Phenotypen mit dem Stereomikroskop Leica MZ75 bei einer 8-fachen und 50-fachen Vergrößerung und dem inversen Leica Mikroskop IRE2 bei einer 400-fachen Vergrößerung. Die Dokumentation erfolgte mit der Leica DFC280 Kamera und der IM50 Software von Leica. Die aufgenommenen Bilder wurden in Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems, Inc.) zusammengestellt und bearbeitet.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Verwendete Oligonukleotide und Plasmide

In den Versuchen dieser Arbeit wurden verschiedene synthetische Oligonukleotide, Plasmide und Vektoren verwendet. Diese sind in den Tabellen 3 und 4 aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide. Nukleotide zum Einbringen von Restriktionsschnittstellen sind rot gekennzeichnet, Nukleotide komplementär zur Matrizen-DNA sind unterstrichen, Linkersequenzen sind grün und Sequenzen komplementär zu anderen Primersequenzen sind blau dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz 5' zu 3' Richtung
PCR-Primer	
oDromR-1	ATCGGTCTAGACATCGCGGAGGCGCTGCC
oDromR-2	GAGTCCTCGCGGATGGTGAGCGAGTC
oDromR-3	ACCATCCGCGAGGAGCTCGAGCGGCTC
oDromR-4	ATCGGAAGCTTCTCGCGCACCGCGGCGGA
oDromR-5	GCCAGATGGAGCCGTTCTTCT
oDromR-6	CCCGAGGAAGGCCCGGGCAT
oMglA-att1	ATCGGTCTAGAAATGCCCAAGAATCTGCTGGTC
oMglA-att2	ATCGGAAGCTTCAACCACCCTTCTTGAG
oMglA-att6	ATCGGAAGCTTATGTCCTTCATCAATTAC
oMglA-3	ATCGGACTAGTACCACCCTTCTTGAGCTC
oMglA-EcoRI	ATCCGGAATTCATGTCCTTCATCAATTAC
oMglAstop-NotI	ATCGCGGCGGCGCCCAAGAAGGGTGGTTGA
oFrzCD-1	ATGTCCTGGACACCCCAACGAG
oFrzCD-2	CTAGTCGGCCTTGAACCGCTTGATG
oFrzE-4	GGAGACCGCGGACCAGGCCGCGGAGGACG
oFrzE-5	GTGGTCCTCGCCGTGACGCACCACCACCG
ofrzS-431	AGCCGATGACGGCGGACTTCGGCGAGGA
oMXAN4150-111	CGACTTCGCCGCCATCATCCGCAGCGGC
oGFP-5549	TGCATCACCTTCACCCTCTCCACTGACAG

oGFP-6009	<u>GGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTAC</u>
oGFy98	<u>GTCTAGATAACGGCGCCGGGATTCCGGCA</u>
oCrGFP-a	ATCGG ACTAGT <u>ATGGCCAAGGGCGAGGAG</u>
oCrGFP-b	ATCGG AAGCTTGGTACCGATATCGGATCCTCTAGA GCCGGCGCGGAGCCGGCCGATCC <u>CTTGTACAGC</u> <u>TCGTCCATGCC</u>
oYFP-1	ATC ACTAGT <u>ATGGTGAGCAAGGGCGAG</u>
<i>attB</i> -links	<u>CGGCACACTGAGGCCACATA</u>
<i>attB</i> -rechts	<u>GGAATGATCGGACCAGCTGAA</u>
<i>attP</i> -links	<u>GGGAAGCTCTGGGTACGAA</u>
<i>attP</i> -rechts	<u>GCTTTCGCGACATGGAGGA</u>
Sequenzierungsprimer	
oCrGFP-7	<u>CCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAA</u>
oCrGFP-8	<u>TTCAGCTCGATGCGGTTACCAGG</u>
oGFy45	<u>GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCG</u>
oGFy60	<u>CACATGGTCCTGCTGGAGTTCG</u>
oGFy61	<u>TGTGGCCGTTTACGTCGCCGTCAGCTC</u>
oGFy97	AGGATCC GGCGGAGCC <u>TTGTCCA</u> ACTCGTCCACCAGG
oAglZhom3	ATCGG GAATTC <u>CTCCAGACGCAGGCCACC</u>
M13-for	<u>GTCGTGACTGGAAAACCCTGGCG</u>
M13-rev	<u>CTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTA</u>
opSL626- <i>Sma</i> I	<u>GACTTGGAGCCCGGGAGCGC</u>
opCC1-for	<u>GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG</u>
opGEX2T-up	<u>CAGACAAGCTGTGACCGTCTCC</u>
opGEX2T-down	<u>ATCCCACAAATTGATAAGTACTTG</u>

Tabelle 4: Verwendete Plasmide und Vektoren.

Bezeichnung	Genotyp/Beschreibung	Referenz
pGEX4-T1	<i>ptac</i> , Expressionsplasmid, GST-Tag, Amp ^R	GE-Healthcare (München)
pBluescript II SK ⁻	Klonierungsvektor, Blau/weiß-Selektion, Amp ^R	Fermentas (St. Leon-Rot)
pFCrGFP	<i>Chlamydomonas</i> adaptiertes grün-fluoreszierendes Protein, Amp ^R	Biocat (Heidelberg)
pSWU30	Mx8 <i>attP</i> , Tet ^R	(Wu & Kaiser, 1997)
pBJ114	pUC119 mit Km ^R und <i>galk</i>	(Wu & Kaiser, 1996)
pFGBJ	<i>frzS-gfp</i> , Km ^R	(Mignot <i>et al.</i> , 2005)
pmDsRed	pDsRed-Monomer, monomeres DsRed Fluoreszenzprotein (Mutante des rot-fluoreszierenden Proteins von <i>Discosoma sp.</i>)	Clontech (Heidelberg)
pSW105-YFP	gelb-fluoreszierendes Protein, Km ^R	V. Jakovlecic (MPI-Marburg)
pPLH325	Mx8 <i>attP</i> , <i>mgIBA</i> -Locus, Km ^R	T. Hartzell
pSW105	Mx8 <i>attP</i> , <i>pilA</i> -Promotor, Km ^R	S. Weiss (MPI-Marburg)
pGFy148	<i>aglZ-gfp</i> , Km ^R	G. Freymark (MPI-Marburg)
pGFy183	pSWU30 <i>dEcoRV</i> , Mx8 <i>attP</i> , <i>pilA</i> -Promotor, Tet ^R	G. Freymark (MPI-Marburg)
pSH1208	P_{nat} - <i>romR-gfp</i> -Fusionskonstrukt, Mx8 <i>attP</i> , Tet ^R	(Leonardy <i>et al.</i> , 2007)
pGFy165	P_{pilA} - <i>romRD53E</i> , Mx8 <i>attP</i> , Str ^R	(Leonardy <i>et al.</i> , 2007)
pGFy166	P_{pilA} - <i>romRD53E-gfp</i> , Mx8 <i>attP</i> , Str ^R	(Leonardy <i>et al.</i> , 2007)
pGFy176	P_{pilA} - <i>romRD53N</i> , Mx8 <i>attP</i> , Str ^R	(Leonardy <i>et al.</i> , 2007)
pGFy177	P_{pilA} - <i>romR-gfp</i> , Mx8 <i>attP</i> , Str ^R	(Leonardy <i>et al.</i> , 2007)
pGFy178	P_{pilA} - <i>romRD53N-gfp</i> , Mx8 <i>attP</i> , Str ^R	(Leonardy <i>et al.</i> , 2007)

pSB01	<i>mgIB</i> ⁺ A-Lokus mit mutiertem <i>mgIA</i> (G21V) Gen in pPLH325, Kan ^R	S. Bubendorfer (MPI-Marburg)
pSB02	<i>mgIB</i> ⁺ A-Lokus mit mutiertem <i>mgIA</i> (T26/27N) Gen in pPLH325, Kan ^R	S. Bubendorfer (MPI-Marburg)
pSL111	<i>P</i> _{nat} - <i>romR</i> - <i>mDsRed</i> (<i>Xba</i> I- <i>Hind</i> III-Fragment aus pSH1208 in pSK kloniert und <i>gfp</i> durch <i>EcoRV</i> - <i>Hind</i> III- <i>mDsRed</i> -Fragment, amplifiziert mit oDsRed1 und oDsRM2 von pmDsRed, ersetzt) in pSK, Amp ^R	Diese Arbeit
pSL113	<i>P</i> _{nat} - <i>romR</i> - <i>mDsRed</i> (<i>Xba</i> I- <i>Hind</i> III-Fragment aus pSL111 in pSWU30 kloniert) in pSWU30, Tet ^R	Diese Arbeit
pSL8	<i>gfp</i> -Polylinkerkonstrukt (mit oCrgfp-a und oCrgfp-b in pFCrGFP amplifiziert) in pSW105, Km ^R	Diese Arbeit
pSL35	<i>gfp-linker-mgIA</i> ⁺ -Fusionkonstrukt (<i>mgIA</i> - <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment mit oMgIA-att1 und oMgIA-att2 von genomischer DK1622 DNA amplifiziert) in pSL8, Kan ^R	Diese Arbeit
pSL37	Δ <i>romR</i> (Deletionskonstrukt für <i>romR</i> amplifiziert mit oDromR1 und oDromR2 bzw. oDromR3 und oDromR4), pBJ114, Km ^R	Diese Arbeit
pSL44	<i>mgIB</i> ⁺ A ⁺ -Lokus (<i>mgIBA</i> - <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III-Fragment aus pPLH325) in pGFy183, Tet ^R	Diese Arbeit
pSL45	<i>mgIB</i> ⁺ A-G21V-Lokus (<i>mgIBA</i> - <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III Fragment mit mutiertem <i>mgIA</i> (G21V) Gen aus pSB01) in pGFy183, Tet ^R	Diese Arbeit
pSL46	<i>mgIB</i> ⁺ A-T26/27N-Lokus (<i>mgIBA</i> - <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III Fragment mit mutiertem <i>mgIA</i> (T26/27N) Gen aus pSB02) in pGFy183, Tet ^R	Diese Arbeit
pSL49	<i>mgIA</i> ⁺ -Gen (mit oMgIA-att6 und oMgA-att2 von chromosomaler <i>M. xanthus</i> DNA amplifiziert) in pSW105, Kan ^R	Diese Arbeit
pSL51	<i>mgIB</i> ⁺ A-G21V-Locus (<i>mgIBA</i> - <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III Fragment mit mutiertem <i>mgIA</i> (G21V) Gen aus pSL45) in pBJ114, Kan ^R	Diese Arbeit
pSL52	<i>mgIB</i> ⁺ A-T26/27N-Locus (<i>mgIBA</i> - <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III Fragment mit mutiertem <i>mgIA</i> (T26/27N) Gen aus pSL46) in pBJ114, Kan ^R	Diese Arbeit
pSL53	<i>mgIB</i> ⁺ A ⁺ -Locus (<i>mgIBA</i> - <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III-Fragment aus pSL44) in pBJ114, Kan ^R	Diese Arbeit
pSL54	<i>mgIA</i> ⁺ -Gen (mit oMgIA- <i>Eco</i> RI und oMgIAstop-NotI von pSL44 amplifiziert) in pGEX4T-1, Amp ^R	Diese Arbeit

pSL55	<i>gfp-linker-mglA</i> -G21V Fusionkonstrukt (<i>mglA</i> - G21V- <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment mit oMglA-att1 und oMglA-att2 von pSL45 amplifiziert) in pSL8, Kan ^R	Diese Arbeit
pSL56	<i>gfp-linker-mglA</i> -T26/27N Fusionkonstrukt (<i>mglA</i> -T26/27N- <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment mit oMglA-att1 und oMglA-att2 von pSL46 amplifiziert) in pSL8, Kan ^R	Diese Arbeit
pSL57	<i>mglA</i> -G21V -Gen (mit oMglA-EcoRI und oMglAstop-NotI von pSL45 amplifiziert) in pGEX4T-1, Amp ^R	Diese Arbeit
pSL58	<i>mglA</i> -T26/27N-Gen (mit oMglA-EcoRI und oMglAstop-NotI von pSL46 amplifiziert) in pGEX4T-1, Amp ^R	Diese Arbeit
pSL59	<i>yfp</i> -Polylinkerkonstrukt (mit oYFP-1 und oCrgfp-b aus pSW105-YFP amplifiziert) in pSW105, Km ^R	Diese Arbeit
pSL60	<i>yfp-linker-mglA</i> ⁺ -Fusionkonstrukt (<i>mglA</i> - <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment aus pSL35) in pSL59, Km ^R	Diese Arbeit
pSL61	<i>yfp-linker-mglA</i> -G21V Fusionkonstrukt (<i>mglA</i> - G21V- <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment aus pSL55) in pSL59, Km ^R	Diese Arbeit
pSL62	<i>yfp-linker-mglA</i> -T26/27N Fusionkonstrukt (<i>mglA</i> -T26/27N- <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment aus pSL56) in pSL59, Km ^R	Diese Arbeit

3.5.2 Präparation von DNA aus *E. coli* und *M. xanthus*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurde das Qiagen Mini-Prep- oder Maxi-Prep-Kit verwendet. Der DNA-Reinheitsgrad sowie die DNA-Konzentration wurden mit dem Nano-Drop ND10000 Spectrophotometer ermittelt. Für die DNA-Isolierung aus *M. xanthus*-Zellen wurde das MasterPure DNA Purification Kit von der Firma Epicentre Biotechnologies (Madison, USA) verwendet oder nach dem Protokoll von Avery und Kaiser (Avery & Kaiser, 1983) verfahren. Die Kulturen wurden bis zu einer OD₅₅₀ größer 1,0 kultiviert und dann bei 4700 rpm, 10 Minuten, 4°C abzentrifugiert. Das Zellzentrifugat wurde in 400µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8) aufgenommen. Es wurden 80 µl einer 2,5 mg/ml Proteinase K Stocklösung (Proteinase K Pulver in 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM NaCl gelöst) und 80 µl Rapid-Lysis-Mix (5% SDS; 0,125 M EDTA; 0,5 M Tris-HCl, pH 9,4) hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit

einer Kanüle (Größe 22) und einer Spritze 10 mal durch Hoch- und Runterziehen gescherrt. Es folgten mehrere Phenol-Chloroform Extraktionsschritte. Nachdem letzten Extraktionsschritt wurde die DNA mit 96%igen Ethanol für 10 Minuten bei 13000 rpm gefällt, danach mit 70%igen Ethanol gewaschen, in 200 µl TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 4°C leicht geschüttelt. Anschließend wurde die DNA-Reinheit und die DNA-Konzentration mit dem Nano-Drop bestimmt.

3.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmenten wurden mittels PCR mit der *PfuUltra*TMII-Polymerase von der Firma Stratagene (Amsterdam) amplifiziert. Die 50 µl Ansätze enthielten 50-150 ng chromosomaler DNA bzw. 10-50 ng Plasmid-DNA mit den entsprechenden Inserts als Matrizen, 20 pmol jedes Oligonukleotids, 250 µM jedes Desoxyribonukleosidtriphosphats, 2,5 Units DNA-Polymerase, 1 mM MgSO₄ sowie den entsprechenden Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM KCl, 1 mM DTT; 0,1 mM EDTA). Die Durchführung der PCR erfolgte im Mastercycler ep (Eppendorf, Hamburg), wobei das Programm jeder PCR individuell eingestellt wurde. Das Grundprinzip der PCR ist in Tabelle 5 aufgezeigt. Zur Verifikation von Integrationen in die chromosomale *M. xanthus*-DNA wurde der Eppendorf Master Mix 2,5x (1,25 Units Taq-DNA-Polymerase; 200 µM dNTP; 1,5 mM MgSO₄) nach Herstellerangaben verwendet. Der 20 µl PCR-Ansatz enthielt je 20 pmol jedes Oligonucleotids. Die PCR erfolgte im Mastercycler und das PCR-Programm wurde wie in Tabelle 6 beschrieben durchgeführt. Die Fragmentlängen der amplifizierten DNA-Proben wurden mithilfe einer Gelelektrophorese verifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit dem DNA Clean & Concentrator-5 Kit oder dem Gel DNA Recovery Kit von Zymo Research (HiSS-Diagnostics, Freiburg) für eine weitere Verwendung aufgereinigt.

Tabelle 5: Programm der PCR.(Die Schritte 2 bis 4 wurden 30 mal wiederholt)

Schritt	Temperatur	Zeitdauer
1. Initiale Denaturierung	94°C	180 Sekunden
2. Denaturierung	94°C	30 Sekunden
3. Primer-Anlagerung	50°C bis 61°C (etwa 5 bis 10°C unterhalb der Schmelztemperatur der verwendeten Primer)	30 Sekunden
4. Polymerisation	68°C	60 Sekunden
5. Finale Polymerisation	68°C	240 Sekunden
6. Aufbewahrung	4°C	-

Tabelle 6: Programm der PCR für die Verifikation von Integrationen. Die Schritte 2 bis 4 wurden 35 mal wiederholt.

Schritt	Temperatur	Zeitdauer
1. Initiale Denaturierung	94°C	180 Sekunden
2. Denaturierung	94°C	30 Sekunden
3. Primer-Anlagerung	51°C	30 Sekunden
4. Polymerisation	72°C	60 Sekunden
5. Finale Polymerisation	72°C	300 Sekunden
6. Aufbewahrung	4°C	

3.5.4 Restriktion und Klonierung von DNA

Die DNA (0,5-2 µg) wurde in der Regel für 2 Stunden bei 37°C mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen inkubiert. Die Restriktionspuffer wurden nach Herstellerangaben verwendet. Die Restriktionsansätze (50 µl) enthielten 0,2-1,0 µl Restriktionsendonuklease (1-20 U/µl).

Für den Nachweis von DNA-Fragmentlängen wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung der DNA durchgeführt. Hierfür wurde eine Gelkammer (MPI, Marburg) mit 12 cm Elektrodenabstand und 120 V Elektrodenpotential verwendet, die mit 1xTBE-Puffer (0,1 M Tris-HCl; 0,09 M Bor-Säure; 0,001 M EDTA) der Firma Invitrogen (Karlsruhe) gefüllt wurde. Gewöhnlich wurden 1%ige Agarosegele (Agarosepulver in 1xTBE-Puffer

aufgekocht) mit 1 µg/ml Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe) angefertigt. Die zu überprüfenden DNA-Proben wurden mit 5-fachen Auftragspuffer (Bioline, Luckenwalde) (32,5% Sucrose; 5 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; 0,15% Bromphenol-Blau) versetzt. Als Längen- und Mengenstandard dienten die DNA-Marker HypperLadder I-IV von Bioline (Luckenwalde). Für die Dokumentation der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde die DNA mit dem 2UV-Transilluminator (UVP-Bio-Doc-IT-System) bei 365 nm sichtbar gemacht und mit dem Mitsubishi Electronic P93E Videoprintgerät fotografiert.

Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die korrekten DNA-Fragmentlängen auf einem UV-Tisch aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mit dem Gel DNA Recovery Kit von Zymo Research (HiSS-Diagnostics, Freiburg) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurden jeweils 2-6 µg Vektor- und Insert-DNA mit Restriktionsendonukleasen behandelt. Anschließend wurde die Vektor- und Insert-DNA wie zuvor beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel aufgereinigt. Die DNA-Reinheit und die DNA-Konzentration wurden mit dem Nano-Drop Spectrophotometer bestimmt.

DNA-Ligationen wurden gewöhnlich mit der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt a. M.) nach Herstellerangaben bei 18°C über Nacht durchgeführt. Der Ligationsansatz (50 µl) enthielt in der Regel 50 ng Vektor-DNA und die 3 bis 5-fache Menge an Insert-DNA.

3.5.5 Herstellung von chemischkompetenten *E. coli* Zellen

Der für die Klonierungen verwendete *E. coli* Stamm Top10 wurde von einer Übernachtskultur in 10 ml LB-Medium inokuliert und bei 37°C, 220 rpm bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,5-0,7 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur auf Eis gestellt und bei 4°C, 3500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zentrifugat in 5 ml eiskalter CaCl₂-Lösung aufgenommen. Danach wurde erneut bei 3500 rpm, 4°C, 10 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 1 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis wurden die kompetenten Zellen in 200 µl Aliquots bei -80°C bis zur Verwendung eingefroren.

3.5.6 Herstellung von elektrokompetenten *E. coli* Zellen

Für das Einbringen von speziellen Plasmiden für die Überexpression von Proteinen in *E. coli* Zellen wurden elektro kompetente *E. coli* Rosetta2 hergestellt. Hierzu wurden 100 ml LB-Medium von einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C, 220 rpm bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,5-0,7 kultiviert. Die Kultur wurde anschließend bei 4°C, 4700 rpm für 20 Minuten zentrifugiert, das Zentrifugat in 50 ml eiskalter 10% Glycerol-Lösung resuspendiert und erneut bei 4°C, 4700 rpm für 20 Minuten abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal wiederholt (1x 50 ml, 1x 25 ml, 1x 10 ml). Nach dem letzten Waschschrift wurde das Sediment in 2 ml eiskalter Glycerol-Lösung aufgenommen und in 50 µl Aliquots bei -80°C bis zur Verwendung der kompetenten Zellen eingefroren.

3.5.7 Transformation von *E. coli* Zellen

Für die Transformation von *E. coli* Zellen mit Plasmiden wurden chemisch kompetente Top10 Zellen verwendet. Die Ligationsansätze (25 µl) wurden jeweils mit 200 µl kompetenten Zellen gemischt und 30 Minuten lang auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde ein Hitzeschock für 2 Minuten bei 42°C durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen sofort 5 Minuten lang auf Eis inkubiert, dann 5 ml LB-Medium hinzugegeben und bei 37°C, 220 rpm für 30 bis 60 Minuten inkubiert. Die Kulturen wurden bei 3500 rpm, 4°C, 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgegossen, das Sediment in dem Restüberstand resuspendiert und auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum mithilfe eines Drigalski-Spatels ausplattiert. Daraufhin wurden die Platten übernacht bei 37°C inkubiert.

Die Transformation von *E. coli* Zellen mit Expressionsplasmiden erfolgte mittels Elektroporation in elektro kompetente Rosetta2 Zellen. Die jeweiligen Expressionsplasmide (100 ng) wurden gegen steriles Wasser dialysiert, anschließend mit 50 µl elektro kompetenten Zellen gemischt und sofort in eine vorgekühlte 0,1 cm BioRad-Küvette überführt. Die Elektroporation wurde mit dem Gene Pulser Xcell Electroporation System (BioRad, München) mit einem Puls von 1,5 KV, 200 Ω und 25 µF durchgeführt. Anschließend wurde die Küvette mit 1 ml LB-Medium gespült und der gesamte Ansatz in einen 25 bis 50

ml Erlenmeyerkolben überführt. Die Kulturen wurden bei 37°C, 220 rpm für 60 Minuten inkubiert und anschließend bei 13000 rpm, 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Zentrifugat in dem restlichen Überstand resuspendiert und auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum mithilfe eines Drigalski-Spatels ausplattiert.

3.5.8 DNA-Sequenzierung

Für die Überprüfung konstruierter Plasmide wurde die Insert-DNA nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger im Max-Planck-Institut Abteilung Ökophysiologie (Marburg) sequenziert. In der Abteilung Ökophysiologie erfolgte die Sequenzierung mit dem Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) und dem 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Herstellerangaben. In einem Ansatz wurden 3 µl BigDye Terminator CycleMix, 2 µl 5-facher Dilution Buffer, 3 µl Plasmid- DNA, 1 µl Primer (5 pmol/µl) und 11 µl HPLC-Wasser gegeben. Nach dem in Tabelle 15 angegebenen Programm wurde die PCR im 20 µl-Ansatz durchgeführt. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von jeweils 10 µl 125 mM EDTA, 9 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6 bis 4,8), 80 µl HPLC-Wasser und 400 µl 96%-igem Ethanol für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 13000 rpm und 20°C, wonach das Zentrifugat zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und der Ansatz dann für 5 Minuten zentrifugiert wurde. Das Ethanol wurde vollständig abgenommen, das Sediment 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 nächsten Tag am Computer ausgewertet werden. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem VektorNTI Software Packet bearbeitet und analysiert.

3.5.9 Elektroporation von *M. xanthus*

Die Elektroporationsmethode wurde verwendet, um in verschiedene *M. xanthus* Stämme Plasmidkonstrukte einzubringen. Die jeweiligen Kulturen wurden bis zu einer OD₅₅₀ von ca. 0,7 angezogen, dann 2 ml entnommen und diese bei 13000 rpm, für 2 Minuten, bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben 3-mal mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen

und dann in 40 µl sterilem Wasser aufgenommen. Pro Elektroporationsansatz wurden 80 ng (Integration in die „phage Mx8 *attB*-site“) bis 1000 ng (homologe Rekombination) gegen Wasser dialysierte (VSWP-Membran von Millipore, Eschborn) Plasmid-DNA hinzugegeben und sofort in eine vorgekühlte 0,1 cm BioRad-Küvette überführt. Die Elektroporation wurde mit dem Gene Pulser Xcell Electroporation System (BioRad, München) mit einem Puls von 0,65 KV, 400 Ω und 25 µF durchgeführt. Anschließend wurde die Küvette mit 1 ml CTTYE-Medium (1% Casiton, 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM KH₂PO₄ pH 7,6; 8 mM MgSO₄; 0,2% Hefeextrakt, pH 7.6) gespült und der gesamte Ansatz in einen 25 bis 50 ml Erlenmeyerkolben überführt. Für die phänotypische Expression wurden die Kulturen 5 Stunden bei 230 rpm und 32°C inkubiert. Danach wurde der Elektroporationsansatz mit 4 ml 50°C warmen CTT-Softagar (1% CTT-Medium; 0,75% Agar) vermischt und sofort auf 1% CTT-Platten mit Kanamycin gegeben. Die Platten wurden für 4 bis 5 Tage bei 32°C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde dann auf eine neue 1% CTT-Platte mit Kanamycin ausgestrichen.

Für die Verifikation der Integration von Plasmid-DNA via „site-specific recombination“ in die „phage Mx8 *attB*-site“ und homologer Rekombination in die chromosomale *M. xanthus* DNA wurde eine Polymerasenkettenreaktion wie zuvor beschrieben durchgeführt. Für die Gewinnung von genomischer *M. xanthus* DNA als Matrize für die PCR, wurde ein Einzelkolonie eines transformierten *M. xanthus* Stammes in 25 bis 50 µl Wasser resuspendiert, 5 Minuten bei 95°C erhitzt und anschließend kurz abzentrifugiert. Von diesem Ansatz wurden dann 1,5 µl in die PCR-Reaktion eingesetzt. Für die Überprüfung eines Stammes auf die Integration von Plasmid-DNA in die „phage Mx8 *attB*-site“ wurden 3 Reaktionsansätze mit verschiedenen *attB*- und *attP*-Primerpaaren angesetzt (Magrini *et al.*, 1999). Für die Verifikation der Integration von Plasmid-DNA via homologer Rekombination in die chromosomale *M. xanthus* DNA wurden die jeweiligen Oligonukleotide (Tab. 3) der nachzuweisenden Gene in einen PCR Reaktionsansatz gegeben. Nach der PCR wurden die amplifizierten DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese auf ihre erwartete Größe überprüft.

3.5.10 Herstellung der Plasmidkonstrukte

In den folgenden Abschnitten werden die Klonierungsstrategien der wichtigsten und meist verwendeten Plasmide beschrieben.

pSL44: Der *mgIB*A-Lokus wurde mit den Endonukleasen *EcoRI* und *HindIII* aus dem Vektor pPLH325 herausgeschnitten und in die *EcoRI*- und *HindIII*-Schnittstelle des pGFy183 Vektor kloniert. Anschließend erfolgte die Transformation in den *E. coli*-Stamm Top10.

pSL45: Für die Erstellung des Plasmids pSL45 wurde der *mgIB*A-Lokus mit dem mutierten Gen *mgIA*-G21V mit den Endonukleasen *EcoRI* und *HindIII* aus dem Vektor pSB01 herausgeschnitten und in die *EcoRI*- und *HindIII*-Schnittstelle des pGFy183 Vektor kloniert. Nach der Klonierung erfolgte die Transformation in den *E. coli*-Stamm Top10.

pSL46: Das Plasmid pGFy183 wurde mit den Endonukleasen *EcoRI* und *HindIII* geöffnet und mit dem *EcoRI*- und *HindIII*-Fragment aus pSB02, dem *mgIB*A-Lokus mit dem mutierten Gen *mgIA*-T26/27, ligiert. Anschließend erfolgte die Transformation in den *E. coli*-Stamm Top10.

pSL49: Als Matrize für die Amplifizierung eines *mgIA*-Fragments mit den Oligonukleotiden oMgIA-att6 und oMgIA-att2, diente chromosomale *M. xanthus*-DNA. Das Fragment enthielt eine *XbaI*- und *HindIII*-Schnittstelle. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, mit *XbaI* und *HindIII* verdaut und in das Plasmid pSW105 kloniert, das mit den gleichen Endonukleasen behandelt wurde. Anschließend erfolgte die Transformation in den *E. coli*-Stamm Top10.

pSL51: Aus dem Plasmid pSL45 wurde der *mgIB*A-Lokus mit dem mutierten Gen *mgIA*-G21V mit den Endonukleasen *EcoRI* und *HindIII* herausgeschnitten und in die *EcoRI*- und *HindIII*-Schnittstelle des pBJ114 Vektor, für eine homologe Rekombination des Lokus in chromosomale *M. xanthus* DNA, kloniert. Nach der Klonierung erfolgte die Transformation in den *E. coli*-Stamm Top10.

pSL52: Der *mgIB*A-Lokus mit dem mutierten Gen *mgIA*-T26/27N wurde mit den Endonukleasen *EcoRI* und *HindIII* aus dem Plasmid pSL46 herausgeschnitten und in die *EcoRI*- und *HindIII*-Schnittstelle des pBJ114 Vektor, für eine homologe Rekombination des Lokus in chromosomale *M.*

xanthus DNA, kloniert. Anschließend erfolgte die Transformation in den *E. coli*-Stamm Top10.

pSL54: Als Matrize für die Amplifizierung eines GST-tag-*mgIA*-Fragments mit den Oligonukleotiden oMgIA-EcoRI und oMgIAstop-NotI diente chromosomale *M. xanthus*-DNA. Das Fragment enthielt eine EcoRI- und NotI-Schnittstelle. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, mit EcoRI und NotI verdaut und in das entsprechend geöffnete (EcoRI und NotI) GST-Überexpressionsplasmid pGEX4T-1 kloniert. Das MgIA-Überexpressionsplasmid pSL54 wurde in den *E. coli*-Stamm Rosetta2 transformiert.

pSL57: Für die Amplifizierung eines GST-tag-*mgIA*-G21V-Fragments mit den Oligonukleotiden oMgIA-EcoRI und oMgIAstop-NotI diente chromosomale *M. xanthus*-DNA als Matrize. Das entstandene *mgIA*-G21V-Fragment enthielt eine EcoRI- und eine NotI-Schnittstelle. Nach der Aufreinigung wurde es mit den entsprechenden Endonukleasen verdaut und mit dem EcoRI und NotI geschnittenden GST-Überexpressionsplasmid pGEX4T-1 ligiert. Das MgIA-G21V-Überexpressionsplasmid pSL57 wurde in Rosetta2-Zellen eingebracht.

pSL58: Als Matrize für die Amplifizierung eines GST-tag-*mgIA*-T26/27N-Fragments mit den Oligonukleotiden oMgIA-EcoRI und oMgIAstop-NotI diente chromosomale *M. xanthus*-DNA. Das Fragment enthielt eine EcoRI- und NotI-Schnittstelle. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, mit EcoRI und NotI verdaut und in das GST-Überexpressionsplasmid pGEX4T-1 kloniert, das mit den gleichen Endonukleasen behandelt wurde. Das MgIA-T26/27-Überexpressionsplasmid pSL58 wurde in den *E. coli*-Stamm Rosetta2 transformiert.

pSL59: Das *yfp*-Gen wurde unter Verwendung der Primer oYFP-1 und oCrGFPb von dem pSW-YFP-Plasmid amplifiziert. Das 5'-Ende des 777 bp-Fragment enthielt eine SpeI-Schnittstelle. Im Bereich des 3'-Ende wurde ein Polylinker amplifiziert, welcher eine 10 Aminosäuren lange linker-Sequenz und mehrere Restriktionsschnittstellen (*Xba*I, *Bam*HI, *Eco*RV, *Kpn*I und *Hind*III) beinhaltet. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, mit den Endonukleasen SpeI und HindIII geschnitten und mit dem *Xba*I und HindIII verdauten pSW105-

Plasmid ligiert. Durch diesen Klonierungsschritt wurde die ursprüngliche *Xba*I-Schnittstelle in pSW105 zerstört. Das erstellte YFP-Fusionsplasmid pSL59 wurde in Top10-Stamm transformiert.

pSL60: Das *mgIA*-Gen aus pSL35 wurde mittels *Bam*HI und *Hind*III Restriktionsverdau aus pSL35 extrahiert und mit der *Bam*HI- und *Hind*III-Schnittstelle in pSL59 ligiert. Das *yfp-linker-mgIA*-Fusionsplasmid wurde in den *E. coli*-Stamm Top10 transformiert.

pSL61: Das *mgIA*-G21V-Gen aus pSL55 wurde mit den Endonukleasen *Bam*HI und *Hind*III aus pSL55 herausgeschnitten und mit der *Bam*HI- und *Hind*III-Schnittstelle in pSL59 ligiert. Das *yfp-linker-mgIA*-G21V-Fusionsplasmid wurde in den *E. coli*-Stamm Top10 transformiert.

pSL62: Das *mgIA*-T26/27N-Gen aus pSL56 wurde mittels *Bam*HI und *Hind*III Restriktionsverdau aus pSL56 extrahiert und mit der *Bam*HI- und *Hind*III-Schnittstelle in pSL59 ligiert. Das *yfp-linker-mgIA*-Fusionsplasmid wurde in den *E. coli*-Stamm Top10 transformiert.

pSL113: Für die Herstellung eines P_{nat} -*romR*-*mDsRed*-Konstruktes (*romR*-Gen + Region 372 bp aufwärts von *romR*, fusioniert mit *mDsRed*-Gen) wurde das *mDsRed*-Gen mit den Oligonukleotiden oDsRed-1 und oDsRM-2 von dem Plasmid pmDsRed amplifiziert. Das *Xba*I-*Hind*III-Fragment aus pSH1208 wurde in den Klonierungsvektor pSK⁻ kloniert und anschließend mit den Endonukleasen *Eco*RV und *Hind*III behandelt, um das *gfp*-Gen durch das amplifizierte *mDsRed*-*Eco*RV-*Hind*III-Fragment zu ersetzen (pSL111). Anschließend wurde das neue *Xba*I-*Hind*III-Fragment aus pSL111 herausgeschnitten und in die *Xba*I-*Hind*III-Schnittstelle des pSWU30 Plasmids kloniert. Dieses P_{nat} -*romR*-*mDsRed*-Plasmid wurde in Top10-Zellen transformiert.

3.5.11 Konstruktion einer *romR* „in frame“ Deletionsmutante in *M. xanthus*

Die Konstruktion einer *romR* „in-frame“ Deletionsmutante erfolgte mittels zweifacher homologer Rekombination wie in (Shi *et al.*, 2008) beschrieben. Zunächst wurden die Oligonukleotide oDromR1 und oDromR2 verwendet, um in einer PCR das stromaufwärts liegende Fragment von *romR* zu amplifizieren.

Das Oligonukleotid oDromR1 enthielt eine *Xba*I Schnittstelle für die spätere Klonierung in das Plasmid pBJ114, während oDromR2 eine Region enthielt, welche komplement zu dem stromabwärts liegenden Fragment von *romR* war, das mit den Oligonukleotiden oDromR3 und oDromR4 amplifiziert wurde. oDromR3 wiederum codierte eine Region die komplement zu dem stromaufwärts liegenden PCR-Fragment war und oDromR4 enthielt eine *Hind*III Schnittstelle für die Klonierung in pBJ114. Im nächsten Schritt dienten die Produkte aus beiden unabhängigen PCRs als Templates in einer neuen PCR, unter Verwendung der Oligonukleotide oDromR1 und oDromR4, um so ein Fusionsprodukt aus beiden zu amplifizieren. Dieses wurde anschließend in den Vektor pBJ114 kloniert, welcher neben einer Resistenz gegen Kanamycin noch das *galk* Gen (Galaktose-Kinase) trägt. Diese Kinase phosphoryliert Galaktose und phosphorylierte Galaktose ist toxisch für *M. xanthus*. Der resultierende Vektor pSL37 wurde in *E. coli* Top10-Zellen transformiert und mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

Das Plasmid pSL37 wurde wie in 3.5.9 erläutert in den *M. xanthus* DK1622-Stamm transformiert. Nach einer erfolgreichen homologen Rekombination in einer der beiden flankierenden Regionen des Zielgens waren die Zellen fähig auf Kanamycin enthaltenen Platten zu wachsen. Neben der Selektion auf Kanamycin wurde eine PCR (oDromR5 und M13for bzw. oDromR6 und M13rev) durchgeführt um die korrekte Integration zu verifizieren.

Die so erzeugte Insertionsmutante wurde in 1% CTT-Medium bis zu einer OD_{550} von 0,5-0,7 kultiviert, 100 μ l und 200 μ l in 55°C warmen CTT-Softagar mit 1% Galaktose gegeben, gevortext und auf CTT-Agarplatten mit 1% Galaktose plattiert und bei 32°C für 4 Tage inkubiert. Galaktose-resistente und Kanamycin-sensitive Kolonien wurden selektiert und deren Genotyp bzw. die Deletion durch eine PCR mit den Oligonukleotiden oDromR1 und oDromR5 bestätigt.

3.5.12 Herstellung verschiedener Insertionsmutanten

Um bestehende Insertionsmutationen in verschiedene *M. xanthus* Stämme einzubringen wurde die mutierte chromosomale DNA wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben von entsprechenden Stämmen isoliert. Mittels

Elektroporation (Kap. 3.5.9) wurden jeweils 5 µg der isolierten chromosomalen DNA in die gewünschten Stämme eingebracht. Der Elektroporationsansatz wurde mit 4 ml 50°C warmen CTT-Softagar (1% CTT-Medium; 0,75% Agar) vermischt und sofort auf 1% CTT-Platten mit dem entsprechenden Antibiotika gegeben. Die Platten wurden für 4 bis 5 Tage bei 32°C inkubiert. Es wurden Zellen selektiert, die durch die Insertion der Antibiotikakassette in das gewünschte Gen auf der chromosomalen *M. xanthus* DNA fähig waren auf dem entsprechenden Antibiotika zu wachsen. Zusätzlich wurde eine Verifikations-PCR durchgeführt (Kap. 3.5.3) und die amplifizierten DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese auf ihre erwartete Größe bezüglich der Insertion überprüft.

3.6 Mikroskopie

3.6.1 Durchführung der Mikroskopie

Die Mikroskopierung wurde an einem Leica DM6000B Mikroskop, welches mit einem Leica Fluotar 40x/NA 0.75 Phasenkontrast und einem Leica Plan Apo 100x/NA 1.40 Phasenkontrast Ölimmersionsobjektiv (Leica, Wetzlar) ausgestattet war, durchgeführt. Als UV-Lichtquelle diente die Kompaktlichtquelle EL6000 von Leica (Wetzlar). Die Bilder wurden mit der Leica DFC 350FX Kamera oder der Photometrics® Cascade II 1024 Kamera aufgenommen. Die Bildaufnahmen erfolgten mit dem Leica FW4000 Programm oder dem Image-Pro® 6.2 Programm (MediaCybernetics). Für die Betrachtung von GFP-Fusionsproteinen und Fluorescein-konjugierter Antikörper wurde der Leica GFP Filter (Ex 450-490 nm, Em 500-550 nm) verwendet. YFP-Proteine wurden mit dem Leica YFP Filter (Ex 490-510 nm, Em 520-550 nm) betrachtet. Proteine fusioniert mit mDsRed und Cy3 gefärbte Zellen wurden mit dem Leica Y3 Filter (Ex 530-560 nm, Em 570-650 nm) visualisiert. Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten bei 10-100% UV-Lichtintensität, einem 1- bis 3-fachen Kameraverstärkungsfaktor, einer Auflösung von 1x1 und einer Belichtungsdauer von 100 bis 600 Millisekunden. Von den Zellen wurden jeweils Phasenkontrast- und Fluoreszenzbilder erstellt. Die Bilder wurden anschließend in dem Image-Pro® Analyzer 6.2 Programm (MediaCybernetics), dem Metamorph 7.0r2 Programm (Visitron Systems) und/oder dem Adobe

Photoshop CS 2 Programm bearbeitet und in Adobe Illustrator CS 2 (Adobe Systems, Inc.) zusammengestellt.

3.6.2 Vorbereitung der Proben für die Zeitrafferaufnahmen

Die zu untersuchenden *M. xanthus* Stämme wurden wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben in 1% CTT-Medium inokuliert und bis zu einer OD_{550} von 0.7-0.9 kultiviert. Jeweils 5 μ l der Flüssigkultur wurden direkt auf einen Objektträger getropft, mit einer dünnen 1,5 % Agarschicht bedeckt war. Der 1,5 % Agar wurde zuvor in Wasser gelöst, aufgekocht und anschließend mit den Komponenten des „A50-Starvationbuffer“ (10 mM MOPS, pH 7,2; 10 mM $CaCl_2$; 10 mM $MgCl_2$; 50 mM NaCl) versehen. Der Objektträger mit der Zellsuspension wurde je nach verwendeten Objektiv sofort mit einem Deckglas bedeckt und für ungefähr 20 bis 30 Minuten bei 25°C in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Petrischale im Dunkeln inkubiert.

3.6.3 Anfertigung von Zeitrafferaufnahmen

Die Zellproben wurden wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben behandelt und anschließend unter dem Mikroskop betrachtet. In der verdunkelten Plexiglaskammer (Werkstatt FB Biologie, Marburg), welche den Objektisch umschloss, wurde die Luftfeuchtigkeit mithilfe feuchter Tücher, erhöht, um optimale Bedingungen für die Untersuchung der Zellbewegung und der Dynamik verschiedener Fusionsproteine innerhalb der Zelle zu erhalten.

Für die Ermittlung der Richtungswechselperiode und der Bewegungsgeschwindigkeit erfolgte eine Phasenkontrastaufnahme der Zellen mit dem 40x oder 100x Leica Objektiv für insgesamt 15 Minuten alle 30 Sekunden. Anschließend wurden die Bilder in Metamorph 7.0r2 visualisiert und analysiert. Um zu gewährleisten, dass nur Zellen, welche sich mit A-Bewegungssystem fortbewegen, untersucht werden, wurden nur die Richtungswechsel von Zellen gezählt, welche sich mindestens eine Zelllänge von anderen Zellen entfernt bewegten. Ebenso wurde verfahren, um die Bewegungsgeschwindigkeit von Zellen mit dem „object track tool“ von Metamorph 7.0r2 zu erfassen.

Für die Untersuchung der Dynamik verschiedener Proteine, fusioniert zu Fluoreszenzproteinen, wurden alle 30 Sekunden Fluoreszenz- und Phasenkontrastbilder von den zu untersuchenden Zellen über einen Zeitraum von 15 Minuten erstellt. Wie zuvor beschrieben wurden nur solche Zellen betrachtet, welche sich mit dem A-Bewegungssystem fortbewegen. Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten bei 10% UV-Lichtintensität und einer Belichtungsdauer von ungefähr 150-450 Millisekunden. Anschließend wurde von den digitalen Fluoreszenzbildern die Fluoreszenzsignalintensität mit der Metamorph „region measurement tool“ Funktion quantifiziert. Hierzu wurden Regionen um die Fluoreszenzsignale an den Zellpolen definiert und deren „integrierte Intensität“ gemessen. Identisch große Regionen innerhalb der Zelle dienten der Berechnung der Hintergrundsignale, die von den ermittelten Werten subtrahiert wurden. Die integrierte Intensität ist definiert als Summe der Intensitätswerte aller Pixel innerhalb der gewählten Region. Diese Form der Quantifizierung wurde gewählt, um Größenunterschiede bezüglich der Ansammlung von Fluoreszenzsignal an den Zellpolen zu berücksichtigen. Für die Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen, welche in der gesamten Zelle verteilt lokalisiert sind, wurde die Metamorph „linescan tool“ Funktion verwendet. Hierzu wurde mit dem Metamorph Programm zunächst eine Linie durch die gesamte Zelllänge gezogen und daraufhin die mittlere Graustufen Intensität entlang dieser Linie ermittelt. Anschließend wurde die ermittelte mittlere Graustufen Intensität in einem Graphen dargestellt.

3.6.4 Anfärben von Typ-IV-Pili

Um den vorderen, Typ-IV-Pili tragenden Zellpol (Mignot *et al.*, 2005), besonders in bewegungsunfähigen Zellen, bestimmen zu können, wurden die Zellen und deren Pili mit dem Cy3-Farbstoff von GE-Healthcare (München) angefärbt. Der Cy3-Farbstoff (orange-fluoreszierendes Cyanin) ist ein monofunktionelles NHS (N-Hydroxisuccinimid)-Ester, welches Strukturen mit freien Aminogruppen bindet und anfärbt. Für die Färbung der Zellen wurde das Protokoll von (Skerker & Berg, 2001) modifiziert. *M. xanthus* Zellen wurden in 1% CTT-Medium bis zu einer optischen Dichte (OD_{550}) von 0,5 bis 0,9 kultiviert und anschließend bei 13000 rpm 5 Minuten lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zentrifugat mit 1% CTT-

Medium auf eine kalkulierte OD₅₅₀ von 7 resuspendiert. Von den verschiedenen Zellsuspensionen wurden jeweils 3 mal 20 µl auf 1,5% CTT-Agarplatten getropft. Die Platten wurden mit der Agarseite nach unten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bei 32°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit einer Impföse von der Platte abgenommen und in 100 µl Färbepuffer (50 mM KPO₄, pH 8,0; 5 mM MgCl₂; 25 µM EDTA) durch sanftes Schütteln resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei 5000 rpm für 3 Minuten abzentrifugiert und das Zentrifugat durch sanftes Schütteln in 500 µl Färbepuffer aufgenommen. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt und währenddessen das Pulver eines Cy3 Vial (GE-Healthcare) in 250 µl Färbepuffer gelöst. Nach dem letzten Waschschrift wurden die abzentrifugierten Zellen vorsichtig in 50 µl Cy3-Farbstoff resuspendiert und für 1,5 Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut, wie zu vor beschrieben, dreimal mit Färbepuffer gewaschen, beim letzten Waschschrift in 50 µl Puffer aufgenommen und 5 µl dieser gefärbten Zellsuspension auf einen Objektträger getropft, mit einem Deckglas bedeckt und unter dem Mikroskop betrachtet. Von den Zellen wurden Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen erstellt und in den oben angeführten Programmen bearbeitet und ausgewertet.

3.6.5 Immunfluoreszenz Mikroskopie

Für die Lokalisierung von nativen Proteinen in *M. xanthus*-Stämmen mittels Immunfluoreszenz nach (Mignot *et al.*, 2005) wurden die Zellen wie in Kapitel 3.4.2 erläutert in 1% CTT-Medium kultiviert. Danach wurden je 10 µl der Zellsuspension mit 2,6% Paraformaldehyd und 0,008% Glutaraldehyd für 20 Minuten auf Poly-L-Lysin-behandelten (Sigma-Aldrich, Steinheim) diagnostischen Objektträgern mit zwölf Vertiefungen (Thermo Scientific, Bonn) fixiert. Daraufhin wurden die Zellen mit 0,2 µg/ml Lysozym (Sigma-Aldrich, Steinheim) für 4 Minuten permeabilisiert, für 20 Minuten in PBS-Puffer (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) mit zusätzlich 2% BSA (Bovines Serum Albumin) geblockt und über Nacht mit Kaninchen-Anti RomR Antikörpern (1:200), in PBS-Puffer mit 2% BSA bei 4°C inkubiert. Bevor die Proben mit einem Fluorescein-konjugierten Sekundär-Antikörper (Thermo Scientific) behandelt wurden, erfolgten zehn Waschschriffe mit PBS-Puffer. Der

Sekundär-Antikörper wurde 1:80 in PBS-Puffer mit 2% BSA verdünnt und die Zellen bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zehnmals mit PBS-Puffer gewaschen und dann mit dem „Slow Fade Anti Fade“ Reagenz von Molecular Probes (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben behandelt. Der Objektträger wurde mit einem großen Deckglas versehen und die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Es wurden sowohl Fluoreszenzbilder wie auch Phasenkontrastaufnahmen angefertigt und in den zuvor beschriebenen Programmen betrachtet und analysiert.

3.6.6 Dekonvolutions-Mikroskopie

Für die Darstellung von Fluoreszenzsignalen innerhalb der Zelle wurde das 3D-Dekonvolutions-Programm von Image-Pro® 6.2 (MediaCybernetics) verwendet. Zunächst wurden die zu untersuchenden Zellen wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben kultiviert und anschließend 5 µl auf einen Objektträger getropft und sofort mit einem Deckglass bedeckt. Nach ca. 15 Minuten wurden die Zellen, unter Verwendung der jeweiligen Fluoreszenz-Filter, im Mikroskop betrachtet. In einem Abstand von 0,1 µm wurden 40 Fluoreszenzbildaufnahmen durch das Zellvolumen (Z-Ebene) hindurch angefertigt und mit der Deconvolution-Funktion des Sharp-Stack Programms (Image-Pro) überarbeitet, um die Unschärfen, die zum Beispiel durch eine ungewollte Anregung der Zellen außerhalb des Fokusses entstanden sind, zu beheben. Die 3D-Blind-Deconvolution-Funktion verwendet hierfür einen „Maximum Likelihood“. Die Darstellung und weitere Analysen der 3D-Bilder erfolgte mit dem 3D-Constuctor von Image-Pro®.

3.7 Biochemische Methoden

3.7.1 Überproduktion und Aufreinigung verschiedener MglA Proteine

Für die Überexpression von *mgIA*, *mgIA-G21V* und *mgIA-T26/27N* wurden die Plasmide pSL54, pSL57 bzw. pSL58 verwendet. Die Plasmide enthielten neben dem jeweiligen Gen einen Tac-Promotor (pGEX Vektor) für eine optimale Expressionsinduktion. Vor dem Startkodon der verschiedenen *mgIA*-Sequenzen befand sich das Gluthione S-transferase (GST) Gen für die spätere Proteinaufreinigung. Die Überexpression wurde in Rosetta2

durchgeführt, da dieser *E. coli*-Stamm für die Überproduktion von Proteinen optimiert ist. Zusätzlich enthielt dieser Stamm das Plasmid pRARE2, welches für sieben, selten in *E. coli* vorkommende, Kodon tRNAs codiert. In diesen Stamm wurden die Plasmide pSL54, pSL57 bzw. pSL58 mittels Elektroporation transformiert. Für die Expression wurde eine Vorkultur bei 37°C, über Nacht in LB-Medium mit 0,2% Glukoselösung und Antibiotikum (50 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol) angesetzt. Von dieser Vorkultur wurde dann eine 100 ml Kultur, welche das gleiche Medium enthielt, angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bei 37°C und 220 rpm angezogen. Für die Induktion der Expression wurde eine 0,1 mM IPTG-Endkonzentration hinzugegeben und die Kultur bei 18°C, 230 rpm für 20 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4700 rpm und 4°C für eine halbe Stunde abzentrifugiert, das Zentrifugat in 10 ml nativem Lysepuffer (200 mM NaCl₂; 50 mM Tris-Cl; 1 mM DTT; mit TrisCl auf pH 8) mit Proteinase Inhibitor Complete ohne EDTA (Roche, Mannheim) aufgenommen und die Zellen insgesamt dreimal in einem French-Press-Zylinder (MPI, Marburg) aufgeschlossen. Das entstandene Zelllysat wurde bei 4700 rpm und 4°C für eine halbe Stunde zentrifugiert. Der Zellüberstand wurde abgenommen, mit 5-fach SDS-Ladepuffer versetzt und auf das Vorhandensein der Zielproteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft. Die löslichen Zellfraktionen wurden jeweils mit 500 µl GST-Bind Agarose (Novagen, Darmstadt) für eine Stunde bei Raumtemperatur, leicht schwenkend inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf eine Poly Prep Chromatographie Säule (BioRad, München) gegeben, welche zuvor mit Lysepuffer äquilibriert wurde. Der Durchfluss wurde aufbewahrt und die Säule zweimal mit Wasch-Puffer (200 mM NaCl₂; 50 mM Tris-Cl; 1 mM DTT; mit TrisCl auf pH 8) mit Proteinase Inhibitor Complete ohne EDTA (Roche, Mannheim) gewaschen. Die GST-Proteine wurden in 6 Elutionsschritten mit jeweils 600 µl Elutions-Puffer (10 mM reduziertes Glutathion, 200 mM NaCl₂; 50 mM Tris-Cl; 1 mM DTT; mit TrisCl auf pH 8) mit Proteinase Inhibitor Complete ohne EDTA (Roche, Mannheim) eluiert. Die verschiedenen Durchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktionen dieser Aufreinigung wurden auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die einzelnen Elutions-Fraktionen wurden gegebenenfalls vereint und gegen 20 mM Tris-Cl pH 7,6; 50 mM NaCl₂, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT dialysiert. Anschließend

erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem Bradford-Test, und wenn erforderlich, wurden die Proben mithilfe von Millipore Filtersäulen MWCO 10 kDa (Millipore, Eschborn) auf 1 mg/ml Protein ankonzentriert.

3.7.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Protein-Konzentrationen erfolgte mit Bio-Rad Protein-Assay (Bio-Rad, München). Das Prinzip beruht auf der Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Zu jedem Testansatz wurde, wie in der folgenden Tabelle 7 beschrieben, zuerst die entsprechende Menge Wasser und 200 μ l Bradford-Reagenz, und dann die Probe bzw. der Proteinstandard (Rinderserumalbumin) gegeben. Die Ansätze wurden gemischt und für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Extinktion bei 595 nm mit einem Ultrospec 2100 pro Spektrometer der Firma Amersham Bioscience (München), woraus durch Vergleich mit der Standardkalibrierungsgeraden die Proteinkonzentrationen errechnet werden konnten.

Tabelle 7: Proteinbestimmung.

1. Wasser	800 μ l	...	700 μ l	780 μ l
2. Bradford-Reagenz	200 μ l	...	200 μ l	200 μ l
3. Probe bzw. Standard (100 μ g/ml BSA)	0 μ l BSA	...	100 μ l BSA	20 μ l Probe

3.7.3 Protein-Auftrennung: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden je nach Molekulargewicht der Proteine 14% oder 16%ige Lämmli Gele (Laemmli, 1970) angefertigt. Die Mini-Protein-Gele wurden wie in Tabelle 8 beschrieben hergestellt und anschließend in eine Mini-Protein 3 Cell Elektrophoresekammer (BioRad, München) gespannt, welche mit 1-fachen TGS-Elektrophorese-Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS; pH 8,3) befüllt wurde. Die zu untersuchenden Proteinproben wurden in 5-fachen Ladepuffer (50% Glycerol; 250 mM Tris-HCl pH 6,8; 10 mM EDTA; 10% SDS; 0,5 M DTT; 1% Bromphenol-Blau) aufgenommen welcher zusätzlich Proteinase Inhibitoren

enthielt (2% Mercaptoethanol; 5,5 µg/ml Leupeptin; 0,7 µg/ml Pepstatin; 0,6 mM PMSF), bei 99°C 10 Minuten gekocht und danach kurz abzentrifugiert. Die Gele wurde mit 12 bis 20 µl Probe und 6 µl Page-Ruler Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) beladen. Bis zum Einlaufen der Proteinproben in das Trenngel wurde die Elektrophorese bei 70 Volt und dann später bei 150 Volt durchgeführt. Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau (Sambrook *et al.*, 1989). Die Gele wurden zur Entfernung von nicht gebundenen Farbstoffen in der Mikrowelle drei bis fünfmal in Wasser aufgeköcht, wobei das Wasser nach jedem Aufkochschritt gewechselt wurde. Anschließend wurden die Gele eingescannt und bei 75°C unter Vakuum 5 bis 6 Stunden getrocknet.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Mini-Protein-Gele nach Lämmli.

Trenngel 14% (16%) (für 2 Gele)	Volumen
1,5 mM Tris-HCl, pH 8,8	2,5 (2,5) ml
40% Acrylamid/Bisacrylamid (37:1)	3,5 (4) ml
Wasser, ad 10 ml	4 (3,5) ml
TEMED	7 (7) µl
Ammoniumpersulfat (APS) 10%	60 (60) µl
Sammelgel 4% (für 10 Gele)	
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
40% Acrylamid/Bisacrylamid (37:1)	1 ml
Wasser, ad 10 ml	6,5 ml
TEMED	6 µl
Ammoniumpersulfat (APS) 10%	12 µl

3.7.4 Nachweis von Proteinen durch Western Blot Analyse

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden derart in 5-fachen Probenpuffer mit Proteinase-Inhibitor (2% Mercaptoethanol; 5,5 µg/ml Leupeptin; 0,7 µg/ml Pepstatin; 0,6 mM PMSF) aufgenommen, dass zwischen 5 µg und 15 µg Protein auf das entsprechende SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen werden konnte. Es erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung wie in 3.7.2 beschrieben. Die Proteine von dem ungefärbten SDS-Gel wurden in

einer Hoefer TE 77 semi-dry-transfer-unit-Blot Apparatur (Amersham, Freiburg) bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Membran für 2 Stunden auf eine Nitrocellulose Membran (Schleicher und Schueller, Dassel) mit einer Porengröße von 0,2 µm übertragen. Als Transferpuffer wurde ein diskontinuierliches Tris/Glycin-Puffersystem nach Tabelle 9 verwendet. Die freien Bindestellen der Membran wurden über Nacht bei 4°C in TTBS-Trockenmilch-Lösung (0,05% Tween 20; 20 mM Tris-HCl; 137 mM NaCl₂; 5% Trockenmilchpulver; pH 7) unter leichtem Schütteln abgesättigt. Es wurde zweimal 5 Minute mit TTBS-Puffer unter leichtem Schütteln gewaschen. Anschließend wurde die Membran 2 Stunden bei 4°C in einem Gefäß mit dem Erstantikörper (Kaninchen-Serum oder monoklonaler Maus-anti-GFP-Antikörper, Roche), 1:500 bis 1:8000 verdünnt in TTBS-Puffer mit 2% Trockenmilch, inkubiert. Nicht gebundene Antikörpermoleküle wurden danach durch zweimaliges Waschen der Membran in TTBS-Puffer für jeweils 5 Minuten entfernt. Im Anschluß wurde erneut für 15 Minuten mit TTBS-Puffer gewaschen. Die nachfolgende Inkubation mit einem polyklonalen Ziege-anti Kaninchen oder polyklonalen Kaninchen-anti Maus Immunoglobulin HRP konjugierter Antikörper (Perbio Science, Bonn bzw. Dako, Dänemark), 1:15000 bzw. 1:2500 verdünnt in 2% Trockenmilch-TTBS-Lösung, erfolgte für 1 Stunde bei 4°C unter leichtem Schwenken. Nach einmal 15-minütigem und viermal 5-minütigem Waschen mit TTBS-Puffer, wurde die Membran für eine Minute mit dem Super-Signal West Pico Chemiluminescent Substrat-Kit (Perbio Science, Bonn) nach Herstellerangaben behandelt. Zuletzt erfolgte die Exposition eines CL-XPosure™ Röntgenfilms (Perbio Science, Bonn), wodurch die Chemilumineszenzsignale der Membran auf dem Röntgenfilm nach dessen Entwicklung durch schwarze Banden sichtbar wurden.

Tabelle 9: Transferpuffer für Western-Blots.

Membranseite (Anode)		Gelseite (Kathode)	
Chemikalien pro Liter H ₂ O	Endkonzentration	Chemikalien pro Liter H ₂ O	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%

3.7.5 GTP Bindungsversuch/ GTPase Aktivierungsversuch

Die zuvor aufgereinigten Proteine, MglA, MglA-G21V und MglA-T26/27N (Kapitel 3.7.1) wurden auf ihre Fähigkeit getestet GTP zu binden. Hierzu wurde jeweils 50 μM aufgereinigtes Protein in GTP-Bindungspuffer (50 mM Tris-Cl pH 7,6; 50 mM NaCl_2 , 5 mM DTT, 20 mM EDTA) mit 0,5 μl radioaktiv-markierten alpha-GTP (1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$; Hartmann, Braunschweig) für 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in „kaltem“ Bindungspuffer (50 mM Tris-Cl pH 7,6; 50 mM NaCl_2 , 5 mM DTT, 20 mM EDTA) mit 5 mM MgCl_2 für die Stabilisierung der alpha-GTP-Bindung, verdünnt und über 25 mm Nitrocellulose Filtermembranen NC 45 (Hartenstein, Würzburg) abgefiltert. Die Filtermembranen wurden dreimal mit „kaltem“ GTP-Bindungspuffer mit 5mM MgCl_2 gewaschen, an der Luft getrocknet und die Radioaktivität des alpha-GTPs, welches an die Proteine gebunden hat, mittels eines Szintillationszählers („Counts per minute“, cpm) nachgewiesen.

4 Ergebnisse

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Mechanismus, welcher die Zellen befähigt die Polarität der A-Bewegungsmaschinerie während eines Richtungswechsels zu ändern. Hierzu wird zunächst das für das A-Bewegungssystem essentielle Protein RomR näher betrachtet. Neben RomR wird das Protein MglA in dieser Arbeit behandelt. MglA ist vermutlich eine kleine GTPase der Ras/Rac/Rho Superfamilie. In der Literatur wird beschrieben, dass MglA in die Regulierung der zellulären Richtungswechsel involviert ist.

Aus diesem Grund befasst sich der Ergebnisteil zunächst mit der Analyse des RomR Proteins (Kap. 4.1) und anschließend mit der Untersuchung des MglA Proteins (Kap. 4.2).

4.1 RomR („required for motility response regulator“) Protein

4.1.1 Untersuchung der RomR Lokalisierung in *M. xanthus* Zellen

Der Response Regulator RomR ist essentiell für die Fortbewegung der Zellen mit Hilfe des A-Bewegungssystems. Diese Tatsache lässt spekulieren, dass die Lokalisierung des Proteins eine entscheidende Rolle hierbei spielt. Um die RomR Lokalisierung näher zu untersuchen, wurden *M. xanthus* Zellen verwendet (Tab. 2), welche ein *romR-gfp*-Fusionskonstrukt in der chromosomalen *M. xanthus* „phage Mx8-attB-site“ integriert haben. Unmittelbar vor der *romR*-Sequenz befindet sich die *romR*-Promotor-Region (*Pnat*), eine 372 bp große Sequenz stromaufwärts liegend von *romR*. Zunächst wurde die RomR-GFP Lokalisierung in Wildtyp-Zellen (SA2273) und in der *romR*-Mutante (SA2271) betrachtet. Wie bereits in Kapitel 2.7 erwähnt zeigen diese Stämme in Bewegungsanalysen (Kap. 3.4.4) auf 0,5%-CTT-1,5%-Agarplatten eine normale Bewegungsfähigkeit. Mit anderen Worten bewegen sich die Zellen des Stammes SA2273 (*romR*⁺, *romR-gfp*) und des Stammes SA2271 (*romR*⁻, *romR-gfp*) wie Wildtyp Zellen und sind eindeutig zu unterscheiden von der A-bewegungsunfähigen *romR*-Mutante SA1128 (Abb. 10). Der Defekt der *romR*-Mutante im A-Bewegungssystem äußert sich durch das Fehlen von vereinzelt Zellen am Kolonienrand wie sie bei Wildtyp Kolonien zu beobachten sind (Abb. 10). Ohne den näheren Kontakt zu anderen Zellen sind diese Zellen nicht fähig sich fortzubewegen. Jedoch die in Abbildung 10 dargestellte Kolonie des

Stammes SA2271 zeigt vereinzelte Zellen am Kolonienrand. Demnach ist das Fusionskonstrukt in der „phage Mx8 *attB*-site“ unter Kontrolle des *romR* Promotors voll funktionsfähig und zeigt keinen Einfluss auf die A-Bewegung in den SA2273 Zellen, welche neben dem RomR-GFP Protein ebenfalls das native RomR Protein enthalten (Abb. 10). Dies bestätigte auch die Messung der Bewegungsgeschwindigkeit der Stämme. Hierzu wurden in Zeitrafferaufnahmen nur solche Zellen beobachtet und deren Geschwindigkeit bestimmt, welche mindestens eine Zelllänge von der nächsten Zelle entfernt waren (siehe Kapitel 3.6.2). Durch das Einbringen des *romR-gfp* Fusionskonstruktes in die *romR*-Mutante sind die Zellen in der Lage sich mit wildtyp-ähnlicher (DK1622; 3,3 $\mu\text{m}/\text{min}$) Geschwindigkeit von 3,4 $\mu\text{m}/\text{min}$ vorwärts zu bewegen. Es konnte gezeigt werden, dass normale Mengen an RomR-GFP Protein in diesen Stämmen synthetisiert wurden, verglichen mit dem Level an RomR in Wildtyp Zellen (Leonardy *et al.*, 2007).

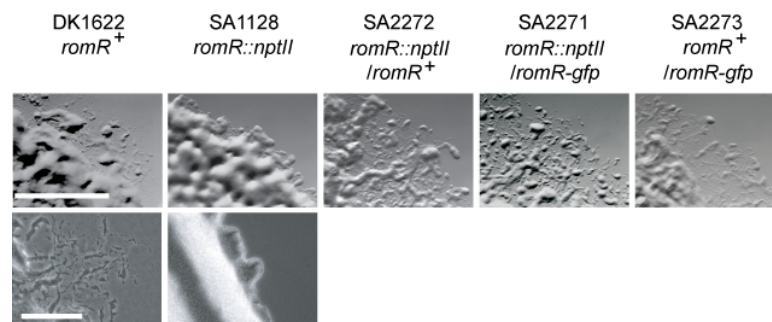


Abbildung 10: Bewegungsanalysen verschiedener *M. xanthus* Zellen. Die Abbildung stellt die Bewegungsphänotypen der verschiedenen Stämme mit den gekennzeichneten Genotypen dar. Die obere Reihe zeigt eine 50-fache Vergrößerung der jeweiligen Stämme, welche zuvor auf 0,5% CTT-1,5% Agar-Platten getropft, bei 32°C für 24 Stunden inkubiert und anschließend unter dem Stereomikroskop abgebildet wurden. Die untere Reihe zeigt eine 400-fache Vergrößerung der jeweiligen Zellen auf einem Objektträger mit einer dünnen Agarschicht aufgenommen an dem Inversen Mikroskop. Der weiße Balken auf der Abbildung des Wildtyp Stammes entspricht 5 mm (oben) bzw. 50 μm (unten).

Für die Betrachtung der RomR-GFP Lokalisierung wurden die jeweiligen Stämme über Nacht in 1% CTT-Medium kultiviert, 5 μl auf einen Objektträger getropft und mit einem Deckglas versehen. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Sowohl in SA2271 als auch in SA2273 lokalisiert RomR-GFP an den Zellpolen (Abb. 11A). Wobei ca. 90 Prozent der Zellen (Tab.10) eine polare asymmetrische RomR-GFP Lokalisierung aufweisen, ein Pol mit einer starken Ansammlung von RomR-GFP und ein Pol mit einer geringeren Ansammlung von RomR-GFP. Um die

polare asymmetrische Verteilung von RomR zu bestätigen wurde unter Verwendung von aufgereinigten RomR Antikörpern eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Hierzu wurden Wildtyp (DK1622) und *romR* Mutanten Zellen (SA1128) in 1% CTT-Medium kultiviert, die Zellen fixiert und nach Protokoll (Kap. 3.6.5) weiter behandelt. Abbildung 11B zeigt die Verteilung des nativen RomR Proteins in den genannten Zellen, wobei in der *romR* Mutante SA1128 kein Signal zu erkennen ist, da kein natives RomR Protein in diesem Stamm vorhanden ist. Nur DK1622 Zellen zeigen die polare asymmetrische Lokalisierung und verifizieren somit die polare asymmetrische Verteilung von RomR-GFP. Weiterhin wurde die sichtbare polare asymmetrische Lokalisierung innerhalb der Zellen durch die Quantifizierung der relativen Fluoreszenzlichtintensität mit der Metamorph „region measurement tool“ Funktion validiert (Daten nicht gezeigt).

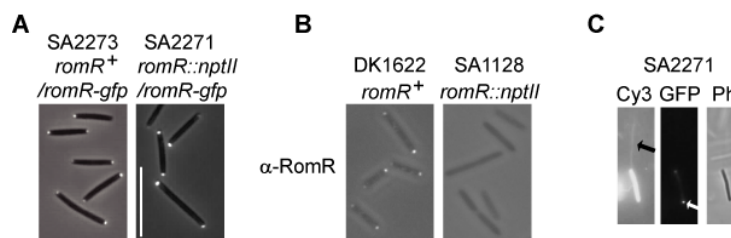


Abbildung 11: Lokalisierung von RomR. Die Zellen wurden jeweils bei einer 1000 fachen Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Abgebildet sind die Überlagerungsbilder des GFP Filters und der Phasenkontrastaufnahme. Die Aufnahmen erfolgten bei einer UV-Lichtintensität von 100% und einer Belichtungsdauer von 200 ms. **A**] Darstellung der RomR-GFP Lokalisierung in den gekennzeichneten Stämmen. Der weiße Balken auf der Abbildung des Stammes SA2271 entspricht 10 µm. **B**] Verteilung des RomR Proteins in fixierten Zellen der beschriebenen Stämme mittels Immunfluoreszenz. **C**] Anfärbung der SA2271 Zellen und deren Typ-IV-Pili mit dem Cy3-Farbstoff. Dargestellt ist jeweils die Bildaufnahme des Y3 Filters, des GFP Filters und die Phasenkontrastaufnahme der Zelle. Pfeile deuten auf die gefärbten Typ-IV-Pili. Detaillierte Beschreibung siehe Text.

Eine Typ-IV-Pili Anfärbung wurde angefertigt, um zu klären ob die stärkere Ansammlung von RomR-GFP sich am vorderen oder hinteren Pol der Zelle befindet. Typ-IV-Pili lokalisieren ausschließlich am vorderen Zellpol (Kaiser, 1979, Mignot *et al.*, 2005). Für die Färbung wurde ein Cy3-Farbstoff (orange-fluoreszierendes Cyanin) verwendet. Der Cy3-Farbstoff ist ein monofunktionelles NHS (N-Hydroxisuccinimid)-Ester, welches Strukturen mit freien Aminogruppen bindet und anfärbt. Für die Färbung der Zellen wurde das Protokoll von Skerker und Berg, 2001 modifiziert und wird in Kapitel 3.6.4 detailliert erläutert. Als Positivkontrolle für die Anfärbung diente der Wildtyp Stamm DK1622, als Negativkontrolle der Stamm DK10410, welcher nicht fähig

ist Typ-VI-Pili zu synthetisieren (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 11C ist die Anfärbung einer Zelle und somit auch der Typ-IV-Pili des Stammes SA2271 mit dem Cy3-Farbstoff dargestellt. Neben dem Leica Y3 Filter für die Veranschaulichung der Cy3-Färbung der Zelle wurde der Leica GFP Filter für die Visualisierung des RomR-GFP Proteins in diesen Zellen gewählt. Die stärkere Ansammlung von RomR-GFP befindet sich nicht an dem Typ-IV-Pili befindlichen Pol sondern an dem gegenüberliegenden und demnach dem hinteren Zellpol. Dieses Ergebnis konnte in 88% der angefärbten Zellen (N=32 Zellen) beobachtet werden.

4.1.2 Betrachtung der RomR-GFP Lokalisierung während der zellulären Fortbewegung

Die bisher beschriebene Lokalisierung von RomR wurde ausschließlich in Zellen betrachtet, welche aufgrund der Oberflächenbeschaffenheit der Objektträger nicht bewegungsfähig waren oder wie im Falle der Immunfluoreszenz fixiert waren. Um eine Vorstellung zu bekommen wie sich RomR-GFP während der zellulären Fortbewegung innerhalb der Zellen verhält und um direkt nachweisen zu können, dass RomR-GFP hauptsächlich am hinteren Pol der Zelle lokalisiert, wurden Zeitrafferaufnahmen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in 1% CTT-Medium über Nacht kultiviert, auf mit 1,5% Agar beschichtete Objektträger getropft und wie in Kapitel 3.6.2 und 3.6.3 erläutert weiterbehandelt. Zunächst wurde eine Zelle betrachtet, welche eine Kopie des *romR*-Gens, fusioniert mit dem *gfp*-Gen (SA2271) enthält.

Die Darstellung des RomR-GFP Proteins erfolgte mit dem Leica GFP Filter bei einer UV-Lichtintensität von 10% und einer Belichtungsdauer von 200 Millisekunden. Diese Einstellungen ermöglichten es die RomR-GFP Lokalisierung innerhalb der Zelle und während der zellulären Fortbewegung über einen Zeitraum von ungefähr 10 Minuten zu beobachten. Alle 30 Sekunden erfolgte eine Aufnahme mit dem GFP Filter und parallel wurden Phasenkontrastbilder für die Abbildung der gesamten Zelle angefertigt. Betrachtet wurden ausschließlich Zellen, die mehr als eine Zelllänge von anderen Zellen entfernt waren, um sicherzustellen, dass diese Zellen sich mit dem A-Bewegungssystem vorwärts bewegen. Für eine übersichtlichere Darstellung wurde in Abbildung 12A die Überlagerung beider Bilder in

einminütigen Abständen gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die verstärkte Ansammlung von RomR-GFP permanent am hinteren Pol der Zelle lokalisiert ist, während die Zelle sich vorwärtsbewegt (in Richtung der Pfeile). In Abbildung 12B wurde die Quantifizierung (Kapitel 3.6.3) des relativen Fluoreszenzsignals an den beiden Polen über die Zeit von 6 Minuten in einem Graphen dargestellt. Abgesehen von kleineren Schwankungen, welche vermutlich auf die manuelle Fokussierung zurück zuführen sind, ist das RomR-GFP Signal am hinteren Pol (Abb. 12B, schwarze Rechtecke) konstant stärker als das am vorderen Pol (Abb. 12B, weiße Kreise). Dieses Ergebnis zeigte sich ebenfalls in anderen SA2271 Zellen (N=30), mit denen diese Zeitrafferaufnahmen und die darauf folgende Quantifizierung durchgeführt wurde (Daten nicht gezeigt). Ebenso verhielt es sich mit Zellen des Stammes SA2273, welche neben dem RomR-GFP Protein das native RomR Protein besitzen. Demnach lokalisiert RomR-GFP zum größten Teil am hintern Zellpol wenn sich die Zelle vorwärts bewegt.

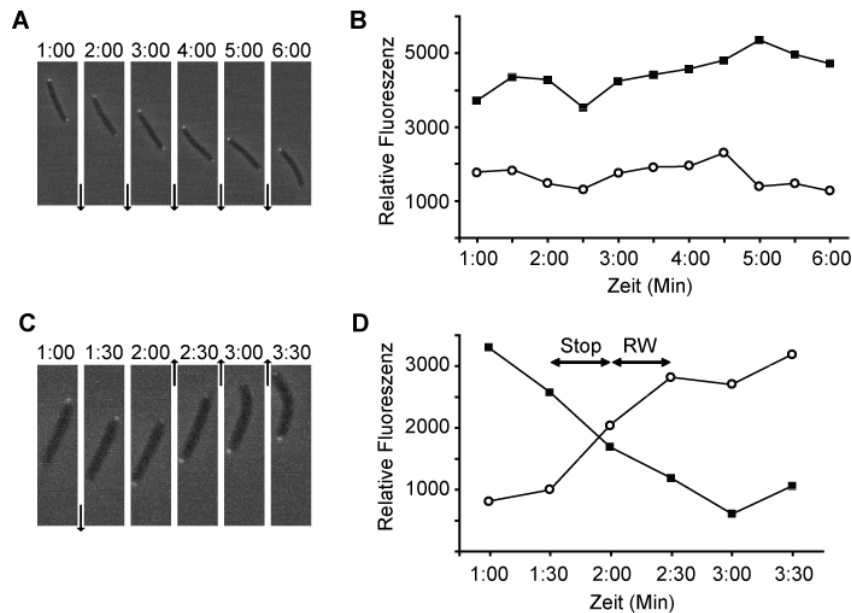


Abbildung 12: Lokalisierung von RomR-GFP während der zellulären Bewegung. Die dargestellten SA2271 Zellen wurden bei einer Belichtungsdauer von 200 ms und einer UV-Lichtintensität von 10% in Zeitrafferaufnahmen betrachtet. Die Pfeile zeigen die Bewegungsrichtung der Zellen an und über den Überlagerungsbildern der Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahme wird die Zeit in Minuten wiedergegeben in der die Aufnahmen durchgeführt wurden. **A**] Darstellung der RomR-GFP Lokalisierung in einer sich vorwärts bewegenden Zelle **B**] Gibt die quantifizierten relativen Fluoreszenzsignale der RomR-GFP Signale (Y-Achse) an beiden Polen der Zelle von Abbildung A über die Zeit (X-Achse) in einem Graphen wieder. Die schwarzen Rechtecke stellen die relative Fluoreszenzsignal des hinteren Pols und die weißen Kreise das Fluoreszenzsignal des vorderen Zellpols dar. **C**] Dynamische Lokalisierung von RomR-GFP während eines Richtungswechsels einer Zelle. **D**] Zeigt den Graph mit den quantifizierten relativen Fluoreszenzsignalen des RomR-GFP Proteins (Y-Achse) an beiden Polen der Zelle von Abbildung F] über die Zeit (X-Achse). Die schwarzen Rechtecke

stellen die relative Fluoreszenzsignal zunächst des alten hinteren Pol (1:00-2:00 min) und anschließend des neuen vorderen Zellpol (2:30-3:30 min) dar. Die weißen Kreise repräsentieren das Fluoreszenzsignal von RomR-GFP zunächst des alten vorderen Pols (1:00-2:00 min) und anschließend des neuen hinteren Zellpols (2:30-3:30 min). In dem Zeitraum von 1:30 min und 2:00 min stoppt die Zelle ihre Bewegung und nach 2:00-2:30 min vollzieht die Zelle einen Richtungswechsel (RW). Eine detaillierte Beschreibung ist im Text zu finden.

4.1.3 Dynamische Lokalisierung von RomR-GFP während eines Richtungswechsels in der zellulären Bewegung

In den vorherigen Abschnitten wurde beschrieben, dass RomR-GFP polar asymmetrisch in den Zellen verteilt vorliegt, wobei sich die stärkere Ansammlung des Fusionsproteins am hinteren Zellpol befindet wenn sich die Zelle vorwärts bewegt. Um zu erfahren ob sich die Lokalisierung des Proteins während eines für *M. xanthus* charakteristischen Richtungswechsel in der Bewegung ändert, wurden erneut Zeitrafferaufnahmen wie zuvor beschrieben durchgeführt. Hierbei wurde der Fokus auf Zellen gerichtet, welche einen Richtungswechsel während der Zellbewegung vollzogen. Für die Untersuchung wurde der Stamm SA2271 (*romR-*, *romR-gfp*) verwendet und die Lokalisierung von RomR-GFP wie zuvor erläutert analysiert.

Bei den insgesamt 32 betrachteten Richtungswechseln der Zellen änderte sich parallel mit der Bewegungsrichtung ebenfalls die RomR-GFP Verteilung innerhalb der Zellen. Die verstärkte Ansammlung von RomR-GFP wechselte von dem alten hinteren Pol zum neuen hinteren Zellpol (dynamische RomR Lokalisierung). Abbildung 12C zeigt eine Zelle, welche diesen Wechsel in der Bewegungsrichtung und der RomR-GFP Lokalisierung vollzieht. Für eine detaillierte Analyse der zeitlichen Abfolge dieser dynamischen RomR Lokalisierung erfolgte eine Quantifizierung der Fluoreszenzsignalstärke der RomR-GFP Ansammlung an beiden Zellpolen (siehe Graph, Abb. 12D). Bewegt sich die Zelle vorwärts so ist zunächst das RomR-GFP Signal am hinteren Pol (schwarze Rechtecke, Abb. 12D), verglichen mit dem am vorderen Zellpol (weiße Kreise, Abb. 12D) intensiver. Nach 1:30 Minuten beginnt die Signalstärke am hinteren Pol schwächer zu werden während die Intensität am vorderen Pol zunimmt. Die Verteilung des RomR-GFP Proteins an beiden Polen wird mehr oder weniger identisch und zeitgleich stoppt die Zelle ihre Vorwärtsbewegung (Abb. 12D, 2:00 Minuten). Während das Fluoreszenzsignal am alten hinteren Pol deutlich abnimmt, steigt die Intensität am alten vorderen

Pol stetig an und die Zelle vollzieht einen Richtungswechsel (Abb. 12D, 2:00-2:30 Minuten). Mit anderen Worten, die Zelle beginnt sich in die entgegengesetzte Richtung fortzubewegen (2:30 Minuten). Innerhalb von ca. 1:00-1:30 Minuten wechselt die starke RomR-GFP Ansammlung von einem Pol zum gegenüberliegenden. Diese zeitliche Abfolge der dynamischen RomR Lokalisierung konnte bei allen 32 untersuchten Richtungswechseln beobachtet werden. Dies ist ebenfalls der Fall in SA2289 Zellen ($\Delta pilA$, *romR::nptII*, *romR-gfp*), welche nur ein funktionsfähiges A-Bewegungssystem besitzen und sich nicht mittels des S-Bewegungssystems fortbewegen können (Daten nicht gezeigt; Tab. 10).

Um eine genauere Vorstellung von dem Mechanismus der dynamischen RomR Lokalisierung zu bekommen, wurde erneut RomR-GFP in dem Stamm SA2271 (*romR::nptII*, *romR-gfp*) in Zeitrafferaufnahmen betrachtet, wobei sowohl die Zellen als auch die dünne Agarschicht auf dem Objektträger mit 25 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol behandelt wurden. Chloramphenicol inhibiert die Proteinbiosynthese in den Zellen. Die dynamische RomR Lokalisierung kann demnach nur beobachtet werden, wenn der Mechanismus nicht auf Proteolyse von RomR an dem alten hinteren Zellpol und neuer Lokalisierung von *de novo* synthetisierten RomR am neuen hinteren Pol beruht, sondern auf einem Transfer von RomR von einem zum anderen Pol. Die Behandlung mit dem Antibiotikum zeigt weder eine Auswirkung auf das Bewegungsverhalten der Zellen und noch auf die dynamische RomR Lokalisierung (Daten nicht gezeigt). Demnach scheint die dynamische RomR Lokalisierung und die Richtungswechsel nicht über Proteolyse und *de novo* Synthese reguliert zu werden.

Tabelle 10: RomR-GFP Lokalisierung und Richtungswechsel in Zellen.

Stamm (Genotyp)		Bildaufnahmen ²	Zeitrafferaufnahmen ³		
	GFP Konstrukt ¹	% bipolar asymmetrisch/bipolar symmetrisch/andere	% verstärkte RomR Lokalisierung am hinteren Pol/vorderen Pol/symmetrische Ansammlung	RW der Zellen	RomR Wechsel während des RW
SA2273 (<i>romR</i> ⁺)	P _{nat} -RomR-GFP	90/10/0	100/0/0	30	30
SA2271 (<i>romR::nptII</i>)	P _{nat} -RomR-GFP	93/7/0	100/0/0	32	32
SA2058 (<i>romR::nptII</i>)	P _{pilA} -RomR-GFP	92/8/0	100/0/0	34	34
SA2289 (Δ <i>pilA</i> , <i>romR::nptII</i>)	P _{nat} -RomR-GFP	85/15/0	97/3/0	20	19
SA2070 (<i>frz</i> ^{lof})	P _{pilA} -RomR-GFP	99/1/0	100/0/0	0	NA ⁴
SA2066 (<i>frz</i> ^{gof})	P _{pilA} -RomR-GFP	56/44/0*	28/28/44	138	0
SA2268 (Δ <i>frzS</i>)	P _{nat} -RomR-GFP	90/10/0	100/0/0	34	34

Übersicht der RomR-GFP Lokalisierung in verschiedenen Mutanten in Zusammenhang gesetzt mit den Richtungswechseln (RW) dieser Zellen. Legende: ¹Die verschiedenen *romR-gfp* Fusionen wurden in die „phage Mx8 *attB*-site“ integriert und unter Kontrolle des *pilA* (P_{pilA}) oder des nativen *romR* Promotors (P_{nat}) exprimiert. ²Die RomR-GFP Lokalisierung wurde in jeweils 100 Zellen betrachtet und gezählt. ³Statistische Auswertung der dynamischen RomR-GFP Lokalisierung in Zeitrafferaufnahmen (alle 30 s ein Bild, insgesamt 10 min) und die Bestimmung der Richtungswechsel von 50 Zellen. ⁴NA=nicht anwendbar da die Zellen bewegungsunfähig sind. *50% der Zellen zeigen eine zusätzliche Ansammlung von RomR-GFP zwischen den Zellpolen.

4.1.4 Bestimmung der verantwortlichen Domänen für die RomR Lokalisierung in *M. xanthus* Zellen

Der Response Regulator RomR besteht aus zwei Domänen, einer N-terminalen konservierten Receiver Domäne und einer C-terminalen Output Domäne (Kap. 2). Um zu testen ob diese beiden Domänen eine entscheidende Rolle in der RomR Aktivität und Lokalisierung haben wurde das gesamte RomR Protein, die Receiver Domäne mit zusätzlich 24 Aminosäuren am C-Terminus (Kap. 2, Abb. 7A, Aminosäure 1-140 von RomR) und die Output Domäne (Kap. 2, Abb. 7A, Aminosäure 117-420 von RomR) jeweils von dem *pilA* Promotor in der *romR* Mutante exprimiert. Für die Untersuchung der Lokalisierung wurden die drei genannten Proteine zu GFP fusioniert und ebenfalls unter Kontrolle des *pilA* Promotors in der *romR* Mutante exprimiert. Western Blot Analysen zeigten, dass in den sechs erhaltenen Stämmen wildtyp-ähnliche Mengen an RomR Protein in der *romR* Mutante gebildet werden (Daten nicht gezeigt) (Leonardy *et al.*, 2007).

Um die Bewegungsfähigkeit dieser Stämme und somit die Aktivität der verschiedenen RomR Proteine zu überprüfen wurden Bewegungsanalysen durchgeführt. Zusätzlich wurden die zu untersuchenden Zellen, welche ein GFP Fusionsprotein enthielten, unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und Zeitrafferaufnahmen angefertigt (Kap.3.6.3). Das unter Kontrolle des *pilA* Promotors gebildete RomR Protein (Stamm SA2059) wie auch das RomR-GFP Protein (SA2058) können die Bewegungsfähigkeit der Zellen mittels des A-Bewegungssystems in der *romR* Mutante wiederherstellen und das RomR-GFP Protein zeigt die typische polare asymmetrische RomR Lokalisierung (Abb. 13A+B, Tab.10). Sowohl die Receiver Domäne (SA2244), als auch die Receiver Domäne fusioniert zu GFP (SA2259), zeigen dagegen keine Aktivität in der *romR* Mutante und diese Zellen sind nicht fähig sich mit dem A-Bewegungssystem fortzubewegen. Das Receiver-GFP Fusionsprotein verteilt sich homogen in der gesamten Zelle und ist nicht in der Lage an den Zellpolen zu lokalisieren (Abb. 13A+B; Tab. 11). Die Output Domäne alleine (SA2256) wie auch das Output-GFP Fusionsprotein (SA2260) komplementieren hingegen den *romR* Mutanten Phänotyp bezüglich der A-Bewegung. Diese Zellen können sich als einzelne Zellen vorwärts bewegen (Abb. 13A). Zusätzlich lokalisiert das Output-GFP Fusionsprotein polar asymmetrisch in den Zellen. Wobei in

Zeitrafferaufnahmen 88% der Zellen die vermehrte Ansammlung von Output-GFP am hinteren Zellpol aufweisen, während die restlichen 12% der Zellen diese am vorderen Pol zeigen (Tab. 11). Wird die Fähigkeit dieser Zellen (SA2256 und SA2260) untersucht Richtungswechsel während der zellulären Fortbewegung durchzuführen, wird deutlich, dass die Zellen sehr selten ihre Bewegungsrichtung ändern (Tab. 11). Zusätzlich werden diese Richtungswechsel nicht von einem Wechsel des Output-GFP Proteins von dem alten hinteren Pol zum neuen hinteren Zellpol begleitet (Tab. 11), wie es für das RomR-GFP Protein zu beobachten ist (SA2058). Demnach lokalisiert das Output-GFP Protein zwar an den Zellpolen ist jedoch ist nicht fähig eine dynamische Lokalisierung zwischen den Polen zu vollziehen, was wiederum einen Einfluss auf die Häufigkeit der Richtungswechsel der Zellen hat.

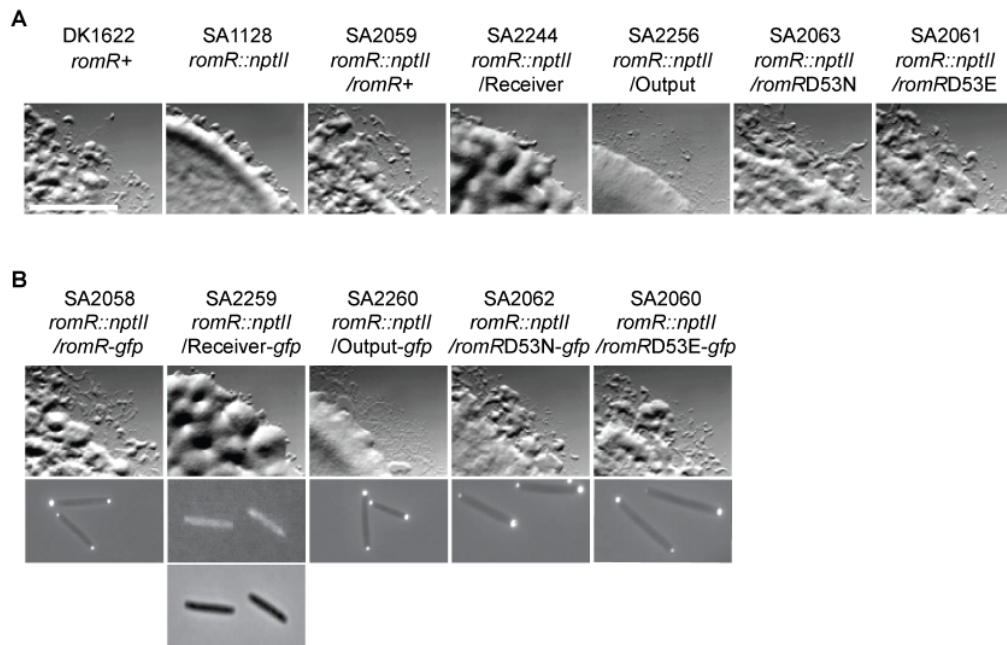


Abbildung 13: Bewegungsanalysen und RomR Lokalisierung. Dargestellt ist neben der Bewegungsanalyse verschiedener Stämme die Lokalisierung verschiedener RomR Proteine fusioniert zu GFP **A** | Stellt die Bewegungsphänotypen der verschiedenen Stämme mit den gekennzeichneten Genotypen dar. Gezeigt ist eine 50-fache Vergrößerung der jeweiligen Stämme, welche zuvor auf 0,5% CTT-1,5% Agar-Platten getropft, bei 32°C für 24 Stunden inkubiert und anschließend unter dem Stereomikroskop fotografiert wurden. Der weiße Balken auf der Abbildung des Wiltyp Stammes entspricht 5 mm. **B** | Die obere Reihe zeigt eine 50-fache Vergrößerung der angegebenen Stämme, welche wie in A | behandelt wurden. Die untere Reihe gibt eine 1000-fache Vergrößerung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop wieder. Die Bildaufnahmen erfolgten bei einer 100% UV-Lichtintensität und einer Belichtungsdauer von 200 ms. Dargestellt sind die Überlagerungsbilder des GFP Filters und der Phasenkontrastaufnahme. Eine detaillierte Erläuterung ist im Text zu finden.

Wie bereits beschrieben (Kap 2.7) besitzt das RomR Protein eine Receiver Domäne mit einer konservierten Aspartat Aminosäure an der Position 53 in der RomR Protein Sequenz. Es wurde beschrieben (Stock *et al.*, 2000), dass die Phosphorylierung dieser konservierten Aminosäure wichtig ist für die Aktivität der Response Regulator Proteine. Um auf genetischer Ebene zu testen ob die Phosphorylierung dieser Aminosäure einen Einfluss auf die RomR Aktivität und Lokalisierung hat, wurden zwei verschiedene *romR* Mutanten Gene unter Kontrolle des *pilA* Promotors in der *romR* Mutante exprimiert. In RomR^{D53N} wurde der Aspartatrest in RomR zu Asparagin substituiert. Diese Substitution unterbindet die Phosphorylierungsfähigkeit von Response Regulatoren. In RomR^{D53E} wurde der Aspartatrest zu Glutamat substituiert. In mehreren Response Regulatoren führt diese Substitution zu einer partiellen Imitation der strukturellen Konformation des phosphorylierten Proteins (Domian *et al.*, 1997). Für die Betrachtung der Lokalisierung dieser beiden Mutanten Proteine wurden zusätzlich RomR^{D53N}-GFP und RomR^{D53E}-GFP Proteine, welche in der *romR* Mutante unter der Kontrolle des *pilA* Promotors gebildet wurden, untersucht.

Durch Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass die genannten Proteine wildtyp-ähnliche Mengen RomR Protein in der *romR* Mutante bilden (Leonardy *et al.*, 2007). Zusätzlich komplementieren die verschiedenen RomR Proteine den A-Bewegungsdefekt der *romR* Mutante (Abb. 13A). Werden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, wird deutlich, dass RomR^{D53N}-GFP (SA2062) asymmetrisch an beiden Polen lokalisiert (Abb.13B), wobei sich die verstärkte Ansammlung von RomR^{D53N}-GFP am hinteren Zellpol befindet wenn die Zelle sich vorwärts bewegt (Daten nicht gezeigt; Tab.11). Im Gegensatz zu Zellen, welche das native RomR-GFP (SA2058) besitzen, vollziehen diese Zellen (SA2062) keine Richtungswechsel (Tab. 11) und RomR^{D53N}-GFP zeigt keine dynamische Lokalisierung zwischen den Polen (Tabelle 11). Zellen, welche das RomR^{D53E}-GFP Protein (Stamm, SA2060) beinhalten, lokalisieren ebenfalls polar asymmetrisch, mit der stärkeren Ansammlung des RomR^{D53E}-GFP Proteins am hinteren Pol, in sich bewegenden Zellen (Abb.13B; Tab.11). Jedoch verglichen mit Zellen des Stammes SA2058 (RomR-GFP) zeigen die Zellen 1,5 mal häufiger einen

Richtungswechsel (Tab. 11) und jeder dieser Richtungswechsel wird von einem Wechsel des RomR^{D53E}-GFP Proteins von dem alten hinteren Pol zum neuen hinteren Pol begleitet (Tab. 11).

Demnach ist die Phosphorylierung des Aspartatrestes wichtig für die Richtungswechsel der Zellen und ebenfalls für die dynamische RomR Lokalisierung zwischen den Polen. Das unterschiedliche Verhalten dieser beider Stämme bezüglich der Häufigkeit der Richtungswechsel deutet an, dass RomR^{D53E} die strukturellen Konformation des phosphorylierten RomR Proteins partiell imitiert und so die Richtungswechsel der Zelle beeinflusst.

4.1.5 Untersuchung der Abhängigkeit der dynamischen RomR Lokalisierung von dem Frz chemosensorischen System

Das Frz chemosensorische System reguliert die Frequenz der Richtungswechsel in *M. xanthus* Zellen (Kap. 2.6). Die Zellen einer *frzE::Tn5(Tet^r)*Ω231 Insertionsmutante wechseln nur sehr selten ihre Bewegungsrichtung und stellen somit ein inaktives Frz-System bezüglich der Richtungswechsel dar. Für eine vereinfachte Beschreibung wird diese Mutante im folgenden Text als Frz „loss of function“ (Frz^{lof}) Mutante bezeichnet. Hingegen wechseln die Zellen einer *frzCD::Tn5(Tet^r)*Ω224 Insertionsmutante ihre Richtung alle 1-2 Minuten (Blackhart & Zusman, 1985, Bustamante et al., 2004). Demnach besitzen diese Zellen ein konstitutiv aktives Frz-System und die Mutante wird in dieser Arbeit als *frz* „gain of function“ (*frz*^{gof}) Mutante angeführt. Der Zusammenhang von zellulären Richtungswechseln und dynamischer RomR Lokalisierung lässt vermuten, dass der Transfer des RomR Proteins von einem Pol zum anderen ebenfalls durch das Frz-System gesteuert wird. Um diese Annahme zu prüfen, wurden Plasmid Konstrukte mit *romR-gfp* in eine *frz^{lof}/romR::nptII* und eine *frz^{gof}/romR::nptII* Mutante eingebracht (Kap. 3.5.9) und unter Kontrolle des *pilA* Promotors exprimiert. Die Zellen der resultierenden Stämme SA2070 und SA2066 wurden mikroskopisch auf ihre RomR-GFP Verteilung in der Zelle und die Fähigkeit Richtungswechsel auszuführen, untersucht. Zellen des Stammes SA2070 (*frz^{lof}/romR::nptII, romR-gfp*), die sich vorwärts bewegen, weisen eine polare asymmetrische Verteilung von RomR-GFP auf mit einer verstärkten Ansammlung am hinteren Zellpol (Abb. 14; Tab. 10). Weiterhin zeigen die Zellen keinen Wechsel in ihrer

Bewegungsrichtung (Tab. 10) und RomR-GFP ist dauerhaft am hinteren Pol der Zelle lokalisiert und das Protein wird nicht von einem Pol zum anderen transferiert (Tab. 10). Demnach wird das Frz-System für die dynamische RomR Lokalisierung benötigt.

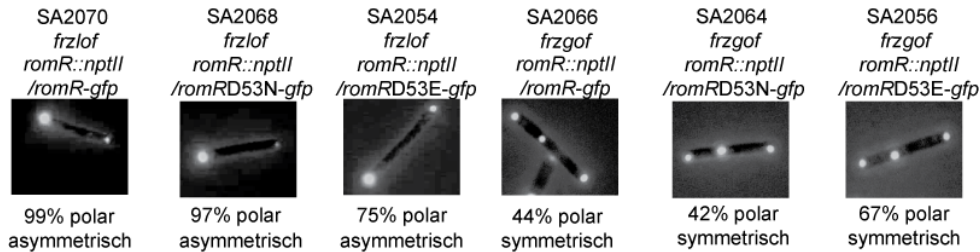


Abbildung 14: Lokalisierung verschiedener RomR-GFP Proteine. Darstellung der Lokalisierung verschiedener RomR Proteine fusioniert zu GFP in den gekennzeichneten Stämmen. Die Aufnahmen der Zellen wurden bei einer 1000-fachen Vergrößerung an dem Fluoreszenzmikroskop, bei einer 100% UV-Lichtintensität und einer Belichtungsdauer von 200 ms durchgeführt. Abgebildet sind die jeweiligen Überlagerungsbilder des GFP Filters und der Phasenkontrastaufnahme. Unter den Bildern ist die polare Verteilung der verschiedenen RomR-GFP Proteine in Prozent angegeben. Eine detaillierte Erläuterung der Lokalisierung ist im Text zu finden.

Dagegen lokalisiert RomR-GFP in der *frz^{gof}* Mutante (SA2066, *frz^{gof}/romR::nptII, romR-gfp*) vermehrt symmetrisch verteilt an beiden Zellpolen mit einer zusätzlichen Ansammlung von RomR-GFP zwischen den beiden Polen (Abb. 14; Tab. 10). Die Zellen wechseln die Richtung ihrer Bewegung alle 1-2 Minuten, wobei kein sichtbarer Transfer des RomR-GFP Proteins von dem alten hinteren Pol zum neuen hinteren Pol zu erkennen ist (Tab. 10). Die Lokalisierung des RomR-GFP Proteins in diesen Zellen ist gleichbleibend und verändert sich nicht während der Bewegung oder eines Richtungswechsels der Zellen. Dies wird bestätigt durch die durchgeführte Quantifizierungen der Fluoreszenzsignale in der Zelle (Daten nicht gezeigt).

4.1.6 Überprüfung der Phänotypen der RomR D53N und D53E Proteine in den *frz* Mutanten

In der *frz^{lof}* Mutante (SA2070) zeigt RomR-GFP keine dynamische Lokalisierung zwischen den beiden Polen (vergleiche Kap. 4.7; Tab. 10). Um auf genetischer Ebene zu testen ob das Frz-System die dynamische RomR Lokalisierung über die Phosphorylierung des Proteins reguliert, wurden Plasmide, welche die Sequenz für RomR^{D53N}-GFP und RomR^{D53E}-GFP kodieren, in die *frz* Mutanten eingebracht (Kap. 3.5.9). In der *frz^{lof}/romR::nptII* Mutante (SA2068) lokalisiert RomR^{D53N}-GFP deutlich asymmetrisch an beiden

Polen, mit der stärkeren Verteilung des Fusionsproteins am hinteren Zellpol (Abb. 14; Tab.11). Die Zellen vollziehen keinen Richtungswechsel und keinen dynamischen Wechsel des RomR^{D53N}-GFP Proteins zwischen den Polen (Tab. 11). Dagegen lokalisiert RomR^{D53E}-GFP polar asymmetrisch in 71% der Zellen einer *frz^{lof}* Mutante (SA2054), mit der vermehrten Ansammlung des Fusionsproteins am hinteren Pol, während in den verbleibenden Zellen RomR^{D53E}-GFP symmetrisch an beiden Polen verteilt vorliegt (Abb. 14; Tab. 11). Zusätzlich wechseln diese Zellen ähnlich häufig ihre Bewegungsrichtung wie die Wildtyp Zellen (Tab. 11). In Zellen, welche eine asymmetrische Lokalisierung zeigen, werden die Richtungswechsel von einem Transfer des RomR^{D53E}-GFP Proteins von dem alten hinteren Pol zum neuen hinteren Pol begleitet. In Zellen mit einer symmetrischen RomR^{D53E}-GFP Lokalisierung wird keine dynamische Lokalisierung zwischen den Polen beobachtet wenn die Zelle die Bewegungsrichtung wechselt (Tab. 11). Demnach befähigt das Vorhandensein von RomR^{D53E}-GFP in der *frz^{lof}* Mutante die Zellen dazu erneut ihre Bewegungsrichtung zu ändern. Mit anderen Worten kann in Zellen, die das RomR^{D53E}-GFP Protein besitzen, welche die strukturelle Konformation des phosphorylierten RomR Proteins partiell imitieren, die *frz^{lof}* Mutation bezüglich der Richtungswechsel umgangen werden. Dies deutet an, dass RomR stromabwärts des Frz-Systems agiert, um Richtungswechsel im A-Bewegungssystem einzuleiten und dass das Frz-System vermutlich die dynamische RomR Lokalisierung über die Phosphorylierung des Proteins reguliert.

In der konstitutiv aktiven *frz^{gof}* Mutante lokalisieren RomR^{D53N}-GFP und RomR^{D53E}-GFP ähnlich wie das native RomR-GFP Protein in dieser Mutante (vergl. Kap. 4.5). Sowohl RomR^{D53N}-GFP, als auch RomR^{D53E}-GFP lokalisieren vermehrt symmetrisch an beiden Zellpolen (42% bzw. 67% der Zellen), mit einer zusätzlichen Ansammlung von RomR-GFP zwischen den beiden Polen (Abb. 14; Tab. 11). Die Zellen der beiden Stämme (SA2064 und SA2056) wechseln die Richtung ihrer Bewegung alle 1-2 Minuten, wobei keine dynamische Lokalisierung der Proteine von dem alten hinteren Pol zum neuen hinteren Pol zu beobachten ist (Tab. 11). Die Lokalisierung der Proteine verhält sich wie die des RomR-GFP Proteins in der *frz^{gof}* Mutante (SA2066). In diesen

Zellen ist die Lokalisierung gleichbleibend und verändert sich nicht während der Bewegung oder eines Richtungswechsels der Zellen. Anzumerken ist, dass RomR^{D53E}-GFP häufiger eine symmetrische Lokalisierung in den Zellen (67%) aufweist verglichen mit RomR-GFP (44%, Tab. 11) in der *frz^{gof}* Mutante. Quantifizierungen der Fluoreszenzsignale in den jeweiligen Stämmen bestätigen die symmetrische Verteilung der verschiedenen Fusionsproteine in dieser Mutante (Daten nicht gezeigt). Vermutlich bewirkt die vermehrte symmetrische Verteilung der verschiedenen RomR-GFP Proteine in der *frz^{gof}* Mutante die erhöhte Richtungswechselfrequenz der Zellen und diese symmetrische Verteilung ist scheinbar unabhängig von dem Phosphorylierungsstatus des RomR Proteins.

Tabelle 11: RomR-GFP Verteilung und Richtungswechsel in verschiedenen Zellen.

Stamm (Genotyp)		Bildaufnahmen ²	Zeitrafferaufnahmen ³		
	GFP Konstrukt ¹	% bipolar asymmetrisch/bipolar symmetrisch/andere	% verstärkte RomR Lokalisierung am hinteren Pol/vorderen Pol/symmetrische Ansammlung	RW der Zellen	RomR- Wechsel während RW
SA2058 (<i>romR::nptII</i>)	P_{pilA} -RomR-GFP	92/8/0	100/0/0	34	34
SA2062 (<i>romR::nptII</i>)	P_{pilA} -RomR ^{D53N} -GFP	89/11/0	89/0/11	7	0
SA2060 (<i>romR::nptII</i>)	P_{pilA} -RomR ^{D53E} -GFP	88/12/0	100/0/0	45	45
SA2259 (<i>romR::nptII</i>)	P_{pilA} -Receiver-GFP	0/0/100% homogen	NA/NA/NA ²	NA ⁴	NA ⁴
SA2260 (<i>romR::nptII</i>)	P_{pilA} -Output-GFP	95/5/0	88/12/0	3	0
SA2070 (<i>frz^{lof}</i>)	P_{pilA} -RomR-GFP	99/1/0	100/0/0	0	NA ⁴
SA2068 (<i>romR::nptII/ frz^{lof}</i>)	P_{pilA} -RomR ^{D53N} -GFP	97/3/0	100/0/0	0	0
SA2054 (<i>romR::nptII/ frz^{lof}</i>)	P_{pilA} -RomR ^{D53E} -GFP	75/15/0	71/0/29	43	29
SA2066 (<i>frz^{gof}</i>)	P_{pilA} -RomR-GFP	56/44/0*	28/28/44	138	0
SA2064 (<i>romR::nptII/ frz^{gof}</i>)	P_{pilA} -RomR ^{D53N} -GFP	58/42/0*	30/28/42	130	0
SA2056 (<i>romR::nptII/ frz^{gof}</i>)	P_{pilA} -RomR ^{D53E} -GFP	33/67/0*	18/15/67	141	0

Übersicht der RomR-GFP Lokalisierung in verschiedenen Mutanten im Zusammenhang mit Richtungswechsel (RW) dieser Zellen.

Legende:¹Die verschiedenen *romR-gfp* Fusionen wurden in die „phage Mx8 *attB*-site“ integriert und unter Kontrolle des *pilA* (P_{pilA}) exprimiert.

²Die RomR-GFP Lokalisierung wurde in jeweils 100 Zellen betrachtet und gezählt. ³ Statistische Auswertung der dynamischen RomR-GFP Lokalisierung in Zeitrafferaufnahmen (alle 30 s ein Bild, insgesamt 10 min) und die Bestimmung der Richtungswechsel von 50 Zellen.

⁴NA=nicht anwendbar, da die Zellen bewegungsunfähig sind. *Diese 29 Richtungswechsel wurden in Zellen beobachtet, welche eine polare asymmetrische RomR Lokalisierung aufwiesen. Die verbleibenden 14 Richtungswechsel wurden von Zellen vollzogen, welche eine polar symmetrische RomR-GFP Verteilung zeigten. *50% der Zellen zeigen eine zusätzliche Ansammlung der RomR-GFP Proteine zwischen den Zellpolen.

4.1.7 Analyse der Lokalisierung von RomR und FrzS in *M. xanthus* Zellen

Die beiden Bewegungssysteme in *M. xanthus* arbeiten synergistisch, um eine Bewegungsenergie in dieselbe Richtung zu erzeugen (Kaiser & Crosby, 1983a). Demnach müsste die Polarität der beiden Bewegungsmaschinerien während eines zellulären Richtungswechsels synchron wechseln, um zu garantieren, dass die Zellen sich weiterhin vorwärtsbewegen können. Um diese Annahme zu prüfen, wurde in Zeitrafferaufnahmen die Lokalisierung von RomR-mDsRed und FrzS-GFP betrachtet. Wobei RomR-mDsRed einen Marker für die Polarität der A-Bewegungsmaschinerie und FrzS-GFP ein Marker für die Polarität der S-Maschinerie (Mignot *et al.*, 2005) darstellt (Kap. 2.3).

Für die Lokalisierung von RomR zusammen mit FrzS-GFP in lebenden *M. xanthus* Zellen, wurde zunächst ein Vektor, welcher ein *romR-mDsRed* Konstrukt enthält, wie Kapitel 3.5.10 beschrieben, hergestellt. Unmittelbar vor der *romR*-Sequenz befindet sich die *romR*-Promotor-Region (*P_{nat}*). Das Plasmid mit dem *romR-mDsRed* Konstrukt wurde mittels „site-specific recombination“ in die chromosomale „phage Mx8 *attB*-site“ der *M. xanthus* DNA integriert. Das in *M. xanthus* Zellen eingebrachte RomR-mDsRed-Fusionskonstrukt ist funktionsfähig. Sowohl die A-Bewegung in einer *romR*-Mutante kann wiederhergestellt werden, als auch die dynamische Lokalisierung von RomR während eines Richtungswechsels der Zellen ist mit dem RomR-mDsRed Fusionsprotein zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Für die simultane Darstellung von RomR und FrzS in einer Zelle wurde das RomR-mDsRed Fusionskonstrukt in den Stamm SA2028 eingebracht, welcher bereits eine *frzS-gfp*-Fusion in der chromosomalen DNA enthält. Für weitere Untersuchungen wurde der erhaltene Stamm SA2036 wie auch die Stämme SA2268 ($\Delta frzS$, *romR-gfp*) und SA2041 (*romR::nptII*, *frzS-gfp*) unter dem Mikroskop betrachtet und Zeitrafferaufnahmen durchgeführt.

Zunächst wurde überprüft ob FrzS für die korrekte RomR Lokalisierung benötigt wird und umgekehrt. In einer *frzS* Deletionsmutante lokalisiert RomR-GFP (SA2268) asymmetrisch an beiden Polen (Abb. 15A) und die Richtungswechsel der Zellen werden von dem Transfer der RomR-GFP Proteine vom alten hinteren Pol zum neuen hinteren Pol begleitet (Tab. 10). Wird die Verteilung von FrzS-GFP betrachtet, so wird deutlich, dass dieses

Protein auf eine ähnlicheweise an den Polen lokalisiert wie RomR-GFP, jedoch mit einer entgegengesetzten Polarität. FrzS-GFP lokalisiert asymmetrisch an den Polen, wobei eine verstärkte Ansammlung des Fusionsproteins am vorderen Ende und eine kleinere Menge am hinteren Ende der Zelle zu beobachten ist (Mignot *et al.*, 2005). Während eines Richtungswechsels der Zelle wechselt das Protein vom alten vorderen Pol zum neuen vorderen Zellpol. Diese dynamische Lokalisierung wird durch das Frz chemosensorische System reguliert (Mignot *et al.*, 2005). In einer *romR::nptII* Mutante (SA2041) lokalisiert FrzS-GFP wie zuvor beschrieben. Die Fusionsproteine sind polar asymmetrisch verteilt (Abb. 15B), mit einer vermehrten Ansammlung am vorderen Zellpol. Ebenso ist die dynamische FrzS Lokalisierung in diesen Zellen zu beobachten. In 9 von 10 Richtungswechseln in der *romR::nptII* Mutante konnte die dynamische Lokalisierung von FrzS-GFP beobachtet werden (N=25 Zellen). Dies ist vergleichbar mit dem FrzS-GFP Protein in Wildtyp Zellen (Abb. 15B; SA2028), welche 15 mal die Richtung wechselten, wobei 13 mal der Transfer von FrzS-GFP zum neuen vorderen Zellpol zu sehen war (N=25 Zellen). Demnach lokalisieren FrzS und RomR unabhängig von einander.

Für die simultane Darstellung von RomR und FrzS während eines zellulären Richtungswechsels wurde die Lokalisierung von FrzS-GFP und RomR-mDsRed in Zellen des Stammes SA2036 näher betrachtet. In diesen Zellen lokalisiert die verstärkte Ansammlung von FrzS-GFP und RomR-mDsRed jeweils am entgegengesetzten Pol (N=50 Zellen), mit FrzS-GFP vermehrt am vorderen Pol und RomR-mDsRed am hinteren Zellpol (Abb. 15C). Während eines zellulären Richtungswechsels wechseln beide Fusionsproteine innerhalb von ca. 1 Minute synchron von dem einem Zellpol zum gegenüberliegenden Pol (Abb. 15C+D). Die relativen Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Signale an den Zellpolen wurde mithilfe des Metamorph Programms quantifiziert und in einem Graphen dargestellt (Abb. 15D). Es ist ersichtlich, dass RomR-mDsRed (Abb. 15D, Kreise) und FrzS-GFP (Abb. 15D, Rechtecke) innerhalb von 1 Minute den jeweiligen Pol parallel wechseln. Folglich vollziehen beide Proteine synchron eine dynamische Lokalisierung zwischen den Polen wenn die Zelle ihre Bewegungsrichtung ändert. In 10 erfassten Richtungswechseln (N=25 Zellen) konnte dieser synchrone Wechsel

des S-System Markers (FrzS-GFP) und des A-System Markers (RomR-mDsRed) beobachtet werden.

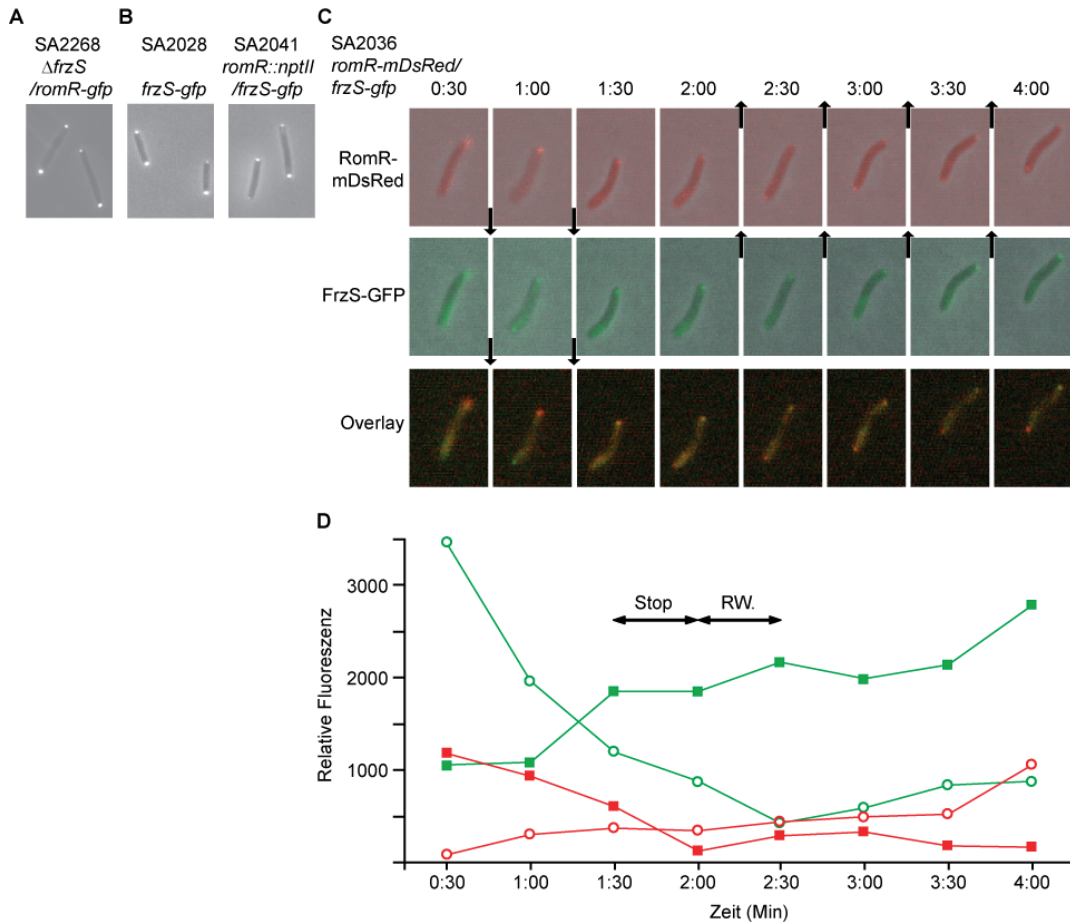


Abbildung 15: Lokalisierung von RomR-mDsRed und FrzS-GFP. **A**] Darstellung von RomR-GFP in einer *frzS* Deletionsmutante. Die Zellen wurden auf einen Objektträger mit einer dünnen Agarschicht gegeben und bei einer 1000 fachen Vergrößerung an dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Bildaufnahmen erfolgten bei einer Belichtungsdauer von 200 ms und einer UV-Lichtintensität von 100 %. Abgebildet ist die Überlagerung des GFP Fluoreszenzbildes und des Phasenkontrastbildes. **B**] Gibt die Lokalisierung von FrzS-GFP in den gekennzeichneten Stämmen wieder. Die Zellen wurden behandelt und abgebildet wie in A] beschrieben. **C**] Zeigt die simultane Darstellung der RomR-mDsRed und FrzS-GFP Lokalisierung in dem Stamm SA2036. Die Zellen wurden auf einen Objektträger mit einer dünnen Agarschicht gegeben und bei einer 1000 fachen Vergrößerung an dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Bildaufnahmen erfolgten alle 30 Sekunden bei einer Belichtungsdauer von 200 ms (Y3 Filter) bzw. 500 ms (GFP Filter), einer UV-Lichtintensität von 10 % und einer Auflösung von 2x2. Dargestellt sind die Bildaufnahmen des Y3 Filters (obere Reihe), des GFP Filters (mittlere Reihe) und die Überlagerungsbilder (untere Reihe). Die Pfeile deuten die Bewegungsrichtung der Zelle an. In dem Zeitraum von 1:00-1:30 min stoppt die Zelle, in Minute 2:00-2:30 vollzieht die Zelle einen Richtungswechsel. Detaillierte Beschreibung der Lokalisierung ist im Text gegeben. **D**] Gibt die relative Fluoreszenzintensität der Signale an den Polen (Y-Achse) über die Zeit in Minuten (X-Achse) in Form eines Graphen wieder. Die Rechtecke repräsentieren das FrzS-GFP Signal und die Kreise das RomR-mDsRed Signal. Die gefüllten Symbole stehen für den anfänglich hinteren Pol und die nicht gefüllten Symbole für den anfänglich vorderen Zellpol. In dem Zeitraum von 1:00-1:30 min stoppt die Zelle und in Minute 2:00-2:30 vollzieht die Zelle einen Richtungswechsel (RW).

4.2 MglA („mutual gliding A“) Protein

4.2.1 Analyse der MglA Primärstruktur und des *mgI* Lokus

Das MglA Protein wird für die Funktion beider Bewegungssysteme benötigt (Hodgkin & Kaiser, 1979b). Die Primärstruktur von MglA ähnelt derer eukaryontischer kleiner GTPasen der Ras/Rac/Rho Superfamilie (Abb. 16). Werden verschiedene Sequenzen dieser Superfamilie miteinander verglichen, so wird deutlich, dass es einige konservierte Regionen innerhalb der verschiedenen Sequenzen gibt (Abb. 16). Charakteristisch für alle kleinen GTPasen sind die Sequenzregionen G-1 bis G-5 und deren konservierte Aminosäurereste werden für die GDP/GTP Bindung, den GDP/GTP Austausch, die GTP induzierte Konformationsänderung und die GTP Hydrolyse benötigt. Diese konservierten Regionen sind überwiegend in der MglA Sequenz enthalten (G-1 bis G-4 Region), mit Ausnahme der G-5 Region, welche vorwiegend in den eukaryontischen kleinen GTPasen konserviert vorliegt.

Besonders hervorzuheben ist eine Region in den verschiedenen GTPase Sequenzen, die G-1 Region GX₄GK(S/T). Diese Region stellt die konservierte P-Schleife („phosphate binding loop“) dar und ist entscheidend für die GDP/GTP-Bindung (Saraste *et al.*, 1990). Die konservierte Aminosäure Glycin in dieser Region, zum Beispiel an Position 12 in Cdc42 (*Ustilago maydis*) bzw. an Position 21 in MglA und die konservierte Aminosäure Threonin an Position 17 in Cdc42 bzw. Position 26/27 in MglA (Abb. 16) sind wichtig für die Bindung von GTP bzw. GDP. Wird das Glycin durch Valin substituiert, so bindet diese Mutante zwar GTP, jedoch kann das gebundene GTP nicht mehr hydrolysiert werden (Bourne *et al.*, 1991). Demnach stellt diese Mutante eine dominant, konstitutiv aktive Form des Proteins dar, welches ständig im GTP gebundenen Zustand vorliegt. Wird die Aminosäure Threonin zu Asparagin substituiert, führt dies zu einer negativ-dominanten, inaktiven Form des Proteins, welches meist im GDP gebundenen Zustand auftritt und üblicherweise die GEF („GTP exchange factors“) Aktivität blockiert (Bourne *et al.*, 1991).

In der MglA Sequenz von *M. xanthus* wurde das Glycin an Position 21 zu Valin mutiert, um ein konstitutiv aktives MglA Protein zu bekommen und die beiden Threonine an Position 26 und 27 durch Asparagin substituiert, um ein inaktives MglA Protein im GDP gebundenen Zustand zu erhalten (Abb. 16). In

GTPase Sar1 von *Saccharomyces cerevisiae* in eine *mgIA* Mutante der Sporulationsdefekt der Zellen komplementiert werden kann, jedoch nicht der Bewegungsdefekt der *mgIA* Mutante (Hartzell, 1997). Demnach scheint MglA nicht nur auf Sequenzebene (Abb. 16) ähnlich zu eukaryontischen kleinen GTPasen zu sein.

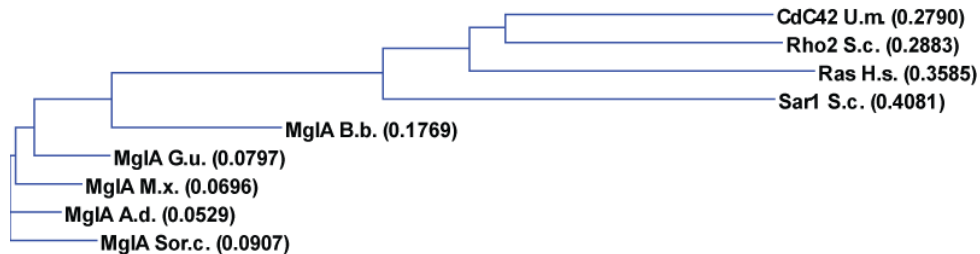


Abbildung 17. Dendrogramm verschiedener Proteinprimärstrukturen. Vergleich von MglA Sequenzen verschiedener δ -Proteobakterien und eukaryontischer kleiner GTPase Sequenzen. Die Sequenzen wurden in Vector NTI aneinander gelegt und daraufhin das Dendrogramm erstellt. Unten beginnend mit MglA von *Sorangium cellulosum* (Sor.c.; R. Müller), MglA von *Anaeromyxobacter dehalogenans* (A.d.; NC_011891), MglA von *Myxococcus xanthus* (M.x.;(Stephens *et al.*, 1989)), MglA von *Geobacter uraniumreducens* (G.u.;NZ_AASH01000018), MglA von *Bdellovibrio bacteriovorus* (B.b.; (Rendulic *et al.*, 2004)). Daraufhin folgen die Sequenzen von Sar1 von *Saccharomyces cerevisiae* (S.c.;NP015106.1), Ras von *Homo sapiens* (H.s.; (Santos & Nebreda, 1989)), Rho2 von *Saccharomyces cerevisiae* (S.c.; AF_458981) und Cdc42 von *Ustilago maydis* (U.m.; (Weinzierl *et al.*, 2002)).

In *Myxococcus xanthus* besteht der *mgI* Locus aus zwei Genen, dem *mgIB* Gen (MXAN1926) und dem *mgIA* Gen (MXAN1925; Abb.18). Die beiden Gene werden zusammen transkribiert und stellen ein Operon dar (Hartzell & Kaiser, 1991). MglB wird auf Grund der Aminosäuresequenz zur Familie der Roadblock Proteine (Kap. 2.8) gezählt. In der Literatur wird beschrieben, dass MglB benötigt wird um normale Mengen an MglA Protein in *M. xanthus* Zellen zu erhalten (Hartzell & Kaiser, 1991).

Für weitere Analysen der Funktion des MglA Proteins *in vivo* wurde teilweise der gesamte *mgIBA* Locus (+1 bis +1628 bp, Abb.18) verwendet und in die entsprechenden Plasmide kloniert (vergl. Kap. 3.5.10). Diese Region beinhaltet neben der *mgIBA* Sequenz eine 214 bp große Region stromaufwärts des *mgIB* Genes in der chromosomalen *M. xanthus* DNA und eine 336 bp umfassenden Bereich stromabwärts der *mgIA* Sequenz in *M. xanthus* (Abb.18). Die beschriebene Sequenzregion umfasst die gesamte Transkriptionseinheit von *mgIBA* (Hartzell & Kaiser, 1991).

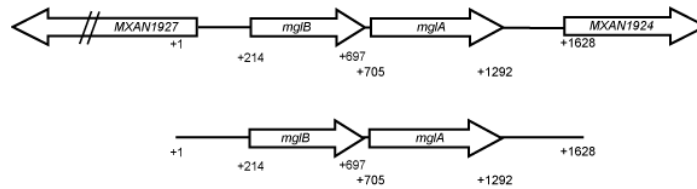


Abbildung 18: Analyse des *mgl* Lokus in *M. xanthus*. Die Gene sind als Pfeile dargestellt, wobei *mglB* (MXAN1926) stromaufwärts von *mglA* (MXAN1925) liegt. Oben: Veranschaulichung des *mglBA* Lokus in der chromosomalen *M. xanthus* DNA. Links und rechts neben dem *mglBA* Lokus befinden sich zwei Gene (MXAN1927/1924), welche jeweils für ein hypothetisches Protein kodieren. Unten: Darstellung des *mglBA* Lokus, welcher für die weitere Analyse der Funktion des MglA Proteins verwendet wird.

4.2.2 Analyse des Phänotyps der MglA-G21V und MglA-T26/27N Mutationen in *M. xanthus*

Um eine Vorstellung zu erhalten, welche Funktion MglA in den Zellen ausübt und wie sich die in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Punktmutationen in der GTPase Domäne von MglA auf die A-Bewegungsfähigkeit der *M. xanthus* Zellen auswirkt, wurden zunächst wie in Kapitel 3.5.10 erläutert Plasmide erstellt. Wobei der gesamte *mglBA* Lokus, der *mglBA* Lokus mit dem mutierten Gen *mglA*-G21V (konstitutiv aktive, GTP gebundene Form) bzw. der gesamte *mglBA* Lokus mit dem mutierten Gen *mglA*-T26/27N (inaktive, GDP-gebundene Form) jeweils auf dem Plasmid enthalten ist. Die jeweiligen Konstrukte wurden mittels Elektroporation (Kap. 3.5.9) in die chromosomale „phage Mx8 *attB*-site“ in *M. xanthus* DNA eingebracht.

Neben den *mglBA* Konstrukten für die Integration in die chromosomale „phage Mx8 *attB*-site“, wurden Plasmide erstellt, welche den *mglBA* Lokus mit dem mutierten Gen *mglA*-G21V bzw. *mglA*-T26/27N enthalten, für eine homologe Rekombination in den *mglBA* Lokus in der chromosomalen *M. xanthus* DNA (Kap. 3.5.10). In diesem Abschnitt und den folgenden werden Bewegungsanalysen und Zeitrafferaufnahmen der angeführten Stämme beschrieben, wobei für die Auswertung ausschließlich Zellen betrachtet wurden welche mindestens eine Zelllänge von der nächsten Zelle entfernt waren, um sicher zu stellen das sich diese Zellen mit dem A-Bewegungssystem fortbewegen.

Wird die Bewegungsfähigkeit von $\Delta mglBA$ Zellen (DK6204) untersucht (vergl. Kap 3.4.4) ist erkennbar, dass Kolonien dieses Stammes einen glatten

Rand bilden (Abb. 19). Es sind weder vereinzelte Zellen, noch Zellen, welche sich im Zellgruppenverband fortbewegen, sichtbar, während diese am Kolonienrand des Wildtyp Stammes (DK1622, Abb. 19A) deutlich wahrnehmbar sind. Ebenso bewegungsunfähig verhalten sich die Zellen des Deletionsstammes in Zeitrafferaufnahmen (Kap. 3.6.2 und 3.6.3) bei einer 400 fachen Vergrößerung. Die Zellen liegen ohne die Ausbildung jeglicher Bewegungsmuster wie sie im Stamm DK1622 erkennbar sind, bewegungslos auf den mit Agar beschichteten Objektträgern (Abb. 19). Diese Ergebnisse stehen einer Publikation entgegen, in der die Zellen der *mgIB*A Deletionsmutante (DK6204) als bewegungsfähig beschrieben werden, mit einer gesteigerten Richtungswechsel Frequenz der Zellen, welcher die glatte Kolonienmorphologie erklären sollte (Spormann & Kaiser, 1999). Dieser Phänotyp der DK6204 Zellen konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden.

Für die Analyse des Phänotyps der MglA-G21V bzw. MglA-T26/27 Mutante wurden die zuvor beschriebenen Konstrukte in die „phage Mx8 *attB*-site“ in *M. xanthus* Wildtyp Zellen (DK1622) wie auch in die *mgIB*A Deletionsmutante (DK6204) eingebracht. Für eine vereinfachte Beschreibung wird im folgenden Text die konstitutiv aktive, GTP gebundene Form (MglA-G21V) als MglA „gain of function“ (MglA^{gof}) Mutante und die inaktive, GDP gebundene GTPase Form (MglA-T26/27) als MglA „loss of function“ (MglA^{lof}) Mutante bezeichnet. In der Literatur ist beschrieben, dass sich der Phänotyp der konstitutiv aktiven Form (MglA^{gof}), wie auch der inaktiven, GDP gebundenen Form (MglA^{lof}) dominant gegenüber des Phänotyps der nativen Kopien in den Zellen verhält (Bourne *et al.*, 1991).

Aus diesem Grund wird in diesem Abschnitt der Phänotyp der jeweiligen Konstrukte nicht ausschließlich in der *mgIB*A Deletionsmutante beschrieben (eine Kopie des *mgIB*A Lokus), sondern ebenfalls in Wildtyp Zellen (zwei Kopien des *mgIB*A Lokus). Wird zunächst eine zweite Kopie des *mgIB*⁺A⁺ Lokus in Wildtyp Zellen eingebracht (SA3306) so sind keine Einflüsse auf die Bewegung der Zellen erkennbar (Abb. 19; Tab. 12). Diese Zellen bewegen sich in einer normalen Geschwindigkeit vorwärts und wechseln ebenso oft wie Wildtyp Zellen die Bewegungsrichtung (Tab. 12). Ähnlich verhalten sich Δ *mgIB*A Zellen, in die eine Kopie des *mgIB*A Lokus integriert wurde (SA3302).

Demnach komplementiert der eingebrachte *mgIB⁺A⁺* Locus die *mgIBA* Deletionsmutante und erfüllt somit die Grundvoraussetzung für die Untersuchung des Phänotyps der beiden mutierten *mgIA* Gene.

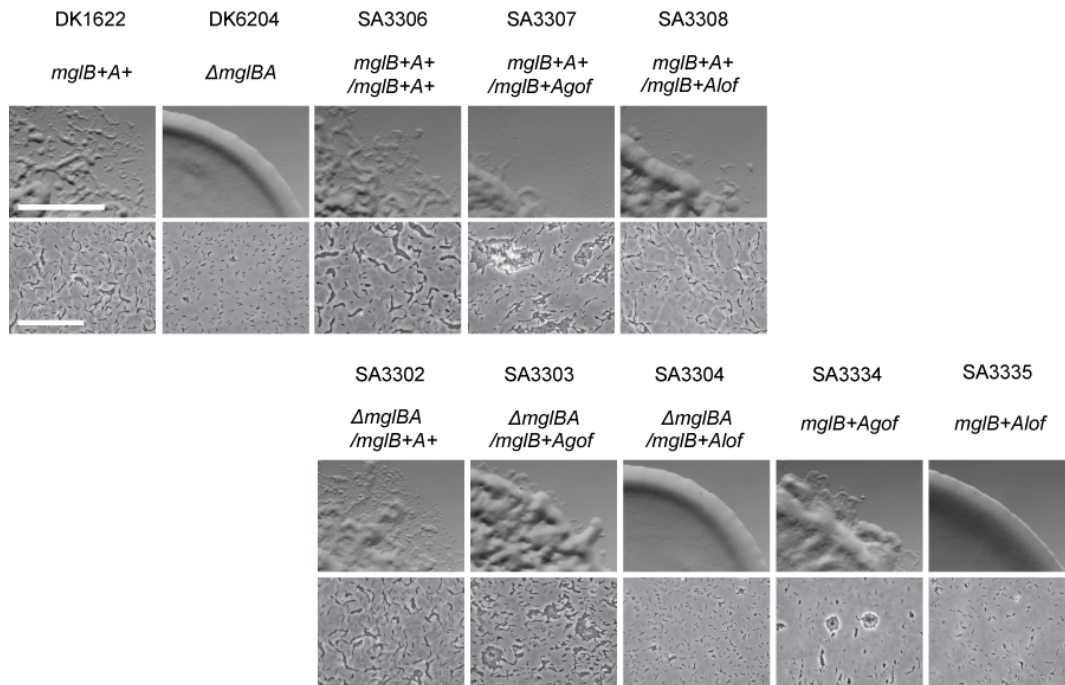


Abbildung 19: Analyse des Phänotyps der verschiedenen *mgIA* Mutanten *in vivo*. Stellt die Bewegungspheotypen der verschiedenen Stämme mit den gekennzeichneten Genotypen dar. Die obere Reihe zeigt eine 50-fache Vergrößerung der jeweiligen Stämme, welche zuvor auf 0,5% CTT-1,5% Agar-Platten getropft, bei 32°C für 24 Stunden inkubiert und anschließend unter dem Stereomikroskop photographiert wurden. Die untere Reihe zeigt eine 400-fache Vergrößerung der jeweiligen Zellen auf einem Objektträger mit einer dünnen Agarschicht aufgenommen an dem Durchlicht Mikroskop. Der weiße Balken auf der Abbildung des Wildtyp Stammes entspricht 5 mm (oben) bzw. 50 μ m (unten).

Zellen der Δ *mgIBA* Mutante, welche eine Kopie des *mgIB⁺A^{9of}* Locus tragen (SA3303), sind fähig sich mit normaler Geschwindigkeit vorwärts zu bewegen (80% der Zellen, Tab. 12). Jedoch wechseln diese Zellen ungefähr alle 4,6 Minuten die Richtung ihrer Bewegung, während Wildtyp Zellen ungefähr alle 14 Minuten einen Richtungswechsel vollziehen (Tab. 12). Auf Grund dieser verkürzten Richtungswechselperiode zeigen die Zellen dieses Stammes die in Abbildung 19 dargestellte Kolonienmorphologie und Bewegungsmuster, welche von dem des Wildtyp Stammes abweichen (Abb. 19). Ähnlich verkürzt sich die Richtungswechsel Periode in Wildtyp Zellen, welche neben der nativen Kopie des *mgIB⁺A⁺* Locus, den *mgIB⁺A^{9of}* Locus integriert haben (SA3307). Diese Zellen wechseln ca. alle 5,7 Minuten die Richtung ihrer Bewegung (Tab. 12). Zusätzlich weisen SA3307 Zellen eine ähnliche Kolonienmorphologie und

Bewegungsmuster auf, wie der Stamm SA3303 (Abb. 19). Folglich wirkt sich die Substitution des Glycin zu Valin in MglA ($MglA^{gof}$) auf die Richtungswechselperiode der Zellen aus und ist dominant gegenüber dem nativen MglA Protein (SA3307).

Werden Zellen der $\Delta mglBA$ Mutante betrachtet, welche eine Kopie des $mglB^+A^{lof}$ Locus integriert haben (SA3304), spiegelt sich der Phänotyp der $mglBA$ Deletionsmutante wieder (Abb. 19). Die Kolonien des Stammes SA3304 weisen einen glatten Rand auf und in Zeitrafferaufnahmen wird deutlich, dass diese Zellen bewegungsunfähig sind (Tab. 12). Dagegen sind Zellen, die neben der nativen Kopie des $mglB^+A^+$ den $mglB^+A^{lof}$ besitzen (SA3308), bewegungsfähig (75% der Zellen). SA3308 Zellen bewegen sich mit wildtyp-ähnlicher Geschwindigkeit (Tab. 12), jedoch vollziehen diese Zellen weniger häufig einen Richtungswechsel. Im Schnitt wechselt eine Zelle alle 48 Minuten die Richtung ihrer Bewegung (Tab. 12). Verglichen mit Wildtyp Zellen, die alle 14 Minuten die Richtung ändern, ist in diesen Zellen die Richtungswechselperiode stark verlängert. Demzufolge beeinflusst die Substitution der beiden Threoninreste zu zwei Asparaginresten in MglA ($MglA^{lof}$) ebenfalls die Richtungswechselperiode der Zellen und ist dominant gegenüber dem nativen MglA Protein (SA3308, $mglB^+A^+/mglB^+A^{lof}$). Die Bewegungsunfähigkeit der Zellen des Stammes SA3304 ($\Delta mglBA/mglB^+A^{lof}$) verdeutlicht, dass MglA nicht nur die Richtungswechselperiode in den Zellen beeinflusst, sondern ebenfalls die Bewegung der Zellen stimuliert.

Wie zuvor erläutert wurden neben den gerade beschriebenen $mglA^{gof}$ und $mglA^{lof}$ Mutationen, welche sich auf dem $mglBA$ Locus auf der „phage Mx8 *attB*-site“ befinden, dieselben Mutationen mittels homologer Rekombination in $mglA$ auf dem Chromosom eingeführt. Die Zellen der resultierenden Stämme SA3334 ($mglB^+A^{gof}$) bzw. SA3335 ($mglB^+A^{lof}$) weisen einen ähnlichen Phänotyp auf wie Zellen, welche die entsprechende Mutation in dem $mglBA$ Locus in der „phage Mx8 *attB* site“ enthalten (Abb. 19). Das mutierte $MglA^{gof}$ (SA3334) bewirkt, wie in dem Stamm SA3303, eine stark verkürzte Richtungswechselperiode der Zellen (Tab. 12). Ebenso wie der Stamm SA3304 bilden Kolonien des Stammes SA3335 ($MglA^{lof}$) einen glatten Rand (Abb. 19) und die Zellen sind nicht bewegungsfähig (Tab. 12). Dementsprechend ist der

beschriebene Phänotyp der jeweiligen Mutation unabhängig von der Lokalisation auf der chromosomalen DNA von *M. xanthus*.

Tabelle 12: Analyse des Bewegungsphänotyps der MglA Mutanten.

Stamm	Genotypen	A-Bewegung		
		Richtungswechselperiode (/min)	Bewegungsfähigkeit (%)	Geschwindigkeit ² (µm/min)
DK1622	<i>mglBA</i>	13,9	100	3,2
DK6204	Δ <i>mglBA</i>	NA ¹	0	0
SA3302	Δ <i>mglBA/mglB</i> ⁺ <i>A</i> ₃ ⁺	14,2	99	3,5
SA3303	Δ <i>mglBA/mglB</i> ⁺ <i>A</i> ₃ ^{gof}	4,6	80	2,6
SA3304	Δ <i>mglBA/mglB</i> ⁺ <i>A</i> ₃ ^{lof}	NA ¹	0	NA ¹
SA3306	<i>mglB</i> ⁺ <i>A</i> ⁺ / <i>mglB</i> ⁺ <i>A</i> ₃ ⁺	14,0	99	3,6
SA3307	<i>mglB</i> ⁺ <i>A</i> ⁺ / <i>mglB</i> ⁺ <i>A</i> ₃ ^{gof}	4,7	87	3,0
SA3308	<i>mglB</i> ⁺ <i>A</i> ⁺ / <i>mglB</i> ⁺ <i>A</i> ₃ ^{lof}	48	75	3,4
SA3334	<i>mglB</i> ⁺ <i>A</i> ^{gof}	4,6	86	3,1
SA3335	<i>mglB</i> ⁺ <i>A</i> ^{lof}	NA ¹	0	NA ¹

Die Tabelle gibt die errechnete Periode der Richtungswechsel pro Minute (Zellzahl x Zeit/ Richtungswechsel), die Bewegungsfähigkeit in Prozent und die Bewegungsgeschwindigkeit in µm/min der verschiedenen Zellen in der A-Bewegung wieder. In Zeitrafferaufnahmen (alle 30 s ein Bild; insgesamt 15 min) wurden insgesamt 100 Zellen (N) je Stamm analysiert. Legende: ¹NA=nicht anwendbar, da die Zellen bewegungsunfähig sind. ²In 15 Zellen je Stamm wurde die Bewegungsgeschwindigkeit bestimmt. ³*mglA* Mutation befindet sich im *mglBA* Locus auf der „phage Mx8 *attB*-site“ im Chromosom.

Um sicherzustellen, dass die beschriebenen Phänotypen der beiden Substitutionsmutanten nicht auf eine vermehrte oder verminderte Bildung der MglA Proteine zurück zuführen sind, wurde das MglA Protein in Western Blot Analysen mithilfe eines anti-MglA Antikörpers (Serum; vergl. Kap. 3.7.4) in den verschiedenen Zellen nachgewiesen (Abb. 20). In DK1622 Zellen (Abb. 20;

Spur 2, *mgIB*⁺*A*⁺) wurde das MglA Protein in der erwarteten Höhe von ungefähr 22 kDa mit dem anti-MglA Antikörper detektiert. In der *mgIBA* Deletionsmutante ist wie erwartet kein MglA detekierbar (Abb. 20; Spur 1). In den Spuren 3 bis 5 (Abb. 20) sind die nachgewiesenen MglA Proteine der Stämme SA3306 (*mgIB*⁺*A*⁺/*mgIB*⁺*A*⁺), SA3307 (*mgIB*⁺*A*⁺/*mgIB*⁺*A*^{gof}) und SA3308 (*mgIB*⁺*A*⁺/*mgIB*⁺*A*^{lof}) sichtbar. Da zwei Kopien des *mgIA* Gens jeweils in den Zellen enthalten sind wird ca. doppelt so viel MglA Protein in diesen Zellen gebildet, verglichen mit dem MglA Level in Wildtyp Zellen (Spur 2). Dagegen weisen die Zellen der Stämme SA3302 (*mgIB*⁻*A*⁺/*mgIB*⁺*A*⁺), SA3303 (*mgIB*⁻*A*⁺/*mgIB*⁺*A*^{gof}) und SA3304 (*mgIB*⁻*A*⁺/*mgIB*⁺*A*^{lof}), welche nur eine Kopie des *mgIA* Gens besitzen, eine vergleichbare Menge an MglA auf wie die Wildtyp Zellen (Abb. 20; Spur 6-8). Dementsprechend wird eine wildtyp-ähnliche Menge von MglA^{gof} bzw. MglA^{lof} in den verschiedenen Zellen synthetisiert. In Western Blot Analysen wird ebenfalls eine wildtyp-ähnliche Menge von MglA^{gof} bzw. MglA^{lof} in dem Stamm SA3334 bzw. SA3335 detektiert (Daten nicht gezeigt).

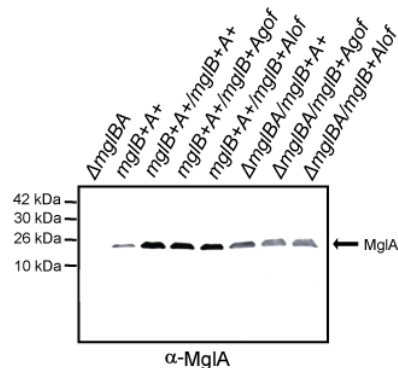


Abbildung 20: Akkumulation von MglA⁺, MglA^{gof} und MglA^{lof} in vivo. In Western Blot Analysen wurden die verschiedenen MglA Proteine mithilfe eines anti MglA Antikörpers in den Zellextrakten der Stämme mit den gekennzeichneten Genotypen nachgewiesen. Hierzu wurde Protein von gleichen Mengen Zellen in einer SDS-PAGE nach Lämmli aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrocellulose Membran transferiert und die MglA Proteine mit dem genannten Antikörper detektiert. Links neben der ersten Spur wird die Auftrennung des Page Ruler Prestained Markers in kDa angedeutet. Die erwartete Laufhöhe des MglA Proteins ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Das MglA^{lof} Protein wird in wildtyp-ähnlichen Mengen gebildet. Dennoch sind die Zellen, welche die *mgIB*⁺*A*^{lof} Mutation tragen (SA3304), bewegungsunfähig. Folglich resultiert die beobachtete Bewegungslosigkeit der Zellen aus der ausbleibenden Stimulierung der Bewegung durch die inaktive Form des MglA Mutantenproteins. Weiterhin deutet die Bewegungsfähigkeit der

SA3303 Zellen ($mgIB^-A^- / mgIB^+A^{gof}$) darauf hin, dass das $MglA^{gof}$ Protein die Bewegung stimulieren kann. Zusätzlich regt das $MglA^{gof}$ Protein die Zellen an, häufiger als Wildtyp Zellen, einen Richtungswechsel zu vollziehen. Daraus lässt sich folgern, dass $MglA^{gof}$ eine konstitutiv aktive Form des $MglA$ Proteins darstellt, welche die Bewegung anregt und ständig die Zelle stimuliert, einen Richtungswechsel zu vollziehen. Das $MglA^{gof}$ Protein wie auch das $MglA^{lof}$ Protein ist dominant gegenüber den nativen $MglA$ Proteinen bezüglich der Richtungswechsel Periode der Zellen (SA3307 und SA3308).

Auf genetischer Ebene deuten die beschriebenen *in vivo* Daten der beiden Substitutionmutanten an, dass $MglA$ eine prokaryontische kleine GTPase ist, welche zum einen die Bewegung der Zellen stimuliert und zum anderen die Zellen anregt einen Richtungswechsel durchzuführen.

4.2.3 Untersuchung des Zusammenhangs der Stimulierung von Richtungswechsel durch das Frz-System und durch $MglA$

Das Frz chemosensorische System reguliert die Frequenz der Richtungswechsel in *M. xanthus* (Kap. 2.6). $MglA$ scheint ebenfalls einen erheblichen Einfluss auf den Richtungswechsel der Zellen zu nehmen (vergl. Kap. 4.2.2). Die Tatsache, dass sowohl das Frz-System, als auch das $MglA$ Protein in diesen Prozess involviert sind, könnte zwei mögliche Ursachen haben. Zum einen könnten beide in ein und demselben Signalweg agieren, um den Richtungswechsel in Zellen zu stimulieren und zum anderen wäre es möglich, dass beide in unterschiedlichen Signalwegen die Richtungswechsel induzieren.

Um diese Frage zu beantworten wurden zunächst Mutanten hergestellt, welche jeweils eine Kopie der inaktive Form des Frz-Systems (Frz^{lof}) bzw. $MglA$ ($MglA^{lof}$) beinhalten und zusätzlich eine Kopie der konstitutiv aktive Form des $MglA$ Proteins ($MglA^{gof}$) bzw. des Frz-Systems (Frz^{gof}) besitzen, ebenso wie Mutanten, die beide in einer inaktiven Form bzw. konstitutiv aktiven Form tragen. Anschließend wurden Zeitrafferaufnahmen durchgeführt und die Richtungswechsel der verschiedenen Zellen studiert und die Richtungswechselperiode ermittelt (Tab. 13).

Frz^{lof} Zellen (DK8505, *frzCD::Tn5lacΩ536*) wechseln sehr selten oder überhaupt nicht die Richtung ihrer Bewegung. Dies wird im folgenden mit einer Richtungswechselperiode von größer 100 Minuten definiert. Werden Zellen des Stammes SA3318 beobachtet, die neben der Frz^{lof} Mutation eine MglA^{gof} Mutation ($\Delta mglBA/mgB^+A^{gof}$) innehaben, so zeigen diese Zellen sehr häufig einen Richtungswechsel. Demnach verkürzt sich die Richtungswechselperiode erheblich durch das Einbringen der *mgIB⁺A^{gof}* Mutation (5,7 min, Tab. 13). Wird dagegen die *mgIB⁺A^{lof}* Mutation in die *frz^{lof}* Mutante eingebracht (SA3321), so sind diese Zellen bewegungsunfähig, ebenso wie Zellen die ausschließlich die *mgIB⁺A^{lof}* Mutation aufweisen (Tab. 12, SA3304).

Eine *frz^{gof}* Mutante (DK8506, *frzCD::Tn5Ω224*) vollzieht alle 1 bis 2 Minuten einen Wechsel der Bewegungsrichtung. Wird zusätzlich die *mgIB⁺A^{gof}* Mutation in diese Zellen (SA3319) eingebracht, wechseln die Zellen ca. alle 5 Minuten die Richtung ihrer Bewegung (Tab. 13), ebenso häufig wie Zellen die ausschließlich die *mgIB⁺A^{gof}* Mutation beinhalten (Tab. 12, SA3303). Wird dagegen die MglA^{lof} Mutation ($\Delta mglBA, mgIB^+A^{lof}$) in DK8506 eingeführt, so zeigen diese Zellen keine Bewegung (SA3320, Tab. 13).

Folglich befähigen das MglA^{gof} Protein (MglA-G21V) die Zellen dazu die *frz^{lof}* Mutation bezüglich der Richtungswechsel zu umgehen. Ebenso ändert sich der Phänotyp einer Frz^{gof} Mutante derart, dass sie den der jeweiligen *mglA* Mutation annimmt. Werden die Richtungswechsel in Zellen studiert, welche sowohl die *frz^{gof}* Mutation als auch die *mgIB⁺A^{gof}* Mutation haben (SA3319), wird deutlich, dass die Zellen die Bewegungsrichtung ebenso häufig (Tab. 13, 5 min) wie eine *frz⁺/mgIB⁺A^{gof}* Mutante wechseln (Tab. 12, 4,6 min). Demzufolge ist kein additiver Phänotyp in der Doppelmutante erkennbar und es ist auszuschließen, dass die beiden in unterschiedlichen Signalwegen ihre Funktion ausüben. Vielmehr ist anzunehmen, dass MglA stromabwärts des Frz-Systems, in demselben Signalweg, agiert, um einen Wechsel der Bewegungsrichtung der Zellen zu induzieren.

Tabelle 13: Richtungswechsel Periode verschiedener *frz* und *mgIA* Mutanten.

Stamm	Genotypen		A-Bewegung		
	<i>frz</i>	<i>mgIB⁺A⁺</i>	RW-Periode (/min)	BW (%)	V (μ m/min)
DK1622	<i>frz⁺</i>	<i>mgIB⁺A⁺</i>	13,9	100	3,2
DK6204	<i>frz⁺</i>	Δ <i>mgIBA</i>	NA	0	0
DK8505	<i>frz^{lof}</i>	<i>mgIB⁺A⁺</i>	>100 ³	100	2,2
SA3325	<i>frz^{lof}</i>	Δ <i>mgIBA</i>	NA	0	NA
SA3318	<i>frz^{lof}</i>	Δ <i>mgIBA/mgIB⁺A^{gof}₄</i>	5,7	82	1,6
SA3321	<i>frz^{lof}</i>	Δ <i>mgIBA/mgIB⁺A^{lof}₄</i>	NA	0	NA
DK8506	<i>frz^{gof}</i>	<i>mgIB⁺A⁺</i>	1,5	85	2,4
SA3324	<i>frz^{gof}</i>	Δ <i>mgIBA</i>	NA	0	NA
SA3319	<i>frz^{gof}</i>	Δ <i>mgIBA/mgIB⁺A^{gof}₄</i>	5,0	90	1,2
SA3320	<i>frz^{gof}</i>	Δ <i>mgIBA/mgIB⁺A^{lof}₄</i>	NA	0	NA

Die Tabelle gibt die errechnete Periode der Richtungswechsel pro Minute (Zellzahl x Zeit/ Richtungswechsel) und die Bewegungsfähigkeit in Prozent der verschiedenen Zellen in der A-Bewegung wieder. In Zeitrafferaufnahmen (alle 30 s ein Bild; insgesamt 15 min) wurden insgesamt 100 Zellen (N) je Stamm analysiert. Legende: RW bedeutet Richtungswechsel, BW ist eine Abkürzung für Bewegungsfähigkeit und v stellt die Geschwindigkeit da. ¹NA=nicht anwendbar, da die Zellen bewegungsunfähig sind. ²In 15 Zellen je Stamm wurde die Bewegungsgeschwindigkeit bestimmt. ³keine Richtungswechsel beobachtbar bzw. weniger als alle 1000 Minuten, wurde hier als größer 100 definiert. ⁴ *mgIA* Mutation befindet sich im *mgIBA* Locus auf der „phage Mx8 *attB*-site“ im Chromosom.

4.2.4 Untersuchung der Lokalisierung von *MglA⁺*, *MglA^{gof}* und *MglA^{lof}* Proteine in *M. xanthus*

Um zu verstehen, wie *MglA* die Bewegung und die Richtungswechsel der Zellen stimuliert, wurde die Lokalisierung des Proteins in der Zelle untersucht. Für die Lokalisierung der nativen und mutierten *MglA* Proteine in bewegungsfähigen Zellen, wurden YFP Fusionen angefertigt. Es wurden

verschiedene Strategien getestet, wobei sich herausstellte, dass die effektivste eine N-terminale YFP-linker Fusion, unter Kontrolle des *pilA* Promotors, integriert in die chromosomale „phage Mx8 *attB*-site“ einer *mgIA* Mutante (*mgIA9 Tn5-132* Ω 1901, DK3685) ist. Die *mgIA9* Mutante zeigt wie die *mgIBA* Deletionsmutante (vergl. Kap 4.2.3) keine Bewegungsfähigkeit (Abb. 21). Im Gegensatz zu der *mgIBA* Deletion ist in der *mgIA9* Mutante noch eine Kopie des *mgIB* Gens vorhanden. MglB wird für die Stabilisierung und somit für das Vorhandensein von MglA Proteinen in der Zelle benötigt (Hartzell und Kaiser, 1991b). Da nur die jeweilige *yfp-mgIA* Fusion in der „phage Mx8 *attB*-site“ vorliegt, wurde die *mgIA9* Mutante verwendet. Zusätzlich wurden die verschiedenen Plasmide in Wildtyp Zellen (DK1622) eingebracht. Die genaue Konstruktion der Plasmide, welche die *yfp-linker-mgIA*⁺, *yfp-linker-mgIA*^{gof} und *yfp-linker-mgIA*^{lof} Fusion direkt hinter der *pilA* Promotorsequenz enthalten, ist detailliert in Kapitel 3.5.10 erläutert.

In Bewegungsanalysen und Zeitrafferaufnahmen wurde anschließend die Bewegungsfähigkeit der die YFP-linker Fusionen enthaltenden Zellen untersucht (Abb. 21). Wird eine Kopie des *mgIA*⁺ Gens in die *mgIA9* Mutante eingebracht (SA2096), erlangen die Zellen eine wildtyp-ähnliche Bewegungsfähigkeit und Richtungswechselperiode zurück (Abb. 21). Dagegen zeigen Zellen, die in dieser Mutante eine *yfp-linker-mgIA*⁺ Kopie tragen (SA3359), eine reduzierte Bewegungsfähigkeit was sich in der Kolonienmorphologie widerspiegelt, verglichen mit der des Wildtyps bzw. SA2096 (Abb. 21). Nur achtzig Prozent der SA3359 Zellen bewegen sich vorwärts, jedoch bewegen sich diese 80% der Zellen mit einer wildtyp-ähnlichen Geschwindigkeit vorwärts und wechseln ebenso häufig die Bewegungsrichtung wie Wildtyp Zellen (Abb. 21). Aus diesem Grund wurde die Lokalisierung der verschiedenen YFP-MglA Fusionsproteine in der *mgIA9* Mutante in sich vorwärtsbewegenden Zellen unter dem Mikroskop betrachtet. In Wildtyp Zellen zeigt die YFP-MglA⁺ Fusion keinen Einfluss auf die Bewegungsfähigkeit dieser Zellen (Abb. 21, SA3364). Hundert Prozent der SA3364 Zellen bewegen sich mit einer wildtyp-ähnlichen Geschwindigkeit vorwärts und wechseln ebenso häufig wie Wildtyp Zellen ihre Bewegungsrichtung (Abb. 21).

Das YFP-MglA^{gof} Protein in der *mgIA9* Mutante (SA3360) wie auch im Wildtyp (SA3365) verhält sich ebenso wie ein MglA^{gof} Protein ohne die YFP Fusion (vergl. Kap. 4.2.3, SA3302 und SA3307). Alle vier Stämme zeigen eine verkürzte Richtungswechselperiode (Abb. 21). In der *mgIA9* Mutante bewirkt das YFP-MglA^{lof} Protein (SA3361) eine Bewegungsunfähigkeit der Zellen, genauso wie das MglA^{lof} Protein in dieser Mutante (vergl. Kap. 4.2.3, SA3304). Im Wildtyp bewirkt das YFP-MglA^{lof} Protein (Abb. 21, SA3366) erneut eine Verlängerung der Richtungswechselperiode (vergl. Kap. 4.2.3, SA3308). Demnach können die verschiedenen YFP Fusionen für die Lokalisierung der jeweiligen MglA Mutanten Proteine verwendet werden.

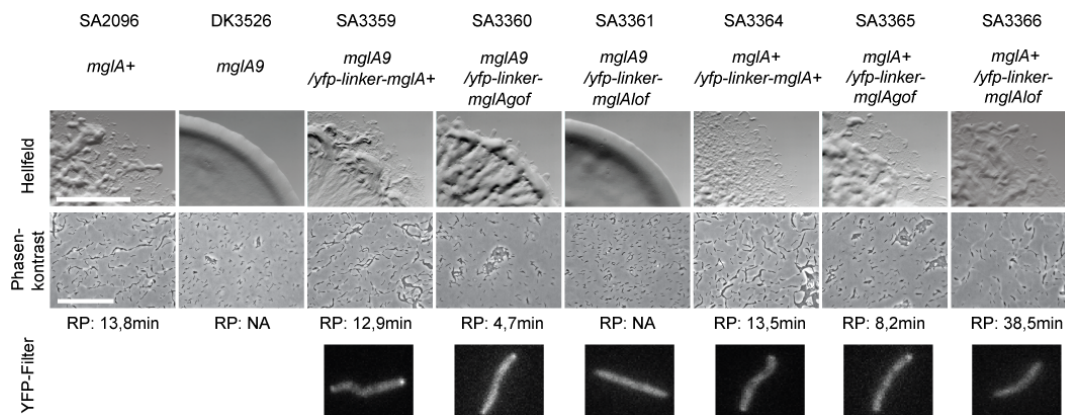


Abbildung 21: Analyse der verschiedenen YFP-MglA Fusionsproteine *in vivo*. Die obere und die mittlere Reihe stellen die Bewegungsphänotypen der verschiedenen Stämme mit den gekennzeichneten Genotypen dar. Die obere Reihe zeigt eine 50-fache Vergrößerung (Hellfeld) der jeweiligen Stämme, welche zuvor auf 0,5% CTT-1,5% Agar-Platten getropft, bei 32°C für 24 Stunden inkubiert und anschließend unter dem Stereomikroskop fotografiert wurden. Die mittlere Reihe zeigt eine 400-fache Vergrößerung (Phasenkontrast) der jeweiligen Zellen auf einem Objektträger mit einer dünnen Agarschicht aufgenommen an dem Durchlicht Mikroskop. Der weiße Balken auf der Abbildung des Wildtyp Stammes entspricht 5 mm (oben) bzw. 50 µm (mitte). Unterhalb der Bilder ist die Richtungswechselperiode (RP) der jeweiligen Stämme angegeben. Die untere Reihe gibt die Lokalisierung der der jeweiligen YFP-MglA Fusionen in den angegebenen Stämmen wieder. Die abgebildeten Fluoreszenzaufnahmen erfolgten mit dem YFP Filter, bei einer Belichtungsdauer von 450 ms und einer UV-Lichtintensität von 10%. Die Lokalisierung der Fusionsproteine wird im Text detailliert beschrieben.

Für die Betrachtung der YFP-MglA Proteine wurden die jeweiligen Stämme übernacht in 1% CTT-Medium kultiviert und anschließend auf mit Agar beschichtete Objektträger getropft (Kap. 3.6.2/3). Daraufhin wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

YFP-MglA lokalisiert vorwiegend an einem Pol innerhalb der Zelle (Abb. 21). Diese Lokalisierung zeigt sich sowohl in Zellen der *mgIA9* Mutante (SA3359) wie auch in Wildtyp Zellen (SA3364). Dagegen zeigt das YFP-MglA^{gof}

Protein vorwiegend ein Lokalisierungsmuster, entweder am Zellpol (Abb. 21) oder mit einem Lokalisierungsmuster innerhalb der Zelle. Dieses Lokalisierungsmuster ist in *mgIA9* (SA3360) und Wildtyp Zellen (SA3365) zu beobachten (Abb. 21). Das $MgIA^{lof}$ Protein, fusioniert zu YFP (YFP- $MgIA^{lof}$), verteilt sich homogen in der gesamten Zelle ohne jegliche Lokalisierungsmuster innerhalb der Zelle aufzuweisen. Diese homogene Verteilung ist sowohl in der *mgIA9* Mutante wie auch in Wildtyp Zellen zuerkennen (Abb. 21, SA3361 und SA3366). In Zeitrafferaufnahmen konnte keine Änderung dieser homogenen Verteilung des YFP- $MgIA^{lof}$ Proteins über einen Zeitraum von 15 Minuten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Zellen, welche die YFP- $MgIA$ und YFP- $MgIA^{9of}$ Fusionen enthalten, neben dem genannten Lokalisierungsmuster einen hohen Fluoreszenzsignalhintergrund innerhalb der Zelle aufweisen (Abb. 21).

Um zu gewährleisten, dass die beobachtete Lokalisierung der jeweiligen Proteine nicht auf einer zu geringen oder zu starken Produktion der Fusionsproteine beruht, wurden die YFP- $MgIA$ bzw. $MgIA$ Proteine in Western Blot Analysen unter der Verwendung von anti- $MgIA$ bzw. anti-GFP (detektieren ebenfalls YFP) Antikörpern detektiert (Abb. 22). Die Fusionsproteine zeigen in allen sechs dargestellten Stämmen ein erwartetes Molekulargewicht von ungefähr 50 kDa. Dieses Molekulargewicht ist mit den anti- $MgIA$ wie auch mit den anti-GFP Antikörpern nachweisbar.

Werden die gebildeten $MgIA$ Mengen (Abb. 22, anti- $MgIA$ Blot) der verschiedenen Stämme (Abb. 22, anti- $MgIA$, Spur 3 bis 8) mit dem des Wildtyps (Abb. 22, anti- $MgIA$, Spur 1) verglichen, ist zu erkennen, dass nur geringfügig weniger YFP- $MgIA$ gebildet wird als $MgIA$ in Wildtyp Zellen. In Zellen, welche neben der nativen $MgIA$ Kopie eine YFP- $MgIA^+$ Fusion enthalten (*mgIA+/yfp-linker-mgIA⁺*, Spur 6; *mgIA+/yfp-linker-mgIA^{9of}*, Spur 7; *mgIA+/yfp-linker-mgIA^{lof}*, Spur 8) werden etwas mehr Mengen an $MgIA$, verglichen mit dem Wildtyp, mit der erwarteten Molekulargewicht von ca. 22 kDa, produziert. In der *mgIA9* Mutante werden von den YFP- $MgIA$ und den YFP- $MgIA^{9of}$ Proteinen (Abb. 22, anti- $MgIA$, Spur 3 und 4), neben dem gesamten Fusionsprotein, eine gewisse Menge eines Degradierungsproduktes nachgewiesen, welche etwas höher läuft

als MglA in einer SDS-Page. In Zellen, die nur das YFP-MglA^{lof} Protein beinhalten (*mgIA9/yfp-linker-mglA^{lof}*, Spur 5), weisen die anti-MglA Antikörper ausschließlich das gesamte Fusionsprotein nach.

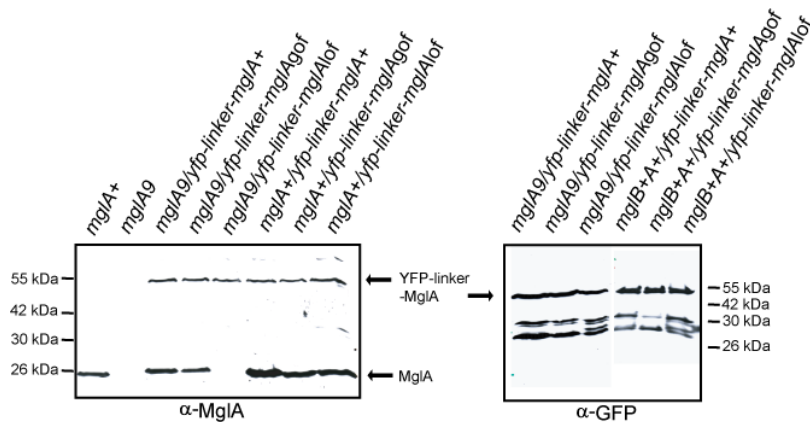


Abbildung 22: Akkumulation der verschiedenen YFP-MglA Proteine *in vivo*. In Western Blot Analysen wurden die verschiedenen MglA und YFP-MglA Proteine mithilfe eines anti-MglA bzw. anti-GFP Antikörpers in den Zellextrakten der Stämme mit den gekennzeichneten Genotypen nachgewiesen. Hierzu wurde Protein von gleichen Mengen an Zellen in einer SDS-PAGE nach Lämmli aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrocellulose Membran transferiert und die MglA Proteine mit dem genannten Antikörper detektiert. Links neben der ersten Spur wird jeweils die Auftrennung des Page Ruler Prestained Markers in kDa angedeutet. Die erwartete Laufhöhe des MglA Proteins und des YFP-MglA Proteins ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. **A**] Nachweis der verschiedenen MglA und YFP-MglA Proteine mithilfe eines anti-MglA Antikörpers. **B**] Detektion der verschiedenen MglA und YFP-MglA Proteine mithilfe eines anti-GFP Antikörpers.

Werden die verschiedenen YFP-MglA Fusionen in der *mgIA9* Mutante und im Wildtyp (Abb. 22, anti-GFP, Spur 1 bis 6) mit dem anti-GFP Antikörper nachgewiesen, werden neben dem gesamten Fusionsprotein zwei Degradierungsprodukte detektiert. Diese Degradierungsprodukte werden nicht von dem anti-MglA Antikörper erkannt und sind demnach eher den YFP Proteinen zuzuordnen, wobei vermutlich jeweils noch kurze Stücke des MglA Proteins enthalten sind.

Folglich scheinen die Lokalisierungsmuster des YFP-MglA⁺, YFP-MglA^{9of} Proteins bzw. die homogene Verteilung des YFP-MglA^{lof} innerhalb der Zelle auf der Funktion der jeweiligen MglA Form zu beruhen. Die Degradierungsprodukte (anti GFP Blot) könnten den hohen Fluoreszenzsignalhintergrund in den Zellen hervorrufen. Dennoch scheinen die Degradierungsprodukte nicht die Funktion der jeweiligen Fusionsproteine zu beeinflussen, da unter anderem Bewegungsanalysen zeigen, dass die Fusionskonstrukte sich wie die Mutanten, die nicht mit YFP fusioniert sind, verhalten.

4.2.5 Betrachtung der YFP-MglA⁺ Lokalisierung während der zellulären Fortbewegung

Die beschriebene Lokalisierung von YFP-MglA⁺ wurde bisher ausschließlich in mehr oder weniger statischen Zellen betrachtet. Um eine Aussage über das dynamische Verhalten des Proteins treffen zu können, wurden die Zellen des Stammes SA3359 (*mglA9/yfp-linker-mglA⁺*) erneut unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet (vergl. Kap. 4.2.4) und Zeitrafferaufnahmen durchgeführt. Der Fokus wurde sowohl auf Zellen gerichtet, welche sich nur in eine Richtung vorwärts bewegten, als auch auf Zellen die einen Richtungswechsel in ihrer Bewegung vollzogen. Hierzu wurden alle 30 Sekunden Bilder von Zellen, die mehr als eine Zelllänge von anderen Zellen entfernt waren, mit dem YFP Filter über den Zeitraum von ca. 15 Minuten aufgenommen.

In Zellen, die sich nur in eine Richtung vorwärts bewegen, lokalisiert YFP-MglA⁺ hauptsächlich am vorderen Zellpol (Abb. 23A). Für eine Quantifizierung der sichtbaren polaren Lokalisierung von YFP-MglA⁺ wurde die Metamorph „linescan tool“ Funktion verwendet. In dem Metamorph Programm wurde eine Linie durch die Zelle hindurch gelegt und die mittlere Graustufen Intensität entlang dieser Linie ermittelt und dargestellt (Abb. 23A, rote Linie im Graph). In allen untersuchten Zellen (N=25 Zellen) ist zu erkennen, dass das Fluoreszenzsignal des YFP-MglA⁺ am intensivsten an dem vorderen Pol lokalisiert, wenn sich eine Zelle vorwärts bewegt.

Um zu erfahren ob sich die Lokalisierung des Proteins während eines für *M. xanthus* charakteristischen Richtungswechsel in der Bewegung ändert, wurden erneut Zeitrafferaufnahmen wie zuvor beschrieben durchgeführt und Zellen betrachtet, welche die Richtung ihrer Bewegung änderten. Das Fluoreszenzsignal innerhalb der Zellen wurde mit der Metamorph „linescan tool“ Funktion quantifiziert.

Bewegt sich die Zelle vorwärts so ist zunächst das YFP-MglA⁺ Signal am vorderen Pol lokalisiert (Abb. 23B). Nach einer gewissen Zeit der Vorwärtsbewegung ändert sich das Lokalisierungsmuster des YFP-MglA⁺ Signals. Die Fluoreszenzlichtintensität am vorderen Zellpol wird geringer, wobei das Signal innerhalb der Zelle zunimmt (Abb. 23B, 2:30 min). Zusätzlich wird

am hinteren Pol verstärkt YFP-MglA⁺ sichtbar (Abb. 23B 4:30 min), die Zelle stoppt ihre Vorwärtsbewegung (Abb. 23B, 5 min) und die Intensität am hinteren Zellpol ist stärker verglichen mit dem Signal am vorderen Pol (Abb. 23B, 5:30 min). Während die Zelle beginnt sich in die entgegengesetzte Richtung fortzubewegen, lokalisiert das Fluoreszenzsignal des YFP-MglA⁺ deutlich an dem neuen vorderen Pol der Zelle (Abb. 23B, 6 min). Die Zelle bewegt sich erneut vorwärts mit YFP-MglA⁺ am neuen vorderen Zellpol.

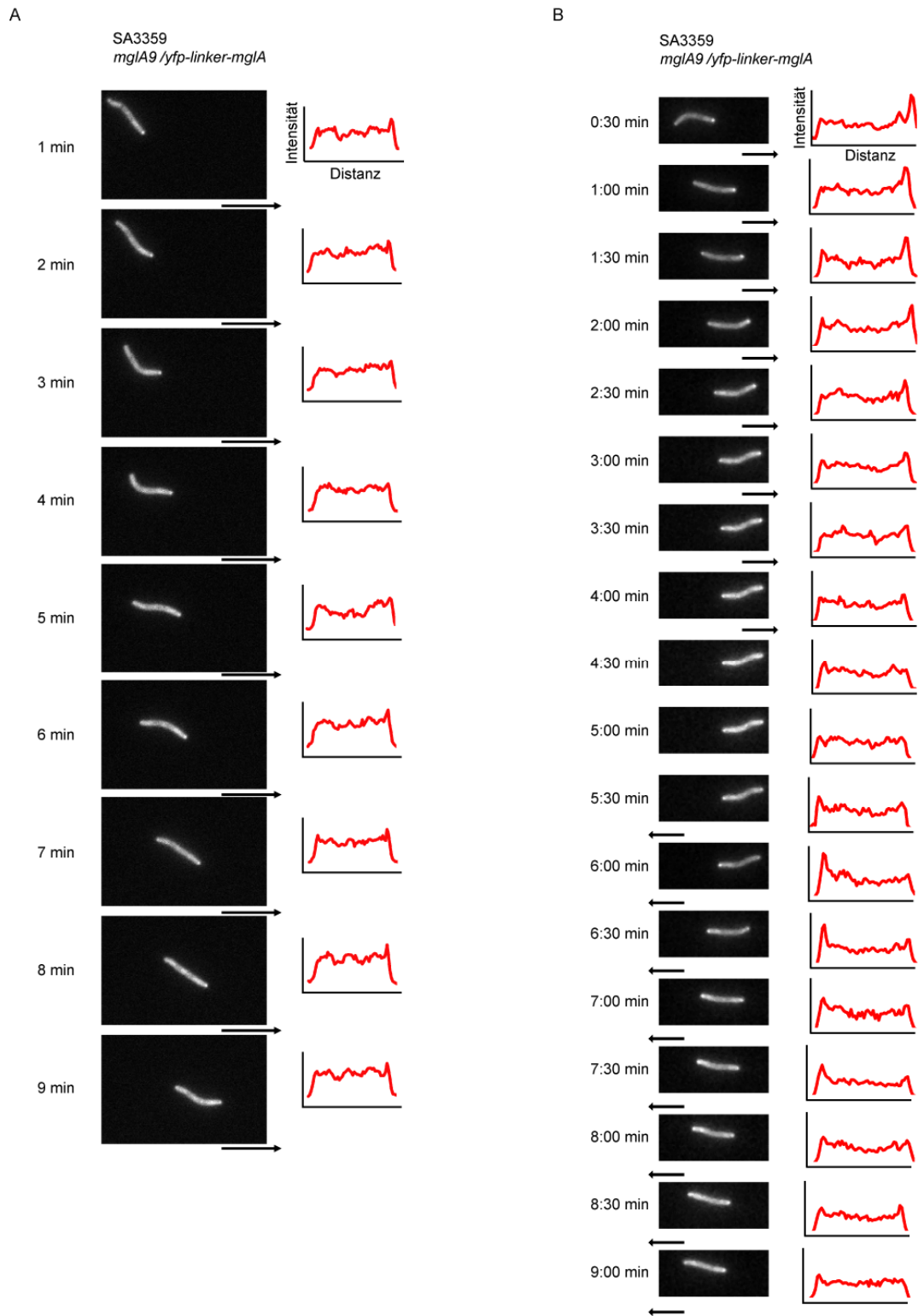


Abbildung 23: Lokalisierung von YFP-MglA⁺ während der zellulären Bewegung. Es wurden Zeitrafferaufnahmen der SA3359 Zellen auf Objektträgern mit einer dünnen Agarschicht unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer 1000-fachen Vergrößerung betrachtet. Die Zellen wurden bei einer Belichtungsdauer von 450 ms und einer UV-Lichtintensität von 10% alle 30 Sekunden abgebildet. Gezeigt sind die Fluoreszenzaufnahmen des YFP Filters. Die Pfeile deuten die Bewegungsrichtung der Zelle an, neben den Bildern wird zum einen die Zeit der Aufnahme in Minuten wiedergegeben und zum anderen die quantifizierte mittlere

Graustufenintensität der YFP-MglA Signale in der Zelle (rote Linie). **A|** Darstellung der YFP-MglA Lokalisierung in einer sich vorwärts bewegenden Zelle. **B|** Zeigt die dynamische Lokalisierung von YFP-MglA⁺ während eines Richtungswechsels einer Zelle. Nach 5:00 Minuten stoppt die Zelle ihre Vorwärtsbewegung und nach 6:00 Minuten wechselt sie die Richtung ihrer Bewegung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das YFP-MglA⁺ Signal zunächst vom vorderen Zellpol zum hinteren Pol wechselt und dann die Zelle ihre Bewegungsrichtung ändert. Diese dynamische Lokalisierung des YFP-MglA⁺ Proteins von dem vorderen Pol zum hinteren Zellpol wird in allen betrachteten Zellen jeweils in einem Zeitraum von ca. 3 bis 4 Minuten vollendet (N=25 Zellen) (Abb. 23, 2:30-6:00 min). Lokalisiert das YFP-MglA⁺ Signal am hinteren Pol, so führt die Zelle einen Richtungswechsel durch.

Folglich scheint es einen Zusammenhang zwischen vollendeter dynamischer YFP-MglA⁺ Lokalisierung und einem Richtungswechsel in der zellulären Bewegung zu geben. Sobald das YFP-MglA⁺ Fluoreszenzsignal am hinteren Zellpol einer Zelle lokalisiert, wechselt die Zelle ihre Bewegungsrichtung.

4.2.6 Untersuchung der YFP-MglA^{gof} Lokalisierung während der zellulären Bewegung

Das MglA^{gof} Protein lokalisiert am Zellpol oder zeigt ein Lokalisierungsmuster innerhalb der Zellen (vergl. Abb. 21). Für die Analyse der YFP-MglA^{gof} Lokalisierung während der zellulären Bewegung und um festzustellen ob die verschiedenen Lokalisierungsmuster von MglA^{gof} auf eine dynamische Lokalisierung des Proteins zurück zuführen sind, wurden Zeitrafferaufnahmen des Stammes SA3360 (*mgIA9/yfp-linker-mglA^{gof}*) erstellt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals innerhalb der Zelle mit der Metamorph „linescan tool“ Funktion.

Die Zellen des Stammes SA3360 haben eine verkürzte Richtungswechselperiode und wechseln die Richtung der Bewegung ca. alle fünf Minuten. In Abbildung 25A ist eine Zelle dargestellt, welche in der Zeit von 11 Minuten dreimal die Bewegungsrichtung ändert. Zunächst ist das YFP-MglA^{gof} Signal im vorderen Teil der Zelle lokalisiert (Abb. 24A; 0:30 min). Die Zelle bewegt sich weiter vorwärts und das YFP-MglA^{gof} Fluoreszenzsignal wandert Richtung hinteren Zellpol. Nach 2:30 Minuten gelangt das

Fusionsprotein am hinteren Zellpol an und dann wechselt die Zelle ihre Bewegungsrichtung. Anschließend beginnt das YFP-MglA Signal erneut in Richtung des neuen hinteren Zellpols zu wandern (Abb. 24A, 4:00). Nach 6:30 Minuten erreicht das Fusionsprotein erneut den hinteren Zellpol und wiederholt wechselt die Zelle die Richtung ihrer Bewegung. Dieser Ablauf wiederholt sich ein weiteres Mal, das YFP-MglA^{gof} Signal wandert zum hinteren Zellpol und daraufhin vollzieht die Zelle einen Richtungswechsel (Abb. 24A, 10:30). Folglich benötigt das YFP-MglA^{gof} Signal insgesamt 3,5 bis 4 Minuten, um von dem vorderen Zellpol zum hinteren zu gelangen (Abb. 24, 2:30-6:30 min). Trifft das YFP-MglA^{gof} Signal am hinteren Zellpol an so wechselt die Zelle ihre Bewegungsrichtung. Die Quantifizierung der Fluoreszenzlichtintensität in der Zelle zeigt besonders anschaulich wie das YFP-MglA^{gof} Signal von einem Zellpol, durch die Zelle hindurch, zum gegenüberliegenden Zellpol wandert (Abb. 24A, Graph). Die beschriebene zeitliche Abfolge der dynamischen MglA^{gof} Lokalisierung konnte in allen analysierten Zellen (N=25 Zellen) des Stammes SA3360 beobachtet werden. Demnach besteht ein Zusammenhang zwischen der dynamischen MglA^{gof} Lokalisierung und den zellulären Richtungswechseln.

Der Unterschied der Lokalisierung des konstitutiv aktiven Proteins verglichen zu der Verteilung des nativen Proteins (YFP-MglA⁺) besteht in dem deutlich sichtbaren Transfer des MglA^{gof} Proteins von dem vorderen Zellpol zum hinteren Pol der Zelle.

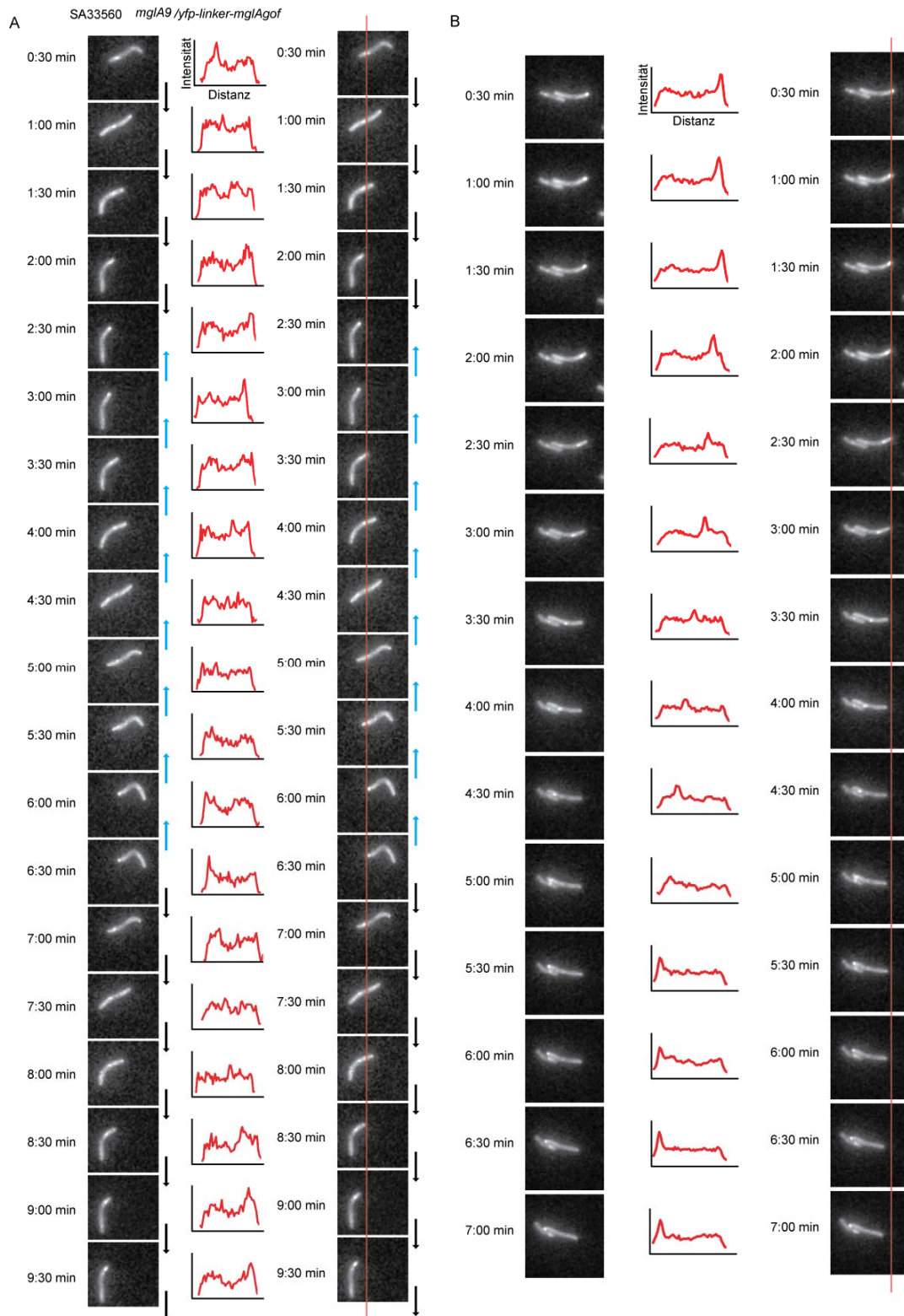


Abbildung 24: Lokalisierung von YFP-MgIA^{9of} während der zellulären Bewegung. Die Zellen des Stammes SA3360 wurden auf Objektträgern mit einer dünnen Agarschicht getropft und anschließend bei einer 1000 fachen Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Zellen wurden bei einer Belichtungsdauer von 450 ms und einer UV-Lichtintensität von 10% alle 30 Sekunden in Zeitrafferaufnahmen abgebildet. Gezeigt sind die Fluoreszenzaufnahmen des YFP Filters. Die Pfeile deuten die Bewegungsrichtung der Zelle an,

neben den Bildern wird zum einen die Zeit der Aufnahme in Minuten wiedergegeben und zum anderen die quantifizierte mittlere Graustufenintensität der YFP-MglA Signale in der Zelle (rote Linie). **A|** Die linke Reihe zeigt die dynamische Lokalisierung von YFP-MglA^{gof} während verschiedener Richtungswechsel in einer Zelle. Die rechte Reihe ist identisch zu der linken Reihe, hier wurde nur zusätzlich eine rote Linie durch das YFP-MglA^{gof} Signal des ersten Bildes gelegt, um das Signal innerhalb der Zelle über die Zeit besser verfolgen zu können. **B|** Dargestellt ist die dynamische Lokalisierung von YFP-MglA^{gof} in einer Zelle, welche in dem Agar fixiert ist (linke Reihe). Die rechte Reihe stellt die linke Reihe dar, wobei zusätzlich eine rote Linie durch das YFP-MglA^{gof} Signal des ersten Bildes gelegt wurde, um das Signal innerhalb der Zelle über die Zeit besser verfolgen zu können.

Aufgrund der beschriebenen und dargestellten dynamischen Lokalisierung des YFP-MglA^{gof} Proteins könnte vermutet werden, dass sich nur die Zelle vorwärts bewegt, wobei das Fluoreszenzsignal relativ zur Umgebung bewegungslos bleibt. Dementsprechend würde das YFP-MglA^{gof} Protein nicht von dem vorderen Zellpol zum hinteren Pol wandern, sondern passiv durch die Zellbewegung dorthin gelangen. Werden jedoch Zellen betrachtet, welche in dem Agar fixiert vorliegen und sich nicht vorwärts bewegen können (Abb. 24B), wird deutlich, dass das Signal des YFP-MglA^{gof} Proteins sich von einem Pol zum anderen bewegt. Die Zelle in Abbildung 24B bewegt sich nicht, dennoch wandert das YFP-MglA^{gof} Signal innerhalb von ca. 4 Minuten von dem einem Pol der Zelle zum gegenüberliegenden Zellpol. Demnach basiert die dynamische MglA^{gof} Lokalisierung tatsächlich auf einem Transfer des Proteins von dem vorderen Zellpol zum hinteren Pol der Zelle.

4.2.7 Untersuchung der RomR-GFP Lokalisierung in verschiedenen *mgIA* Mutanten

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Mechanismus, welcher die Zellen befähigt die Polarität der A-Bewegungsmaschinerie während eines Richtungswechsels der Zelle zu ändern. Das RomR Protein ist essentiell für die Funktion des A-Bewegungssystem und die dynamische RomR Lokalisierung hat einen entscheidenden Einfluss auf die Richtungswechsel der Zellen, welche sich mittels des A-System bewegen (Kap. 4.2). Infolgedessen ist die Verteilung der RomR-GFP Proteine in den verschiedenen *mgIA* Mutanten von Interesse.

In der bewegungsunfähigen *mgIA9* Mutante (vergl. Kap. 4.2.4) lokalisiert RomR-GFP in 90% der Zellen (SA2042) nur an einem Zellpol (Abb. 25), während in Zellen mit einer intakten Kopie des *mgIA*⁺ Gens RomR-GFP polar asymmetrisch lokalisiert (SA2271). In dem Stamm SA2271 befindet sich die

stärkere Ansammlung des Fusionsproteins am hinteren Zellpol, was unter anderem durch die Färbung der Typ-IV-Pili dieser Zellen mithilfe des Cy3-Farbstoffs gezeigt werden konnte (Kap. 4.1.1). 88% der angefärbten SA2271 Zellen weisen die stärkere RomR-GFP Ansammlung am gegenüberliegenden Pol der gefärbten Typ-IV-Pili auf (Abb. 25). Werden die Zellen des Stammes SA2042 mit dem Cy3-Farbstoff behandelt ist erkennbar, dass RomR-GFP an dem Zellpol lokalisiert an dem sich ebenfalls die gefärbten Typ-IV-Pili befinden. Dieses Ergebnis konnte in 85% der angefärbten SA2042 Zellen (N=32 Zellen) beobachtet werden. In durchgeführten Zeitrafferaufnahmen konnte keine dynamische Lokalisierung des RomR-GFP Proteins in der *mgIA9* Mutante festgestellt werden (Tab.14). Demnach lokalisiert RomR-GFP in der *mgIA9* Mutante am falschen Zellpol, verglichen mit der RomR-GFP Lokalisierung in der *romR* Mutante (SA2271) oder in Wildtyp Zellen (SA2273). Ebenso verteilt sich das RomR-GFP Fusionsprotein in der bewegungsunfähigen *mgIA^{lof}* Mutante, welche die Kopie des *mgIA* Gens trägt, das für eine inaktive GDP gebundene Form des MglA Proteins kodiert (Abb. 25; Tab. 14; SA3337). In 86% der Zellen lokalisiert RomR-GFP nur an einem Zellpol. In 70% der Cy3 angefärbten Zellen befindet sich RomR-GFP an demselben Pol wie die Typ-IV-Pili (N=25 Zellen). In den Zellen der *mgIA^{lof}* Mutante zeigt RomR-GFP ebenfalls keine dynamische Lokalisierung zwischen den beiden Zellpolen.

Wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben zeigen die Zellen des Stammes SA3334, welche eine konstitutiv aktive Kopie des *mgIA* Gens (*mgIA^{gof}*) im Chromosom tragen, eine verkürzte Richtungswechselperiode und vollziehen alle 4 bis 5 Minuten einen Richtungswechsel. In diesen Zellen verteilt sich das RomR-GFP Fusionsprotein (SA3336) symmetrisch an beiden Zellpolen. In 83 % der Zellen ist eine deutliche symmetrische Verteilung des RomR Proteins sichtbar (Abb. 25; Tab. 14). Die übrigen 17% der Zellen zeigen ebenfalls nur geringe Unterschiede in der RomR-GFP Verteilung an den beiden Polen. Demnach bewirkt die *MglA^{gof}* Form in den Zellen eine symmetrische Verteilung des RomR-GFP Proteins. In Zeitrafferaufnahmen und darauffolgenden Quantifizierungen des relativen Fluoreszenzsignals in den Zellen ist es nicht möglich einen Wechsel des RomR-GFP Proteins vom alten hinteren Zellpol zum neuen hinteren Zellpol zu beobachten, da die Unterschiede in der

Fluoreszenzsignalintensität an den beiden Polen zum Teil zu gering sind (Daten nicht gezeigt).

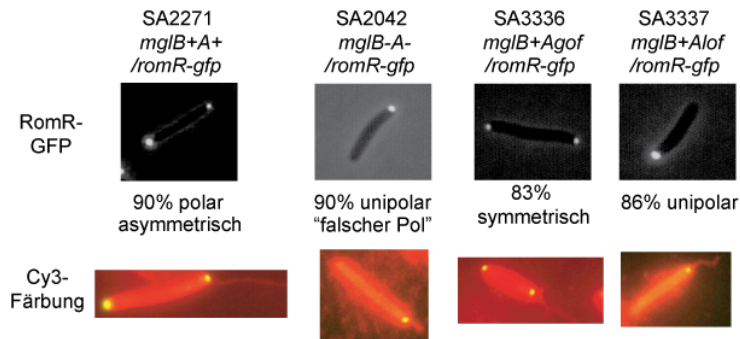


Abbildung 25: Lokalisierung von RomR-GFP in den verschiedenen *mglA* Mutanten. Darstellung der Lokalisierung von RomR-GFP in den gekennzeichneten Stämmen. Die Aufnahmen der Zellen wurden bei einer 1000-fachen Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer 100% UV-Lichtintensität und einer Belichtungsdauer von 200 ms durchgeführt. Abgebildet wurden die jeweiligen Überlagerungsbilder der verschiedenen Fluoreszenzfilter und der Phasenkontrastaufnahme. In der oberen Reihe ist die Lokalisierung von RomR-GFP gezeigt, wobei unter den Bildern die polare Verteilung in Prozent angegeben wird. Die untere Reihe stellt die RomR-GFP Verteilung zusammen mit der Lokalisierung der Typ-IV-Pili (Cy3-Färbung) dar. Eine detaillierte Erläuterung der Lokalisierung ist im Text zu finden.

4.2.8 Analyse des Signalwegs für die Induzierung der Richtungswechsel der Zellen

Das Frz-System und MglA agieren in demselben Signalweg, um Richtungswechsel in Zellen zu induzieren, welche sich mit dem A-System fortbewegen (Kap. 4.2.3). Die Lokalisierung von RomR in den Zellen ist abhängig von dem Frz-System (Kap. 4.1.5) und dem MglA Protein (Kap. 4.2.7). Die dynamische Lokalisierung von RomR ist wiederum involviert in die Richtungswechsel der Zellen.

Basierend auf den genannten Ergebnissen stellt sich die Frage, wie diese drei Systeme bzw. Proteine untereinander agieren, um den Richtungswechsel der Zellen einzuleiten und so die Polarität des A-Bewegungssystems zu ändern, damit die Zellen sich erneut in umgekehrter Richtung fortbewegen können. Hierzu wurde die RomR-GFP Lokalisierung in verschiedenen *frz* und *mglA* Doppelmutanten in Zeitrafferaufnahmen untersucht.

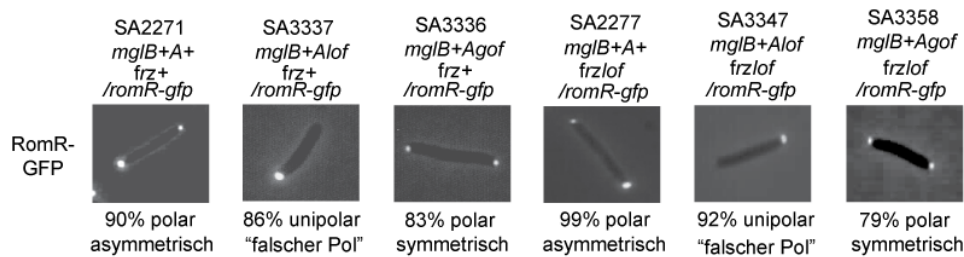


Abbildung 26: Darstellung von RomR-GFP in verschiedenen *mglA* und *frz* Mutanten. Die Zellen der angegebenen Stämme wurden bei einer 1000-fachen Vergrößerung an dem Fluoreszenzmikroskop bei einer 100% UV-Lichtintensität und einer Belichtungsdauer von 200 ms betrachtet. Abgebildet wurden die jeweiligen Überlagerungsbilder des GFP Filters und der Phasenkontrastaufnahme. Unter den Bildern wird die polare RomR-GFP Verteilung in Prozent angegeben. Eine detaillierte Erläuterung der Lokalisierung ist im Text zu finden.

Das in *frz*⁺ und *mglA*⁺ Zellen polar asymmetrisch verteilte RomR-GFP (Abb. 26; SA2271) lokalisiert in einer *mglB*⁺*A*^{lof} Mutante ausschließlich an dem Zellpol, an dem die Typ-IV-Pili vorhanden sind (Abb. 25/26; SA3337, 86% der Zellen) und RomR-GFP vollzieht keinen dynamischen Wechsel zwischen den Polen wie in SA2271 Zellen. In einer *frz*^{lof} Mutante (*frzCD::Tn5lacΩ536*, SA2277) lokalisiert das Fusionsprotein deutlich polar asymmetrisch (Abb. 26), mit der verstärkten Ansammlung von RomR-GFP am hinteren Zellpol. Jedoch zeigt das RomR-GFP Protein keine dynamische Lokalisierung und die Zellen vollziehen keine Richtungswechsel (Tab. 14). In Zellen einer Doppelmutante mit einer *frz*^{lof} und einer *mglB*⁺*A*^{lof} Mutation (SA3347) lokalisiert RomR-GFP dagegen wie in einer *mglB*⁺*A*^{lof} Mutante (SA3337) ausschließlich an einem Zellpol (Abb. 26). Dieser Pol ist derjenige an dem sich die Type-IV-Poli befinden (Daten nicht gezeigt). Die Zellen der *mglB*⁺*A*^{lof}, *frz*^{lof} Doppelmutante sind wie die *mglB*⁺*A*^{lof} Mutante bewegungsunfähig.

In Zellen, die das *MglA*^{gof} Protein enthalten, verteilt sich RomR-GFP symmetrisch an beiden Polen (Abb. 26; SA3336). Eine dynamische Lokalisierung ist nicht zu detektieren, eventuell ist dies aber auf die geringen Intensitätsunterschiede der Signale an beiden Polen zurückzuführen. Ebenso lokalisiert RomR-GFP in Zellen, welche neben dem *MglA*^{gof} Protein ein inaktives *Frz*-System (*frz*^{lof}, SA3358; Abb. 26) beinhalten. RomR-GFP verteilt sich gleichmäßig an beiden Polen (79% der Zellen) und eine dynamische Lokalisierung ist nicht detektierbar. Die Zellen wechseln häufig ihre Bewegungsrichtung, ca. alle fünf Minuten, vergleichbar mit den Zellen des Stammes SA3336.

Demnach ist die RomR Lokalisierung unabhängig von der jeweiligen *frz* Mutation in der Doppelmutante, steht jedoch unter dem Einfluss der jeweiligen *mgIA* Mutation in diesen Zellen. Dies bestätigt, dass MglA stromabwärts des Frz-Systems, in demselben Signalweg arbeitet. Zusätzlich deutet es an, dass RomR stromabwärts von MglA agiert, wobei MglA vermutlich die RomR Lokalisierung beeinflusst und derart die Richtungswechsel der Zellen beeinflusst.

4.2.9 Untersuchung des Zusammenspiels der MglA und RomR Proteine für die Induzierung von Richtungswechseln

Neben der RomR-GFP Lokalisierung in den verschiedenen *mgIA* Mutanten (Kap. 4.2.7) ist die Verteilung der RomR^{D53N}-GFP und RomR^{D53E}-GFP Mutantenproteine in diesen Stämmen von Interesse. Denn die Phosphorylierung des Aspartatrestes in RomR hat einen Einfluss auf den Richtungswechsel der Zellen und ebenfalls auf die dynamische RomR Lokalisierung zwischen den Polen (vergl. Kap. 4.1.4).

Das RomR^{D53N}-GFP Protein lokalisiert polar asymmetrisch (SA2062), mit der verstärkten Ansammlung des Fusionsproteins am hinteren Pol. Verglichen mit Zellen welche, das native RomR-GFP (SA2058) besitzen, vollziehen diese Zellen keine Richtungswechsel (Tab. 14) und RomR^{D53N}-GFP zeigt keine dynamische Lokalisierung zwischen den Polen (Tab. 14).

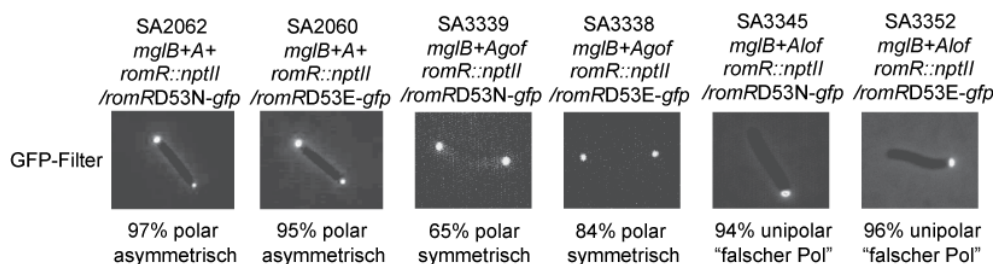


Abbildung 27: Verteilung verschiedener RomR-GFP Proteine in Zellen einer *mgIA* Mutanten. Gezeigt ist die Lokalisierung verschiedener RomR Proteine, fusioniert zu GFP, in den gekennzeichneten Stämmen. Die Aufnahmen der Zellen wurden bei einer 1000-fachen Vergrößerung an dem Fluoreszenzmikroskop, bei einer 100% UV-Lichtintensität und einer Belichtungsdauer von 200 ms durchgeführt. Dargestellt sind die jeweiligen Überlagerungsbilder des GFP Filters und der Phasenkontrastaufnahme. Unter den Bildern ist die polare Verteilung der verschiedenen RomR-GFP Proteine in Prozent angegeben. Eine detaillierte Erläuterung der Lokalisierung ist im Text zu finden.

In Zellen, welche das RomR^{D53E}-GFP Protein (Stamm, SA2060) beinhalten, lokalisiert RomR^{D53E}-GFP ebenfalls polar asymmetrisch, mit der

stärkeren Ansammlung des RomR^{D53E}-GFP Proteins am hinteren Pol in sich bewegendenden Zellen (Abb. 27; Tab. 14). Jedoch zeigen diese Zellen 1,5 mal häufiger einen Richtungswechsel, verglichen mit dem Stamm SA2058 (Tab. 14), und jeder dieser Richtungswechsel wird von einem Wechsel des RomR^{D53E}-GFP Signals von dem alten hinteren Pol zum neuen hinteren Pol begleitet (Tab. 14). Die Substitutionmutante RomR^{D53E} scheint die strukturelle Konformation des phosphorylierten RomR Proteins partiell zu imitieren und so die Richtungswechsel der Zelle zu beeinflussen.

Das RomR^{D53N}-GFP bzw. RomR^{D53E}-GFP Protein lokalisiert in der *mgIB⁺A^{lof}* Mutante (SA3345 bzw. SA3352) ähnlich wie RomR-GFP in diesen Zellen (Abb. 27). In ungefähr 90% der Zellen lokalisiert das jeweilige Fusionsprotein nur an einem Zellpol und es ist keine dynamische Lokalisierung zwischen den beiden Zellpolen zu beobachten. In ca. 75% der Cy3 angefärbten Zellen befindet sich RomR^{D53N}-GFP bzw. RomR^{D53E}-GFP an demselben Pol wie die Typ-IV-Pili (N=20 Zellen; Daten nicht gezeigt).

In der *mgIB⁺A^{gof}* Mutante zeigt das RomR^{D53N}-GFP bzw. RomR^{D53E}-GFP Protein eine deutliche symmetrische Verteilung, vergleichbar mit der Lokalisierung von RomR-GFP in dieser Mutante (Abb. 27; Tab. 14). Ebenfalls ist es nicht möglich in den Zellen des Stammes SA3339 (*mgIB⁺A^{gof}, romR^{D53E}-gfp*) bzw. SA3338 (*mgIB⁺A^{gof}, romR^{D53E}-gfp*) einen Wechsel des jeweiligen Fusionsproteins vom alten hinteren Zellpol zum neuen hinteren Zellpol zu beobachten. Dies könnte auf den geringen Unterschieden in der Fluoreszenzsignalintensität an den beiden Polen beruhen (Daten nicht gezeigt). Die Zellen des Stammes SA3339 wechseln die Bewegungsrichtung alle 6 Minuten (N=25 Zellen), ähnlich häufig wie die Zellen des Stammes SA3334 (*mgIB⁺A^{gof}*). SA3338 Zellen, welche das MglA^{gof} Protein und das RomR^{D53E}-GFP Protein beinhalten, wechseln sehr häufig die Richtung ihrer Bewegung, wobei die Zellen zum Teil eher ein Zucken in ihrer Bewegung zeigen, als einen vollständigen Richtungswechsel. Ein Richtungswechsel einer Zelle ist definiert durch eine Vorwärtsbewegung der Zelle um mindestens 2 µm (entspricht ca. 1/3 der Zelllänge), bevor sich die Zelle in die entgegengesetzte Richtung weiter bewegt. Ein Zucken in der Bewegung entspricht dagegen einer Vorwärtsbewegung der Zelle von weniger als 1 µm in die eine Richtung und

erneut in die entgegengesetzte Richtung. In einem Zeitraum von 10 Minuten zucken die Zellen zum Teil 10mal oder häufiger (N=25 Zellen).

Zusammengefasst ist die polare symmetrische Lokalisierung des RomR Proteins in der *mgIB⁺A^{gof}* Mutante unabhängig von dem Phosphorylierungsstatus des RomR Proteins. Dennoch scheint der Phosphorylierungsstatus von RomR einen gewissen Einfluss auf die Richtungswechselperiode bzw. das Richtungswechselverhalten der Zellen einer *mgIB⁺A^{gof}* Mutante zu haben (Tab. 14).

Tabelle 14: RomR-GFP Lokalisierung und Richtungswechsel Periode.

Stamm	Genotyp			RomR Lokalisierung während der A-Bewegung	
	<i>Frz</i>	<i>mgIB</i> A	<i>romR</i> ¹	Lokalisierung von <i>romR-gfp</i> (%) bipolar asymmetrisch/bipolar symmetrisch/andere ²	Richtungswechsel- periode (/ min) / dynamische RomR Lokalisierung (+/sym/-) ³
SA2271	<i>Frz</i> ⁺	<i>mgIB</i> ⁺ A ⁺	<i>romR::nptIII</i> P _{nat} - <i>romR-gfp</i>	90/10/0	13/+
SA2058	<i>Frz</i> ⁺	<i>mgIB</i> ⁺ A ⁺	<i>romR::nptIII</i> P _{pilA} - <i>romR-gfp</i>	92/8/0	12,8/+
SA2042	<i>Frz</i> ⁺	<i>mgIA9::Tn5-132Q1901</i>	P _{nat} - <i>romR-gfp</i>	10/0/90% unipolar	NA ⁴
SA2277	<i>frz</i> ^{ot}	<i>mgIB</i> ⁺ A ⁺	P _{nat} - <i>romR-gfp</i>	98/2/0	-/-
SA3347	<i>frz</i> ^{ot}	<i>mgIB</i> ⁺ A ^{ot}	P _{nat} - <i>romR-gfp</i>	8/0/92% unipolar	NA ⁴
SA3358	<i>frz</i> ^{ot}	<i>mgIB</i> ⁺ A ^{got}	P _{nat} - <i>romR-gfp</i>	21/79/0	6,1/sym.
SA3336	<i>Frz</i> ⁺	<i>mgIB</i> ⁺ A ^{got}	P _{nat} - <i>romR-gfp</i>	17/83/0	4,6/sym.
SA3337	<i>Frz</i> ⁺	<i>mgIB</i> ⁺ A ^{ot}	P _{nat} - <i>romR-gfp</i>	14/0/86% unipolar	NA ⁴
SA2060	<i>Frz</i> ⁺	<i>mgIB</i> ⁺ A ⁺	<i>romR::nptIII</i> P _{pilA} - <i>romR</i> ^{D53E} - <i>gfp</i>	88/12/0	9,5/sym
SA2062	<i>frz</i> ⁺	<i>mgIB</i> ⁺ A ⁺	<i>romR::nptIII</i> P _{pilA} - <i>romR</i> ^{D53N} - <i>gfp</i>	89/11/0	50/-
SA3339	<i>frz</i> ⁺	<i>mgIB</i> ⁺ A ^{got}	<i>romR::nptIII</i> P _{pilA} - <i>romR</i> ^{D53N} - <i>gfp</i>	35/65/0	5,6/sym.
SA3345	<i>frz</i> ⁺	<i>mgIB</i> ⁺ A ^{ot}	<i>romR::nptIII</i> P _{pilA} - <i>romR</i> ^{D53N} - <i>gfp</i>	6/0/94% unipolar	NA ⁴
SA3338	<i>frz</i> ⁺	<i>mgIB</i> ⁺ A ^{got}	<i>romR::nptIII</i> P _{pilA} - <i>romR</i> ^{D53E} - <i>gfp</i>	16/84/0	Zucken/sym.
SA3352	<i>frz</i> ⁺	<i>mgIB</i> ⁺ A ^{ot}	<i>romR::nptIII</i> P _{pilA} - <i>romR</i> ^{D53E} - <i>gfp</i>	4/0/96% unipolar	NA ⁴

Übersicht der RomR-GFP Lokalisierung in verschiedenen Mutanten in Zusammenhang mit der Richtungswechselperiode dieser Zellen. Legende: ¹Die verschiedenen *romR-gfp* Fusionen wurden in die „phage Mx8 *attB*-site“ integriert und unter Kontrolle des *pilA* (P_{pilA}) oder des nativen *romR* Promotors (P_{nat}) exprimiert. ²Die RomR-GFP Lokalisierung wurde in jeweils 100 Zellen betrachtet und gezählt. ³Statistische Auswertung der dynamischen RomR-GFP Lokalisierung und die Bestimmung der Richtungswechselperiode (/min) von 35 Zellen in Zeitrafferaufnahmen. Werden die Richtungswechsel von einer dynamischen RomR-GFP Lokalisierung begleitet wird dies mit einem Plus (+) gekennzeichnet und falls nicht mit einem Minus (-). sym bezeichnet eine symmetrische Verteilung des RomR-GFP, weshalb vermutlich keine dynamische Lokalisierung detektierbar war. Zucken wird im Text detailliert erläutert ⁴NA=nicht anwendbar, da die Zellen bewegungsunfähig sind.

4.2.10 Betrachtung des Einflusses von MglA auf die Lokalisierung des A-Bewegungssystems Protein AglZ

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Mechanismus, welcher die Zellen befähigt die Polarität der A-Bewegungsmaschinerie während eines Richtungswechsels der Zelle zu ändern. Bisher wurde unter anderem beschrieben, welchen Einfluss MglA auf die RomR Lokalisierung ausübt. Offen ist dennoch, ob MglA auf die Lokalisierung andere Proteine einwirkt, welche essentiell für die Bewegung mittels des A-Systems sind. Desweiteren stellt sich die Frage, ob RomR in einer *mgIB⁺A⁻* bzw. *mgIB⁺A^{lof}* Mutante tatsächlich am Type-IV-Pili befindlichen Pol und somit dem „falschen“ Pol lokalisiert oder ob die Type IV Pili in diesen Zellen am hinteren Pol lokalisieren statt am vorderen.

Aus den genannten Gründen wurde die Lokalisierung von AglZ-GFP und RomR-mDsRed in den verschiedenen *mgIA* Mutanten simultan betrachtet. Hierzu wurde zunächst mittels homologer Rekombination das native *aglZ* Gen durch eine *aglZ-linker-gfp* Fusion in der chromosomalen DNA ersetzt. Wildtyp Zellen, welche die Fusion tragen, sind voll bewegungsfähig und in Western Blot Analysen kann das Fusionsprotein mithilfe von anti-GFP Antikörpern in diesen Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Wie zuvor von Mignot (Mignot *et al.*, 2007) publiziert, lokalisiert die erhaltene AglZ-GFP Fusion in Zeitrafferaufnahmen verstärkt am vorderen Zellpol (Abb. 28; SA2092, AglZ-linker-GFP) und wechselt zum neuen vorderen Pol wenn die Zelle einen Richtungswechsel vollzieht. Zusätzlich sind kleinere fokale Adhäsionssignale von AglZ-GFP entlang der gesamten Zelle lokalisiert. Diese sind auf Grund der geringeren Auflösung dieser Fluoreszenzaufnahmen (Kameraeinstellung: 2x2 Pixel Binning) in Abbildung 28 anhand eines erhöhten AglZ-GFP Signal in der Zelle sichtbar. Neben der *aglZ-linker-gfp* Fusion ist eine *romR-mDsRed* Fusion (*Pnat-romR-mDsRed*) in der „phage Mx8 *attB*-site“ im Chromosom dieser Zellen integriert. Das eingebrachte RomR-mDsRed-Fusionskonstrukt ist ebenfalls funktionsfähig (vergl. Kap. 4.1.7). RomR-mDsRed lokalisiert in diesen Zellen verstärkt am hinteren Zellpol (Abb. 28; SA2092, RomR-mDsRed) und vollzieht die dynamische RomR Lokalisierung zwischen den Polen während eines Richtungswechsels (Daten nicht gezeigt).

Demnach sind beide Fusionen in den Zellen funktionsfähig und können simultan unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. In der Überlagerung der GFP Filter und Y3 Filter Fluoreszenzaufnahmen ist zu erkennen, dass die beiden Fusionsproteine an gegenüberliegenden Zellpolen lokalisieren (Abb. 28; SA2092, Überlagerung). In Zeitrafferaufnahmen wird deutlich, dass AglZ-GFP am vorderen Pol und RomR-mDsRed am hinteren Zellpol lokalisiert (Daten nicht gezeigt).

Werden die beiden Fusionen in eine *mglA* Mutante eingebracht, lokalisiert AglZ-GFP ausschließlich an einem Zellpol, wobei scheinbar keine fokalen Adhäsionssignale des Fusionsproteins in der Zelle vorliegen (Abb. 28; SA3362, AglZ-linker-GFP). Die RomR-mDsRed Proteine sind ebenfalls nur an einem Zellpol zusehen, wie die RomR-GFP Proteine in einer *mglA* Mutante. Mittels Cy3-Färbung (Kap. 3.6.4) konnte gezeigt werden, dass RomR-GFP am Typ-IV-Pili befindlichen Pol in der $\Delta mglBA$ Mutante lokalisiert (vergl. 4.2.7). Werden die beiden Fusionsproteine gleichzeitig dargestellt so ist erkennbar, dass beide Proteine an demselben Zellpol lokalisieren (Abb. 28; SA3362, Überlagerung). Ebenso verteilen sich AglZ-GFP und RomR-mDsRed in der *mglB⁺A^{lof}* Mutante. Beide Fusionsproteine lokalisieren an ein und demselben Zellpol (Abb. 28; SA3354, Überlagerung). Demnach lokalisiert RomR in einer $\Delta mglBA$ bzw. *mglB⁺A^{lof}* Mutante nicht am hinteren Pol, sondern am vorderen Zellpol, wo sich ebenfalls die AglZ-GFP Proteine und die Typ-IV-Pili befinden.

In der *mglB⁺A^{gof}* Mutante, die häufig die Bewegungsrichtung ändert, lokalisiert RomR-mDsRed ebenso wie RomR-GFP in dieser Mutante (vergl. Kap. 4.2.7., SA3336) symmetrisch an beiden Polen (Abb. 28; SA3357, RomR-mDsRed). Vergleichbar symmetrisch verteilt sich das AglZ-GFP Protein in dieser Mutante. Die MglA^{gof} Form bewirkt dementsprechend eine symmetrische Lokalisierung der beiden A-Bewegungssystemproteine (Abb. 28; SA3357, Überlagerung).

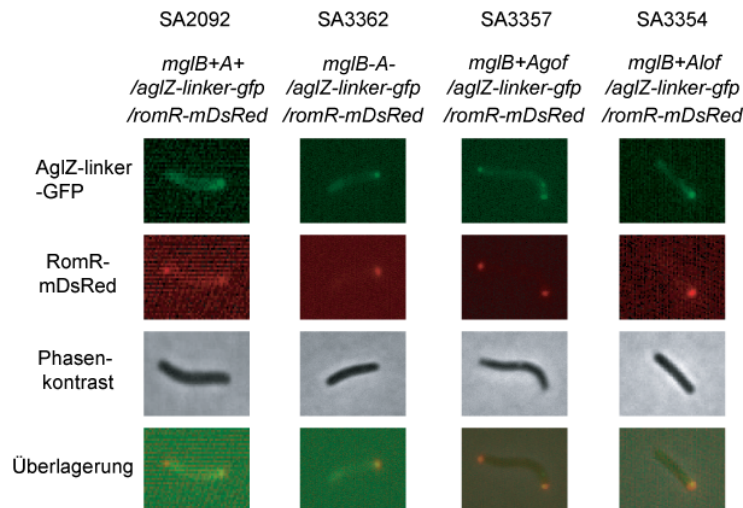


Abbildung 28: Lokalisierung von AglZ-GFP und RomR-mDsRed in *mglA* Mutanten. Die Zellen der beschriebenen Stämme wurden auf einen Objektträger mit einer dünnen Agarschicht gegeben und bei einer 1000 fachen Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Bildaufnahmen erfolgten bei einer UV-Lichtintensität von 10 %, einer Kameraauflösung von 2x2 Binning, einer Belichtungsdauer von 550 ms mit dem GFP Filter und 200 ms mit dem Y3 Filter. Abgebildet sind von oben nach unten die Bilder des GFP Filters, die des Y3 Filters, die der Phasenkontrasteinstellung und die Überlagerung der verschiedenen Fluoreszenzbilder und des Phasenkontrastbildes. Die Verteilung der Fusionsproteine wird im Text genauer beschrieben.

Zusammenfassend beeinflusst MglA nicht ausschließlich die Lokalisierung von RomR, sondern auch die Verteilung eines anderen A-Bewegungs Proteins, AglZ.

Wird dagegen die MglA Lokalisierung (*yfp-linker-mglA*⁺) in einer *aglZ* Deletionsmutante (MxH2265) betrachtet, ist erkennbar, dass YFP-MglA⁺ vorwiegend an einem Pol innerhalb der Zelle lokalisiert (Abb. 29; SA3371), vergleichbar mit der Lokalisierung des Fusionsproteins in Wildtyp Zellen (vergl. Abb. 21; SA3364). In einer *romR* Deletionsmutante (SA3300; Herstellung s. Kap. 6) dagegen verteilt sich das YFP-MglA⁺ Signal homogen in der gesamten Zelle ohne jegliche Lokalisierungsmuster in der Zelle aufzuweisen (Abb. 29; SA3367). In Western Blot Analysen kann das YFP-MglA⁺ Protein in der *aglZ* und der *romR* Mutante mit einem anti-GFP Antikörper nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine dynamische YFP-MglA Lokalisierung in den beiden A-bewegungsunfähigen Mutanten konnte nicht beobachtet werden.

Folglich beeinflusst MglA die RomR Lokalisierung und umgekehrt. Dagegen hat die Abwesenheit von AglZ keine Auswirkung auf die MglA Lokalisierung.

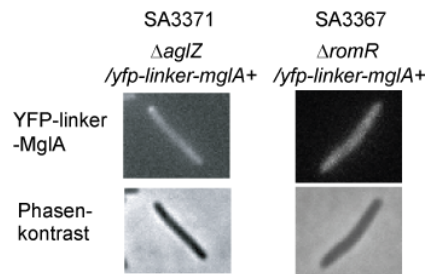


Abbildung 29: Lokalisierung von YFP-MglA⁺ in einer \DeltaaglZ und einer \DeltaromR Mutante. Veranschaulicht die Lokalisierung der YFP-MglA⁺ Fusion in einer *aglZ* Deletionsmutante (SA3371) und in einer *romR* Deletionsmutante (SA3367). Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten mit dem YFP Filter, bei einer Belichtungsdauer von 450 ms und einer UV-Lichtintensität von 10%. Neben den Fluoreszenzaufnahmen sind die Phasenkontrastbilder der jeweiligen Zelle abgebildet. Die Lokalisierung der Fusionsproteine wird im Text detailliert beschrieben.

4.2.11 Überproduktion und Aufreinigung von MglA⁺, MglA^{gof} und MglA^{lof} Proteine

Für spätere biochemische Analysen wurde *mglA⁺*, *mglA^{gof}* und *mglA^{lof}* in *E. coli* Zellen überexprimiert. Hierzu wurden die Plasmide pSL54, pSL57 bzw. pSL58 verwendet. Die Plasmide enthalten neben dem jeweiligen *mglA* Gen einen Tac-Promotor (pGEX Vektor) für eine optimale Expressionsinduktion. Vor dem Startkodon der verschiedenen *mglA*-Sequenzen befindet sich das Glutathione S-transferase (GST) Gen für die spätere Proteinaufreinigung. Die Überexpression wurde in Rosetta2 Zellen durchgeführt, da dieser *E. coli*-Stamm für die Überproduktion von Proteinen optimiert ist. Neben den genannten MglA Proteinen wurde ebenfalls das GST Protein (pGEX4-T1) unter den in Kapitel 3.7.1 beschriebenen Bedingungen überproduziert und aufgereinigt.

Die Proteine wurden in 3 Elutionsschritten mit jeweils 600 μ l Elutionspuffer mit Proteinase Inhibitor Complete ohne EDTA (Roche, Mannheim) eluiert. Die 3 verschiedenen Elutionsfraktionen der jeweiligen Aufreinigungen wurden auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 30). Das jeweilige MglA-GST Protein wird in dieser SDS-PAGE, verglichen mit dem Page Ruler Prestained Marker in der erwarteten Höhe von ca. 47 kDa aufgetrennt (Abb. 30; Spur 2-10). Das aufgereinigte GST Protein läuft in einer Höhe von ungefähr 25 kDa (Abb. 30; Spur 11-13). Die Überproduktion des jeweiligen GST-MglA Proteins ist deutlich geringer als die des GST Proteins. In allen Elutionsfraktionen sind schwache Banden anderer *E. coli* Proteine des Rosetta2 Stammes nachweisbar (Spur 2-13). Zahlreiche Optimierungen der Überproduktion wie auch der Aufreinigung der verschiedenen GST-MglA

Proteine erbrachten keine größeren Mengen Protein oder reinere Elutionsfraktionen (Daten nicht gezeigt).

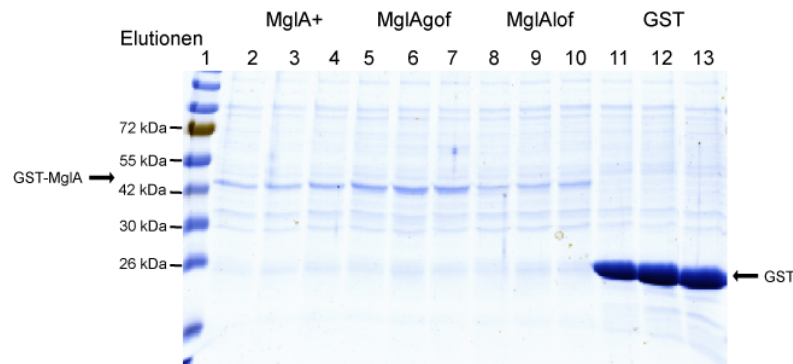


Abbildung 30: Aufreinigung der verschiedenen MgIA Proteine und des GST Proteins. Es wurden 15 μ l der verschiedenen Proben zusammen mit 10 μ l 5x Ladepuffer gemischt und auf das 14%ige SDS-Gel geladen, welches später mit Coomassie gefärbt wurde. In Spur 1 wurde der Page Ruler Prestained Marker (Fermentas) aufgetragen. Die Spuren 2-4 stellen jeweils eine Elutionsfraktion von MgIA⁺ dar, die Spuren 5-7 die des MgIA-G21V, die Spuren 8-10 die des MgIA-T26/27N und auf die Spuren 11-13 wurden jeweils die Elutionsfraktionen der GST Aufreinigung aufgetragen.

4.2.12 Nachweis der GTP Bindungsfähigkeit des MgIA⁺, MgIA^{gof} und MgIA^{lof} Proteins

Bislang wurde die Aktivität des MgIA⁺, MgIA^{gof} und MgIA^{lof} Proteins ausschließlich *in vivo* getestet. Um eine genaue Aussage bezüglich der GTPase Aktivität des MgIA Proteins treffen zu können, wurde das MgIA⁺ Protein auf die Fähigkeit GTP zu binden geprüft. Ebenso wurde das MgIA^{gof} Protein, welches im GTP gebundenen Zustand vorkommt und die GDP gebundene MgIA^{lof} Form auf die GTP Bindungsfähigkeit untersucht. Als Negativkontrolle für die GTP Bindung diente das GST Protein, als Positivkontrolle die eukaryontische kleine GTPase Cdc42 von *Ustilago maydis*. Es ist bekannt, dass Cdc42 GTP bindet und eine GTPase Aktivität zeigt (Self & Hall, 1995, Hlubek *et al.*, 2008). Das aufgereinigte GST-Cdc42 Protein wurde freundlicherweise von Kay Schink, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Bölker (Genetik), Uni-Marburg, zur Verfügung gestellt.

Die zuvor aufgereinigten Proteine MgIA, MgIA^{gof}, MgIA^{lof}, GST und das Cdc42 Protein wurden zunächst gegen 20 mM Tris-Cl pH 7,6; 50 mM NaCl₂, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT dialysiert. Anschließend erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung durch den Bradford-Test und, wenn

erforderlich, wurden die Proben mithilfe von Millipore Filtersäulen MWCO 10 kDa (Millipore, Eschborn) auf 1 mg/ml Protein ankonzentriert.

Jeweils 50 μM aufgereinigtes Protein wurde in GTP-Bindungspuffer mit 0,5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ radioaktiv-markierten α - $[^{32}\text{P}]$ GTP (Hartmann, Braunschweig) für 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in „kaltem“ Bindungspuffer mit 5 mM MgCl_2 für die Stabilisierung der alpha-GTP-Bindung verdünnt und über Nitrocellulose Filtermembranen abgefiltert. Die Filtermembranen wurden dreimal mit „kaltem“ GTP-Bindungspuffer mit 5 mM MgCl_2 gewaschen, an der Luft getrocknet und der Zerfall des radioaktiven α - $[^{32}\text{P}]$ GTP, welches an die Proteine gebunden hat, mittels eines Szintillationszählers nachgewiesen.

In der Abbildung 31 ist der Graph mit den gemessenen radioaktiven Zerfälle des α - $[^{32}\text{P}]$ GTPs pro Minute dargestellt. Die radioaktiven Zerfälle, welche in der Probe mit dem Cdc42 detektiert wurden (Abb. 31; Säule Cdc42, $>1.00\text{E}+07$), verdeutlichen, dass dieses Protein fähig ist α - $[^{32}\text{P}]$ GTP zu binden. Dagegen sind die nachgewiesenen radioaktiven Zerfälle der MglA^+ , MglA^{gof} bzw. MglA^{lof} Proteinprobe sehr gering (Abb. 31; $<2.00\text{E}+06$; Säule MglA , MglA^{gof} bzw. MglA^{lof}). Da die radioaktiven Zerfälle in der Negativkontrolle (GST Proteine) vergleichbar gering sind, sind die gemessenen Zerfälle in den verschiedenen MglA Proben und der GST Probe auf eine unspezifische Bindung des α - $[^{32}\text{P}]$ GTP zurückzuführen.

Demnach konnte unter den genannten Versuchsbedingungen kein Nachweis für eine GTP Bindungsfähigkeit des MglA^+ , MglA^{gof} bzw. MglA^{lof} Proteins erbracht werden.

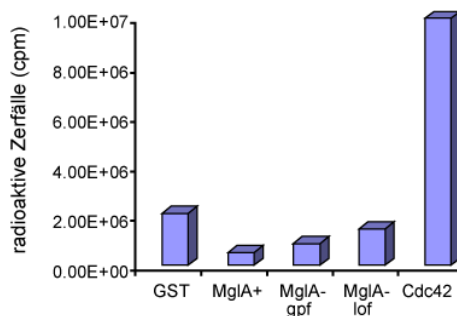


Abbildung 31: Detektierte radioaktive Zerfälle pro Minute. Der Graph stellt die radioaktiven Zerfälle des α - $[^{32}\text{P}]$ GTP in den verschiedenen Proteinproben dar. Die 1. Säule gibt die Zerfälle der GST Probe, 2. Säule der MglA^+ Probe, 3. Säule der MglA^{gof} Probe, 4. Säule der MglA^{lof} und 5. Säule der Cdc42 Probe wieder.

5 Diskussion

Myxococcus xanthus Zellen bewegen sich mit einer gleitenden Bewegung auf festen Oberflächen vorwärts. Hierfür verwenden die Zellen zwei verschiedene, synergistisch arbeitende Fortbewegungssysteme (Hodgkin & Kaiser, 1979a, Hodgkin & Kaiser, 1979b). Die S-Bewegung („social“) stellt eine Zell-Zellkontakt-abhängige Bewegung in Zellgruppen dar, welche durch die Retraktion von unipolar lokalisierten Typ IV Pili vermittelt wird (Wu & Kaiser, 1995, Sun *et al.*, 2000, Mignot *et al.*, 2005). Dagegen befähigt die A-Bewegung („adventurous“) die Zellen, eine individuelle und von anderen Zellen unabhängige Vorwärtsbewegung auszuführen. Für die Fortbewegung mit dem A-System existieren derzeit drei Modelle. Zum einem wird eine Vorwärtsbewegung beschrieben, welche durch Schleimsekretion von düsenartigen Strukturen am hinteren Ende der Zelle vermittelt wird (Wolgemuth *et al.*, 2002). Zum anderen werden fokale Adhäsionskomplexe, lokalisiert entlang der Zelle, im Zusammenhang mit der Generierung der A-Bewegung diskutiert (Mignot *et al.*, 2007). Nach dem dritten Modell wird die A-Bewegung durch die Schleimsekretion am hinteren Zellpol zusammen mit den fokalen Adhäsionskomplexen entlang der Zelle vermittelt (Leonardy *et al.*, 2007).

M. xanthus Zellen wechseln regelmäßig die Richtung ihrer Bewegung. Hierbei wird der alte vordere Pol zum neuen hinteren Zellpol (Spormann, 1999, Jelsbak & Søgaard-Andersen, 1999, Blackhart & Zusman, 1985). Die Richtungswechselfrequenz der Zellen wird durch das Frz chemosensorische System reguliert (Blackhart & Zusman, 1985). Während eines Richtungswechsels müssen die beiden Bewegungsmaschinerien synchron ihre Polarität innerhalb der Zelle ändern, um eine erneute Vorwärtsbewegung in die entgegengesetzte Richtung zu garantieren.

Fraglich bleibt wie die Zellen synchron die Polarität der Bewegungsmaschinerien während eines Richtungswechsels ändern und welche Proteine sich stromabwärts des Frz-Systems befinden, um die zellulären Richtungswechsel einzuleiten. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem molekularen Mechanismus des Polaritätswechsels der A-Bewegungsmaschinerie. Aus diesem Grund wurden die für das A-Bewegungssystem essentiellen Proteine RomR und MglA genauer analysiert.

Hierfür wurde die Lokalisierung dieser Proteine mittels Fluoreszenzmikroskopie in sich vorwärtsbewegenden *M. xanthus* Zellen verfolgt. Fluoreszenzprotein-Fusionen bieten sich für die Analyse von Proteinlokalisierungen in lebenden Organismen an, da die Zellen nicht zerstört werden, was die Verfolgung von dynamischen Prozessen (z.B. Richtungswechsel) in der Zelle ermöglicht. Weiterhin sollte der Einfluss verschiedener Mutationen in RomR bzw. MglA auf die Lokalisierung der Proteine und auf die Aktivität der A-Bewegung getestet werden. Hierzu wurden verschiedene RomR bzw. MglA Substitutionsmutanten ausgewählt, welche in der Literatur als wichtig für die Aktivität von Response Regulatoren bzw. kleinen GTPasen beschrieben werden.

5.1 Die polare asymmetrische Lokalisierung von RomR ist wichtig für die Aktivität der A-Bewegung

Die Lokalisierung von Proteinen in speziellen subzellulären Regionen der Zellen ist ein weit konservierter Mechanismus, um die Aktivität von Proteinen räumlich zu begrenzen (Gitai, 2005). Der Response Regulator RomR stellt ein weiteres Beispiel für ein Protein dar, dessen Lokalisierung in der Zelle entscheidend für die Regulierung der Aktivität des Proteins ist.

Das RomR Protein wird für die Aktivität des A-Bewegungssystems benötigt, denn die Zellen einer *romR* Mutante sind nicht fähig eine A-Bewegung durchzuführen (Leonardy *et al.*, 2007). Desweiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass RomR asymmetrisch an beiden Zellpolen in *M. xanthus* lokalisiert, wobei eine verstärkte Ansammlung des Proteins am hinteren Zellpol aufzufinden ist. Beweis hierfür sind die Ergebnise der Zeitrafferaufnahmen von Zellen, die eine voll funktionsfähige RomR-GFP Fusion beinhalten, die Durchführung der Immunfluoreszenz Mikroskopie, in welcher die Lokalisierung des nativen RomR Proteins in fixierten Zellen mittels anti-RomR Antikörpern detektiert wurde und die gleichzeitige Lokalisierung von Typ-IV-Pili und der RomR-GFP Verteilung in Zellen die mit Cy3 Farbstoff angefärbt wurden (Kap. 4.1.1). Demnach lokalisiert RomR hauptsächlich am hinteren Pol und die Zelle bewegt sich vorwärts. Parallel mit der Änderung der Bewegungsrichtung wechselt ebenfalls das RomR Protein seine Lokalisierung von dem alten hinteren Pol zum neuen hinteren Zellpol. Diese Beobachtung zusammen mit der Tatsache, dass RomR essentiell ist für die A-Bewegung deutet an, dass die

polare asymmetrische Lokalisierung von RomR einen Einfluss auf die Aktivität der A-Bewegung hat. Diese Aussage wird gestützt vom zeitlichen Ablauf der dynamischen RomR Lokalisierung. Das RomR-GFP Protein verteilt sich gleichmäßig an beiden Polen und gleichzeitig stoppt die Zelle die Vorwärtsbewegung mit dem A-System (Kap. 4.1.3). Während das Fluoreszenzsignal am alten hinteren Pol deutlich abnimmt, steigt die Intensität am alten vorderen Pol stetig an und der Wechsel der RomR Polarität in der Zelle wird begleitet von einem Richtungswechsel. Zusätzlich existieren Mutanten, in denen RomR-GFP polar asymmetrisch lokalisiert jedoch keine dynamische Lokalisierung vollzieht. Diese Zellen bewegen sich mit RomR-GFP am hinteren Zellpol ausschließlich in eine Richtung vorwärts ohne einen Richtungswechsel durchzuführen. Folglich beeinflusst die Lokalisierung von RomR die Aktivität der A-Maschinerie.

Derzeit beschreiben drei verschiedene Modelle den Mechanismus, mit welchem die A-Bewegung der Zellen generiert wird. Zum einem wird vermutet, dass düsenartige Strukturen („nozzle-like structures“), die an beiden Polen lokalisiert sind (Abb. 4) und Schleim sekretieren, in die A-Bewegung involviert sind. Der Schleim soll in einer dehydratisierten Form an einem Zellpol in die düsenartigen Strukturen eingeleitet werden. Eine darauffolgende Hydratisierung bewirkt ein Anschwellen des Schleims, wodurch dieser dann aus den Strukturen am hinteren Zellpol ausgestoßen wird. Auf festen Oberflächen entsteht durch den vermehrten Schleimausstoß am hinteren Zellpol eine Schubkraft, welche die Zelle vorwärts schiebt (Wolgemuth *et al.*, 2002). Das andere Modell beschreibt die Generierung der A-Bewegung durch kleine fokale Adhäsionskomplexe, welche sich entlang der gesamten Zelle verteilen (Mignot *et al.*, 2007). Diese Komplexe werden durch das für die A-Bewegung essentielle Protein AglZ definiert. Ein AglZ-YFP Fusionsprotein lokalisiert verstärkt am vorderen Zellpol (Abb. 4, blauer Kreis), wobei zusätzlich kleinere Ansammlungen des AglZ Proteins entlang der Zelle gebildet werden (Abb. 4, blaue Dreiecke). Diese kleinen AglZ-YFP Ansammlungen verbleiben, relativ zum umgebenden Medium, an fixierten Positionen in der Zelle, wenn sich das Bakterium vorwärts bewegt. Nach dem Modell werden die kleinen AglZ Ansammlungen, welche entlang der Zelle lokalisieren, an dem vorderen Zellpol

von der verstärkten Ansammlung des AglZ-YFP Proteins gebildet bzw. abgelöst und an dem hinteren Pol erneut aufgelöst. Die Vorwärtsbewegung der Zellen soll generiert werden durch einen Proteinkomplex, der die Zellhülle durchspannt, so an das Substratum bindet und wahrscheinlich gleichzeitig an einer Zytoskelettstruktur in der Zelle zieht. Neben AglZ soll der Proteinkomplex andere Adhäsionsproteine und Motorproteine beinhalten (Mignot *et al.*, 2007). Nach dem dritten Modell wird die A-Bewegung durch die Schleimsekretion am hinteren Zellpol zusammen mit den fokalen Adhäsionskomplexen entlang der Zelle vermittelt (Leonardy *et al.*, 2007).

Ausgehend von den beschriebenen Modellen, unterstützen die RomR Daten ein Modell, in dem ein Teil der A-Maschinerie am hinteren Zellpol lokalisiert ist und deren Aktivität durch RomR stimuliert wird. Es wäre denkbar, dass die verstärkte Ansammlung von RomR am hinteren Zellpol die Sekretion von Schleim stimuliert. Wobei die dynamische Lokalisierung von RomR während eines Richtungswechsels in einer Deaktivierung der düsenartigen Strukturen am alten hinteren Zellpol und eine Aktivierung der Schleimsekretion von düsenartigen Strukturen am neuen hinteren Pol resultieren könnte. Weiterhin wäre es vorstellbar, dass RomR am hinteren Zellpol in die Auflösung der fokalen AglZ Komplexe involviert ist und so die A-Bewegung beeinflusst (Mignot & Kirby, 2008).

Wir vermuten, dass das A-Bewegungssystem aus zwei unterschiedlichen Einheiten besteht. Zum einem aus den düsenartigen Strukturen, wobei das RomR Protein die Schleimsekretion am hinteren Zellpol stimuliert und zum anderen aus den AglZ enthaltenen fokalen Adhäsionskomplexen entlang des Zellkörpers. Die Tatsache, dass beide Proteine, RomR und AglZ, absolut notwendig für die A-Bewegung sind, deutet an, dass beide Einheiten funktionell zusammenhängen.

5.2 Die Phosphorylierung der RomR Receiver Domäne beeinflusst die dynamische RomR Lokalisierung

Der Response Regulator RomR besteht aus einer N-terminalen konservierten Receiver Domäne und einer C-terminalen Output Domäne. Die Output Domäne wird in eine prolinreiche Region und einen glutamatreichen

Schwanz unterteilt (Abb. 7 C). RomR besitzt wie andere Response Regulatoren einen konservierten Aspartatrest an Position 53 in der Receiver Domäne, welcher die Phosphorylierungsstelle des Proteins darstellt (Abb. 7 B) (Stock *et al.*, 2000).

Die Analyse verschiedener RomR Mutantenproteine, welche ausschließlich die Receiver oder die Output Domäne fusioniert zu GFP beinhalten (Kap. 4.1.4), zeigt, dass sich das Receiver-GFP Protein homogen in der gesamten Zelle verteilt, während das Output-GFP Protein eine polare asymmetrische Lokalisierung in den Zellen aufweist. Das Receiver Protein zeigt keine Aktivität in der *romR* Mutante und diese Zellen sind nicht fähig sich mit dem A-Bewegungssystem fortzubewegen. Das Output Protein hingegen komplementiert den *romR* Mutanten Phänotyp bezüglich der A-Bewegung und ermöglicht eine Fortbewegung mit dem A-System.

Folglich stellt die Output Domäne die Komponente in RomR dar, welche für die Lokalisierung des Proteins an den Polen verantwortlich ist. Weiterhin ist die Output Domäne hinreichend und notwendig für die asymmetrische Verteilung des RomR Proteins. Die Receiver Domäne hingegen ist zwar entbehrlich für die polare asymmetrische RomR Lokalisierung, jedoch entscheidend für die dynamische Lokalisierung von RomR und die Durchführung von Richtungswechseln. Denn die Output Domäne ist nicht fähig eine dynamische Lokalisierung zwischen den Polen zu vollziehen, was wiederum einen Einfluss auf die Häufigkeit der Richtungswechsel der Zellen hat.

Zellen, die eine Substitution des Aspartatrestes zu Asparagin in der Receiver Domäne (RomR^{D53N}, unterbindet die Phosphorylierungsfähigkeit von Response Regulatoren) beinhalten, zeigen keine dynamische RomR Lokalisierung. Dagegen führt eine Substitution zu Glutamat (RomR^{D53E}), welche die strukturelle Konformation eines phosphorylierten Response Regulators imitieren soll (Domian *et al.*, 1997), zu einer verstärkten dynamischen RomR Lokalisierung zwischen den Polen, im Vergleich zu dem nativen RomR Protein. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der Phosphorylierungsstatus des Aspartatrestes an Position 53 in RomR für die dynamische Lokalisierung des Proteins wichtig ist. Wobei unphosphoryliertes RomR, über die Output Domäne

vermittelt, asymmetrisch an den Polen lokalisiert und eine Phosphorylierung von D53 zu einer Freisetzung von RomR vom Pol führt. Die polare Freisetzung ermöglicht einen Wechsel des RomR Proteins zwischen den Polen. Ob die Receiver Domäne von RomR an beiden Polen phosphoryliert wird oder nur an dem Pol mit der stärkeren Ansammlung des RomR Proteins ist nicht bekannt.

Die Daten deuten ebenfalls an, dass die Substitution des Aspartatrestes zu Glutamat (RomR^{D53E}) die strukturelle Konformation des phosphorylierten RomR Proteins zumindestens partiell imitiert. Das RomR^{D53E} Protein lokalisiert polar asymmetrisch und nicht homogen in der gesamten Zelle, wie es bei einer ständigen polaren Freisetzung des RomR Proteins erwartet werden würde. Jedoch ist die polare Lokalisierung transienter als in Zellen mit dem nativen RomR Protein, was die verstärkte dynamische Lokalisierung und die vermehrte Durchführung von Richtungswechseln hervorruft. Eine solche partielle Imitation der strukturellen Konformation des phosphorylierten RomR Proteins durch die RomR^{D53E} Substitution wird auch für andere Response Regulatoren mit einer solchen Substitution in der Literatur beschrieben (Domian *et al.*, 1997).

Für andere Response Regulatoren konnte ebenfalls eine Abhängigkeit der Lokalisierung von der Phosphorylierung des Proteins gezeigt werden. In *Caulobacter crescentus* basiert die polare Lokalisierung des DivK und PleD Response Regulators auf der Phosphorylierung des Aspartatrestes in der Receiver Domäne (Lam *et al.*, 2003, Matroule *et al.*, 2004, Paul *et al.*, 2004). Dementsprechend unterscheidet sich RomR von diesen Response Regulatoren, da die Phosphorylierung von RomR zu einer Freisetzung des Proteins vom Zellpol führt und die polare Lokalisierung über die Output Domäne vermittelt wird.

Die polare asymmetrische Lokalisierung von RomR deutet die Existenz von Bindungskomponenten bzw. polaren Lokalisierungsfaktoren an den Zellpolen an, welche mit der Output Domäne interagieren, um RomR zu rekrutieren. Es ist bekannt, dass der Phosphorylierungsstatus von Response Regulatoren die Konformation des Proteins beeinflusst (Birck *et al.*, 1999). Vermutlich erleichtert die unphosphorylierte RomR Form die Interaktion der Output Domäne mit Komponenten bzw. Faktoren an den Zellpolen. Fraglich ist ob diese Komponenten bzw. Faktoren ebenfalls während eines

Richtungswechsel zwischen den Polen lokalisieren, oder ob nur RomR zwischen den Polen wechselt. Zurzeit sind keine derartigen Proteine oder Faktoren bekannt, welche die polare RomR Lokalisierung beeinflussen. Für eine Identifikation solcher Proteine bietet sich die Analyse der RomR Lokalisierung in bekannten A-Bewegungsmutanten an. Denn ohne eine polare Lokalisierung des RomR Proteins sind die Zellen nicht fähig sich mit dem A-Bewegungssystem fortzubewegen (Kap. 4.1.4, Receiver-GFP).

5.2.1 Mechanismus der dynamischen RomR Lokalisierung

Wird die dynamische RomR Lokalisierung betrachtet, so stellt sich die Frage, wie RomR während eines Richtungswechsels von dem einen Zellpol zum gegenüberliegenden Pol gelangt. Denkbar ist zum einem ein Transfer des Proteins, vermittelt durch Diffusion oder aktiven Transport, und zum anderem eine Regulierung der RomR Lokalisierung über Proteolyse und *de novo* Synthese des RomR Proteins.

Ergebnisse von Versuchen, in denen die Zellen mit Choramphenicol behandelt wurden, welches die Proteinbiosynthese der Zellen inhibiert, schließen eine dynamische RomR Lokalisierung, basierend auf der Proteolyse von RomR an dem alten hinteren Zellpol und neuer Lokalisierung von *de novo* synthetisierten RomR am neuen hinteren Pol, aus. Demnach beruht die dynamische RomR Lokalisierung auf einem Transfer des RomR Proteins von einem zum anderen Pol.

Derzeit kann nicht entschieden werden, ob der Transfer durch Diffusion oder aktiven Transport entlang eines Zytoskelettelements vermittelt wird. Einige Tubulin-ähnliche und Aktin-ähnliche Proteine wurden bereits in Prokaryonten identifiziert. Zu nennen ist das MreB Protein, ein Aktin Homolog, welches ein helikales Filament ausbildet. MreB ist in die Chromosom Segregation und die Morphogenese der Zellwand involviert (Gitai *et al.*, 2005, Kruse *et al.*, 2003, Figge *et al.*, 2004). In *C. crescentus* und in *E. coli* beeinflusst MreB die Lokalisierung von polaren Proteinen (Gitai *et al.*, 2004, Kruse *et al.*, 2003). Ein MreB Homolog ist ebenfalls in *M. xanthus* vertreten und es wäre denkbar, dass dieses oder auch andere Filamente in der Zelle in einen aktiven Transport von Proteinen und somit auch von RomR involviert sind. Mittels einfacher Diffusion können Proteine ebenfalls problemlos von einem Ende der Zelle zum

gegenüberliegenden Ende gelangen. Nach Analysen von Elowitz *et al.* 1999 bewegen sich Proteine wie GFP mit einem Diffusionskoeffizient von $\sim 5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ in dem Zytoplasma von *E. coli* Zellen. Demnach benötigen Proteine (GFP Protein) 0,4 Sekunden, um von einem Ende der Zelle zum gegenüberliegenden Pol zu gelangen (Elowitz *et al.*, 1999). *E. coli* Zellen sind durchschnittlich $2 \mu\text{m}$ lang, während *M. xanthus* Zellen ca. $6 \mu\text{m}$ lang sind, demnach würden Proteine in *M. xanthus* einige Sekunden benötigen, um von einem Pol zum anderen Zellpol zu gelangen. Dementsprechend würde es möglich sein, dass RomR mittels Diffusion von einem Pol zum anderen Pol transferiert wird, denn RomR-GFP wechselt innerhalb von 1 bis 1,5 Minuten von einem Zellende zum gegenüberliegenden Zellpol. Die Tatsache, dass eine Diffusion sehr schnell abläuft verglichen mit der zeitlichen Abfolge der dynamischen RomR Lokalisierung würde voraussetzen, dass die polare Freisetzung des RomR Proteins langsam erfolgt, während die Diffusion zum gegenüberliegenden Pol zügig abläuft. Zusammengefasst ist sowohl die Diffusion als auch der aktive Transport als Mechanismus für den Transfer des RomR Proteins zwischen den Polen nicht auszuschließen.

Die Durchführung von FRAP („Fluorescence Recovery after Photobleaching“) Experimenten könnte einen Hinweis darauf geben, ob RomR mittels einfacher Diffusion oder aktivem Transport von einem Pol zu dem anderen Zellpol gelangt. Denn die Wiederkehrtrate des Fluoreszenzsignals der Fusionsproteine, nach erfolgter Bleichung einer polaren Region bzw. Region innerhalb der Zelle, gibt Aufschluss über die Zeit, welche die Moleküle benötigen, um in die gebleichte Region zu gelangen. Wobei der Vergleich der Wiederkehrtrate von freidiffundierbaren Proteinen (GFP Protein) mit der des zu untersuchenden Proteins es erlaubt, eine Vorstellung zu erhalten, ob das Protein mittels einfacher Diffusion, Diffusion von ganzen Komplexen oder aktivem Transport von einem Pol zum anderen gelangt (Sprague & McNally, 2005).

Mignot *et al.*, 2005 konnte mithilfe der FRAP Methode ausschließen, dass der Transfer des Pseudoresponse Regulator Proteins FrzS-GFP in *M. xanthus* von einem Zellpol zum anderen nicht durch eine einfache Diffusion erfolgt. Zusätzlich konnte in einer *frzS* Mutante (*frzS* $_{\Delta 537-548}$), in welcher das

FrzS Protein nicht an den Polen lokalisiert sondern ausschließlich im Zytoplasma der Zelle, gezeigt werden, dass sich das Protein entlang einer helikalen Struktur anordnet. Daraufhin folgte Mignot, dass der Transfer des Proteins vermutlich durch einen aktiven Transport entlang einer helikalen Struktur in der Zelle vermittelt wird (Mignot *et al.*, 2005). Eine derartige Anordnung des Fusionsproteins, wie sie für FrzS beschrieben sind, konnte für RomR bisher in keiner Mutante beobachtet werden.

5.3 Die dynamische RomR Lokalisierung beeinflusst die Richtungswechsel der Zellen

Wie bereits beschrieben erfolgt die dynamische RomR Lokalisierung zeitlich parallel zu einem Richtungswechsel der Zellen. Denn die verstärkte Ansammlung von RomR-GFP wechselt von dem alten hinteren Pol zum neuen hinteren Zellpol und dann wechselt die Zelle die Richtung ihrer Bewegung (Kap. 4.1.3). Ausgehend von dieser Beobachtung folgern wir, dass RomR nicht zwischen den Polen wechselt, weil eine Zelle ihre Richtung ändert, sondern die Zelle die Richtung ändert, weil RomR eine dynamische Lokalisierung vollzieht und am gegenüberliegenden Pol die Aktivität der A-Maschinerie stimuliert.

Das Frz chemosensorische System reguliert die Richtungswechselfrequenz in den Zellen (Blackhart & Zusman, 1985). In Zellen einer *frz^{lof}* Mutante, welche nicht fähig sind Richtungswechsel zu vollziehen (Blackhart & Zusman, 1985, Bustamante *et al.*, 2004), lokalisiert RomR-GFP polar asymmetrisch, jedoch führt das Fusionsprotein keine dynamische Lokalisierung zwischen den Polen durch (Tab. 10+11). Die fehlende dynamische RomR Lokalisierung in dieser Mutante, zusammen mit der Annahme, dass RomR nicht zwischen den Polen wechselt, weil eine Zelle ihre Richtung ändert, weist auf eine Regulierung der dynamischen RomR Lokalisierung durch das Frz-System hin. Diese Hypothese wird auf genetischer Ebene gestützt durch die beobachtete Eigenschaft einer RomR^{D53E} Mutante (welche die strukturelle Konformation des phosphorylierten RomR Proteins partiell imitiert) die *frz^{lof}* Mutation bezüglich der Richtungswechsel umgehen zu können. Diese Zellen wechseln erneut ihre Bewegungsrichtung und die Richtungswechsel werden begleitet von einem Transfer des RomR^{D53E}-GFP Proteins von dem alten hinteren Zellpol zum neuen hinteren Pol (Tab. 11). Dies

impliziert, dass RomR stromabwärts des Frz-Systems agiert, um Richtungswechsel im A-Bewegungssystem einzuleiten. Wobei das Frz-System die dynamische RomR Lokalisierung vermutlich durch Änderung des RomR Phosphorylierungsstatus reguliert. Das RomR Protein wird phosphoryliert, wechselt zum gegenüberliegenden Pol, dort stimuliert RomR die A-Bewegung und die Zellen bewegen sich in die entgegengesetzte Richtung vorwärts.

Überraschenderweise sind Zellen, in welchen der Aspartatrest in RomR zu Asparagin substituiert wurde (RomR^{D53N}) hingegen nicht fähig den Defekt einer konstitutiv aktiven *frz*^{gof} Mutante, welche die Richtung ihrer Bewegung alle 1-2 Minuten ändern (Bustamante *et al.*, 2004), aufzuheben. Die RomR^{D53N} Substitution unterbindet die Phosphorylierungsfähigkeit von RomR und in Wildtyp Zellen vollzieht das RomR^{D53N}-GFP Protein keine dynamische Lokalisierung und die Zellen wechseln ihre Bewegungsrichtung nicht. Ähnliches wurde in einer *frz*^{gof} Mutante erwartet, jedoch wechseln diese Zellen alle 1-2 Minuten ihrer Richtung. Dennoch ist zu erwähnen, dass die Lokalisierung von RomR-GFP wie auch RomR^{D53N}-GFP und die RomR^{D53E}-GFP in diesen *frz*^{gof} Zellen stark symmetrisch ist, im Gegensatz zu der deutlich asymmetrischen Lokalisierung in Wildtyp Zellen (Tab.11). Wir nehmen an, dass die symmetrische Verteilung von RomR^{D53N} in dieser *frz*^{gof} Mutante ausreichend für die Aktivierung des A-Bewegungssystems an beiden Zellpolen ist und dass so die Zellen ihre Bewegungsrichtung häufig ändern können. Da genügend RomR an beiden Zellpolen für die Aktivierung bereit steht, ist der Wechsel des Proteins zwischen den Polen während eines Richtungswechsels nicht erforderlich. Wie die Aktivierung des A-Bewegungssystems an beiden Zellpolen reguliert wird, so dass die Zellen nicht ständig hin und her zucken, sondern eine Vorwärtsbewegung für 1-2 Minuten zeigen, wird in Kapitel 5.8 diskutiert (S.143f). Weiterhin vermuten wir, dass die polare Lokalisierung von RomR^{D53E}-GFP wesentlich transienter ist als die polare Verteilung des RomR^{D53N}-GFP Proteins in diesen Zellen. Dementsprechend würde ein ständiger Austausch von RomR^{D53E}-GFP zwischen den Polen herrschen, während das RomR^{D53N}-GFP Protein permanent an den Polen lokalisiert ist. Diese Hypothese lässt sich durch die Analyse der RomR Lokalisierung mittels der FRAP („Fluorescence Recovery After Photobleaching“) Methode testen. In FRAP Experimenten

würden wir einen Unterschied in der Wiederkehrtrate des Fluoreszenzsignals des RomR^{D53E}-GFP und des RomR^{D53N}-GFP Fusionsproteins in der *frz*^{gof} Mutante erwarten.

5.4 Die beiden Bewegungsmaschinerien in *M. xanthus* wechseln synchron ihre Polarität während eines Richtungswechsels

Die beiden Bewegungssysteme in *M. xanthus* arbeiten synergistisch, um eine Bewegung in dieselbe Richtung zu erzeugen, denn die kombinierte Ausbreitungsrate der Wildtyp-Zellen (A⁺S⁺) ist 50% höher als die Summe der beiden einzelnen Ausbreitungsraten (A⁺S⁻ und A⁻S⁺), die jeweils nur von einem System gestellt wird (Kaiser & Crosby, 1983b, Kaiser & Crosby, 1983a). Während eines zellulären Richtungswechsels müsste demnach die Polarität der beiden Bewegungsmaschinerien synchron wechseln, um zu garantieren, dass die Zellen sich weiterhin vorwärtsbewegen können. Die Typ-IV-Pili, welche nur an dem vorderen Zellpol lokalisiert sind (Sun *et al.*, 2000; Mignot *et al.*, 2005), werden während eines Richtungswechsels an dem einem Pol abgebaut und an dem gegenüberliegenden Pol erneut aufgebaut. Parallel hierzu wechselt das FrzS Protein, das für die Typ-IV-Pili vermittelte S-Bewegung benötigt wird, vom alten vorderen Pol zum neuen vorderen Zellpol (Mignot *et al.*, 2005). Ebenso ändern die beiden A-Bewegungsproteine AglZ (Mignot *et al.*, 2007) und RomR ihre Lokalisierung während eines Richtungswechsels (Kap. 4.1.3). Die dynamische Lokalisierung aller beschriebenen Proteine wird durch das Frz chemosensorische System reguliert. Diese Beobachtungen sprechen für eine parallele Änderung der Polarität beider Bewegungsmaschinerien wenn die Zellen einen Richtungswechsel vollziehen. In dieser Arbeit konnte erstmals direkt gezeigt werden, dass das S-Bewegungsprotein FrzS und das A-Bewegungsprotein RomR unabhängig voneinander, jedoch synchron, zwischen den beiden Polen wechseln, wenn die Zelle ihre Bewegungsrichtung ändert (vergl. Kap. 4.1.7). Folglich wechseln die beiden Bewegungsmaschinerien synchron ihre Polarität und dieser synchrone Wechsel wird durch das Frz-System vermittelt.

5.5 Das MglA Protein zeigt *in vivo* die Aktivität einer kleinen GTPase der Ras/Rac/Rho Superfamilie

Das MglA Protein wird für die Funktion beider Bewegungssysteme benötigt (Hodgkin & Kaiser, 1979b). Die Primärstruktur von MglA ähnelt derer eukaryontischer kleiner GTPasen der Ras/Rac/Rho Superfamilie. Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der beiden Substitutionsmutanten von MglA deutet darauf hin, dass das MglA Protein *in vivo* die Aktivität einer kleinen GTPase ausführt. Wie für eukaryontische kleine GTPasen in der Literatur beschrieben (Bourne *et al.*, 1991) führt die Substitution des Glycin an Position 21 zu Valin *in vivo* zu einem konstitutiv aktiven MglA Protein und die Substitution der beiden Threonine an Position 26 und 27 durch Asparagin *in vivo* zu einem inaktiven MglA Protein (vergl. Kap. 4.2.2).

Beweis hierfür ist zum einem die Bewegungslosigkeit der Zellen einer *mgIA^{lof}* Mutante, hervorgerufen durch eine ausbleibende Stimulierung der A-Bewegung durch das MglA^{lof} (MglA-T26/27) Protein, während die MglA^{gof} Form (MglA-G21V) die Bewegung der Zellen anregt. Dies indiziert, dass MglA die A-Bewegung der Zellen stimuliert. Zum anderen weist das MglA^{gof} (MglA-G21V) Protein eine stimulierende Eigenschaft bezüglich der Richtungswechsel der Zellen auf. Im Vergleich zu Wildtyp Zellen zeigen *mgIA^{gof}* Zellen eine dreifach erniedrigte Richtungswechselperiode (Tab. 12) und wechseln somit dreimal häufiger die Richtung ihrer Bewegung als Wildtyp Zellen. Weiterhin ist das MglA^{gof} Protein dominant gegenüber dem nativen MglA Protein, denn in Zellen, welche sowohl eine Kopie des nativen *mgIA* Gens, wie auch eine Kopie des *mgIA^{gof}* Gens tragen, ist die Richtungswechselperiode ebenfalls erniedrigt. Ein dominanter Phänotyp wird in der Literatur für konstitutiv aktive GTPasen der Ras/Rac/Rho Familie beschrieben (Bourne *et al.*, 1991). Zellen, welche neben der nativen Kopie des *mgIA* das *mgIA^{lof}* Gen besitzen, sind bewegungsfähig aber wechseln, verglichen mit Wildtyp Zellen, auffällig selten ihre Bewegungsrichtung. Demzufolge beeinflusst die Substitution der beiden Threoninreste zu zwei Asparaginresten in MglA (MglA^{lof}) nicht nur die Bewegungsfähigkeit sondern ebenfalls die Richtungswechselperiode der Zellen und ist dominant gegenüber dem nativen MglA Protein.

Anhand der beschriebenen *in vivo* Ergebnisse ist anzunehmen, dass MglA eine prokaryontische kleine GTPase der Ras/Rac/Rho Familie ist, welche zum einen die Bewegung der Zellen stimuliert und zum anderen die Zellen anregt einen Richtungswechsel durchzuführen. Denn Zellen, die MglA ausschließlich in der GDP gebundenen Form (MglA^{lof}) beinhalten sind bewegungsunfähig. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass eine gewisse Menge an MglA im GTP gebundenen Zustand benötigt wird, um die A-Bewegung der Zellen zu stimulieren. Desweiteren ändern *mgIA*^{gof} Zellen, welche ein artifiziell erhöhten Level an MglA im GTP gebundenen Zustand aufweisen, ständig die Richtung ihrer Bewegung. Demnach leiten erhöhte Mengen an MglA im GTP gebundenen Zustand in den Zellen einen Richtungswechsel ein. Unserer Hypothese zufolge ist in Wildtyp Zellen eine gewisse Menge an MglA Protein im GTP gebundenen Zustand vorhanden. Diese Menge an MglA-GTP_N (N steht für niedrig) wird für die Stimulierung der A-Bewegung benötigt. Bei stark erhöhten Konzentrationen von MglA-GTP (MglA-GTP_H; H steht für hoch) wechseln die Zellen ihre Bewegungsrichtung und eine Hydrolyse des GTPs bewirkt erneut eine niedrigere Menge an MglA-GTP in den Zellen, was wiederum eine Vorwärtsbewegung der Zellen ermöglicht.

Einen endgültigen Beweis für eine GTPase Aktivität des MglA Proteins könnte ausschließlich ein Nachweis der GTP/GDP Bindung und der GTP Hydrolyse durch die GTPase Aktivität von MglA auf biochemischer Ebene *in vitro* erbringen. Das in dieser Arbeit durchgeführte GTP Bindungsexperiment (vergl. Kap. 4.2.13) konnte unter den genannten Versuchsbedingungen keinen Nachweis für eine GTP Bindungsfähigkeit des MglA, MglA^{gof} bzw. MglA^{lof} Proteins liefern. Für die kleine GTPase Cdc42 (*Ustilago maydis*) ermöglichten die gewählten Bedingungen eine GTP Bindung. Eventuell kann die GTP Bindung und ebenso eine GTP Hydrolyse durch MglA unter veränderten Versuchsbedingungen erfolgen. Diese optimale Versuchsdurchführung muss zunächst ermittelt werden. Zusätzlich könnten reinere Proteinfractionen die Wahrscheinlichkeit einer eventuellen Störung der MglA GTP Bindung durch andere Proteine oder Bildung von unspezifischen Proteinaggregaten mindern. Weiterhin ist bekannt dass die GTPase Aktivität kleiner GTPasen durch

Interaktionen mit verschiedenen Effektorproteinen bzw. –molekülen moduliert wird. GTPase aktivierende Proteine (GAPs) begünstigen die GDP gebundene Form, indem sie die GTPase Aktivität der GTPase und somit die GTP Hydrolyse stimulieren (Bernards & Settleman, 2004). Dagegen fördern GTP „exchange factors“ (GEFs) den GTP gebundenen Zustand der GTPase, indem sie den Austausch von GDP zu GTP erleichtern (Rossman & Sondek, 2005). Eventuell ist eine Interaktion mit GEFs und GAPs für MglA erforderlich, um eine GTP/GDP Bindung bzw. eine GTPase Aktivität zu zeigen. Jedoch sind zurzeit keine derartigen GEFs oder GAPs für MglA in *M. xanthus* identifiziert. Denkbar wäre, dass das Protein MglB benötigt wird, um *in vitro* die GTPase Aktivität nachzuweisen. Das Protein ist essentiell für die Bildung normaler Mengen von MglA in *M. xanthus* Zellen (Hartzell & Kaiser, 1991). Vermutlich stabilisiert MglB das MglA Protein. Die Anwesenheit von MglB in dem GTP Bindungsversuch könnte zu einer Stabilisierung des MglA Proteins führen und so die GTP Bindung bzw. GTP Hydrolyse durch MglA ermöglichen.

5.6 Der Transfer des MglA Proteins zum hinteren Zellpol leitet einen Richtungswechsel ein

Das Protein MglA lokalisiert am vorderen Zellpol in Zellen, die sich vorwärts bewegen (vergl. Kap. 4.2.5). Wechselt das Protein die Lokalisierung vom vorderen Ende der Zelle zum hinteren Zellpol ändert die Zelle ihre Bewegungsrichtung. Hinweis hierauf geben die durchgeführten Zeitrafferaufnahmen, in denen die dynamische Lokalisierung des YFP-MglA Proteins von dem vorderen Pol zum hinteren Zellpol in einer Zeit von ca. 3 bis 4 Minuten erfolgt. Jedesmal wenn das YFP-MglA Signal vollständig am hinteren Pol lokalisiert ist, führt die Zelle einen Richtungswechsel durch. Dieser Zusammenhang deutet darauf hin, dass MglA durch die Lokalisierung am hinteren Zellpol einen Richtungswechsel der Zellen induziert. Einen weiteren Hinweis hierauf gibt die dynamische Lokalisierung des MglA^{gof} Proteins. Zellen, die das YFP-MglA^{gof} Protein beinhalten, weisen eine dreifach erniedrigte Richtungswechselperiode, verglichen mit Wildtyp Zellen, auf wobei jedem Richtungswechsel ein Transfer des YFP-MglA^{gof} Proteins zum hinteren Zellpol vorausgeht. Das YFP-MglA^{gof} Protein wandert sichtbar durch die Zellen hindurch, von dem vorderen Pol zum hinteren Zellpol und erst daraufhin

vollzieht die Zelle einen Richtungswechsel. Demnach besteht ein Zusammenhang zwischen der dynamischen MglA^{gof} Lokalisierung und den zellulären Richtungswechseln. Die dynamische Lokalisierung des MglA^{gof} Proteins basiert auf einem Transfer des Proteins durch die Zelle. Denn in Zellen, welche in Agar fixiert vorliegen und sich nicht vorwärts bewegen können, wandert das YFP-MglA^{gof} Protein ebenfalls innerhalb von ca. 4 Minuten von dem einen Pol der Zelle zum gegenüberliegenden Zellpol. Demnach kann ausgeschlossen werden, dass das MglA Protein relativ zur Umgebung an einer fixierten Position in der Zelle verbleibt und nur scheinbar zum hinteren Pol wandert, da sich die Zelle vorwärtsbewegt, wie es für die Lokalisierung des AglZ Proteins gezeigt wurde (Mignot *et al.*, 2007).

Das MglA^{lof} Protein fusioniert zu YFP (YFP-MglA^{lof}) verteilt sich homogen in der gesamten Zelle ohne jegliche Lokalisierungsmuster innerhalb der Zelle aufzuweisen. In Zeitrafferaufnahmen konnte keine Änderung dieser homogenen Verteilung des YFP-MglA^{lof} beobachtet werden. Demnach scheint die MglA^{lof} Form eine homogene Verteilung der MglA Proteine in den Zellen zu bewirken. Weiterhin bewirkt die homogene Verteilung bzw. die nicht polare Lokalisierung des MglA^{lof} Proteins eine Bewegungsunfähigkeit der Zellen.

Ausgehend von der beobachteten Lokalisierung der verschiedenen MglA Proteine haben wir das folgende Modell für die dynamische Lokalisierung des MglA Proteins aufgestellt. Im GDP gebundenen Zustand ist das MglA Protein inaktiv, verteilt sich homogen in der gesamten Zelle und die Zelle ist bewegungsunfähig. Eine niedrige bis mittlere Menge an MglA im GTP gebundenen Zustand (MglA-GTP_N) lokalisiert am vorderen Zellpol. Hinweis hierauf gibt die Lokalisierung des nativen YFP-MglA Proteins, am vorderen Pol der Zelle. Wird eine erhöhte Menge an MglA im GTP gebundenen Zustand (MglA-GTP_H) erreicht, so wird das MglA Protein an dem vorderen Zellpol freigesetzt und gelangt von dort zum hinteren Zellpol (Abb. 32). Diese Aussage wird gestützt durch den deutlich erkennbaren Transfer des YFP-MglA^{gof} Proteins (Kap. 4.2.6) von dem einem Pol zum anderen, verglichen mit dem weniger sichtbaren Transfer des YFP-MglA Proteins zwischen den Polen (Kap. 4.2.5). Weiterhin nehmen wir in unserem Modell an, dass MglA-GTP_H an den hinteren Zellpol gelangt und dort vermutlich mit einem GTPase aktivierenden

Protein (GAP) interagiert, wodurch MglA-GTP_H in MglA-GTP_N überführt wird und erneut eine polare Lokalisierung von MglA-GTP_N vermittelt wird (Abb. 32). Im klassischen Fall binden GAPs spezifisch an eine GTPase im GTP gebundenen Zustand und stimulieren so die GTP Hydrolyse. Dementsprechend bewirken GAPs eine Verminderung der GTP gebundenen Form einer GTPase, jedoch stellen einige GAPs zusätzlich aktive Moleküle in einem Signaltransduktionsweg dar (McGlade *et al.*, 1993, Scheffzek *et al.*, 1998). Es wäre denkbar, dass durch die Bildung eines MglA-GTP-GAP Komplexes, gefolgt von einer GTP Hydrolyse, MglA-GTP_H in MglA-GTP_N überführt wird. Diese Überführung vermittelt die polare Lokalisierung des MglA Proteins und garantiert, dass nicht ständig Richtungswechsel durchgeführt werden.

Einen experimentellen Hinweis auf die Bedeutsamkeit einer möglichen Interaktion von MglA-GTP mit einem GAP und die darauffolgenden GTP-Hydrolyse für die polare Lokalisierung von MglA-GTP_N, gibt die fehlende polare Lokalisierung des MglA^{gof} und des MglA^{lof} Proteins. MglA^{gof} oszilliert ständig zwischen den Polen und verweilt nie lange an einem Zellpol. Denn das MglA^{gof} Protein verbleibt ständig im GTP gebundenen Zustand und kann dementsprechend keine GTP Hydrolyse durchführen. Dies resultiert in einem konstanten Level an MglA-GTP_H, weshalb die polare Lokalisierung des Proteins nicht erfolgen kann. Das MglA^{lof} Protein liegt ständig in der GDP Form vor und zeigt deshalb weder eine polare Lokalisierung noch einen Transfer des Proteins zwischen den Polen. Demnach beruht die polare Bindung von MglA vermutlich auf der Erniedrigung des GTP gebundenen MglA Levels, vermittelt durch die Bildung eines GAP-MglA Komplexes, gefolgt von der GTP Hydrolyse.

Nach unserem Modell verbleibt MglA-GTP_N zunächst am Zellpol (Abb. 32). Vermutlich erst durch die Interaktion mit einem „Guanine nucleotide-exchange factor“ (GEF) wird die GTP Bindung an MglA stimuliert, die Menge an MglA im GTP gebundenen Zustand nimmt zu und es wird eine hohe Menge an MglA-GTP (MglA-GTP_H) erreicht, so wird MglA-GTP_H von dem Pol freigesetzt und wandert erneut im GTP gebundenen Zustand zum gegenüberliegenden Zellpol. Im Allgemeinen binden GEFs an eine GTPase im GDP gebundenen Zustand und katalysieren den Austausch von GDP zu GTP. In der Literatur wird für die GTPase Ras beschrieben, dass die GAP Interaktion häufig eine

Auswirkung auf die räumliche Verteilung der Ras Aktivität hat, während die GEF Interaktion eher die zeitliche Regulierung der Ras Aktivität kontrolliert (Ohba *et al.*, 2003). Dies ist ebenfalls zutreffend für das MglA Protein in unserem Modell. Gelangen die MglA-GTP_H an den Zellpol so wird durch eine GAP vermittelte GTP Hydrolyse die polare Lokalisierung von MglA-GTP_N ermöglicht. Erst durch die katalysierende Wirkung eines GEFs bindet das MglA Protein erneut vermehrt GTP, es werden hohe Mengen an MglA-GTP erhalten und MglA-GTP_H wird von dem Zellpol freigesetzt und ein neuer Zyklus der dynamischen MglA Lokalisierung beginnt.

Das erläuterte Modell könnte erklären wie der Transfer des MglA Proteins zwischen den Polen und die polare Lokalisierung des Proteins vermittelt wird. Wie zuvor beschrieben besteht ein Zusammenhang zwischen der dynamischen MglA Lokalisierung und den zellulären Richtungswechseln. Jedesmal wenn das YFP-MglA Signal vollständig am hinteren Pol lokalisiert ist, führt die Zelle einen Richtungswechsel durch. Wird das Modell der dynamischen MglA Lokalisierung bezüglich der Einleitung der Richtungswechsel betrachtet (Abb. 32), so nehmen wir an, dass MglA-GTP_H an den hinteren Zellpol gelangt und dort mit GAPs und/oder Effektorproteinen interagiert. Diese Interaktion beeinflusst vermutlich die Polarität der A-Bewegungsmaschinerie und die Zelle wechselt ihre Bewegungsrichtung. Diese Annahme wird gestützt durch die Beobachtung, dass das Eintreffen des MglA^{gof} Proteins, welches ständig im GTP gebundenen Zustand vorliegt, am hinteren Zellpol einen Richtungswechsel einleitet. Im Allgemeinen interagieren GTPasen im GTP gebundenen Zustand mit einer Vielzahl von GAPs und/oder Effektorproteinen und dies stimuliert eine zelluläre Antwort (Scheffzek *et al.*, 1998, Hall & Nobes, 2000, Goldfinger, 2008). Die Überführung in den GDP gebundenen Zustand dient der Abschaltung der Aktivität des Proteins (Jaffe & Hall, 2005). Dies ist ebenfalls zutreffend für MglA in unserem Modell, denn die Erniedrigung des Levels von MglA im GTP gebundenen Zustand und die polare Lokalisierung von MglA-GTP_N garantiert in Wildtyp Zellen, dass nicht ständig Richtungswechsel durchgeführt werden, wie in einer *mgIA*^{gof} Mutante, sondern nur wenn sie erforderlich sind.

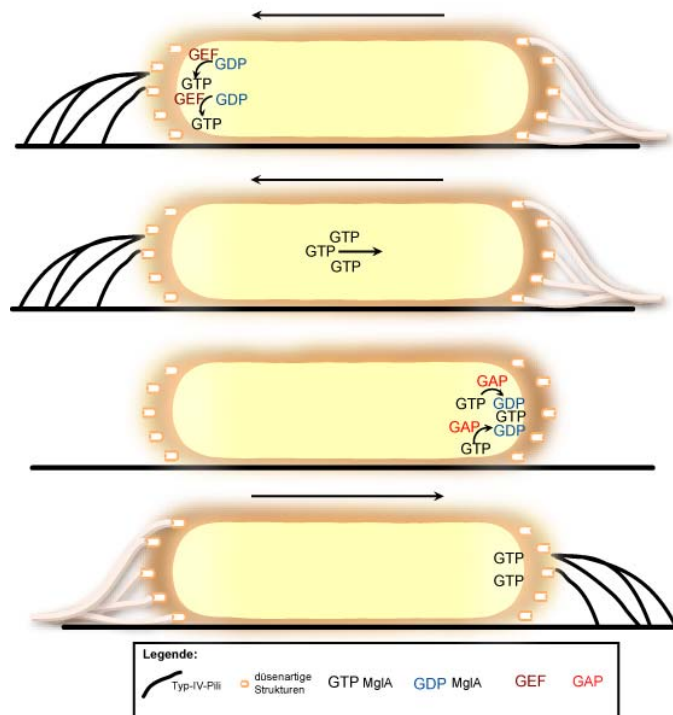


Abbildung 32. Vereinfachtes Modell der dynamischen MglA Lokalisierung. Schematische Darstellung einer Zelle die ihre Bewegungsrichtung ändert. Gezeigt ist die Lokalisierung des MglA Proteins. Die Pfeile über der Zelle deuten die Bewegungsrichtung an. Eine detaillierte Beschreibung des Modells ist im Text zu finden.

Um dieses Modell experimentell überprüfen zu können, müssen zunächst GEFs und GAPs identifiziert werden, um anschließend deren Einfluss auf die MglA Lokalisierung zu testen. Zurzeit versuchen wir in Yeast-Two-Hybrid Experimenten eine Interaktion von MglA mit möglichen GEF bzw. GAP Kandidaten nachzuweisen. Wir erwarten, dass in GEF Mutanten das MglA Protein ständig am vorderen Zellpol verbleibt und dass die Zellen dieser Mutante sich nur in eine Richtung fortbewegen. In GAP Mutanten vermuten wir hingegen keine polare Lokalisierung von MglA und die Zellen sollten häufiger die Bewegungsrichtung ändern, als Wildtyp Zellen. Ein guter GAP Kandidat für MglA ist das Protein MglB, welches für die Bildung einer normalen Menge an MglA Protein in der Zelle benötigt wird (Hartzell & Kaiser, 1991). In Yeast-Two-Hybrid Experimenten interagiert das MglB Protein nicht mit dem MglA bzw. dem MglA^{lof} Protein, jedoch mit dem MglA^{gof} Protein, wie es für GAP Proteine in der Literatur beschrieben wird (Petters & Leonardy, unveröffentlicht). Aus diesem Grund werden wir eine *mglB* Mutante herstellen, um deren Phänotyp bezüglich

der Richtungswechsel zu analysieren und die Lokalisierung von MglA zu überprüfen. Zusätzlich werden wir die Lokalisierung des MglB Proteins mithilfe einer YFP Fusion in den Zellen untersuchen.

5.7 MglA arbeitet stromabwärts des Frz-Systems um zelluläre Richtungswechsel zu stimulieren

Das Frz chemosensorische System reguliert die Frequenz der Richtungswechsel in *M. xanthus* (Kap. 2.6) (Blackhart & Zusman, 1985). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MglA ebenfalls einen erheblichen Einfluss auf die Richtungswechselfrequenz der Zellen ausübt (vergl. Kap. 4.2.2). Weiterhin konnte auf genetischer Ebene demonstriert werden, dass MglA stromabwärts des Frz-Systems, in demselben Signalweg, agiert, um einen Wechsel der A-Bewegungsrichtung der Zellen zu induzieren. Hinweis hierauf gibt die Analyse der Richtungswechsel in Zellen, die eine *frz*^{lof} bzw. *mgIA*^{lof} Mutation beinhalten und zusätzlich eine *mgIA*^{gof} bzw. *frz*^{gof} Mutation besitzen, ebenso wie Mutanten, die beide in einer inaktiven Form (^{lof}) bzw. konstitutiv aktiven Form (^{gof}) beinhalten (vergl. Kap. 4.2.3). In diesen Analysen ist der Phänotyp der *mgIA*^{gof} bzw. *mgIA*^{lof} Mutation immer dominant gegenüber der *frz*^{lof} bzw. *frz*^{gof} Mutation in diesen Zellen. Das Einbringen einer *mgIA*^{gof} Mutation in Zellen einer *frz*^{lof} Mutante, welche keine Richtungswechsel vollziehen können, befähigt die Zellen erneut die Richtung ihrer Bewegung zu ändern und demnach die *frz*^{lof} Mutation bezüglich der Richtungswechsel zu umgehen. Werden die Richtungswechsel in Zellen studiert, welche sowohl die *frz*^{gof} Mutation, als auch die *mgIA*^{gof} Mutation haben, wird deutlich, dass die Zellen die Bewegungsrichtung ebenso häufig wie eine *mgIA*^{gof} Mutante wechseln. Demzufolge ist kein additiver Phänotyp in der Doppelmutante erkennbar und es ist auszuschließen, dass die beiden in unterschiedlichen Signalwegen ihre Funktion ausüben. Fraglich ist in welcher Form das Frz-System stromaufwärts von MglA auf das MglA Protein einwirkt, um die Richtungswechsel der Zellen zu regulieren. Aufgrund des beobachteten Einflusses der *mgIA*^{gof} und der *mgIA*^{lof} Lokalisierung auf die Richtungswechsel nehmen wir an, dass das Frz-System direkt oder indirekt eine Bindung von GTP an MglA bewirkt, ähnlich wie ein „Guanine nucleotide-exchange factor“ (GEF).

Die vermehrte GTP Bindung an MglA, vermittelt durch das Frz-System, würde zu einer erhöhten Menge von MglA im GTP gebundenen Zustand führen. Daraufhin würde MglA-GTP_H am vorderen Pol freigesetzt werden und zum hinteren Zellpol wandern. Wird eine kritische Menge an MglA im GTP gebundenen Zustand am hinteren Zellpol, durch das Eintreffen von MglA-GTP_H an diesem Pol, erreicht, wird ein Richtungswechsel eingeleitet. Demnach würde das Frz-System am vorderen Zellpol als ein GEF wirken. Wie bereits erläutert binden GEFs an die GTPase und durch die Bindung entsteht ein nukleotidfreier GEF-GTPase Komplex (Vetter & Wittinghofer, 2001). Durch eine erneute Bindung eines Nukleotids, vorwiegend GTP, löst sich der Komplex wieder auf und die GTPase liegt im GTP gebundenen Zustand vor. Die GEFs katalysieren den Austausch von GDP zu GTP, denn die Guaninnukleotid-Freisetzung ist normalerweise sehr langsam (Lenzen *et al.*, 1998, Klebe *et al.*, 1995). Demnach erhöhen die GEFs die Konzentration der GTP gebundenen Form. Diese niedrige Konzentration von MglA-GTP (entspricht MglA-GTP_N) in Abwesenheit der GEFs könnte erklären, warum *frz*^{lof} Mutanten zwar keine Richtungswechsel vollziehen, jedoch noch bewegungsfähig sind, während *mgIA*^{lof} Mutanten mit MglA ausschließlich in einer GDP gebundenen Form unbeweglich sind. Derzeit überprüfen wir die Lokalisierung des YFP-MglA Proteins in der *frz*^{lof} und *frz*^{gof} Mutante. Ist das beschriebene Modell zutreffend, so erwarten wir, dass YFP-MglA in einer *frz*^{gof} Mutante ähnlich lokalisiert wie das YFP-MglA^{gof} Protein in Wildtyp Zellen. Denn das konstitutiv aktive Frz-System in dieser Mutante würde zu einer stark erhöhten Menge an MglA im GTP gebundenen Zustand führen, was zu einem deutlichen Transfer von MglA-GTP_H von einem Zellpol zum anderen führen würde und so zu häufigen Richtungswechseln. In einer *frz*^{lof} Mutante hingegen würde das YFP-MglA Protein lediglich am vorderen Pol lokalisieren und die Zellen würden keine Richtungswechsel vollziehen. Diese Zellen wären bewegungsfähig, da eine gewisse Menge an MglA Protein im GTP gebundenen Zustand (MglA-GTP_N) vorliegt. Und dieses MglA-GTP_N ist ausreichend für eine Stimulierung der A-Bewegung der Zellen, jedoch nicht für die Durchführung von Richtungswechseln.

Das letzte bekannte Glied in dem Frz-Signalweg stellt der Tandem CheY Response Regulator FrzZ dar (Li *et al.*, 2005, Inclan *et al.*, 2007). *frzZ* Mutanten

verhalten sich, bezüglich der Richtungswechsel, wie die *frz*^{lof} Mutante (Bustamante *et al.*, 2004). Die genaue Funktion des FrzZ Proteins ist nicht bekannt. Es wäre denkbar, dass dieses Protein die Aufgabe eines GEFs übernimmt. FrzZ besitzt keine DH Domäne (dibble-homology), welche für die GEFs der Rho Unterfamilie von GTPasen beschrieben wird (Cherfils & Chardin, 1999). Jedoch ist in der Literatur beschrieben, dass spezifische GEF Domänen zum Teil nur in der jeweiligen Unterfamilie der GTPasen konserviert sind und zum Teil zeigen GEFs keinerlei strukturelle Ähnlichkeiten zu anderen beschriebenen GEFs (Cherfils & Chardin, 1999). Eventuell stellen die GEFs in der Gruppe der MglA-ähnlichen GTPasen (Kap. 4.2.1; δ -Proteobakterien) unter anderem Response Regulatoren dar, die durch eine Interaktion mit der MglA-ähnlichen GTPase eine GTP Bindung erleichtert. Ob der Response Regulator FrzZ oder andere Frz Proteine eine derartige Rolle in dem Signalweg der Richtungswechsel innehaben wird die Analyse der YFP-MglA Lokalisierung in den entsprechenden Mutanten zeigen.

5.8 MglA stimuliert die Richtungswechsel durch die Festlegung der RomR Lokalisierung in den Zellen

In den vorherigen Kapiteln wurde ein Modell beschrieben, indem die Ansammlung einer kritische Menge der GTP gebundenen MglA Form am hinteren Zellpol einen Richtungswechsel in der zellulären A-Bewegung einleitet. Fraglich ist, wie das MglA Protein diese Richtungswechsel stimuliert. Das RomR Protein ist essentiell für die Funktion des A-Bewegungssystem (Leonardy *et al.*, 2007), und in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die dynamische RomR Lokalisierung einen entscheidenden Einfluss auf die Richtungswechsel der Zellen hat, welche sich mittels des A-Systems bewegen (Kap. 4.2). Denn ein RomR^{D53E} Mutantenprotein alleine ist fähig die gesamte Polarität des A-Bewegungssystem zu verändern und so die Richtungswechselfrequenz der Zellen zu beeinflussen (Kap. 4.1.4/5). Infolgedessen hat die Verteilung des RomR Proteins einen erheblichen Einfluss auf die Aktivität und Polarität der A-Bewegungsmaschinerie und das RomR Protein stellt einen Schlüsselregulator für das A-Bewegungssystem dar. Aus diesem Grund ist RomR ein relevantes Protein, um den Einfluss von MglA auf die Polarität des A-Bewegungssystem zu testen.

Wir vermuten, dass MglA über die Festlegung der RomR Lokalisierung in der Zelle, wie auch anderer A-Bewegungsproteine, die Polarität der A-Bewegungsmaschinerie beeinflusst. Hinweis hierauf geben die Untersuchungen der RomR-GFP Lokalisierung in den verschiedenen *mgIA* Mutanten (Kap. 4.2.7). In Zellen, die kein MglA besitzen (*mgIA9* Mutante) oder ausschließlich das MglA^{lof} Protein beinhalten, lokalisiert RomR nur an einem Zellpol und dieser Pol ist der Typ-IV-Pili tragende Pol.

Demnach lokalisiert RomR in diesen Zellen am vorderen Pol und somit am „falschen“ Zellpol, verglichen mit der RomR Lokalisierung in Wildtyp Zellen. Zusätzlich vollzieht RomR keine dynamische Lokalisierung zwischen den Polen in den beiden *mgIA* Mutanten. Folglich hat MglA einen entscheidenden Einfluss auf die Festlegung der RomR Polarität in den Zellen. Wir nehmen an, dass eine gewisse Menge an MglA im GTP gebundenen Zustand (MglA-GTP_N) in den Zellen vorhanden sein muss, um eine korrekte asymmetrische RomR Lokalisierung und somit eine korrekte Polarität der A-Bewegungsmaschinerie zu erhalten. Diese korrekte Polarität wiederum ermöglicht der Zelle eine Vorwärtsbewegung.

Zusätzlich scheint sich die Lokalisierung von MglA und RomR gegenseitig an den Polen auszuschließen. Diese Aussage wird zum einem gestützt von der Beobachtung, dass in sich vorwärts bewegendes Zellen MglA vorwiegend am vorderen Pol der Zelle lokalisiert, während RomR überwiegend am hinteren Zellende lokalisiert. Zum anderem lokalisiert YFP-MglA in einer *romR* Deletionsmutante nicht mehr am vorderen Zellpol, sondern verteilt sich homogen in der gesamten Zelle (Kap. 4.2.10). Demnach beeinflusst MglA die Lokalisierung von RomR und RomR wiederum die Lokalisierung von MglA, vermutlich indem sich die beiden Proteine gegenseitig an den Polen ausschließen.

Desweiteren lokalisiert RomR-GFP in einer *mgIA*^{9of} Mutante symmetrisch an beiden Zellpolen und nicht länger polar asymmetrisch wie in Wildtyp Zellen. Hieraus folgern wir, dass eine erhöhte Menge an MglA im GTP gebundenen Zustand (MglA-GTP_H) die Polarität des RomR Proteins so verändert, dass sich RomR symmetrisch an beiden Polen verteilt. Demnach erfolgt kein Ausschluß der beiden Proteine an den Zellpolen, da MglA-GTP_H in

einer *mgIA^{gof}* Mutante nicht an dem vorderen Pol lokalisiert, jedoch ständig zwischen den beiden Polen oszilliert. Zusätzlich ist in dieser Mutante keine dynamische Lokalisierung von RomR zwischen den Polen zu beobachten. Folglich hat MglA-GTP_H einen entscheidenden Einfluss auf die polare und dynamische RomR Lokalisierung. Weiterhin wechseln die Zellen einer *mgIA^{gof}* Mutante ihre Bewegungsrichtung jedes Mal, wenn MglA-GTP_H am hinteren Zellpol eintrifft. Wir erklären uns die häufigen Richtungswechsel einer *mgIA^{gof}* Mutante wie folgt. Zunächst nehmen wir an, dass RomR in dieser Mutante durchaus eine dynamische Lokalisierung durchführt, jedoch ist diese aufgrund der geringen Intensitätsunterschiede der Signale an beide Polen nicht zu detektieren. Weiterhin vermuten wir, dass die Oszillation des MglA Proteins zwischen den Polen nicht nur einen entscheidenden Einfluss auf die Lokalisierung von RomR hat, sondern vermutlich ebenfalls auf andere Effektorproteine des A-Bewegungssystems wirkt. Demnach würden die symmetrische und dynamische RomR Lokalisierung zusammen mit der Oszillation des MglA^{gof} Proteins zwischen den Polen, den Zellen einer *mgIA^{gof}* Mutante ermöglichen, häufiger ihre Bewegungsrichtung ändern zu können als Wildtyp Zellen.

Übereinstimmend mit den Beobachtungen, dass sich MglA stromabwärts des Frz-Systems bezüglich der Richtungswechsel befindet, lokalisiert RomR-GFP unabhängig von der jeweiligen *frz* Mutation in verschiedenen *frz/mglA* Doppelmutanten, steht jedoch unter dem Einfluss der jeweiligen *mgIA* Mutation in diesen Zellen (Kap. 4.2.8). Demnach scheint RomR stromabwärts von MglA zu agieren, wobei MglA die Polarität und die dynamische Lokalisierung von RomR beeinflusst und so die Bewegung stimuliert und die Richtungswechsel der Zellen einleitet.

Ist diese Hypothese zutreffend, so würden wir erwarten, dass Zellen die eine RomR^{D53N} Substitutionsmutation (unterbindet die Phosphorylierungsfähigkeit von RomR und somit die dynamische RomR Lokalisierung in Wildtyp Zellen) in der *mgIA^{gof}* Mutante aufweisen, ihre Bewegungsrichtung nicht mehr wechseln können. Jedoch wechseln diese Zellen ca. alle 6 Minuten ihre Richtung (Kap. 4.2.9). Wir vermuten, dass diese Richtungswechsel durch die beobachtete symmetrische Verteilung des

RomR^{D53N} Proteins in dieser Mutante ermöglicht werden, wie es bereits für das RomR^{D53N} Protein in der *frz*^{gof} Mutante beschrieben wurde (vergl. Kap. 5.3). Ähnlich symmetrisch verteilt sich das RomR^{D53E}-GFP Protein in einer *mgIA*^{gof} Mutante. Einen Wechsel des RomR^{D53N} und des RomR^{D53E} Proteins vom alten hinteren Zellpol zum neuen hinteren Zellpol ist in dieser Mutante nicht zu beobachten.

Wir nehmen an, dass RomR^{D53N} in der *mgIA*^{gof} Mutante keine dynamische Lokalisierung zwischen den Polen durchführt und dass die symmetrische Verteilung des Proteins zusammen mit der Oszillation des MglA^{gof} Proteins zwischen den Polen ausreichend für die Aktivierung des A-Bewegungssystems an beiden Zellpolen ist. Wir gehen davon aus, dass dies ebenfalls der Fall in einer *frz*^{gof} Mutante ist (Kap. 5.3). In dieser Mutante ist vermutlich eine erhöhte Menge an MglA-GTP vorhanden durch die ständige Stimulierung der GTP Bindung an MglA, vermittelt durch das konstitutiv aktive Frz-System. MglA-GTP_H bewirkt die symmetrische Verteilung von RomR^{D53N} und zusammen mit der Oszillation des MglA^{gof} Proteins wechseln die Zellen häufig ihre Bewegungsrichtung.

Weiterhin vermuten wir, dass in einer *mgIA*^{gof} Mutante das RomR^{D53E} Protein die Lokalisierung zwischen den Polen wechselt, jedoch kann die dynamische Lokalisierung aufgrund der geringen Unterschiede in der Fluoreszenzsignalintensität an den beiden Polen nicht detektiert werden. Hinweis auf eine dynamische Lokalisierung des RomR^{D53E} Proteins gibt die Beobachtung, dass in einer *mgIA*^{gof} Mutante 84% der Zellen eine symmetrische Verteilung dieses Proteins aufweisen, wo hingegen in derselben Mutante das RomR^{D53N} Protein nur in 65% der Zellen eine symmetrische Lokalisierung zeigt. Folglich ist die polare symmetrische RomR Lokalisierung in der *mgIA*^{gof} Mutante unabhängig von dem Phosphorylierungsstatus des RomR Proteins.

Dennoch hat der Phosphorylierungsstatus von RomR einen Einfluss auf die dynamische RomR Lokalisierung und auf die Richtungswechsel. Denn Zellen, welche das MglA^{gof} Protein und das RomR^{D53E} Protein beinhalten, wechseln sehr häufig die Richtung ihrer Bewegung, wobei die Zellen zum Teil eher ein Zucken in ihrer Bewegung zeigen, als einen vollständigen Richtungswechsel (Kap. 4.2.9). Diese Beobachtung deutet einen additiven

Phänotyp bezüglich der Richtungswechsel in diesen Zellen an, hervorgerufen zum einen durch die symmetrische Lokalisierung von RomR^{D53E}, vermittelt durch das MglA^{gof} Protein und durch die Oszillation des MglA^{gof} Proteins. Zum anderen durch die dynamische Lokalisierung des RomR^{D53E} Proteins, welche unabhängig von dem MglA^{gof} Protein ist.

Wenn diese Aussage zutreffend ist, und die dynamische RomR^{D53E} Lokalisierung unabhängig von der *mglA*^{gof} Mutation ist, würde in dieser Mutante ein ständiger Austausch von RomR^{D53E} zwischen den Polen herrschen, während das RomR^{D53N} Protein permanent symmetrisch an den Polen lokalisiert ist. Diese Hypothese lässt sich durch die Analyse der RomR Lokalisierung mittels FRAP („Fluorescence Recovery After Photobleaching“) Methode testen. Wie bereits für die RomR Lokalisierung in der *frz*^{gof} Mutante beschrieben (Kap. 5.3), würden wir nach erfolgter Bleichung eines polaren RomR Signals einen Unterschied in der Wiederkehrtrate des Fluoreszenzsignals der RomR^{D53E}-GFP und der RomR^{D53N}-GFP Fusionsproteine in der *mglA*^{gof} Mutante erwarten.

Aufgrund der Ergebnisse der RomR Lokalisierung in den verschiedenen *mglA* Mutanten nehmen wir an, dass in einer *mglA*^{lof} Mutante aufgrund des ständig im GDP Zustand vorliegenden MglA Proteins die Polarität des RomR Proteins gestört ist. Das RomR Protein lokalisiert am „falschen“ Zellpol und die inkorrekte RomR Polarität und Lokalisierung resultiert in einem inaktiven A-Bewegungssystem. Zusätzlich bildet AglZ in der *mglA*^{lof} Mutante keine fokalen Adhäsionskomplexe innerhalb der Zelle aus, was die Hypothese eines inaktiven A-Bewegungssystems stützt (Kap. 4.2.10). Demnach wird die Anwesenheit einer gewissen Menge an MglA-GTP in den Zellen benötigt, um die A-Bewegung zu stimulieren.

In einer *mglA*^{gof} Mutante hingegen lokalisieren RomR und AglZ symmetrisch an beiden Polen und die Zellen vollziehen häufiger als Wildtyp Zellen einen Richtungswechsel (Kap. 4.2.10). Wir vermuten, dass die symmetrische Verteilung des RomR Proteins in einer *mglA*^{gof} Mutante durch die artifiziell erhöhte Menge an MglA-GTP hervorgerufen wird, welches ständig zwischen den Polen hin und her wandert und so das RomR Protein gleichmässig an beiden Polen verteilt, und zwar unabhängig von dem

Phosphorylierungsstatus des RomR Proteins. Demnach erfolgt kein Ausschluß der beiden Proteine an den Zellpolen, da MglA-GTP_H in einer *mgIA*^{gof} Mutante nicht an dem vorderen Pol lokalisiert, jedoch ständig zwischen den beiden Polen oszilliert. Dennoch stimuliert das Eintreffen von MglA-GTP_H vermutlich die Phosphorylierung von RomR, gewisse Mengen an RomR Protein gelangen zum neuen hinteren Zellpol, dort wird das A-Bewegungssystem stimuliert und die Zelle wechselt ihre Bewegungsrichtung.

Basierend auf den beobachteten RomR Lokalisierungsmustern in den verschiedenen *mgIA* Mutanten, haben wir das folgende Modell für die durch MglA vermittelte RomR Lokalisierung und deren Effekt auf die Richtungswechsel aufgestellt (Abb. 33). Das Frz-System vermittelt vermutlich eine vermehrte GTP Bindung an MglA. Daraufhin wird MglA-GTP_H am vorderen Pol freigesetzt und MglA wandert zum hinteren Zellpol. Dort angelangt bewirkt MglA-GTP_H eine Phosphorylierung des RomR Proteins, vermutlich vermittelt über eine Interaktion mit einer unbekanntes Histidinproteinkinase. Das phosphorylierte RomR Protein gelangt von dem alten hinteren Pol zum neuen hinteren Zellpol. Dort bindet sehr wahrscheinlich die unphosphorylierte RomR Form über die Output Domäne an den Zellpol. Wird eine asymmetrische Verteilung des RomR Proteins mit einer verstärkten Ansammlung des Proteins am neuen hinteren Zellpol erreicht, so stimuliert RomR einen Teil der A-Bewegungsmaschinerie an diesem Pol und die Zelle wechselt die Richtung ihrer Bewegung (Abb. 33). Die Menge an MglA im GTP gebundenen Zustand wird vermutlich durch die Interaktion mit GAPs und einer darauffolgenden GTP Hydrolyse reduziert und MglA-GTP_N lokalisiert an dem alten hinteren Zellpol (vergl. Modell Kap. 5.6). Aufgrund der Tatsache, dass in einer *romR* Deletionsmutante die Lokalisierung von YFP-MglA gestört ist und die Lokalisierung von RomR-GFP in den verschiedenen *mgIA* Mutanten ebenfalls verändert ist, vermuten wir, dass RomR die Lokalisierung von MglA beeinflusst, indem das unphosphorylierte RomR Protein vermutlich direkt oder indirekt die Rolle eines GAPs übernimmt.

Demnach würde das unphosphorylierte RomR am alten hinteren Pol die GTP Hydrolyse stimulieren und derart die Überführung von MglA-GTP_H zu MglA-GTP_N vermitteln (Abb. 33). Diese Überführung würde garantieren, dass

MglA am alten hinteren Zellpol lokalisiert, während das RomR Protein, vermittelt durch die MglA abhängige Phosphorylierung, zum neuen hinteren Zellpol gelangt. Über den beschriebenen Mechanismus würde sich die Lokalisierung beider Proteine an den Polen ausschließen. Diese Annahme wird von dem zeitlichen Ablauf der dynamischen MglA und RomR Lokalisierung in Wildtyp Zellen während eines Richtungswechsels gestützt. Bevor eine Zelle ihre Richtung ändert, beginnt das YFP-MglA Protein bereits die Lokalisierung von dem alten vorderen Zellpol zum alten hinteren Pol zu wechseln (Kap. 4.2.5). Dies wird gefolgt von dem Wechsel des RomR-GFP Proteins von dem alten hinteren Zellpol zum neuen hinteren Zellpol (Kap. 4.1.3). Lokalisiert YFP-MglA vollständig am alten hinteren Zellpol, verteilt sich RomR-GFP mit einer verstärkten Ansammlung am neuen hinteren Zellpol und die Zelle wechselt ihre Bewegungsrichtung. Zusätzlich könnte die Annahme, dass die unphosphorylierte RomR Form direkt oder indirekt ein GAP darstellt, erklären, warum Zellen einer *mgIA^{gof}* Mutante, welche das RomR^{D53N} Protein (unterbindet die Phosphorylierungsfähigkeit von RomR) beinhalten, ständig die Richtung ihre Bewegung wechseln, während Wildtyp Zellen mit dem RomR^{D53N} Protein keine Richtungswechsel vollziehen. Denn in Wildtyp Zellen bewirkt RomR^{D53N} eine dauerhafte Stimulierung der MglA GTP Hydrolyse, was zu einem konstanten Level an MglA-GTP_N führt und dementsprechend zu einer Stimulierung der A-Bewegung ohne die Durchführung von Richtungswechseln.

In einer *mgIA^{gof}* Mutante hingegen ist ständig eine erhöhte Menge von MglA im GTP gebundenen Zustand vorhanden, da dieses MglA Protein ausschließlich in der GTP gebundenen Form vorkommt. Die dauerhafte Stimulierung der GTP Hydrolyse in dieser Mutante durch RomR^{D53N} hat folglich keinen Einfluss auf MglA-GTP_H. Der Level bleibt konstant erhöht und die Zellen wechseln ständig ihre Bewegungsrichtung.

Zusammengefasst folgern wir, dass RomR mit MglA-GTP_H interagiert. Wobei MglA-GTP_H vermutlich die Aktivität einer unbekannteren Histidinproteinkinase beeinflusst, welche dann die Phosphorylierung des RomR Proteins vermittelt. Die unphosphorylierte RomR Form wiederum fungiert wahrscheinlich direkt oder indirekt als ein GAP, welches eine GTP Hydrolyse stimuliert und so die Überführung von MglA-GTP_H zu MglA-GTP_N vermittelt.

Phosphoryliertes RomR gelangt zum neuen hinteren Pol und MglA-GTP_N verbleibt am alten hinteren Pol. Dieser Mechanismus reguliert die Lokalisierung von MglA und RomR und bewirkt die Änderung der Polarität der A-Bewegungsmaschinerie während eines Richtungswechsels. Zurzeit überprüfen wir die Lokalisierung von YFP-MglA in einer RomR^{D53E} Mutante, welche partiell die strukturelle Konformation des phosphorylierten Proteins imitiert. Ist unsere Hypothese zutreffend, und das unphosphorylierte RomR Protein fungiert als eine Art GAP, so würden wir erwarten, dass YFP-MglA in dieser Mutante ständig zwischen den Polen hin und her oszilliert, da durch die ausbleibende GTP Hydrolyse eine erhöhte Menge von MglA im GTP gebundenen Zustand vorliegt. Zellen einer RomR^{D53E} Mutante weisen eine erhöhte Richtungswechselfrequenz auf. Diese Tatsache unterstützt das Modell in dem die unphosphorylierte RomR Form die GTP Hydrolyse beeinflusst.

Das beschriebene Modell könnte erklären, wie durch die Regulierung der polaren wie auch dynamischen MglA und RomR Lokalisierung in den Zellen eine Änderung der Polarität und der Aktivität der A-Bewegungsmaschinerie während eines Richtungswechsels in der zellulären Bewegung ermöglicht wird. Die kleine GTPase Ras ist ein Schlüsselregulator für den nukleocytoplasmatischen Transport während der Interphase. Versuche zeigten, dass eine asymmetrische Verteilung der GTP gebundenen Ras Form die Direktionalität vieler nukleärer Transportprozesse bestimmt (Ohba *et al.*, 1999) (Manser, 2002). Ähnlich scheint die Oszillation des MglA-GTP Proteins zwischen den Zellpolen die zielgerichtete Lokalisierung von Bewegungsproteinen zu bestimmen.

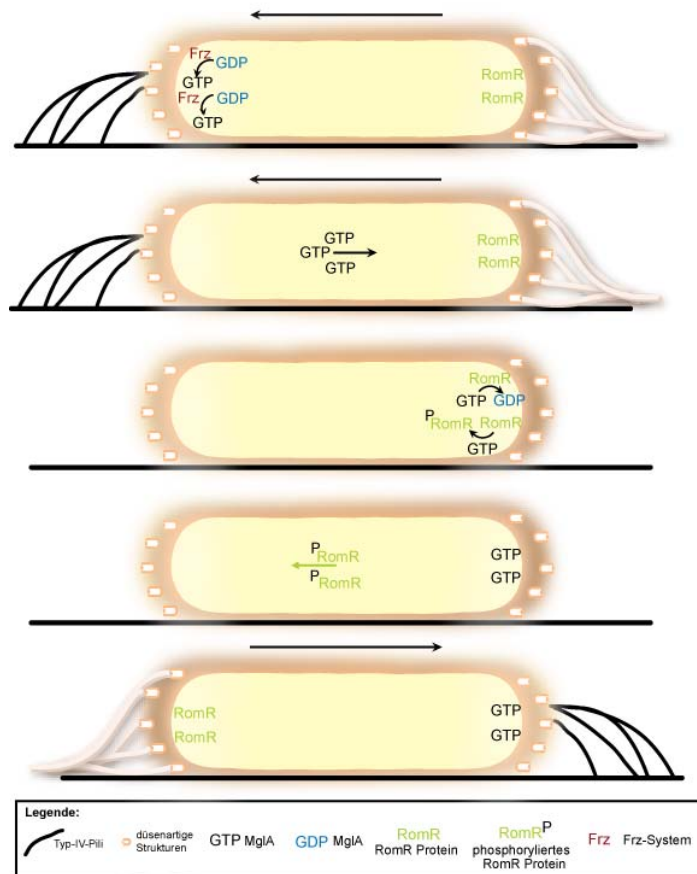


Abbildung 33: Vereinfachtes Modell der dynamischen Lokalisierung von MglA und RomR. Schematische Darstellung einer Zelle, welche die Bewegungsrichtung ändert. Die schwarzen Pfeile deuten die Bewegungsrichtung der Zelle an. Innerhalb der Zelle ist die Lokalisierung verschiedener Proteine gezeigt. Das Modell wird im Text erläutert.

5.9 Modell für die Stimulierung der Richtungswechsel in dem A-Bewegungssystem

Basierend auf den gesamten Ergebnissen dieser Arbeit und den bereits diskutierten Annahmen und Hypothesen nehmen wir das folgende Modell für die Einleitung von Richtungswechseln in dem A-Bewegungssystem an (Abb. 34).

Das FrzCD oder das FrzF Protein des Frz chemosensorischen Systems empfängt ein noch unbekanntes Signal (Zusman *et al.*, 2007), welches letztlich in einer Änderung der Autokinaseaktivität von FrzE resultiert (Abb. 34A). FrzE autophosphoryliert einen konservierten Histidinrest in der FrzE Kinase Domäne und die Phosphorylgruppe wird von der FrzE Kinase zur Receiver Domäne von

FrzZ transferiert (Kap. 2.6) (Leonardy *et al.*, 2008). Wir nehmen in unserem Modell an, dass eine Konformationsänderung des FrzZ Proteins, bedingt durch die Phosphorylierung, eine direkte (GEF) oder indirekte Interaktion mit MglA stimuliert und in einer vermehrten Bindung von GTP an MglA resultiert (Abb. 34A+B). Die GTP Bindung führt zu einer erhöhten Menge an MglA im GTP gebundenen Zustand (MglA-GTP_H). Daraufhin wird MglA-GTP_H am vorderen Pol freigesetzt und MglA wandert zum hinteren Zellpol (Abb. 34B). Vermutlich erfolgt der Transfer des Proteins entlang eines möglichen Zytoskelettelementes in der Zelle. Ist MglA-GTP_H am hinteren Pol angelangt, so interagiert MglA-GTP vermutlich mit der unphosphorylierten RomR Form (GAP) an diesem Zellpol. Dies stimuliert die GTP Hydrolyse von MglA (Abb. 34A). Zusätzlich interagiert MglA-GTP mit einer unbekanntem Histidinproteinkinase, welche daraufhin RomR phosphoryliert. Die Phosphorylierung von RomR bewirkt die polare Freisetzung des Proteins und RomR gelangt zum neuen hinteren Zellpol, wo die unphosphorylierte Form an den Pol bindet (Abb. 34B). Gleichzeitig wird durch die GTP Hydrolyse erneut eine niedrige bis mittlere Menge an MglA-GTP (MglA-GTP_N) erreicht, welche eine polare Lokalisierung von MglA an dem neuen vorderen Zellpol vermittelt. MglA-GTP_N lokalisiert am neuen vorderen Zellpol, RomR lokalisiert mit einer verstärkten Ansammlung des Proteins am neuen hinteren Zellpol, stimuliert dort einen Teil der A-Bewegungsmaschinerie und die Zelle bewegt sich vorwärts. Ein neuer Zyklus kann beginnen.

In dem erläuterten Modell wird der Signalweg für die Einleitung der Richtungswechsel in dem A-Bewegungssystem diskutiert, wobei hierfür nur das Frz-System, MglA und RomR berücksichtigt wurden. Natürlich sind wesentlich mehr Proteine in diesen Prozess involviert. Das RomR Protein stellt nur einen Teil der A-Bewegungsmaschinerie dar (Kap. 5.1). Wir nehmen an, dass die verstärkte Ansammlung von RomR am hinteren Zellpol die Sekretion von Schleim stimuliert. Wobei die dynamische Lokalisierung von RomR während eines Richtungswechsels in einer Deaktivierung der düsenartigen Strukturen am alten hinteren Zellpol und eine Aktivierung der Schleimsekretion von düsenartigen Strukturen am neuen hinteren Pol resultieren könnte. Die dynamische Lokalisierung von RomR wird, wie in dem Modell beschrieben, durch MglA vermittelt. RomR wiederum beeinflusst die MglA Lokalisierung

(Abb. 34). Neben RomR ist das Protein AglZ ebenfalls essentiell für die A-Bewegung (Yang *et al.*, 2004). Das AglZ Protein definiert die fokalen Adhäsionskomplexe in den Zellen (Kap. 2.4) (Mignot *et al.*, 2007). Wir vermuten, dass das A-Bewegungssystem aus zwei unterschiedlichen Einheiten besteht. Zum einem aus den düsenartigen Strukturen, wobei das RomR Protein die Schleimsekretion am hinteren Zellpol stimuliert, und zum anderen aus den AglZ enthaltenen fokalen Adhäsionskomplexen entlang des Zellkörpers. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die AglZ Lokalisierung ebenfalls durch das MglA Protein bestimmt wird (Kap. 4.2.10). Wird das AglZ Protein in dem Modell berücksichtigt, so nehmen wir an, dass die Oszillation des MglA Proteins in der Zelle die Ausbildung der fokalen Adhäsionskomplexe stimuliert. Zusätzlich legt die Oszillation des MglA Proteins, wie auch die des RomR Proteins die Polarität in der Zelle fest, und die fokalen Adhäsionskomplexe richten sich nach dieser Polarität aus. Diese Annahme könnte erklären, warum das AglZ Protein in der *mglA*^{lof} Mutante keine Adhäsionskomplexe entlang der Zelle ausbildet (Kap. 4.2.10). Nach diesem Modell bewirkt eine veränderte Verteilung des MglA und des RomR Proteins während eines Richtungswechsels eine neue Ausrichtung der AglZ enthaltenen fokalen Adhäsionskomplexe in der Zelle.

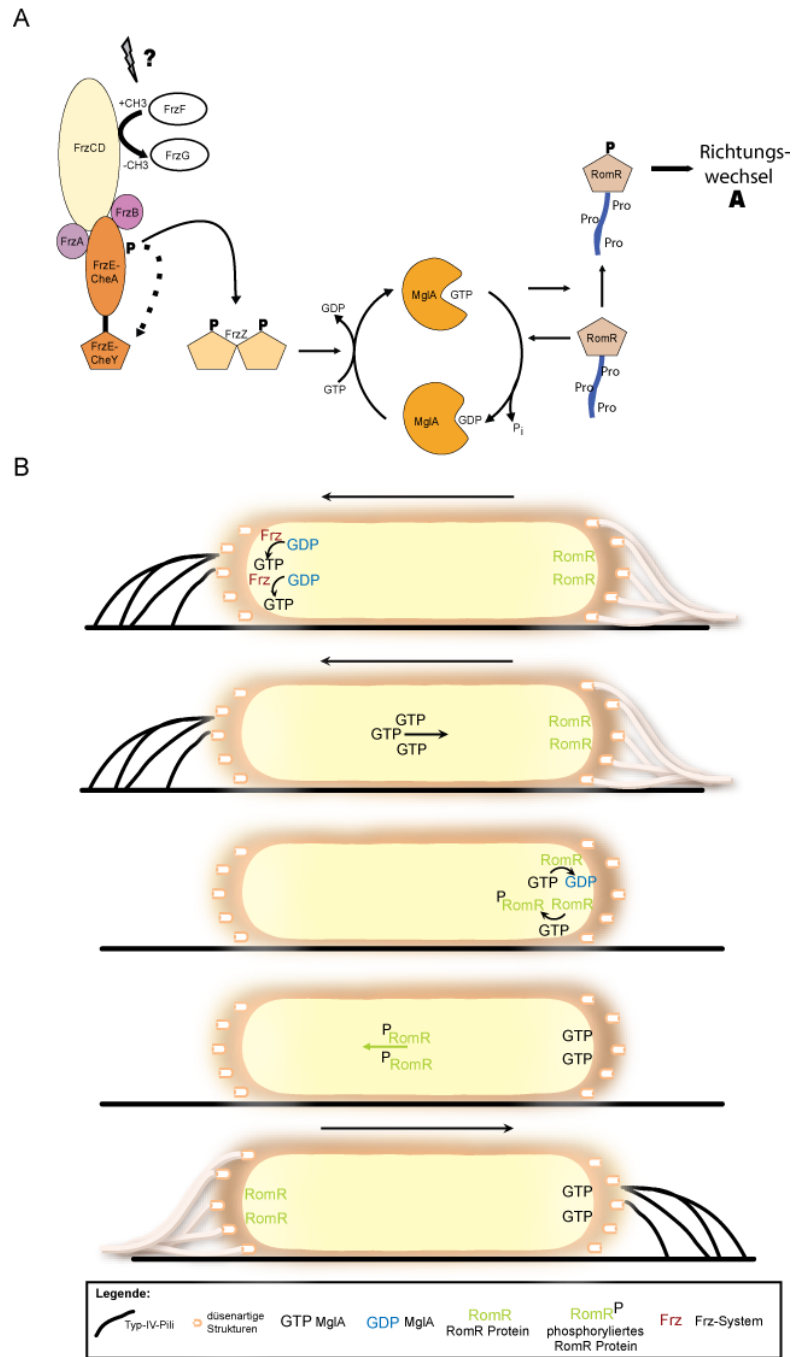


Abbildung 34: Vereinfachtes Modell für die Regulierung der Polarität des A-Bewegungssystems während eines Richtungswechsels. A) Modell für die Stimulierung der Richtungswechsel auf molekularer Ebene. Die einzelnen Komponenten des Signalwegs und die Beschreibung des Modells sind im Text erläutert. **B)** Vereinfachtes Modell für die Regulierung der Polarität des A-Bewegungssystems in einer schematisch dargestellten Zelle, die ihre Bewegungsrichtung ändert. Innerhalb der Zelle ist die Lokalisation verschiedener Proteine gezeigt. Die schwarzen Pfeile oberhalb der Zelle deuten die Bewegungsrichtung an. Das Modell wird detailliert im Text beschrieben.

Dieses Modell könnte erklären, wie die Polarität der A-Bewegungsmaschinerie und somit die Aktivität des Systems während eines Richtungswechsels reguliert wird, um die erneute Vorwärtsbewegung in die entgegengesetzte Richtung zu garantieren. Wobei MglA die Rolle eines Schlüsselregulators der Polarität übernimmt, denn die Oszillation von MglA legt in der Zelle fest, welcher Pol der vordere Zellpol und welcher der hintere Pol ist. Zusätzlich beeinflusst die Oszillation die Verteilung der A-Bewegungsproteine in der Zelle und reguliert so die Polarität und die Aktivität der A-Bewegung. Diese Festlegung der Polarität und Regulierung der Lokalisierung der A-Bewegungskomponenten ermöglicht es den Zellen auf ein Signal hin, wahrgenommen und weitergeleitet durch das Frz-System, einen Richtungswechsel zu vollziehen. Hierbei hält das MglA Protein Rücksprache mit dem A-System über die Interaktion mit RomR. Dies stellt eine Art Kontrollpunkt dar, bevor die gesamte Polarität des A-Systems neu orientiert wird. Zusätzlich bewirkt die Interaktion eine Reduzierung der Menge an MglA im GTP gebundenen Zustand und garantiert so, dass die Zelle zunächst eine Vorwärtsbewegung ausführt und nicht ständig die Bewegungsrichtung ändert.

Die beiden Bewegungssysteme in *M. xanthus* arbeiten synergistisch, um eine Bewegung in dieselbe Richtung zu erzeugen (Kaiser & Crosby, 1983a, Kaiser & Crosby, 1983b). Zusätzlich konnte in dieser Arbeit direkt gezeigt werden, dass das S-Bewegungsprotein FrzS und das A-Bewegungsprotein RomR unabhängig voneinander, jedoch synchron zwischen den beiden Polen lokalisieren, wenn die Zelle ihre Bewegungsrichtung ändert (vergl. Kap. 4.1.7). Folglich wechseln die beiden Bewegungsmaschinerien synchron ihre Polarität und dieser synchrone Wechsel wird durch das Frz-System vermittelt. Nach unserem Modell bewirkt die Oszillation des MglA Proteins auf ein Signal des Frz-System hin eine Polaritätsänderung des A-Bewegungssystem während eines Richtungswechsels. Aufgrund des synchronen Wechsels der Polarität beider Bewegungssysteme ist anzunehmen, dass die Oszillation von MglA ebenfalls die Polarität und Aktivität der S-Bewegung beeinflusst. Die Tatsache, dass *mgIA* Mutanten vollständig bewegungsunfähig sind und sich auch nicht mit dem S-Bewegungssystem fortbewegen können (Hodgkin & Kaiser, 1979b), spricht für einen Zusammenhang zwischen der Oszillation des MglA Proteins

und der Aktivität des S-Bewegungssystems. Fraglich ist, ob MglA direkt oder indirekt das S-System beeinflusst. Die beschriebene Rückkopplung zwischen MglA und RomR deutet eher auf eine indirekte Stimulierung hin, denn Zellen einer *romR* Deletionsmutante können sich noch mit dem S-Bewegungssystem vorwärts bewegen, obwohl das MglA Protein in dieser Mutante eine inkorrekte Lokalisierung aufweist. Diese S-Bewegung ist jedoch leicht beeinträchtigt. Vermutlich ist das inkorrekt lokalisierte MglA Protein nicht mehr fähig ohne RomR die A-Bewegung zu stimulieren, kann jedoch noch indirekt die S-Bewegung teilweise anregen, was in einer beeinträchtigten S-Bewegung resultiert. In dieser Arbeit wurde ausschließlich der Polaritätswechsel der A-Bewegungsmaschinerie analysiert. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob und wie das MglA Protein die Polarität des S-Bewegungssystems beeinflusst.

In dieser Arbeit konnte auf genetischer Ebene gezeigt werden, dass MglA *in vivo* eine prokaryontische kleine GTPase der Ras/Rac/Rho Superfamilie darstellt, welche wahrscheinlich als eine Art Schlüsselregulator die Polarität des gesamten A-Bewegungssystems in *M. xanthus* kontrolliert. Diese Regulierung ist besonders von Bedeutung wenn die Zellen einen Richtungswechsel vollziehen. Die Richtungswechsel erfolgen auf ein unbekanntes Signal hin, welches vom Frz chemosensorischen System wahrgenommen wird. Eine reduzierte Richtungswechselfrequenz ermöglicht es den *M. xanthus* Zellen zu aggregieren und Fruchtkörper auszubilden (Jelsbak & Søgaard-Andersen, 1999). Demnach haben Richtungswechsel einen entscheidenden Einfluss auf die gerichtete Bewegung der Zellen und deren Überlebensstrategie. In *Dictyostelium discoïdum* reguliert eine kleine GTPase die Dynamik des Zytoskletts und derart die Zellbewegung und die Zellpolarität während der Chemotaxis der Zellen (Charest & Firtel, 2007). Ähnlich wie *M. xanthus* bilden diese Zellen unter nährstoffarmen Bedingungen Fruchtkörper aus, um ihr Überleben zu sichern. Die chemotaktische Bewegung der Zellen in Zellaggregate ermöglicht erst die Ausbildung der Fruchtkörper (Charest & Firtel, 2007). MglA wird ebenfalls für eine gerichtete Bewegung der *M. xanthus* Zellen benötigt. Es wäre denkbar, dass die Oszillation des MglA Proteins auf eine ähnliche Weise wie die GTPase in *D. discoïdum*, die Dynamik eines möglichen

Zytoskelettelements in *M. xanthus* beeinflusst, so die Bewegung stimuliert und die Polarität in der Zelle festlegt. Weiterhin verdeutlicht dieses Beispiel, dass die Funktionsweise der prokaryontischen GTPase MglA vermutlich derer der eukaryontischen GTPasen sehr ähnlich ist.

Die Ausbildung einer Zellpolarität spielt bei vielen zell- und entwicklungsbiologischen Prozessen eine zentrale Rolle. Häufig stellt die Polarität einer Zelle die Grundlage für gerichtete Signaltransduktion, Sekretion oder lokales Zellwachstum, wie auch für asymmetrische Zellteilung dar. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass kleine GTPasen der Ras/Rac/Rho Superfamilie in eukaryontischen Zellen eine fundamentale Funktion in der Festlegung der Zellpolarität haben (Iden & Collard, 2008; Etienne-Manneville & Hall, 2002). In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine kleine GTPase der Ras/Rac/Rho Superfamilie eine Schlüsselrolle in der Festlegung der Zellpolarität in einem Bakterium innehat.

6 Anhang

6.1 Phänotyp einer *romR* „in frame“ Deletionsmutante

Der Response Regulator RomR ist essentiell für die Fortbewegung der Zellen mittels des A-Bewegungssystems. Um eine *romR* Mutante zu erhalten, welche keine Resistenzen trägt, wurde eine *romR* „in frame“ Deletionsmutante wie in Kap. 3.5.11 erläutert hergestellt.

Die Zellen einer *romR* Mutante SA1128 sind in Bewegungsanalysen auf 0,5%-CTT-1,5%-Agarplatten nicht fähig sich als einzelne Zellen fortzubewegen (vergl. Kap. 4.1). Der Defekt der *romR*-Mutante im A-Bewegungssystem äussert sich durch das Fehlen von vereinzelt Zellen am Kolonienrand wie sie bei Wildtyp Kolonien zu beobachten sind (Abb. 35). Ohne den näheren Kontakt zu anderen Zellen sind diese Zellen nicht fähig sich fortzubewegen. Ebenso verhalten sich die Zellen der *romR* Deletionsmutante. Die in Abbildung 36 dargestellte Kolonie des Stammes DK1622 zeigt vereinzelt Zellen am Kolonienrand, die beiden *romR* Mutanten jedoch nicht.

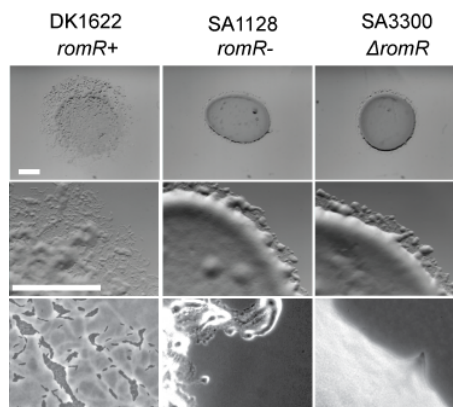


Abbildung 35: Bewegungsphänotyp der *romR* Deletionsmutante. Stellt die Bewegungsphänotypen der verschiedenen Stämme mit den gekennzeichneten Genotypen dar. Die obere Reihe zeigt eine 50-fache Vergrößerung der jeweiligen Stämme, welche zuvor auf 0,5% CTT-1,5% Agar-Platten getropft, bei 32°C für 24 Stunden inkubiert und anschließend unter dem Stereomikroskop photographiert wurden. Die untere Reihe zeigt eine 400-fache Vergrößerung der jeweiligen Zellen auf einem Objektträger mit einer dünnen Agarschicht aufgenommen an dem Durchlicht Mikroskop. Der weiße Balken auf der Abbildung des Wildtyp Stammes entspricht 5 mm (oben) bzw. 50 µm (unten).

Um sicher zu stellen dass die *romR* Deletionmutante nicht mehr fähig ist RomR zu synthetisieren, wurde eine Western Blot Analysen mithilfe eines anti-RomR Antikörpers (Serum; vergl. Kap. 3.7.4) durchgeführt (Abb. 36). In DK1622 Zellen (Abb. 36; Spur 1, *romR*+) wurde das RomR Protein, verglichen

mit dem Marker prestained PageRuler von Fermentas, in der erwarteten Höhe von ungefähr 42 kDa in einer SDS-PAGE aufgetrennt und nach anschließendem Transfer auf eine Nitrocellulose Membran mit dem anti-MglA Antikörper nachgewiesen. In der *romR* Mutante SA1128 und in der *romR* Deletionsmutante ist wie erwartet kein RomR detektierbar (Abb. 36; Spur 2 bzw 3). Demnach wird in der *romR* Deletionsmutante kein RomR mehr synthetisiert, wodurch der zuvor beschriebene Bewegungsphänotyp dieser Zellen hervorgerufen wird.

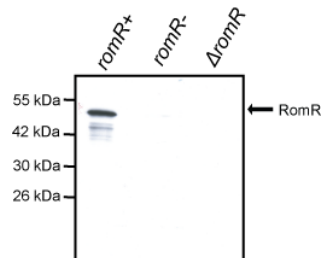


Abbildung 36: Akkumulation des RomR Protein *in vivo*. In Western Blot Analysen wurde die RomR mithilfe eines anti-RomR Antikörpers in den verschiedenen Zellextrakten der Stämme mit den gekennzeichneten Genotypen nachgewiesen. Hierzu wurde Protein von gleichen Mengen an Zellen in einer SDS-PAGE nach Lämmli aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrocellulose Membran transferiert und die RomR Proteine mit dem genannten Antikörper detektiert. Links neben der ersten Spur wird jeweils die Auftrennung des Page Ruler Prestained Markers in kDa angedeutet. Die erwartete Laufhöhe des RomR Proteins ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Literaturverzeichnis

- Arnold, J. W. & L. J. Shimkets, (1988a) Cell surface properties correlated with cohesion in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **170**: 5771-5777.
- Arnold, J. W. & L. J. Shimkets, (1988b) Inhibition of cell-cell interactions in *Myxococcus xanthus* by congo red. *J Bacteriol* **170**: 5765-5770.
- Avery, L. & D. Kaiser, (1983) In situ transposon replacement and isolation of a spontaneous tandem genetic duplication. *Mol Gen Genet* **191**: 99-109.
- Behmlander, R. M. & M. Dworkin, (1994) Biochemical and structural analyses of the extracellular matrix fibrils of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **176**: 6295-6303.
- Bernards, A. & J. Settleman, (2004) GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol* **14**: 377-385.
- Birck, C., L. Mourey, P. Gouet, B. Fabry, J. Schumacher, P. Rousseau, D. Kahn & J. P. Samama, (1999) Conformational changes induced by phosphorylation of the FixJ receiver domain. *Structure* **7**: 1505-1515.
- Blackhart, B. D. & D. R. Zusman, (1985) "Frizzy" genes of *Myxococcus xanthus* are involved in control of frequency of reversal of gliding motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 8771-8774.
- Bourne, H. R., D. A. Sanders & F. McCormick, (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**: 117-127.
- Bowden, M. G. & H. B. Kaplan, (1998) The *Myxococcus xanthus* lipopolysaccharide O-antigen is required for social motility and multicellular development. *Mol Microbiol* **30**: 275-284.
- Bowman, A. B., R. S. Patel-King, S. E. Benashski, J. M. McCaffery, L. S. Goldstein & S. M. King, (1999) Drosophila roadblock and Chlamydomonas LC7: a conserved family of dynein-associated proteins involved in axonal transport, flagellar motility, and mitosis. *J Cell Biol* **146**: 165-180.
- Bradford, M. M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Burchard, R. P., (1982) Trail following by gliding bacteria. *J Bacteriol* **152**: 495-501.
- Bustamante, V. H., I. Martinez-Flores, H. C. Vlamakis & D. R. Zusman, (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.
- Charest, P. G. & R. A. Firtel, (2007) Big roles for small GTPases in the control of directed cell movement. *Biochem J* **401**: 377-390.
- Cheng, Y. & D. Kaiser, (1989) *dsg*, a gene required for cell-cell interaction early in *Myxococcus* development. *J Bacteriol* **171**: 3719-3726.
- Cherfils, J. & P. Chardin, (1999) GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **24**: 306-311.
- Dawid, W., (2000) Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 403-427.

- Domian, I. J., K. C. Quon & L. Shapiro, (1997) Cell type-specific phosphorylation and proteolysis of a transcriptional regulator controls the G1-to-S transition in a bacterial cell cycle. *Cell* **90**: 415-424.
- Downard, J., S. V. Ramaswamy & K. S. Kil, (1993) Identification of *esg*, a genetic locus involved in cell-cell signaling during *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol* **175**: 7762-7770.
- Ellehaug, E., M. Nørregaard-Madsen & L. Søgaard-Andersen, (1998) The FruA signal transduction protein provides a checkpoint for the temporal co-ordination of intercellular signals in *M. xanthus* development. *Mol Microbiol* **30**: 807-817.
- Elowitz, M. B., M. G. Surette, P. E. Wolf, J. B. Stock & S. Leibler, (1999) Protein mobility in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 197-203.
- Etienne-Manneville, S. & A. Hall, (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**: 629-635.
- Figge, R. M., A. V. Divakaruni & J. W. Gober, (2004) MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **51**: 1321-1332.
- Galperin, M. Y., (2006) Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol* **188**: 4169-4182.
- Gitai, Z., (2005) The new bacterial cell biology: moving parts and subcellular architecture. *Cell* **120**: 577-586.
- Gitai, Z., N. Dye & L. Shapiro, (2004) An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 8643-8648.
- Gitai, Z., N. A. Dye, A. Reisenauer, M. Wachi & L. Shapiro, (2005) MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. *Cell* **120**: 329-341.
- Goldfinger, L. E., (2008) Choose your own path: specificity in Ras GTPase signaling. *Mol Biosyst* **4**: 293-299.
- Hagen, D. C., A. P. Bretscher & D. Kaiser, (1978) Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*. *Dev Biol* **64**: 284-296.
- Hall, A. & C. D. Nobes, (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**: 965-970.
- Hartzell, P. & D. Kaiser, (1991) Upstream gene of the *mgl* operon controls the level of MglA protein in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **173**: 7625-7635.
- Hartzell, P. L., (1997) Complementation of sporulation and motility defects in a prokaryote by a eukaryotic GTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 9881-9886.
- Henrichsen, J., (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* **36**: 478-503.
- Hlubek, A., K. O. Schink, M. Mahlert, B. Sandrock & M. Bolker, (2008) Selective activation by the guanine nucleotide exchange factor Don1 is a main determinant of Cdc42 signalling specificity in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **68**: 615-623.
- Hodgkin, J. & D. Kaiser, (1977) Cell-to-cell stimulation of movement in nonmotile mutants of *Myxococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 2938-2942.

- Hodgkin, J. & D. Kaiser, (1979a) Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales) : genes controlling movement of single cells. *Mol. Gen. Genet.* **171**: 167-176.
- Hodgkin, J. & D. Kaiser, (1979b) Genetics of Gliding Motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): Two gene systems control movement. *Mol. Gen. Genet.* **171**: 177-191.
- Iden, S. & J. G. Collard, (2008) Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 846-859.
- Inclan, Y. F., H. C. Vlamakis & D. R. Zusman, (2007) FrzZ, a dual CheY-like response regulator, functions as an output for the Frz chemosensory pathway of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **65**: 90-102.
- Jaffe, A. B. & A. Hall, (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 247-269.
- Jakovljevic, V., S. Leonardy, M. Hoppert & L. Sogaard-Andersen, (2008) PilB and PilT are ATPases acting antagonistically in type IV pilus function in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **190**: 2411-2421.
- Jelsbak, L. & L. Sogaard-Andersen, (1999) The cell surface-associated intercellular C-signal induces behavioral changes in individual *Myxococcus xanthus* cells during fruiting body morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5031-5036.
- Jelsbak, L. & L. Sogaard-Andersen, (2000) Pattern formation: fruiting body morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 637-642.
- Jelsbak, L. & L. Sogaard-Andersen, (2002) Pattern formation by a cell surface-associated morphogen in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 2032-2037.
- Kaiser, D., (1979) Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 5952-5956.
- Kaiser, D. & C. Crosby, (1983a) Cell movements and its coordination in swarms of *Myxococcus xanthus*. *Cell Motil* **3**: 227-245.
- Kaiser, D. & C. Crosby, (1983b) Cell movements and its coordination in swarms of *Myxococcus xanthus*. *Cell Motil* **3**: 275-284.
- Kaiser, D. & L. Kroos, (1993a) Intercellular Signalling. In: *Myxobacteria II*. M. Dworkin & D. Kaiser (eds). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 257-283.
- Kaiser, D. & L. Kroos, (1993b) Intercellular signalling. In: *Myxobacteria II*. M. Dworkin & D. Kaiser (eds). Washington, D.C: Amer. Soc. Microbiol., pp.
- Kim, S. K. & D. Kaiser, (1990a) C-factor: a cell-cell signaling protein required for fruiting body morphogenesis of *M. xanthus*. *Cell* **61**: 19-26.
- Kim, S. K. & D. Kaiser, (1990b) Cell alignment required in differentiation of *Myxococcus xanthus*. *Science* **249**: 926-928.
- Kim, S. K. & D. Kaiser, (1990c) 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.
- Klebe, C., H. Prinz, A. Wittinghofer & R. S. Goody, (1995) The kinetic mechanism of Ran--nucleotide exchange catalyzed by RCC1. *Biochemistry* **34**: 12543-12552.
- Koonin, E. V. & L. Aravind, (2000) Dynein light chains of the Roadblock/LC7 group belong to an ancient protein superfamily implicated in NTPase regulation. *Curr Biol* **10**: R774-776.

- Kroos, L., P. Hartzell, K. Stephens & D. Kaiser, (1988) A link between cell movement and gene expression argues that motility is required for cell-cell signaling during fruiting body development. *Genes Dev* **2**: 1677-1685.
- Kroos, L. & D. Kaiser, (1987) Expression of many developmentally regulated genes in *Myxococcus* depends on a sequence of cell interactions. *Genes & Dev.* **1**: 840-854.
- Kruse, T., S. Lobedanz, N. M. S. Berthelsen & L. Sogaard-Andersen, (2001) C-signal: A cell surface-associated morphogen that induces and coordinates multicellular fruiting body morphogenesis and sporulation in *M. xanthus*. *Mol Microbiol* **40**: 156-168.
- Kruse, T., J. Moller-Jensen, A. Lobner-Olesen & K. Gerdes, (2003) Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*. *EMBO J* **22**: 5283-5292.
- Kuner, J. M. & D. Kaiser, (1982) Fruiting body morphogenesis in submerged cultures of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **151**: 458-461.
- Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lam, H., J. Y. Matroule & C. Jacobs-Wagner, (2003) The asymmetric spatial distribution of bacterial signal transduction proteins coordinates cell cycle events. *Dev Cell* **5**: 149-159.
- Lenzen, C., R. H. Cool, H. Prinz, J. Kuhlmann & A. Wittinghofer, (1998) Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras and the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25Mm. *Biochemistry* **37**: 7420-7430.
- Leonardy, S., I. Bulyha & L. Sogaard-Andersen, (2008) Reversing cells and oscillating motility proteins. *Mol Biosyst* **4**: 1009-1014.
- Leonardy, S., G. Freymark, S. Hebener, E. Ellehauge & L. Sogaard-Andersen, (2007) Coupling of protein localization and cell movements by a dynamically localized response regulator in *Myxococcus xanthus*. *EMBO J* **26**: 4433-4444.
- Li, S., B. U. Lee & L. J. Shimkets, (1992) *csgA* expression entrains *Myxococcus xanthus* development. *Genes Dev* **6**: 401-410.
- Li, Y., V. H. Bustamante, R. Lux, D. Zusman & W. Shi, (2005) Divergent regulatory pathways control A and S motility in *Myxococcus xanthus* through FrzE, a CheA-CheY fusion protein. *J Bacteriol* **187**: 1716-1723.
- Li, Y., H. Sun, X. Ma, A. Lu, R. Lux, D. Zusman & W. Shi, (2003) Extracellular polysaccharides mediate pilus retraction during social motility of *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 5443-5448.
- Lobedanz, S. & L. Sogaard-Andersen, (2003) Identification of the C-signal, a contact-dependent morphogen coordinating multiple developmental responses in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev* **17**: 2151-2161.
- Magrini, V., C. Creighton & P. Youderian, (1999) Site-specific recombination of temperate *Myxococcus xanthus* phage Mx8: genetic elements required for integration. *J Bacteriol* **181**: 4050-4061.
- Manser, E. J., (2002) The GTPase cycle. How dominant inhibitory mutants block the biological functions of small GTPases. *Methods Mol Biol* **189**: 3-11.
- Matroule, J. Y., H. Lam, D. T. Burnette & C. Jacobs-Wagner, (2004) Cytokinesis monitoring during development; rapid pole-to-pole shuttling of a signaling

- protein by localized kinase and phosphatase in *Caulobacter*. *Cell* **118**: 579-590.
- Mattick, J. S., (2002) Type IV pili and twitching motility. *Ann. Rev. Microbiol.* **56**: 289-314.
- Mauriello, E. M., D. P. Astling, O. Sliusarenko & D. R. Zusman, (2009) Localization of a bacterial cytoplasmic receptor is dynamic and changes with cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- McCurdy, H. D., (1974) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, p. pp.76. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
- McGlade, J., B. Brunkhorst, D. Anderson, G. Mbamalu, J. Settleman, S. Dedhar, M. Rozakis-Adcock, L. B. Chen & T. Pawson, (1993) The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. *EMBO J* **12**: 3073-3081.
- Merz, A. J., M. So & M. P. Sheetz, (2000) Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* **407**: 98-102.
- Mignot, T., (2007) The elusive engine in *Myxococcus xanthus* gliding motility. *Cell Mol Life Sci* **64**: 2733-2745.
- Mignot, T. & J. R. Kirby, (2008) Genetic circuitry controlling motility behaviors of *Myxococcus xanthus*. *Bioessays* **30**: 733-743.
- Mignot, T., J. P. Merlie, Jr. & D. R. Zusman, (2005) Regulated pole-to-pole oscillations of a bacterial gliding motility protein. *Science* **310**: 855-857.
- Mignot, T., J. W. Shaevitz, P. L. Hartzell & D. R. Zusman, (2007) Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility. *Science* **315**: 853-856.
- Nariya, H. & M. Inouye, (2008) MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Myxococcus* development. *Cell* **132**: 55-66.
- O'Connor, K. A. & D. R. Zusman, (1991) Analysis of *Myxococcus xanthus* cell types by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J Bacteriol* **173**: 3334-3341.
- Ohba, T., M. Nakamura, H. Nishitani & T. Nishimoto, (1999) Self-organization of microtubule asters induced in *Xenopus* egg extracts by GTP-bound Ran. *Science* **284**: 1356-1358.
- Ohba, Y., K. Kurokawa & M. Matsuda, (2003) Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. *EMBO J* **22**: 859-869.
- Paul, R., S. Weiser, N. C. Amiot, C. Chan, T. Schirmer, B. Giese & U. Jenal, (2004) Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev* **18**: 715-727.
- Reichenbach, H., (1999) The ecology of the myxobacteria. *Environ Microbiol* **1**: 15-21.
- Rendulic, S., P. Jagtap, A. Rosinus, M. Eppinger, C. Baar, C. Lanz, H. Keller, C. Lambert, K. J. Evans, A. Goesmann, F. Meyer, R. E. Sockett & S. C. Schuster, (2004) A predator unmasked: life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. *Science* **303**: 689-692.
- Rodriguez, A. M. & A. M. Spormann, (1999) Genetic and molecular analysis of *cglB*, a gene essential for single-cell gliding in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **181**: 4381-4390.
- Rolbetzki, A., M. Ammon, V. Jakovljevic, A. Konovalova & L. Sogaard-Andersen, (2008) Regulated secretion of a protease activates

- intercellular signaling during fruiting body formation in *M. xanthus*. *Dev Cell* **15**: 627-634.
- Rosenberg, E., K. H. Keller & M. Dworkin, (1977) Cell density-dependent growth of *Myxococcus xanthus* on casein. *J Bacteriol* **129**: 770-777.
- Rossman, K. L. & J. Sondek, (2005) Larger than Dbl: new structural insights into RhoA activation. *Trends Biochem Sci* **30**: 163-165.
- Sager, B. & D. Kaiser, (1993) Two cell-density domains within the *Myxococcus xanthus* fruiting body. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3690-3694.
- Sager, B. & D. Kaiser, (1994) Intercellular C-signaling and the traveling waves of *Myxococcus*. *Genes Dev* **8**: 2793-2804.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis, (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanford, R. A., J. R. Cole & J. M. Tiedje, (2002) Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halorespiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl Environ Microbiol* **68**: 893-900.
- Santos, E. & A. R. Nebreda, (1989) Structural and functional properties of ras proteins. *FASEB J* **3**: 2151-2163.
- Saraste, M., P. R. Sibbald & A. Wittinghofer, (1990) The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **15**: 430-434.
- Scheffzek, K., M. R. Ahmadian, L. Wiesmuller, W. Kabsch, P. Stege, F. Schmitz & A. Wittinghofer, (1998) Structural analysis of the GAP-related domain from neurofibromin and its implications. *EMBO J* **17**: 4313-4327.
- Self, A. J. & A. Hall, (1995) Purification of recombinant Rho/Rac/G25K from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **256**: 3-10.
- Shi, X., S. Wegener-Feldbrugge, S. Huntley, N. Hamann, R. Hedderich & L. Sogaard-Andersen, (2008) Bioinformatics and experimental analysis of proteins of two-component systems in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **190**: 613-624.
- Shimkets, L. J., (1986) Correlation of energy-dependent cell cohesion with social motility in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **166**: 837-841.
- Skerker, J. M. & H. C. Berg, (2001) Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 6901-6904.
- Sliusarenko, O., D. R. Zusman & G. Oster, (2007) The motors powering A-motility in *Myxococcus xanthus* are distributed along the cell body. *J Bacteriol* **189**: 7920-7921.
- Søgaard-Andersen, L. & D. Kaiser, (1996) C factor, a cell-surface-associated intercellular signaling protein, stimulates the cytoplasmic Frz signal transduction system in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2675-2679.
- Søgaard-Andersen, L., F. J. Slack, H. Kimsey & D. Kaiser, (1996) Intercellular C-signaling in *Myxococcus xanthus* involves a branched signal transduction pathway. *Genes Dev* **10**: 740-754.
- Spormann, A. M., (1999) Gliding motility in bacteria: insights from studies of *Myxococcus xanthus*. *Microbial. Mol. Biol. Rev.* **63**: 621-641.
- Spormann, A. M. & A. D. Kaiser, (1995) Gliding movements in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **177**: 5846-5852.

- Spormann, A. M. & D. Kaiser, (1999) Gliding mutants of *Myxococcus xanthus* with high reversal frequencies and small displacements. *J Bacteriol* **181**: 2593-2601.
- Sprague, B. L. & J. G. McNally, (2005) FRAP analysis of binding: proper and fitting. *Trends Cell Biol* **15**: 84-91.
- Stephens, K., P. Hartzell & D. Kaiser, (1989) Gliding motility in *Myxococcus xanthus*: *mgl* locus, RNA, and predicted protein products. *J Bacteriol* **171**: 819-830.
- Stock, A. M., V. L. Robinson & P. N. Goudreau, (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183-215.
- Sun, H., D. R. Zusman & W. Shi, (2000) Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the *frz* chemosensory system. *Current Biology* **10**: 1143-1146.
- Thomasson, B., J. Link, A. G. Stassinopoulos, N. Burke, L. Plamann & P. L. Hartzell, (2002) MglA, a small GTPase, interacts with a tyrosine kinase to control type IV pili-mediated motility and development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **46**: 1399-1413.
- Vetter, I. R. & A. Wittinghofer, (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**: 1299-1304.
- Ward, M. J., H. Lew & D. R. Zusman, (2000) Social motility in *Myxococcus xanthus* requires FrzS, a protein with an extensive coiled-coil domain. *Mol Microbiol* **37**: 1357-1371.
- Weinzierl, G., L. Leveleki, A. Hassel, G. Kost, G. Wanner & M. Bolker, (2002) Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **45**: 219-231.
- Wireman, J. W. & M. Dworkin, (1977) Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **129**: 798-802.
- Wolgemuth, C., E. Hoiczky, D. Kaiser & G. Oster, (2002) How myxobacteria glide. *Curr. Biol.* **12**: 369-377.
- Wu, S. S. & D. Kaiser, (1995) Genetic and functional evidence that Type IV pili are required for social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **18**: 547-558.
- Wu, S. S. & D. Kaiser, (1996) Markerless deletions of *pil* genes in *Myxococcus xanthus* generated by counterselection with the *Bacillus subtilis sacB* gene. *J Bacteriol* **178**: 5817-5821.
- Wu, S. S. & D. Kaiser, (1997) Regulation of expression of the *pilA* gene in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **179**: 7748-7758.
- Yang, R., S. Bartle, R. Otto, A. Stassinopoulos, M. Rogers, L. Plamann & P. Hartzell, (2004) AglZ is a filament-forming coiled-coil protein required for adventurous gliding motility of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **186**: 6168-6178.
- Yang, Z., X. Ma, L. Tong, H. B. Kaplan, L. J. Shimkets & W. Shi, (2000) *Myxococcus xanthus* dif Genes Are Required for Biogenesis of Cell Surface Fibrils Essential for Social Gliding Motility. *J Bacteriol* **182**: 5793-5798.
- Youderian, P., N. Burke, D. J. White & P. L. Hartzell, (2003) Identification of genes required for adventurous gliding motility in *Myxococcus xanthus* with the transposable element mariner. *Mol Microbiol* **49**: 555-570.

- Youderian, P. & P. L. Hartzell, (2006) Transposon insertions of magellan-4 that impair social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Genetics* **172**: 1397-1410.
- Yu, R. & D. Kaiser, (2007) Gliding motility and polarized slime secretion. *Mol Microbiol* **63**: 454-467.
- Zirkle, R., J. M. Ligon & I. Molnar, (2004) Cloning, sequence analysis and disruption of the *mglA* gene involved in swarming motility of *Sorangium cellulosum* So ce26, a producer of the antifungal polyketide antibiotic soraphen A. *J Biosci Bioeng* **97**: 267-274.
- Zusman, D. R., (1982) "Frizzy" mutants: a new class of aggregation-defective developmental mutants of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **150**: 1430-1437.
- Zusman, D. R., A. E. Scott, Z. Yang & J. R. Kirby, (2007) Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Nat Rev Microbiol* **5**: 862-872.

7 Dank

Vorallem möchte ich mich bei Lotte Søgaard-Andersen bedanken, für die Bereitstellung dieses „bewegenden“ Projektes, ihre Hilfsbereitschaft und besonders für ihre Diskussionsfreude und ihr Interesse an meiner Arbeit.

Ich möchte mich ebenfalls sehr bei Frau Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl bedanken, dafür, dass Sie sich bereit erklärt hat an meiner Prüfungskommission teilzunehmen und zusätzlich noch das Zeitgutachten für diese Dissertation anzufertigen.

Großer Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. U. Mösch und Prof. Dr. M. Thanbichler für die Teilnahme als Gutachter in meiner Prüfungskommission.

Ebenfalls danke ich Sigrun Wegener-Feldbrügge für das Gegenlesen meiner Arbeit und für ihre ständige Diskussionsbereitschaft

Zudem danke ich Manfred Irmeler für die Anfertigung und Bereitstellung einer Vorlage für wissenschaftliche Dokumente.

Zusätzlich möchte ich mich bei dem gesamten Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie Marburg für Rat und Tat bedanken.

Großer Dank auch an die Werkstatt (MPI-Marburg) für die Anfertigung einer sehr hilfreichen Mikroskopierkammer.

Vielen Dank an die Max-Planck-Gesellschaft und das Graduierten Kollege „Intra- und intercellular transport and communication“ (IITC) für die Finanzierung meiner Dissertation.

Weiterhin geht ein großer Dank an die gesamte Belegschaft der Abteilung Ökophysiologie, für die tolle Atmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft.

Ebenso danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Søgaard-Andersen für den Zusammenhalt, den besonderen Humor und die einzigartig gute Atmosphäre.

Zusätzlich möchte ich meinem Bachelor Studenten S. Bubendorfer danken, der ebenfalls an dem MglA Projekt gearbeitet hat. Ebenso Dank an T. Petters für die Durchführung der „Yeast Two-Hybrid“ Analyse.

Weiterhin danke ich Iryna Bulyha, Steffi Lindow und den anderen Mitgliedern des „Motility Labs“, für viele interessante Gespräche, Diskussionen und Aufheiterungen, gerade im Mikroskopierraum. Das hat immer sehr geholfen!

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, meinem Bruder und Freundin, meinem Schatz, meinen Freunden besonders Iryna und Alex, für die seelische und moralische Unterstützung während meiner Dissertationsarbeit. Danke das es euch gibt.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Simone Leonardy
Geburtsdatum	28.01.1980 in Trier, Deutschland
Nationalität	Deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Anneliese Orth, geborene Hoffmann Richard Leonardy

Ausbildungsdaten

1997-2000	Berufliches Gymnasium (Bildungsgang für Gesundheit und Sozialwesen) in Trier; Allgemeine Hochschulreife
10/2000-10/2005	Diplom-Biologie-Studium (Schwerpunkte im Hauptstudium: Mikrobiologie, Virologie und Zoologie), Philipps-Universität in Marburg, Deutschland
04/2003	Vordiplom
23/02/04- 12/03/04	Virologisches Praktikum in dem Labor von PD Dr. A. Maisner, Institut für medizinische Virologie in Marburg
10/05/04- 21/05/04	Mikrobiologisches Praktikum in dem Labor von PD Dr. A. Brune, Abteilung Biogeochemie, Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg
11/2004- 09/2005	Diplomarbeit: "Lokalisation der Type IV Pili Proteine PilB and PilT während des Zellpolaritätswechsels <i>Myxococcus xanthus</i> " in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lotte Søgaard-Andersen, Abteilung Ökophysiologie, Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg
10/2005	Diplom
Seit 10/2005	Promotion am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie (Marburg) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lotte Søgaard-Andersen, Abteilung Ökophysiologie Thema: "Regulierung der Polarität des A-Bewegungssystems in <i>Myxococcus xanthus</i> "

Veröffentlichungen

Leonardy, S., I. Bulyha & L. Søgaard-Andersen, (2008) Reversing cells and oscillating motility proteins. *Mol Biosyst* **4**: 1009-1014.

Jakovljevic, V., **S. Leonardy**, M. Hoppert & L. Søgaard-Andersen, (2008) PilB and PilT are ATPases acting antagonistically in type IV pilus function in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **190**: 2411-2421.

Leonardy, S., G. Freymark, S. Hebener, E. Ellehaug & L. Søgaard-Andersen, (2007) Coupling of protein localization and cell movements by a dynamically localized response regulator in *Myxococcus xanthus*. *EMBO J* **26**: 4433-4444.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Regulierung der Polarität des A-Bewegungssystems in *Myxococcus xanthus*“ selbstständig verfasst, keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem 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.

Simone Leonardy

Ort, Datum

Einverständniserklärung

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die vorliegende Dissertation

Regulierung der Polarität des A-Bewegungssystems in *Myxococcus xanthus*

**in Bibliotheken allgemein zugänglich gemacht wird. Dazu gehört,
dass sie**

- von der Bibliothek der Einrichtung, in der ich meine Arbeit anfertigt habe, zur Benutzung in ihren Räumen bereit gehalten wird;
- in konventionellen und maschinenlesbaren Katalogen, Verzeichnissen und Datenbanken verzeichnet wird;
- im Rahmen der urheberrechtlichen Bestimmungen für Kopierzwecke genutzt werden kann.

Marburg, den

(Unterschrift des Autors)

(Unterschrift des betreuenden Hochschullehrers)