

**Neue Signalwege in *Myxococcus xanthus*:
Die Entdeckung des SgmT/DigR-Regulons und
die Untersuchung der zellulären Rolle von c-di-GMP**

DISSERTATION

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

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

TOBIAS PETTERS
aus Marburg

Marburg an der Lahn, 2012

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von August 2008 bis April 2012 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg in der Abteilung Ökophysiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Lotte Søgaard-Andersen durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am: 12. April 2012

Erstgutachter: Prof. Dr. Lotte Søgaard-Andersen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Andrea Maisner

Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juli 2012

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

The orphan histidine protein kinase SgmT is a c-di-GMP receptor and regulates composition of the extracellular matrix together with the orphan DNA binding response regulator DigR in *Myxococcus xanthus*.

Petters, T., X. Zhang, J. Nesper, A. Treuner-Lange, N. Gomez-Santos, M. Hoppert, U. Jenal & L. Søgaard-Andersen (2012).
Molecular Microbiology, 84: 147-165

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**„Neue Signalwege in *Myxococcus xanthus*:
Die Entdeckung des SgmT/DigR-Regulons und
die Untersuchung der zellulären Rolle von c-di-GMP“**

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.

Marburg, den 12. April 2012


(Tobias Petters)

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abstract	4
Zusammenfassung	5
1 Einleitung	6
1.1 Signaltransduktion von Zwei-Komponenten-Systemen	7
1.1.1 Aufbau von Histidinkinasen.....	7
1.1.2 Aufbau von Antwortregulatoren.....	10
1.1.3 Mechanismen von Zwei-Komponenten-Systemen	11
1.1.4 Spezifität von Zwei-Komponenten-Systemen	13
1.2 c-di-GMP Signalsysteme	14
1.2.1 Der Metabolismus von c-di-GMP	14
1.2.2 c-di-GMP-bindende Rezeptoren	17
1.3 Signalsysteme in <i>Myxococcus xanthus</i>	19
1.4 Die Bewegungssysteme von <i>M. xanthus</i>	21
1.4.1 Der A-Motor.....	21
1.4.2 Der S-Motor.....	22
1.5 Das Lipopolysaccharid O-Antigen und die extrazelluläre Matrix	23
1.5.1 LPS O-Antigen	23
1.5.2 Exopolysaccharide	23
1.5.3 Das Matrixprotein FibA.....	24
1.5.4 Regulatorische Proteine der extrazellulären Matrix	25
2 Ergebnisse	27
2.1 Die Charakterisierung der Histidinkinase SgmT	27
2.1.1 Δ <i>sgmT</i> hat einen S-Bewegungsdefekt.....	27
2.1.2 SgmT beeinflusst den Aufbau der extrazellulären Matrix	29
2.1.3 Die Hybrid-Histidinkinase SgmT ist konserviert in Myxococcales	33
2.1.4 Sensor- und Kinasedomäne sind essentiell für die Funktion von SgmT	37
2.1.5 SgmT bindet c-di-GMP in der I-site der GGDEF-Domäne.....	41
2.1.6 Die zelluläre Lokalisierung von SgmT ist c-di-GMP-abhängig.....	42
2.1.7 Die zelluläre Lokalisierung von SgmT ist statisch.....	46
2.2 Identifizierung des SgmT-zugehörigen Antwortregulators	48
2.2.1 <i>digR</i> ist konserviert in den Myxococcales und lokalisiert „verwaist“	48
2.2.2 Δ <i>sgmT</i> und Δ <i>digR</i> zeigen identische Phänotypen.....	50
2.2.3 SgmT und DigR sind korrespondierende Partner	53
2.3 Die physiologische Funktion des SgmT/DigR-Regulationswegs	59
2.3.1 SgmT/DigR regulieren Gene von extrazellulären Proteinen	59

2.3.2	DigR bindet eine semi-palindromische Sequenz im <i>fibA</i> -Promotor	61
2.3.3	Weitere regulierte Gene besitzen DigR-Bindestellen.....	66
2.4	c-di-GMP in <i>M. xanthus</i>	70
2.4.1	<i>M. xanthus</i> besitzt essentielle Elemente von c-di-GMP Signalsystemen	70
2.4.2	Δ MXAN2424 und Δ MXAN2530 zeigen keinen Einfluss auf die Bewegungs- und Entwicklungsfähigkeit von <i>M. xanthus</i>	74
2.4.3	Δ MXAN4463 zeigt einen S-Bewegungsdefekt.....	76
2.4.4	c-di-GMP beeinflusst den koordinierten Ablauf des Entwicklungsprogramms	76
3	Diskussion	81
3.1	Die Identifikation eines neuen TCS in <i>M. xanthus</i>	81
3.1.1	Die Charakterisierung der Histidinkinase SgmT	81
3.1.2	Die Identifikation des SgmT/DigR-TCS und dessen Regulon	83
3.1.3	Das aktuelle Arbeitsmodell des SgmT/DigR-TCS.....	89
3.2	Der Einfluss von c-di-GMP auf <i>M. xanthus</i>	91
4	Material und Methoden	97
4.1	Material und Chemikalien.....	97
4.1.1	Enzyme und Kitsysteme.....	97
4.1.2	Verwendete Geräte	98
4.1.3	Medien.....	100
4.2	Mikrobiologische Methoden.....	103
4.2.1	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i>	103
4.2.2	Kultivierung und Lagerung von <i>M. xanthus</i>	104
4.2.3	Bewegungsstudien von <i>M. xanthus</i>	105
4.2.4	Untersuchung zur Farbstoffbindung an <i>M. xanthus</i>	106
4.2.5	Entwicklungsstudien von <i>M. xanthus</i>	107
4.3	Molekularbiologische Methoden	108
4.3.1	Oligonukleotide.....	108
4.3.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	112
4.3.3	Quantitative Echtzeit-PCR	113
4.3.4	Vektoren und Plasmide	114
4.3.5	Konstruktion von Plasmiden.....	115
4.3.6	Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	122
4.3.7	Herstellung und Transformation elektrisch-kompetenter <i>M. xanthus</i> -Zellen	123
4.3.8	Deletionsmutagenese in <i>M. xanthus</i>	124
4.4	Biochemische Methoden.....	127
4.4.1	Überexpression von Genen und Reinigung von Proteinen.....	127
4.4.2	Proteinauftrennung durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese	129
4.4.3	Immunblot (Western-blot).....	130
4.4.4	Herstellung polyklonaler Antikörper gegen SgmT.....	133

4.4.5	<i>In vitro</i> Autophosphorylierung und Phosphogruppentransfer	133
4.4.6	Vergleichende Transkriptomanalysen von <i>M. xanthus</i>	134
4.4.7	Nachweis der spezifischen Bindung von c-di-GMP an SgmT	135
4.4.8	Promotor-Bindestudien von DigR mittels EMSA.....	136
4.5	Mikroskopische Methoden.....	138
4.5.1	Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie	138
4.5.2	Transmissions-Elektronenmikroskopie	139
4.6	Bioinformatische Methoden.....	139
	Literaturverzeichnis	141
	Abkürzungsverzeichnis	150
	Abbildungsverzeichnis	151
	Tabellenverzeichnis	152
	Danksagung.....	153
	Curriculum Vitae	154
	Anhänge.....	155

Abstract

The extracellular matrix of *Myxococcus xanthus* is essential for type IV pili-dependent motility and starvation-induced fruiting body formation. The composition of the extracellular matrix is regulated by proteins of two-component systems including the orphan response regulator DigR.

In this work I identified and characterized the orphan hybrid histidine kinase SgmT as corresponding partner of DigR. SgmT contains an N-terminal GAF domain and a C-terminal GGDEF domain. Using genetical and biochemical analyses the function of each domain was addressed. I found that the GAF domain is the primary sensor domain, while the GGDEF domain binds the second messenger bis-(3'-5')-cyclic-dimeric-GMP (c-di-GMP) and functions as a receptor to spatially sequester SgmT. In addition, a DigR binding site has been identified in the promoter of the *fibA* gene, encoding for an abundant extracellular matrix-associated zinc-metalloprotease. Comparative expression studies in combination with the identified DigR binding site allowed the revelation of the SgmT/DigR regulon-containing genes, encoding for secreted proteins and enzymes involved in secondary metabolite synthesis. These findings strongly indicate that: 1.) SgmT/DigR regulates the composition of the extracellular matrix and 2.) SgmT activity is regulated by two sensor domains with ligand binding to the GAF domain resulting in SgmT kinase activation and c-di-GMP binding to the GGDEF domain resulting in spatial sequestration of SgmT.

Additionally, conserved c-di-GMP-dependent proteins were identified in *M. xanthus* and I started to investigate their function in important cellular processes. Preliminary data show that c-di-GMP participates in the regulation of the starvation-induced developmental program of *M. xanthus*.

Zusammenfassung

Die extrazelluläre Matrix von *Myxococcus xanthus* ist ein essentieller Bestandteil für ein funktionelles Typ-IV-Pili-abhängiges Bewegungssystem sowie für den kontrollierten Ablauf des charakteristischen Entwicklungsprogramms in nährstoffarmer Umgebung. Die korrekte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix wird über Proteine von Zwei-Komponenten-Systemen einschließlich des verwaisten Antwortregulators DigR reguliert.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die verwaiste Hybrid-Histidinkinase SgmT charakterisiert und als korrespondierender Partner von DigR identifiziert. Neben einer Kinase- und einer Empfängerdomäne besitzt SgmT eine N-terminale GAF-Domäne und eine C-terminale GGDEF-Domäne. Mit Hilfe genetischer und biochemischer Analysen wurde die Funktion der einzelnen Domänen von SgmT untersucht, wobei die GAF-Domäne als sensorische Haupteinheit fungiert und die Kinaseaktivität von SgmT steuert. Die GGDEF-Domäne ist ein Rezeptor für den sekundären Botenstoffs c-di-GMP, der SgmT abhängig von dessen Bindung zellulär lokalisiert. Desweiteren wurde eine DigR-Bindestelle im Promoter von *fibA* identifiziert, einem Gen, das für eine extrazelluläre Matrixprotease kodiert. Die Identifikation weiterer DigR-Bindestellen in den Promotorregionen von signifikant-regulierten Genen aus vergleichenden Transkriptomstudien lässt vermuten, dass das SgmT/DigR-Regulon aus Genen besteht, die für sekretierte Proteine sowie für Enzyme des Sekundärmetabolismus kodieren. Diese Beobachtungen geben Grund zur Annahme, dass SgmT und DigR die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix direkt regulieren, und dass die Funktion von SgmT über zwei sensorische Domänen gesteuert wird, wobei die Kinaseaktivität durch Ligandenbindung an die GAF-Domäne und die zelluläre Lokalisierung von SgmT über die Bindung von c-di-GMP an die GGDEF-Domäne reguliert wird.

Desweiteren wurden konservierte c-di-GMP-abhängige Proteine in *M. xanthus* identifiziert und damit begonnen deren Einfluss auf wichtige zelluläre Prozesse hin zu untersuchen. Darüber hinaus wurden erste Erkenntnisse gewonnen, dass c-di-GMP möglicherweise an der Koordination des Entwicklungsprogramms beteiligt sein könnte.

1 Einleitung

Das Überleben in einer ständig wechselnden Umwelt erfordert eine schnelle Anpassung an die vorherrschenden Bedingungen. Lebewesen, die am besten an das umgebende Milieu angepasst sind, haben einen Selektionsvorteil gegenüber weniger gut angepassten Spezies. Diese damals revolutionäre Theorie vom „Überleben des am besten Angepassten“ („Survival of the Fittest“), aus dem Buch „Die Entstehung der Arten“ („On the Origin of Species“) von Charles Darwin (Darwin, 1859), ist Grundlage der modernen Evolutionstheorie.

Ein Beispiel für die Anpassung an unterschiedliche ökologische Nischen zeigt der Vergleich zwischen parasitär-lebenden Prokaryoten und Bodenbakterien. Parasitäre Bakterien, wie Chlamydien oder Mycoplasmen, leben in einem konstanten Milieu innerhalb von Wirtszellen. Dies garantiert ein ausreichendes Nährstoffangebot, geringe Temperatur- und pH-Wertveränderungen sowie den Schutz vor Feinden (Subramanian *et al.*, 2001). Deswegen besitzen parasitäre Bakterien eine reduzierte Anzahl an metabolischen Enzymen, eine rudimentäre Zellwand und keine Systeme zur Zellimmunität oder -verteidigung. Diese spezialisierte Lebensweise von parasitären Bakterien spiegelt sich in der geringen Größe des Genoms wider, das im Allgemeinen nur einen Grundstock von Genen enthält (Subramanian *et al.*, 2001). Dementsprechend ist die Kultivierung solcher Bakterien außerhalb ihrer Wirtszelle auf Nährmedien schwierig bis nahezu unmöglich.

Im Gegensatz zu parasitären Bakterien sind Bodenorganismen an die vielen unterschiedlichen Bedingungen ihres Habitats angepasst. Zum Schutz vor UV-Strahlung, osmotischem Stress und Fressfeinden produzieren viele Bodenbakterien diverse Sekundärmetabolite, wie Karotinoide, kompatible Solute oder Antibiotika (Wenzel & Müller, 2005, Chater *et al.*, 2010, Sansinenea & Ortiz, 2011). Aufgrund des sich stetig verändernden Nährstoffvorkommens, besitzen Bodenbakterien oft ein breites metabolisches Repertoire an Enzymen, was es ihnen erlaubt unterschiedliche Nahrungsquellen auszuschöpfen. Einige Bakterien sind zudem in der Lage resistente Dauerformen, wie Zysten und Sporen, auszubilden, die sie vor UV-Strahlung, Nährstoffmangel und extremen Temperaturen schützen. Es ist deshalb auch nicht verwunderlich, dass Bodenbakterien im Gegensatz zu ihren parasitären Verwandten in der Regel

viel größere Genome besitzen, die eine Vielzahl von unterschiedlichen Genen enthalten. Um schnell auf Umweltreize reagieren zu können, besitzen Bodenorganismen generell eine Fülle von regulatorischen Systemen und Komponenten, wie z.B. Serin-, Threonin- und Tyrosin-Kinasen (Zhang, 1996), Zwei-Komponenten-Systeme (TCS) (Alm *et al.*, 2006), „Quorum Sensing“-Systeme (Reading & Sperandio, 2006) und sekundären Botenstoffen, wie z. B. bis-(3'-5')-zyklisches di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) (Pesavento & Hengge, 2009).

1.1 Signaltransduktion von Zwei-Komponenten-Systemen

Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen ist ein typischer Mechanismus in der intrazellulären Signaltransduktion von Lebewesen. In Eukaryoten sind daran vornehmlich Serin-, Threonin- und Tyrosinkinase beteiligt, die in prokaryotischen Organismen eine eher untergeordnete Rolle spielen. In Bakterien und Archäen erfolgt die Signaltransduktion hauptsächlich über Zwei-Komponenten-Systeme (TCS), die aus Histidinkinasen (HK) und Antwortregulatoren (RR, „Response Regulators“) bestehen und vornehmlich in prokaryotischen Organismen vorkommen. TCS regulieren eine Vielzahl von zellulären Prozessen, beispielsweise die Anpassung von *Escherichia coli* an aerobe/anaerobe Lebensbedingungen, die Zellbewegung in Enterobakterien, die Zelldifferenzierung in *Caulobacter crescentus* und die Sporulation in *Bacillus subtilis*.

1.1.1 Aufbau von Histidinkinasen

Eine typische HK besteht aus einer variablen N-terminalen Sensordomäne, die bei unterschiedlichen HK variabel auf einen spezifischen Stimulus angepasst ist, und einer konservierten Kinasedomäne, die zwei Subdomänen enthält.

Sensordomänen

Die zelluläre Lokalisierung sensorischer Domänen von Membran gebundenen HK ist auf den jeweiligen Stimulus abgestimmt und kann extrazellulär bzw. periplasmatisch, direkt in die Membran eingebaut oder zytoplasmatisch sein (Cheung & Hendrickson, 2010).

Bislang sind drei Klassen von extrazellulären bzw. periplasmatischen Sensordomänen bekannt. Die erste Klasse der PDC-Domänen wurde nach den ersten drei Proteinen benannt (PhoQ von *Salmonella typhimurium*, DcuS von *E. coli* und CitA von *Klebsiella pneumoniae*), von denen eine Kristallstruktur der Sensordomäne vorlag (Cheung & Hendrickson, 2010). PDC-Domänen bestehen aus α -Helices und β -Faltblatt-Strukturen und sind oft Sensoren von Chemotaxisproteinen. Aufgrund von Sequenzhomologien wurden manche PDC-Domänen als Cache- bzw. CHASE-Domänen annotiert (Cheung & Hendrickson, 2010). Die zweite Klasse extrazellulärer Sensordomänen besteht vornehmlich aus α -Helices und wurde in den Proteinen NarX und TorS von *E. coli* identifiziert. In NarX ist die Sensordomäne sensitiv gegenüber Nitrat- und Nitritkonzentrationen und in TorS werden unterschiedliche Konzentrationen von Trimethylamin-N-oxid wahrgenommen (Cheung & Hendrickson, 2009, Moore & Hendrickson, 2009). Die Vertreter der dritten Sensoren-Klasse zeigen Ähnlichkeit zu periplasmatischen Bindeproteinen, wobei der spezifische Stimulus noch unbekannt ist (Cheung *et al.*, 2009).

Von Sensordomänen, die direkt in die Membran eingebaut werden, liegen bislang keine Strukturinformationen vor. Allerdings konnten Proteine identifiziert werden, die auf Temperaturunterschiede, auf die Interaktion eines spezifischen Proteins oder auf „Quorum Sensing“-Signale reagieren (Cheung & Hendrickson, 2010).

Zytoplasmatische Sensordomänen treten in Membran-gebundenen und in zytoplasmatischen HK auf. Die bekanntesten zytoplasmatischen Sensoren sind PAS-, GAF- und PCD-Domänen. PAS-Domänen (Per/ARNT/Sim) sind in regulatorischen Proteinen von Prokaryoten und Eukaryoten weit verbreitet und erkennen eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli (Henry & Crosson, 2011). Divalente Kationen, wie z. B. Ca^{2+} , und organische Verbindungen, wie Di- und Trikarbonsäuren sind Stimuli, die direkt von PAS-Domänen wahrgenommen werden. Mit Hilfe von Kofaktoren oder Kosubstraten, wie Häm, FMN, FAD und 4-Hydroxizimtsäure, werden Sauerstoff bzw. bestimmte Wellenlängen des Lichts erkannt (Henry & Crosson, 2011). PAS-Domänen sind strukturell homolog zu PDC-Domänen, werden aber aufgrund starker sequenzieller Unterschiede als eigene Klasse definiert (Cheung & Hendrickson, 2010). GAF-

Domänen (cGMP Phosphodiesterasen, Adenylatzyklen und FhlA) sind strukturell mit PAS-Domänen verwandt und bestehen im Kern aus sechs Antiparallelen β -Faltblatt-Strukturen (Cheung & Hendrickson, 2010). In der Literatur beschriebene Liganden von GAF-Domänen sind beispielsweise zyklische Nukleotide, wie cAMP und cGMP (Heikaus *et al.*, 2009), Aminosäuren, wie Isoleucin (Levdikov *et al.*, 2006), oder Gase, wie O₂, NO und CO, die über Häm-Kofaktoren gebunden werden (Vos *et al.*, 2012). Die Identifikation von PCD-Domänen („photosensory core domain“) erfolgte in Proteinen von unterschiedlichen Spezies, wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodospseudomonas palustris* oder *Deinococcus radiodurans*. PCD-Domänen bestehen typischerweise aus einer PAS-, einer GAF- und einer Phytochrom-Domäne, die als Photosensoren unterschiedliche Wellenlängen des Lichts erkennen (Cheung & Hendrickson, 2010).

Kinasedomänen

Kinasedomänen sind strukturell hoch konserviert, ihre Proteinsequenzen weisen fünf konservierte Motive auf, die aufgrund charakteristischer Aminosäuren als H-, N-, D-, F- und G-Box bezeichnet wurden (Grebe & Stock, 1999). Diese fünf Motive sind auf die beiden Subdomänen HisKA („Histidin-Kinase A“) und HATPase („Histidin-Kinase-ähnliche ATPase“) verteilt.

Die HisKA-Subdomäne beinhaltet die H-Box mit einem konservierten Histidinrest, auf den die Phosphogruppe übertragen wird und der der Namensgeber von HK ist. Darüber hinaus vermittelt die HisKA-Subdomäne die Bildung von Homodimeren mit einem zweiten HK-Protein und die spezifische Interaktion mit einem korrespondierenden RR über dessen Empfängerdomäne (Capra *et al.*, 2010). Die HATPase-Subdomäne besteht aus den N-, D-, F- und G-Box-Motiven, die die ATP-Bindetasche bilden. Die HATPase-Subdomäne hydrolysiert ATP und katalysiert die *trans*-Phosphorylierung des konservierten Histidins der HisKA-Subdomäne im HK-Dimer.

1.1.2 Aufbau von Antwortregulatoren

Typische RR bestehen aus einer N-terminalen Empfängerdomäne und einer C-terminalen „output“-Domäne. Allerdings existieren auch RR, die nur aus einer Empfängerdomäne bestehen.

Empfängerdomänen

Empfängerdomänen sind Phosphoakzeptorproteine, deren $(\beta\alpha)_5$ -Struktur mit alternierenden β -Faltblatt- und α -Helix-Strukturen in der Primärsequenz hoch konserviert ist (Bourret, 2010). Die fünf parallelen β -Faltblatt-Strukturen bilden dabei den Kern der Domäne, die von fünf α -Helices umgeben sind. Für die Phosphogruppen-Bindung an einen konservierten Aspartatrest werden divalente Kationen, wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} , benötigt, welche durch zwei konservierte Aspartatreste gebunden werden, die in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander stehen (Bourret, 2010). Die Bindung der Phosphogruppe wird zusätzlich über eine Interaktion mit zwei weiteren konservierten Aminosäuren Lysin und Serin bzw. Threonin stabilisiert. Die Phosphorylierung einer Empfängerdomäne geschieht entweder durch den Transfer der Phosphogruppe von der korrespondierenden HK oder über Autophosphorylierung durch kleine molekulare Phosphodonoren, wie Acetylphosphat (Chamnongpol & Groisman, 2000).

„output“-Domänen

Ähnlich wie bei den sensorischen Domänen von HK gibt es auch eine große Vielfalt an „output“-Domänen in RR. Die weitaus größte Gruppe (66 %) bilden dabei RR mit DNA-bindenden Domänen, die als Transkriptionsregulatoren fungieren (Galperin, 2006). 14 % der RR besitzen keine „output“-Domäne, bestehen also nur aus einer Empfängerdomäne, die entweder mit anderen Proteinen interagieren oder als Akzeptorproteine von Phosphogruppen in gestaffelten TCS-Relaissystemen fungieren (Galperin, 2006, Bourret, 2010). Die restlichen 20 % der RR besitzen enzymatische bzw. Protein-, Liganden- oder RNA-bindende Domänen (Galperin, 2006).

DNA-bindende Domänen von Transkriptionsregulatoren werden aufgrund ihrer Struktur in unterschiedliche Klassen eingeordnet, die meist nach einem prominenten Protein benannt wurden (Galperin, 2006). Die am häufig-

sten vorkommenden DNA-Bindedomänen besitzen ein HTH-Motiv („helix-turn-helix“), von denen zwei unterschiedliche Formen existieren. Die NarL-ähnliche Form besteht aus einem HTH-Motiv mit 3-4 α -Helices (Galperin, 2006, Baikalov *et al.*, 1996). Im Vergleich ist die OmpR-ähnliche Form leicht modifiziert und besitzt zusätzlich 3-4 anti-parallele β -Faltblattstrukturen, die das „geflügelte“ wHTH-Motiv („winged-HTH“) bilden (Robinson *et al.*, 2003). Eine weitere weit verbreitete Klasse sind NtrC-ähnliche DNA-Bindedomänen, die neben der C-terminalen Fis-Bindedomäne eine AAA-ATPase-Domäne besitzen. Weniger häufig verbreitete DNA-Bindedomänen gehören den LytR-, PrrA- oder YesN-ähnlichen Klassen an, die eine LytTR-, eine Fis-, bzw. eine HTH_AraC-Domäne besitzen (Galperin, 2006). Nach der Dimerisierung der RR erfolgt die Bindung der DNA-Bindedomänen an (semi-) palindromische DNA-Motive in den Promotorregionen von Genen (Lacal *et al.*, 2008, Stauff & Bassler, 2011).

Enzymatisch aktive „output“-Domänen können die Funktion von Methyltransferasen, Diguanylatzyklasen (GGDEF), Phosphodiesterasen (EAL, HD-GYP), Protein-Phosphatasen oder Histidinkinasen übernehmen (Galperin, 2006).

Neben den Protein-bindenden CheW- und TPR-Domänen wurden auch Liganden-bindende Domänen wie PAS-, GAF- und PilZ-Domänen in RR identifiziert, die an der Interaktion mit anderen Proteinen beteiligt sein können (Galperin, 2006). RNA-bindende ANTAR-Domänen („AmiR and NasR transcription antitermination regulators“) sind weitverbreitet und regulieren die Transkription von Genen (Galperin, 2006).

1.1.3 Mechanismen von Zwei-Komponenten-Systemen

Das Prinzip der Signaltransduktion von TCS beruht auf der Phosphorylierung der jeweiligen Komponenten. Das einfachste TCS besteht aus einer HK, die eine sensorische Domäne und eine Kinasedomäne enthält, sowie einem korrespondierenden RR, der neben einer Empfängerdomäne eine „output“-Domäne besitzt (Abbildung 1A). Die Formierung von Homo-Dimeren der HK und des RR sind essentiell für den mechanistischen Ablauf der Signaltransduktion, der in drei Schritten abläuft:

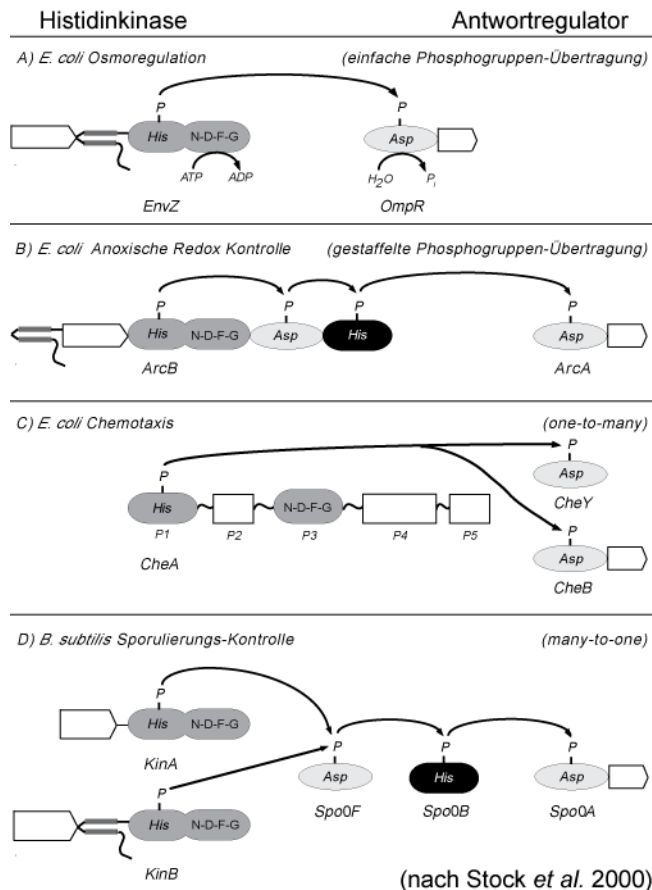


Abbildung 1: Mechanismen von Zwei-Komponenten-Systemen.

Die schematische Darstellung zeigt Histidinkinasedomänen in dunkelgrau, Empfängerdomänen in hellgrau, Histidin-Phosphotransferase-Domänen in schwarz und sensorische, „output“- oder variable Domänen in weiß. **(A)** Durch eine einfache Phosphogruppen-Übertragung von der Histidinkinase (HK) EnvZ zum Antwortregulator (RR) OmpR wird die Osmoregulation von *E. coli* gesteuert. **(B)** Eine gestaffelte Phosphogruppen-Übertragung von der Hybrid-HK ArcB zum RR ArcA reguliert die anoxische Redox-Kontrolle von *E. coli*. **(C)** Bei der Regulation der Chemotaxis in *E. coli* besitzt die HK CheA mit CheY und CheB zwei korrespondierende RR. **(D)** Bei der Regulation der Sporulierung in *B. subtilis* besitzt der RR Spo0F mehrere korrespondierende HK. Modifiziert nach (Stock *et al.*, 2000).

1.) Die sensorische Domäne der HK empfängt einen intra- oder extrazellulären Stimulus der eine Autophosphorylierungsreaktion in der Kinasedomäne auslöst. Die HATPase -Subdomäne hydrolysiert dabei ATP, bei dem γ -Phosphat abgespalten und auf den konservierten Histidinrest in der HisKA-Subdomäne *in cis* übertragen wird (Casino *et al.*, 2009).

2.) Nach der Interaktion mit dem korrespondierenden RR findet ein Phosphogruppentransfer von der HK zum konservierten Aspartatrest in der Empfängerdomäne des RR statt. Die Phosphorylierung des RR führt zu einer Konformationsänderung innerhalb der Empfängerdomäne, wodurch die „output“-Domäne aktiviert wird, die eine zelluläre Antwort auf den empfangenen Stimulus auslöst. Je nach „output“-Domäne beeinflusst diese Antwort die Expression von Genen über DNA-Bindung, die Interaktion mit Proteinen oder eine enzymatische Reaktion.

3.) In einer Dephosphorylierungsreaktion wird der RR regeneriert, indem die Phosphogruppe hydrolytisch abgespalten wird. Die Phosphatase-Aktivität geht dabei entweder von der Empfängerdomäne selbst, von einer weiteren HK

oder einer separaten Phosphatase aus. Für die Autophosphorylierung der HK, den Phosphogruppentransfer von HK zu RR und die Dephosphorylierung des RR werden jeweils divalente Kationen, wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} , als Kofaktoren benötigt (Stock *et al.*, 2000).

In gestaffelten Phosphogruppen-Übertragungen („Phosphorelays“) zeigen TCS einen komplizierteren Mechanismus auf (Abbildung 1B). Die Wahrnehmung des Stimulus erfolgt über eine Hybrid-HK, die eine interne Empfängerdomäne enthält. Danach wird die Kinasedomäne autophosphoryliert und die Phosphogruppe auf die interne Empfängerdomäne transferiert. Über eine Histidin-Phosphotransferase (HPt) erfolgt die Übertragung der Phosphogruppe zum finalen RR, der eine zelluläre Antwort über die „output“-Domäne reguliert. Darüber hinaus existieren durchaus kompliziertere TCS, bei denen eine HK mehrere korrespondierende RR bedient („one-to-many“, Abbildung 1C) oder bei der mehrere HK denselben RR („many-to-one“, Abbildung 1D) besitzen (Stock *et al.*, 2000). Diese Kreuzreaktionen erlauben eine zelluläre Antwort auf mehrere Stimuli bzw. mehrere zelluläre Antworten auf einen Stimulus (Stock *et al.*, 2000).

1.1.4 Spezifität von Zwei-Komponenten-Systemen

Kinase- und Empfängerdomänen von TCS sind strukturell stark konserviert und unterscheiden sich in verschiedenen HK- bzw. RR-Proteinen nur wenig voneinander. Bakterienzellen besitzen oft mehrere TCS, die räumlich und zeitlich nebeneinander existieren und sowohl unterschiedliche als auch ähnliche zelluläre Prozesse steuern. Daher müssen korrespondierende HK- und RR-Proteine spezifisch zueinander sein, um sich gegenseitig zu erkennen und um Kreuzkommunikationen („cross-talk“) mit anderen Proteinen zu vermeiden (Laub & Goulian, 2007). Als Kreuzkommunikationen werden Phosphogruppen-Übertragungen zwischen nicht-korrespondierenden HK und RR bezeichnet, die häufig *in vitro* beobachtet werden und seltener *in vivo* auftreten (Laub & Goulian, 2007). In der Zelle werden solche Kreuzkommunikationen durch verschiedene Mechanismen verhindert. Diese sind beispielsweise, die Spezifität von HK und RR zueinander über interagierende Aminosäuren (Capra *et al.*, 2010), die Dephosphorylierung durch Phosphatasen (Laub & Goulian, 2007)

oder die räumliche Trennung von konkurrierenden Proteinen (Laub & Goulian, 2007).

Kreuzkommunikationen dürfen nicht mit Kreuzreaktionen von TCS-Proteinen, wie „many-to-one“ oder „one-to-many“, verwechselt werden, an denen mehrere HK bzw. RR beteiligt sind (Laub & Goulian, 2007). In Kreuzreaktionen sind die entsprechenden HK und RR an der Regulation des gleichen zellulären Prozesses beteiligt und dementsprechend spezifisch zueinander (Laub & Goulian, 2007). Ein Beispiel für eine „one-to-many“ Kreuzreaktion zeigt das chemosensorische System (Che-System) von *E. coli*. Hier wird die Chemotaxis über die Kommunikation von der HK CheA mit den RR CheY und CheB reguliert (Djordjevic & Stock, 1998).

1.2 c-di-GMP Signalsysteme

c-di-GMP besteht aus zwei Guaninbasen, die über Ribose und Phosphat zu einem kleinen RNA-Ring miteinander verbunden sind. Eine biologische Bedeutung von c-di-GMP wurde zuerst 1987 von der Gruppe um Moshe Benziman beschrieben (Ross *et al.*, 1987), die gezeigt hat, dass c-di-GMP als Aktivator der Zellulose-Synthase in *Gluconacetobacter xylinus* fungiert. Heute ist c-di-GMP ein etablierter sekundärer Botenstoff, dessen Vorkommen sich, nach heutigem Kenntnisstand, ausschließlich auf Bakterien beschränkt und dort zentrale zelluläre Prozesse steuert. Beispielsweise reguliert c-di-GMP den Übergang zwischen einer sessilen und mobilen Lebensweise in Enterobakterien (Ryjenkov *et al.*, 2006), den Zellzyklus in *C. crescentus* (Paul *et al.*, 2004) und die Virulenz in *Vibrio cholerae* (Tischler & Camilli, 2005).

1.2.1 Der Metabolismus von c-di-GMP

In Abbildung 2 ist das zentrale Dogma des c-di-GMP Metabolismus dargestellt (Mills *et al.*, 2011). Demnach werden zwei GTP von Diguanylatzyklasen (DGC), die aus einer GGDEF-Domäne bestehen, zu c-di-GMP generiert (Valla *et al.*, 1989). Der Abbau von c-di-GMP zu pGpG erfolgt durch Phosphodiesterasen (PDE), die entweder eine EAL- oder eine HD-GYP-Domäne enthalten (Hengge, 2009).

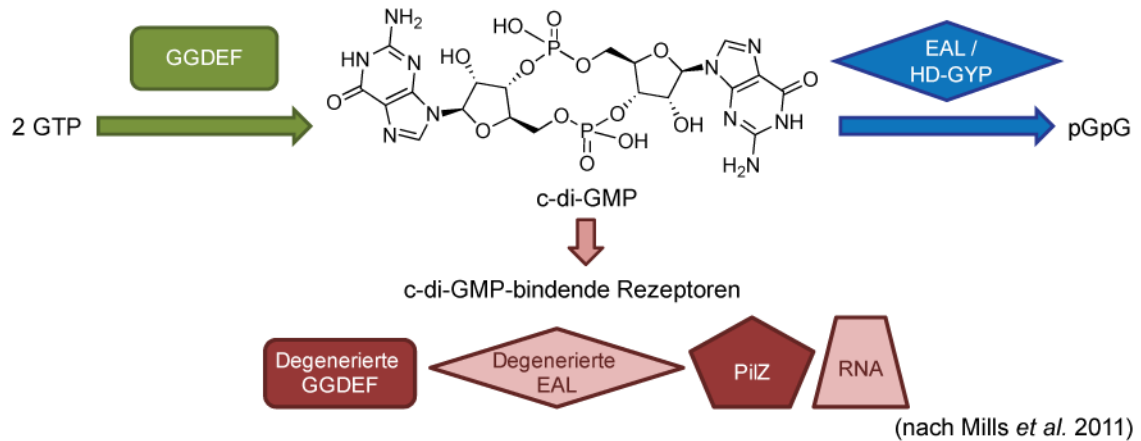


Abbildung 2: Der c-di-GMP Metabolismus.

Diguanylatzyklen mit GGDEF-Domänen (grün) synthetisieren c-di-GMP aus 2 GTP, der Abbau von c-di-GMP zu pGpG erfolgt durch Phosphodiesterasen mit EAL- bzw. HD-GYP-Domänen (blau). Unterschiedliche Protein- und RNA-Motive sind als c-di-GMP-bindende Rezeptoren (rot) bekannt. Modifiziert nach (Mills *et al.*, 2011).

GGDEF-Domänen wurden nach den konservierten Aminosäuren des aktiven Zentrums, der A-site („Active-site“), benannt (Hecht & Newton, 1995) und sind nur als Dimer enzymatisch aktiv (Chan *et al.*, 2004). Dabei wird GTP jeweils über die A-site eines Monomers gebunden. Durch die Dimerisierung der GGDEF-Domänen werden die beiden GTP in räumliche Nähe zueinander gebracht und über eine 3'-5'-Phosphodiesterreaktion, unter Abspaltung der β - und γ -Phosphate, wird die Formierung von c-di-GMP katalysiert (Chan *et al.*, 2004, Ross *et al.*, 1991).

In der Literatur werden neben GGDEF zwei weitere katalytisch aktive Motive (GGEEF und GGDEY) beschrieben (Chan *et al.*, 2004, Levi *et al.*, 2011). Für die A-site von PleD aus *C. crescentus* (G^{368} EEF) konnte gezeigt werden, dass die Konservierung der Aminosäuren G368, G369 und E371 wichtig für die Bindung von GTP und die Konservierung von E370 essentiell für die katalytische Funktion der DGC ist (Chan *et al.*, 2004).

Neben der A-site besitzen GGDEF-Domänen oft ein zweites konserviertes Motiv (RxxD), die I-site („Inhibitory-site“) (Christen *et al.*, 2006). Über die Bindung eines c-di-GMP-Dimers an die I-site wird die Aktivität der DGC allosterisch inhibiert (Chan *et al.*, 2004). In PleD wird die Bindung von c-di-GMP über zwei zusätzliche Argininreste (R390 und R178) unterstützt (Chan *et al.*, 2004), die als sekundäre I-site bezeichnet werden. Die Aminosäuren der sekundären I-site von PleD befinden sich in der GGDEF-Domäne und der N-

terminal angrenzenden Pseudoempfängerdomäne (Chan *et al.*, 2004). PleD reguliert den Abbau des Flagellenproteins FliF und beeinflusst damit den Zellzyklus in *C. crescentus* (Aldridge & Jenal, 1999). Neben PleD sind weitere DGC an der Regulation von essentiellen zellulären Prozessen beteiligt. Der Antwortregulator (RR) WspR besitzt eine GGDEF-Domäne und ist Teil eines chemosensorischen Systems, das die Ausbildung von Biofilmen in *P. aeruginosa* reguliert (Hickman *et al.*, 2005). AdrA von *S. typhimurium* ist eine DGC mit Transmembranhelices und an der interzellulären Adhäsion beteiligt (Römling *et al.*, 2000).

Ähnlich wie bei GGDEF-Domänen sind die Namen von EAL- bzw. HD-GYP-Domänen auf die konservierten Motive im katalytisch-aktiven Zentrum der jeweiligen Phosphodiesterase (PDE) zurückzuführen. Beide PDE zeigen keine Homologien zueinander und sind daher konvergenten evolutionären Ursprungs (Galperin *et al.*, 2001). Während EAL-Domänenproteine Teil einer neuen Proteinfamilie sind, bilden HD-GYP-Domänenproteine eine Unterfamilie der HD-Superfamilie von Metall-abhängigen Phosphohydrolasen (Galperin *et al.*, 2001), der auch die ppGpp-Synthasen RelA und SpoT angehören (Magnusson *et al.*, 2005).

EAL- und HD-GYP-Domänen mit katalytisch-aktivem Zentrum können c-di-GMP binden und zu pGpG hydrolysieren. In EAL-Domänen konnten neben dem EAL-Motiv noch neun weitere konservierte Aminosäuren identifiziert werden, die für die katalytische Aktivität der PDE essentiell sind (Tchigvintsev *et al.*, 2010). Für HD-GYP-Domänen sind neben dem GYP-Motiv des aktiven Zentrums keine weiteren Aminosäurereste bekannt, die essentiell für die Bindung von c-di-GMP oder dessen katalytische Spaltung sind. In der Literatur sind einige PDE beschrieben, denen eine Funktion in unterschiedlichen zellulären Prozessen zugeschrieben wird. Die PDE VieA mit EAL-Domäne aus *V. cholerae* reguliert die intrazelluläre c-di-GMP Konzentration und ist indirekt an der Aktivierung der Expression des Cholera-toxins und an der Repression der Transkription der Exopolysaccharidgene *vps* beteiligt (Tischler & Camilli, 2005). Eine weitere PDE mit EAL-Domäne ist YhjH, die in Enterobakterien konserviert vorliegt und die flagellare Bewegung beeinflusst (Ryjenkov *et al.*, 2006). Das HD-GYP-Domänenprotein RpfG von *Xanthomonas campestris* ist an der

Regulation von Exopolysacchariden und Virulenzfaktoren beteiligt (Slater *et al.*, 2000).

1.2.2 c-di-GMP-bindende Rezeptoren

Neben den bereits erwähnten metabolisierenden Proteinen existieren c-di-GMP-bindende Rezeptoren, die Proteine und RNA-Moleküle umfassen (Hengge, 2010).

PilZ-Domänen wurden aufgrund ihres Einflusses auf die Ausbildung von Typ-IV-Pili in *P. aeruginosa* („pilus protein Z“) benannt (Alm *et al.*, 1996) und sind die am besten studierten c-di-GMP-bindenden Rezeptoren bzw. Effektorproteine. PilZ-Domänen treten als Einzeldomänenproteine auf oder sind Bestandteil von Multidomänenproteinen, die z.T. auch GGDEF- und EAL-Domänen enthalten (Amikam & Galperin, 2006). Die Bindung von c-di-GMP am N-Terminus von PilZ erfolgt über zwei Aminosäure-Motive (RxxxR und D/NxSxxG) und führt zu einer Konformationsänderung im C-terminalen Bereich der Domäne (Guzzo *et al.*, 2009, Shin *et al.*, 2010), die Voraussetzung für eine Protein-Protein Interaktion ist. So interagiert beispielsweise YcgR, ein PilZ-Domänenprotein aus Enterobakterien, in c-di-GMP-gebundener Form mit Proteinen des Flagellenmotors, um dessen Rotation zu stören und damit eine Fortbewegung der Zelle zu verhindern (Böhm *et al.*, 2010, Paul *et al.*, 2010). Darüber hinaus steuern PilZ-Domänen, in Abhängigkeit ihrer c-di-GMP-Bindung, in diversen Bakterien die Biosynthese von extrazellulären Matrixkomponenten, wie Zellulose und Alginat (Zogaj *et al.*, 2001, Merighi *et al.*, 2007).

Eine weitere Gruppe von c-di-GMP-Effektorproteinen sind degenerierte GGDEF- und EAL-Domänen. Der RR PopA aus *C. crescentus* besitzt eine GGDEF-Domäne mit degenerierter A-site und intakter I-site (Duerig *et al.*, 2009). Folglich ist PopA katalytisch inaktiv, behält aber die Fähigkeit, c-di-GMP zu binden. Wie PleD ist PopA an der Regulation des Zellzyklus in *C. crescentus* beteiligt, indem es hilft, den Inhibitor der Replikationsinitiierung CtrA polar in der Zelle zu lokalisieren (Duerig *et al.*, 2009). Das Membranprotein LapD von *Pseudomonas fluorescens* ist vermutlich in der Lokalisierung des Adhesins LapA involviert und besitzt u. a. eine GGDEF-Domäne mit degenerierter I- und A-site sowie eine degenerierte EAL-Domäne (Newell *et al.*, 2009). Die Bindung

von c-di-GMP erfolgt über die EAL-Domäne, die wie die GGDEF-Domäne katalytisch inaktiv ist (Newell *et al.*, 2009).

Neben Protein-Protein Interaktionen können c-di-GMP Effektoren auch die Genexpression regulieren. In *P. aeruginosa* wurden zwei strukturell unterschiedliche Transkriptionsfaktoren identifiziert, die die Expression von Genen für die Exopolysaccharid-Synthese regulieren (Lee *et al.*, 2007, Hickman & Harwood, 2008). Zusätzlich wurde in *Xanthomonas axonopodis* der Transkriptionsfaktor „Clp“ identifiziert, der zur CRP-Familie gehört, aber c-di-GMP anstelle von cAMP bindet (Leduc & Roberts, 2009). Im Gegensatz zu anderen CRP-Transkriptionsfaktoren fungiert Clp als Repressor von Virulenzgenen, der durch die Bindung von c-di-GMP inaktiviert wird (Leduc & Roberts, 2009).

Die Aktivierung oder Repression von Genen kann durch direkte Bindung von c-di-GMP an spezifische RNA-Motive reguliert werden, von denen bislang zwei unterschiedliche Strukturen identifiziert wurden (Sudarsan *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2010). Die erste Struktur, das GEMM-Motiv („genes for environment, membranes and motility“), lokalisiert in der untranslatierten Region am 5'-Ende (5'UTR) der mRNA und ist in vielen Bakterien-Spezies konserviert (Weinberg *et al.*, 2007). Dieses Motiv kann c-di-GMP spezifisch binden, wodurch sich die Sekundärstruktur der RNA verändert. Durch diese Veränderung wird die Shine-Dalgarno-Sequenz (RBS) für die Bindung des Ribosoms entweder freigesetzt oder blockiert, und somit die Translation der mRNA reguliert (Sudarsan *et al.*, 2008). Das zweite Struktur-Motiv (c-di-GMP-II Aptamer) wurde in der 5'UTR von *Clostridium difficile* identifiziert und kommt hauptsächlich in Gram-positiven Bakterien und vereinzelt in Archäen vor (Lee *et al.*, 2010). In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Expression von Genen durch das c-di-GMP-II Aptamer translationell über die RBS und transkriptionell über Termination/Antitermination reguliert wird (Lee *et al.*, 2010).

1.3 Signalsysteme in *Myxococcus xanthus*

Myxobakterien sind phylogenetisch in die Klasse der δ -Proteobakterien unter der Ordnung Myxococcales eingegliedert und finden vor allem durch ihr soziales Verhalten wissenschaftliche Beachtung (Spröer *et al.*, 1999). Ein Großteil der Myxobakterien durchlebt einen komplexen Lebenszyklus, in dem abwechselnd die Stadien des vegetativen Zellwachstums und der Sporendifferenzierung durchlaufen werden (Beebe, 1941). Der Modellorganismus für Myxobakterien-betreffende Studien ist *M. xanthus*, ein in den aeroben Bodenschichten lebendes Stäbchenbakterium, das sich räuberisch ernährt. Die Jagd auf andere Mikroorganismen erfolgt in Zellgruppen, die sich gleitend über Oberflächen fortbewegen und lytische Enzyme, wie Proteasen und Lipasen, sowie Antibiotika sekretieren (Dworkin, 1996, Rosenberg *et al.*, 1973). Nach der Erschöpfung der Nährstoffquelle leitet *M. xanthus* ein Entwicklungsprogramm ein, in dem vegetative Zellen zu multizellulären Fruchtkörpern aggregieren, in denen die Bakterien zu Myxosporen differenzieren. Myxosporen sind die Überdauerungsformen von *M. xanthus*, in denen extreme Umweltbedingungen, wie Temperaturstress, überdauert werden können. Der kontrollierte Ablauf dieses zellulären Prozesses im Lebenszyklus von *M. xanthus* wird durch diverse Signalsysteme koordiniert, die sich in der Vielfalt der mechanistischen Prinzipien unterscheiden.

Das Entwicklungsprogramm wird durch den sekundären Botenstoff ppGpp eingeleitet (Singer & Kaiser, 1995). Zusätzlich sind Genregulationen durch Transkriptions- bzw. alternative σ -Faktoren an diesem Prozess beteiligt (Kroos, 2007). Der korrekte zeitliche Ablauf der Fruchtkörperbildung wird über Phosphogruppentransfers durch Serin-/Threonin-Kinasen (Nariya & Inouye, 2006) und TCS (Garza *et al.*, 1998, Higgs *et al.*, 2005, Rasmussen & Søgaaard-Andersen, 2003, Rasmussen *et al.*, 2006) kontrolliert.

Um die Ausbildung dieser multizellulären Fruchtkörper zu koordinieren, kommunizieren die Zellen durch die interzelluläre Signale A und C miteinander (Hagen *et al.*, 1978). Das A-Signal ist ein Gemisch aus Aminosäuren und Peptiden (Plamann *et al.*, 1992, Kuspa *et al.*, 1992), die sekretiert und von umgebenden Zellen wahrgenommen werden können, wodurch intrazelluläre Signalkaskaden in diesen Zellen aktiviert werden (Bowden & Kaplan, 1996).

Das C-Signal ist ein Protein auf der äußeren Membran, das die Interaktion mit einem Rezeptor auf einer benachbarten Zelle vermittelt und dadurch zelluläre Prozesse im Entwicklungsprogramm aktiviert und koordiniert (Kroos *et al.*, 1988, Søgaard-Andersen *et al.*, 1996).

Die Ausführung von periodischen Richtungswechseln ist essentiell für die Zellbewegung und das Entwicklungsprogramm von *M. xanthus*. Diese Richtungswechsel werden durch das Frz-System kontrolliert. Das Frz-System ist ein chemosensorisches System, das Homologien zum Che-System von *E. coli* zeigt (Blackhart & Zusman, 1985, McBride *et al.*, 1989). Neben dem Frz-System besitzt *M. xanthus* sieben weitere chemosensorische Systeme, die sich voneinander in Architektur und Funktion unterscheiden (Zusman *et al.*, 2007).

Klassische chemosensorische Systeme, wie das Che-System in *E. coli*, bestehen aus einem Methyl-akzeptierenden chemosensorischen Protein (MCP), einem Adapterprotein (CheW), einer HK (CheA) und einem RR (CheY). Weitere Bestandteile sind eine Methyltransferase (CheR), eine Methylesterase (CheB) und eine Phosphatase (CheC), die jedoch nicht in allen Systemen auftreten. MCP, CheW und CheA bilden einen Komplex, wobei die chemosensorischen Systeme über den Methylierungszustand des MCP ihre Sensitivität gegenüber Stimuli steuern können (Borkovich *et al.*, 1992). Wird ein Stimulus erkannt, erfolgt die Autophosphorylierung der HK CheA und die Signaltransduktion zum RR CheY, der eine Zellreaktion auslöst.

M. xanthus besitzt 272 TCS-Proteine, die nicht Teil der acht chemosensorischen Systeme sind (Shi *et al.*, 2008). Aufgrund ihrer genetischen Anordnung können die Proteine in drei unterschiedliche Klassen eingeteilt werden (Shi *et al.*, 2008): 1.) Die Gene von HK und RR kodieren hintereinander in gleicher Transkriptionsrichtung in einem Operon. 2.) In komplexen Anordnungen sind benachbarte Gene eingeteilt, die unabhängig von ihrer transkriptionellen Ausrichtung für zwei oder mehr RR, zwei oder mehr HK und mehr als zwei RR/HK kodieren. 3.) Die Gene von HK oder RR kodieren verwaist („orphan“), d. h. getrennt von ihrem korrespondierenden Partner, im Genom. Während 55 % der TCS-Proteine genetisch verwaist angeordnet sind, sind nur 29 % bzw. 16 % in einem Operon bzw. einem komplexen Gencluster organisiert (Shi *et al.*, 2008).

1.4 Die Bewegungssysteme von *M. xanthus*

Die gleitende Bewegung über Oberflächen wird in *M. xanthus* durch zwei unabhängige, aber synergetisch-arbeitende Motorsysteme angetrieben (Leonardy *et al.*, 2008). Der A-Motor („adventurous“) erlaubt es einzelnen Zellen, sich individuell fortzubewegen (A-Bewegung), während der S-Motor („social“) die Bewegung von Zellgruppen (S-Bewegung) vorantreibt (Kaiser, 1979).

1.4.1 Der A-Motor

Der A-Motor, der die individuelle Zellbewegung ausführt, wird von einem Protonengradienten durch fokale Adhäsionskomplexe (FAC) angetrieben (Nan *et al.*, 2011, Mignot *et al.*, 2005). FAC sind multimere Proteinkomplexe, die spiralförmig über den Zellkörper verteilt sind und während der rotierenden Vorwärtsbewegung zum hinteren Zellpol wandern (Mignot *et al.*, 2005, Nan *et al.*, 2011, Sun *et al.*, 2011). Nach dem aktuellen Modell stellen die Komponenten des A-Motors eine direkte oder indirekte Verbindung zwischen dem Substrat und dem Zytoskelett her, um die rotierende Bewegung auszuführen (Sun *et al.*, 2011). Bisher konnten allerdings nur wenige Komponenten identifiziert werden.

Zusätzlich zu dem in 1.3 beschriebenen chemosensorischen Frz-System, sind zwei verwaiste RR an der korrekten Ausführung der A-Bewegung beteiligt. Der Pseudo-RR AglZ interagiert sowohl mit FrzCD (Mauriello *et al.*, 2009), dem MCP des Frz-Systems in *M. xanthus*, als auch mit den Motorkomplexen des A-Systems (Nan *et al.*, 2010, Mignot *et al.*, 2007). Neben der Pseudo-Empfängerdomäne, der wichtige Aminosäuren für eine Phosphorylierung fehlen, besteht AglZ aus einer verlängerten „output“-Domäne mit einer „coiled coil“-Struktur, die Interaktionen zwischen Proteinen vermittelt (Yang *et al.*, 2004). RomR ist ein klassischer RR der eine Empfängerdomäne mit konserviertem Aspartat und einer „output“-Domäne besitzt, die eine Prolinreiche und eine Glutamat-reiche Region enthält (Leonardy *et al.*, 2007). Die „output“-Domäne ist essentiell für die polare Lokalisierung von RomR, während der Phosphorylierungszustand der Empfängerdomäne die Frequenz der Richtungswechsel der Zellen beeinflusst (Leonardy *et al.*, 2007). Eine

korrespondierende HK wurde bisher nicht identifiziert, es wird jedoch vermutet, dass RomR direkt oder indirekt durch das Frz-System phosphoryliert wird (Leonardy *et al.*, 2008).

1.4.2 Der S-Motor

Typ-IV-Pili (T4P) treiben den S-Motor an, der die Fortbewegung von Zellgruppen vermittelt (Wu & Kaiser, 1995). Der T4P-Apparat lokalisiert unipolar am vorderen Zellpol und besitzt durchschnittlich neun T4P pro Zelle (Jakovljevic *et al.*, 2008). Der Mechanismus des S-Motors lässt sich in drei Phasen einteilen: die T4P-Verlängerung, die Anhaftung der T4P an ein Substrat und die T4P-Verkürzung. Durch eine periodische Wiederholung der drei Phasen ziehen T4P den Zellkörper in Richtung seiner Längsachse vorwärts. Das Filament eines T4P besteht aus vielen PilA-Monomeren, die durch die ATPase PilB während der Verlängerungsphase polymerisiert werden (Bulyha *et al.*, 2009, Wu *et al.*, 1997). Für die Verkürzung des Pilusfilaments ist eine weitere ATPase, PilT, essentiell (Jakovljevic *et al.*, 2008). Die weiteren strukturellen Komponenten des T4P-Apparats zeigen Homologien zu T4P-Systemen anderer Bakterien, wie *P. aeruginosa* oder *Neisseria gonorrhoeae* (Darzins, 1994).

Über die Regulation der Gene des S-Motors ist nur wenig bekannt. Die Expression von *pilA* wird durch den RR PilR aktiviert und durch die HK PilS inhibiert (Wu & Kaiser, 1997). Weitere regulatorische Proteine, die die S-Bewegung indirekt beeinflussen, werden in 1.5.4 beschrieben.

1.5 Das Lipopolysaccharid O-Antigen und die extrazelluläre Matrix

Neben dem S-Motor sind zwei weitere zelluläre Strukturen für die korrekte Ausführung der S-Bewegung essentiell: 1.) das O-Antigen der Lipopolysaccharide (LPS) und 2.) die Exopolysaccharide (EPS) der extrazellulären Matrix (ECM). Ein weiterer Bestandteil der ECM neben EPS sind Proteine, die im gleichen Anteilsverhältnis (1:1) zueinander stehen (Behmlander & Dworkin, 1994). Eine direkte Beteiligung von Matrixproteinen an der S-Bewegung konnte bislang nicht nachgewiesen werden.

1.5.1 LPS O-Antigen

Das O-Antigen der Lipopolysaccharide (LPS) aus der äußeren Zellmembran beeinflusst die S-Bewegung durch einen noch unbekanntem Mechanismus (Bowden & Kaplan, 1998). Die Bestandteile des LPS O-Antigen von *M. xanthus* sind Glukose, Galaktosamin und 6-O-Methylgalaktosamin (MacLean *et al.*, 2007), während das gesamte LPS zusätzlich aus Mannose, Rhamnose, Arabinose, Xylose, Glukosamin, 2-Keto-3-Deoxyoktulosonsäure und 3-O-Methylpentose besteht (Yang *et al.*, 2008).

1.5.2 Exopolysaccharide

Exopolysaccharide (EPS) sind die zweite essentielle Struktur für eine korrekte S-Bewegung. EPS sind ein Bestandteil der ECM, die den Zellkörper umhüllt. Der strukturelle Aufbau der EPS ist bisher unbekannt, allerdings wurden Monosaccharid-Bestandteile identifiziert, die sich aus Galaktose, Glukosamin, Glukose, Rhamnose und Xylose zusammensetzen (Behmlander & Dworkin, 1994). Die Synthese der EPS erfolgt durch enzymatische Proteine, wie Glykosyltransferasen oder Glukonasen, die genetisch in den *eps*- und *eas*-Loci kodieren (Lu *et al.*, 2005). Während der S-Bewegung dienen EPS als bevorzugte Oberflächenstrukturen für die Anhaftung von T4P (Hu *et al.*, 2012) und vermutlich stimuliert die T4P-Anhaftung die Synthese von EPS, die durch das chemosensorische Dif-System reguliert wird (Black *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2000).

Das Dif-System besteht aus fünf Proteinen: einem MCP (DifA), einem CheW-Adapter (DifC), einer CheA-HK (DifE), einem CheY-RR ohne „output“-Domäne (DifD) und einer CheC-Phosphatase (DifG) (Yang *et al.*, 1998). DifA, DifC und DifE bilden den Kernkomplex des Dif-Systems, der die Synthese von EPS stimuliert (Yang *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu sind DifD und DifG Inhibitoren der EPS-Synthese (Black & Yang, 2004), wobei DifD als Phosphat-senke von DifE fungiert und von DifG wieder regeneriert wird (Black *et al.*, 2010). Es wird vermutet, dass DifE mindestens einen weiteren RR aktiviert, der die Expression der *eps-/eas*-Gene steuert und so die Synthese und den Transport von EPS reguliert (Black & Yang, 2004, Mauriello *et al.*, 2010).

1.5.3 Das Matrixprotein FibA

In einer chromatographischen und massenspektrometrischen Untersuchung von isoliertem ECM-Material wurden 13 Proteine identifiziert, die mit der ECM assoziiert werden und deren Struktur und Funktion größtenteils unbekannt sind (Curtis *et al.*, 2007). Zwei Proteine sind homolog zu Zink-Metalloproteasen, von denen nur FibA näher untersucht wurde (Kearns *et al.*, 2002).

FibA besitzt neben der Proteasedomäne und einem N-terminalen Signalpeptid zusätzlich ein N-terminales Propeptid und zwei C-terminale Pro-Peptidasedomänen (Kearns *et al.*, 2002). Das N-terminale Propeptid besitzt die Funktion eines intramolekularen Chaperons, das die Proteaseaktivität hemmt und den Export von FibA stimuliert (Kearns *et al.*, 2002). Nach dem Proteinexport wird die Proteasedomäne in einem selbstständigen Prozess von dem Propeptid und den Pro-Peptidasedomänen abgespalten, wodurch FibA aktiviert wird (Kearns *et al.*, 2002).

In vegetativen Zellen ist FibA als Teil der ECM an der Zelloberfläche exponiert und wird während der Sporendifferenzierung im Sporenmantel angereichert (McCleary *et al.*, 1991, Lee *et al.*, 2011). Überraschenderweise zeigte eine *fibA*-Mutante weder einen Defekt im Aufbau der ECM noch in der Bewegungsfähigkeit oder in der Ausbildung von lebensfähigen Sporen (Kearns *et al.*, 2002, Lee *et al.*, 2011). Allerdings zeigte die *fibA*-Mutante eine leichte Störung in der Fruchtkörperbildung während des Entwicklungszyklus, die

vermutlich auf einen Defekt in der Lipid-Chemotaxis zurückzuführen ist (Kearns *et al.*, 2002). Lipide sind chemische Lockstoffe für *M. xanthus* und werden durch die Lyse von bakteriellen Zellen freigesetzt (Kearns & Shimkets, 1998). Durch die Sekretion von lytischen Enzymen durch *M. xanthus*-Zellen während der Jagd wird die Zellmembran von Beutebakterien perforiert und deren Lipide freigesetzt (Rosenberg *et al.*, 1973, Bonner & Shimkets, 2006). Auch im frühen Entwicklungsprogramm, in dem ein Großteil der Population geopfert wird, um Nährstoffe für die sporulierenden Zellen bereitzustellen (Wireman & Dworkin, 1975, Nariya & Inouye, 2008), dienen die eigenen Membranlipide als Lockstoffe für *M. xanthus* (Bonner & Shimkets, 2006). *M. xanthus* besitzt im Vergleich zu anderen Bakterien eine spezielle Form von Membranlipiden, die sich in der Struktur der Lipide und Kettenlänge der Fettsäuren unterscheiden (Kearns *et al.*, 2001, Bonner & Shimkets, 2006). Die Sensitivität gegenüber *M. xanthus*-eigenen Lipiden ist abhängig von FibA, von dem eine sensorische Funktion während der Lipid-Chemotaxis im frühen Entwicklungszyklus vermutet wird (Bonner & Shimkets, 2006). An der Regulation der Lipid-Chemotaxis ist das chemosensorische Dif-System beteiligt, das während des Entwicklungsprogramms über FibA stimuliert wird (Bonner *et al.*, 2005). Für die Stimulierung der Lipid-Chemotaxis während der Beutejagd wird außerdem ein weiterer, noch unbekannter Sensor vermutet (Bonner & Shimkets, 2006).

1.5.4 Regulatorische Proteine der extrazellulären Matrix

Die Zusammenstellung der ECM wird nicht ausschließlich durch das Dif-System reguliert, es wurden zusätzliche Proteine identifiziert, die Einfluss auf die Synthese von EPS und Matrixproteinen nehmen. Stellvertretend für das Vorhandensein von weiteren Matrixproteinen wurde die Akkumulierung von FibA in unterschiedlichen Mutanten untersucht.

Der Pseudo-RR FrzS stimuliert die EPS-Synthese und besitzt eine verlängerte „output“-Domäne mit einer „coiled-coil“-Struktur, die eine Interaktion mit anderen Proteinen vermuten lässt (Berleman *et al.*, 2011, Ward *et al.*, 2000). FrzS lokalisiert vornehmlich am vorderen pillierten Zellpol in Abhängigkeit vom Frz-System (Mignot *et al.*, 2005). Bisher wurden keine Interaktions-

partner identifiziert, so dass die Funktion von FrzS in der EPS-Synthese unbekannt ist.

Die zwei NtrC-ähnlichen Transkriptionsregulatoren Nla24 und Nla19 sind essentiell für eine korrekte EPS-Synthese (Caberoy *et al.*, 2003). Beide Proteine besitzen eine Empfängerdomäne, die durch eine HK aktiviert wird, und eine DNA-Bindedomäne, die typischerweise an der Transkription mit σ^{54} -Faktoren beteiligt ist (Caberoy *et al.*, 2003). Nla24 stimuliert die Synthese von EPS und kodiert im *eps*-Gencluster (Lu *et al.*, 2005, Lancero *et al.*, 2004). Eine direkte transkriptionelle Aktivierung der *eps*-Gene wurde bisher nicht nachgewiesen und die korrespondierende HK ist unbekannt. Im Gegensatz zu Nla24 ist Nla19 ein Inhibitor der EPS-Synthese, dessen Zielgene unbekannt sind und der möglicherweise durch das Dif-System aktiviert wird (Lancero *et al.*, 2005). Neben einer Zwei-Hybrid-Studie fehlt jedoch ein zusätzlicher experimenteller Nachweis für eine Interaktion zwischen DifE und Nla19 (Lancero *et al.*, 2005).

DigR („Defective in gliding Response regulator“) ist ein RR mit einer DNA-Bindedomäne der Xre-Familie von Transkriptionsregulatoren, der die EPS-Synthese inhibiert (Overgaard *et al.*, 2006). Eine $\Delta digR$ -Deletionsmutante zeigte neben einem erhöhten EPS-Anteil einen Defekt in der Akkumulierung von FibA in der ECM (Overgaard *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu zeigt die *difD*-Insertionsmutante, die ebenfalls die EPS-Synthese inhibiert, keinen Defekt in der FibA-Akkumulierung (Black & Yang, 2004). Vergleichende Transkriptomstudien zwischen $\Delta digR$ - und Wildtyp-Zellen zeigten, dass die *eps*- und *dif*-Gene in beiden Stämmen nicht signifikant unterschiedlich reguliert werden und somit eine direkte Regulation der EPS-Synthese durch DigR ausgeschlossen werden kann (Overgaard *et al.*, 2006). Unter den 118 signifikant regulierten Genen wird die Expression von vier ECF-Sigmafaktoren differentiell reguliert (Overgaard *et al.*, 2006). ECF-Sigmafaktoren regulieren die Expression von Proteinen mit extrazytoplasmatischer Funktion, die u. a. am Aufbau der Zellhülle beteiligt sein können (Missiakas & Raina, 1998). Zusätzlich wird FibA in der $\Delta digR$ -Mutante stark reduziert exprimiert (Overgaard *et al.*, 2006). Um die direkte Regulation von *fibA* durch DigR zu testen, wurden erste Untersuchungen durchgeführt (Zhang, 2005).

2 Ergebnisse

Um die Bewegungsfähigkeit von *M. xanthus* besser zu verstehen, wurde in einer Mutagenese-Studie nach neuen Genen gesucht, die für die S-Bewegung essentiell sind (Youderian & Hartzell, 2006). Neben einer Reihe von bereits bekannten Genen (u.a. *mglB*, *pilA*, *epsD* und *frzS*) wurden 31 neue Gene identifiziert, die die S-Bewegung beeinflussen. Drei dieser Gene kodieren für TCS-Proteine: zwei RR SgnC (MXAN6627) und SgmW bzw. DigR (MXAN5592) sowie die HK SgmT (MXAN4640) (Youderian & Hartzell, 2006). SgmT („Social gliding motility protein T“) ist bis heute die einzige HK außerhalb eines chemosensorischen Regulationssystems, die die Bewegungsfähigkeit von *M. xanthus* beeinflusst. Im ersten Teil dieser Arbeit galt mein besonderes Interesse der Charakterisierung von SgmT, der Identifizierung des korrespondierenden RR sowie der Untersuchung der physiologischen Funktion von SgmT.

Im zweiten Teil setzt sich meine Arbeit mit dem sekundären Botenstoff c-di-GMP und dessen Einfluss auf das Verhalten von *M. xanthus* auseinander. Die Erforschung von c-di-GMP hat in den letzten Jahren erheblich dazu beigetragen, komplexe zelluläre und regulatorische Prozesse von Bakterien zu verstehen. Besonders dessen Einfluss auf die Zellbewegung, die Biofilmbildung, den Zellzyklus und die Virulenz sind Gegenstand aktueller Studien. Das ubiquitäre Auftreten von c-di-GMP und die starke Konservierung von c-di-GMP-beeinflussenden und -abhängigen Proteinen in Bakterien weckte mein Interesse, dessen Einfluss in *M. xanthus* zu untersuchen.

2.1 Die Charakterisierung der Histidinkinase SgmT

2.1.1 Δ sgmT hat einen S-Bewegungsdefekt

Vom Wildtyp abweichende Phänotypen von Insertionsmutanten können zum einen auf die Genunterbrechung selbst oder zum anderen auf polare Effekte im genetischen Kontext zurückzuführen sein. Um den von Youderian und Hartzell beschriebenen S-Bewegungsdefekt der *sgmT*-Insertionsmutante zu überprüfen (Youderian & Hartzell, 2006), wurde eine Δ *sgmT*-Deletionsmutante (SA3502), wie in 4.3.8 beschrieben, generiert und phänotypisch untersucht. Vergleicht man die Koloniemorphologien des Wildtyps (DK1622) mit

$\Delta sgmT$ nach drei bis vier Tagen Wachstum auf CTT-Agar, lassen sich bereits erste starke Unterschiede erkennen (nicht dargestellt). Während Wildtypzellen leuchtend-gelbe Kolonien im Durchmesser von 5-10 mm bilden, sind die Kolonien von $\Delta sgmT$ mit 1-2 mm Durchmesser verhältnismäßig klein und bräunlich. In der Komplementationsmutante SA3503 ($\Delta sgmT/sgmT+$), bei der *sgmT* mit seinem mutmaßlichen Promotor in die „phage Mx8 *attB*-site“ von SA3502 ($\Delta sgmT$), wie in 4.3.8 beschrieben, integriert wurde, konnte der Wildtyp-Phänotyp wieder hergestellt werden.

Abbildung 3 zeigt die Bewegungsstudie von SA3502 ($\Delta sgmT$) und seinem Komplementationsstamm SA3503 ($\Delta sgmT/sgmT+$), die wie in 4.2.3 beschrieben durchgeführt wurde. In Abbildung 3A wurden die Stämme auf einer 0,5 %igen Agaroberfläche auf einen S-Bewegungsdefekt hin untersucht. Im Wildtypstamm (DK1622) bewegen sich die Zellen distal fort und bilden dabei die charakteristische strahlenförmige Kolonierandmorphologie. Der Kolonierand von SA3502 ($\Delta sgmT$) weist eine glatte Morphologie auf, dem die typischen Strahlen („flares“) fehlen. Demnach bestätigt SA3502 ($\Delta sgmT$) den zuvor in der Insertionsmutante entdeckten S-Bewegungsdefekt. SA3503 ($\Delta sgmT/sgmT+$) bewegt sich wie DK1622 (Wildtyp) distal strahlenförmig fort und kann den S-Bewegungsdefekt von SA3502 ($\Delta sgmT$) kompensieren. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass *sgmT* ein essentielles Gen für die S-Bewegung in *M. xanthus* ist. Die A-Bewegungsfähigkeit von SA3502 ($\Delta sgmT$) und SA3503 ($\Delta sgmT/sgmT+$) wurde in Abbildung 3B dokumentiert. Betrachtet man den Rand der Kolonien, so sind in SA3502 ($\Delta sgmT$) vergleichbar mit DK1622 (Wildtyp) und SA3503 ($\Delta sgmT/sgmT+$) vereinzelt Zellen sichtbar. Somit wurde die A-Bewegung durch die Deletion von *sgmT* nicht beeinträchtigt.



Abbildung 3: Bewegungsstudie der Deletionsmutante ΔsgmT (SA3502).

Die Bewegungsstudie wurde an folgenden Stämmen von *M. xanthus* durchgeführt: Wildtyp (DK1622), die A-Bewegungsmutante (DK1217), die S-Bewegungsmutante (DK1300), ΔsgmT (SA3502) und die Komplementationsmutante (SA3503). Längenskalen sind jeweils rechts von jeder Zeile angegeben. (A) Kolonie- und Kolonieranduntersuchungen auf 0,5 % Agar zur Überprüfung der S-Bewegungsfähigkeit. (B) Kolonieranduntersuchungen auf 1,5 % Agar zur Überprüfung der A-Bewegungsfähigkeit.

2.1.2 SgmT beeinflusst den Aufbau der extrazellulären Matrix

Um die Ursache für den S-Bewegungsdefekt von SA3502 (ΔsgmT) zu ermitteln, wurde die Mutante auf Defekte im Aufbau von Typ-IV-Pili (T4P), in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (ECM) und in der Akkumulation des Lipopolysaccharid (LPS) O-Antigens hin untersucht.

Um das Vorhandensein von T4P in SA3502 (ΔsgmT) an den Zellpolen zu analysieren, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen, wie in 4.5.2 beschrieben, angefertigt. Abbildung 4A zeigt, dass SA3502 (ΔsgmT) wie DK1622 (Wildtyp) unipolare T4P ausbildet, die als filamentäre Anhänge am Zellpol zu erkennen sind. Die S-Bewegungsmutante DK10410 (ΔpilA) dient als nicht-pilierter Kontrollstamm. PilA ist die Hauptuntereinheit des Pilusfilaments und daher essentiell für dessen Aufbau (Wu & Kaiser, 1997). Parallel dazu wurde ein Protein-Immunblot mit Antikörpern gegen PilA, wie in 4.4.3 beschrieben, angefertigt, der in Abbildung 4B dargestellt ist. Darauf sind

vergleichbare Protein-Mengen von PilA in SA3502 (Δ *sgmT*) und DK1622 (Wildtyp) detektierbar. Diese beiden Untersuchungen lassen darauf schließen, dass der korrekte Aufbau von T4P in SA3502 (Δ *sgmT*) nicht beeinflusst und der beobachtete S-Bewegungsdefekt nicht auf eine fehlerhafte Funktion der T4P zurückzuführen ist.

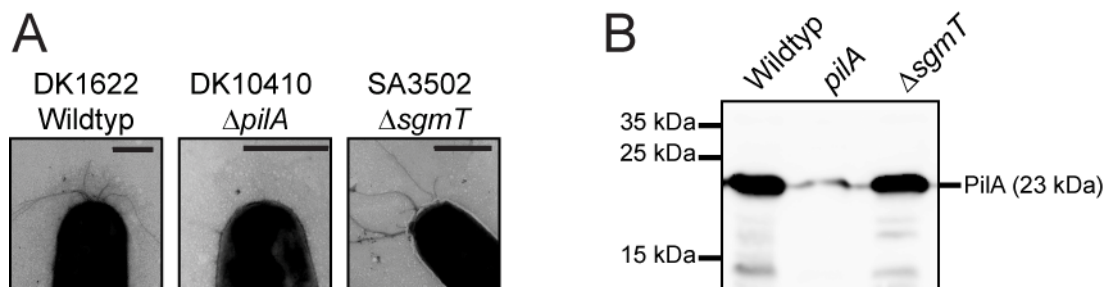


Abbildung 4: Untersuchungen zum Aufbau der Typ-IV-Pili in Δ *sgmT*.

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *M. xanthus*. Dargestellt sind die pilierten Zellpole von Wildtyp (DK1622) und Δ *sgmT* (SA3502), sowie ein Zellpol des unpilierten Kontrollstamms Δ *pilA* (DK10410). Die aufgezeigten Längenmaßstäbe betragen jeweils 0,5 μ m. (B) Protein-Immunblot Analyse gegen PilA (23 kDa). Verglichen wurden Lysate der gleichen Zellmenge (10^8 Zellen) von den Stämmen DK1622 (Wildtyp), DK10407 (*pilA*) und SA3502 (Δ *sgmT*). Die Größenstandards des Proteinmarkers sind auf der linken Seite angegeben.

Die extrazelluläre Matrix (ECM) von *M. xanthus* besteht zu 55 % aus Kohlenhydraten in Form von Exopolysacchariden (EPS) und zu 45 % aus Proteinen (Behmlander & Dworkin, 1994). Beide Fraktionen der ECM wurden in Δ *sgmT* (SA3502) untersucht und mit Wildtypzellen verglichen.

Zunächst wurde die Farbstoffbindung von SA3502 (Δ *sgmT*) untersucht, um Rückschlüsse auf die Menge an EPS zu bekommen. Abbildung 5A zeigt Kolonien nach einer Inkubation von 24 h auf Agarplatten, in denen die Farbstoffe Trypanblau bzw. Kongorot enthalten waren (siehe 4.2.4). Die EPS von Wildtypzellen (DK1622) haben einen Teil des jeweiligen Farbstoffs gebunden und zeigen eine entsprechende grüne bzw. rote Koloniefärbung. Die Zellen des Kontrollstamms SW501 (*difE*) besitzen keine EPS und können folglich keinen der beiden Farbstoffe binden. Dementsprechend zeigt SW501 (*difE*) keine Färbung und verbleibt gelb. Die Kolonien von SA3502 (Δ *sgmT*) zeigen eine erhöhte Farbstoffbindung, ähnlich der des Kontrollstamms SA1804 (Δ *digR*), und erschienen blau bzw. pink auf Trypanblau- bzw. Kongorotagar. Die Zellen von SA1804 (Δ *digR*) besitzen einen S-Bewegungsdefekt, der auf eine erhöhte Akkumulierung von EPS in der ECM zurückzuführen ist (Overgaard et

al., 2006). Die Komplementationsmutante SA3503 ($\Delta\text{sgmT}/\text{sgmT}+$) zeigt eine vergleichbare Farbstoffbindung wie DK1622 (Wildtyp).

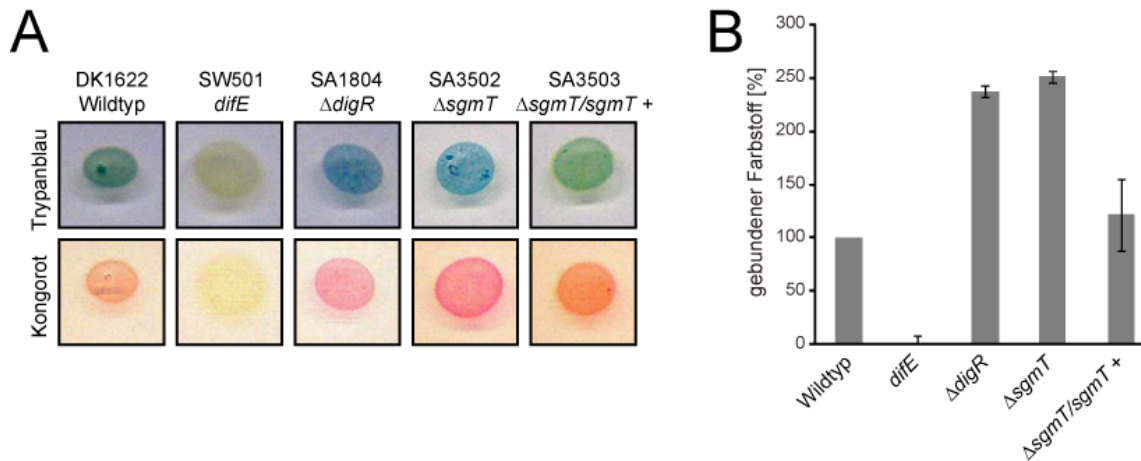


Abbildung 5: Quantifizierung des Exopolysaccharid-Anteils in ΔsgmT .

(A) Untersuchung zur Farbstoffbindung der angegebenen Stämme auf Agarplatten mit Trypanblau (obere Reihe) bzw. Kongorot (untere Reihe). (B) Quantifizierung des gebundenen Farbstoffs durch kolorimetrische Analysen. Der Anteil von gebundenem Trypanblau wurde in Wildtypzellen auf 100 % normalisiert und für ΔsgmT , $\Delta\text{sgmT}/\text{sgmT}+$ sowie *difE* & ΔdigR entsprechend berechnet. Die schwarzen Balken stellen die Standardabweichung der Messergebnisse dar.

Um den Anteil des gebundenen Farbstoffs und damit indirekt den relativen Anteil der EPS zu quantifizieren, wurde ein kolorimetrischer Test mit Flüssigkulturen, wie in 4.2.4 beschrieben, durchgeführt. In Abbildung 5B ist das Ergebnis der kolorimetrischen Untersuchung dargestellt. Das Balkendiagramm zeigt den Anteil an gebundenem Trypanblau normalisiert zu Wildtypzellen (100 %). Dieser Test bestätigt die Beobachtungen zur Farbstoffbindung auf Agarplatten: DK1622 (Wildtyp) und die Komplementationsmutante SA3503 ($\Delta\text{sgmT}/\text{sgmT}+$) können vergleichbare Anteile an Trypanblau binden, während SA3502 (ΔsgmT) im Gegensatz dazu eine zweieinhalbmal höhere Bindekapazität besitzt. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass SA3502 (ΔsgmT) einen erhöhten Anteil von EPS in der ECM produziert und dadurch der S-Bewegungsdefekt hervorgerufen werden könnte.

Um die Proteinfraction der ECM in SA3502 (ΔsgmT) zu untersuchen, wurde stellvertretend für andere Proteine die Metalloprotease FibA („fibril protein A“) ausgewählt. FibA ist das am häufigsten vorkommende Protein in der ECM von *M. xanthus* (Curtis *et al.*, 2007). Ein Protein-Immunblot mit

spezifischen Antikörpern gegen FibA (MAb2105) wurde, wie in 4.4.3 beschrieben, durchgeführt und in Abbildung 6 dargestellt.

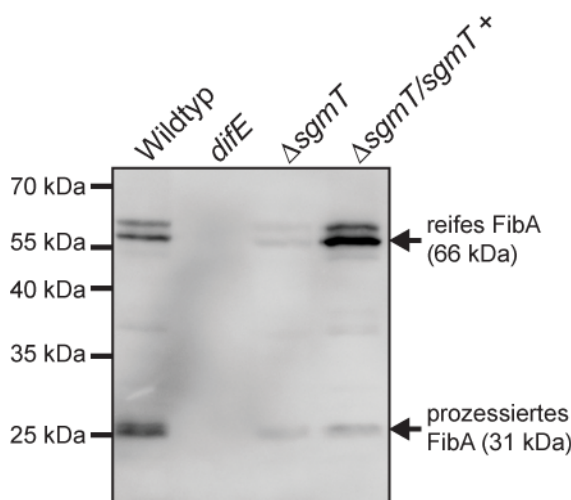


Abbildung 6: Nachweis des extrazellulären Matrix-Proteins FibA in Δ sgmT.

Immunblot Analyse mit Antikörpern gegen FibA (MAb2105). Der Blot zeigt den Vergleich gleicher Zellmengen (10^8 Zellen) der Stämme SA3502 (Δ sgmT) und SA3503 (Δ sgmT/sgmT+) mit Zellen der Kontrollstämme DK1622 (Wildtyp) und SW501 (*difE*). Die reife (66 kDa) und die prozessierte (31 kDa) Form von FibA sind mit schwarzen Pfeilen kenntlich gemacht. Die Größenstandards des Proteinmarkers sind auf der linken Seite angegeben.

Im Wildtyp und der Komplementationsmutante (Δ sgmT/sgmT+) lassen sich zwei FibA-spezifische Banden detektieren: 1.) die reife Form von FibA mit einer molekularen Masse von 66 kDa und 2.) die prozessierte Form mit einer molekularen Masse von 31 kDa. In Δ sgmT (SA3502) sind diese beiden Protein-Banden nur schwer erkennbar. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Anteil an FibA im Gegensatz zum Wildtyp stark reduziert vorliegt. In SW501 (*difE*) konnte gezeigt werden, dass ein Defekt in der Produktion von FibA vorliegt (Black & Yang, 2004). FibA ist entsprechend in SW501 (*difE*) nicht detektierbar. Diese Daten lassen vermuten, dass Δ sgmT (SA3502) neben der zuvor gezeigten Überproduktion von EPS einen Defekt in der Akkumulierung von FibA und damit möglicherweise auch von anderen Matrixproteinen hat.

In vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass Zellen, die kein O-Antigen aufbauen können, einen Defekt in der S-Bewegung aufweisen (Bowden & Kaplan, 1998). Daher wurde SA3502 (Δ sgmT) auf die Präsenz des LPS O-Antigens mit O-Antigen-spezifischen Antikörpern (MAb783) in Immunblot Analysen untersucht. Dabei diente *wzm* (HK1321), der einen Defekt im Transport von LPS O-Antigen aufzeigt, als Kontrolle (Bowden & Kaplan, 1998). Abbildung 7 zeigt, dass die Anhäufung des LPS O-Antigen in Δ sgmT (SA3502) gegenüber DK1622 (Wildtyp) und SA3503 (Δ sgmT/sgmT+) leicht reduziert ist. Der Vergleich mit *wzm* zeigt jedoch, dass in SA3502 (Δ sgmT) immer noch LPS O-Antigen detektierbar ist. Folglich ist mit hoher

Wahrscheinlichkeit auszuschließen, dass der beobachtete S-Bewegungsdefekt in SA3502 ($\Delta sgmT$) auf einem Defekt in der Synthese oder dem Transport von O-Antigen beruht.

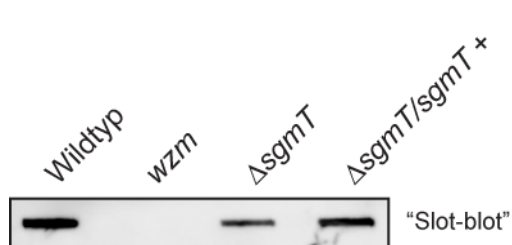


Abbildung 7: Nachweis des LPS O-Antigens in $\Delta sgmT$.

Gleiche Mengen von Zellen wurden über einen „Slot-blot“ auf die Membran aufgetragen und mit Antikörpern gegen Lipopolysaccharid O-Antigen untersucht. Dabei wurden SA3502 ($\Delta sgmT$) und SA3503 ($\Delta sgmT/sgmT +$) mit den Kontrollstämmen DK1622 (Wild-typ) und HK1321 (*wzm*) verglichen.

2.1.3 Die Hybrid-Histidinkinase SgmT ist konserviert in Myxococcales

Eine BLAST-Analyse der Proteinsequenz lieferte erste Erkenntnisse über die phylogenetische Herkunft von SgmT (Altschul *et al.*, 1990). Das komplette Protein, bestehend aus 836 Aminosäuren (aa), ist neben *M. xanthus* ausschließlich in Spezies der Myxococcales (*Myxococcus fulvus* und *Stigmatella aurantiaca*) hoch konserviert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch der genetische Kontext von *sgmT* innerhalb der Myxococcales hoch konserviert vorliegt (Abbildung 8A). Dabei wurden zusätzlich zu den veröffentlichten Genomen von *M. xanthus*, *M. fulvus*, *S. aurantiaca*, *Anaeromyxobacter dehalogenans*, *Haliangium ochraceum* und *Sorangium cellulosum* bislang unveröffentlichte Genomdaten anderer Myxococcales-Spezies (*Myxococcus macrosporus*, *Myxococcus stipitatus* und *Coralloccoccus coralloides*) in der Analyse berücksichtigt (Huntley *et al.*, unveröffentlicht).

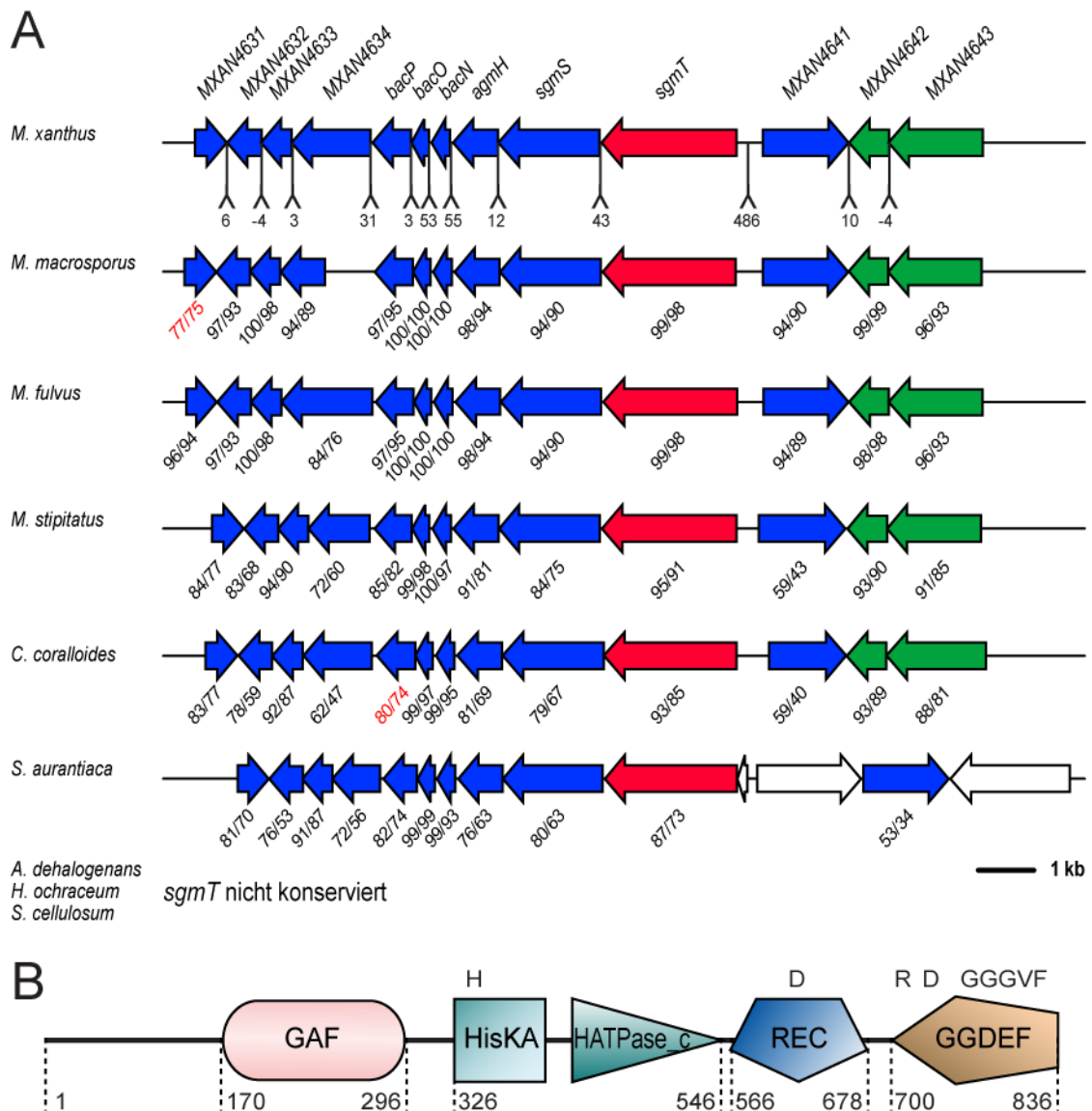


Abbildung 8: Konservierung des genetischen Kontexts von *sgmT* und Domänenstruktur von SgmT.

(A) Dargestellt ist der genetische Kontext von *sgmT* in *M. xanthus* und dessen Konservierung in anderen Myxococcales-Spezies (*M. macrosporus*, *M. fulvus*, *M. stipitatus*, *C. coralloides* und *S. aurantiaca*). Die roten Pfeile repräsentieren *sgmT* bzw. dessen Homologe, blaue Pfeile kennzeichnen hochkonservierte Gene, grüne Pfeile symbolisieren minder konservierte Gene, während weiße Pfeile Gene darstellen, die nicht im *sgmT* Kontext von *M. xanthus* auftreten. Der Abstand der Gene (in bp) zueinander ist unter der Grafik von *M. xanthus* angegeben. Schräggestellte Zahlen unter den Grafiken der Myxococcales Spezies geben die Ähnlichkeit/Gleichheit der jeweiligen Proteinsequenzen zu *M. xanthus* in % an, rote Zahlen beziehen sich auf unvollständige Sequenzen. Die Darstellung der Loci ist maßstabsgetreu (Längenstandard = 1 kb). (B) Die graphische Darstellung der Domänenstruktur von SgmT wurde nach SMART (Schultz *et al.*, 1998) modifiziert. Die einzelnen Domänen sind farblich wie folgt dargestellt: die sensorische Domäne (GAF) in rosa, die Kinasedomänen (HisKA & HATPase_c) in grün, die Empfängerdomäne (REC) in blau und die Diguanylatzyklase-Domäne (GGDEF) in braun. Die konservierten Aminosäurereste der HisKA-, der REC- sowie der GGDEF-Domäne sind über der Grafik dargestellt. Die Zahlen unter der Abbildung kennzeichnen die Position der begrenzenden Aminosäuren von SgmT bzw. den einzelnen Domänen.

In klassischen TCS werden die Gene einer HK und des korrespondierenden RR innerhalb eines Operons koexprimiert (Kyriakidis & Tiligada, 2009). Interessanterweise befindet sich im genetischen Kontext von *sgmT* kein Gen, das für einen Antwortregulator kodiert und damit einen potentiellen Interaktionspartner von SgmT darstellen könnte. Diese isolierte Lokalisierung von Genen aus TCS wird als „verwaist“ („orphan“) bezeichnet und kommt in *M. xanthus* zu 55 % vor (Shi *et al.*, 2008). Die Gene, die in der Transkriptionsrichtung nach *sgmT* („downstream“) angeordnet sind, kodieren für Proteine, die die Bewegungsfähigkeit beeinflussen (*sgmS* und *agmH*), bzw. eine strukturelle Funktion (*bacN-P*) besitzen und ebenfalls hoch konserviert vorkommen (Youderian *et al.*, 2003, Youderian & Hartzell, 2006, Kühn *et al.*, 2010, Koch *et al.*, 2011). Die hohe Konservierung auf DNA- und Proteinebene spricht für eine essentielle Funktion von SgmT innerhalb der Myxococcales.

Um die zelluläre Lokalisierung von SgmT abschätzen zu können, folgten bioinformatische Untersuchungen auf das Vorhandensein von Signalpeptiden und Transmembranhelices. SignalP 3.0 (Bendtsen *et al.*, 2004), LipoP 1.0 (Juncker *et al.*, 2003), TatP 1.0 (Bendtsen *et al.*, 2005) und TMHMM 2.0 (Krogh *et al.*, 2001) zeigen, dass SgmT weder über ein Signalpeptid noch über Transmembrandomänen verfügt. Folglich lokalisiert SgmT mit hoher Wahrscheinlichkeit im Zytoplasma der Zelle.

Die Domänenstruktur von SgmT wurde mit SMART analysiert (Schultz *et al.*, 1998) und ist in Abbildung 8B dargestellt. Dieser bioinformatischen Analyse zufolge besteht das Protein aus vier Domänen: 1.) einer N-terminalen sensorischen Domäne (GAF); 2.) den zwei Subdomänen der Kinase (HisKA & HATPase_c); 3.) einer Empfängerdomäne (REC) und 4.) einer C-terminalen Diguanylatzyklase-Domäne (GGDEF). Betrachtet man die Struktur des Proteins, so sind alle wichtigen Elemente für eine Signaltransduktion in SgmT enthalten. Vergleichende Sequenzanalysen zeigen, dass alle funktionellen Aminosäurereste in der Kinase- und der Empfängerdomäne konserviert sind (Anhang 1). Vergleicht man die GGDEF-Domäne von SgmT mit den GGDEF-Domänen anderer Proteine, so wird deutlich, dass die primären und sekundären Aminosäurereste des inhibitorischen Motivs, der „I-site“, in SgmT^{GGDEF} konserviert (RxxD) vorliegen (Abbildung 9). Das GGDEF-Motiv, welches das

katalytische Zentrum bzw. die „A-site“ von Diguanylatzyklasen bildet, ist in SgmT^{GGDEF} degeneriert (GGGVF). Die basischen Aminosäuren am C-Terminus der Domäne (K442 und R446 in PleD von *C. crescentus*), die die Bindung des β- und γ-Phosphats von GTP unterstützen, fehlen in SgmT. Folglich besitzt SgmT eine degenerierte A-site, die katalytisch inaktiv ist, und eine konservierte I-site. Da eine intakte I-site den sekundären Botenstoff c-di-GMP binden kann (Christen *et al.*, 2006), könnte SgmT als c-di-GMP-Rezeptor dienen, der eine regulatorische Funktion besitzt. Der Einfluss der einzelnen Domänen auf die Funktion von SgmT wird im nachfolgenden Abschnitt untersucht.

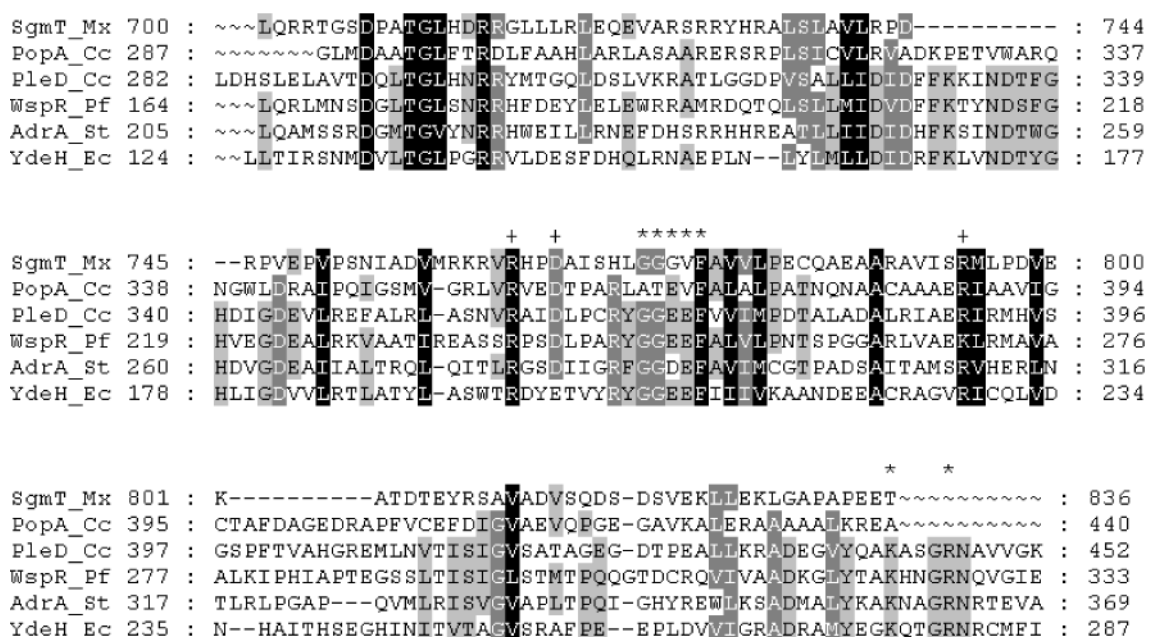


Abbildung 9: Sequenzvergleich von SgmT^{GGDEF} mit anderen GGDEF-Domänen.

Die Proteinsequenz der GGDEF-Domäne von SgmT wurde mit den Sequenzen von GGDEF-Domänen verglichen, die in der Literatur beschrieben und analysiert wurden. Auf der linken Seite jeder Zeile sind die Namen der Proteine sowie die Spezies angegeben, die Kürzel stehen für folgende Organismen: Mx = *M. xanthus*, Cc = *C. crescentus*, Pf = *P. fluorescens*, St = *S. typhimurium* und Ec = *E. coli*. Die Koordinaten der Domäne innerhalb des Proteins sind jeweils vor und hinter jeder Zeile angegeben. Dieses „Sequenzalignment“ wurde mit „Genedoc“ generiert (Nicholas *et al.*, 1997), farbig hinterlegte Aminosäuren sind zu 100 % (schwarz), mindestens 80 % (dunkelgrau) bzw. mindestens 60 % (hellgrau) ähnlich innerhalb des Alignments. Mit „+“ sind primäre und sekundäre Aminosäurereste der „I-site“ markiert. Das GGDEF-Motiv der „A-site“ sowie die beiden basischen Aminosäurereste, die bei der Bindung des β- und γ-Phosphats von GTP essentiell sind, wurden mit „*“ hervorgehoben.

2.1.4 Sensor- und Kinasedomäne sind essentiell für die Funktion von SgmT

Um die Funktion von SgmT näher zu eruieren, wurden zunächst Komplementationsplasmide (pTP24-28) mit Punktmutationen in den unterschiedlichen Domänen generiert: Durch gerichtete Mutagenese wurde das konservierte Histidin (H336) in der Kinasedomäne durch Alanin substituiert, der konservierte Aspartatrest (D615) in der Empfängerdomäne mit Asparagin ausgetauscht und die konservierten Aminosäuren der primären und sekundären I-site der GGDEF-Domäne (R763, D766 und R794) wurden jeweils durch Alanin ersetzt. Diese Plasmide wurden, wie in 4.3.5 beschrieben, hergestellt und in die „phage Mx8 *attB*-site“ von Δ *sgmT* (SA3502), wie in 4.3.7 beschrieben, integriert. Die resultierenden Mutantenstämme (SA3506-3510) wurden auf ihre S-Bewegungsfähigkeit hin untersucht (Abbildung 10A). Im Gegensatz zu SA3507 (Δ *sgmT/sgmT*^{D615N}) und den drei GGDEF-Mutanten (SA3508, SA3509 und SA3510), die wie SA3503 (Δ *sgmT/sgmT* +) einen Wildtyp-Phänotyp zeigen, konnte SA3506 (Δ *sgmT/sgmT*^{H336A}) den S-Bewegungsdefekt nicht komplementieren.

Abbildung 10B zeigt einen Immunblot mit SgmT-spezifischen Antikörpern (4.4.3), der mit unterschiedlichen Mutanten durchgeführt wurde. SgmT (92 kDa) ist dabei im Wildtyp (Spur 1), in der Komplementationsmutante und den einzelnen Punktmutanten (Spuren 3-8) detektierbar, die Negativkontrolle Δ *sgmT* (Spur 2) zeigt wie erwartet keine SgmT-Akkumulierung.

Als nächstes erfolgte die Herstellung von Komplementationsplasmiden (pTP39, pTP40 und pTP29), in denen jeweils die kodierende Sequenz einzelner oder mehrerer Domänen von SgmT deletiert wurde (4.3.5), sowie deren Integration in die „phage Mx8 *attB*-site“ von Δ *sgmT* (4.3.7). Die Δ GAF-Mutante (SA3512) zeigt einen S-Bewegungsdefekt, der mit Δ *sgmT* (SA3502) und der H336A-Kinase-Mutante (SA3506) vergleichbar ist (Abbildung 10A). Die Deletion der GGDEF-Domäne allein und die Doppel-Deletion von Empfänger- (REC) und GGDEF-Domäne haben keinen Einfluss auf die S-Bewegung der generierten Mutanten (SA3511 und SA3513) (Abbildung 10A). Die Akkumulierung der verkürzten SgmT-Proteine wurde mittels Immunblot-Analyse mit SgmT-spezifischen Antikörpern untersucht (Abbildung 10B Spuren 9-11).

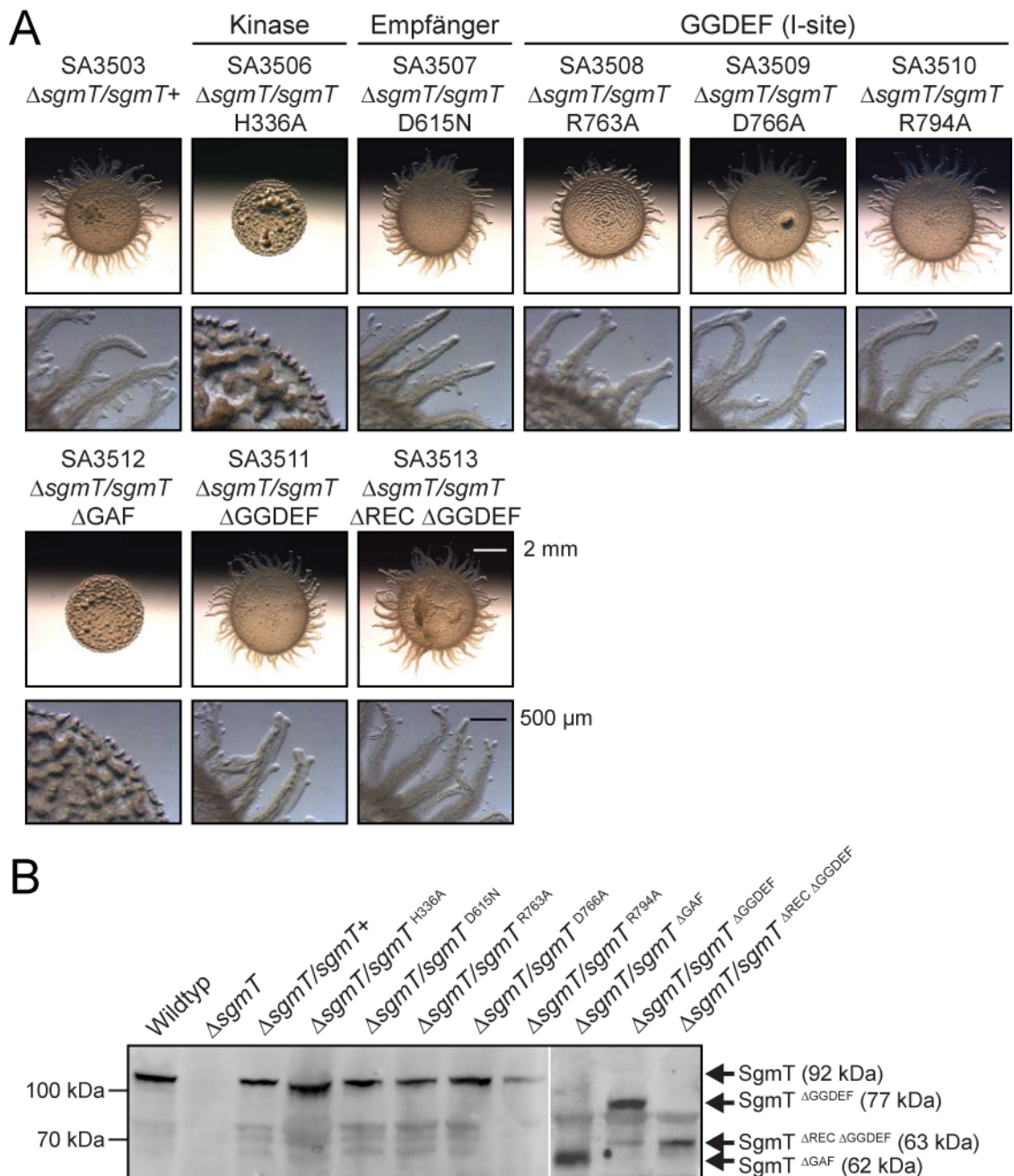


Abbildung 10: S-Bewegungsstudie und Immunblot der Punkt-/Domänen- und Deletionsmutanten von *sgmT*.

(A) S-Bewegungsstudie der unterschiedlichen SgmT-Mutanten auf 0,5 % Agar. Die Längenmaßstäbe betragen 2 mm (obere Zeile) bzw. 500 μm (untere Zeile). (B) Nachweis von SgmT durch Immunblot-Analysen mit SgmT-spezifischen Antikörpern von Lysaten gleicher Zellmengen (10^8 Zellen). Die Größenstandards des Proteinmarkers sind auf der linken Seite angegeben, die schwarzen Pfeile auf der rechten Seite kennzeichnen die unterschiedlichen Versionen von SgmT mit ihren theoretischen molekularen Massen.

Im Anschluß daran wurden die Domänen-Mutanten SA3511-SA3513 auf die Akkumulierung von EPS und FibA hin untersucht. SA3512 ($\Delta\text{sgmT}/\text{sgmT}^{\Delta\text{GAF}}$) zeigt eine vermehrte Akkumulierung von gebundenem Trypanblau, die um den Faktor 2,5 größer war als im Wildtyp und damit auf einen erhöhten

EPS-Anteil in der Mutante hinweist (Abbildung 11A). Der akkumulierte Anteil von Trypanblau in SA3511 ($\Delta sgmT/sgmT^{\Delta GGDEF}$) und SA3513 ($\Delta sgmT/sgmT^{\Delta REC \Delta GGDEF}$) ist vergleichbar mit dem des Wildtyps. Auch die Akkumulation von FibA ist, nach dem Ergebnis des Immunblots, in SA3511 und SA3513 vergleichbar mit der FibA-Konzentration im Wildtyp (Abbildung 11B). In SA3512 ($\Delta sgmT/sgmT^{\Delta GAF}$) hingegen ist FibA weniger stark detektierbar als im Wildtyp.

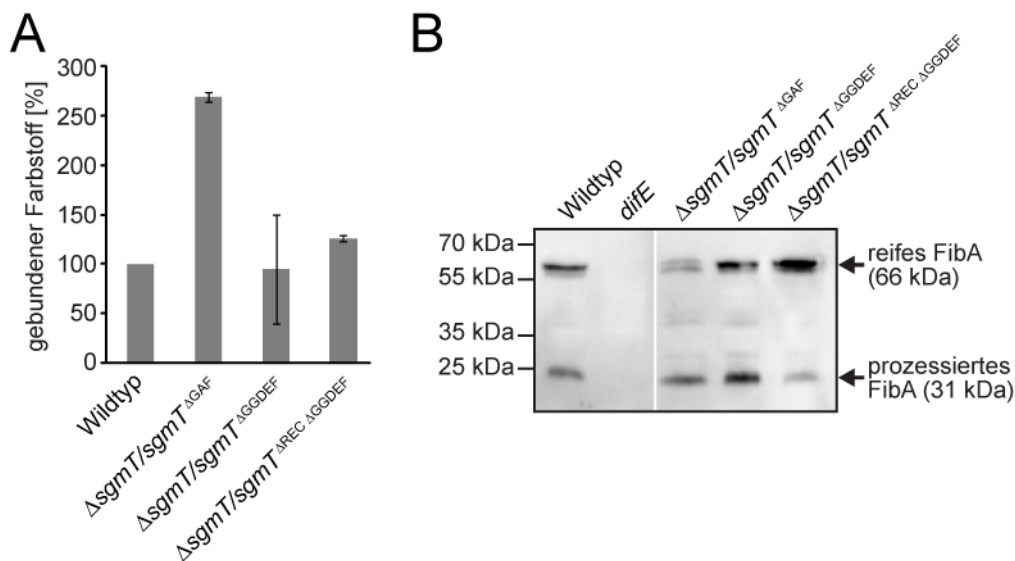


Abbildung 11: EPS-Quantifizierung und FibA-Immunblot Analyse in *sgmT*-Mutanten.

(A). Quantifizierung von gebundenem Farbstoff an *M. xanthus*-Stämmen durch kolorimetrische Analysen. Die Menge an gebundenem Trypanblau wurde in Wildtypzellen auf 100 % normalisiert. Die Standardabweichung der Messergebnisse ist in schwarzen Balken dargestellt. (B) Nachweis von FibA durch Immunblot Analyse mit spezifischen Antikörpern (MAb2105). Die reife (66 kDa) und die prozessierte (31 kDa) Form von FibA wurden mit schwarzen Pfeilen markiert. Die Größenstandards des Proteinmarkers sind auf der linken Seite angegeben.

Letztlich wurden die generierten *sgmT*-Mutanten in Studien auf ihre Entwicklungsfähigkeit hin untersucht, die wie in 4.2.5 beschrieben durchgeführt wurden. Abbildung 12 zeigt die Entwicklungstudie nach 24 h und 120 h auf TPM-Agar. DK1622 aggregiert bei Nährstoffknappheit zu Fruchtkörpern, in denen sich die Zellen zu Myxosporen differenzieren. Schon nach 24 h ist diese Fruchtkörperentwicklung zu beobachten. Ähnlich wie der Kontrollstamm DK11063 (*fruA*), der einen Defekt in der Fruchtkörperbildung aufweist, zeigen die Mutanten SA3502 ($\Delta sgmT$), SA3506 ($\Delta sgmT/sgmT^{H336A}$) und SA3512 ($\Delta sgmT/sgmT^{\Delta GAF}$) keine Fruchtkörperbildung nach 24 h im Hungerzustand, selbst nach 120 h werden keine Fruchtkörper gebildet. Dieser starke Entwicklungsdefekt der Mutanten ist vermutlich auf die fehlende S-Bewegung, die für

eine korrekte Fruchtkörperbildung notwendig ist (Yang *et al.*, 1998, Bellenger *et al.*, 2002), zurückzuführen. *sgmT*-Mutanten, die keinen S-Bewegungsdefekt aufweisen (SA3503, SA3507-11 und SA3513), aggregieren hingegen ähnlich wie der Wildtyp zu Fruchtkörpern (Abbildung 12). Alle getesteten Mutanten zeigen den beschriebenen Entwicklungsphänotyp, unabhängig davon, ob die Studien auf TPM-Agar, auf CF-Agar oder in MC7-Puffer durchgeführt wurden.

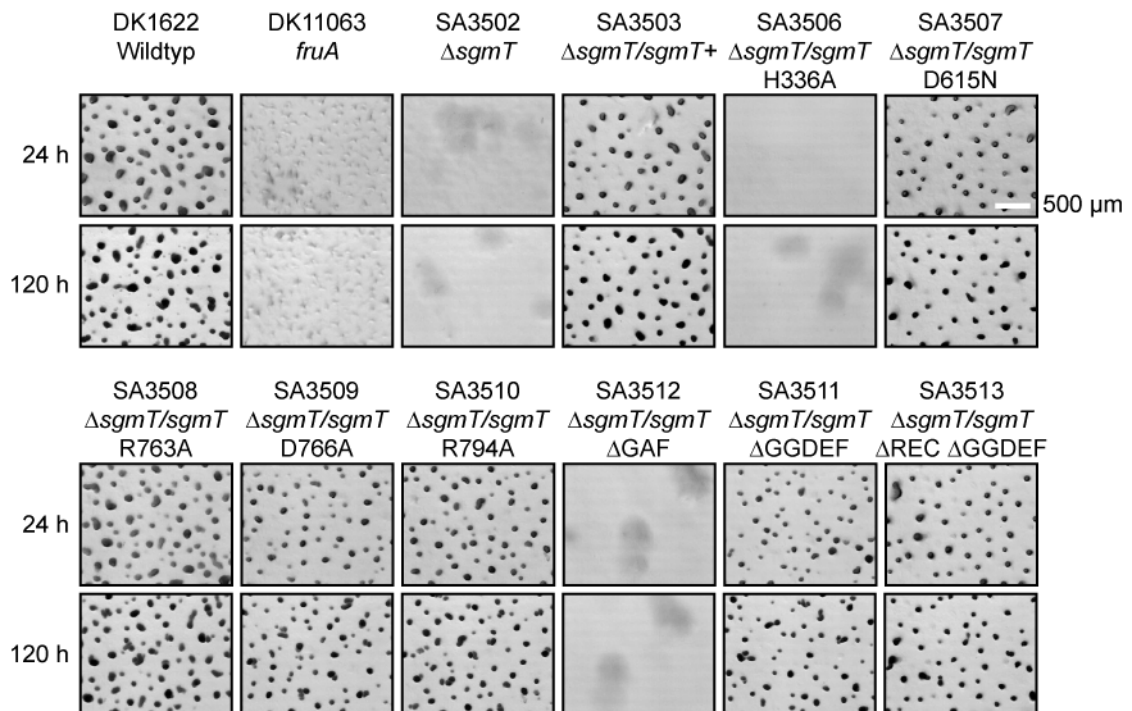


Abbildung 12: Entwicklungsstudie der *sgmT*-Mutanten auf TPM-Agar.

Entwicklungsstudie der *SgmT*-Mutanten im Vergleich mit den Kontrollstämmen DK1622 (Wildtyp) und DK11063 (*fruA*) nach 24 h und 120 h auf TPM-Agar. Der Längenstandard beträgt 500 µm.

Zusammenfassend deuten die bisher gezeigten Daten darauf hin, dass *SgmT* primär an der Regulation der S-Bewegung beteiligt ist und dass dafür die sensorische GAF-Domäne sowie die Kinasedomäne essentiell sind. Die Empfänger- und die GGDEF-Domäne scheinen dagegen für die Funktion von *SgmT* unter den getesteten Bedingungen eine untergeordnete Rolle zu spielen, da eine Deletion beider Domänen (SA3513) keinen Einfluss auf die S-Bewegung und die Entwicklung der Zellen zeigt.

2.1.5 SgmT bindet c-di-GMP in der I-site der GGDEF-Domäne

Unter den bisher getesteten Bedingungen konnte kein Unterschied zwischen Zellen von Wildtyp (DK1622) und SA3511 ($\Delta\text{sgmT}/\text{sgmT}^{\Delta\text{GGDEF}}$) bzw. SA3513 ($\Delta\text{sgmT}/\text{sgmT}^{\Delta\text{REC } \Delta\text{GGDEF}}$) *in vivo* festgestellt werden. Die hohe Konservierung von SgmT innerhalb der Myxococcales (Abbildung 8A) deutet darauf hin, dass alle Domänen eine wichtige Funktion besitzen. Im folgenden Absatz werden Untersuchungen bezüglich der GGDEF-Domäne beschrieben.

Um die spezifische c-di-GMP-Bindung von SgmT *in vitro* zu testen, wurden unterschiedliche SgmT-Varianten benötigt. Die Expressionsplasmide pTP33, pTP51, pTP59, pTP60 und pTP62 wurden, wie in 4.3.5 beschrieben, hergestellt und kodieren für natives SgmT bzw. einzelne SgmT-Domänen sowie eine GGDEF-Mutante $\text{SgmT}^{\text{GGDEF } R763A}$, die mit einem N-terminalen Hexa-Histidin-Peptid fusioniert wurden. Nach der Transformation der Expressionsplasmide in *E. coli* (4.3.6), erfolgte die Herstellung und Reinigung der Proteine, wie in 4.4.1 beschrieben.

Mit den gereinigten Proteinen erfolgte der Nachweis der spezifischen c-di-GMP-Bindung mittels Affinitätschromatographie, die in 4.4.7 detailliert beschrieben wird. In diesem Experiment wurden 5 μM einer Komponente (cdG-CC) eingesetzt, an die c-di-GMP gekoppelt ist. cdG-CC verfügt über eine reaktive Gruppe zur UV-Quervernetzung von Proteinen sowie eine Biotinmarkierung zur gezielten Isolierung. Nach der Bindung an cdG-CC wurden die quervernetzten Proteine über die Biotinmarkierung des cdG-CC mit Streptavidin-beschichteten Magnetkügelchen isoliert, über SDS-PAGE getrennt und mit SgmT-spezifischen Antikörpern identifiziert.

Abbildung 13 zeigt, dass die GGDEF-Domäne von SgmT an cdG-CC bindet. Durch die Zugabe von löslichem c-di-GMP konnte die Bindung von SgmT an cdG-CC verhindert werden, während die Zugabe von löslichem GTP keinen Einfluss auf die Bindung an cdG-CC hatte. Die gleiche Beobachtung kann auch mit der gereinigten GGDEF-Domäne ($\text{SgmT}^{\text{GGDEF}}$) gemacht werden. Die Mutante der GGDEF-Domäne ($\text{SgmT}^{\text{GGDEF } R763A}$), in der das konservierte Arginin der I-site mit Alanin substituiert und damit das konservierte Motiv (RxxD) zerstört wurde, kann wie erwartet nicht an cdG-CC binden. Die gereinigte GAF-Domäne (SgmT^{GAF}) wurde generell schlecht von den SgmT-Antikörpern

erkannt. Jedoch sind die Mengen an detektierbarem und damit an cdG-CC-gebundenem Protein vergleichbar, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von c-di-GMP bzw. GTP. Deshalb ist zu vermuten, dass die GAF-Domäne kein c-di-GMP binden kann. Wie erwartet konnte die Kinasedomäne von SgmT (SgmT^{Kinase}) nicht an cdG-CC binden.

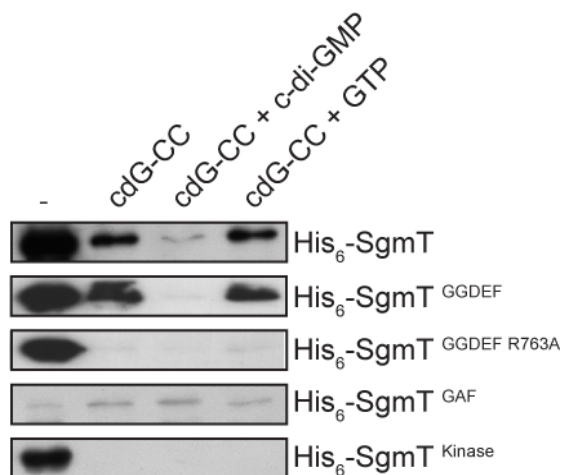


Abbildung 13: Nachweis der spezifischen c-di-GMP-Bindung von SgmT.

Die Proteine (0,5 µM) wurden mit cdG-CC (5 µM) und in Ab- bzw. Anwesenheit von c-di-GMP bzw. GTP (500 µM) isoliert, mittels SDS-PAGE getrennt und mit SgmT-spezifischen Antikörpern in Immunblot-Analysen identifiziert. In der mit „-“ markierten Spur wurden die unbehandelten Proteine in äquimolaren Mengen (0,5 µM) aufgetragen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass c-di-GMP von SgmT über die GGDEF-Domäne *in vitro* gebunden werden kann. Dies lässt vermuten, dass die GGDEF-Domäne *in vivo* eine ähnliche Funktion besitzt.

2.1.6 Die zelluläre Lokalisierung von SgmT ist c-di-GMP-abhängig

In Kapitel 2.1.5 konnte gezeigt werden, dass SgmT c-di-GMP über die I-site der GGDEF-Domäne binden kann und vermutlich als c-di-GMP-Rezeptor dient. Solche c-di-GMP-Rezeptorproteine besitzen unterschiedliche Funktionen, z. B. können sie für die zelluläre Lokalisierung des Proteins essentiell sein (Duerig *et al.*, 2009).

Im nachfolgenden Kapitel wurde die Rolle der GGDEF-Domäne auf die zelluläre Lokalisierung von SgmT untersucht. Dafür wurden die Plasmide pTP41, pTP44 und pTP46 wie in 4.3.5 beschrieben konstruiert, die für eine C-terminale Fusion des gelb-fluoreszierenden Protein „YFP“ („yellow fluorescent protein“) mit Varianten von SgmT kodieren. Die Plasmide wurden in die „phage Mx8 *attB*-site“ von Δ *sgmT* (SA3502) integriert (4.3.7) und die erhaltenden Mutanten zunächst auf die Komplementation des S-Bewegungsdefekts hin

untersucht. Damit soll überprüft werden, ob die generierten SgmT-YFP-Fusionsproteine die Funktion von nativem SgmT übernehmen können.

In Abbildung 14A ist eine S-Bewegungsstudie der SgmT-YFP-Fusionsmutanten dargestellt: SA3504 (*sgmT-yfp*), SA3529 (*sgmT^{ΔGGDEF}-yfp*) und SA3534 (*sgmT^{R763A}-yfp*) komplementieren den S-Bewegungsdefekt des Elternstammes SA3502 (Δ *sgmT*). Dies deutet darauf hin, dass die SgmT-YFP-Fusionsproteine aktiv sind und deren Produktion nicht gestört wird.

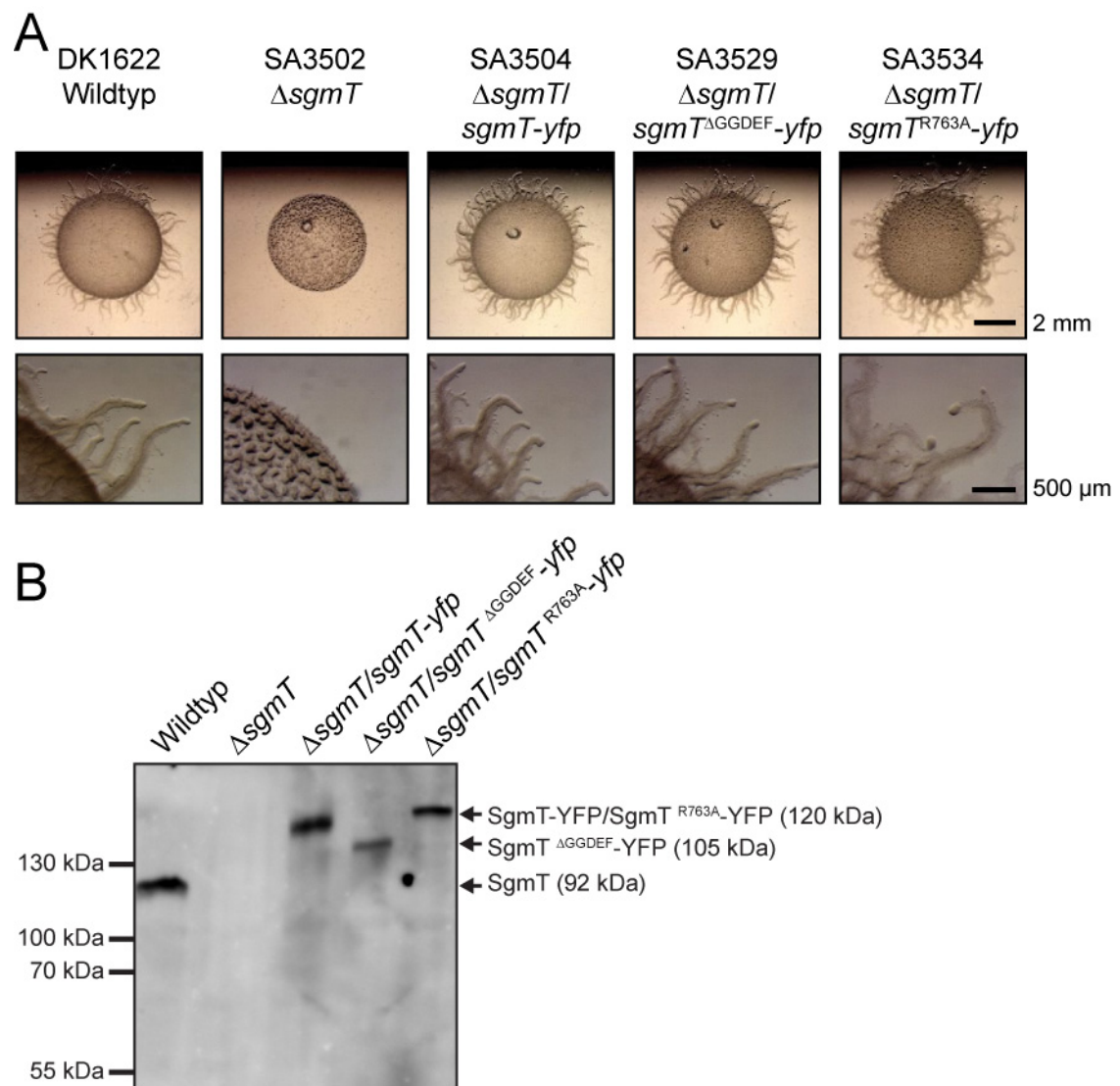


Abbildung 14: S-Bewegungsstudie und Immunblot Analysen der SgmT-YFP-Fusionsmutanten.

(A) S-Bewegungsstudie der SgmT-YFP-Fusionsmutanten. Längenstandards betragen 2 mm (obere Zeile) bzw. 500 μm (untere Zeile). (B) Nachweis von SgmT durch Immunblot-Analysen mit SgmT-spezifischen Antikörpern. Die Größenstandards des Proteinmarkers sind auf der linken Seite angegeben, die schwarzen Pfeile auf der rechten Seite kennzeichnen die unterschiedlichen Versionen von SgmT mit ihren errechneten molekularen Massen.

Um die SgmT-YFP-Fusionsproteine zu detektieren und deren proteolytische Spaltung auszuschließen, wurde ein Immunblot mit SgmT-spezifischen Antikörpern von Zelllysaten der SgmT-YFP-Fusionsmutanten angefertigt (4.4.3), der in Abbildung 14B dargestellt ist. Natives SgmT hat eine errechnete molekulare Masse von 92 kDa. Im Immunblot wird diese Proteinbande bei über 100 kDa detektiert. Die errechnete molekulare Masse von SgmT-YFP bzw. SgmT^{R763A}-YFP liegt bei 120 kDa, die von SgmT^{ΔGGDEF}-YFP bei 105 kDa. Alle drei Fusionsproteine wurden als einzelne Proteinbande im Immunblot detektiert. Mögliche Spalt- bzw. Abbauprodukte der SgmT-YFP-Fusionsproteine wurden nicht identifiziert. Ein Immunblot mit Antikörpern gegen das grün-fluoreszierende Protein „GFP“ („green fluorescent protein“) (4.4.3) und lieferte ein vergleichbares Ergebnis (nicht dargestellt). Demnach sind die drei SgmT-YFP-Fusionsproteine aktiv und YFP wird nicht abgespalten.

Als nächstes folgte die mikroskopische Untersuchung der Zellen, wie in 4.5.1 beschrieben. In Abbildung 15A sind die charakteristischen Lokalisierungstypen der drei YFP-Fusionsmutanten mit jeweils zwei typischen Zellen dargestellt.

Demnach lokalisiert SgmT-YFP (SA3504) hauptsächlich in einem oder zwei nicht-polaren Clustern innerhalb der Zelle. Bei der Mehrheit der Zellen von SA3504 ($\Delta\text{sgmT}/\text{sgmT}\text{-yfp}$) liegt SgmT-YFP in einem Cluster (58 %) bzw. in zwei Clustern (25 %) vor (Abbildung 15B). Bei 12 % der Zellen ist eine diffuse Lokalisierung von SgmT-YFP zu beobachten, während bei 5 % der Zellen SgmT-YFP in mehr als zwei Clustern lokalisiert ist. Abbildung 15C zeigt die Positionen der YFP-Cluster in Abhängigkeit zur Zelllänge in SA3504 ($\Delta\text{sgmT}/\text{sgmT}\text{-yfp}$). Die dafür verwendeten Daten beinhalten ausschließlich Zellen mit diffusem SgmT-YFP-Signal oder Zellen, in denen SgmT-YFP in einem oder zwei Clustern vorliegt. Diese Daten zeigen deutlich, dass das Auftreten eines bestimmten Lokalisierungstyps unabhängig von der Zelllänge ist. In Zellen von 3-4 μm Länge treten beispielsweise sowohl eine diffuse Lokalisierung als auch eine Lokalisierung in einem oder zwei Clustern auf. In etwas längeren Zellen von 5-7 μm sind diese drei Lokalisierungsformen ebenso erkennbar. Berechnet man die durchschnittliche Lokalisierungsposition von SgmT-YFP in Zellen mit einem Cluster so befindet sich dieses Cluster bei

37,7 % \pm 8,8 %, wobei 50 % die Zellmitte darstellt. In Zellen mit zwei Clustern lokalisiert SgmT-YFP bei 33,3 % \pm 9,1 % und 61,0 % \pm 10,4 %. Zusammenfassend bedeutet dies, dass SgmT-YFP in den nicht-polaren Bereichen der Zelle lokalisiert.

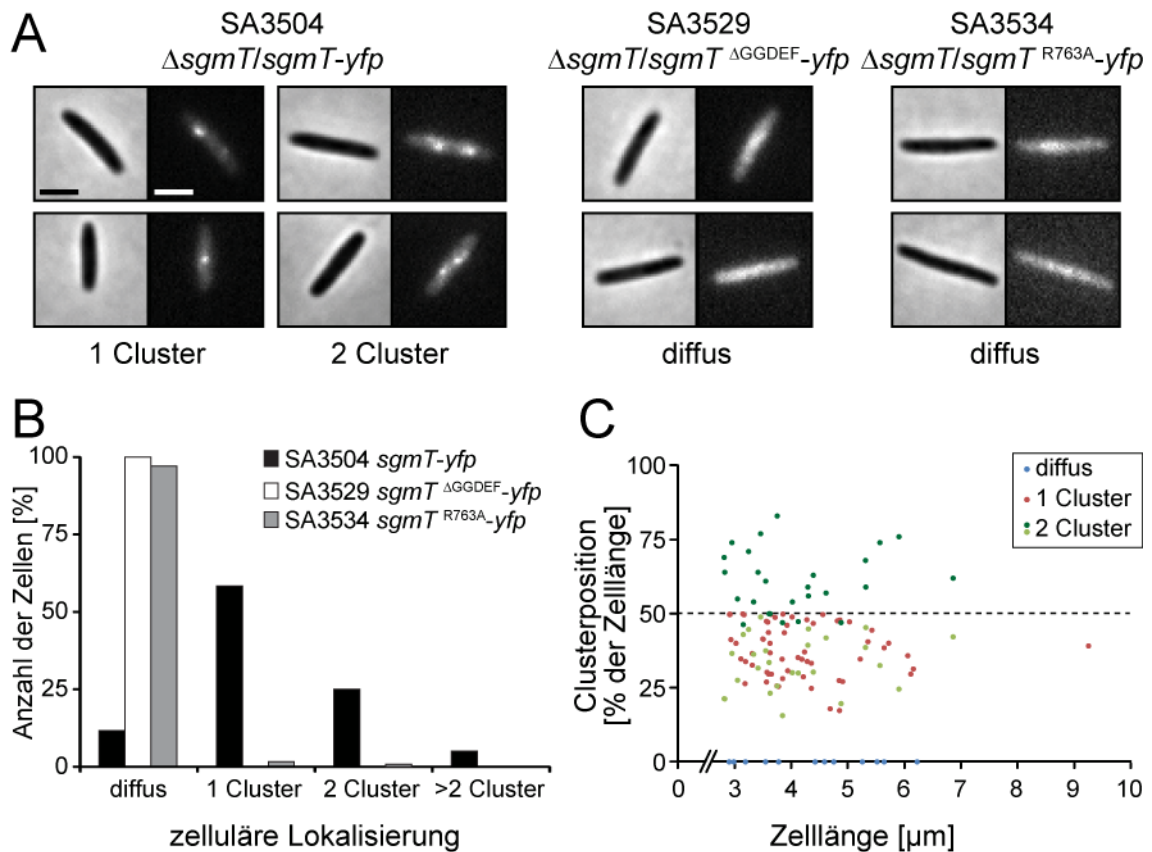


Abbildung 15: Zelluläre Lokalisierung von SgmT-YFP.

(A) Mikroskopische Aufnahmen der SgmT-YFP-Fusionsmutanten. Jeweils links Phasenkontrast- und jeweils rechts Fluoreszenzmikroskopie. Dargestellt sind charakteristische Lokalisierungstypen mit jeweils zwei typischen Zellen. Die Längenstandards sind als schwarze bzw. weiße Balken oben links dargestellt und betragen jeweils 2 μ m. (B) Das Säulendiagramm zeigt die zelluläre Lokalisierung der SgmT-YFP-Proteine innerhalb einer Zellpopulation. Unterschieden wurde zwischen Zellen mit diffusem YFP-Signal und Zellen mit einem, zwei oder mehreren Clustern. Es wurden jeweils mindestens 100 Zellen für die quantitative Auswertung berücksichtigt. SA3504 (Δ sgmT/sgmT-yfp) ist in schwarz, SA3529 (Δ sgmT/sgmT^{AGGDEF}-yfp) in weiß und SA3534 (Δ sgmT/sgmT^{R763A}-yfp) in grau dargestellt. (C) Dieses Diagramm zeigt die Abhängigkeit zwischen der Zelllänge und der Position des SgmT-YFP-Clusters in der Zelle von SA3504 (Δ sgmT/sgmT-yfp). Blaue Punkte repräsentieren Zellen mit einem diffusem YFP-Signal (12 %), jeweils als 0 % der Zelllänge definiert. Rote Punkte Zellen mit einem YFP-Cluster (58 %) und grüne Punkte Zellen mit zwei YFP-Clustern (25 %). Die gestrichelte Linie markiert die Zellmitte. Zellen, die mehr als zwei YFP-Cluster aufzeigten (5 %) wurden in dieser Analyse nicht berücksichtigt.

Die Deletion der GGDEF-Domäne bzw. die Substitution des konservierten Arginin in der I-site durch Alanin (R763A) hat einen starken Effekt auf die Lokalisierung von SgmT. SA3529 ($\Delta\text{sgmT}/\text{sgmT}^{\Delta\text{GGDEF}}\text{-yfp}$) und SA3534 ($\Delta\text{sgmT}/\text{sgmT}^{\text{R763A}}\text{-yfp}$) zeigen ausschließlich eine diffuse Lokalisierung von SgmT^{ΔGGDEF}-YFP bzw. SgmT^{R763A}-YFP (Abbildung 15A). In SA3534 ($\Delta\text{sgmT}/\text{sgmT}^{\text{R763A}}\text{-yfp}$) zeigen 97 % der Zellen eine diffuse Lokalisierung von SgmT^{R763A}-YFP. Nur vereinzelt ist eine Lokalisierung von SgmT^{R763A}-YFP in einem (2 %) bzw. zwei Clustern (1 %) zu beobachten (Abbildung 15B). In SA3529 ($\Delta\text{sgmT}/\text{sgmT}^{\Delta\text{GGDEF}}\text{-yfp}$) lokalisiert SgmT^{ΔGGDEF}-YFP ausschließlich diffus (Abbildung 15B).

Die Ergebnisse der Lokalisierungsstudien der SgmT-YFP-Fusionsmutanten geben einen starken Hinweis darauf, dass die zelluläre Lokalisierung von SgmT c-di-GMP-abhängig ist.

2.1.7 Die zelluläre Lokalisierung von SgmT ist statisch

Die Lokalisierung verschiedener Bewegungsproteine kann während der Fortbewegung einer Zelle statisch oder dynamisch sein (Leonardy *et al.*, 2008). Während eines Richtungswechsels ändern einige Proteine ihre zelluläre Lokalisierung, beispielsweise bewegt sich PilB dabei vom alten vorderen Zellpol zum neuen vorderen Zellpol (Bulyha *et al.*, 2009). Wie in 2.1.6 beschrieben lokalisiert SgmT hauptsächlich in einem oder zwei Clustern in nicht-polaren Zellregionen. Die Daten dieser Lokalisierungsstudien basieren auf quantitativen Analysen von Zellaufnahmen zu einem fixen Zeitpunkt. Um die Lokalisierung von SgmT während der Fortbewegung zu studieren wurden Zeitrafferaufnahmen, wie in 4.5.1 beschrieben, angefertigt. In Abbildung 16 ist exemplarisch eine Zelle von SA3504 ($\Delta\text{sgmT}/\text{sgmT}\text{-yfp}$) mit einem SgmT-YFP-Cluster während der Fortbewegung dargestellt. Dabei lokalisiert SgmT-YFP über den dokumentierten Zeitraum von 14,5 min an derselben Position innerhalb der Zelle, selbst nach dem Richtungswechsel zum Zeitpunkt 09:30 min. SgmT zeigt somit eine statische Lokalisierung während der Fortbewegung der Zelle.

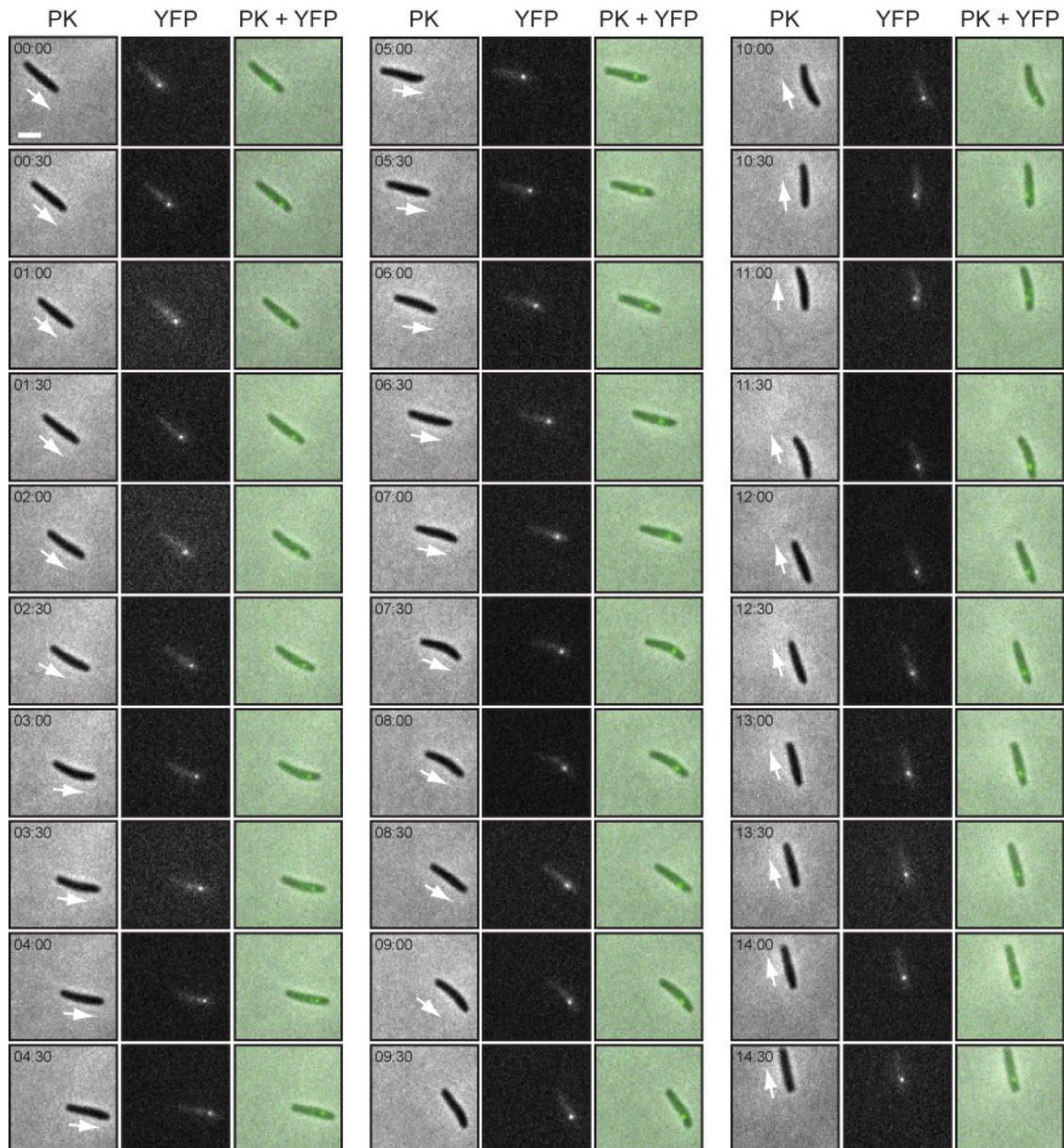


Abbildung 16: Lokalisierung von SgmT-YFP während der Zellbewegung.

Dargestellt sind Zeitrafferaufnahmen einer sich bewegenden Zelle des Stammes SA3504 (Δ *sgmT*/*sgmT-yfp*) mit einem SgmT-YFP-Cluster. Die Phasenkontrast- (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (YFP) sowie deren Überlagerung (PK + YFP) sind entsprechend gekennzeichnet, die entsprechenden Zeitpunkte (min:s) sind in der linken oberen Ecke (PK) angezeigt und die weißen Pfeile zeigen die Bewegungsrichtung der Zelle an. Der weiße Längenstandard im linken oberen Bild beträgt 2 μ m.

2.2 Identifizierung des SgmT-zugehörigen Antwortregulators

Die Zielsetzung im zweiten Teil dieser Arbeit war die Identifizierung des zugehörigen Antwortregulators (RR) von SgmT. Nach der Charakterisierung von SgmT (2.1) sollte der RR von SgmT folgende Kriterien erfüllen: 1.) Das Gen lokalisiert im genetischen Kontext wie *sgmT* „verwaist“ und 2.) eine Mutante zeigt einen S-Bewegungsdefekt und damit einen vergleichbaren Phänotyp zu SA3502 (Δ *sgmT*).

In der Literatur werden „verwaiste“ RR wie zum Beispiel RomR, FrzS und DigR beschrieben, die essentiell für die Bewegung von *M. xanthus* sind (Leonardy *et al.*, 2007, Ward *et al.*, 2000, Overgaard *et al.*, 2006). Während RomR eine bisher unbekannte Rolle in der A-Bewegung und der Zellumkehr spielt (Leonardy *et al.*, 2007), ist FrzS ein wichtiger Bestandteil eines funktionellen S-Bewegungssystems (Ward *et al.*, 2000). Neueste Studien zeigen, dass der S-Bewegungsdefekt von Δ *frzS* auf einer reduzierten Akkumulierung von EPS in der ECM beruht (Berleman *et al.*, 2011). DigR wurde in vorhergehenden Studien in der Arbeitsgruppe von Prof. Søgaard-Andersen am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg untersucht. Die Δ *digR*-Mutante SA1804 ähnelt stark dem Phänotypen von SA3502 (Δ *sgmT*): SA1804 zeigt einen S-Bewegungsdefekt, eine vermehrte Akkumulierung von EPS und eine reduzierte Anhäufung des vorherrschenden ECM-Proteins FibA (Overgaard *et al.*, 2006). Mit diesen phänotypischen Ähnlichkeiten zu SA3502 (Δ *sgmT*) erfüllt DigR eine der zuvor aufgestellten Kriterien des zu identifizierenden RR zu SgmT.

2.2.1 *digR* ist konserviert in den Myxococcales und lokalisiert „verwaist“

DigR besteht aus 197 aa, die in einer N-terminalen Empfängerdomäne und einer C-terminalen DNA-Bindedomäne der Xre-Familie organisiert sind (Overgaard *et al.*, 2006). Ähnlich wie *sgmT* ist *digR* und dessen genetischer Kontext innerhalb der Myxococcales hochkonserviert (Abbildung 17).

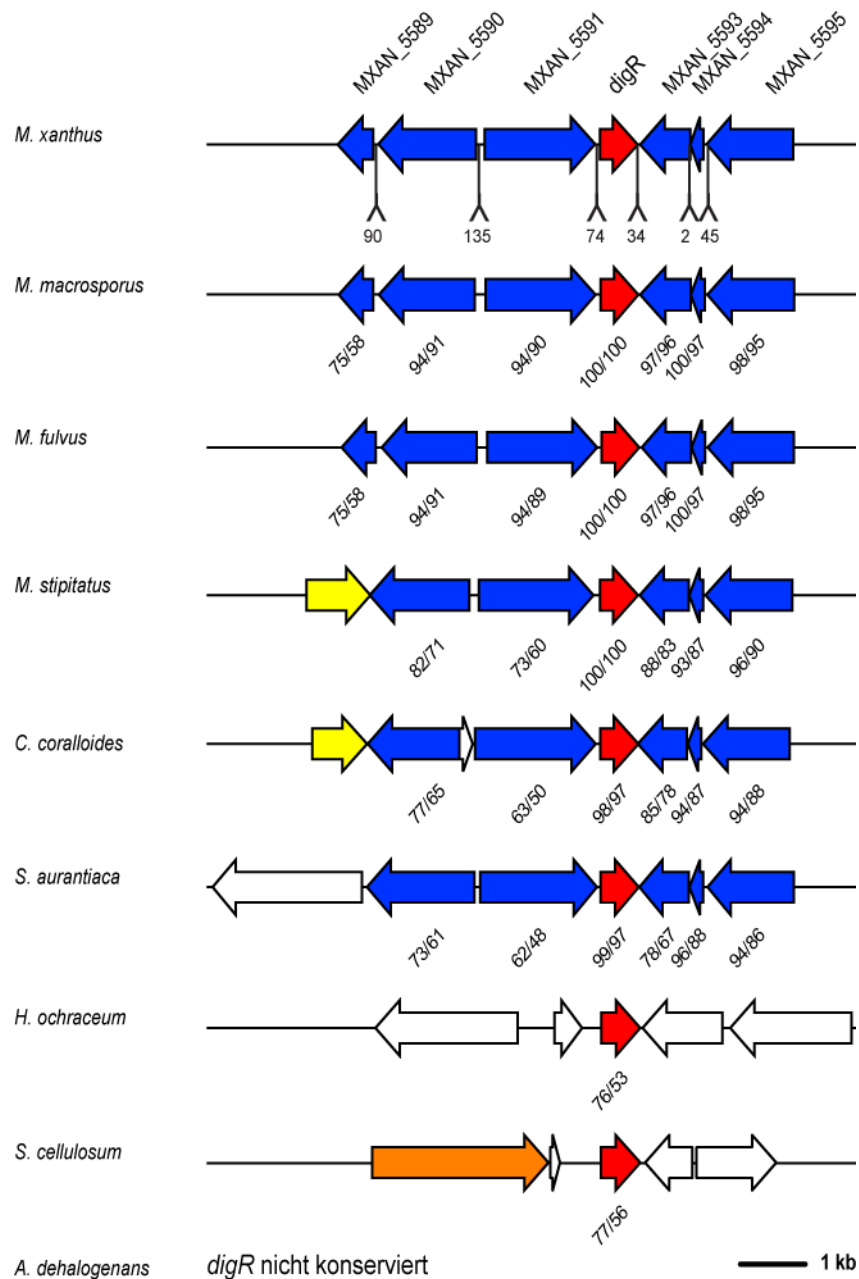


Abbildung 17: Konservierung des genetischen Kontexts von *digR*

Dargestellt ist der genetische Kontext von *digR* in *M. xanthus* und dessen Konservierung in anderen Myxococcales-Spezies (*M. macrosporus*, *M. fulvus*, *M. stipitatus*, *C. coralloides*, *S. aurantiaca*, *H. ochraceum* und *S. cellulorum*). Die roten Pfeile repräsentieren *digR* bzw. dessen Homologe, blaue Pfeile kennzeichnen hochkonservierte Gene, gelbe Pfeile symbolisieren minder konservierte Gene, während weiße Pfeile Gene darstellen, die nicht im *digR* Kontext von *M. xanthus* auftreten. Der orange-farbene Pfeil stellt eine Histidinkinase dar. Der Abstand der Gene (in bp) zueinander ist unter der Grafik von *M. xanthus* angegeben. Schräggestellte Zahlen unter den Grafiken der Myxococcales Spezies geben die prozentuale Ähnlichkeit/Gleichheit der jeweiligen Proteinsequenzen zu *M. xanthus* an. Die Darstellung der Loci ist maßstabsgetreu (Längenstandard = 1 kb).

In den vier *Myxococcus*-Spezies (*M. xanthus*, *M. macrosporus*, *M. fulvus* und *M. stipitatus*) sind die Proteinsequenzen von DigR zu 100 % identisch, die Proteinsequenzen von *C. coralloides* und *S. aurantiaca* haben jeweils 97 % Identität und 98 % bzw. 99 % Ähnlichkeit mit der Sequenz von *M. xanthus*. In *A. dehalogenans* hingegen liegt *digR* nicht konserviert vor. Der gesamte *digR*-Locus ist in diesen sechs Spezies stark konserviert. In *H. ochraceum* und *S. cellulosum* zeigen die flankierenden Gene von *digR* keine Homologien zu den entsprechenden Genen in den anderen Myxococcales-Spezies. DigR von *H. ochraceum* und *S. cellulosum* ist im Vergleich zu *M. xanthus* zu 53 % bzw. 56 % identisch und zu 76 % bzw. 77 % ähnlich. Diese hohe Konservierung von DigR lässt auf eine dominante Rolle innerhalb der Myxococcales schließen.

In *M. xanthus* sowie sechs weiteren Spezies der Myxococcales liegt *digR* „verwaist“ ohne korrespondierende HK im genetischen Kontext vor. Nur in *Sorangium cellulosum* lokalisiert eine Hybrid-HK in unmittelbarer Nähe von *digR*, die für eine mögliche Partner-HK von DigR kodiert. In *S. cellulosum* liegt SgmT nicht konserviert vor, die identifizierte Hybrid-HK „upstream“ von *digR* zeigt allerdings Ähnlichkeiten in der Domänenstruktur zu SgmT. Neben zwei N-terminalen PAS/PAC Domänen findet man wie in SgmT von *M. xanthus* eine sensorische GAF-Domäne, eine Kinasedomäne und eine Empfängerdomäne.

Die Beobachtung, dass *digR* in SgmT-enthaltenden Myxococcales „verwaist“ vorliegt, erfüllt ein weiteres aufgestelltes Kriterium (2.2) des zu identifizierenden RR. Dies ist ein zweiter Hinweis darauf, dass DigR der korrespondierende RR für SgmT sein könnte.

2.2.2 Δ sgmT und Δ digR zeigen identische Phänotypen

Falls DigR der zugehörige RR von SgmT ist, sollten sich die einzelnen Deletionsmutanten SA3502 (Δ sgmT) und SA1804 (Δ digR) sowie eine Δ digR Δ sgmT Doppelmutante phänotypisch gleichen. Die Δ digR Δ sgmT Doppelmutante (SA3515) wurde durch die Deletion von *sgmT* in SA1804 (Δ digR) generiert, wobei die Durchführung analog zu 4.3.8 erfolgte. Anschließend wurden SA3502 (Δ sgmT), SA1804 (Δ digR) und SA3515 (Δ digR Δ sgmT) auf phänotypische Ähnlichkeit hin untersucht.

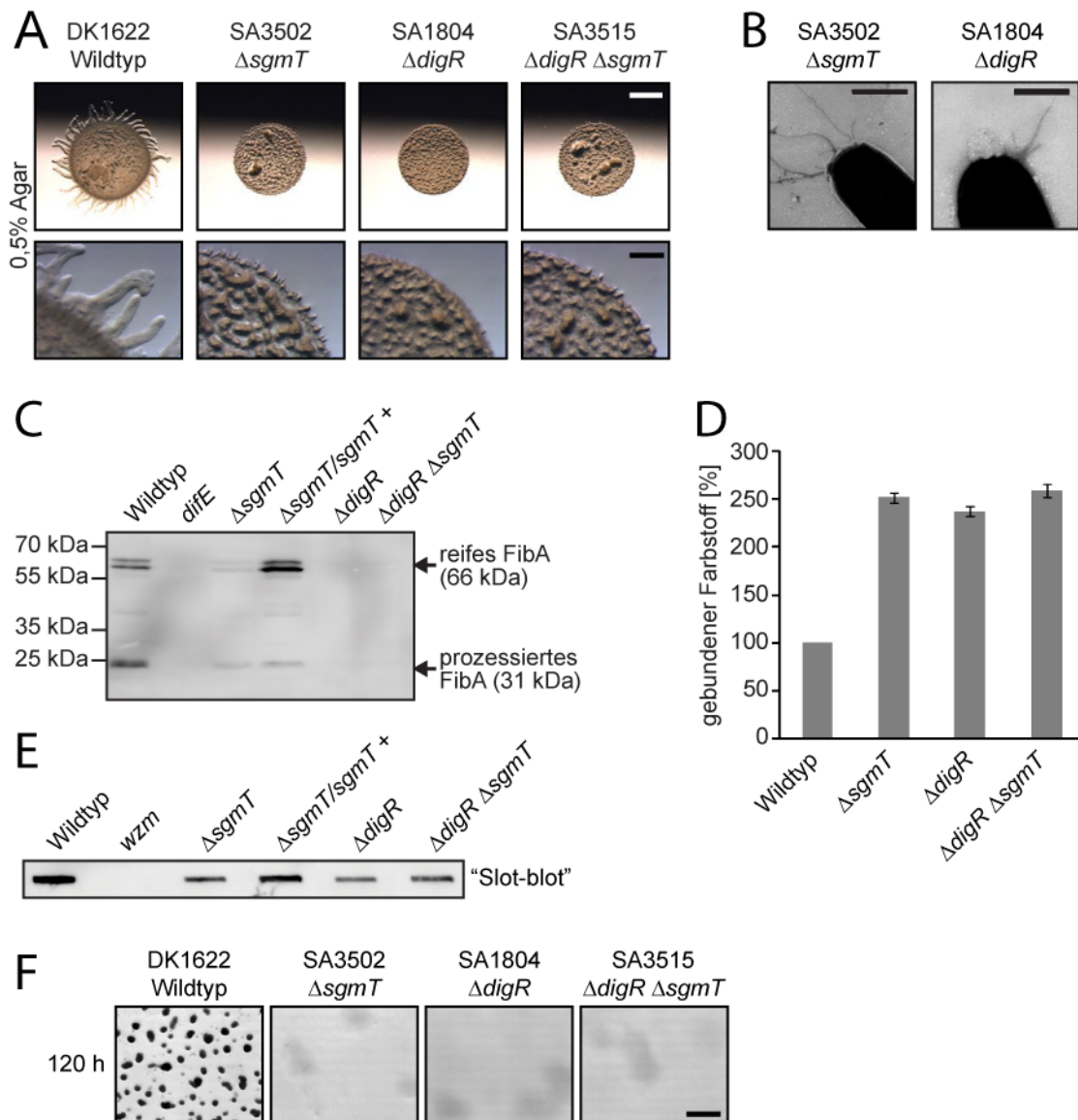


Abbildung 18: Phänotypischer Vergleich der Deletionsmutanten Δ sgmT und Δ digR.

Die teilweise Darstellung von bereits gezeigten Daten aus vorherigen Abbildungen (Abbildung 4-7 und Abbildung 12) dient der Übersicht dieses Vergleichs. **(A)** S-Bewegungsanalyse auf 0,5 % Agar von SA3502, SA1804 und SA3515 im Vergleich mit Wildtyp. Die Längenmaßstäbe betragen 2 mm (oben) bzw. 500 μ m (unten). **(B)** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der pilierten Zellpole von SA3502 und SA1804. Die Längenmaßstäbe betragen jeweils 0,5 μ m. **(C)** Nachweis von FibA durch Immunblot Analyse mit spezifischen Antikörpern (Mab2105). Die reife (66 kDa) und die prozessierte (31 kDa) Form von FibA wurden mit schwarzen Pfeilen kenntlich gemacht. Die Größenstandards des Proteinmarkers sind auf der linken Seite angegeben. Die Probenbehandlung erfolgte wie in Abbildung 6. **(D)** Quantifizierung des gebundenen Farbstoffs an *M. xanthus* durch kolorimetrische Analysen. Der Anteil an gebundenem Trypanblau in Wildtypzellen wurde auf 100 % normalisiert und für SA3502, SA1804 und SA3515 entsprechend berechnet. Die Standardabweichung der Messergebnisse ist in schwarzen Balken dargestellt. **(E)** Im „Slot-blot“ mit spezifischen Antikörpern (Mab783) gegen das LPS O-Antigen wurden die Zellen auf dessen Vorhandensein hin untersucht. Die Probenbehandlung erfolgte wie in Abbildung 7. **(F)** Entwicklungsstudie von SA3502, SA1804 und SA3515 nach 120 h auf TPM-Agar, der Längenmaßstab beträgt 500 μ m.

In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der phänotypischen Untersuchungen zusammengefasst. Wenn man die Morphologie der Kolonien in der S-Bewegungsstudie miteinander vergleicht (Abbildung 18A), so zeigen die beiden Deletionsmutanten SA3502 ($\Delta sgmT$) und SA1804 ($\Delta digR$) sowie die Doppelmutante SA3515 ($\Delta digR \Delta sgmT$) denselben erwarteten S-Bewegungsdefekt. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen konnte ein Defekt im T4P-Aufbau von SA3502 ($\Delta sgmT$) und SA1804 ($\Delta digR$) ausgeschlossen werden, da beide Mutanten nachweislich unipolare T4P zeigen (Abbildung 18B). Zur Zeit der Durchführung dieses Experiments war die Doppelmutante SA3515 noch nicht verfügbar.

Im Gegensatz zum Wildtyp und der Komplementationsmutante SA3503 ($\Delta sgmT/sgmT+$) ist das Matrixprotein FibA in SA3502 ($\Delta sgmT$) im Immunblot nicht nachzuweisen (Abbildung 18C). Ebenso ist FibA in SA1804 ($\Delta digR$) und SA3515 ($\Delta digR \Delta sgmT$) nicht detektierbar (Abbildung 18C). Durch die dramatische Reduzierung von akkumuliertem FibA könnte die Proteinzusammenstellung in der ECM in allen drei Mutanten (SA3502, SA1804 und SA3515) gestört sein. Die Quantifizierung des EPS-Anteil der drei Mutanten SA3502 ($\Delta sgmT$), SA1804 ($\Delta digR$) und SA3515 ($\Delta digR \Delta sgmT$) zeigt einen 2,5-fach höheren Wert an als der Wildtyp (Abbildung 18D), was die Vermutung nahelegt, dass vergleichbar höhere Mengen an EPS in die ECM der drei Mutanten eingebaut ist. Das LPS O-Antigen konnte in SA3502 ($\Delta sgmT$), SA1804 ($\Delta digR$) und SA3515 ($\Delta digR \Delta sgmT$) mittels Immunblot nachgewiesen werden (Abbildung 18E). Im Gegensatz zum Wildtyp und SA3503 ($\Delta sgmT/sgmT+$) zeigten die drei Mutanten geringere O-Antigen-Konzentrationen auf.

In einer Entwicklungsstudie auf TPM-Agar zeigten SA3502 ($\Delta sgmT$), SA1804 ($\Delta digR$) und SA3515 ($\Delta digR \Delta sgmT$) im Gegensatz zum Wildtyp keine Bildung von Fruchtkörpern. Dieser Entwicklungsdefekt entspricht der Erwartung aufgrund des S-Bewegungsdefekts der drei Mutanten.

Man kann abschließend zusammenfassen, dass die beiden Einzelmutanten SA3502 ($\Delta sgmT$) und SA1804 ($\Delta digR$) sowie die Doppelmutante SA3515 ($\Delta digR \Delta sgmT$) denselben Phänotyp in allen durchgeführten Untersuchungen kopieren. Es ist daher zu vermuten, dass SgmT und DigR im selben

Signaltransduktionsweg agieren und damit korrespondierende Partner sein könnten.

2.2.3 SgmT und DigR sind korrespondierende Partner

Bioinformatische Analysen zeigen, dass DigR eine C-terminale DNA-Bindedomäne enthält, die homolog zu DNA-Bindedomänen der Xre-Familie von Transkriptionsfaktoren ist. Deshalb könnte DigR die Transkription bestimmter Gene regulieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der Empfängerdomäne essentiell für die Aktivität von DigR ist (Overgaard *et al.*, 2006). Unter diesen Voraussetzungen und der Annahme dass DigR der korrespondierende RR zu SgmT ist, sollten die Transkriptome von SA3502 (Δ *sgmT*) und SA1804 (Δ *digR*) starke Ähnlichkeiten aufweisen.

Vergleichende Transkriptom-Analysen

Mittels Microarray-Technologie wurden die Transkriptomdaten von SA3502 (Δ *sgmT*) und SA1804 (Δ *digR*) jeweils mit denen von DK1622 (Wildtyp) verglichen und auf signifikant unterschiedlich regulierte Gene untersucht. Die verwendeten DNA-Chips enthalten einzelsträngige Oligonukleotide mit einer Länge von jeweils 70 Basen, deren Sequenz die Genbereiche von 6687 der 7380 Protein-kodierenden Gene in *M. xanthus* abdecken (Müller *et al.*, 2010). Die Vorgehensweise und die Auswahlkriterien signifikant unterschiedlich regulierter Gene sind detailliert in 4.4.6 beschrieben. Anschließend erfolgte die Verifizierung der Transkriptomdaten mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR) von ausgewählten Genen (4.3.3).

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden nur solche Gene berücksichtigt, für die in beiden Vergleichsstudien Transkriptomdaten vorliegen. Als „negativ-exprimiert“ werden Gene bezeichnet, die eine erhöhte Expression im Wildtyp gegenüber der jeweiligen Mutante zeigen; „positiv-exprimierte“ Gene hingegen zeigen eine erhöhte Expression in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Die gesammelten Daten von den Microarrays und der qRT-PCR sind in Anhang 2 tabellarisch aufgeführt.

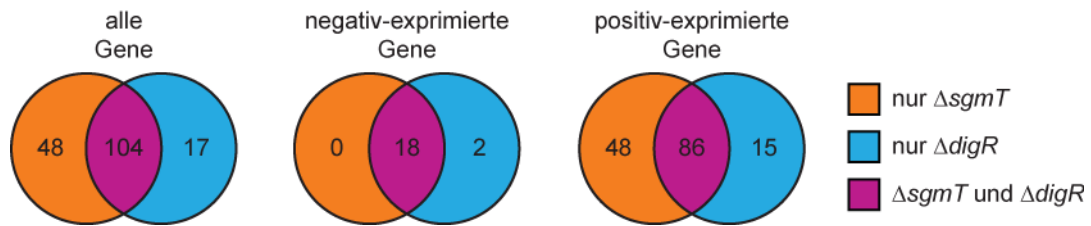


Abbildung 19: Vergleichende Transkriptomanalysen von ΔsgmT und ΔdigR .

Die Mengendiagramme der signifikant unterschiedlich regulierten Gene von SA3502 (ΔsgmT) und SA1804 (ΔdigR) im Vergleich zu DK1622 (Wildtyp). Die Zahlen geben die Anzahl der regulierten Gene an, die jeweilige Farbe zeigt an ob ein Gen exklusiv in ΔsgmT (orange), exklusiv in ΔdigR (blau) oder in beiden Deletionsmutanten (violett) signifikant unterschiedlich exprimiert wurde.

Vergleicht man die Transkriptomdaten von SA3502 (ΔsgmT) mit denen von DK1622 (Wildtyp), so sind 152 Gene signifikant unterschiedlich reguliert: 18 Gene werden negativ und 134 Gene positiv exprimiert (Abbildung 19). In SA1804 (ΔdigR) sind gegenüber DK1622 (Wildtyp) 121 Gene signifikant unterschiedlich reguliert: 20 negativ-exprimierte Gene stehen 101 positiv-exprimierten Genen gegenüber (Abbildung 19). Zusammenfassend werden 104 Gene gleichermaßen in SA3502 (ΔsgmT) und SA1804 (ΔdigR) signifikant unterschiedlich zu DK1622 (Wildtyp) reguliert, wovon 18 negativ und 86 positiv exprimiert werden. Es bleibt anzumerken, dass im Vergleich der Transkriptomdaten von SA3502 und SA1804 mit DK1622 kein Gen entgegengesetzt exprimiert wurde.

Die Transkriptomdaten von SA3502 (ΔsgmT) und SA1804 (ΔdigR) bekräftigen die aufgestellte Hypothese, dass SgmT und DigR im gleichen Signaltransduktionsweg aktiv sind, da ein relativ hoher Anteil der signifikant regulierten Gene gleichermaßen in beiden Mutanten auftritt. Eine direkte Interaktion von SgmT mit DigR kann aufgrund der bisherigen Daten nur vermutet, aber nicht nachgewiesen werden.

Phosphogruppentransferstudien

Um eine direkte Interaktion zwischen SgmT und DigR zu untersuchen, wurden Phosphogruppentransferstudien *in vitro* durchgeführt. Dafür wurden die kodierenden Gensequenzen, die für die benötigten Proteine oder Domänen kodieren, in die Expressionsplasmide pET28a(+) bzw. pMAL-c2x, wie in 4.3.5 beschrieben, kloniert und nach 4.3.6 in *E. coli* transformiert. Die Induzierung der

Gene sowie die Reinigung der Fusionsproteine erfolgte wie in 4.4.1 beschrieben. Danach wurde die Kinasedomäne des jeweiligen SgmT-Konstrukts autophosphoryliert und anschließend durch die Zugabe von Proteinen mit Empfängerdomäne auf einen Phosphogruppentransfer hin untersucht (4.4.5).

Zunächst wurde durch die Zugabe von 1 mM [γ ³²P]-ATP die Kinasedomäne von SgmT (His₆-SgmT^{Kinase}) für 30 min autophosphoryliert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung über ein SDS-Gel konnte ein Phosphoreszenzsignal bei 32 kDa detektiert werden, das damit der theoretischen molekularen Masse von His₆-SgmT^{Kinase} entspricht (Abbildung 20A). Nach der Zugabe von äquimolaren Mengen von MalE-DigR konnte ein Phosphogruppentransfer von His₆-SgmT^{Kinase} zu MalE-DigR nach 2 min Inkubationszeit beobachtet werden (Abbildung 20A). Das Phosphoreszenzsignal von His₆-SgmT^{Kinase} verlor an Intensität, dafür zeigte die Proteinbande von MalE-DigR mit einer abgeschätzten Masse von 65 kDa eine starke Phosphoreszenz. Nach der Zugabe einer DigR-Mutante MalE-DigR^{D53N}, bei der das konservierte Aspartat in der Empfängerdomäne durch Asparagin substituiert wurde, konnte keine Phosphogruppenübertragung von His₆-SgmT^{Kinase} zu MalE-DigR^{D53N} beobachtet werden (Abbildung 20A). Nach dem Austausch des konservierten Histidinrests in der Kinasedomäne von SgmT durch Alanin (His₆-SgmT^{Kinase H336A}) zeigte das mutierte SgmT-Protein keine Autophosphorylierung und folglich konnten keine Phosphogruppen auf MalE-DigR übertragen werden (Abbildung 20A). Diese Ergebnisse zeigen, dass SgmT am konservierten Histidinrest H336 in der Kinasedomäne autophosphoryliert und dass die Phosphogruppe von SgmT~P auf den konservierten Aspartatrest D53 in der Empfängerdomäne von DigR transferiert wird. Da der Prozess des Phosphogruppentransfer *in vitro* nach zwei Minuten detektierbar ist und folglich spezifisch abläuft (Laub & Goulian, 2007), ist zu vermuten, dass DigR der zugehörige RR zu SgmT ist.

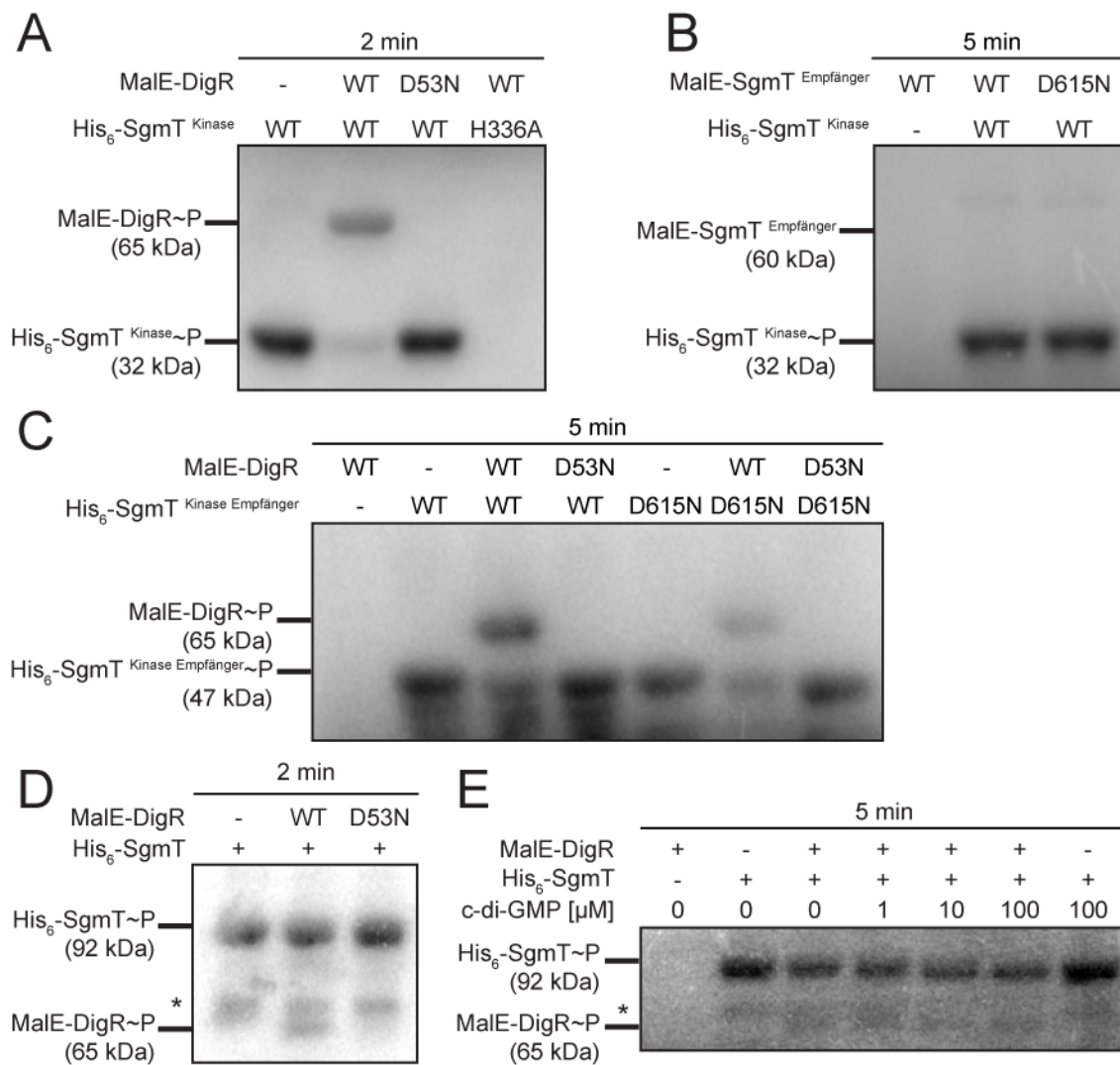


Abbildung 20: Phosphogruppentransferstudien mit SgmT und DigR.

Phosphogruppentransferstudien von SgmT-Proteinen. Die SgmT-Kinasedomänen-Proteine wurden nach 30 min Autophosphorylierungsreaktion den entsprechenden Empfängerdomänen-Proteinen zugegeben, nach der angegebenen Zeit von 2 min bzw. 5 min wurde die Phosphogruppenübertragung gestoppt und die Proteine danach über SDS-PAGE nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt. **(A)** Phosphogruppentransferstudie zwischen His₆-SgmT^{Kinase} und MalE-DigR. **(B)** Phosphogruppentransferstudie zwischen His₆-SgmT^{Kinase} und MalE-SgmT^{Empfänger}. **(C)** Phosphogruppentransferstudie zwischen His₆-SgmT^{Kinase Empfänger} und MalE-DigR. **(D)** Phosphogruppentransferstudie zwischen His₆-SgmT und MalE-DigR. **(E)** Phosphogruppentransferstudie zwischen His₆-SgmT und MalE-DigR in Abhängigkeit von c-di-GMP. Die Konzentrationen von c-di-GMP sind im Bild angegeben.

Da ein interner Phosphogruppentransfer in Hybrid-HK häufig auftritt, wurde zum Vergleich die Übertragung der Phosphogruppe von His₆-SgmT^{Kinase} auf die Empfängerdomäne von SgmT (MalE-SgmT^{Empfänger}) *in trans* untersucht. Nach der Zugabe von MalE-SgmT^{Empfänger} zu autophosphorylierter His₆-SgmT^{Kinase} konnte nach 5 min Inkubation kein Phosphoreszenzsignal für MalE-SgmT^{Empfänger} detektiert werden (Abbildung 20B). Vergleicht man die Intensität des Phosphoreszenzsignals von His₆-SgmT^{Kinase} nach der Zugabe von MalE-

SgmT^{Empfänger} bzw. MalE-SgmT^{Empfänger D615N}, so sind beide Banden vergleichbar stark (Abbildung 20B). In MalE-SgmT^{Empfänger D615N} wurde das konservierte Aspartat D615 durch Asparagin substituiert, so dass eine spezifische Phosphogruppenübertragung von SgmT^{Kinase} nicht möglich ist. Ein interner Phosphogruppentransfer wurde für SgmT *in trans* nicht beobachtet.

In einer weiteren Studie wurde der Phosphogruppentransfer zu DigR mit einem Konstrukt durchgeführt, in dem die Kinase- und Empfängerdomäne von SgmT *in cis* angeordnet sind (His₆-SgmT^{Kinase Empfänger}). Damit sollte untersucht werden, ob der Transfer der Phosphogruppe zu DigR durch das Vorhandensein der SgmT-Empfängerdomäne beeinträchtigt wird. Parallel dazu wurde ein Konstrukt verwendet, das sich von His₆-SgmT^{Kinase Empfänger} nur durch eine Asparaginsubstitution im konservierten Aspartatrest D615 der Empfängerdomäne unterscheidet (His₆-SgmT^{Kinase Empfänger D615N}). Abbildung 20C zeigt eine Phosphoreszenzaufnahme nach der Auftrennung über eine SDS-PAGE. Spur 1 zeigt MalE-DigR, das parallel zu den beiden Kinase-Konstrukten 30 min mit [³²P]-ATP inkubiert wurde und als Negativkontrolle diente; wie erwartet wurde kein Signal detektiert. Die Phosphoreszenzsignale eines 47 kDa-Protein entsprechenden autophosphoryliertem His₆-SgmT^{Kinase Empfänger} bzw. His₆-SgmT^{Kinase Empfänger D615N} (Abbildung 20C). Nach der Zugabe von DigR ist nach 5 min eine Übertragung des Phosphoreszenzsignals vom jeweiligen Kinase-Konstrukt auf DigR sichtbar (Abbildung 20C). Die Zugabe von MalE-DigR^{D53N} lieferte in beiden Fällen keinen Phosphogruppentransfer (Abbildung 20C). Berücksichtigt man, dass His₆-SgmT^{Kinase Empfänger D615N} generell eine schwächere Phosphoreszenz zeigt als His₆-SgmT^{Kinase Empfänger}, so kann man keinen Unterschied in der Transferrate zwischen beiden Proteinen erkennen. Setzt man voraus, dass ein interne Phosphogruppenübertragung stattfindet, so würde man eine schlechtere Transferrate von His₆-SgmT^{Kinase Empfänger} zu DigR erwarten als von His₆-SgmT^{Kinase Empfänger D615N} zu DigR. In der Mutante His₆-SgmT^{Kinase Empfänger D615N} kann die Phosphogruppe nur auf MalE-DigR übertragen werden, während sie in His₆-SgmT^{Kinase Empfänger} zusätzlich auf den internen Aspartatrest D615 in der SgmT-Empfängerdomäne übertragen werden kann. Ein solches Ergebnis wurde nicht beobachtet, ein SgmT-interner Phosphogruppentransfer ist somit eher unwahrscheinlich, da keine Beeinträch-

tigung im Phosphogruppentransfer zu DigR im Vergleich der beiden SgmT-Konstrukte beobachtet wurde.

In einem weiteren Versuch wurde ein Phosphogruppentransfer mit vollständigem SgmT (His₆-SgmT) auf MalE-DigR durchgeführt (Abbildung 20D). In Spur 1 ist die Autophosphorylierung von SgmT bei 92 kDa zu erkennen, wobei eine zusätzliche Bande bei 70 kDa auftritt, die mit „*“ markiert wurde. Da diese Bande in allen Proben detektiert wurde, handelt es sich vermutlich um ein Abbauprodukt von SgmT, das noch Kinaseaktivität aufweisen könnte. Nach Zugabe von MalE-DigR und einer zweiminütigen Inkubation ist ein Signal in einer dritten Bande mit der errechneten Masse von 65 kDa zu erkennen (Abbildung 20D), was der Phosphorylierung von MalE-DigR entspricht. Als Negativkontrolle diente auch hierbei MalE-DigR^{D53N}, das durch His₆-SgmT wie erwartet nicht phosphoryliert werden konnte. Der *in vitro*-Phosphogruppentransfer von His₆-SgmT zu MalE-DigR bestätigt die Ergebnisse der beiden zuvor durchgeführten Experimente mit verkürzten Versionen von SgmT. Demnach ist DigR der zugehörige RR der HK SgmT.

Abschließend wurde die Kinaseaktivität von SgmT in Abhängigkeit unterschiedlicher c-di-GMP-Konzentrationen untersucht (Abbildung 20E). In Spur 1 wurde DigR aufgetragen, das zuvor 30 min mit [³²P]-ATP behandelt wurde. Wie erwartet konnte keine Phosphoreszenz des Proteins detektiert werden. Spur 2 zeigt autophosphoryliertes His₆-SgmT, die Bande mit einer Molekularmasse von 92 kDa repräsentiert dabei das komplette Protein, die mit „*“ markierte schwache Bande ein Abbauprodukt. Nach Zugabe von DigR nimmt die Intensität des Phosphoreszenzsignals von SgmT ab und die DigR-Bande kann bei 65 kDa detektiert werden (Abbildung 20E, Spur 3). In den Spuren 4-6 wurden verschiedene Konzentrationen von c-di-GMP vor der Autophosphorylierung von SgmT zugegeben und anschließend der Phosphogruppentransfer auf DigR untersucht (Abbildung 20E, Spuren 4-6). Vergleicht man die einzelnen Reaktionen untereinander sowie mit der Probe, in der kein c-di-GMP zugegeben wurde (Abbildung 20E, Spur 3), so kann man keinen Unterschied feststellen. Durch die Zugabe von 100 µM c-di-GMP konnte auch kein signifikanter Unterschied in der Autophosphorylierungsreaktion von SgmT

beobachtet werden (Abbildung 20E, Spur 7). Das bedeutet, *in vitro* ist die Kinaseaktivität von SgmT c-di-GMP-unabhängig.

2.3 Die physiologische Funktion des SgmT/DigR-Regulationswegs

In den beiden vorhergehenden Kapiteln wurde die HK SgmT charakterisiert (2.1) und der korrespondierende RR DigR identifiziert (2.2). Im nachfolgenden Kapitel sollte die physiologische Funktion des SgmT/DigR-Signaltransduktionswegs erörtert werden.

2.3.1 SgmT/DigR regulieren Gene von extrazellulären Proteinen

Um die physiologische Funktion von SgmT/DigR zu ermitteln, wurden die regulierten Gene, die in der vergleichenden Transkriptomanalyse von SA3502 (Δ *sgmT*) und SA1804 (Δ *digR*) gegenüber DK1622 (Wildtyp) identifiziert wurden, im Detail untersucht (2.2.3).

Von denjenigen Genen, für die Messwerte aus beiden Microarrays vorliegen, zeigen 152 bzw. 121 eine signifikant unterschiedliche Expression in SA3502 (Δ *sgmT*) bzw. SA1804 (Δ *digR*) (Abbildung 19). Von den 121 unterschiedlich-exprimierten Genen in SA1804 (Δ *digR*) wurden nur 22 in einer vorherigen Microarray-Studie, in der ebenso die Transkriptome von Δ *digR* und Wildtyp verglichen wurden, identifiziert (Overgaard *et al.*, 2006). Die abweichenden Ergebnisse beider Microarray-Studien könnten auf dem Einsatz verschiedener „DNA-Chips“ beruhen (Overgaard *et al.*, 2006, Müller *et al.*, 2010).

Wie in 2.2.3 dargelegt wurden 104 Gene identifiziert, deren Regulation in SA3502 (Δ *sgmT*) und SA1804 (Δ *digR*) ähnlich beeinflusst ist und von denen kein Gen gegensätzlich reguliert wurde (Anhang 2). 86 dieser Gene werden in den Mutanten positiv exprimiert, während die verbleibenden 18 Gene negativ exprimiert werden. Außerdem weisen diese 104 Gene eine quantitativ ähnlich reduzierte bzw. erhöhte Expression in den zwei Mutanten auf (Abbildung 21A, Anhang 2). 59 der 104 Gene kodieren für Proteine, denen eine Funktion aufgrund ihrer Homologien zu anderen Proteinen zugeordnet werden kann, die verbleibenden 45 Gene kodieren für Proteine mit unbekannter Funktion (Abbildung 21B).

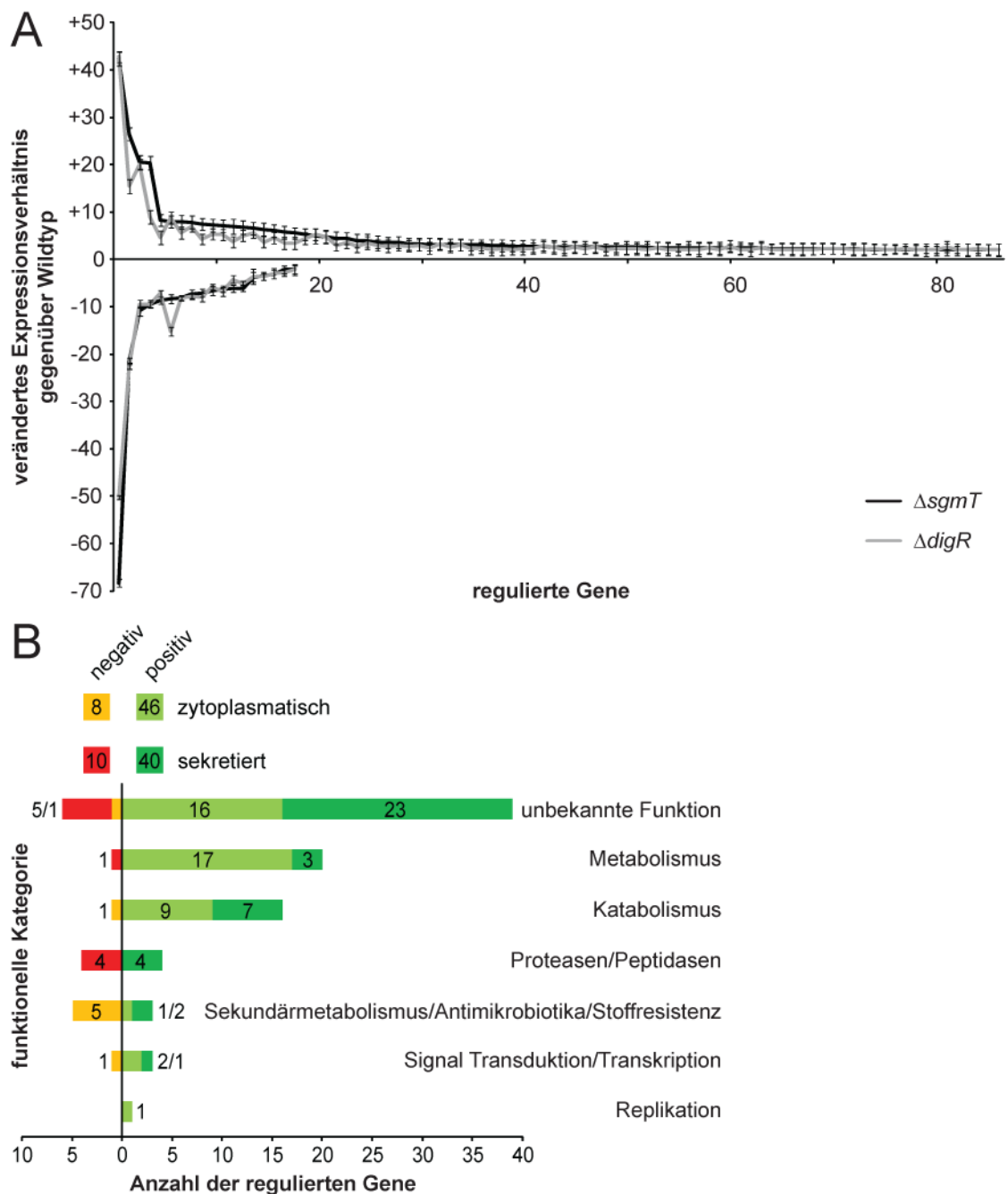


Abbildung 21: Unterschiedlich-exprimierte Gene in $\Delta sgmT$ und $\Delta digR$ im Vergleich zum Wildtyp.

Die Diagrammdaten beziehen sich auf die 104 Gene, die signifikant-unterschiedlich in $\Delta sgmT$ und $\Delta digR$ reguliert sind (Abbildung 19). **(A)** Verändertes Expressionsverhältnis der 86 positiv-exprimierten Gene und der 18 negativ-exprimierten Gene von $\Delta sgmT$ und $\Delta digR$ gegenüber Wildtyp. Die regulierten Gene wurden in Anhang 2 von 1 bis 86 bzw. von 1 bis 18 entsprechend kenntlich gemacht. **(B)** Anzahl der signifikant unterschiedlich-regulierten Gene in Bezug auf die zelluläre Funktion des korrespondierenden Proteins. Die positiv-exprimierten Gene sind grünlich und die negativ-exprimierten Gene sind rötlich dargestellt. Die jeweils hellere Farbe repräsentiert Proteine, bei denen weder ein Signalpeptid noch eine Transmembranhelix prognostiziert werden und die daher vermutlich im Zytoplasma der Zelle lokalisieren. Die jeweils dunklere Farbe repräsentiert Proteine bei denen Signalpeptide oder Transmembranhelices vorhergesagt werden und die daraufhin als sekretierte Proteine bezeichnet werden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorherigen Analyse von SA1804 ($\Delta digR$) (Overgaard *et al.*, 2006) kodiert keines der 59 Gene für ein Protein, das an der Zellbewegung oder an der EPS-Produktion bzw. dem EPS-Export beteiligt ist. Aufgrund des Bewegungsdefekts von SA3502 ($\Delta sgmT$) und SA1804 ($\Delta digR$), der durch den vermehrten EPS-Anteil in der ECM der Mutanten resultiert (2.1.2), hätte man vermuten können, dass solche Bewegungs- bzw. EPS-Gene signifikant reguliert werden.

Nach bioinformatischer Analyse kodieren 50 der 104 Gene (48 %) für Proteine, die exportiert werden (Abbildung 21B), d. h. mindestens ein Signalpeptid oder eine Transmembrandomäne besitzen.

Von den 18 Genen mit reduzierter Expression in beiden Mutanten kodieren vier für sekretierte Proteasen, darunter *fibA*. Weitere fünf Gene kodieren für Enzyme des Sekundärmetabolismus, davon sind drei Proteine an der Synthese des gelben Pigments DKxanthen beteiligt, das Kolonien von *M. xanthus* gelb färbt (Meiser *et al.*, 2006). Die verbleibenden beiden Proteine sind homolog zu LanA, dem Vorläuferprotein eines Lantibiotikums, welches zur Klasse der Peptidantibiotika zählt (Begley *et al.*, 2009). Die drei größten Gen-Gruppen mit bekannter Funktion und erhöhter Expression in beiden Mutanten enthalten jeweils 20 Gene, die im Metabolismus involviert sind, 16 Gene, die am Katabolismus beteiligt sind, und vier Gene, die für sekretierte Proteasen kodieren (Abbildung 21B).

Zusammenfassend sind SgmT und DigR an der Regulation von Genen beteiligt, die für sekretierte Proteine kodieren und deren Funktion größtenteils unbekannt ist. Da diese Gene sowohl positiv als auch negativ reguliert werden, fungiert DigR vermutlich als transkriptioneller Aktivator und Repressor.

2.3.2 DigR bindet eine semi-palindromische Sequenz im *fibA*-Promotor

Aufgrund seiner DNA-Bindedomäne der Xre-Familie zählt DigR zu den Transkriptionsregulatoren. Gene, die direkt von DigR reguliert werden, sollten eine spezifische Bindestelle für die DNA-Bindedomäne in ihrer Promotorregion besitzen. Um diese DigR-spezifische Bindestelle zu identifizieren, wurde unter Zuhilfenahme der Microarraydaten (2.3.1) nach geeigneten Kandidaten unter

den stark regulierten Genen von SA3502 (ΔsgmT) und SA1804 (ΔdigR) gesucht. Diese Gene kodieren hauptsächlich für Proteine mit unbekannter Funktion. Ein Gen, das stark negativ reguliert wird und dessen Funktion jedoch relativ gut untersucht wurde, ist *fibA*. *fibA* kodiert für eine matrix-assoziierte Protease (Kearns *et al.*, 2002) und tritt in der ΔdigR -Microarray-Studie von Overgaard und Kollegen als eines der stärksten regulierten Gene mit bekannter Funktion auf (Overgaard *et al.*, 2006). Deshalb wurde in der *fibA*-Promotorregion die Bindeaffinität von DigR untersucht.

Im Rahmen der Masterarbeit von Xin Zhang wurde damit begonnen, den *fibA*-Promotor zu untersuchen (Zhang, 2005). Zunächst wurde der Transkriptionsstart von *fibA* mit der „Primer Extension“-Methode identifiziert. Dafür wurde RNA isoliert und eine Reverse Transkriptase-Reaktion mit einem radioaktiv-markiertem Primer, der in der kodierenden Sequenz von *fibA* in „anti-sense“-Richtung bindet, durchgeführt (Zhang, 2005). Das erhaltene Produkt wurde gereinigt, elektrophoretisch getrennt und autoradiographisch visualisiert (Abbildung 22A). Im Vergleich mit einer radioaktiven Sequenzierreaktion wurde der Transkriptionsstart von *fibA* auf ein Thymin definiert (Abbildung 22A und C), das 25 Basen „upstream“ des Startcodons lokalisiert (Zhang, 2005).

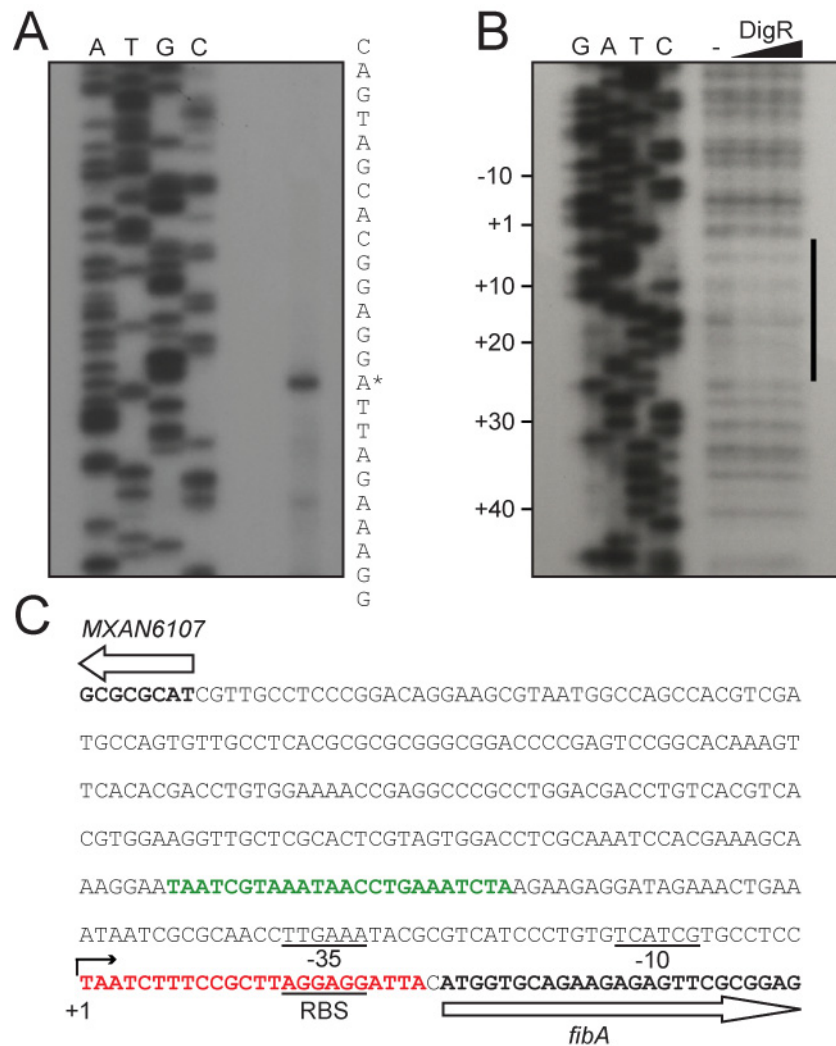


Abbildung 22: Identifikation des Transkriptionsstarts und einer DigR-Bindestelle im *fibA*-Promotor

Diese Abbildung aus (Zhang, 2005) ist modifiziert dargestellt. **(A)** Autoradiogramm zur Definition des Transkriptionsstarts von *fibA* mittels „Primer Extension“. Die ersten vier Spuren zeigen das Sequenzierergebnis mit den angegebenen Nukleotiden. Spur 5 zeigt das Produkt der „Primer Extension“-Methode. Rechts daneben ist die Sequenz in „anti-sense“ Richtung angegeben, wobei „*“ den Transkriptionsstart anzeigt. **(B)** Autoradiogramm des „DNase I Footprintings“. Die ersten vier Spuren zeigen das Sequenzierergebnis mit den angegebenen Nukleotiden an. Spur 5 zeigt DNase I-behandelte DNA ohne Zugabe von DigR (-), in den Spuren 6 bis 8 wurden steigende Konzentrationen von DigR zugegeben. Der schwarze Balken zeigt die Sequenz an, an der DigR bindet. **(C)** Nukleinsäuresequenz des *fibA*-Promotors. Die kodierenden Bereiche von *fibA* und *MXAN6107* sind fett-gedruckt und deren Transkriptions-Richtung mit weißen Pfeilen dargestellt. Der abknickende Pfeil sowie „+1“ markiert den Transkriptionsstart, die Ribosomenbindestelle (RBS) und die potentiellen Promotorelemente -35 und -10 sind unterstrichen dargestellt. In rot ist die Sequenz der experimentell identifizierten DigR-Bindestelle, und in grün eine dazu ähnliche Bindestelle hervorgehoben.

Des weiteren wurde die *fibA*-Promotorregion auf DigR-Bindestellen hin untersucht (Zhang, 2005). *fibA* wird in den Microarray-Analysen negativ reguliert und muss dementsprechend aktiviert werden. Da eine Mutante, die eine Asparaginsubstitution des konservierten Aspartat in der DigR-Empfänger-

domäne trägt, *in vivo* den gleichen Phänotyp zeigt wie SA1804 ($\Delta digR$) (Overgaard *et al.*, 2006), ist zu vermuten, dass für die Aktivierung von DigR die Phosphorylierung der Empfängerdomäne wichtig ist. Die *in vitro* Phosphorylierung von DigR mit Acetylphosphat war nicht erfolgreich, deshalb wurde in der anschließenden „DNase I Footprinting“-Untersuchung unphosphoryliertes Protein eingesetzt (Zhang, 2005). Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen von DigR zu einer radioaktiv-markierten DNA-Sonde gegeben, deren Sequenz Teile von *fibA* und dessen Promotor trägt, die anschließend mit DNase I verdaut wurde (Zhang, 2005). Danach wurden die Reaktionsansätze elektrophoretisch aufgetrennt und untereinander sowie mit dem Sequenzierreaktion verglichen (Abbildung 22B). Dabei konnte eine semi-palindromische DigR-Bindestelle mit 24 bp identifiziert werden (+1~TAATCTTTCCGCTTAGGAGGATTA), die zwischen Transkriptionsstart und Startcodon von *fibA* lokalisiert (Abbildung 22B und C). Für einen Aktivator ist eine solche Lokalisierung der Bindestelle ungewöhnlich, da diese für gewöhnlich „upstream“ vom Transkriptionsstart liegen (Cox *et al.*, 2007). Betrachtet man die Sequenz „upstream“ des Transkriptionsstarts, so findet man dort eine Sequenz (-94~TAATCGTAAATAACCTGAAATCTA), die eine große Ähnlichkeit zur identifizierten DigR-Bindestelle aufweist (2.3.3).

Um die ermittelte DigR-Bindestelle zu bestätigen, wurde eine EMSA-Studie („electrophoretic mobility shift assay“) mit unphosphoryliertem DigR durchgeführt (4.4.8). Dafür wurden Male-DigR, die DNA-Sonde (HEX-f2) und diverse Konkurrenz-Fragmente, wie in 4.4.1 bzw. 4.4.8 beschrieben, hergestellt. Die Sequenz von HEX-f2 kodiert für ein 369 bp langes DNA-Fragment aus der Promotorregion von *fibA* (Abbildung 23A).

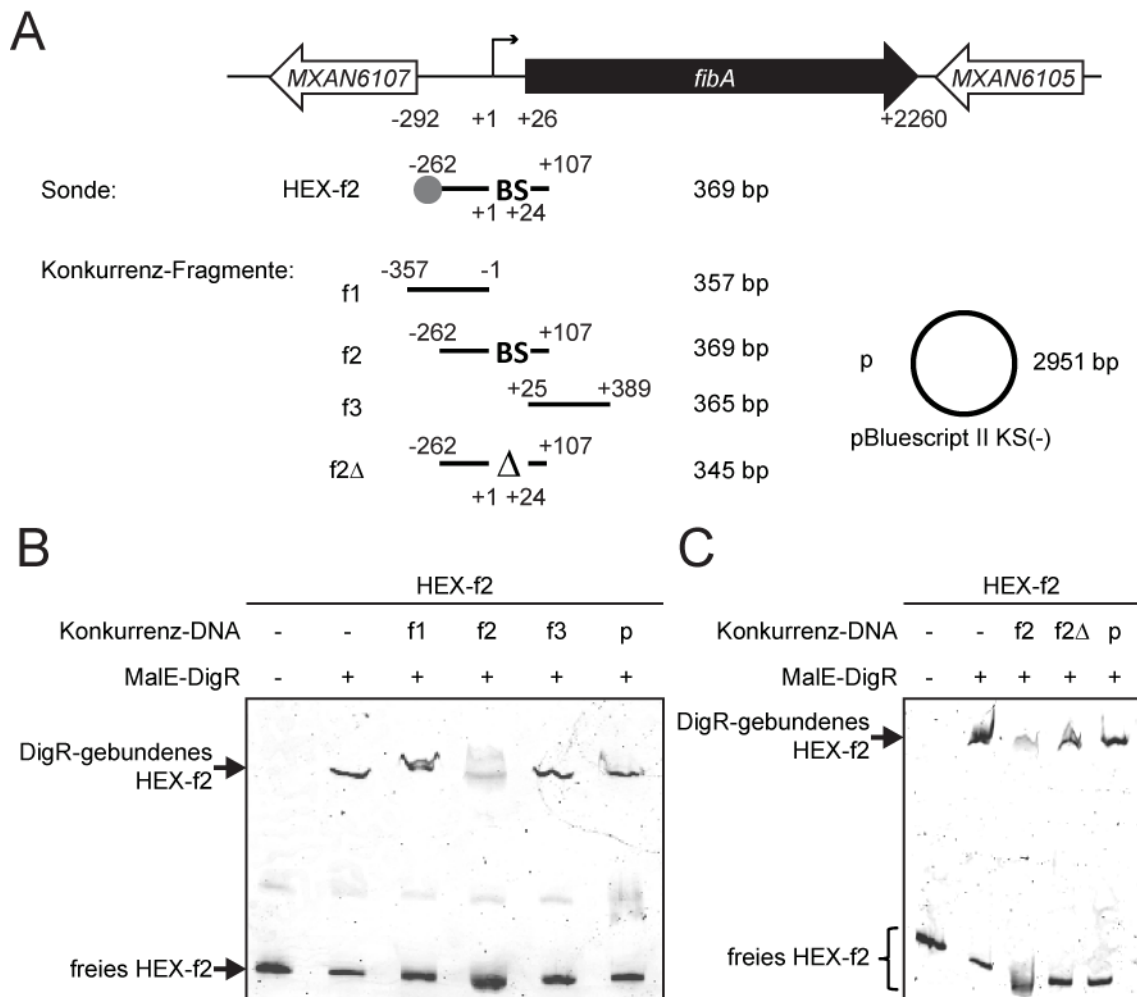


Abbildung 23: EMSA-Studien zur Verifikation der DigR-Bindestelle im *fibA*-Promotor

(A) Schematische Darstellung des genetischen Kontexts von *fibA*, mit den eingesetzten DNA-Fragmenten. Alle Koordinaten beziehen sich auf den Transkriptionsstart (+1), der durch einen geknickten Pfeil dargestellt ist. Der graue Kreis symbolisiert die Fluoreszenz-Markierung der DNA-Sonde mit „HEX“, die identifizierte DigR-Bindestelle ist mit „BS“ gekennzeichnet und die Deletion der Bindestellensequenz mit „Δ“. (B und C) EMSA-Studie von DigR in der *fibA*-Promotorregion. HEX-markierte DNA aus der *fibA*-Promotorregion wurde mit Fragmenten von Konkurrenz-DNA in 150-fach höherer Konzentration und MalE-DigR (4 μM) inkubiert, über ein 5 % Polyacrylamidgel elektrophoretisch bei 4 °C getrennt und dessen Fluoreszenz mit einem Typhoon-Scanner (GE Healthcare, Freiburg) dokumentiert. Die freie und die DigR-gebundene Form von HEX-f2 wurden entsprechend markiert.

Um eine spezifische Bindung von DigR an die identifizierte Bindestelle im *fibA*-Promotor zu untersuchen, wurde das Laufverhalten der HEX-f2-Sonde mit und ohne Zugabe von MalE-DigR nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem Polyacrylamidgel miteinander verglichen (Abbildung 23B und C, Spuren 1 und 2). Die „freie“ Form von HEX-f2 ist in beiden Proben zu erkennen (Abbildung 23B und C), allerdings verringert sich dessen Intensität nach der Zugabe von MalE-DigR und eine zweite Bande ist detektierbar (Abbildung 23B

und C, Spur 2). Diese zweite Bande, mit einer wesentlich höheren molekularen Masse im Vergleich zur freien Bande, repräsentiert die Form von HEX-f2, an der DigR gebunden hat (Abbildung 23B). Das zeigt, dass DigR *per se* an eine Sequenz in der *fibA*-Promotorregion binden kann.

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Bindung von DigR an HEX-f2 spezifisch ist und ob DigR an der identifizierten Stelle im *fibA*-Promotor bindet, wurden EMSA-Studien mit Konkurrenz-DNA durchgeführt (4.4.8). Im Vergleich zum verwendeten HEX-f2 wurde jeweils die 150-fache Konzentration an Konkurrenz-DNA eingesetzt. Nach der Zugabe der f1- und f3-Fragmente, die für die Sequenz direkt „up-“ bzw. „downstream“ von der DigR-Bindestelle kodieren (Abbildung 23A), und des Expressionsvektors pBluescriptII KS(-), der als weiteres unspezifisches DNA-Fragment eingesetzt wurde, konnte kein Unterschied im Laufverhalten von HEX-f2 im Vergleich zur Probe mit DigR und ohne Konkurrenz-DNA beobachtet werden (Abbildung 23B). Eine deutliche Reduzierung der Intensität von DigR-gebundenem HEX-f2 ist nach der Zugabe des f2-Fragments zu beobachten (Abbildung 23B). Das f2-Fragment ist Sequenz-identisch zu HEX-f2 und beinhaltet folglich die DigR-Bindestelle. In f2 Δ wurde die Sequenz der DigR-Bindestelle des f2-Fragments deletiert. Nach dem Einsatz des f2 Δ -Fragments in der EMSA-Studie ist eine vergleichbare Menge an DigR-gebundenem HEX-f2 wie bei anderen unspezifischen Konkurrenz-DNA-Fragmenten detektierbar (Abbildung 23C). Das bedeutet: DigR bindet spezifisch an die Sequenz der identifizierten Bindestelle (Abbildung 22).

Die Ergebnisse aus den EMSA-Studien bestätigen die identifizierte DigR-Bindestelle im *fibA*-Promotor (Zhang, 2005). Unter der Berücksichtigung aller bisher gesammelten Daten kann man vermuten, dass *fibA* direkt durch die Bindung von DigR über die identifizierte Bindestelle aktiviert wird.

2.3.3 Weitere regulierte Gene besitzen DigR-Bindestellen

Nach der Identifikation der DigR-Bindestelle im *fibA*-Promotor (2.3.2) wurden weitere Gene auf das Vorhandensein einer DigR-Bindestelle hin untersucht. Dafür wurden ausschließlich bioinformatische Methoden verwendet.

Gene, die über eine DigR-Bindestelle reguliert werden, sollten in SA1804 ($\Delta digR$) und SA3502 ($\Delta sgmT$) im Vergleich zu DK1622 (Wildtyp) signifikant unterschiedlich reguliert sein. Aus den Microarray-Analysen sind 204 signifikant regulierte Gene bekannt (Abbildung 21). Von diesen 204 Genen, wurden alle 18 negativ-regulierten Gene und alle 17 positiv-regulierten Gene, die eine mindestens 4,0-fach höhere Expression in SA1804 ($\Delta digR$) zeigten, näher charakterisiert. Um das Vorhandensein von DigR-Bindestellen im genetischen Kontext dieser Gene zu untersuchen, wurde zunächst deren Promotorregion bestimmt. Da in *M. xanthus* bisher nur wenige Promotorregionen experimentell identifiziert wurden (Fisseha *et al.*, 1996, Wu & Kaiser, 1997, Yoder-Himes & Kroos, 2006), war diese Aufgabe eine große Herausforderung.

Die nachfolgenden Untersuchungen zur Identifikation von Promotorelementen in den einzelnen Genen wurden von Dr. Nuria Gomez Santos (Arbeitsgruppe Søgaard-Andersen, Max-Planck-Institut Marburg) durchgeführt. Die Regionen bis 150 bp „upstream“ vom Translationsstart wurden mit Bioprospector, Virtualfootprint und Prodoric (Liu *et al.*, 2001, Münch *et al.*, 2005, Münch *et al.*, 2003) sowie manuell auf typische σ^{70} -, ECF- und σ^{54} -Promotorelemente von *M. xanthus* hin untersucht. Die Gene, von denen angenommen wird, Teil eines Operons zu sein, liegen höchstens 100 bp in der gleichen Transkriptions-Richtung voneinander entfernt. Von Genen, die dieses Kriterium erfüllen, wurden die Promotorregionen des ersten Gens im jeweiligen Operon auf die oben beschriebene Weise identifiziert.

Nach der Identifikation von Promotorelementen der stark-regulierten Gene, wurden diese auf DigR-Bindestellen hin untersucht. Die Zielsequenz sollte aus 24 bp bestehen und mindestens 60 % Identität zur palindromischen Sequenz der DigR-Bindestelle im *fibA*-Promotor (TAATC-N14-GATTA) aufweisen. Als zusätzliches Kriterium sollte die Zielsequenz höchstens 200 bp „upstream“ oder „downstream“ vom Startcodon des jeweiligen Gens lokalisiert sein. Mit Hilfe von FIMO (Grant *et al.*, 2011) und Palinsight (Pareja *et al.*, 2006) wurden zwölf weitere DigR-Bindestellen identifiziert, die vermutlich an der Regulation von 16 Genen beteiligt sind (Anhang 3, Anhang 4).

Von diesen 16 Genen werden acht negativ und acht positiv reguliert. Vier der acht negativ regulierten Gene kodieren für sekretierte Proteine mit unbe-

kannter Funktion (MXAN0504, MXAN1672, MXAN3175 und MXAN4421), die phylogenetisch ausschließlich in *M. xanthus* konserviert sind (Anhang 1). Die weiteren vier Gene kodieren für zwei homologe LanA-Vorläuferproteine eines Peptidantibiotikums (MXAN2855 und MXAN2856), einem TonB-abhängigem Rezeptorprotein (MXAN4746) sowie für die bereits erwähnte Matrixprotease FibA (MXAN6106). Sechs der acht positiv regulierten Gene kodieren für Proteine mit unbekannter Funktion, von denen zwei im Zytoplasma (MXAN5453 und MXAN7352) lokalisieren und vier exportiert werden (MXAN6254, MXAN6255, MXAN7212 und MXAN7351). Die verbleibenden beiden Gene kodieren für eine Oxidase (MXAN1676) und eine Acyltransferase (MXAN7353).

Abbildung 24 zeigt schematisch die Lokalisierung der identifizierten DigR-Bindestellen in den aktivierten und reprimierten Promotoren. Klassischerweise befinden sich Bindestellen von Transkriptionsfaktoren in aktivierten Promotoren „upstream“ der beiden Promotormotive (-35 und -10) oder überlappen mit diesen (Cox *et al.*, 2007, Madan Babu & Teichmann, 2003). In reprimierten Promotoren befinden sich solche Bindestellen für gewöhnlich überlappend mit den Promotormotiven oder „downstream“ davon (Cox *et al.*, 2007, Madan Babu & Teichmann, 2003). Dies trifft auch auf die Mehrheit der identifizierten DigR-Bindestellen zu, mit einer Ausnahme: die identifizierte DigR-Bindestelle im *fibA*-Promotor befindet sich zwischen dem -10-Promotormotiv und dem Translationsstart. Allerdings wurde eine ähnliche Bindestelle „upstream“ des -35-Promotormotivs identifiziert (Abbildung 24, Anhang 4).

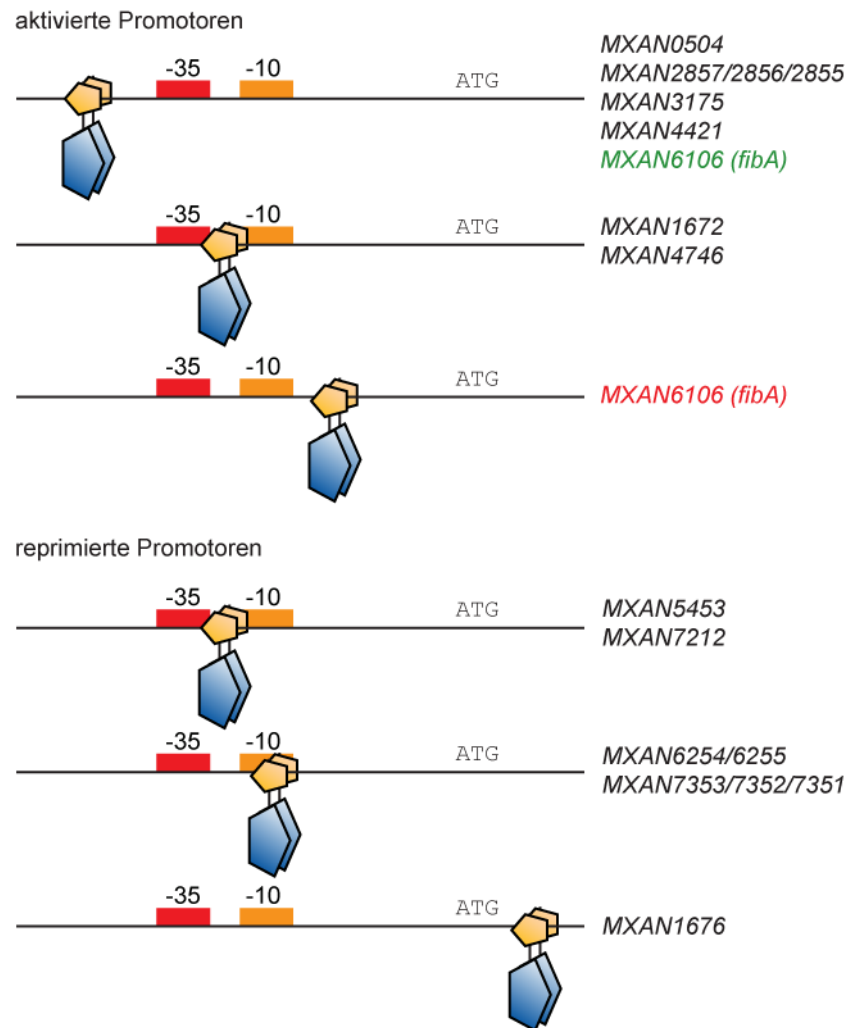


Abbildung 24: Identifikation von DigR-Bindestellen stark-regulierter Gene

Schematische Darstellung von DigR-Bindestellen in aktivierten (oben) und reprimierten (unten) Promotoren. Identifizierte Promotorelemente (-35 und -10) sind als rote bzw. orange-farbene Rechtecke dargestellt. Der Translationsstart ist mit „ATG“ gekennzeichnet und identifizierte DigR-Bindestellen werden durch gelbe und blaue Fünfecke markiert. Die Farbkodierung der DigR-Bindestellen im *fibA*-Promotor wurde von Abbildung 22 übernommen.

Am Beispiel des *fibA*-Promotors wurde experimentell eine DigR-Bindestelle identifiziert. Mit bioinformatischen Analysen konnten ähnliche Sequenzen in den Promotoren von 15 weiteren Genen gefunden werden. Für 10 dieser Gene ist keine Funktion bekannt, allerdings kodieren mit 8 von 10 Genen überdurchschnittlich viele für exportierte Proteine.

2.4 c-di-GMP in *M. xanthus*

c-di-GMP ist seit nunmehr über einer Dekade Bestandteil aktueller Forschung in unterschiedlichen bakteriellen Modellorganismen. Der sekundäre Botenstoff kommt ausschließlich in Bakterien vor und reguliert dort wichtige zelluläre Prozesse wie die Zellbewegung, die Biofilmbildung und die Virulenz (Jenal & Malone, 2006).

In *M. xanthus* wurde die Rolle von c-di-GMP bisher nicht genauer untersucht. In einer früheren Studie, die sich mit dem Entwicklungsprogramm von *M. xanthus* beschäftigt, wurde der RR ActA identifiziert, der eine GGDEF-Domäne besitzt. Die Deletionsmutante $\Delta actA$ zeigt eine abnormale Fruchtkörperbildung sowie einen Sporulationsdefekt (Gronewold & Kaiser, 2001). Auf die Funktion von c-di-GMP wurde in dieser Studie nicht näher eingegangen. Im Rahmen dieser Dissertation wurde während der Charakterisierung der HK SgmT zum ersten Mal eine aktive Rolle von c-di-GMP in *M. xanthus* beschrieben (2.1). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurde in den nachfolgenden Abschnitten die Rolle von c-di-GMP in *M. xanthus* näher analysiert.

2.4.1 *M. xanthus* besitzt essentielle Elemente von c-di-GMP Signalsystemen

Unterschiedliche molekulare Bestandteile von c-di-GMP Signalsystemen sind in vielen Bakterienarten konserviert und übernehmen innerhalb der Zelle diverse Aufgaben. Bisher wurden vier unterschiedliche Proteinklassen sowie zwei regulatorische genetische Elemente identifiziert (Hengge, 2010).

Die ersten drei Proteinklassen wurden nach den Motiven ihrer aktiven Zentren benannt. GGDEF-Domänenproteine generieren als Diguanylatzyklasen (DGC) c-di-GMP, während EAL- und HD-GYP-Domänenproteine die Funktion von Phosphodiesterasen (PDE) übernehmen und c-di-GMP abbauen. GGDEF- und EAL-Domänenproteine sind eigenständige Domänen, während HD-GYP-Domänenproteine eine Unterfamilie der HD-Domänenproteine bilden. Die vierte Proteinklasse stellen PilZ-Domänenproteine dar, die c-di-GMP binden und als Effektoren bei unterschiedlichen zellulären Prozessen fungieren. Für die Bindung von c-di-GMP sind zwei konservierte Motive (RxxxR und DxSxxG) essentiell (Habazettl *et al.*, 2011).

Die beiden regulatorischen genetischen Elemente wurden vor wenigen Jahren in diversen Bakterienspezies entdeckt und sind in Promotorregionen von bestimmten Genen lokalisiert (Sudarsan *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2010). Als „riboswitches“ sind sie an der Regulation der Transkription bzw. der Translation beteiligt (Hengge, 2010).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde zunächst in der „Microbial Signal Transduction Database“ (MiST2) (Ulrich & Zhulin, 2010) nach homologen Genen im *M. xanthus*-Genom gesucht, die für eine GGDEF-, EAL- oder HD-Domäne kodieren. Dabei wurden 17 GGDEF-Domänenproteine, 2 EAL-Domänenproteine und 11 HD-Domänenproteine identifiziert (Tabelle 1). Eine BLAST-Analyse (Altschul *et al.*, 1990), bei der nach homologen Proteinen für GGDEF-, EAL- und HD-Domänen in *M. xanthus* gesucht wurde, lieferte keine zusätzlichen Kandidaten. Anschließend wurden mit „Clustal“ (Thompson *et al.*, 1997) die ermittelten Proteinsequenzen mit typischen GGDEF-, EAL- und HD-GYP-Domänen anderer Spezies auf Homologien untersucht.

Von 17 GGDEF-Domänenproteinen besitzen 15 mindestens ein konserviertes Motiv in der I-site oder in der A-site. Die beiden EAL-Domänenproteine zeigen starke Homologien zu typischen EAL-Domänenproteinen, wie YhjH aus *S. typhimurium* und VieA aus *V. cholerae*, und besitzen jeweils das konservierte Aminosäuremotiv (EAL) des aktiven Zentrums. Nur fünf von elf HD-Domänenproteinen können aufgrund ihrer Homologie in die HD-GYP-Unterfamilie eingeordnet werden. In Tabelle 1 sind die identifizierten GGDEF-, EAL- und HD-GYP-Domänenproteine mit den typischen konservierten Motiven und ihrer SMART-Domänenstruktur (Schultz *et al.*, 1998) aufgelistet.

Tabelle 1: GGDEF-, EAL- und HD-GYP-Domänenproteine von *M. xanthus*

In dieser Tabelle sind alle c-di-GMP-abhängigen Diguanylatzyklasen (GGDEF) und Phosphodiesterasen (EAL und HD-GYP) aus *M. xanthus* aufgelistet. Die Proteine wurden mit MiST2 (Ulrich & Zhulin, 2010) und BLAST (Altschul *et al.*, 1990) identifiziert und deren Sequenzen mit Clustal (Thompson *et al.*, 1997) und SMART (Schultz *et al.*, 1998) auf konservierte Motive bzw. Domänen untersucht.

Gen	I-site Motiv	A-site Motiv	EAL Motiv	HD-GYP Motiv	Domänenstruktur ¹
GGDEF-Domänenproteine					
<i>MXAN1525</i>	RREQ	GGEEF	-	-	FHA-GGDEF
<i>MXAN2643</i>	QNLD	GGDEF	-	-	GAF-GGDEF
<i>MXAN2997</i>	RKVD	GGEEF	-	-	sp-RPT-HAMP-GAF-GGDEF
<i>MXAN3213/actA</i>	RDAD	GDCQF	-	-	REC-GGDEF
<i>MXAN3705</i>	RDTD	GGEEF	-	-	sp-4TMH-GAF-GAF-GGDEF
<i>MXAN3735</i>	RESD	GGDEF	-	-	REC-GGDEF
<i>MXAN4029</i>	RRED	GGEEF	-	-	FHA-GGDEF
<i>MXAN4257</i>	VPGG	EGGAF	-	-	REC-GAF-PAS-GGDEF
<i>MXAN4445</i>	APGD	AGDDF	-	-	REC-GAF-PAS-HK-REC-REC-GGDEF
<i>MXAN4463</i>	RDHD	GGDEY	-	-	REC-GGDEF
<i>MXAN4640/sgmT</i>	RHPD	GGGVF	-	-	GAF-HK-REC-GGDEF
<i>MXAN5053</i>	RDSB	SDQEF	-	-	REC-GAF-GGDEF
<i>MXAN5199</i>	RTED	GGEEF	-	-	FHA-GGDEF
<i>MXAN5340</i>	RDID	ADSRF	-	-	REC-GGDEF
<i>MXAN5366</i>	RETD	GGEEF	-	-	REC-GGDEF
<i>MXAN5791</i>	REVD	GGEEF	-	-	REC-GGDEF
<i>MXAN7362</i>	RRED	GGEEF	-	-	REC-HPt-REC-REC-GGDEF
EAL-Domänenproteine					
<i>MXAN2424</i>	-	-	EAL	-	EAL
<i>MXAN2530</i>	-	-	EVL	-	EAL
HD-GYP-Domänenproteine					
<i>MXAN2061</i>	-	-	-	HD GYP	sp-HAMP-HD_GYP
<i>MXAN2807</i>	-	-	-	HD GTP	GSPII_E_N-HD_GYP-REC
<i>MXAN4232</i>	-	-	-	HD GYP	REC-HD_GYP
<i>MXAN4675</i>	-	-	-	HD GYP	REC-HD_GYP
<i>MXAN6298</i>	-	-	-	HD GYP	GAF-HD_GYP

¹Abkürzungen: FHA = „Fork-head-associated“ Domäne, REC = Empfängerdomäne, HK = Histidinkinase, HPt = Histidin-Phosphotransferase, TMH = Transmembranhelix, sp = Signalpeptid

Zur Identifikation von PilZ-Domänen wurde ähnlich, wie oben beschrieben, verfahren. Insgesamt sind 22 PilZ-Domänenproteine in MiST2 zu finden. Nach den Analysen mit BLAST und SMART wurden Sequenzvergleiche zu anderen PilZ-Domänen von YcgR (*E. coli*), VCA0042 (*V. cholerae*) und YpfA (*B. subtilis*) mit Clustal durchgeführt und auf die Konservierung der Signaturmotive hin untersucht. In Tabelle 2 sind die PilZ-Domänenproteine mit ihren

konservierten RxxxR- und D/NxSxxG-Motiven sowie der Domänenstruktur des Proteins nach SMART aufgelistet. Auffallend ist dabei, dass 14 Proteine exklusiv aus einer PilZ-Domäne bestehen, die vereinzelt eine nicht-konservierte N- oder C-terminale Verlängerung aufweisen. Jeweils zwei PilZ-Domänen sind Bestandteil von Serin-/Threonin-/Tyrosin-Kinasen bzw. Antwortregulatoren und die verbleibenden vier PilZ-Domänenproteine sind mit Chaperon-Domänen von Hitzeschockproteinen gekoppelt (DnaK und DnaJ).

Tabelle 2: PilZ-Domänenproteine von *M. xanthus*

Die aufgelisteten PilZ-Domänenproteine wurden mit MiST2 (Ulrich & Zhulin, 2010) und BLAST (Altschul *et al.*, 1990) identifiziert und deren Sequenzen mit Clustal (Thompson *et al.*, 1997) und SMART (Schultz *et al.*, 1998) auf konservierte Motive bzw. Domänen untersucht. Abkürzungen: Pkn = Serin-/Threonin-/Tyrosin-Proteinkinase-Domäne, REC = Empfängerdomäne.

Gen	RxxxR Motiv	D/NxSxxG Motiv	Domänenstruktur
<i>MXAN0063</i>	RRNGR	DLSEGG	PilZ
<i>MXAN0614</i>	nicht vorhanden	ELSRGG	Pkn-PilZ
<i>MXAN0833</i>	RRFPR	DASLGG	PilZ
<i>MXAN0961</i>	RRGRR	NISNGG	PilZ
<i>MXAN1087</i>	RQHPR	NLSHEG	PilZ-REC
<i>MXAN1467/pkn1</i>	RLAPA	GLSRGG	Pkn-PilZ
<i>MXAN2528</i>	RQNGR	NISKGG	PilZ
<i>MXAN2649</i>	RHFPR	NVSVSG	PilZ
<i>MXAN3585</i>	RKNKR	DISQEG	PilZ
<i>MXAN3721</i>	RKSTR	NLSEGG	PilZ
<i>MXAN3778</i>	nicht vorhanden	NVSRGG	PilZ-DnaK
<i>MXAN3788</i>	PRAPR	NLSKGG	PilZ
<i>MXAN4328</i>	RSHLR	NISARG	PilZ
<i>MXAN4567</i>	RADER	NISAGG	PilZ
<i>MXAN5615</i>	RRFPR	DISRGG	PilZ
<i>MXAN5655</i>	RFHPR	DVSMAG	PilZ
<i>MXAN5707</i>	RDSPR	DLSSLGG	PilZ
<i>MXAN5804</i>	nicht vorhanden	NVARGG	PilZ-DnaK
<i>MXAN6013</i>	RSDDR	NLSSGG	DnaJ-PilZ
<i>MXAN6605</i>	RTTDR	NLSPGG	PilZ-DnaK
<i>MXAN6957</i>	RVEAR	ALSPGG	PilZ
<i>MXAN7024</i>	RAAER	DAGPGA	REC-REC-PilZ

M. xanthus besitzt einen c-di-GMP-regulierten „RNA-Riboswitch“ der Klasse 1 mit einer „GEMM“-Domäne („genes for the environment, for membranes and for motility“), die hauptsächlich in Gram-negativen Bakterien konser-

viert ist (Weinberg *et al.*, 2007, Sudarsan *et al.*, 2008). Dieser „RNA-riboswitch“ lokalisiert „upstream“ von *MXAN4442*, dem ersten Gen eines potentiellen Operons mit drei weiteren Genen (*MXAN4441-4439*). Diese vier Gene kodieren für Proteine, deren Funktion unbekannt ist und die keine konservierten Domänen besitzen. Interessanterweise lokalisiert dieses Operon in unmittelbarer Nähe zum *MXAN4445*-Gen, das für die zweite Hybrid-HK mit GGDEF-Domäne neben SgmT kodiert (Tabelle 1). Aufgrund dessen kann ein Zusammenhang zwischen dem GGDEF-Domänenprotein *MXAN4445* und dem „RNA-riboswitch“ vermutet werden, den es experimentell zu beweisen gilt.

Mit Hilfe von bioinformatischen Methoden konnten wichtige Elemente des c-di-GMP Signalsystems in *M. xanthus* identifiziert werden. Neben 38 Proteinen (GGDEF-, EAL-, HD-GYP- und PilZ-Domänenproteine), die am Metabolismus von c-di-GMP beteiligt sein oder als Effektoren auftreten könnten, besitzt *M. xanthus* noch einen „RNA-riboswitch“ mit GEMM-Domäne (Sudarsan *et al.*, 2008). Diese große Anzahl von c-di-GMP-abhängigen Elementen lässt vermuten, dass c-di-GMP in *M. xanthus* an der Regulation von zellulären Prozessen beteiligt sein könnte.

2.4.2 Δ MXAN2424 und Δ MXAN2530 zeigen keinen Einfluss auf die Bewegungs- und Entwicklungsfähigkeit von *M. xanthus*

Eine Möglichkeit, den Einfluss von c-di-GMP in *M. xanthus* zu untersuchen, ist die Deletion von einzelnen Genen, die für c-di-GMP-abhängige Proteine kodieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde damit begonnen, Deletionsmutanten der entsprechenden Gene zu generieren und diese auf Defekte in der Morphologie, der Bewegung und der Entwicklung zu analysieren.

Der Fokus lag zunächst auf den beiden Genen *MXAN2424* und *MXAN2530*, die für EAL-Domänenproteine kodieren (Tabelle 1). Die Generierung der Deletionsmutanten SA3524 (Δ MXAN2424) und SA3525 (Δ MXAN2530) erfolgte wie in 4.3.8 beschrieben. Anschließend wurden SA3524 (Δ MXAN2424) und SA3525 (Δ MXAN2530) auf Defekte in der Bewegung bzw. der Entwicklung untersucht; dabei wurde wie in 4.2.3 bzw. 4.2.5 beschrieben vorgegangen. Abbildung 25A zeigt, dass SA3524 (Δ MXAN2424) und SA3525 (Δ MXAN2530) eine vergleichbare A- und S-Bewegungsfähigkeit besitzen wie

der Wildtyp DK1622. Auch die Fruchtkörperbildung auf TPM-Agar zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen SA3524 ($\Delta MXAN2424$), SA3525 ($\Delta MXAN2530$) und DK1622 (Wildtyp) nach 24 h bzw. 120 h (Abbildung 25B). Die Entwicklungsstudien auf CF-Agar und in MC7-Puffer zeigten dasselbe Ergebnis, auch hier war kein Unterschied in der Fruchtkörperbildung zwischen den beiden Mutanten (SA3524 und SA3525) und dem Wildtyp (DK1622) zu beobachten (nicht dargestellt).

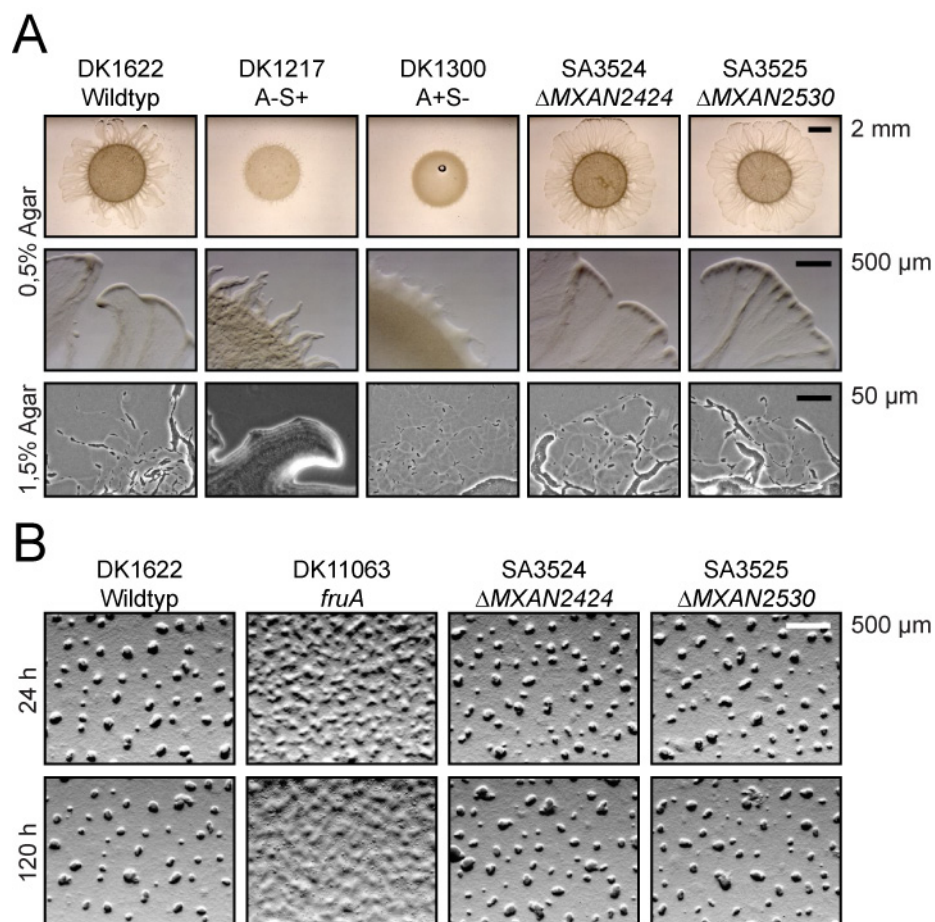


Abbildung 25: Bewegungs- und Entwicklungsstudie von $\Delta MXAN2424$ und $\Delta MXAN2530$

(A) Bewegungsstudie von SA3524 ($\Delta MXAN2424$) und SA3525 ($\Delta MXAN2530$) im Vergleich mit DK1622 (Wildtyp) und den Kontrollstämmen DK1217 (A-S+) und DK1300 (A+S-). Die Konzentration der Agaroberfläche sowie die Längenstandards sind in der Abbildung dargestellt.

(B) Entwicklungsstudie von SA3524 ($\Delta MXAN2424$) und SA3525 ($\Delta MXAN2530$) im Vergleich mit DK1622 (Wildtyp) und dem Kontrollstamm DK11063 (*fruA*) auf TPM-Agar. Die Zeit der Hunger-induzierten Entwicklung sowie die Längenstandards sind dargestellt.

2.4.3 Δ MXAN4463 zeigt einen S-Bewegungsdefekt

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Isabel Hinderberger wurden Deletionsmutanten zweier Gene generiert, die für die RR MXAN4463 und MXAN5791 mit GGDEF-Domäne kodieren (Hinderberger, 2011). Beide Proteine besitzen den konservierten Aspartatrest in der Empfängerdomäne sowie die konservierte „I-“ und „A-site“ Motive in der GGDEF-Domäne (Tabelle 1).

Nach ersten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Deletionsstamm SA3531 (Δ MXAN4463) einen Defekt in der S-Bewegung aufweist (Hinderberger, 2011). Die A-Bewegungsfähigkeit sowie die Ausbildung von Fruchtkörpern von SA3531 (Δ MXAN4463) waren im Vergleich zu DK1622 (Wildtyp) nicht signifikant beeinflusst (Hinderberger, 2011). Der S-Bewegungsdefekt konnte im Komplementationsstamm SA3532 (Δ MXAN4463/*P_{pilA}*-MXAN4463) durch die Integration von MXAN4463 unter der Kontrolle des konstitutiv-aktiven *pilA*-Promotors in die „phage Mx8 *attB*-site“ komplementiert werden (Hinderberger, 2011). Die Erforschung der Funktion von MXAN4463 in der S-Bewegung ist Bestandteil aktueller Untersuchungen.

Die Deletionsmutante SA3533 (Δ MXAN5791) zeigte weder einen signifikanten Unterschied in der A- und S-Bewegung noch in der Entwicklungsfähigkeit im Vergleich zu DK1622 (Wildtyp) (Hinderberger, 2011). Unter den getesteten Bedingungen ist MXAN5791 für *M. xanthus* nicht essentiell und keiner der getesteten Funktionen zuzuordnen.

2.4.4 c-di-GMP beeinflusst den koordinierten Ablauf des Entwicklungsprogramms

Eine weitere Möglichkeit, den Einfluss von c-di-GMP auf *M. xanthus* zu untersuchen, besteht darin, die intrazelluläre c-di-GMP-Konzentration zu manipulieren. In dem man heterologe Gene, die für aktive DGC bzw. PDE kodieren, hinter einem starken Promotor exprimiert, lässt sich die natürliche c-di-GMP-Konzentration in der Zelle erhöhen bzw. senken. Auf diese Weise konnte für *Shewanella oneidensis* gezeigt werden, dass die Ausbildung von Biofilmen abhängig von der intrazellulären c-di-GMP-Konzentration ist (Thormann *et al.*, 2006).

Für die Manipulation der zellulären c-di-GMP-Konzentration in *M. xanthus* wurden drei Überexpressions-Plasmide hergestellt (4.3.5), auf denen die Gensequenzen hinter dem konstitutiv-aktiven *pilA*-Promotor und mit einer C-terminalen StrepII-Peptid-Sequenz kloniert wurden. Diese Zielgene kodieren für die zwei GGDEF-Domänenproteine VCA0956 (*V. cholerae*) und PleD* (*C. crescentus*) bzw. das EAL-Domänenprotein YhjH (*S. typhimurium*). Die Funktion der DGC VCA0956 ist bisher unbekannt, allerdings zeigte eine Überexpression von VCA0956 in *V. cholerae* im Vergleich zum Wildtyp eine verminderte Produktion des Cholera-toxins (Tischler & Camilli, 2005). PleD ist ein RR und an der Regulation des Zellzyklus in *C. crescentus* beteiligt (Abel *et al.*, 2011, Paul *et al.*, 2007). PleD* ist eine genetisch-manipulierte Version des RR, die durch mehrere Punktmutationen eine erhöhte Diguanylatzyklase-Aktivität im Gegensatz zum nativen Protein besitzt (Paul *et al.*, 2007). YhjH ist eine PDE, die das Schwärm- und Schwimmverhalten und somit die Virulenz von *S. typhimurium* beeinträchtigt (Ryjenkov *et al.*, 2006). Die drei Überexpressions-Plasmide wurden jeweils in die „phage Mx8 *attB*-site“ des Wildtyps DK1622 integriert (4.3.7) und die generierten Mutantenstämme SA3526 (VCA0956-*strepII*), SA3527 (*yhjH*-*strepII*) und SA3528 (*pleD**-*strepII*) auf Unterschiede zum Wildtyp in der Bewegung und der Entwicklung hin analysiert.

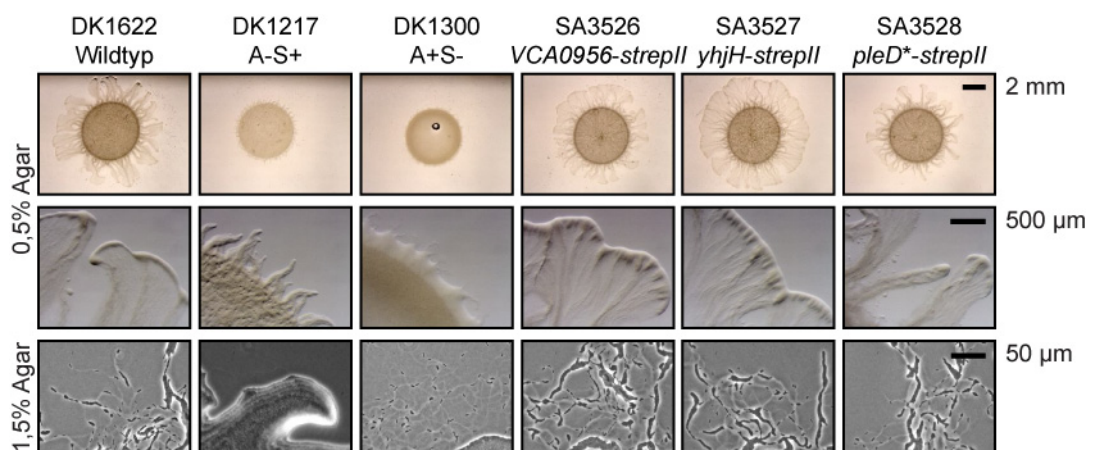


Abbildung 26: Bewegungsstudie von SA3526, SA3527 und SA3528

Bewegungsstudie von SA3526 (VCA0956-*strepII*), SA3527 (*yhjH*-*strepII*) und SA3528 (*pleD**-*strepII*) im Vergleich zu DK1622 (Wildtyp) und den Kontrollstämmen DK1217 (A-S+) und DK1300 (A+S-). Die Konzentration der Agaroberfläche sowie die Längenstandards sind dargestellt.

Abbildung 26 zeigt die Bewegungsstudien der Stämme SA3526 (*VCA0956-strepII*), SA3527 (*yhjH-strepII*) und SA3528 (*pleD*-strepII*) im Vergleich zu DK1622 (Wildtyp). Betrachtet man die Kolonierandmorphologien der generierten Stämme SA3526 (*VCA0956-strepII*), SA3527 (*yhjH-strepII*) und SA3528 (*pleD*-strepII*) so lässt sich im Vergleich zum Wildtyp weder in der A- noch der S-Bewegung ein signifikanter Unterschied erkennen.

Eine Immunblot Analyse auf das Vorhandensein der StrepII-Fusionsproteine in vegetativen Zellen von SA3526 (*VCA0956-strepII*), SA3527 (*yhjH-strepII*) und SA3528 (*pleD*-strepII*) wurde, wie in 4.4.3 beschrieben, durchgeführt. Abbildung 27 zeigt, dass nur eine schwache Bande von PleD*-strepII detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu waren VCA0956- und YhjH-strepII nicht detektierbar.

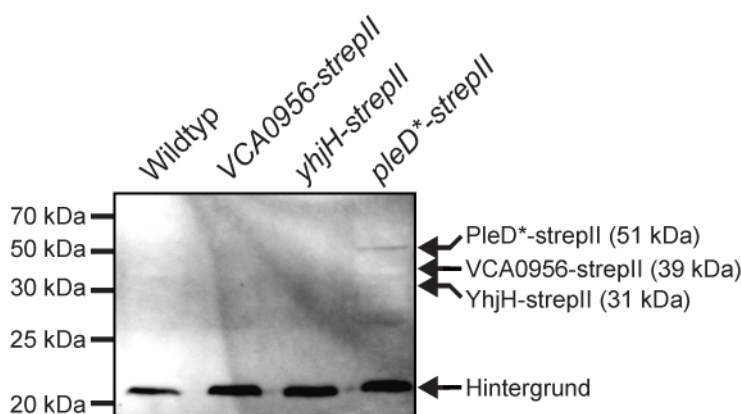


Abbildung 27: Nachweis von StrepII-Fusionsproteinen in vegetativen Zellen.

Immunblot Analyse mit Streptactin. Zelllysate von 10^9 Zellen wurden in einem 6 % SDS-Gel über PAGE getrennt. Links sind die Größenstandards des Proteinmarkers angegeben, schwarze Pfeile auf der rechten Seite kennzeichnen die erwartete Größe des entsprechenden Proteins.

Anschließend wurden SA3526 (*VCA0956-strepII*), SA3527 (*yhjH-strepII*) und SA3528 (*pleD*-strepII*) im Vergleich mit DK1622 (Wildtyp) und DK11063 (*fruA*) auf Defekte im Entwicklungszyklus hin untersucht (Abbildung 28). Während der Wildtyp nach 120 h Inkubation auf TPM- und CF-Agar und in MC7-Puffer jeweils reife, d. h. durch die Myxosporen dunkel gefärbte, Fruchtkörper gebildet hat, zeigte der Kontrollstamm DK11063 (*fruA*) wie erwartet keine Fruchtkörperbildung (Abbildung 28). Die Stämme SA3526 (*VCA0956-strepII*), SA3527 (*yhjH-strepII*) und SA3528 (*pleD*-strepII*) bilden wie DK1622 (Wildtyp) zwar Fruchtkörper aus, jedoch erscheinen diese auf CF-Agar sowie in MC7-Puffer deutlich weniger gereift und damit weniger dunkel gefärbt. Auf CF-Agar bilden SA3526, SA3527 und SA3528 jeweils leicht vergrößerte, aber deutlich hellere Fruchtkörper als in DK1622 (Wildtyp) aus. In MC7-Puffer

ist dieser leichte Defekt in der Fruchtkörperbildung noch etwas deutlicher zu erkennen (Abbildung 28).

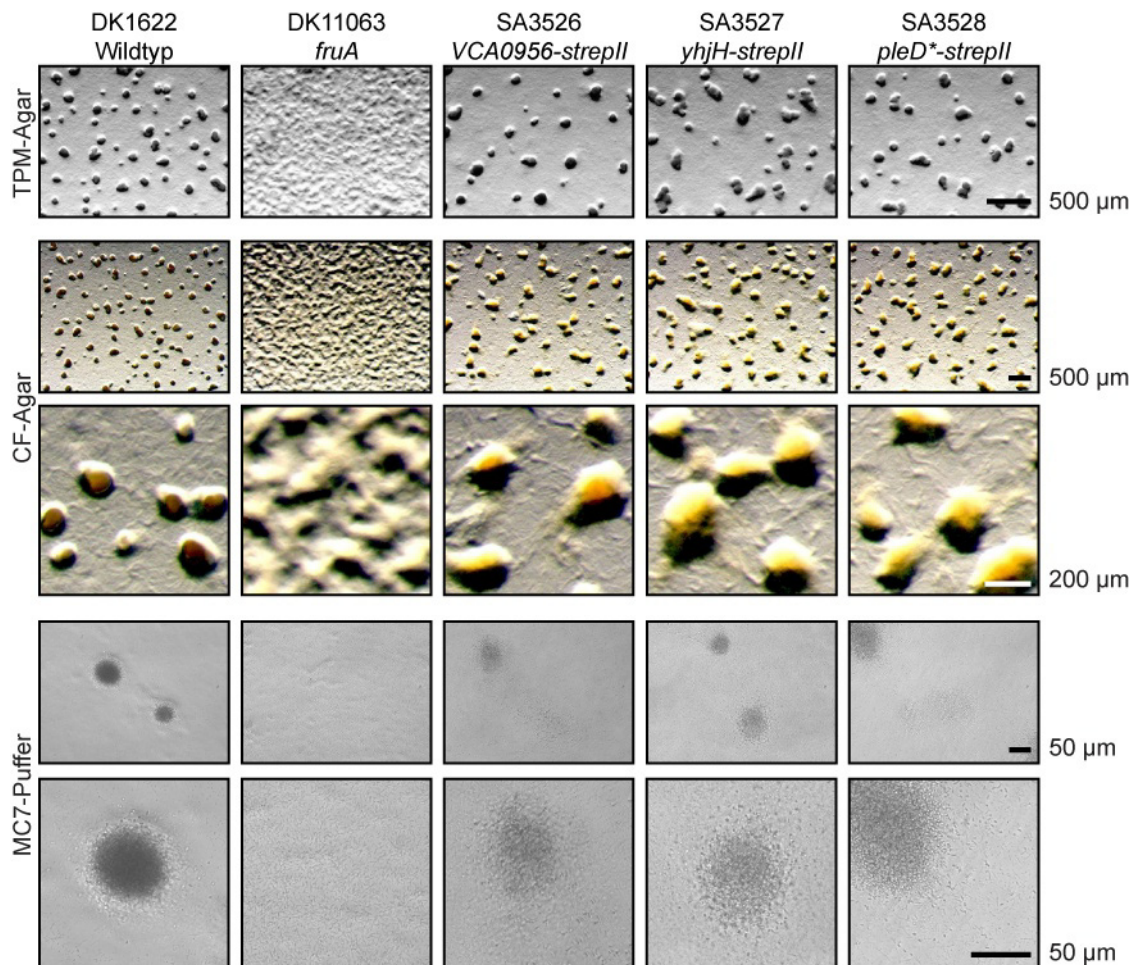


Abbildung 28: Entwicklungsstudie von SA3526, SA3527 und SA3528

Entwicklungsstudie von SA3526 (*VCA0956-strepII*), SA3527 (*yhjH-strepII*) und SA3528 (*pleD*-strepII*) im Vergleich mit DK1622 (Wildtyp) und dem Kontrollstamm DK11063 (*fruA*) nach 120 h im Hungerzustand. Die entsprechenden Medien sowie die Längenstandards sind dargestellt. Die zweite Bildzeile von CF-Agar und MC7-Puffer zeigt jeweils einen vergrößerten Bildausschnitt des darüber angeordneten Bilds.

Nach 6 h bzw. 24 h Inkubation bei 32 °C in MC7-Puffer wurden die Zellen von SA3526 (*VCA0956-strepII*), SA3527 (*yhjH-strepII*) und SA3528 (*pleD*-strepII*) geerntet und mit den Zelllysaten wurde ein Immunblot mit Strep-Tactin durchgeführt (4.4.3). Eine Detektion der StrepII-Fusionsproteine war nicht möglich.

Die Mutanten SA3526, SA3527 und SA3528 zeigen keine signifikante Veränderung in der A- oder S-Bewegungsfähigkeit. Allerdings zeigen alle drei Mutanten einen leicht gestörten Ablauf des Entwicklungsprogramms, was sich

in einer verminderten Reifung der Fruchtkörper äußert. Da sowohl DGC als auch PDE die zelluläre c-di-GMP-Konzentration beeinflussen, könnte aus den beobachteten Ergebnissen geschlossen werden, dass die Fruchtkörperbildung abhängig von der Konzentration von c-di-GMP ist. Um diese Hypothese zu bestätigen, sind weitere Untersuchungen nötig.

3 Diskussion

3.1 Die Identifikation eines neuen TCS in *M. xanthus*

3.1.1 Die Charakterisierung der Histidinkinase SgmT

SgmT ist eine Hybrid-Histidinkinase (Hybrid-HK), die als essentielles Protein für die S-Bewegung identifiziert wurde (Youderian & Hartzell, 2006). Übereinstimmend mit dem berichteten S-Bewegungsdefekt der *sgmT*-Insertionsmutante von Youderian und Hartzell (Youderian & Hartzell, 2006) zeigt auch die in dieser Arbeit generierte Δ *sgmT*-Deletionsmutante diesen Defekt.

Aus der Literatur sind drei zelluläre Strukturen bekannt, die für eine korrekte Ausführung der S-Bewegung essentiell sind: Unipolare Typ-IV-Pili (T4P), das O-Antigen von Lipopolysacchariden (LPS) und die Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) (Konovalova *et al.*, 2010). Basierend auf biochemischen und mikroskopischen Daten ist der Aufbau und die Lokalisierung von T4P in Δ *sgmT* nicht beeinträchtigt und der Anteil von LPS O-Antigen leicht reduziert. Der Anteil von Exopolysacchariden (EPS) in der ECM von Δ *sgmT* ist, im Gegensatz zu Wildtyp, um etwa zweieinhalbmal höher. EPS sind als ein bevorzugtes Substrat für die Anhaftung von T4P während der S-Bewegung von *M. xanthus* bekannt (Black *et al.*, 2006) und daher ist die korrekte Zusammensetzung der EPS essentiell. Beispielsweise zeigen verschiedene Dif-Mutanten, die einen höheren oder einen niedrigeren Anteil an EPS in der ECM akkumulieren, einen Defekt in der S-Bewegung (Black & Yang, 2004). Deshalb ist zu vermuten, dass der beobachtete S-Bewegungsdefekt von Δ *sgmT* nicht auf defekte T4P oder den reduzierten Anteil an LPS O-Antigen zurückzuführen ist, was auch experimentell ausgeschlossen werden konnte, sondern auf den nachweisbar erhöhten EPS-Anteil in der ECM der Zellen.

Neben einer Histidinkinase- und einer Empfängerdomäne besitzt die Hybrid-HK SgmT eine N-terminale GAF-Domäne und eine C-terminale GGDEF-Domäne. In genetischen Studien dieser Arbeit wurde die Funktion der einzelnen Domänen von SgmT untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Deletion der GAF-Domäne sowie die Substitution des konservierten Histidins mit Alanin (H336A) in der Kinasedomäne *in vivo* in einem S-Bewegungsdefekt der Zellen resultiert, der vergleichbar mit dem von Δ *sgmT* ist. Folglich ist die N-

terminale GAF-Domäne und die Histidinkinasedomäne essentiell für die Funktion von SgmT *in vivo*.

GAF-Domänen findet man in einer Fülle von Proteinen, in denen sie typischerweise die Aktivität von benachbarten enzymatisch-aktiven Domänen, z. B. Histidinkinasedomänen, regulieren. Als Sensoren binden GAF-Domänen unterschiedliche Liganden, wie zyklische Nukleotide (Heikaus *et al.*, 2009), Aminosäuren (Levdikov *et al.*, 2006) oder Gase (Tucker *et al.*, 2008, Vos *et al.*, 2012). Die Vermutung, dass c-di-GMP als Ligand an die SgmT GAF-Domäne bindet, konnte durch eine c-di-GMP-Affinitätsstudie *in vitro* nicht bestätigt werden (2.1.5), so dass der zugehörige Ligand weiterhin unbekannt ist. Die Identifikation dieses Liganden stellt eine herausfordernde Aufgabe für die Zukunft dar, weil für GAF-Domänen bislang mehrere Liganden identifiziert wurden, die sich strukturell stark unterscheiden (Levdikov *et al.*, 2006, Tucker *et al.*, 2008, Heikaus *et al.*, 2009, Vos *et al.*, 2012). Vermutlich führt die Bindung des Liganden zu einer Konformationsänderung in SgmT, wodurch die Aktivierung der Histidinkinasedomäne und die Autophosphorylierung am konservierten Histidinrest (H336) erfolgen.

Innerhalb der Mikroorganismen, für die ein sequenziertes Genom vorliegt, ist ein homologes Protein zu SgmT in sechs Myxobakterienarten (*M. xanthus*, *M. macrosporus*, *M. fulvus*, *M. stipitatus*, *C. coralloides* und *S. aurantiaca*) zu finden. Da neben der kompletten Domänenstruktur auch die degenerierte A-site und die intakte I-site in der C-terminalen GGDEF-Domäne in den homologen SgmT-Proteinen konserviert vorliegen, ist zu vermuten, dass ein hoher selektiver Druck zur evolutionären Erhaltung der GGDEF-Domäne vorlag, der für eine essentielle Funktion der Domäne spräche. Überraschenderweise zeigen Mutationen in der GGDEF-Domäne *in vivo* weder einen Defekt in der S-Bewegung noch im Entwicklungszyklus von *M. xanthus*. Basierend auf Sequenzvergleichen mit anderen GGDEF-Domänen besitzt die GGDEF-Domäne von SgmT eine, wie oben bereits erwähnte, degenerierte A-site, so dass eine Diguanylatzyklase-Aktivität ausgeschlossen werden kann (Malone *et al.*, 2007). Allerdings liegen die Aminosäurereste der I-site in SgmT konserviert vor. *In vitro* Affinitätsstudien dieser Arbeit zeigten, dass sowohl SgmT als auch die isolierte SgmT GGDEF-Domäne den sekundären Botenstoff c-di-GMP

binden können und dass diese Bindung von einer intakten I-site abhängt, da die I-site-Mutante keine Bindung zu c-di-GMP zeigt. Nachfolgende Lokalisierungsstudien *in vivo* zeigten, dass SgmT in Abwesenheit der GGDEF-Domäne bzw. ohne intakte I-site diffus in der Zelle verteilt ist, während SgmT mit einer intakten I-site hauptsächlich in einem oder zwei Clustern entlang der Längsachse der Zelle angeordnet sind. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die GGDEF-Domäne als c-di-GMP-Rezeptor dient und dass eine Funktion der c-di-GMP-Bindung an die I-site für die räumliche Anordnung von SgmT in der Zelle verantwortlich sein könnte. Eine ähnliche Funktion für eine GGDEF-Domäne mit einer degenerierten A-site und einer intakten I-site wurde für den RR PopA in *C. crescentus* beschrieben, dessen polare Anordnung abhängig von der c-di-GMP-Bindung an die I-site ist (Duerig *et al.*, 2009).

Die vorliegenden genetischen und biochemischen Daten lassen keine Rückschlüsse auf die Funktion der SgmT-Empfängerdomäne zu. Unter den getesteten Bedingungen ist die Empfängerdomäne nicht essentiell für die Funktion von SgmT. Dennoch lässt die Konservierung der Empfängerdomäne in homologen SgmT-Proteinen vermuten (Abbildung 8), dass während der Evolution der Myxococcales ein hoher Selektionsdruck vorgeherrscht hat, um diese Domäne zu erhalten. Für den RR PleD aus *C. crescentus*, der aus zwei N-terminalen Empfängerdomänen und einer C-terminalen GGDEF-Domäne besteht, wurde gezeigt, dass die benachbarte Empfängerdomäne einen Argininrest (R178) enthält, der die Bindung von c-di-GMP an die I-site der GGDEF-Domäne unterstützt (Chan *et al.*, 2004). Ein Sequenzvergleich mit der zweiten Empfängerdomäne von PleD zeigte, dass dieser Argininrest (R590) in SgmT von *M. xanthus* sowie in den jeweiligen homologen Proteinen anderer Myxococcales konserviert vorliegt. Folglich besteht die Möglichkeit, dass R590 in SgmT eine unterstützende Funktion in der Bindung von c-di-GMP besitzt und deshalb die Empfängerdomäne evolutionär erhalten blieb.

3.1.2 Die Identifikation des SgmT/DigR-TCS und dessen Regulon

Nach der funktionellen Charakterisierung von SgmT wurde der korrespondierende RR gesucht. Da eine Punktmutation (H336A) in der Kinasedomäne *in vivo* ausreicht, einen Defekt in der S-Bewegung auszulösen,

wurde vermutet, dass die Phosphorylierung des korrespondierenden RR essentiell für die S-Bewegung ist. Folglich sollte die Deletionsmutante des korrespondierenden RR ebenso einen Defekt in der S-Bewegung besitzen. Als weiteres Kriterium sollte das Gen des korrespondierenden RR ebenso „verwaist“ sein wie *sgmT*. DigR erfüllt die beiden aufgestellten Kriterien (Overgaard *et al.*, 2006) und in genetischen Untersuchungen zeigten $\Delta digR$, $\Delta sgmT$ sowie die Doppelmutante $\Delta digR \Delta sgmT$ den jeweils identischen Phänotyp. Zusätzlich zu den genetischen Daten lässt die hohe Anzahl an übereinstimmend signifikant-regulierten Genen in den vergleichenden Transkriptomstudien von $\Delta digR$ und $\Delta sgmT$ mit Wildtyp darauf schließen, dass SgmT und DigR Bestandteile desselben Signaltransduktionswegs sind.

In vitro Phosphorylierungsstudien zeigten einen direkten Nachweis für die Autophosphorylierung des konservierten Histidinrests (H336) in der isolierten SgmT-Kinasedomäne und den Transfer von Phosphogruppen zum konservierten Aspartat (D53) in der Empfängerdomäne von DigR. Eine Übertragung der Phosphogruppen zur SgmT-Empfängerdomäne *in trans* konnte jedoch nicht detektiert werden. Dies bedeutet, dass die isolierte SgmT-Kinasedomäne eine deutlich höhere kinetische Präferenz für DigR als zur isolierten SgmT-Empfängerdomäne besitzt. Vergleicht man die Proteinsequenzen der Empfängerdomänen von SgmT und DigR, so unterscheiden sich diese mit nur 25 % Gleichheit und 43 % Ähnlichkeit recht stark voneinander. Zudem unterscheiden sich die Aminosäurereste, die die vermutete Kontaktfläche der jeweiligen Empfängerdomäne zur Kinasedomäne bilden und damit die Spezifität zueinander vermitteln (Capra *et al.*, 2010), zwischen SgmT und DigR deutlich voneinander (Anhang 1). *In vitro* kann die kinetische Präferenz von Hybrid-HK bei *in trans* Phosphogruppentransfers von der isolierten Kinasedomäne zu einem isolierten RR höher als zur eigenen isolierten Empfängerdomäne sein. Im Gegensatz dazu kann die kinetische Präferenz für den RR durch die räumliche Nähe der eigenen Empfängerdomäne *in cis* im kompletten Hybrid-HK-Protein übertroffen werden (Wegener-Feldbrügge & Søgaard-Andersen, 2009). Im Fall von SgmT scheint dies nicht zuzutreffen, da ein Phosphogruppentransfer zu DigR sowohl durch das komplette SgmT-Protein als auch mit einer Variante von SgmT, die nur aus der

Kinase- und der Empfängerdomäne besteht, beobachtet werden konnte. Folglich zeigte eine D615N-Substitution in der Empfängerdomäne von SgmT keine kinetische Steigerung in der Phosphogruppenübertragung zu DigR.

Hybrid-HK sind oft an gestaffelten Phosphogruppenübertragungen beteiligt, in denen die Phosphogruppen intern von der Kinase- zur Empfängerdomäne und weiter über eine Histidinphosphotransferase (Hpt) zur Empfängerdomäne eines Antwortregulators (RR) transferiert werden (Appleby *et al.*, 1996). Nach meinem Kenntnisstand wurde bisher kein direkter Phosphogruppentransfer einer HK aus einem gestaffelten System zum finalen RR dieses gestaffelten Systems beobachtet. Stattdessen konnte mehrfach gezeigt werden, dass der Phosphogruppentransfer zum RR streng von der korrespondierenden Hpt abhängt (Takeda *et al.*, 2001, Biondi *et al.*, 2006, Hsu *et al.*, 2008). Aufgrund dessen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen, dass SgmT und DigR Bestandteile eines gestaffelten Phosphorelais-Systems sind. Vielmehr lassen die genetischen und biochemischen Daten vermuten, dass die „verwaiste“ HK SgmT und der „verwaiste“ RR DigR korrespondierende Partner eines Zwei-Komponenten-System (TCS) sind, in dem Phosphogruppen von SgmT direkt auf DigR transferiert werden.

Phylogenetisch sind SgmT und DigR innerhalb der Ordnung Myxococcales hoch konserviert. Neben *M. xanthus* treten beide Proteine in fünf weiteren Spezies (*M. macrosporus*, *M. fulvus*, *M. stipitatus*, *C. coralloides* und *S. aurantiaca*) der Unterordnung Cystobacterineae auf (Abbildung 8). DigR liegt zusätzlich in *H. ochraceum* und *S. cellulosum* vor, die Vertreter der Unterordnungen Nannocystineae bzw. Sorangineae sind. Ein Sequenzvergleich zwischen den einzelnen DigR-Proteinen der Myxococcales zeigt, dass die Aminosäurereste, die vermutlich die Spezifität zur korrespondierenden HK vermitteln (Capra *et al.*, 2010), innerhalb der Cystobacterineae identisch sind, während sie in *H. ochraceum* und *S. cellulosum* erheblich davon abweichen (Anhang 5). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass DigR innerhalb der verschiedenen Unterordnungen der Myxococcales unterschiedliche korrespondierende Kinasen besitzt. In der Unterordnung der Cystobacterineae ist SgmT, basierend auf den genetischen und biochemischen Daten von *M. xanthus*, die korrespondierende HK von DigR. In *H. ochraceum* und *S. cellulosum* sollte eine andere

HK die Funktion von SgmT übernehmen, vorausgesetzt, DigR wird wie in *M. xanthus* durch eine Phosphorylierung des konservierten Aspartats aktiviert (Overgaard *et al.*, 2006). In *S. cellulosum* kodiert eine Hybrid-HK (Sce0624) 815 bp „upstream“ von *digR* in der gleichen transkriptionellen Richtung, die vom strukturellen Aufbau leichte Ähnlichkeiten zu SgmT von *M. xanthus* zeigt (Abbildung 17). Sce0624 besteht aus zwei N-terminalen PAS/PAC-Domänen, einer GAF-, einer Kinase- und einer C-terminalen Empfängerdomäne. GAF-, Kinase- und Empfängerdomäne zeigen 43 %, 57 % bzw. 53 % Ähnlichkeit zu den korrespondierenden Domänen von SgmT in *M. xanthus* und sind zu 22 %, 35 % bzw. 28 % mit ihnen identisch. Auch wenn sich die Kinasedomänen von Sce0624 und SgmT nicht sehr ähneln, könnte Sce0624 die korrespondierende Kinase von DigR in *S. cellulosum* sein, da die Empfängerdomänen von DigR in beiden Spezies nur zu 74 % ähnlich und zu 47 % gleich sind und die Aminosäurereste, die die Spezifität zur korrespondierenden HK vermitteln (Capra *et al.*, 2010), deutliche Unterschiede aufweisen (Anhang 5).

Die Identifikation einer DigR-Bindestelle im *fibA*-Promotor erfolgte durch eine Kombination aus „DNase I Footprinting“- und „EMSA“-Studien. Die Sequenz dieser Bindestelle enthält ein distales Palindrom. Dies lässt darauf schließen, dass DigR als Dimer daran binden könnte, wie es beispielsweise für CRP im Promotor des *lac*-Operons in *E. coli* experimentell nachgewiesen wurde (Kolb *et al.*, 1983). Acht von 18 Genen, die in den Transkriptomstudien von Δ *sgmT* und Δ *digR* negativ exprimiert sind, besitzen in der jeweiligen Promotorregion (oder falls diese Bestandteil eines Operons sind, in der Promotorregion des jeweiligen Operons) eine Bindestelle mit einer ähnlichen Sequenz. Unter den 17 Genen die in Δ *digR* im Vergleich zum Wildtyp mindestens vierfach positiv exprimiert werden, besitzen sieben Gene eine Variante der DigR-Bindestelle in ihrer Promotorregion bzw. in der Promotorregion des jeweiligen Operons. Da DigR-Bindestellen in Promotoren identifiziert wurden, die in der Abwesenheit von SgmT und DigR sowohl negativ als auch positiv exprimiert werden, fungiert DigR vermutlich als transkriptioneller Aktivator und Repressor. Die genetische Lokalisierung von DigR-Operatorsequenzen ist vergleichbar mit der Lokalisierung von Operatorsequenzen für Aktivatoren und Repressoren in *E. coli* (Madan Babu & Teichmann, 2003, Cox

et al., 2007, van Hijum *et al.*, 2009). Eine Ausnahme bildet ausgerechnet die ungewöhnliche Lokalisierung der experimentell identifizierten Aktivatorsequenz im *fibA*-Promotor, die überlappend mit dem Transkriptionsstart im proximalen Teil des Promotors auftritt und nicht wie erwartet „upstream“ oder überlappend mit der Promotorsequenz selbst. Eine ähnliche Aktivatorsequenz zu der experimentell identifizierten DigR-Bindestelle wurde „upstream“ der -35-Promotorsequenz von *fibA* identifiziert (Anhang 4), die nur einen Teil des Palindroms besitzt (5´-TAATCGTAAATAACCTGAAATCTA). Weder in „DNase I Footprinting“- noch in „EMSA“-Studien konnte eine DigR-Bindung an diese Aktivatorsequenz beobachtet werden. Diese Studien wurden jeweils mit unphosphoryliertem DigR durchgeführt. In Untersuchungen von anderen RR mit DNA-Bindedomäne konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung des RR dessen Bindung zu Bindestellen mit niedriger Affinität stimuliert ohne die DNA-Sequenz *per se* zu ändern (Dahl *et al.*, 1997). Deshalb ist zu vermuten, dass die „upstream“ des Promotors identifizierte Aktivatorsequenz eine Bindestelle mit niedriger Affinität ist, die ausschließlich von phosphoryliertem DigR gebunden werden kann.

Vermutlich werden nicht alle 104 signifikant differentiell-exprimierten Gene in Δ *sgmT* und Δ *digR* direkt durch das SgmT/DigR-TCS reguliert. In den Promotorregionen von 35 differentiell-exprimierten Genen in Δ *sgmT* und Δ *digR* wurden für 15 Gene potentielle DigR-Bindestellen identifiziert. Dies lässt darauf schließen, dass die verbleibenden 20 Gene nicht direkt durch DigR reguliert, sondern vermutlich durch andere transkriptionelle Regulatoren beeinflusst werden. Unter den 104 differentiell-regulierten Genen in Δ *sgmT* und Δ *digR* kodieren zwei für DNA-bindende Regulatorproteine, von denen *mrpC* negativ und *MXAN1093* positiv exprimiert wird. Durch diese differentielle Regulation von *mrpC* und *MXAN1093* werden wahrscheinlich die Zielgene dieser Regulatoren differentiell-exprimiert, so dass sie indirekt-regulierte Gene von DigR darstellen.

Die acht negativ-exprimierten Gene in Δ *sgmT* und Δ *digR*, die eine DigR-Bindestelle besitzen, kodieren für die sekretierte Protease FibA, für einen in der äußeren Membran lokalisierten TonB-abhängigen Rezeptor, für zwei Vorläuferproteine von Lanthionin-Peptidantibiotika und für vier sekretierte Proteine mit

unbekannter Funktion, die ausschließlich im Genom von *M. xanthus* vorkommen (Huntley *et al.*, 2011). Die sieben positiv-exprimierten Gene in ΔsgmT und ΔdigR , die eine DigR-Bindestelle besitzen, kodieren für sechs sekretierte und zytoplasmatische Proteine mit unbekannter Funktion, die größtenteils phylogenetisch weit verbreitet sind, und für eine zytoplasmatisch lokalisierte Oxidase.

Ursprünglich wurden die *sgmT*- und *digR*-Mutanten aufgrund ihres S-Bewegungsdefekts identifiziert (Youderian & Hartzell, 2006, Overgaard *et al.*, 2006). Überraschenderweise befindet sich unter den differentiell-regulierten Genen in ΔsgmT und ΔdigR kein Gen, von dem bekannt ist, dass es direkt an der S-Bewegung oder der EPS-Biosynthese bzw. deren Transport beteiligt ist. Daher könnte man vermuten, dass das SgmT/DigR-TCS Gene aktiviert, die für sekretierte Proteine der ECM, wie beispielsweise FibA und vier Proteine mit unbekannter Funktion, sowie für Enzyme des Sekundärmetabolismus kodieren. In ΔsgmT und ΔdigR werden diese aktivierten Gene reduziert exprimiert, was die ECM-Zusammensetzung der Zellen beeinflusst und vermutlich zu einer vermehrten EPS-Sekretion als Kompensation für das Fehlen der Proteine bzw. der Metabolite führt. Es ist deshalb anzunehmen, dass der S-Bewegungsdefekt von ΔsgmT aufgrund eines vermehrten EPS-Anteil in der ECM auftritt, wie dies schon für ΔdigR vermutet wurde (Overgaard *et al.*, 2006). Dies könnte auch die leicht erhöhte Expression von katabolisch-aktiven Genen in ΔsgmT und ΔdigR erklären, die für Proteine des Zitratzyklus und der Atmungskette kodieren. Unter der Annahme, dass eine erhöhte Genexpression eine erhöhte Aktivität der entsprechenden Enzyme nach sich zieht, könnten auf diese Weise die Reduktionsäquivalente bzw. die Energie generiert werden, die für die Produktion von EPS benötigt werden. Eine frühere Studie belegt, dass der Proteinanteil der ECM in *M. xanthus* hauptsächlich aus Proteinen mit unbekannter Funktion besteht (Curtis *et al.*, 2007). Damit übereinstimmend kodieren einige der von SgmT/DigR regulierten Gene für *M. xanthus*-spezifische sekretierte Proteine mit unbekannter Funktion, die vermutlich in der ECM lokalisieren. Um die Funktion dieser Proteine zu entschlüsseln, sind genetische und biochemische Analysen geplant.

3.1.3 Das aktuelle Arbeitsmodell des SgmT/DigR-TCS

Zusammenfassend lassen die gesammelten Daten auf folgendes Arbeitsmodell schließen (Abbildung 29): Die GAF-Domäne fungiert als sensorisches Hauptelement um über einen noch unbekanntem Liganden die Kinaseaktivität von SgmT zu regulieren. Die GGDEF-Domäne stellt einen Rezeptor für den sekundären Botenstoff c-di-GMP dar, der SgmT abhängig von gebundenem c-di-GMP in Clustern entlang des Zellkörpers positioniert (Abbildung 29A). Im c-di-GMP-ungebundenen Zustand hingegen lokalisiert SgmT diffus innerhalb des Zytoplasmas der Zelle (Abbildung 29B).

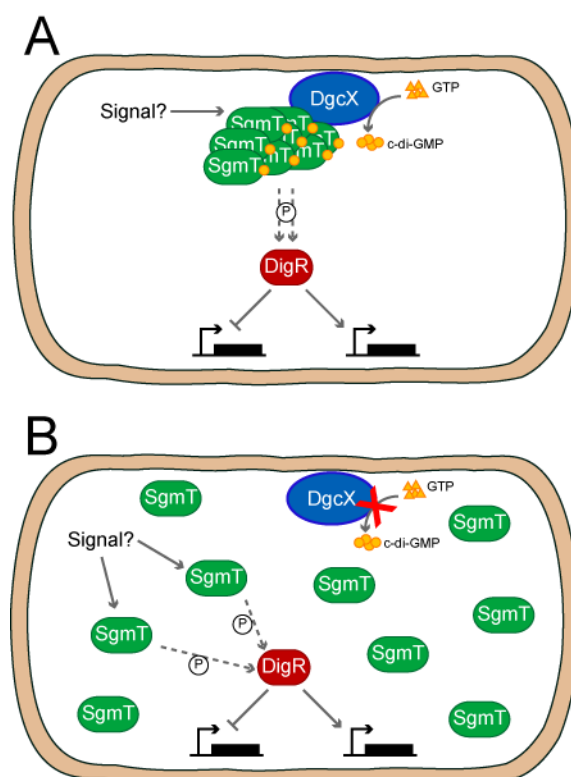


Abbildung 29: Das regulatorische Modell des SgmT/DigR-Regulons

Nach der Wahrnehmung eines unbekanntem Signals transferiert SgmT Phosphogruppen zu DigR, der die Transkription verschiedener Gene aktiviert bzw. reprimiert. Dieser Prozess ist unabhängig von der Lokalisierung von SgmT. (A) SgmT lokalisiert c-di-GMP-gebundener Form in Clustern der nicht-polaren Bereiche der Zelle, vermutlich zusammen mit einer noch unbekanntem c-di-GMP synthetisierenden Diguanylatzyklase (DgcX). (B) Stellt DgcX die c-di-GMP-Synthese ein bzw. ist die zelluläre c-di-GMP Konzentration niedrig, lokalisiert SgmT in der c-di-GMP-ungebundenen Form diffus in der Zelle. Ob und unter welchen Umständen die zelluläre Lokalisierung von SgmT essentiell ist, ist bisher unbekannt.

Nach meinem Kenntnisstand ist SgmT damit die erste HK, die als Rezeptor für c-di-GMP identifiziert wurde. Über die Funktion der c-di-GMP-abhängigen zellulären Positionierung von SgmT kann derzeit nur spekuliert werden. Mutationen in der GGDEF-Domäne *in vivo* zeigten im Vergleich zum Wildtyp keine phänotypischen Unterschiede unter den getesteten Bedingungen. Auch in *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten wurde weder die Autophosphorylierung von SgmT noch der Phosphogruppentransfer zu DigR durch c-di-GMP beeinflusst. Die einzige momentan bekannte Funktion der GGDEF-Domäne ist die c-di-GMP-abhängige zelluläre Positionierung von SgmT. Die

subzelluläre Lokalisierung von TCS-Proteinen spielt eine essentielle Rolle, um beispielsweise die Kreuzkommunikation von TCS-Proteinen zu minimieren (Scott *et al.*, 2010), eine asymmetrische Verteilung von Differenzierungsfaktoren nach der Zellteilung zu gewährleisten (Wheeler & Shapiro, 1999), eine räumliche Trennung einer HK von seinem Inhibitor vorzunehmen (Tsokos *et al.*, 2011), die Signalwahrnehmung zu verstärken (Dahlquist, 2002) und einen Signaltransduktionsprozess räumlich zu begrenzen (Abel *et al.*, 2011). Die vorliegenden Daten zeigen, dass unter den getesteten Bedingungen die SgmT-Variante ohne GGDEF-Domäne und natives SgmT keinen signifikanten Aktivitätsunterschied aufweisen. Unter gewissen Umständen könnte eine c-di-GMP-abhängige, räumliche Positionierung von SgmT eine Kreuzkommunikation von SgmT bzw. DigR mit anderen TCS-Proteinen verhindern.

Wie kann derselbe sekundäre Botenstoff, der durch unterschiedliche Proteine synthetisiert wird, verschiedene Zellantworten auslösen? Für c-di-GMP-abhängige Signaltransduktionswege wurde vorgeschlagen, dass Kreuzkommunikationen durch temporäre oder räumliche Trennungen verhindert werden, z. B. sind Proteine solcher Signalwege zeitlich zu unterschiedlichen Bedingungen in der Zelle präsent oder sie treten zeitlich gemeinsam auf, sind aber räumlich voneinander getrennt (Hengge, 2009). Danach existiert vermutlich mindestens ein weiteres katalytisch-aktives GGDEF-Domänenprotein (DgcX), das SgmT zu den Clustern rekrutiert (Abbildung 29A).

Um diese Hypothese zu unterstützen, ist die Identifikation dieses korrespondierenden Proteins geplant. Die Synthese von c-di-GMP obliegt nach jetzigem Kenntnisstand ausschließlich katalytisch-aktiven GGDEF-Domänenproteinen (Mills *et al.*, 2011). Bioinformatische Analysen lieferten 17 Proteine mit GGDEF-Domäne, für die bislang nur die Funktion von ActA (Gronewold & Kaiser, 2001) und SgmT charakterisiert wurde, die beide eine degenerierte A-site und eine intakte I-site besitzen. ActA ist ein RR mit N-terminaler Empfänger- und C-terminaler GGDEF-Domäne und koordiniert die Fruchtkörperbildung während des Entwicklungszyklus (Gronewold & Kaiser, 2001). Die Bewegungsfähigkeit ist von ActA unbeeinflusst (Gronewold & Kaiser, 2001). Elf der verbleibenden 15 GGDEF-Domänen besitzen eine katalytisch-aktive A-site und demnach sind diese Proteine potentielle Interaktionspartner von SgmT.

Da die subzelluläre Lokalisierung von SgmT abhängig von der Bindung zu c-di-GMP ist, erwartet man bei einer Reduzierung der zellulären c-di-GMP-Konzentration durch die Überproduktion einer Phosphodiesterase (PDE), dass SgmT diffus in der Zelle lokalisiert, wie es für SgmT ohne GGDEF-Domäne bzw. mit einer mutierten I-site gezeigt werden konnte.

3.2 Der Einfluss von c-di-GMP auf *M. xanthus*

In Bakterien werden zentrale zelluläre Prozesse wie die Zellbewegung (Huitema *et al.*, 2006), der Übergang von einer planktonischen zu einer sessilen Lebensweise (Simm *et al.*, 2004), die Regulation des Zellzyklus (Paul *et al.*, 2004), die Synthese von Exopolysacchariden (Rashid *et al.*, 2003) und die Expression von Virulenzgenen (Tischler & Camilli, 2005, Leduc & Roberts, 2009) vom sekundären Botenstoff c-di-GMP gesteuert. Diese Erkenntnisse zur zellulären Bedeutung von c-di-GMP wurden hauptsächlich an Enterobakterien, wie *E. coli* und *S. typhimurium*, den γ -Proteobakterien *V. cholerae* und *X. axonopodis* sowie dem α -Proteobakterium *C. crescentus* untersucht. Das Vorkommen von c-di-GMP beschränkt sich jedoch nicht nur auf Proteobakterien. Denn c-di-GMP-synthetisierende GGDEF-Domänen liegen in vielen bakteriellen Genomen konserviert vor, während in Eukaryoten und Archäen solche Proteine bislang nicht identifiziert werden konnten (Römling *et al.*, 2005, Mills *et al.*, 2011).

Lange Zeit war die Funktion von c-di-GMP in δ -Proteobakterien völlig unbekannt. Erst kürzlich wurde für *Bdellovibrio bacteriovorus* gezeigt, dass c-di-GMP für die Bewegungsfähigkeit und die Pathogenität dieses räuberischen Bakteriums essentiell ist (Hobley *et al.*, 2012). In *M. xanthus* wurden, neben einer c-di-GMP-abhängigen regulatorischen GEMM RNA-Domäne im Promotor von *MXAN4442* (Sudarsan *et al.*, 2008), 46 Proteine bioinformatisch identifiziert, die c-di-GMP-assoziierten konservierten Domänen von Effektoren und metabolisierenden Enzymen aufweisen. Korreliert man die Anzahl dieser Proteine mit der Größe des Genoms, so besitzt *M. xanthus* eine höhere Dichte an c-di-GMP-assoziierten Proteinen als beispielsweise *C. crescentus*, der im Vergleich nur 16 c-di-GMP-assoziierte Proteine bei einem nur etwa halb so

großen Genom besitzt. Dies lässt vermuten, dass c-di-GMP eine generelle Funktion in *M. xanthus* besitzt.

In *M. xanthus* liegen neben den 17 GGDEF-Domänenproteinen zwei EAL-, fünf HD-GYP- und 22 PilZ-Domänenproteine konserviert vor. Von diesen Proteinen wurden bisher nur die Funktionen von den GGDEF-Domänenproteinen SgmT und ActA untersucht (Gronewold & Kaiser, 2001). Während PilZ-Domänen ausschließlich als c-di-GMP-Rezeptoren bekannt sind, werden GGDEF-, EAL- und HD-GYP-Domänenproteine in c-di-GMP-generierende bzw. -spaltende Enzyme und c-di-GMP-bindende Rezeptoren unterteilt (Mills *et al.*, 2011). Basierend auf der Konservierung der Aminosäuren des jeweiligen enzymatisch-aktiven Zentrums besitzen 11 der 17 GGDEF-Domänenproteine eine Diguanylatzyklase-Aktivität (DGC) sowie beide EAL-Domänenproteine eine Phosphodiesterase-Aktivität (PDE). Da das Verständnis über die Struktur von HD-GYP-Domänen bisher nicht soweit fortgeschritten ist wie bei GGDEF- oder EAL-Domänen, lassen sich nur schwer funktionelle Vorhersagen über einzelne Aminosäuremotive treffen. Aufgrund von bioinformatischen Analysen besitzen nach jetzigem Kenntnisstand mindestens vier HD-GYP-Domänenproteine in *M. xanthus* eine PDE-Aktivität. Das GYP-Motiv des verbleibenden HD-GYP-Domänenprotein MXAN2807 besitzt eine weniger starke Konservierung und liegt dementsprechend leicht degeneriert vor (GTP). Noch ist unklar, ob diese Version des GYP-Motivs enzymatisch-aktiv ist oder ob MXAN2807 ein c-di-GMP-Rezeptorprotein ist.

Um den direkten Einfluss von c-di-GMP in *M. xanthus* zu untersuchen, wurde damit begonnen, Deletionsmutanten von Genen zu generieren, die für enzymatisch-aktive Proteine kodieren. Unter den getesteten Bedingungen zeigen die Deletionsmutanten Δ MXAN2424 und Δ MXAN2530 der beiden EAL-PDE kodierenden Gene den gleichen Phänotyp wie der Wildtyp. Ein Grund dafür könnte sein, dass beide Proteine redundant zueinander sind, d.h. in Δ MXAN2424 übernimmt die verbleibende EAL-PDE MXAN2530 die Funktion von MXAN2424 und in Δ MXAN2530 entsprechend umgekehrt. Die Ähnlichkeit und Gleichheit der beiden EAL-Domänen zueinander ist mit 47 % bzw. 32 % relativ gering, weshalb die Frage einer funktionellen Redundanz nur durch die phänotypischen Analyse einer Doppel-Deletionsmutante (Δ MXAN2424

Δ MXAN2530) beantwortet werden kann. Die Herstellung einer solchen Doppelmutante ist in Planung. Auch eine funktionelle Redundanz der EAL-Domänenproteine zu den Proteinen der HD-GYP-Familie ist nicht auszuschließen. Im Rahmen der Bachelorarbeit von Isabel Hinderberger wurden die Deletionmutanten von *MXAN4463* und *MXAN5791* generiert, die beide für einen RR mit einer potentiell enzymatisch-aktiven GGDEF-Domäne kodieren (Hinderberger, 2011). Nach der phänotypischen Charakterisierung dieser beiden Mutanten zeigte Δ MXAN4463 einen Defekt in der S-Bewegung, während die A-Bewegung sowie die Entwicklungsfähigkeit nicht beeinträchtigt waren (Hinderberger, 2011). Im Gegensatz dazu wurde für Δ MXAN5791 unter den getesteten Bedingungen kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp beobachtet (Hinderberger, 2011). Vermutlich ist *MXAN5791*, ähnlich wie die EAL-Domänenproteine *MXAN2424* und *MXAN2530*, weder an der Regulation der Bewegungsfähigkeit noch des Entwicklungsprogramms beteiligt oder dessen Funktion ist redundant gegenüber anderen DGC. Im Gegensatz dazu ist der S-Bewegungsdefekt von Δ MXAN4463 ein erster Hinweis darauf, dass c-di-GMP an der Bewegungsregulation von *M. xanthus* beteiligt sein könnte. Bei der Wiederholung des Experiments konnte der beobachtete S-Bewegungsdefekt von Δ MXAN4463 nicht bestätigt werden (Skotnicka, persönliche Korrespondenz). Allerdings zeigte die Überexpression von *MXAN4463-yfp* unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *pilA*-Promotors einen reproduzierbaren S-Bewegungsdefekt (Skotnicka, persönliche Korrespondenz). Inwiefern *MXAN4463* die S-Bewegung beeinflusst, ist nach aktuellem Kenntnisstand nicht zu beantworten. Man könnte vermuten, dass entweder die Funktionalität oder die Synthese von T4P, die Produktion von EPS oder die Akkumulierung von LPS O-Antigen durch die Überexpression von *MXAN4463-yfp* beeinträchtigt ist. Dies wird gegenwärtig untersucht. Darüber hinaus wird die Funktionalität von *MXAN4463* durch die Generierung von Punktmutationen in der Empfänger- und der GGDEF-Domäne überprüft sowie die zelluläre Lokalisierung von *MXAN4463* mit Hilfe eines *MXAN4463*-YFP-Fusionsproteins identifiziert.

Neben der Deletion von enzymatisch-aktiven DGC oder PDE kann die zelluläre c-di-GMP-Konzentration durch die heterologe Überexpression von enzymatisch-aktiven DGC und PDE beeinflusst werden (Thormann *et al.*, 2006,

Tran *et al.*, 2011). In *M. xanthus* wurden Gene, die für zwei DGC (VCA0956 von *V. cholerae* und PleD* von *C. crescentus*) und eine PDE (YhjH von *S. typhimurium*) kodieren, jeweils mit der Gensequenz des StreptII-Peptids fusioniert und über den *pilA*-Promotor exprimiert. Über diesen starken Promotor wird *pilA* in der vegetativen Wachstumsphase und während des Entwicklungsprogramms von *M. xanthus* konstitutiv exprimiert (Wu & Kaiser, 1997). Um den Einfluss der Überexpression dieser Gene phänotypisch zu untersuchen, wurden Bewegungs- und Entwicklungsstudien mit den drei Überexpressionsstämmen durchgeführt. Die heterologe Überexpression der DGC- bzw. PDE-kodierenden Gene zeigte im Vergleich zum Wildtyp keinen signifikanten Unterschied in der A- und S-Bewegung. Interessanterweise zeigten die drei Überexpressionsstämmen jeweils einen leichten Defekt in der Aggregation zu Fruchtkörpern während des Entwicklungsprogramms, die sich in der verminderten Reifung der Fruchtkörper äußerte. Es ist zu vermuten, dass auch die Lebensfähigkeit der Sporen von den Überexpressionsstämmen, wie in anderen Stämmen mit einem Aggregationsdefekt (Gronewold & Kaiser, 2001), stark beeinträchtigt ist. Dies gilt es experimentell zu prüfen.

Die Beobachtung, dass die Erhöhung der c-di-GMP-Konzentration durch die Überproduktion von DGC und die Senkung der c-di-GMP-Konzentration durch die Überproduktion der PDE den gleichen Phänotyp zeigen, ist sehr überraschend, weil unterschiedliche Effekte bei hohen bzw. niedrigen c-di-GMP-Konzentrationen in anderen Organismen beschrieben wurden (Böhm *et al.*, 2010, Thormann *et al.*, 2006). Ein Defekt in der Aggregation zu Fruchtkörpern wurde z. B. für $\Delta actA$ gezeigt (Gronewold & Kaiser, 2001). Als Bestandteil des *act*-Operons wird *actA* mit vier weiteren Genen kotranskribiert, die für einen transkriptionellen σ^{54} -Aktivator (ActB), eine Cystein-Protease (ActD) und zwei Proteine mit unbekannter Funktion (ActC und ActE) kodieren (Gronewold & Kaiser, 2007). ActA ist ein RR, der eine GGDEF-Domäne mit degenerierter A-site (GDCQF) und intakter I-site (RDAD) besitzt und dessen Funktion bislang unbekannt ist. Möglicherweise fungiert ActA aufgrund der konservierten I-site in der GGDEF-Domäne, als c-di-GMP-Rezeptor, der in Abhängigkeit seines c-di-GMP-Bindestatus mit anderen Proteinen interagiert oder zellulär differentiell lokalisiert. Wenn dieser c-di-GMP-Bindestatus von ActA sich während der

Entwicklung dynamisch verändert und ein Wechsel zwischen der c-di-GMP-gebundenen und -ungebundenen Form von ActA notwendig ist, um reife Fruchtkörper zu bilden, könnte dies die Aggregations-Phänotypen der drei Überexpressionsstämme von DGC- und PDE-Genen erklären. Neben dieser einfachen Erklärung könnten aber auch mehrere c-di-GMP-assoziierte Proteine diesen Defekt auslösen.

Bisher wurde nur vermutet, dass der beobachtete Phänotyp der Überexpressionsstämme auf die Veränderung der zellulären c-di-GMP-Konzentrationen zurückzuführen ist. Die experimentelle Bestimmung der zellulären c-di-GMP-Konzentration, wie die von *E. coli* (Spangler *et al.*, 2010), wurde für *M. xanthus* bisher nicht erfolgreich durchgeführt. Da die Optimierung der einzelnen Schritte, wie die Zellernte, die Zellyse und die Pufferauswahl, sowie die eigentliche Messung mitunter sehr aufwendig sein kann (Spangler *et al.*, 2010), wurde stattdessen die Akkumulierung der Fusionsproteine mit Immunblot in vegetativen und entwickelnden Zellen untersucht. In vegetativen Zellen wurde nur eine geringe Menge von PleD*-strepII bei einer hohen Belichtungsdauer detektiert. Das lässt darauf schließen, dass die Fusionsproteine in *M. xanthus* sehr labil sind und nach der Synthese schnell abgebaut werden, so dass eine vermehrte zelluläre Akkumulierung nicht möglich ist. Auch eine Störung der Translation durch eine andere „Codon Usage“ könnte die geringe Akkumulierung der Fusionsproteine erklären (Hoekema *et al.*, 1987). Ein Faktor, der die „Codon Usage“ beeinflusst, ist der unterschiedliche GC-Gehalt (Ermolaeva, 2001), der in *M. xanthus* 69 % beträgt. Im Vergleich mit den Wirtsstämmen der generierten Fusionsproteine besitzt *C. crescentus* mit 67 % einen ähnlich hohen GC-Gehalt wie *M. xanthus*, während er bei *V. cholerae* und *S. typhimurium* mit 47 % bzw. 53 % deutlich niedriger ist. Die Akkumulierung der drei Fusionsproteine, inklusive PleD*-strepII, in sich entwickelnden Zellen konnte mittels Immunblot nicht detektiert werden. Neben den oben aufgeführten Gründen könnten technische Probleme eine Rolle gespielt haben, z. B. dass für die Detektion der Proteine die Anzahl der untersuchten Zellen zu gering war. Dass die beobachteten Aggregationsdefekte in den drei Stämmen von einer veränderten zellulären c-di-GMP-Konzentration durch die Überexpression von DGC bzw. PDE herrührt, kann daher nur vermutet werden. Deshalb ist die

Generierung von Punktmutationen in den katalytisch-aktiven Zentren der Enzyme von den Überexpressionsstämmen geplant, die in katalytisch-inaktiven Enzymen resultieren. Zeigen diese Mutanten einen Aggregationsphänotyp, der vergleichbar zum Wildtyp ist, so kann man daraus schließen, dass der beobachtete Aggregationsdefekt aufgrund veränderter c-di-GMP-Konzentrationen ausgelöst wurde.

Abschließend geben diese vorläufigen Ergebnisse einen ersten Hinweis darauf, dass c-di-GMP möglicherweise eine generelle Funktion in der Regulation von zellulären Prozessen in *M. xanthus* besitzt, neben der zellulären Positionierung von SgmT. Dennoch können bisher wenige Rückschlüsse daraus gezogen werden, wie c-di-GMP diese Prozesse beeinflusst oder welche Proteine direkt daran beteiligt sind. Durch die Generierung einzelner Deletionsmutanten der verbleibenden c-di-GMP-assoziierten Gene, die für metabolisierende Enzyme und Rezeptoren kodieren, sowie der Überexpression von c-di-GMP-metabolisierenden Enzymen aus *M. xanthus* soll zukünftig die Funktion von c-di-GMP in *M. xanthus* entschlüsselt werden.

Die Identifikation von starken c-di-GMP-metabolisierenden Enzymen erfolgt gegenwärtig durch die heterologe Überexpression der entsprechenden Gene in *E. coli*. Die Expression eines aktiven PDE-Gens stimuliert das Schwimmverhalten von *E. coli*, während dieses durch die Expression eines aktiven DGC-Gens behindert wird (Böhm *et al.*, 2010). Zusätzlich soll zukünftig die zelluläre c-di-GMP-Konzentration in vegetativ-wachsenden und entwickelnden Zellen bestimmt werden, um einen Eindruck zu bekommen, zu welchem Zeitpunkt im Lebenszyklus von *M. xanthus* c-di-GMP eine essentielle Rolle spielt. Durch die große Anzahl von c-di-GMP-assoziierten Proteinen besitzt *M. xanthus* das Potential, in Zukunft als ein Modellorganismus für das Studium komplizierter c-di-GMP-abhängigen Regulationswegen zu gelten.

4 Material und Methoden

4.1 Material und Chemikalien

Chemikalien und Antibiotika wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Fluka (Buchs, Schweiz), Difco (Heidelberg) und Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Radioaktiv-markiertes [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP wurde von der Firma Hartmann Analytics (Braunschweig) bezogen, c-di-GMP von der Firma Biolog (Bremen). Die verwendeten DNA-Marker „HyperLadder™“ stammten von der Firma Bioline (Luckenwalde), die verwendeten Proteinmarker („PageRuler™ Prestained Protein Ladder“, „PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder“, „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“) von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot). Synthetische Oligonukleotide wurden von Invitrogen (Karlsruhe) hergestellt. DNA-Sequenzierungen wurden zunächst mit dem „3130 Genetic Analyser“ von Applied Biosystems (Darmstadt) im Max-Planck-Institut in der Abteilung Ökophysiologie (Marburg) durchgeführt und später von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) übernommen.

4.1.1 Enzyme und Kitsysteme

Tabelle 3: Enzyme und Kits

Verwendung	Enzyme/Kits	Hersteller
DNA- Amplifikation	<i>Pfu</i> Ultra™II DNA-Polymerase	Stratagene (Amsterdam)
	BioTherm™ Taq DNA-Polymerase	Genecraft (Ares Biosciences, Köln)
	5 PRIME MasterMix	5 PRIME GmbH (Hamburg)
Restriktionsverdau	Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt a. M.) Fermentas (St. Leon-Rot)
	Antarctic Phosphatase®	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
Ligation	Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)
Reinigung von DNA-Fragmenten	Zymoclean™ Gel DNA Recovery	Zymo Research (HiSS-Diagnostics, Freiburg)
	DNA Clean & Concentrator™-5	
	NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel (Düren)
Plasmid-Präparation	Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research (HiSS-Diagnostics, Freiburg)

Verwendung	Enzyme/Kits	Hersteller
Reinigung von genomischer DNA	MasterPure™ DNA Purification Kit	Epicentre Biotechnologies (Wisconsin, USA)
DNA-Verdau	Ambion DNase I	Applied Biosystems (Darmstadt)
RNA-Präparation	RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
cDNA-Synthese	SuperScript® III Reverse Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
qRT-PCR	SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)

4.1.2 Verwendete Geräte

Tabelle 4: Geräte

Geräte	Typ	Hersteller
Zentrifugen	SORVALL RC 5B plus SORVALL-Ultra Pro 80 Multifuge 1 s-R Biofuge fresco Biofuge pico Centrifuge 5424 R Avanti J-26 XP Optima L-90K	Thermo Electron (Dreieich) Eppendorf (Hamburg) Beckman Coulter (Krefeld)
PCR-Geräte	Mastercycler personal Mastercycler epgradient	Eppendorf (Hamburg)
qRT-PCR-Geräte	7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems (Darmstadt)
Thermomixer	Thermomixer compact Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Agarosegel-Photographie	2UV-Transilluminator	UVP BioDoc-It-System (USA)
UV-Tisch	UVT_20 LE	Herolab (Wiesloch)
Ultraschall	Branson Sonifier 250	G. Heinemann (Schwäbisch Gmünd)
Gelelektrophoresekammer	Mini-Protean® 3 Cell	Bio-Rad (München)
Spektral-Photometer	Nanodrop ND-1000 Ultrospec 2100 pro	Nanodrop (Wilmington, USA) Amersham Biosciences (Freiburg)
Elektroporation	Gene Pulser® Xcell	Bio-Rad (München)

Geräte	Typ	Hersteller
Chemolumineszenzdetektoren	Luminescent Image Analyser LAS~4000	Fujifilm (Düsseldorf)
	Typhoon TRIO Variable Mode Imager	GE Healthcare (Freiburg)
Phosphoreszenzdetektor	Storm 840 PhosphorImager	GE Healthcare (Freiburg)
Proteintransfergeräte	Hoefer TE 77 semi-dry transfer unit	Amersham Biosciences (Freiburg)
	TransBlot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad (München)
	Bio-Dot® SF Microfiltration Apparatus	
Immunoblot Analyse	SNAP i.d. Protein detection system	Millipore (Schwalbach/Ts.)
Mikroskope	MZ75 Stereomikroskop	Leica (Wetzlar)
	DM IRE2 Inversmikroskop	
	CTR 6000 Fluoreszenzmikroskop	
	EM 301 Elektronenmikroskop	Philips (Eindhoven, Niederlande)
Microarray-Scanner	GenePix™ 4000B	Axon Scientific (Biozym, Hess. Oldendorf)
Massenspektrometer	4800Plus MALDI-TOF/TOF mass spectrometer	Applied Biosystems (Darmstadt)

4.1.3 Medien

Die in den nachfolgenden Tabellen (Tabelle 5 - Tabelle 10) beschriebenen Medien und Zusätze wurden nach der Herstellung entweder durch feuchte Hitze bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min autoklaviert oder mittels Filtration bei einer Porengröße von 0,22 µm (Millipore (Schwalbach/Ts.) bzw. Sarstedt (Nümbrecht)) sterilisiert (Sambrook & Russell). Zusätze wie Antibiotika oder Spurenelemente wurden später steril hinzugegeben.

Tabelle 5: Nährmedien für *E. coli*

Medium	Zusammensetzung (pro Liter)
Lysogeny Broth (LB) (Bertani, 1951)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl
LB-Agar	LB-Medium + 15 g Agar
Super Optimal Broth with Catabolite Repression (SOC) (Hanahan, 1983)	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 20 mM Glukose pH 7,0 MgCl ₂ und Glukose wurden nach dem Autoklavieren steril zugegeben

Tabelle 6: Autoinduktionsmedium für *E. coli*

Medium	Zusammensetzung
ZY	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 925 ml H ₂ O
NPS-Puffer (20x)	0,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 1 M KH ₂ PO ₄ 1 M Na ₂ HPO ₄ mit H ₂ O auf 1 Liter auffüllen pH 6,75
5052-Lösung (50x)	250 g Glyzerin 25 g Glukose 100 g Laktose mit H ₂ O auf 1 Liter auffüllen
ZYP-5052 Autoinduktionsmedium (Studier, 2005)	929 ml ZY 1 ml 1 M MgSO ₄ 50 ml NPS-Puffer (20x) 20 ml 5052-Lösung (50x)

Tabelle 7: Antibiotikazusätze in Medien für *E. coli*

Antibiotikum	Endkonzentration	Lösemittel
Ampicillin-Natriumsalz	100 µg/ml	H ₂ O
Chloramphenicol	50 µg/ml	100 % Ethanol
Kanamycinsulfat	100 µg/ml	H ₂ O
Tetrazyklin-Hydrochlorid	5 µg/ml	100 % Ethanol

Tabelle 8: Nährmedien und Zusätze für *M. xanthus*

Medium	Zusammensetzung (pro Liter)
1 % CTT (Hodgkin & Kaiser, 1977)	10 g Casiton 10 ml 1 M Tris, pH 8,0 1 ml 1 M K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,6 10 ml 0,8 M MgSO ₄ 1 ml Spurenelementelösung (1000 x)
1 % CTT-Agarplatten	1 % CTT-Medium + 15 g Agar
CTT-Weichagar	1 % CTT-Medium + 7,5 g Agar
CTTYE	1 % CTT-Medium + 2 g Hefeextrakt
Spurenelementelösung (1000 x)	15 g Titriplex III 136 mg ZnCl ₂ 250 mg CuSO ₄ x 5 H ₂ O 238 mg CoCl ₂ x 6 H ₂ O 200 mg Na ₂ Mo ₄ x 2 H ₂ O 200 mg MnSO ₄ x H ₂ O 2,8 g FeSO ₄ x 7 H ₂ O pH 7,0

Tabelle 9: Antibiotikazusätze in Medien für *M. xanthus*

Antibiotikum	Endkonzentration	Lösemittel
Gentamicinsulfat	10 µg/ml	H ₂ O
Kanamycinsulfat	40 µg/ml	H ₂ O
Oxytetracyclin-Dihydrat	10 µg/ml	0,1 M HCl

Tabelle 10: Medien für Bewegungs- und Entwicklungsstudien von *M. xanthus*

Medium	Zusammensetzung (pro Liter)
0,5 % CTT	5 g Casiton 10 ml 1 M Tris, pH 8,0 1 ml 1 M K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,6 10 ml 0,8 M MgSO ₄
A-Bewegungsagarplatten (Hodgkin & Kaiser, 1977)	0,5 % CTT-Medium + 15 g Agar
S-Bewegungsagarplatten (Hodgkin & Kaiser, 1977)	0,5 % CTT-Medium + 5 g Agar
TPM-Agarplatten (Manoil & Kaiser, 1980)	15 g Agar 10 ml 1 M Tris, pH 7,6 1 ml 1 M K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,6 10 ml 0,8 M MgSO ₄
CF-Agarplatten (Hagen <i>et al.</i> , 1978)	15 g Agar 10 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,0 1 ml 1 M K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,6 10 ml 0,8 M MgSO ₄ 15 ml 1 % CTT-Medium 5 ml 4 % (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ 5 ml 20 % (w/v) Natriumpyruvat 10 ml 20 % (w/v) Natriumzitat CTT-Medium, (NH ₄) ₂ SO ₄ , Natriumpyruvat und Natriumzitat wurden nach dem Autoklavieren steril zugegeben.
MC7-Puffer (Kuner & Kaiser, 1982)	10 mM MOPS, pH 7,0 1 mM CaCl ₂

4.2 Mikrobiologische Methoden

4.2.1 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

In dieser Arbeit wurde *E. coli* für die Klonierung von Plasmiden sowie für die heterologe Expression von Genen aus *M. xanthus* verwendet. Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte aerob bei 37 °C auf dem Horizontalschüttler „Innova

4000“ der Firma New Brunswick Scientific (Hamburg). Die Isolierung von Plasmiden erfolgte aus Übernachtskulturen im LB-Selektivmedium und nach einer Transformation von Plasmiden wurden die Zellen schüttelnd bei 37 °C im SOC-Medium kultiviert (Tabelle 5). Die heterologe Expression von Genen in *E. coli* erfolgte im ZYP-5052 Autoinduktionsmedium (Tabelle 6). Zur Selektion wurden entsprechende Antibiotika zugegeben (Tabelle 7). In Tabelle 11 sind die Stämme von *E. coli* aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Die langfristige Lagerung von *E. coli*-Stämmen erfolgte in Kryo-Röhrchen von Sarstedt (Nümbrecht) bei -80 °C. Zuvor wurde einer exponentiell-wachsenden Kultur 10 % (w/v) Glycerin zugegeben. Die kurzzeitige Lagerung von *E. coli* auf Agarplatten erfolgte bei 4 °C.

Tabelle 11: Verwendete *E. coli* Stämme

Stämme <i>E. coli</i>	Genotyp	Referenz
Mach1	$\Delta recA1398\ endA1\ tonA\ \Phi80\ \Delta lacM15\ \Delta lacX74\ hsdR(r_K^- m_K^+)$	Invitrogen (Karlsruhe)
Rosetta™ 2(DE3)	$F^- ompT\ hsdS_B(r_B^- m_B^-)\ gal\ dcm\ (DE3)\ pRARE2,\ Cam^R$	Novagen/Merck (Darmstadt)

4.2.2 Kultivierung und Lagerung von *M. xanthus*

Die Zellen von *M. xanthus* wurden aerob bei 32 °C im Dunkeln kultiviert. Als Standardmedium wurde 1 % CTT verwendet, welchem Spurenelementelösung zugegeben wurde (Hodgkin & Kaiser, 1977). Nach einer Transformation wurde *M. xanthus* im CTTYE-Medium kultiviert und mit Hilfe von CTT-Weichagar auf CTT-Agarplatten ausplattiert, denen ein Antibiotikum zur Selektion in entsprechender Konzentration zugesetzt war (Tabelle 9). Die in dieser Arbeit verwendeten *M. xanthus*-Stämme sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Die langfristige Lagerung von *M. xanthus*-Stämmen erfolgte analog jener von *E. coli* (4.2.1), jedoch wurden hier exponentiell-wachsende Zellen mit 4 % Glycerin (w/v) vermischt. Die kurzzeitige Lagerung auf Agarplatten erfolgte bei 18 °C im Dunkeln.

Tabelle 12: Verwendete *M. xanthus* Stämme

Stämme <i>M. xanthus</i>	Genotyp	Referenz
DK1622	Wildtyp	(Kaiser, 1979)
DK1217	<i>aglB1</i>	(Hodgkin & Kaiser, 1979)
DK1300	<i>sglG1</i>	(Hodgkin & Kaiser, 1979)
DK10410	$\Delta pilA$	(Wu & Kaiser, 1997)
DK11063	<i>fruA</i> : $\Omega 7540$ Tn5 <i>lac</i> , Kan ^R	(Søgaard-Andersen <i>et al.</i> , 1996)
SW501	<i>difE</i> ::Kan ^R	(Yang <i>et al.</i> , 1998)
HK1321	<i>wzm</i> :: Ω Kan ^R	(Bowden & Kaplan, 1998)
SA1804	$\Delta digR$	(Overgaard <i>et al.</i> , 2006)
SA3502	$\Delta sgmT$	diese Arbeit
SA3503	SA3502, <i>attB</i> ::pTP22, Tet ^R	diese Arbeit
SA3504	SA3502, <i>attB</i> ::pTP41, Tet ^R	diese Arbeit
SA3506	SA3502, <i>attB</i> ::pTP24, Tet ^R	diese Arbeit
SA3507	SA3502, <i>attB</i> ::pTP25, Tet ^R	diese Arbeit
SA3508	SA3502, <i>attB</i> ::pTP26, Tet ^R	diese Arbeit
SA3509	SA3502, <i>attB</i> ::pTP27, Tet ^R	diese Arbeit
SA3510	SA3502, <i>attB</i> ::pTP28, Tet ^R	diese Arbeit
SA3511	SA3502, <i>attB</i> ::pTP40, Tet ^R	diese Arbeit
SA3512	SA3502, <i>attB</i> ::pTP39, Tet ^R	diese Arbeit
SA3513	SA3502, <i>attB</i> ::pTP29, Tet ^R	diese Arbeit
SA3515	$\Delta digR \Delta sgmT$	diese Arbeit
SA3524	$\Delta MXAN2424$	diese Arbeit
SA3525	$\Delta MXAN2530$	diese Arbeit
SA3526	DK1622, <i>attB</i> ::pTP107, Kan ^R	diese Arbeit
SA3527	DK1622, <i>attB</i> ::pTP108, Kan ^R	diese Arbeit
SA3528	DK1622, <i>attB</i> ::pTP109, Kan ^R	diese Arbeit
SA3529	SA3502, <i>attB</i> ::pTP44, Tet ^R	diese Arbeit
SA3534	SA3502, <i>attB</i> ::pTP46, Tet ^R	diese Arbeit

4.2.3 Bewegungsstudien von *M. xanthus*

Zur phänotypischen Untersuchung der Bewegungsfähigkeit von *M. xanthus* wurden zunächst Übernachtskulturen aus der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₅₅₀ von 0,5 bis 0,9 (OD₅₅₀ von 0,7 entspricht

einer Zelldichte von 7×10^8 Zellen/ml) mittels Zentrifugation für 10 min bei 4.700 rpm geerntet. Danach wurde das Zellpellet im 1 % CTT-Medium auf eine berechnete Zelldichte von 7×10^9 Zellen/ml resuspendiert und jeweils 5 μ l der Zellsuspension auf Bewegungsagarplatten (Tabelle 10) getropft. Auf Bewegungsagarplatten mit 1,5 % Agar favorisiert *M. xanthus* die A-Bewegung (adventurous motility), wohingegen auf Bewegungsplatten mit 0,5 % Agar die S-Bewegung (social motility) vorgezogen wird (Hodgkin & Kaiser, 1977). Nach 24 h Inkubation bei 32 °C im Dunkeln wurden sowohl die Morphologie der Kolonie als auch deren Rand mikroskopisch festgehalten. Dabei wurden Aufnahmen mit 8- bzw. 50-facher Vergrößerung mit Hilfe des Leica MZ75 Stereomikroskop (Wetzlar) sowie Bilder mit 400-facher Vergrößerung mit Hilfe des Leica DM IRE2 Inversmikroskop (Wetzlar) aufgenommen und mit der Leica DFC280 Kamera (Wetzlar) festgehalten. Anschließend wurden die Aufnahmen mit IrfanView (Version 4.27) von Irfan Skiljan (Technische Universität, Wien) bearbeitet.

4.2.4 Untersuchung zur Farbstoffbindung an *M. xanthus*

Für die Untersuchung des Exopolysaccharidanteils in verschiedenen Stämmen von *M. xanthus* wurde den Bewegungsagarplatten der Farbstoff Kongorot bzw. Trypanblau in der Konzentration von 20 μ g/ml hinzugegeben. Diese Farbstoffe binden an Exopolysaccharide, die ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix sind (Ramaswamy *et al.*, 1997). Die Zellen wurden analog, wie in 4.2.3 beschrieben, behandelt. Nach 24 h Inkubation bei 32 °C im Dunkeln wurde der Farbzustand der Kolonie photographisch dokumentiert.

Um den jeweiligen Anteil an Exopolysacchariden zu quantifizieren, wurde kolorimetrisch die Bindung von Trypanblau in einer Pufferlösung gemessen (Black & Yang, 2004). Dabei wurden zunächst Zellen einer Übernachtskultur in der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{550} = 0,5-0,9$) geerntet und mit MOPS-Puffer (10 mM MOPS pH 7,5; 1 mM $CaCl_2$) gewaschen. Danach wurden die Zellen in MOPS-Puffer auf eine OD_{550} von 4,5 (entspricht $4,5 \times 10^9$ Zellen/ml) resuspendiert. 100 μ l der Zellsuspension sowie 100 μ l der Trypanblau-Stammlösung (50 μ g/ml) wurden 800 μ l MOPS-Puffer zugegeben, gut gemischt und 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit

5 µg/ml Trypanblau in MOPS-Puffer ohne Zellen. Es wurden Triplikate von allen Proben angefertigt. Nach der Inkubation erfolgte eine 3 minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und RT. Die Überstände wurden abgenommen und deren Absorption kolorimetrisch bei 585nm gemessen. Die Absorption des Kontrollansatzes determiniert hierbei den Anteil des eingesetzten Trypanblau-Farbstoffes (100 % = 5 µg/ml). Die Quotienten der Absorptionswerte zwischen den einzelnen Proben und der Kontrolle wurden gebildet und dadurch die relativen Anteile an ungebundenem Farbstoff bestimmt. Der Anteil an gebundenem Farbstoff wird folglich aus der Differenz zwischen dem eingesetzten Farbstoff und dem ungebundenen Farbstoff berechnet. Der jeweilige Anteil an gebundenem Farbstoff korreliert mit dem Anteil an Exopolysacchariden in der extrazellulären Matrix (Wood & Fulcher, 1978, Black & Yang, 2004).

4.2.5 Entwicklungsstudien von *M. xanthus*

Entwicklungsstudien von *M. xanthus* erfolgten auf unterschiedlichen Medien: CF- und TPM-Agarplatten sowie im MC7-Puffer (Tabelle 10). Die Übernachtskulturen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₅₅₀ von 0,5 bis 0,9 geerntet und im MC7-Puffer zu einer berechneten Zelldichte von 7×10^9 Zellen/ml resuspendiert. Jeweils 20 µl der Zellsuspension wurden für phänotypische Untersuchungen auf CF- bzw. TPM-Agarplatten getropft. Für Entwicklungsstudien im MC7-Puffer wurden 50 µl der Zellsuspension zu 350 µl MC7-Puffer in 24er-Lochplatten gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 32 °C im Dunkeln. Jeweils nach 24 h, 48 h und 120 h erfolgte die photographische Dokumentation. Die Kolonien auf den CF- bzw. TPM-Agarplatten wurden bei 25- bzw. 50-facher Vergrößerung mit dem Leica MZ75 Stereomikroskop (Wetzlar) und der Leica DFC280 Kamera (Wetzlar) aufgenommen. Die Dokumentation der Entwicklungsstudien im MC7-Puffer erfolgte bei 200- bzw. 400-facher Vergrößerung mit dem Leica DM IRE2 Inversmikroskop (Wetzlar) sowie der Leica DFC280 Kamera (Wetzlar). Die photographischen Aufnahmen wurden jeweils mit IrfanView (Version 4.27) von Irfan Skiljan (Technische Universität, Wien) bearbeitet.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide, die bei Klonierungen, bei der zielgerichteten Mutagenese sowie bei Sequenzierungen Verwendung fanden sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Oligonukleotide

Basen, die Spaltstellen für Restriktionsenzyme darstellen, sind unterstrichen. Die **gelb** hinterlegten Sequenzen stellen die ausgetauschten Basen bei der zielgerichteten Mutagenese dar. In **rot** sind Basen dargestellt, die zu einem weiteren Stoppcodon in der Sequenz führen. Gegenläufig-überlappende Basenfolgen für Deletionen über Zwei-Schritt-PCR sind **grün**, Verknüpfungsregionen für YFP-/StreptII-Fusionen sind **blau** dargestellt. In **orange** sind die Basen dargestellt, die für das StreptII-Peptid kodieren.

Oligonukleotid	Sequenz in 5' - zu 3'-Richtung
hpk40 comp forw	ATGCTCTAGACGCCGACTCTAGCCGGTAC
hpk40 comp rev	ATCGGAATTCTCAGGTCTCTTCGGGGGCC
attB left	CGGCACACTGAGGCCACATA
attB right	GGAATGATCGGACCAGCTGAA
attP left	GGGAAGCTCTGGGTGACGAA
attP right	GCTTTCGCGACATGGAGGA
sgmT H336A (+)	GCGGTGTGCAGC GC CGACCTGCGCGC
sgmT H336A (-)	GCGCGCAGGT CG GCCTGCACACCGC
sgmT D615N (+)	ACCTGGTGGTCATG A ACGTGTTCTGCCC
sgmT D615N (-)	GGGCAGGAACACGT T CATGACCACCAGGT
sgmT R763A (+)	CGCAAGCGGGT GC CCACCCGGATGC
sgmT R763A (-)	GCATCCGGGTGG GC CACCCGCTTGCG
sgmT D766A (+)	GCGCCACCCGG C TGCCATCTCCC
sgmT D766A (-)	GGGAGATGGCA G CCGGGTGGCGC
sgmT R794A (+)	GCGCCGTCATCAGT GC CATGTTGCCGGATG
sgmT R794A (-)	CATCCGGCAACATG GC ACTGATGACGGCGC
dGGDEF forw	ATCGACCGGTTGCATCTTCGTCTTC
dGGDEF rev	ATCGGAATTCT TCA GGTCTCTTCGGGGCGCTGCTCTTCTCCTTCTC
dREC-GGDEF rev	ATCGGAATTCT TCA GGTCTCTTCGGGCTGCTCCTGCGGCGTGGAC
dGAF A	ATCGTCTAGACGCCGACTCTAGCCGGTAC
dGAF B	GCGCTTCTTT CGCATCGCCCGCCTCCTTGGC
dGAF C	GGCGATGCG AAGAAGCGCGAGGACCTGGAG
dGAF D	ATCGACCGGTGTCCGGCGGGCTCTC

Oligonukleotid	Sequenz in 5´- zu 3´-Richtung
sgmT prmt forw (=dGAF A)	ATCGTCTAGACGCCGACTCTAGCCGGTAC
sgmT rev KpnI	ATCGGGTACCGGTCTCTTCGGGGGCCGG
C-term YFP A	ATCGCATATGAAGCTTGGTACCGATATCGGATCCGCCGGCGGGCGGAGCCGG CCGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
C-term YFP B	ATCGGAATTCTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
sgmT dGGDEF C-term YFP	ATCGGGTACCGGCGCTGCTCTTCTCCTTCTCC
sgmT-his-forw	ATCGCATATGCAGGCTGATCAGCGGGG
sgmT-his-rev	ATCGGAATTCTCAGGTCTCTTCGGGGGCCG
sgmT GAF his rev	ATCGGAATTCTCAGTCCTCGCGCTTCTTCTCACCG
sgmT GGDEF his forw	ATCGCATATGGAGAAGAGCAGCGCCTTGCAGC
sgmT KD forw	ATCGCATATGAAGAAGCGCGAGGACCTGGAGG
sgmT KD rev	ATCGGAATTCTCACTGCTCCTGCGGCGTGGACG
sgmT KD-RD rev	ATCGGAATTCTCAGGCGCTGCTCTTCTCCTTCTCC
sgmT RD forw	ATCGGAATTCTGAAGCGCCGCGCAACCCGC
sgmT RD rev	ATCGGGATCCTCAGGCGCTGCTCTTCTCCTTCTCC
digR forw	ATCGGAATTCTGTCAGATTTCGCATCCTGGTAG
digR rev	ATCGGGATCCTCAGGTATCGCCGAAGAGCTCG
hpk40 seq1	GGCCTGGTGGAGTCGCTGCT
hpk40 seq2	CCGCTGCAAGGCGCTGCTCT
sgmT seq3	GGACGACCTCTGGCTGCAAC
sgmT seq4	GTGTGTTCCCGTCGTCCTG
SWU30 forw	GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG
SWU30 rev	GCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCG
pEGFPN1rev	GTCCAGCTCGACCAGGATG
M13 forw	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
M13 rev	TAGCTCACTCATTAGGCACCCAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 term	CTAGTTATTGCTCAGCGGT
malE	GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC
M13 uni (-43)	AGGGTTTTCCAGTCACGACGTT
difE seq forw	CCGGGTCCATGACGATGGAC
difE seq rev	TCACGCGGACAGTAACCTCGG
fibA f1 forw	TCGGGCACGTCCACCAGTTG

Oligonukleotid	Sequenz in 5´- zu 3´-Richtung
fibA f1 rev	GGAGGCACGATGACACAGGG
fibA f2 forw	CAGCCACGTCGATGCCAGTG
fibA f2 rev	GGGCAGGGGTGGACTCGTTG
fibA f3 forw	CATGGTGCAGAAGAGAGTTC
fibA f3 rev	GCTTCACGGAATAGCGGTAG
HEX fibA f2 forw	HEX-CAGCCACGTCGATGCCAGTG
delta binding site forw	CGTGCC TCCATGGTGCAGAAGAGAGTTC
delta binding site rev	TGCACCATG GGAGGCACGATGACACAGGG
2424-A	ATCGGGTACC <u>GCACCTGAGCGTGCTGGACG</u>
2424-B	GGCGATGAG CGCCCCGGCATGAACAGCGC
2424-C	CCGGGGGCG CTCATCGCCCGTCCGCAGAGT
2424-D	ATCGTCTAGACGCTCCGAGCCCATTGGCAC
2424-E	CGGCGAGCCCGAAGCTGTTG
2424-F	CAGGCACGACCAGCGCAGTC
2424-G	CACGCACTTCCAGCCCATCG
2424-H	GCGTCCGCGCAATCTCCAGG
2530-A	ATCGGGTACC <u>GCACCC</u> TGGGAAAGATGACGC
2530-B	CAGCAACTC GCTCCATGCCCTCCCCGAAAG
2530-C	GCATGGAGC GAGTTGCTGGAACGGCGCACG
2530-D	ATCGTCTAGAGGAATCCCGCTCCGTGGGCG
2530-E	GCCTCTTCGTGGGATTGAGC
2530-F	CTTCCCGCACGAAGAGGTCC
2530-G	GCGCTGCTGCAACGGCTGAC
2530-H	CCACGTCGGCCTTCTGCTGG
PpilA forw	ATCGGAATTCGCGGCGTTGAACGAG
PpilA rev	ATCGAAGCTTGGTACC <u>GGATCC</u> CAGGTCGACTCTAGACATGG
vca0956 forw	ATCGTCTAGAGTGATGACAACGAAGATTTTC
vca0956 strep rev	ATCGGGATCC CTACTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAGCGCT GAGCGGCA TGACTCGATTGC
yhjH forw	ATCGTCTAGATTGATGATAAGGCAGGTTATCCAG
yhjH strep rev	ATCGAAGCTT CTACTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAGCGCT TAGCGCCA GAACCGCCGTAT
pleD* forw	ATCGTCTAGAAATGAGCGCCCGGATCCTCGT
pleD* strep rev	ATCGAAGCTT CTACTTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAGCGCT GGCGGCCT

Oligonukleotid	Sequenz in 5´- zu 3´-Richtung
	TGCCGACCAC
SW105 forw	TGAGGGAGCCACGGTTGATGAG
SW105 rev	GTGCGCACCTGGGTTGGCATGCG
SW105 PpilA rev	CGGGCAGTGAGCGCAACGC
vca0956 seq1	CAAGGCATAGTTCACGGGGGTG
vca0956 seq2	CCGCTTGGTGAGTGACTCTAAAG
0587 qPCR forw	ACGCCTCCAATCCCAACAA
0587 qPCR rev	AGCACCAGGTCATCATCGATG
1093 qPCR forw	AGTACGGCCATGACGGACCA
1093 qPCR rev	TCAGGATGCCCCGGTCAAT
2791 qPCR forw	GACTTCACCCCCATCAACAGCT
2791 qPCR rev	TTGCTTGAATCAGCGTTCCG
2855 qPCR forw	AGCAAGAAGGAACACATCCTCCGT
2855 qPCR rev	CTGTCCGCACCCGAGATGCT
3175 qPCR forw	ACTTCTTCGTCTCCAACCAGGC
3175 qPCR rev	TGAAACCCACCATAGGTGCTT
3971 qPCR forw	CGGCTGGAAGGTCCAGTACA
3971 qPCR rev	GCATAACCACTGGCGACCAC
5033 qPCR forw	AAGCAGCATTTGAGTTGAGCTCC
5033 qPCR rev	CCAATGCAGTTCCCTTCGC
5453 qPCR forw	TGGGCTCCTCCAGTTGGTCCA
5453 qPCR rev	CTTCTCCGCAGCGAGAACCTTC
5786 qPCR forw	CGGTGTCTGAAGGCAAGGAC
5786 qPCR rev	CTTGCTCTTGATGGCGAACAG
6106 qPCR forw	GTCGGTTGCAACGAGTCCAC
6106 qPCR rev	GCAATCGACAGACCGGTGAC
6255 qPCR forw	GATGCTCTACGGCTGCATCAG
6255 qPCR rev	CCATTCAATCAGCAGGCCAT
6694 qPCR forw	CACTGGCCATTACAGGCGTA
6694 qPCR rev	TCCAGTAGAACCACCCGTCC
7415 qPCR forw	GCAAGCCCTTCTACATGCTGA
7415 qPCR rev	CGTGCTTCATCTTGAAGACGG

4.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = polymerase chain reaction) für die Vervielfältigung von DNA für unterschiedliche Zwecke genutzt und das Originalprotokoll (Mullis *et al.*, 1986) entsprechend modifiziert. Das Grundprinzip der PCR, die in drei verschiedene Stufen eingeteilt werden kann, blieb erhalten: 1.) die Denaturierung der DNA bei 95 °C für 30 s, 2.) die Anlagerung von synthetischen Oligonukleotiden (einzelsträngige DNA-Stücke bzw. Primer) an die DNA bei 50-70 °C für 30 s und 3.) die Polymerisation von DNA durch eine spezifische DNA-Polymerase bei 68-72 °C für 1 min pro kb des zu amplifizierenden Fragments. Durch die Wiederholung der einzelnen Stufen über mehrere Runden wurden spezifische DNA-Fragmente vervielfältigt. Eine klassische PCR besteht aus folgenden Komponenten: DNA-Polymerase, Matrizen-DNA, Oligonukleotide (Primer), dNTPs und Polymerase-Puffer.

Die Matrizen-DNA aus *M. xanthus* für die PCR wurde mittels „MasterPure™ DNA Purification Kit“ von Epicentre Biotechnologies (Wisconsin, USA) gewonnen. Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die PCRs, die DNA-Fragmente für eine Klonierung lieferten, wurden für gewöhnlich im „FailSafe™ PCR PreMix J“ Puffer von Epicentre Biotechnologies (Wisconsin, USA) mit „PfuUltra™II DNA-Polymerase“ von Stratagene (Amsterdam) durchgeführt. Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe der Kits „Zymoclean™ Gel DNA Recovery“, „DNA Clean & Concentrator™-5“ von Zymo Research (HiSS Diagnostics, Freiburg) oder „NucleoSpin® Extract II“ von Macherey-Nagel (Düren), die jeweils nach Herstellerangaben verwendet wurden.

Sollte die Integration oder die Deletion von DNA-Elementen in *M. xanthus* verifiziert werden, wurde eine Kolonie-PCR mit „5 PRIME Mastermix“ von 5 PRIME GmbH (Hamburg) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zuvor wurde die DNA einer *M. xanthus*-Kolonie mit „Lyse-N-Go™ PCR Reagent“ von Pierce (Rockford, USA) nach Herstellerangaben isoliert und als Matrize-DNA in der PCR-Reaktion eingesetzt.

Im Anschluss an die PCR wurden die DNA-Fragmente der Länge nach über ein Agarosegel elektrophoretisch in TBE-Puffer von Invitrogen (Karlsruhe)

getrennt. Mithilfe der Fragmentlänge der produzierten PCR-Produkte konnte über eine Integration (z.B. bei Komplementationen in die „phage Mx8 *attB*-site“) oder eine Deletion eines Gens geurteilt werden.

Die Herstellung der DNA-Sonde und von Konkurrenzfragmenten für EMSA (4.4.8) erfolgte mit Hilfe der „BioTherm™ Taq DNA-Polymerase“ von Genecraft (Ares Biosciences, Köln) und dem mitgelieferten Puffer. Die DNA-Sonde wurde mit Hilfe eines HEX-markierten Oligonukleotids der Firma Invitrogen (Karlsruhe) hergestellt.

4.3.3 Quantitative Echtzeit-PCR

1 µg isolierte RNA diente als Vorlage zur cDNA-Synthese in einem 100 µL Reaktionsansatz mittels „MultiScribe®“ Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) die nach Herstellerangaben erfolgte. Die cDNA diente als Matrizen-DNA für die nachfolgende quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR), die mit dem „SYBR® Green PCR Master Mix“ in einem „7300 Real-Time PCR System“ (beide: Applied Biosystems, Darmstadt) nach Herstellerangaben in einem 25 µL Reaktionsansatz durchgeführt wurde. Um eine Kontamination von chromosomaler DNA auszuschließen, wurde pro Reaktion ein Kontrollansatz mit der äquimolaren Menge von Matrizen-RNA durchgeführt. Die Bestimmung der zur cDNA korrespondierenden Transkriptmengen erfolgte jeweils aus drei technischen Replikaten. Die Primereffizienz jedes Primerpaares wurde unter Einsatz definierter Mengen von chromosomaler Matrizen-DNA (3000 pg, 300 pg, 30 pg, 3 pg und 0,3 pg) mittels qRT-PCR bestimmt. Die Auswertung der SYBR® Green Signale erfolgte mit Hilfe der mitgelieferten Software des „7300 Real-Time PCR Systems“, mit der auch der jeweilige CT-Wert („cycle threshold“) im Zwei-Schritt-Zyklus mit 40 Wiederholungen bestimmt wurde. Anschließend wurde das relative Expressionsniveau der untersuchten Gene von $\Delta digR$ bzw. $\Delta sgmT$ im Vergleich zum Wildtyp über die Differenzen der CT-Werte ermittelt.

4.3.4 Vektoren und Plasmide

Vektoren und Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Vektoren und Plasmide

Bezeichnung	Genotyp / Beschreibung	Referenz
pBluescript II KS(-)	Klonierungsvektor, Amp ^R	Fermentas (St. Leon-Rot)
pET-28a(+)	Expressionsvektor für N-terminale Hexa-Histidin- Fusionen, Kan ^R	Novagen/Merck (Darmstadt)
pMAL-c2x	Expressionsvektor für N-terminale MalE-Fusionen, Amp ^R	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)
pBJ114	Klonierungsvektor, Derivat von pBJ113, <i>galk</i> , Kan ^R	(Julien <i>et al.</i> , 2000)
pSWU30	Klonierungsvektor, Derivat von pBGS18, Mx8 <i>attP</i> , Tet ^R	(Spratt <i>et al.</i> , 1986)
pSW105	<i>pilA</i> -Promotorregion (1 kb Fragment) in pSWU19, Kan ^R	(Weis, 2007)
pIB73	pSW105- <i>yfp</i> -linker1- <i>pilT</i> , Kan ^R	(Bulyha, 2010)
pMO102	<i>digR</i> ^{D53N} hinter nativem Promotor in pSWU30, Tet ^R	(Overgaard <i>et al.</i> , 2006)
pRP89	<i>pleD</i> * mit C-terminaler hexa-Histidin-Kennzeichnung in pET11, Kan ^R	(Paul <i>et al.</i> , 2004)
pARA-VCA0956	VCA0956 unter Kontrolle des araC -P _{BAD} in pME6041	(Thormann <i>et al.</i> , 2006)
pARA-yhjH	<i>yhjH</i> unter Kontrolle des araC -P _{BAD} in pME6041	(Thormann <i>et al.</i> , 2006)
pTP11	Deletionsvektor, flankierende Bereiche von <i>sgmT</i> in pBJ114, Kan ^R	(Petters, 2008)
pTP22	<i>sgmT</i> hinter nativem Promotor (484bp) in pSWU30, Tet ^R	diese Arbeit
pTP24	<i>sgmT</i> ^{H336A} in pTP22, Tet ^R	diese Arbeit
pTP25	<i>sgmT</i> ^{D615N} in pTP22, Tet ^R	diese Arbeit
pTP26	<i>sgmT</i> ^{R763A} in pTP22, Tet ^R	diese Arbeit
pTP27	<i>sgmT</i> ^{D766A} in pTP22, Tet ^R	diese Arbeit
pTP28	<i>sgmT</i> ^{R794A} in pTP22, Tet ^R	diese Arbeit
pTP29	<i>sgmT</i> ^{ΔREC ΔGGDEF} in pTP22, Tet ^R	diese Arbeit
pTP33	<i>sgmT</i> in pET28a(+), Kan ^R	diese Arbeit
pTP39	<i>sgmT</i> ^{ΔGAF} in pTP22, Tet ^R	diese Arbeit
pTP40	<i>sgmT</i> ^{ΔGGDEF} in pTP22, Tet ^R	diese Arbeit
pTP41	<i>sgmT-yfp</i> hinter nativem Promotor in	diese Arbeit

Bezeichnung	Genotyp / Beschreibung	Referenz
pTP44	pSWU30, Tet ^R <i>sgmT</i> ^{ΔGGDEF} - <i>yfp</i> in pTP41, Tet ^R	diese Arbeit
pTP46	<i>sgmT</i> ^{R763A} - <i>yfp</i> in pTP41, Tet ^R	diese Arbeit
pTP51	<i>sgmT</i> -Kinasedomäne in pET28a(+), Kan ^R	diese Arbeit
pTP52	<i>sgmT</i> -Kinasedomäne ^{H336A} in pET28a(+), Kan ^R	diese Arbeit
pTP53	<i>sgmT</i> -Kinase- und Empfängerdomäne in pET28a(+), Kan ^R	diese Arbeit
pTP54	<i>sgmT</i> -Kinase- und Empfängerdomäne ^{D615N} in pET28a(+), Kan ^R	diese Arbeit
pTP55	<i>sgmT</i> - Empfängerdomäne in pMAL-c2x, Amp ^R	diese Arbeit
pTP56	<i>sgmT</i> - Empfängerdomäne ^{D615N} in pMAL-c2x, Amp ^R	diese Arbeit
pTP57	<i>digR</i> in pMAL-c2x, Amp ^R	diese Arbeit
pTP58	<i>digR</i> ^{D53N} in pMAL-c2x, Amp ^R	diese Arbeit
pTP59	<i>sgmT</i> GAF-Domäne in pET28a(+), Kan ^R	diese Arbeit
pTP60	<i>sgmT</i> GGDEF-Domäne in pET28a(+), Kan ^R	diese Arbeit
pTP62	<i>sgmT</i> GGDEF ^{R763A} -Domäne in pET28a(+), Kan ^R	diese Arbeit
pTP100	zusätzliche Restriktionsschnittstellen in pSW105, Kan ^R	diese Arbeit
pTP105	Deletionsvektor, flankierende Bereiche von <i>MXAN2424</i> in pBJ114, Kan ^R	diese Arbeit
pTP106	Deletionsvektor, flankierende Bereiche von <i>MXAN2530</i> in pBJ114, Kan ^R	diese Arbeit
pTP107	<i>VCA0956</i> mit C-terminaler <i>strepII</i> -Fusion in pTP100, Kan ^R	diese Arbeit
pTP108	<i>yjhH</i> mit C-terminaler <i>strepII</i> - Fusion in pTP100, Kan ^R	diese Arbeit
pTP109	<i>pleD*</i> mit C-terminaler <i>strepII</i> - Fusion in pTP100, Kan ^R	diese Arbeit

4.3.5 Konstruktion von Plasmiden

Im folgenden Absatz wird die Konstruktion der wichtigsten Plasmide aus dieser Arbeit beschrieben.

DNA-Fragmente wurden per PCR amplifiziert (4.3.2) und die Fragmentlänge kontrolliert. Dafür wurde der PCR-Ansatz über ein 1-3 %iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem HyperLadderTM DNA-Marker der Firma Bionline (Luckenwalde) verglichen. Die DNA-Fragmente

wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe der Kits „Zymoclean™ Gel DNA Recovery“ von Zymo Research (HiSS Diagnostics, Freiburg) bzw. „NucleoSpin® Extract II“ von Macherey-Nagel (Düren) gereinigt. Die Behandlung der Proben erfolgte nach Herstellerangaben. Optional wurden PCR-Ansätze direkt mittels „DNA Clean & Concentrator™-5“-Kit von Zymo Research (HiSS Diagnostics, Freiburg) bzw. „NucleoSpin® Extract II“-Kit von Macherey-Nagel (Düren) nach Herstellerangaben gereinigt.

Die Restriktionsenzyme, mit denen gereinigte DNA-Fragmente und Plasmide verdaut wurden, wurden von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt a. M.) und Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen und nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach dem Verdau wurden die Plasmide mittels „Antarctic Phosphatase®“ von New England Biolabs (Frankfurt a. M.) am 5'-Ende dephosphoryliert. Das dephosphorylierte Plasmid und das DNA-Fragment wurden mit dem „Rapid DNA Ligation Kit“ ligiert, wobei die Dephosphorylierung und die Ligation nach Protokoll des Herstellers erfolgten. Die Ligationsansätze wurden in Mach1 *E. coli*-Zellen transformiert (4.3.6). Die Reinigung der Plasmide aus Mach1 *E. coli* erfolgte mit Hilfe des „Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit“ von Zymo Research (HiSS Diagnostics, Freiburg) nach Herstellerangaben. Die DNA-Konzentration der Plasmide wurde photometrisch mittels „Nanodrop ND-1000“ der Firma Nanodrop (Wilmington, USA) bestimmt.

Zur Überprüfung der inserierten DNA-Fragmente wurden diese mit spezifischen Primern sequenziert. Die Sequenzierungen erfolgten zunächst nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) in der Abteilung Ökophysiologie des Max-Planck-Instituts (Marburg). Dabei wurde das „Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit“ von Applied Biosystems (Darmstadt) nach Herstellerangaben verwendet und die Sequenzen mit dem „3130 Genetic Analyser“ von Applied Biosystems (Darmstadt) geprüft. Die Bedienung des Gerätes erfolgte durch technisches Personal. Aktuell werden Sequenzierungen bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit Hilfe von „ContigExpress“ der „VectorNTI Advance Suite 11“ Software von Invitrogen (Karlsruhe) analysiert.

Herstellung der Komplementationsplasmide pTP22, pTP24, pTP25, pTP26, pTP27, pTP28, pTP29, pTP39 und pTP40: Diese Plasmide kodieren für verschiedene Varianten von *sgmT*, die für die Komplementation der Deletionsmutante SA3502 (Δ *sgmT*) bzw. zur Herstellung von *sgmT*-Mutanten eingesetzt wurden. Die hier aufgezählten Plasmide sind Derivate von pSWU30. Die Primersequenzen aller folgenden Beschreibungen sind in Tabelle 13 aufgelistet.

pTP22: Zunächst wurde mittels PCR (4.3.2) ein 2995 bp langes DNA-Fragment mit den Primern „hpk40 comp forw“ und „hpk40 comp rev“ amplifiziert, welches die vermeintliche Promotorregion von *sgmT*, *sgmT* selbst und an den beiden Enden Restriktionsschnittstellen für *Xba*I und *Eco*RI trägt. Das Fragment sowie der Vektor wurden mit *Xba*I und *Eco*RI verdaut und miteinander zu pTP22 ligiert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde mit den Primern „SWU30 forw“, „SWU30 rev“, „hpk40 seq1“, „hpk40 seq2“, „sgmT seq3“ und „sgmT seq4“ überprüft.

pTP24: Dieses Plasmid wurde analog zu pTP22 hergestellt, jedoch wurde eine Alaninsubstitution des konservierten Histidin (H336A) der Kinasedomäne (HisKA) mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide, die diese Mutation in der kodierenden Sequenz tragen, eingeführt. Zunächst wurden jeweils eine PCR-Reaktion mit den Primern „hpk40 comp forw“ und „sgmT H336A (-)“ sowie „sgmT H336A (+)“ und „hpk40 comp rev“ durchgeführt, deren Produkte zusammen in einer zweiten PCR mit den Primern „hpk40 comp forw“ und „hpk40 comp rev“ fusioniert wurden. Dieses Fusionsprodukt wurde in pSWU30 kloniert und anschließend wie bei der Klonierung von pTP22 weiterverfahren.

pTP25-28: Die Konstruktion dieser Plasmide erfolgte analog zur Herstellung von pTP24. Die jeweiligen Punktmutationen (D615N, R763A, D766A bzw. R794A) wurden mit Hilfe der synthetischen Oligonukleotide „sgmT D615N (+)“ und „sgmT D615N (-)“ in pTP25; „sgmT R763A (+)“ und „sgmT R763A (-)“ in pTP26; „sgmT D766A (+)“ und „sgmT D766A (-)“ in pTP27 sowie „sgmT R794A (+)“ und „sgmT R794A (-)“ in pTP28 eingeführt.

pTP29: Dieses Plasmid kodiert für eine verkürzte Version von SgmT, in der die Empfänger- und GGDEF-Domäne deletiert wurden. Dabei wurde die Sequenz von Codon 566 bis Codon 832 deletiert. Auf genomischer DNA wurde ein 105 bp langes DNA-Fragment mit „dGGDEF forw“ und „dREC dGGDEF rev“ amplifiziert, mit *AgeI* und *EcoRI* verdaut und in pTP22 eingefügt. Mit den Primern „hpk40 seq1“ und „SWU30 rev“ wurde die Sequenz auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

pTP39: Hier wurde eine SgmT-Version ohne sensorische Domäne hergestellt, in dem die Sequenz von Codon 21 bis Codon 296 deletiert wurde. Dazu wurden zunächst die flankierenden Bereiche der GAF-Domäne mit den Primern „dGAF A“ und „dGAF B“ sowie „dGAF C“ und „dGAF D“ auf genomischer DNA amplifiziert und die Produkte in einer zweiten PCR mit „dGAF A“ und „dGAF D“ fusioniert. Das Fusionsprodukt wurde mit *XbaI* und *AgeI* restriktiv verdaut und in pTP22 eingefügt. Die Überprüfung der Sequenz erfolgte mit Hilfe der Primer „SWU30 forw“, „sgmT-his-forw“, „hpk40 seq1“ und „hpk40 seq2“.

pTP40: Um eine Version von SgmT ohne GGDEF-Domäne zu erhalten, wurden die Sequenz von Codon 700 bis Codon 832 deletiert. Das betreffende DNA-Fragment wurde mit den Primern „dGGDEF forw“ und „dGGDEF rev“ auf genomischer DNA amplifiziert, mit *AgeI* und *EcoRI* restriktiv verdaut und in pTP22 eingefügt. Die Primer „hpk40 seq1“ und „SWU30 rev“ wurden zur Sequenzierung verwendet.

Herstellung der YFP-Fusionsplasmide pTP41, pTP44, und pTP46: Mit Hilfe dieser Plasmide wurden C-terminale Fusionen von SgmT-Varianten mit dem gelben Fluoreszenzprotein (YFP) generiert. Die Plasmide wurden in die Deletionsmutante SA3502 (Δ *sgmT*) integriert, um die Lokalisierung der Proteine *in vivo* bestimmen zu können.

pTP41: Für die Konstruktion des Plasmids, das für eine C-terminale YFP-Fusion mit SgmT kodiert, wurden zwei PCR-Produkte in den Vektor pSWU30 kloniert. Zunächst wurden die vermeintliche Promotorregion von *sgmT* mit *sgmT* ohne Stoppcodon mit den Primern „sgmT prmt forw“ und „sgmT rev KpnI“ auf genomischer DNA und *yfp* mit den Primern „C-term YFP A“ und

„C-term YFP A“ auf pIB73 amplifiziert. Das „P_{sgmT} *sgmT*“-Fragment wurde mit *XbaI* und *KpnI*, *yfp* mit *KpnI* und *EcoRI* und der Vektor pSWU30 mit *EcoRI* und *XbaI* verdaut. Danach wurden die Fragmente miteinander ligiert. Die Sequenz wurde mit Hilfe der Primer „SWU30 forw“, „SWU30 rev“, „hpk40 seq1“, „hpk40 seq2“, „sgmT seq3“ und „sgmT seq4“ kontrolliert.

pTP44: Dieses Konstrukt kodiert für ein C-terminale YFP-Fusion von SgmT ohne GGDEF-Domäne. Dafür wurde das PCR-Produkt mit „sgmT-his-forw“ und „C-term YFP dGGDEF“ auf genomischer DNA amplifiziert, mit *AgeI* und *KpnI* verdaut und mit pTP41 ligiert. Die Sequenzierung erfolgte mit den Primern „hpk40 seq1“ und „pEGFPN1rev“.

pTP46: In diesem Konstrukt wurde das konservierte Arginin R763 in der I-Site der GGDEF-Domäne durch ein Alanin substituiert. Als Matrize für die PCR mit „sgmT RD forw“ und „sgmT rev KpnI“ Primern diente das Plasmid pTP26. Das PCR-Produkt wurde mit *XmaI* und *KpnI* verdaut und in pTP41 ligiert. Die Sequenz wurde mit den Primern „hpk40 seq1“ und „pEGFPN1rev“ auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

Herstellung der Expressionsplasmide pTP33, pTP51, pTP52, pTP53, pTP54, pTP59, pTP60 und pTP62: Diese Plasmide wurden für die Herstellung von Hexa-Histidin-markierten Proteinen verwendet. Die Zielsequenzen wurden jeweils in den Vektor pET-28a(+) von Novagen/Merck (Darmstadt) kloniert.

pTP33: *sgmT* wurde mit den Primern „sgmT-his-forw“ und „sgmT-his-rev“ auf genomischer DNA amplifiziert, das PCR-Produkt mit *NdeI* und *EcoRI* verdaut und in den Vektor pET-28a(+) ligiert. Die Sequenz der inserierten DNA wurde mit den Primern „T7“, „T7 term“, „hpk40 seq1“ und „hpk40 seq2“ auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

pTP51-52: Mit den Primern „sgmT KD forw“ und „sgmT KD rev“ wurde die Sequenz der Kinasedomäne von SgmT auf genomischer DNA bzw. auf pTP24 amplifiziert, das DNA-Fragment mit *NdeI* und *EcoRI* verdaut und in pET28a(+) eingefügt. Die Sequenz der integrierten DNA wurde mit „T7“- und „T7 term“-Primern überprüft.

pTP53-54: Auf genomischer DNA bzw. pTP25 wurde die Sequenz von Kinase- und Empfängerdomäne von SgmT mit den Primern „sgmT KD forw“ und „sgmT KDRD rev“ amplifiziert, das entstandene Fragment mit *NdeI* und *EcoRI* verdaut und in pET28a(+) eingefügt. Mit den Primern „T7“ und „T7 term“ wurde die Sequenz auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

pTP59: Die Sequenz der GAF-Domäne von SgmT wurde auf genomischer DNA mit den Primern „sgmT-his-forw“ und „sgmT GAF rev“ amplifiziert, mit *NdeI* und *EcoRI* verdaut und in pET28a(+) eingefügt. Mit Hilfe der Primer „T7“ und „T7 term“ wurde die Sequenz der inserierten DNA überprüft.

pTP60 und pTP62: Diese Plasmide kodieren für die GGDEF-Domäne von SgmT mit nativer bzw. mutierter I-site (R763A). Dafür wurde die Sequenz auf genomischer DNA bzw. pTP26 mit den Primern „sgmT GGDEF his forw“ und „sgmT-his-rev“ amplifiziert, mit *NdeI* und *EcoRI* verdaut und in pET28a(+) integriert. Die Sequenz wurde mit Hilfe der Primer „T7“ und „T7 term“ kontrolliert.

Herstellung der Expressionsplasmide pTP55, pTP56, pTP57 und pTP58: Mit Hilfe dieser Plasmide wurden N-terminale MalE-Fusionsproteine hergestellt. Dabei diente pMAL-c2x von New England Biolabs (Frankfurt a. M.) als Expressionsvektor.

pTP55-56: Für die Konstruktion dieser Plasmide wurde die Sequenz der Empfängerdomäne von SgmT mit den Primern „sgmT RD forw“ und „sgmT RD rev“ auf genomischer DNA bzw. dem Plasmid pTP25 amplifiziert, mit *EcoRI* und *BamHI* verdaut und in pMAL-c2x integriert. Die Sequenzierung erfolgte mit den Primern „malE“ und „M13 uni (-43)“.

pTP57-58: Die Sequenz des Antwortregulators DigR wurde mit den Primern „digR forw“ und „digR rev“ auf genomischer DNA bzw. aus pMO102 amplifiziert, das DNA-Fragment mit *EcoRI* und *BamHI* verdaut und in pMAL-c2x eingefügt. Die Sequenz wurde mit den Primern „malE“ und „M13 uni (-43)“ überprüft.

Herstellung der Deletionsvektoren pTP105 und pTP106: Diese Plasmide wurden für die Deletion von Genen in *M. xanthus* (4.3.8) verwendet. Die flankierenden Genbereiche wurden in den Vektor pBJ114 (Julien *et al.*, 2000) integriert.

pTP105: Mit „2424-A“ und „2424-B“ bzw. „2424-C“ und „2424-D“ wurden jeweils die flankierenden Bereiche von *MXAN2424* amplifiziert und die Produkte mit einer zweiten PCR mit den Primern „2424-A“ und „2424-D“ miteinander fusioniert. Das Fusionsfragment wurde mit *KpnI* und *XbaI* verdaut und in pBJ114 integriert. Die Sequenz wurde mit Hilfe von „M13 forw“ und „M13 rev“ überprüft.

pTP106: Die Konstruktion des Deletionsvektors für *MXAN2530* geschah analog zur Herstellung von pTP105. Jedoch wurden hier die Oligonukleotide „2530-A“, „2530-B“, „2530-C“ und „2530-D“ verwendet.

Herstellung der Integrationsplasmide pTP100, pTP107, pTP108 und pTP109: Mit Hilfe dieser Plasmide wurde die heterologe Expression von Genen unter dem *pilA*-Promotor in *M. xanthus* durchgeführt.

pTP100: Dieses Plasmid ist ein Derivat von pSW105 (Weis, 2007), dem weitere Restriktionsschnittstellen für die Klonierung zugefügt wurden. Dafür wurde der *pilA*-Promotor mit Hilfe der Primer „PpilA forw“ und „PpilA rev“ amplifiziert, mit *EcoRI* und *HindIII* verdaut und in pSW105 integriert. Zur Kontrolle wurde der integrierte DNA-Bereich mit den Primern „SW105 forw“, „SW105 rev“ und „SW105 PpilA rev“ sequenziert.

pTP107: Die Sequenz der Diguanylatzyklase VCA0956 aus *V. cholerae* wurde mit den Primern „vca0956 forw“ und „vca0956 strep rev“ auf dem Plasmid pARA-VCA0956 (Thormann *et al.*, 2006) amplifiziert, das Fragment mit *XbaI* und *BamHI* verdaut und in pTP100 eingefügt. Die Richtigkeit der Sequenz wurde mit den Primern „SW105 forw“, „SW105 rev“, „vca0956 seq1“ und „vca0956 seq2“ bestätigt.

pTP108: Die Amplifikation von *yjhH* aus *S. typhimurium*, welches für eine Phosphodiesterase kodiert, wurde mit Hilfe der Primer „yjhH forw“ und „yjhH rev“ auf dem Plasmid pARA-yjhH (Thormann *et al.*, 2006) amplifiziert, das

erhaltene DNA-Fragment mit *Xba*I und *Hind*III verdaut und in pTP100 integriert. Die Überprüfung der Sequenz erfolgte mit den Primern „SW105 forw“ und „SW105 rev“.

pTP109: Auf dem Plasmid pRP89 (Paul *et al.*, 2004) wurde die modifizierte Sequenz von *pleD* aus *C. crescentus* mit Hilfe der Primer „pleD* forw“ und „pleD* strep rev“ amplifiziert, das erhaltene Fragment mit *Xba*I und *Hind*III verdaut und in pTP100 eingefügt. Die integrierte Sequenz wurde mit Hilfe von „SW105 forw“ und „SW105 rev“ kontrolliert.

4.3.6 Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung und Transformation von chemisch-kompetenten Zellen wurde nach einem optimierten Protokoll durchgeführt (Mandel & Higa, 1970).

Mit 2 ml einer Übernachtskultur wurden 200 ml LB-Medium angeimpft und schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Die Zellernte erfolgte in der späten exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,7 mittels Zentrifugation bei 4.700 rpm und 4 °C für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 50 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert. Die Zellen wurden erneut zu den oben beschriebenen Konditionen geerntet und das Pellet in 10 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis waren die Zellen kompetent für eine Transformation. Die langfristige Lagerung der chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte nach Aliquotierung zu 200 µl Portionen und unter Zugabe von Glycerin (10 % Endkonzentration) bei -80 °C.

Für die Transformation von Plasmiden in *E. coli* wurde den Zellen zunächst 50-300 ng Plasmid-DNA zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Einem Hitzeschock von 1-2 min bei 42 °C im Wasserbad folgte ein Kälteschock von 5 min auf Eis. Dann wurde pro Ansatz 750 µl SOC-Medium hinzugegeben und die Zellen 45-60 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation bei 13.000 rpm und RT für 1 min pelletiert, das Pellet in 100 µl SOC-Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

4.3.7 Herstellung und Transformation elektrisch-kompetenter *M. xanthus*-Zellen

Elektrisch-kompetente *M. xanthus*-Zellen wurden nach leicht modifiziertem Protokoll wie beschrieben (Kashefi & Hartzell, 1995) hergestellt und transformiert. Anders als bei *E. coli* (4.3.6) erfolgten hierbei beide Schritte jeweils mit frisch hergestellten Zellen.

Eine Übernachtskultur wurde in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₅₅₀ zwischen 0,3 und 0,7 geerntet (4.700 rpm; RT; 10 min). Das Zellpellet wurde nach mehreren Waschschritten mit ddH₂O in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und bei 13.000 rpm und RT für 2 min pelletiert. Daraufhin wurde das Pellet in sterilem ddH₂O resuspendiert und die Zellsuspension danach auf Eis inkubiert. Die Zellen waren nun kompetent zur Transformation.

Pro Transformationsansatz wurden 50 µl elektrisch-kompetente Zellen verwendet, denen 100-1000 ng Plasmid-DNA zugegeben wurde. Danach wurde der Ansatz in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (Gene Pulser® Cuvette) überführt und die Zellen mittels Gene Pulser® Xcell, beides Firma Bio-Rad (München); bei 25 µF, 650 V und 400 Ω elektroporiert. Die Zellen wurden in ein Kulturgefäß überführt und in 2,5 ml CTTYE-Medium 4-6 h schüttelnd im Dunkeln inkubiert. Verschiedene Verdünnungsstufen der Kulturen wurden in CTT-Weichagar auf CTT-Selektionsagarplatten ausplattiert und bei 32 °C im Dunkeln für mehrere Tage inkubiert.

4.3.8 Deletionsmutagenese in *M. xanthus*

Die Herstellung von Deletionsmutanten in *M. xanthus* wurde ausführlich in der Literatur beschrieben (Shi *et al.*, 2008).

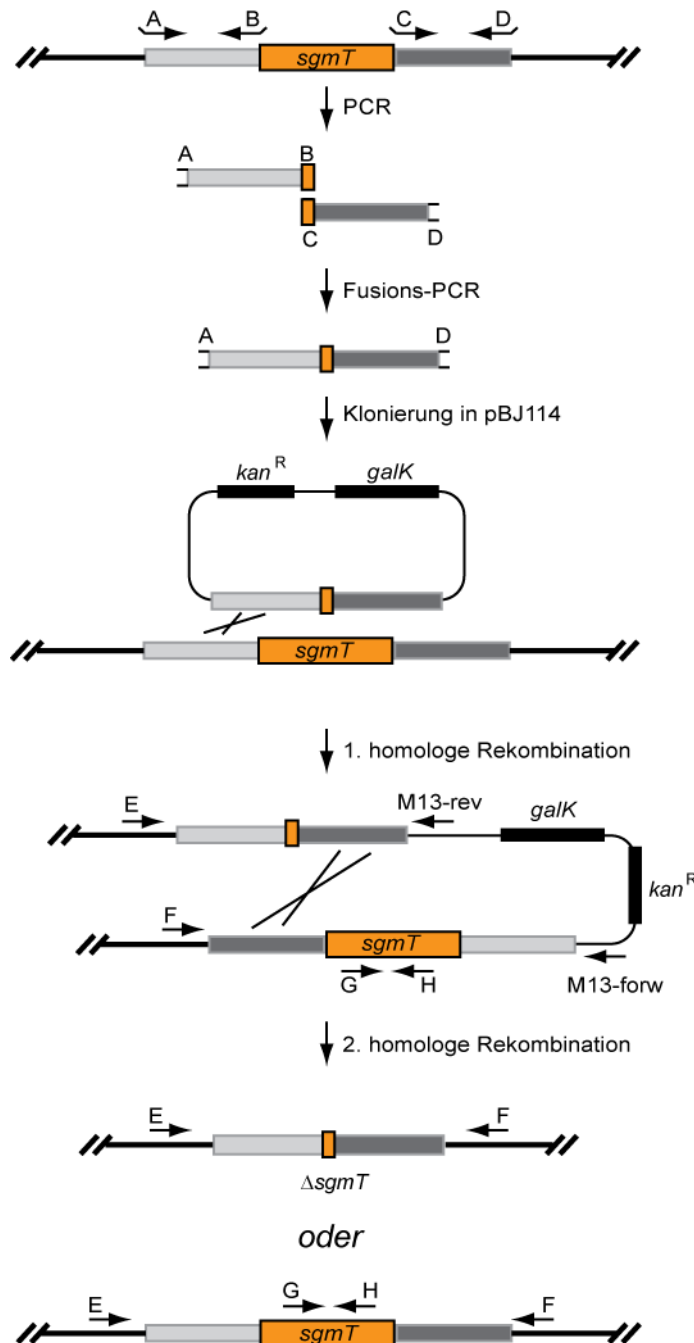


Abbildung 30: Schematische Darstellung der Deletion von *sgmT*.

Die Herstellung einer Deletionsmutante in *M. xanthus* wurde hier anhand von *sgmT* exemplarisch dargestellt. Eine ausführliche Beschreibung über die Vorgehensweise ist in 4.3.8 beschrieben. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Shi *et al.*, 2008) dargestellt.

Zunächst wurden jeweils 600 bp der flankierenden Genbereiche mit den Primerpaaren A und B bzw. C und D amplifiziert (Abbildung 30). Die Primer A und D tragen dabei an ihren Enden Restriktionsenzyme; B- und C-Primer besitzen gegenläufig komplementäre Basenabfolgen, die für eine Fusion der

beiden PCR-Produkte wichtig sind. In einer zweiten PCR-Reaktion mit A- und D-Primern wurden AB- und CD-Fragmente miteinander fusioniert, das Produkt mit Restriktionsenzymen verdaut und in den Vektor pBJ114 (Julien *et al.*, 2000) kloniert. Der Vektor trägt eine Kanamycin-Resistenz zur negativen Selektion und *galk* zur positiven Selektion, was für die Galaktokinase Galk kodiert (Alper & Ames, 1975). Das resultierende Plasmid wurde mit den Primern „M13 forw“ und „M13 rev“ sequenziert, in *M. xanthus* transformiert (4.3.7) und auf Selektionsagarplatten mit Kanamycin plattiert. In resistenten Kolonien wurde das Plasmid durch die erste homologe Rekombination am Zielgen in das Genom integriert. Diese Integration wurde mittels Kolonie-PCR mit den Primerpaaren „M13 forw“ und „F“ sowie „M13 rev“ und „E“ verifiziert, wobei gleichzeitig die Position der Integration „up-“ bzw. „downstream“ des Ziel-Gens bestimmt wurde.

In einem zweiten Rekombinationsschritt wurde das integrierte Plasmid, und damit das zu deletierende Gen, aus dem Genom entfernt. Dazu wurden die Zellen zunächst im CTT-Medium kultiviert und danach auf CTT-Platten plattiert, die 1-2 % Galaktose enthielten. In den Zellen, bei denen das Plasmid nicht aus dem Genom entfernt wurde, wurde die aufgenommene Galaktose von Galk zu Galaktose-1-phosphat phosphoryliert. Die Akkumulation von Galaktose-1-phosphat in der Zelle hemmt das Zellwachstum und wirkt in höheren Dosen zytotoxisch (Lee *et al.*, 2009). Die resultierenden Kolonien wurden auf ihre Kanamycin-Sensitivität hin überprüft und danach zwei Kolonie-PCR-Reaktionen mit „E-“ und „F-“ sowie „G-“ und „H-Primern“ durchgeführt. Entsprechend der Kolonie Wildtyp-Zellen, so erhielt man ein langes PCR-Produkt mit den externen „E- und F-Primern“ und ein internes „GH-Produkt“. War die Deletion erfolgreich, lieferte die PCR ein verkürztes „EF-Produkt“ und kein internes „GH-Produkt“. Das Prinzip der Deletionsmutagenese ist schematisch in Abbildung 30 dargestellt.

In dieser Arbeit wurden Deletionsmutanten von *MXAN4640* (*sgmT*), *MXAN2424* und *MXAN2530* generiert. In SA3502 (Δ *sgmT*) wurden die Basentriplets 54 bis 823, in SA3524 (Δ *MXAN2424*) die Codone 5 bis 256 und in SA3525 (Δ *MXAN2530*) die Codone 11 bis 406 deletiert.

Um polare Effekte bei beobachteten Phänotypen von generierten Deletionsmutanten auszuschließen, wurden Komplementationsmutanten mit dem nativen Gen hergestellt. Dafür wurden entsprechende Plasmide (Tabelle 14) in *M. xanthus* transformiert (4.3.7) und durch homologe Rekombination in die „phage Mx8 *attB*-site“ integriert. Der Nachweis über eine erfolgreiche Plasmidintegration ins Genom erfolgte mittels PCR (Magrini *et al.*, 1999). Die Primer „*attB* left“ und „*attB* right“ binden spezifisch in der „phage Mx8 *attB*-site“ auf dem Chromosom, wobei die Primer „*attP* left“ und „*attP* right“ Plasmid-spezifisch sind und flankierend die „*attP*-site“ in pSWU30-ähnlichen Plasmiden binden. Durch unterschiedliche Kombination dieser vier Primer wurden pro Mutante drei PCR-Reaktionen durchgeführt. Der entsprechende Elternstamm wurde dabei als Wildtyp-Kontrolle eingesetzt. In der ersten PCR mit dem Primerpaar „*attB* left“ und „*attB* right“ wurde im Kontrollstamm ein 485 bp DNA-Fragment amplifiziert. In Mutanten, in denen das entsprechende Plasmid erfolgreich integriert wurde, lieferte diese PCR-Reaktion kein Produkt, jedoch konnte aus diesen Zellen PCR-Produkte der Länge 840 bp bzw. 526 bp mit den Primern „*attP* left“ und „*attB* right“ bzw. „*attB* left“ und „*attP* right“ amplifiziert werden.

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 Überexpression von Genen und Reinigung von Proteinen

Zur Untersuchung von *M. xanthus*-spezifischen Proteinen wurden die kodierenden Genbereiche in Expressionsvektoren kloniert (4.3.5). Dabei erfolgte eine Fusion der Genbereiche mit den Sequenzen eines Hexa-Histidin-Peptids bzw. eines MalE-Proteins.

Die entsprechenden Plasmide (Tabelle 14) wurden in Rosetta™ 2 (DE3) *E. coli*-Zellen transformiert (4.3.6) und die Transformanten im ZYP-5052 Autoinduktionsmedium (Tabelle 6) induziert. Zunächst erfolgte die Inkubation schüttelnd für 3 h bei 37 °C, um ein Anwachsen der Zellen in der Lag-Phase zu erleichtern, danach wurden die Zellen schüttelnd bei 18 °C über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden nach 24 h bei einer $OD_{600} > 1$ mittels Zentrifugation bei 8.000 rpm und 4 °C für 10 min geerntet. Das Zellpellet wurde in Lyse-Puffer (Tabelle 15) mit „Complete“-Proteaseinhibitor von Roche (Mannheim) resuspendiert und die Zellen mittels Ultraschallbehandlung mit dem „Branson Sonifier 250“ von G. Heinemann (Schwäbisch Gmünd) aufgeschlossen. Durch die Zentrifugation bei 40.000 rpm und 4 °C für 40 min erfolgte die Trennung löslicher Proteine von unlöslichen Proteinen und Zelltrümmern aus dem Zelllysats. Das Zellpellet, welches Zelltrümmer und unlösliche Proteine beinhaltete, wurde vom Überstand, der lösliche Proteine enthielt, getrennt und erneut in Lyse-Puffer resuspendiert. Beide Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (4.4.2) auf das Vorhandensein des überproduzierten Proteins hin untersucht und dabei mit nicht-induzierten Zellen verglichen. Proteine, die in dieser Arbeit beschrieben und überproduziert wurden, waren ausschließlich in der löslichen Fraktion des Zelllysats zu finden.

Tabelle 15: Pufferlösungen für die Proteinreinigung

Puffer	Zusammensetzung (pro Liter)
Lyse-Puffer	50 mM Tris, pH 8,0 150 mM NaCl 100 g Glycerin 1 mM DTT 10 mM Imidazol
Tris-Waschpuffer	50 mM Tris, pH 8,0 300 mM NaCl 20 mM Imidazol
Tris-Elutionspuffer	50 mM Tris, pH 8,0 300 mM NaCl 50, 100, 150, 200, 250 bzw. 500 mM Imidazol
CB1-Waschpuffer	20 mM Tris, pH 7,4 200 mM NaCl 1 mM DTT 1mM EDTA
CB2-Elutionspuffer	CB1-Waschpuffer 10 mM Maltose

Es folgte die Reinigung der Proteine aus der löslichen Fraktion des Zelllysats mittels Affinitätschromatographie. Für Hexa-Histidin-Fusionsproteine wurde „Ni-NTA Agarose“ von Qiagen (Hilden), für MalE-Fusionsproteine wurde „Amylose Resin“ von New England Biolabs (Frankfurt a. M.) als Säulenmatrix verwendet. Nach Herstellerangaben wurden die Matrix-gebundenen Fusionsproteine in entsprechendem Waschpuffer (Tabelle 15) schrittweise gereinigt. Die Elution von Hexa-Histidin-Fusionsproteinen erfolgte stufenweise durch die Zugabe von Tris-Elutionspuffer (Tabelle 15), dessen Imidazol-Konzentration graduell erhöht wurde. MalE-Fusionsproteine wurden jeweils mit CB2-Elutionspuffer (Tabelle 15) in mehreren Stufen eluiert. Die Konzentration der eluierten Proteine wurde photometrisch per „Nanodrop ND-1000“ der Firma

Nanodrop (Wilmington, USA) bestimmt, wobei eine Absorptionseinheit 1 mg/ml Protein determinierte. Die unterschiedlichen Elutionsstufen wurden mittels SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (4.4.2), um die Reinheit der Proteine zu untersuchen.

Abschließend wurde das gereinigte Protein proteolytisch mit Trypsin verdaut und anschließend massenspektrometrisch mit Hilfe des „4800plus MALDI-TOF/TOF mass spectrometer“ von Applied Biosystems (Darmstadt) identifiziert. Die Durchführung des proteolytischen Verdaus sowie die massenspektrometrischen Analysen erfolgten durch Jörg Kahnt (Ökophysiologie, Max-Planck-Institut Marburg).

4.4.2 Proteinauftrennung durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse erfolgte über Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970).

In dieser Arbeit wurde das „Mini-Protean® 3 System“ der Firma Bio-Rad (München) verwendet. Polyacrylamidgele, bestehend aus Trenn- und Sammelgel (Tabelle 16), wurden wie beschrieben hergestellt (Laemmli, 1970). Je nach Größe des untersuchten Proteins wurden 6-14 % Polyacrylamid verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung mit TGS-Elektrophoresepuffer (Tabelle 16) erfolgte über „Mini-Protean® 3 Cell“-Gelkammern bei konstanter Spannung von 150 V. Zuvor wurden Proteinproben bzw. Zellpellets in SDS-Ladepuffer (Tabelle 16) resuspendiert, 5 min bei 95 °C erhitzt und kurz zentrifugiert. Dann wurden 10-15 µl der Probe zusammen mit einem Proteinmarker der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) auf das Gel aufgetragen.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine aus dem Gel entweder auf eine Nitrozellulosemembran für Immunblots übertragen (4.4.3) oder mit „PageBlue™ Protein Staining Solution“ von Fermentas (St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers gefärbt. Anschließend wurde das Gel durch mehrere Waschschriffe mit H₂O von ungebundenem Farbstoff entfärbt.

Tabelle 16: Pufferlösungen und Gele für die SDS-PAGE

Puffer/Gel	Zusammensetzung
Trenngel (Laemmli, 1970)	375 mM Tris, pH 8,8 4-16 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 0,001 % (v/v) TEMED 0,001 % (w/v) APS
Sammelgel (Laemmli, 1970)	125 mM Tris, pH 6,8 4 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 0,001 % (v/v) TEMED 0,001 % (w/v) APS
TGS-Elektrophoresepuffer (Bio-Rad, München)	25 mM Tris, pH 8,3 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
SDS-Ladepuffer	60 mM Tris, pH 6,8 2 % (w/v) SDS 10 % (w/v) Glyzerin 5 mM EDTA 100 mM DTT 0,005 % (w/v) Bromphenolblau 0,5 µg/ml Leupeptin-Hemisulfat 0,7 µg/ml Pepstatin A 0,6 mM PMSF

4.4.3 Immunblot (Western-blot)

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf eine Nitrozellulosemembran wurde wie beschrieben durchgeführt (Towbin *et al.*, 1979).

Für den Nachweis von Proteinen aus *M. xanthus* wurden 10^8 Zellen pro Spur eingesetzt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung (4.4.2) erfolgte der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die „Optitran BA-S 83 Reinforced NC“-Membran mit 0,2 µm Porendurchmesser von der Firma Whatman (Dassel). Dafür wurden zunächst „Whatman® Paper“-Filterpapier von Whatman GmbH

(Dassel), Membran und Gel in Transferpuffer bzw. in Bio-Rad Transferpuffer für 5 min bei RT inkubiert und nach Herstellerangaben miteinander zusammengesetzt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte über die „Hoefer TE 77 semi-dry transfer unit“ von Amersham Biosystems (Freiburg), oder alternativ über das „TransBlot® Turbo™ Transfer System“ von Bio-Rad (München) bei konstanter Stromstärke von 0,8 mA/cm² für 2 h bzw. 1,3 A für 10 min.

Tabelle 17: Pufferlösungen für Protein-Immunblots

Puffer	Zusammensetzung (pro Liter)
Transferpuffer	39 mM Glycin 48 mM Tris 0,0375 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol
Bio-Rad Transferpuffer	300 mM Tris 300 mM Glycin 0,05 % (w/v) SDS
TBS-Puffer	20 mM Tris, pH 7,6 137 mM NaCl
TTBS-Puffer	TBS-Puffer + 0,05 % (v/v) Tween 20

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran in 5 % Milchpulverlösung (5 % (w/v) Milchpulver in TTBS-Puffer (Tabelle 17)) für 30 min schüttelnd bei RT inkubiert, um unspezifische Antikörperbindestellen an der Membran zu besetzen. Nach mehreren Waschschritten mit TTBS wurde Protein-spezifischer Antikörper in entsprechender Verdünnung in 2 % Milchpulverlösung zugegeben und 2 h schüttelnd bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TTBS wurde der Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung in 2 % Milchpulverlösung hinzugegeben und 1 h schüttelnd bei RT inkubiert. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Nach der

Behandlung mit dem zweiten Antikörper wurde die Membran erneut in mehreren Schritten mit TTBS gewaschen.

Eine schnellere Alternative zur klassischen Immunblot-Methode nach Towbin (Towbin *et al.*, 1979) bot das „SNAP i.d. protein detection system“ der Firma Millipore (Schwalbach/Ts.). Die Membran wurde hier in eine Halterung eingespannt und mit dem System, das an eine hydraulische Pumpe angeschlossen ist, verbunden. Milchpulverlösung zum Blocken unspezifischer Antikörperbindestellen, TTBS-Waschpuffer sowie die verschiedenen Antikörperlösungen wurden nach Herstellerangaben über die Membran durch das System gesogen.

Tabelle 18: Verwendete Antikörper und Konjugate

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
α -PilA	polyklonaler Antikörper gegen PilA aus Kaninchen-Serum, Verdünnung 1:5000	(Wu & Kaiser, 1997)
α -FibA (MAb2105)	polyklonaler Antikörper gegen FibA aus Maus-Serum, Verdünnung 1:2000	(Kearns <i>et al.</i> , 2002)
α -O-Antigen (MAb783)	polyklonaler Antikörper gegen das LPS O-Antigen aus Maus-Serum, Verdünnung 1:2000	(Guo <i>et al.</i> , 1996)
α -SgmT	polyklonaler Antikörper gegen SgmT aus Kaninchen-Serum, Verdünnung 1:1000	diese Arbeit
α -GFP	monoklonaler Antikörper gegen GFP aus <i>Aequorea victoria</i> aus Maus-IgG, Verdünnung 1:500	Roche (Mannheim)
α -Kaninchen	polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG gekoppelt mit HRP aus Ziegen-Serum, Verdünnung 1:15000	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
α -Maus	polyklonaler Antikörper gegen Maus-Immunglobuline gekoppelt mit HRP aus Kaninchen-Serum, Verdünnung 1:2500	Dako (Glostrup, Dänemark)
Strep-Tactin-HRP	Strep-Tactin Konjugat gekoppelt mit HRP, Verdünnung 1:10000	IBA (Göttingen)

Für den Nachweis von LPS O-Antigen in unterschiedlichen *M. xanthus*-Stämmen wurde ein „slot-blot“ mit Hilfe des „Bio-Dot® SF Microfiltration Apparatus“ von Bio-Rad (München) nach Herstellerangaben verwendet. Nach dem Transfer von 5×10^8 Zellen pro „slot“ auf die Membran wurde der Immunblot, wie zuvor erläutert, weitergeführt.

StrepII-Fusionsproteine wurden mit Hilfe des Strep-Tactin Konjugats von IBA (Göttingen) detektiert. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Anstelle der Milchpulverlösung wurde hier die Membran mit 3 % BSA-Lösung (3 % (w/v) BSA in TTBS-Puffer) geblockt. Strep-Tactin-HRP wurde mit TTBS, wie in Tabelle 18 angegeben, verdünnt.

Die spezifische Antikörperbindung an das Zielprotein wurde mit Hilfe des „SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate“ von Pierce (Rockford, USA) bzw. der „Luminata™ Western HRP Substrates“ von Millipore (Schwalbach/Ts.) sichtbar gemacht. Die an die Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP) katalysiert die Spaltung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu zwei Hydroxidionen ($2 OH^-$). Diese Hydroxidionen oxidieren das im Substrat enthaltene Luminol, wobei Energie in Form von Chemilumineszenz frei wird. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit Hilfe des „Luminescent Image Analyser LAS~4000“ von FujiFilm (Düsseldorf).

4.4.4 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen SgmT

Das Hexa-Histidin-SgmT Fusionsprotein wurde heterolog in *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3)-Zellen überproduziert und wie in 4.4.1 beschrieben gereinigt. Das gereinigte Protein wurde an Eurogentec (Seraing, Belgien) übermittelt, wo die Immunisierung der Kaninchen mit dem 28-Tage-Programm erfolgte. Die Blutseren, die die polyklonalen Antikörper gegen das Zielprotein enthielten, wurden in verschiedenen Verdünnungen im Protein-Immunblot verwendet und auf ihre Spezifität hin getestet. Dabei wurden sowohl gereinigtes SgmT in den Konzentrationen 20 und 200 ng als auch Zelllysate von *M. xanthus* (Wildtyp und $\Delta sgmT$) im Immunblot eingesetzt.

4.4.5 *In vitro* Autophosphorylierung und Phosphogruppentransfer

Autophosphorylierungs- und Phosphogruppentransferstudien wurden *in vitro* mit gereinigten Proteinen leicht modifiziert zu (Igo & Silhavy, 1988) durchgeführt.

Für die Autophosphorylierungsreaktion wurden 10 μ M Histidinkinase in Reaktionspuffer (50 mM Tris, pH 8,0; 150 mM NaCl; 10 % (w/v) Glycerin;

50 mM KCl; 10 mM MgCl₂) aufgenommen. Radioaktiv-markiertes [γ ³²P]-ATP von Hartmann Analytic (Braunschweig) wurde 1:5 mit 10 mM unmarkiertem ATP vermischt. 1 mM des ATP-Gemischs wurde in den Reaktionsansatz überführt und 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Autophosphorylierungsreaktion wurde durch Zugabe von SDS-Ladepuffer gestoppt und der Ansatz über SDS-PAGE getrennt.

Bei Phosphogruppentransferstudien erfolgte zunächst die Autophosphorylierungsreaktion der Kinase und danach folgte die Zugabe von äquimolarem Empfängerprotein. Beide Proteine wurden in einem Reaktionsansatz für 2 bzw. 5 min bei RT inkubiert und nach Zugabe von SDS-Ladepuffer elektrophoretisch über ein Polyacrylamidgel getrennt. Das Gel wurde in einen Röntgenfilm-Kassette gelegt und mit einem „Storage Phosphoscreen“ von Molecular Devices (Ismaning) bedeckt. Am nächsten Tag wurde die Phosphoreszenz des „Storage Phosphoscreen“ mit Hilfe des „Storm 840 PhosphorImager“ von GE Healthcare (Freiburg) detektiert und mit „ImageQuantTM 5.2“ bearbeitet.

4.4.6 Vergleichende Transkriptomanalysen von *M. xanthus*

In dieser Arbeit wurde das Transkriptom der beiden Deletionsmutanten Δ *sgmT* und Δ *digR* mit dem Transkriptom des Wildtyp-Stammes DK1622 verglichen. Dabei wurden „Microarrays“ von Dr. Anke Treuner-Lange (Ökophysiologie, Max-Planck-Institut Marburg) wie beschrieben durchgeführt (Müller & Jakobsen, 2008).

DK1622 (WT), SA3502 (Δ *sgmT*) und SA1804 (Δ *digR*) wurden vegetativ in Triplikaten kultiviert, die Zellen bei OD₅₅₀ = 0,6 geerntet und deren RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert (Müller & Jakobsen, 2008). Die verbleibende DNA wurde mit „Ambion DNase I“ von Applied Biosystems (Darmstadt) verdaut und die RNA anschließend mit dem „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen (Hilden) gereinigt. Danach folgte die Herstellung von cDNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase „SuperScript® III“ von Invitrogen (Karlsruhe) nach Herstellerangaben und die Markierung der cDNA mit den fluoreszierenden Farbstoffen Cy3 bzw. Cy5 von Amersham Biosciences (Freiburg). Nach der Prähybridisierung der „DNA-Chips“ in Prähybridisierungslösung (5x SSC; 0,1 %

(w/v) SDS; 1 % (v/v) BSA) und dem anschließenden Waschen in ddH₂O wurden die markierten cDNAs für die Hybridisierung mit Hybridisierungspuffer (50 % Formamid; 5x SSC; 0,1 % (w/v) SDS; 0,6 µg/ml Lachssperma-DNA) behandelt. Nach dem Mischen der Cy3- und Cy5-markierten cDNAs und der Inkubation bei 95 °C für 3 min wurden die cDNA-Proben für die Hybridisierung mit den prähybridisierten „DNA-Chips“ vorbereitet. Nach Zugabe der cDNA-Proben auf die „DNA-Chips“, wurden diese mit einem Deckgläschen bedeckt. Die „DNA-Chips“ wurden in einer Hybridisierungskammer für 16-20 h bei 42 °C im Wasserbad aufbewahrt, um die Hybridisierung von cDNA-Fragmenten und der jeweiligen Zielsequenz auf den „DNA-Chips“ durchzuführen. Danach wurden die „DNA-Chips“ mit unterschiedlich stringenten Waschlösungen (niedrig-stringente Waschlösung: 2x SSC; 0,1 % (w/v) SDS; medium-stringente Waschlösung: 0,1x SSC; 0,1 % (w/v) SDS; hoch-stringente Waschlösung: 0,1x SSC) gewaschen. Die „DNA-Chips“ wurden nach Fertigstellung des Hybridisierungsschritts mit Hilfe des „GenePix™ 4000B microarray scanner“ sowie der Software „GenePix Pro 6.0“ von Axon Scientific (Biozym, Oldenburg) gelesen und mit der Software „Acuity 4.0“ bearbeitet. Für Signifikanz-Analysen der „Microarrays“ wurde die Software SAM („Significance Analysis of Microarrays“) verwendet (Tusher *et al.*, 2001). Um den statistischen Fehler zu minimieren, wurden nur solche Daten berücksichtigt die folgende Kriterien erfüllen: 1.) Die Regulation der Gene zeigt einen mindestens 2-fachen Unterschied in mindestens zwei von drei Triplikaten zwischen Wildtyp und Mutante und 2.) die „False Discovery Rate“ (FDR) entspricht „0“. Zur Verifizierung der „Microarray“-Daten wurde die Expression von ausgewählten Genen mittels „qRT-PCR“ überprüft (4.3.3).

4.4.7 Nachweis der spezifischen Bindung von c-di-GMP an SgmT

Die spezifische Bindung von nativem SgmT bzw. einzelnen SgmT-Domänen an c-di-GMP wurde mit Hilfe von Affinitätschromatographie untersucht. Dafür wurde das „Capture Compound™ Mass Spectrometry“-Kit der Firma Caprotec (Berlin) unter Anleitung von Dr. Jutta Nesper im Labor von Prof. Urs Jenal am Biozentrum in Basel (Schweiz) verwendet (Nesper *et al.*, Manuskript eingereicht).

Die Kopplung von c-di-GMP an das „Capture Compound“ (cdG-CC) wurde von der Firma Caprotec (Berlin) synthetisiert. Zusätzlich zu c-di-GMP enthält das cdG-CC eine Biotinylierung und eine reaktive Gruppe, die sich in räumlicher Nähe zum gekoppelten c-di-GMP befindet. Die Proteine, die an c-di-GMP binden, wurden über UV-Bestrahlung mit der reaktiven Gruppe des cdG-CC quervernetzt. Mit Hilfe von Streptavidin-beschichteten Magnetkügelchen wurden das cdG-CC über dessen Biotinylierung isoliert und die quervernetzten Proteine mittels Immunblot (4.4.3) identifiziert.

Pro Ansatz wurde 0,5 μ M gereinigtes Protein eingesetzt, das entweder mit oder ohne 500 μ M Konkurrenzstoff (c-di-GMP oder GTP) 30 min bei 4 °C auf dem Roller inkubiert wurde. Danach erfolgte die Zugabe von 5 μ M cdG-CC in alle Ansätze und die erneute Inkubation bei 4 °C für 1 h auf dem Roller. Anschließend wurden die Proteine sowie das cdG-CC mit Hilfe der „capro-BoxTM“ von Caprotec (Berlin) bei -3 °C mittels UV-Bestrahlung bei 266 nm quervernetzt. Nach der Zugabe von Streptavidin-gekoppelten Magnetkügelchen und den im „CCMS caproKitTM“ enthaltenen Waschpuffer von Caprotec (Berlin) wurden die Ansätze bei 4 °C für 1 h auf dem Roller inkubiert. Der wie folgt beschriebene Waschschrift wurde insgesamt 6x durchgeführt. Auf Eis wurden die Magnetkügelchen mit einem Magneten im Deckel des Reagiergefäßes fixiert, der Deckel wurde zusammen mit dem Magneten abgenommen und auf ein neues Gefäß mit Waschpuffer gesetzt. Der Magnet wurde vom Deckel gelöst und die Kügelchen wurden durch kurze Zentrifugation in der Tischzentrifuge vom Deckel gelöst. Danach wurden die Kügelchen im Puffer resuspendiert und der Waschvorgang wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Magnetkügelchen in SDS-Ladepuffer überführt und bei 95 °C für 10 min erhitzt. Danach erfolgte eine SDS-PAGE (4.4.2) mit anschließendem Protein-Immunblot (4.4.3).

4.4.8 Promotor-Bindestudien von DigR mittels EMSA

Xin Zhang identifizierte im Rahmen seiner Masterarbeit mittels „DNase I-Footprinting“ eine mögliche Bindestelle von DigR im *fibA*-Promotor (Zhang, 2005). Um die spezifische Bindung von DigR an diese potentielle Bindestelle *in vitro* zu bestätigen, wurden EMSA-Studien (electrophoretic mobility shift assay)

mit Male-DigR durchgeführt, die vergleichbar mit dem klassischen Protokoll (Garner & Revzin, 1981) sind. Bindet DigR an ein bestimmtes Bindemotiv auf der DNA verändert sich das Laufverhalten der DNA bei der elektrophoretischen Auftrennung im Gegensatz zu ungebundener DNA. Die gebundene DNA zeigt eine scheinbar längere Fragmentgröße als die freie DNA.

Zur Untersuchung einer spezifischen Bindung von DigR an die vermutete Bindestelle im *fibA*-Promotor wurden EMSA-Konkurrenzstudien durchgeführt. Dabei wird die spezifische Bindung von DigR an eine HEX-fluoreszierende DNA-Sonde („HEX-f2“), die einen Teil des Promotors mit dem vermuteten Bindemotiv trägt, unter Zugabe von konkurrierenden DNA-Fragmenten untersucht. Eine Konkurrenz-DNA ist unspezifisch, wenn sie nicht das vermutete Bindemotiv trägt und trotzdem DigR binden kann. Eine spezifische Konkurrenz-DNA enthält folglich das vermutete Bindemotiv und konkurriert mit „HEX-f2“ um das Binden an DigR.

„HEX-f2“ wurde mit den Primern „HEX fibA f2 forw“ und „fibA f2 rev“ amplifiziert. Die Konkurrenz-Fragmente „f1“, „f2“, „f3“ und „f2Δ“ wurden mit den entsprechenden Primerpaaren (Tabelle 13) auf genomischer DNA amplifiziert. Das Konkurrenz-Fragment „f2“ trägt die identische Sequenz wie „HEX-f2“ und ist folglich ein spezifischer Konkurrent zur HEX-markierten DNA-Sonde. Die unspezifischen Konkurrenz-Fragmente „f1“ und „f3“ stellen die flankierenden Bereiche vor bzw. hinter der potentiellen DigR-Bindestelle dar. Das „f2Δ“-Fragment ist Sequenz-identisch zu „f2“, mit der Ausnahme, dass das potentielle DigR-Bindemotiv über eine zwei-stufige PCR-Reaktion, ähnlich der Konstruktion des AD-Fragments bei der Herstellung von Deletionsmutanten (4.3.8), deletiert wurde. Als ebenfalls unspezifische Konkurrenz-DNA wurde der Klonierungsvektor pBlueskript II KS(-) von Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet.

In den Experimenten wurden zwischen 2,5 und 5 nM HEX-f2 und entsprechend 150-200-fach höhere Konzentration an Konkurrenz-DNA eingesetzt. Die Reaktionsansätze mit DNA-Sonde und Konkurrenz-DNA wurden zusammen mit 4 µM Male-DigR und 25 ng/µl poly-(dI-dC) von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) im Reaktionspuffer (10 mM Tris, pH 7,5; 50 mM KCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT) auf Eis pipettiert und bei RT 30 min inkubiert. Danach erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei 4 °C in 5 % Trenngel eines Polyacrylamid-

gels (Tabelle 16). Anstelle von SDS-Ladepuffer wurden die Proben mit „Orange DNA Loading Dye“ von Fermentas (St. Leon-Rot) versetzt. Die Dokumentation der HEX-Signale erfolgte mit Hilfe des „Typhoon TRIO Variable Mode Imager“ von GE Healthcare (Freiburg), die Abbildungen wurden mit Hilfe von „ImageQuant™ TL“ bearbeitet.

4.5 Mikroskopische Methoden

4.5.1 Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie

Für Lokalisierungsstudien von SgmT *in vivo* wurden Zellen betrachtet, die SgmT-YFP Fusionsproteine produzieren. Dafür wurden die entsprechenden Stämme, wie in 4.2.2 beschrieben, kultiviert, 10 µl Kultur von exponentiell-wachsenden Zellen auf einen Objektträger mit A50-Agar (1 % (w/v) Agar; 50 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂; 10 mM MOPS pH 7,0) getropft und mit einem Deckgläschen bedeckt. Der Objektträger wurde in die vorhergesehene Halterung am „CTR 6000 Fluoreszenzmikroskop“ von Leica (Wetzlar) eingespannt und die Zellen bei 100-facher Vergrößerung beobachtet. Mit einer „Cascade® II“ Kamera von Photometrics (Tucson, USA) und der Software „Image Pro 6.2“ von Media Cybernetics (Bethesda, USA) wurden sowohl Phasenkontrast- als auch Fluoreszenzaufnahmen angefertigt. Für die Visualisierung der YFP-Signale wurde ein YFP-Filter von Leica (Wetzlar) mit einem Anregungsbereich von 490-510 nm und einem Emissionsbereich von 520-550 nm verwendet. In „Metamorph® 7.7.5.0“ von Molecular Devices (Ismaning) wurde die Position der Fluoreszenzcluster mit dem Linescan-Tool in Bezug zur Zelllänge ermittelt. Die Weiterverarbeitung der angefertigten Bilder erfolgte mit „Adobe Photoshop CS2“ und „Adobe Illustrator CS2“ von Adobe Systems (München).

Die Zeitrafferstudien von bewegenden Zellen wurden nach dem gleichen Prinzip angefertigt, wobei alle 30 s Aufnahmen gemacht wurden. Der Wechsel zwischen Phasenkontrast- und Fluoreszenzfilter erfolgte automatisiert mit der Software „Image Pro 6.2“.

4.5.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden an der Georg-August-Universität (Göttingen) unter Anleitung von PD Dr. Michael Hoppert angefertigt.

M. xanthus wurde wie in 4.2.2 beschrieben in 1 % CTT-Medium kultiviert. In der frühen exponentiellen Wachstumsphase nach ca. 2-4 h Inkubation wurden 50 µl Zellkultur auf „Parafilm“ der Firma Pechiney Plastic Packaging (Chicago, USA) getropft. Kohle-bedampfte Kupfernetzchen der Firma Plano (Wetzlar) wurden 2 min auf dem Tropfen inkubiert, danach Flüssigkeitsreste mit Hilfe von Filterpapier vorsichtig entfernt und dann 5 s auf einem Tropfen H₂O gewaschen. Das Kupfernetzchen wurde vorsichtig mit Filterpapier vom H₂O befreit und letztendlich für ca. 2 s auf 2 % (w/v) Uranylacetat inkubiert. Dieses Kontrastmittel wurde vorsichtig mit Filterpapier entfernt und das Kupfernetzchen in die Haltevorrichtung am „EM 301 Elektronenmikroskop“ von Philips (Eindhoven, Niederlande) eingespannt. Photographische Aufnahmen wurden mit mitgelieferter Software unter angegebenen Maßstab angefertigt.

4.6 Bioinformatische Methoden

Die Verwaltung von Gen- und Proteinsequenzen erfolgte mit „VectorNTI Advance Suite 11“ von Invitrogen (Karlsruhe). Die Verwendung von bioinformatischer Software ist gesondert im Text angegeben. Eine Auswahl der am häufigsten verwendeten Software ist in Tabelle 19 aufgelistet.

Tabelle 19: Verwendete Software

Software und Funktion	URL	Referenz
KEGG: Sequenz-Datenbank	http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html	(Ogata <i>et al.</i> , 1999)
TIGR: Sequenz-Datenbank	http://cmr.jcvi.org/	(Devine & Wolfe, 1995)
NCBI: Sequenz-Datenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	(Ostell & Kans, 1998)
MiST2: Sequenz-Datenbank	http://mistdb.com/	(Ulrich & Zhulin, 2010)
BLAST: Sequenzvergleich	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	(Altschul <i>et al.</i> , 1990)
ClustalW2: Sequenzvergleich	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/	(Thompson <i>et al.</i> , 1997)
GeneDoc 2.6: Bearbeitung von Sequenzvergleichen	http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/	(Nicholas <i>et al.</i> , 1997)
SMART: Vorhersage von Proteindomänen	http://smart.embl-heidelberg.de/	(Schultz <i>et al.</i> , 1998)
SignalP 3.0: Vorhersage von Signalpeptiden	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	(Bendtsen <i>et al.</i> , 2004)
LipoP 1.0: Vorhersage von Signalpeptiden	http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/	(Juncker <i>et al.</i> , 2003)
TatP 1.0: Vorhersage von Signalpeptiden	http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/	(Bendtsen <i>et al.</i> , 2005)
TMHMM: Vorhersage von Transmembran-Domänen	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	(Krogh <i>et al.</i> , 2001)
Bioprospector: Identifikation von Promotorelementen	http://ai.stanford.edu/~xslu/BioProspector/	(Liu <i>et al.</i> , 2001)
Virtualfootprint: Identifikation von Promotorelementen	http://prodoric.tu-bs.de/vfp/vfp_promoter.php	(Münch <i>et al.</i> , 2005)
Prodoric: Identifikation von Promotorelementen	http://www.prodoric.de/	(Münch <i>et al.</i> , 2003)
FIMO: Identifikation von DNA-Motiven	http://meme.sdsc.edu/meme/cgi-bin/fimo.cgi	(Grant <i>et al.</i> , 2011)
Palinsight: Identifikation von palindromischen DNA-Motiven	http://www.era7.com/ExtraTrain/PALINSIGHT.cfm	(Pareja <i>et al.</i> , 2006)

Literaturverzeichnis

- Abel, S., P. Chien, P. Wassmann, T. Schirmer, V. Kaefer, M. T. Laub, T. A. Baker & U. Jenal, (2011) Regulatory cohesion of cell cycle and cell differentiation through interlinked phosphorylation and second messenger networks. *Mol Cell* **43**: 550-560.
- Aldridge, P. & U. Jenal, (1999) Cell cycle-dependent degradation of a flagellar motor component requires a novel-type response regulator. *Mol Microbiol* **32**: 379-391.
- Alm, E., K. Huang & A. Arkin, (2006) The evolution of two-component systems in bacteria reveals different strategies for niche adaptation. *PLoS Comput Biol* **2**: e143.
- Alm, R. A., A. J. Boder, P. D. Free & J. S. Mattick, (1996) Identification of a novel gene, *pilZ*, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **178**: 46-53.
- Alper, M. D. & B. N. Ames, (1975) Positive selection of mutants with deletions of the gal-chl region of the Salmonella chromosome as a screening procedure for mutagens that cause deletions. *J Bacteriol* **121**: 259-266.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers & D. J. Lipman, (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Amikam, D. & M. Y. Galperin, (2006) PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* **22**: 3-6.
- Appleby, J. L., J. S. Parkinson & R. B. Bourret, (1996) Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* **86**: 845-848.
- Baikalov, I., I. Schroder, M. Kaczor-Grzeskowiak, K. Grzeskowiak, R. P. Gunsalus & R. E. Dickerson, (1996) Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochemistry* **35**: 11053-11061.
- Beebe, J. M., (1941) The Morphology and Cytology of *Myxococcus xanthus*, N. Sp. *J Bacteriol* **42**: 193-223.
- Begley, M., P. D. Cotter, C. Hill & R. P. Ross, (2009) Identification of a novel two-peptide lantibiotic, lichenicidin, following rational genome mining for LanM proteins. *Appl Environ Microbiol* **75**: 5451-5460.
- Behmlander, R. M. & M. Dworkin, (1994) Biochemical and structural analyses of the extracellular matrix fibrils of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **176**: 6295-6303.
- Bellenger, K., X. Ma, W. Shi & Z. Yang, (2002) A CheW homologue is required for *Myxococcus xanthus* fruiting body development, social gliding motility, and fibril biogenesis. *J Bacteriol* **184**: 5654-5660.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne & S. Brunak, (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**: 783-795.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, D. Widdick, T. Palmer & S. Brunak, (2005) Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics* **6**: 167.
- Berleman, J. E., J. J. Vicente, A. E. Davis, S. Y. Jiang, Y. E. Seo & D. R. Zusman, (2011) FrzS regulates social motility in *Myxococcus xanthus* by controlling exopolysaccharide production. *PLoS One* **6**: e23920.
- Bertani, G., (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**: 293-300.
- Biondi, E. G., J. M. Skerker, M. Arif, M. S. Prasol, B. S. Perchuk & M. T. Laub, (2006) A phosphorelay system controls stalk biogenesis during cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **59**: 386-401.
- Black, W. P., F. D. Schubot, Z. Li & Z. Yang, (2010) Phosphorylation and dephosphorylation among Dif chemosensory proteins essential for exopolysaccharide regulation in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **192**: 4267-4274.
- Black, W. P., Q. Xu & Z. Yang, (2006) Type IV pili function upstream of the Dif chemotaxis pathway in *Myxococcus xanthus* EPS regulation. *Mol Microbiol* **61**: 447-456.
- Black, W. P. & Z. Yang, (2004) *Myxococcus xanthus* chemotaxis homologs DifD and DifG negatively regulate fibril polysaccharide production. *J Bacteriol* **186**: 1001-1008.
- 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**: 8767-8770.
- Böhm, A., M. Kaiser, H. Li, C. Spangler, C. A. Kasper, M. Ackermann, V. Kaefer, V. Sourjik, V. Roth & U. Jenal, (2010) Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell* **141**: 107-116.
- Bonner, P. J. & L. J. Shimkets, (2006) Phospholipid directed motility of surface-motile bacteria. *Mol Microbiol* **61**: 1101-1109.
- Bonner, P. J., Q. Xu, W. P. Black, Z. Li, Z. Yang & L. J. Shimkets, (2005) The Dif chemosensory pathway is directly involved in phosphatidylethanolamine sensory transduction in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **57**: 1499-1508.
- Borkovich, K. A., L. A. Alex & M. I. Simon, (1992) Attenuation of sensory receptor signaling by covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 6756-6760.

- Bourret, R. B., (2010) Receiver domain structure and function in response regulator proteins. *Curr Opin Microbiol* **13**: 142-149.
- Bowden, M. G. & H. B. Kaplan, (1996) The *Myxococcus xanthus* developmentally expressed *asgB*-dependent genes can be targets of the A signal-generating or A signal-responding pathway. *J Bacteriol* **178**: 6628-6631.
- 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.
- Bulyha, I., (2010) Regulation of type IV pili localization in *Myxococcus xanthus*. In: Dissertation. Philipps-Universität Marburg, pp. 150.
- Bulyha, I., C. Schmidt, P. Lenz, V. Jakovljevic, A. Hone, B. Maier, M. Hoppert & L. Søgaard-Andersen, (2009) Regulation of the type IV pili molecular machine by dynamic localization of two motor proteins. *Mol Microbiol* **74**: 691-706.
- Caberoy, N. B., R. D. Welch, J. S. Jakobsen, S. C. Slater & A. G. Garza, (2003) Global mutational analysis of NtrC-like activators in *Myxococcus xanthus*: identifying activator mutants defective for motility and fruiting body development. *J Bacteriol* **185**: 6083-6094.
- Capra, E. J., B. S. Perchuk, E. A. Lubin, O. Ashenberg, J. M. Skerker & M. T. Laub, (2010) Systematic dissection and trajectory-scanning mutagenesis of the molecular interface that ensures specificity of two-component signaling pathways. *PLoS Genet* **6**: e1001220.
- Casino, P., V. Rubio & A. Marina, (2009) Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell* **139**: 325-336.
- Chamngopol, S. & E. A. Groisman, (2000) Acetyl phosphate-dependent activation of a mutant PhoP response regulator that functions independently of its cognate sensor kinase. *J Mol Biol* **300**: 291-305.
- Chan, C., R. Paul, D. Samoray, N. C. Amiot, B. Giese, U. Jenal & T. Schirmer, (2004) Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17084-17089.
- Chater, K. F., S. Biro, K. J. Lee, T. Palmer & H. Schrempf, (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 171-198.
- Cheung, J. & W. A. Hendrickson, (2009) Structural analysis of ligand stimulation of the histidine kinase NarX. *Structure* **17**: 190-201.
- Cheung, J. & W. A. Hendrickson, (2010) Sensor domains of two-component regulatory systems. *Curr Opin Microbiol* **13**: 116-123.
- Cheung, J., M. Le-Khac & W. A. Hendrickson, (2009) Crystal structure of a histidine kinase sensor domain with similarity to periplasmic binding proteins. *Proteins* **77**: 235-241.
- Christen, B., M. Christen, R. Paul, F. Schmid, M. Folcher, P. Jenoe, M. Meuwly & U. Jenal, (2006) Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J Biol Chem* **281**: 32015-32024.
- Cox, R. S., 3rd, M. G. Surette & M. B. Elowitz, (2007) Programming gene expression with combinatorial promoters. *Mol Syst Biol* **3**: 145.
- Curtis, P. D., J. Atwood, 3rd, R. Orlando & L. J. Shimkets, (2007) Proteins associated with the *Myxococcus xanthus* extracellular matrix. *J Bacteriol* **189**: 7634-7642.
- Dahl, J. L., B. Y. Wei & R. J. Kadner, (1997) Protein phosphorylation affects binding of the *Escherichia coli* transcription activator UhpA to the *uhpT* promoter. *J Biol Chem* **272**: 1910-1919.
- Dahlquist, F. W., (2002) Amplification of signaling events in bacteria. *Sci STKE* **2002**: pe24.
- Darwin, C., (1859) *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. John Murray, London.
- Darzins, A., (1994) Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene cluster involved in pilus biosynthesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis proteins of enterics and the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **11**: 137-153.
- Devine, K. M. & K. Wolfe, (1995) Bacterial genomes: a TIGR in the tank. *Trends Genet* **11**: 429-431.
- Djordjevic, S. & A. M. Stock, (1998) Structural analysis of bacterial chemotaxis proteins: components of a dynamic signaling system. *J Struct Biol* **124**: 189-200.
- Duerig, A., S. Abel, M. Folcher, M. Nicollier, T. Schwede, N. Amiot, B. Giese & U. Jenal, (2009) Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes Dev* **23**: 93-104.
- Dworkin, M., (1996) Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol Rev* **60**: 70-102.
- Ermolaeva, M. D., (2001) Synonymous codon usage in bacteria. *Curr Issues Mol Biol* **3**: 91-97.
- Fisseha, M., M. Gludemans, R. E. Gill & L. Kroos, (1996) Characterization of the regulatory region of a cell interaction-dependent gene in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **178**: 2539-2550.
- Galperin, M. Y., (2006) Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol* **188**: 4169-4182.

- Galperin, M. Y., A. N. Nikolskaya & E. V. Koonin, (2001) Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett* **203**: 11-21.
- Garner, M. M. & A. Revzin, (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* **9**: 3047-3060.
- Garza, A. G., J. S. Pollack, B. Z. Harris, A. Lee, I. M. Keseler, E. F. Licking & M. Singer, (1998) SdeK is required for early fruiting body development in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **180**: 4628-4637.
- Grant, C. E., T. L. Bailey & W. S. Noble, (2011) FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics* **27**: 1017-1018.
- Grebe, T. W. & J. B. Stock, (1999) The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol* **41**: 139-227.
- Gronewold, T. M. & D. Kaiser, (2001) The *act* operon controls the level and time of C-signal production for *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol* **40**: 744-756.
- Gronewold, T. M. & D. Kaiser, (2007) Mutations of the *act* promoter in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **189**: 1836-1844.
- Guo, D., M. G. Bowden, R. Pershad & H. B. Kaplan, (1996) The *Myxococcus xanthus* *rfbABC* operon encodes an ATP-binding cassette transporter homolog required for O-antigen biosynthesis and multicellular development. *J Bacteriol* **178**: 1631-1639.
- Guzzo, C. R., R. K. Salinas, M. O. Andrade & C. S. Farah, (2009) PILZ protein structure and interactions with PILB and the FIMX EAL domain: implications for control of type IV pilus biogenesis. *J Mol Biol* **393**: 848-866.
- Habazettl, J., M. G. Allan, U. Jenal & S. Grzesiek, (2011) Solution structure of the PilZ domain protein PA4608 complex with cyclic di-GMP identifies charge clustering as molecular readout. *J Biol Chem* **286**: 14304-14314.
- Hagen, D. C., A. P. Bretscher & D. Kaiser, (1978) Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*. *Dev Biol* **64**: 284-296.
- Hanahan, D., (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hecht, G. B. & A. Newton, (1995) Identification of a novel response regulator required for the swarmer-to-stalked-cell transition in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **177**: 6223-6229.
- Heikaus, C. C., J. Pandit & R. E. Klevit, (2009) Cyclic nucleotide binding GAF domains from phosphodiesterases: structural and mechanistic insights. *Structure* **17**: 1551-1557.
- Hengge, R., (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**: 263-273.
- Hengge, R., (2010) Cyclic-di-GMP reaches out into the bacterial RNA world. *Sci Signal* **3**: pe44.
- Henry, J. T. & S. Crosson, (2011) Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annu Rev Microbiol* **65**: 261-286.
- Hickman, J. W. & C. S. Harwood, (2008) Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol* **69**: 376-389.
- Hickman, J. W., D. F. Tifrea & C. S. Harwood, (2005) A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 14422-14427.
- Higgs, P. I., K. Cho, D. E. Whitworth, L. S. Evans & D. R. Zusman, (2005) Four unusual two-component signal transduction homologs, RedC to RedF, are necessary for timely development in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **187**: 8191-8195.
- Hinderberger, I., (2011) Charakterisierung der Funktion des kleinen G-Proteins SofG und der Antwortregulatoren MXAN_4463 und MXAN_5791 in *M. xanthus*. In: Bachelorarbeit. Marburg: Philipps-Universität, pp. 80.
- Hobley, L., R. K. Fung, C. Lambert, M. A. Harris, J. M. Dabhi, S. S. King, S. M. Basford, K. Uchida, R. Till, R. Ahmad, S. Aizawa, M. Gomelsky & R. E. Sockett, (2012) Discrete Cyclic di-GMP-Dependent Control of Bacterial Predation versus Axenic Growth in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *PLoS Pathog* **8**: e1002493.
- Hodgkin, J. & D. Kaiser, (1977) Cell-to-cell stimulation of movement in nonmotile mutants of *Myxococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 2938-2942.
- Hodgkin, J. & D. Kaiser, (1979) Genetics of Gliding Motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales) - 2 Gene Systems Control Movement. *Mol Gen Genet* **171**: 177-191.
- Hoekema, A., R. A. Kastelein, M. Vasser & H. A. de Boer, (1987) Codon replacement in the PGK1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: experimental approach to study the role of biased codon usage in gene expression. *Mol Cell Biol* **7**: 2914-2924.
- Hsu, J. L., H. C. Chen, H. L. Peng & H. Y. Chang, (2008) Characterization of the histidine-containing phosphotransfer protein B-mediated multistep phosphorelay system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Biol Chem* **283**: 9933-9944.
- Hu, W., Z. Yang, R. Lux, M. Zhao, J. Wang, X. He & W. Shi, (2012) Direct visualization of the interaction between pilin and exopolysaccharides of *Myxococcus xanthus* with eGFP-fused PilA protein. *FEMS Microbiol Lett* **326**: 23-30.
- Huitema, E., S. Pritchard, D. Matteson, S. K. Radhakrishnan & P. H. Viollier, (2006) Bacterial birth scar proteins mark future flagellum assembly site. *Cell* **124**: 1025-1037.

- Huntley, S., N. Hamann, S. Wegener-Feldbrügge, A. Treuner-Lange, M. Kube, R. Reinhardt, S. Klages, R. Müller, C. M. Ronning, W. C. Nierman & L. Søgaard-Andersen, (2011) Comparative genomic analysis of fruiting body formation in *Myxococcales*. *Mol Biol Evol* **28**: 1083-1097.
- Huntley, S., Y. Zhang, A. Treuner-Lange, S. Kneip, C. W. Sensen & L. Søgaard-Andersen, (unveröffentlicht). In., pp.
- Igo, M. M. & T. J. Silhavy, (1988) EnvZ, a transmembrane environmental sensor of *Escherichia coli* K-12, is phosphorylated *in vitro*. *J Bacteriol* **170**: 5971-5973.
- 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.
- Jenal, U. & J. Malone, (2006) Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet* **40**: 385-407.
- Julien, B., A. D. Kaiser & A. Garza, (2000) Spatial control of cell differentiation in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9098-9103.
- Juncker, A. S., H. Willenbrock, G. Von Heijne, S. Brunak, H. Nielsen & A. Krogh, (2003) Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci* **12**: 1652-1662.
- Kaiser, D., (1979) Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 5952-5956.
- Kashefi, K. & P. L. Hartzell, (1995) Genetic suppression and phenotypic masking of a *Myxococcus xanthus* *frzF*- defect. *Mol Microbiol* **15**: 483-494.
- Kearns, D. B., P. J. Bonner, D. R. Smith & L. J. Shimkets, (2002) An extracellular matrix-associated zinc metalloprotease is required for dilauroyl phosphatidylethanolamine chemotactic excitation in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **184**: 1678-1684.
- Kearns, D. B. & L. J. Shimkets, (1998) Chemotaxis in a gliding bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11957-11962.
- Kearns, D. B., A. Venot, P. J. Bonner, B. Stevens, G. J. Boons & L. J. Shimkets, (2001) Identification of a developmental chemoattractant in *Myxococcus xanthus* through metabolic engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13990-13994.
- Koch, M. K., C. A. McHugh & E. Hoiczky, (2011) BacM, an N-terminally processed bactofilin of *Myxococcus xanthus*, is crucial for proper cell shape. *Mol Microbiol* **80**: 1031-1051.
- Kolb, A., A. Spassky, C. Chapon, B. Blazy & H. Buc, (1983) On the different binding affinities of CRP at the *lac*, *gal* and *malT* promoter regions. *Nucleic Acids Res* **11**: 7833-7852.
- Konovalova, A., T. Petters & L. Søgaard-Andersen, (2010) Extracellular biology of *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 89-106.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne & E. L. Sonnhammer, (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**: 567-580.
- Kroos, L., (2007) The *Bacillus* and *Myxococcus* developmental networks and their transcriptional regulators. *Annu Rev Genet* **41**: 13-39.
- 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.
- Kühn, J., A. Briegel, E. Morschel, J. Kahnt, K. Leser, S. Wick, G. J. Jensen & M. Thanbichler, (2010) Bactofilins, a ubiquitous class of cytoskeletal proteins mediating polar localization of a cell wall synthase in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J* **29**: 327-339.
- Kuner, J. M. & D. Kaiser, (1982) Fruiting body morphogenesis in submerged cultures of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **151**: 458-461.
- Kuspa, A., L. Plamann & D. Kaiser, (1992) Identification of heat-stable A-factor from *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **174**: 3319-3326.
- Kyriakidis, D. A. & E. Tiligada, (2009) Signal transduction and adaptive regulation through bacterial two-component systems: the *Escherichia coli* AtoSC paradigm. *Amino Acids* **37**: 443-458.
- Lacal, J., M. E. Guazzaroni, A. Busch, T. Krell & J. L. Ramos, (2008) Hierarchical binding of the TodT response regulator to its multiple recognition sites at the *tod* pathway operon promoter. *J Mol Biol* **376**: 325-337.
- Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lancero, H., N. B. Caberoy, S. Castaneda, Y. Li, A. Lu, D. Dutton, X. Y. Duan, H. B. Kaplan, W. Shi & A. G. Garza, (2004) Characterization of a *Myxococcus xanthus* mutant that is defective for adventurous motility and social motility. *Microbiology* **150**: 4085-4093.
- Lancero, H. L., S. Castaneda, N. B. Caberoy, X. Ma, A. G. Garza & W. Shi, (2005) Analysing protein-protein interactions of the *Myxococcus xanthus* Dif signalling pathway using the yeast two-hybrid system. *Microbiology* **151**: 1535-1541.
- Laub, M. T. & M. Goulian, (2007) Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet* **41**: 121-145.

- Leduc, J. L. & G. P. Roberts, (2009) Cyclic di-GMP allosterically inhibits the CRP-like protein (Cip) of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. *J Bacteriol* **191**: 7121-7122.
- Lee, B., P. Mann, V. Grover, A. Treuner-Lange, J. Kahnt & P. I. Higgs, (2011) The *Myxococcus xanthus* spore cuticula protein C is a fragment of FibA, an extracellular metalloprotease produced exclusively in aggregated cells. *PLoS One* **6**: e28968.
- Lee, E. R., J. L. Baker, Z. Weinberg, N. Sudarsan & R. R. Breaker, (2010) An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. *Science* **329**: 845-848.
- Lee, S. J., A. Trostel, P. Le, R. Harinarayanan, P. C. Fitzgerald & S. Adhya, (2009) Cellular stress created by intermediary metabolite imbalances. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 19515-19520.
- Lee, V. T., J. M. Matewish, J. L. Kessler, M. Hyodo, Y. Hayakawa & S. Lory, (2007) A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol Microbiol* **65**: 1474-1484.
- Leonardy, S., I. Bulyha & L. Sogaard-Andersen, (2008) Reversing cells and oscillating motility proteins. *Mol Biosyst* **4**: 1009-1014.
- Leonardy, S., G. Freymark, S. Hebenner, E. Ellehaug & L. Sogaard-Andersen, (2007) Coupling of protein localization and cell movements by a dynamically localized response regulator in *Myxococcus xanthus*. *EMBO J* **26**: 4433-4444.
- Levdikov, V. M., E. Blagova, P. Joseph, A. L. Sonenshein & A. J. Wilkinson, (2006) The structure of CodY, a GTP- and isoleucine-responsive regulator of stationary phase and virulence in gram-positive bacteria. *J Biol Chem* **281**: 11366-11373.
- Levi, A., M. Folcher, U. Jenal & H. A. Shuman, (2011) Cyclic diguanylate signaling proteins control intracellular growth of *Legionella pneumophila*. *MBio* **2**: e00316-00310.
- Liu, X., D. L. Brutlag & J. S. Liu, (2001) BioProspector: discovering conserved DNA motifs in upstream regulatory regions of co-expressed genes. *Pac Symp Biocomput*: 127-138.
- Lu, A., K. Cho, W. P. Black, X. Y. Duan, R. Lux, Z. Yang, H. B. Kaplan, D. R. Zusman & W. Shi, (2005) Exopolysaccharide biosynthesis genes required for social motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **55**: 206-220.
- MacLean, L., M. B. Perry, L. Nossova, H. Kaplan & E. Vinogradov, (2007) The structure of the carbohydrate backbone of the LPS from *Myxococcus xanthus* strain DK1622. *Carbohydr Res* **342**: 2474-2480.
- Madan Babu, M. & S. A. Teichmann, (2003) Evolution of transcription factors and the gene regulatory network in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **31**: 1234-1244.
- Magnusson, L. U., A. Farewell & T. Nystrom, (2005) ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* **13**: 236-242.
- 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.
- Malone, J. G., R. Williams, M. Christen, U. Jenal, A. J. Spiers & P. B. Rainey, (2007) The structure-function relationship of WspR, a *Pseudomonas fluorescens* response regulator with a GGDEF output domain. *Microbiology* **153**: 980-994.
- Mandel, M. & A. Higa, (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**: 159-162.
- Manoil, C. & D. Kaiser, (1980) Guanosine pentaphosphate and guanosine tetraphosphate accumulation and induction of *Myxococcus xanthus* fruiting body development. *J Bacteriol* **141**: 305-315.
- Mauriello, E. M., T. Mignot, Z. Yang & D. R. Zusman, (2010) Gliding motility revisited: how do the myxobacteria move without flagella? *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 229-249.
- Mauriello, E. M., B. Nan & D. R. Zusman, (2009) AglZ regulates adventurous (A-) motility in *Myxococcus xanthus* through its interaction with the cytoplasmic receptor, FrzCD. *Mol Microbiol* **72**: 964-977.
- McBride, M. J., R. A. Weinberg & D. R. Zusman, (1989) "Frizzy" aggregation genes of the gliding bacterium *Myxococcus xanthus* show sequence similarities to the chemotaxis genes of enteric bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 424-428.
- McCleary, W. R., B. Esmon & D. R. Zusman, (1991) *Myxococcus xanthus* protein C is a major spore surface protein. *J Bacteriol* **173**: 2141-2145.
- Meiser, P., H. B. Bode & R. Muller, (2006) The unique DKxanthene secondary metabolite family from the myxobacterium *Myxococcus xanthus* is required for developmental sporulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 19128-19133.
- Merighi, M., V. T. Lee, M. Hyodo, Y. Hayakawa & S. Lory, (2007) The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PiiZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **65**: 876-895.
- 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. P. Merlie, Jr. & D. R. Zusman, (2007) Two localization motifs mediate polar residence of FrzS during cell movement and reversals of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **65**: 363-372.

- Mills, E., I. S. Pultz, H. D. Kulasekara & S. I. Miller, (2011) The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. *Cell Microbiol* **13**: 1122-1129.
- Missiakas, D. & S. Raina, (1998) The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol Microbiol* **28**: 1059-1066.
- Moore, J. O. & W. A. Hendrickson, (2009) Structural analysis of sensor domains from the TMAO-responsive histidine kinase receptor TorS. *Structure* **17**: 1195-1204.
- Müller, F.-D. & J. S. Jakobsen, (2008) *Myxococcus xanthus*: Expression Analysis. In: Myxobacteria. Multicellularity and Differentiation. D. E. Whitworth (ed), pp. 479-489.
- Müller, F. D., A. Treuner-Lange, J. Heider, S. M. Huntley & P. I. Higgs, (2010) Global transcriptome analysis of spore formation in *Myxococcus xanthus* reveals a locus necessary for cell differentiation. *BMC Genomics* **11**: 264.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn & H. Erlich, (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Münch, R., K. Hiller, H. Barg, D. Heldt, S. Linz, E. Wingender & D. Jahn, (2003) PRODORIC: prokaryotic database of gene regulation. *Nucleic Acids Res* **31**: 266-269.
- Münch, R., K. Hiller, A. Grote, M. Scheer, J. Klein, M. Schobert & D. Jahn, (2005) Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics* **21**: 4187-4189.
- Nan, B., J. Chen, J. C. Neu, R. M. Berry, G. Oster & D. R. Zusman, (2011) Myxobacteria gliding motility requires cytoskeleton rotation powered by proton motive force. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 2498-2503.
- Nan, B., E. M. Mauriello, I. H. Sun, A. Wong & D. R. Zusman, (2010) A multi-protein complex from *Myxococcus xanthus* required for bacterial gliding motility. *Mol Microbiol* **76**: 1539-1554.
- Nariya, H. & M. Inouye, (2008) MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Myxococcus* development. *Cell* **132**: 55-66.
- Nariya, H. & S. Inouye, (2006) A protein Ser/Thr kinase cascade negatively regulates the DNA-binding activity of MrpC, a smaller form of which may be necessary for the *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol* **60**: 1205-1217.
- Nesper, J., A. Reinders, T. Glatter, A. Schmidt & U. Jenal, (Manuskript eingereicht) Use of a Novel Capture Compound for the Identification and Analysis of Cyclic di-GMP Binding Proteins. *J Proteomics*.
- Newell, P. D., R. D. Monds & G. A. O'Toole, (2009) LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 3461-3466.
- Nicholas, K. B., H. B. Nicholas Jr. & D. W. Deerfield II., (1997) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW.NEWS* **14**.
- Ogata, H., S. Goto, K. Sato, W. Fujibuchi, H. Bono & M. Kanehisa, (1999) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* **27**: 29-34.
- Ostell, J. M. & J. A. Kans, (1998) The NCBI data model. *Methods Biochem Anal* **39**: 121-144.
- Overgaard, M., S. Wegener-Feldbrügge & L. Søgaard-Andersen, (2006) The orphan response regulator DigR is required for synthesis of extracellular matrix fibrils in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **188**: 4384-4394.
- Pareja, E., P. Pareja-Tobes, M. Manrique, E. Pareja-Tobes, J. Bonal & R. Tobes, (2006) ExtraTrain: a database of Extragenic regions and Transcriptional information in prokaryotic organisms. *BMC Microbiol* **6**: 29.
- Paul, K., V. Nieto, W. C. Carlquist, D. F. Blair & R. M. Harshey, (2010) The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Mol Cell* **38**: 128-139.
- Paul, R., S. Abel, P. Wassmann, A. Beck, H. Heerklotz & U. Jenal, (2007) Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization. *J Biol Chem* **282**: 29170-29177.
- 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.
- Pesavento, C. & R. Hengge, (2009) Bacterial nucleotide-based second messengers. *Curr Opin Microbiol* **12**: 170-176.
- Petters, T., (2008) Analyse von Proteinen im FruA-Signal-Transduktionsweg in *Myxococcus xanthus*. In: Diplomarbeit. Philipps-Universität Marburg, pp. 112.
- Plamann, L., A. Kuspa & D. Kaiser, (1992) Proteins that rescue A-signal-defective mutants of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **174**: 3311-3318.
- Ramaswamy, S., M. Dworkin & J. Downard, (1997) Identification and characterization of *Myxococcus xanthus* mutants deficient in calcofluor white binding. *J Bacteriol* **179**: 2863-2871.
- Rashid, M. H., C. Rajanna, A. Ali & D. K. Karalolis, (2003) Identification of genes involved in the switch between the smooth and rugose phenotypes of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol Lett* **227**: 113-119.
- Rasmussen, A. A. & L. Søgaard-Andersen, (2003) TodK, a putative histidine protein kinase, regulates timing of fruiting body morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **185**: 5452-5464.

- Rasmussen, A. A., S. Wegener-Feldbrügge, S. L. Porter, J. P. Armitage & L. Søgaard-Andersen, (2006) Four signalling domains in the hybrid histidine protein kinase RodK of *Myxococcus xanthus* are required for activity. *Mol Microbiol* **60**: 525-534.
- Reading, N. C. & V. Sperandio, (2006) Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **254**: 1-11.
- Robinson, V. L., T. Wu & A. M. Stock, (2003) Structural analysis of the domain interface in DrrB, a response regulator of the OmpR/PhoB subfamily. *J Bacteriol* **185**: 4186-4194.
- Römling, U., M. Gomelsky & M. Y. Galperin, (2005) C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol Microbiol* **57**: 629-639.
- Römling, U., M. Rohde, A. Olsen, S. Normark & J. Reinköster, (2000) AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol Microbiol* **36**: 10-23.
- Rosenberg, E., B. Vaks & A. Zuckerberg, (1973) Bactericidal action of an antibiotic produced by *Myxococcus xanthus*. *Antimicrob Agents Chemother* **4**: 507-513.
- Ross, P., R. Mayer & M. Benziman, (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev* **55**: 35-58.
- Ross, P., H. Weinhouse, Y. Aloni, D. Michaeli, P. Weinberger-Ohana, R. Mayer, S. Braun, E. de Vroom, G. A. van der Marel, J. H. van Boom & M. Benziman, (1987) Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**: 279-281.
- Ryjenkov, D. A., R. Simm, U. Romling & M. Gomelsky, (2006) The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem* **281**: 30310-30314.
- Sambrook, J. & D. W. Russell, (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen & A. R. Coulson, (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Sansinenea, E. & A. Ortiz, (2011) Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnol Lett* **33**: 1523-1538.
- Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork & C. P. Ponting, (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5857-5864.
- Scott, K. A., S. L. Porter, E. A. Bagg, R. Hamer, J. L. Hill, D. A. Wilkinson & J. P. Armitage, (2010) Specificity of localization and phosphotransfer in the CheA proteins of *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **76**: 318-330.
- Shi, X., S. Wegener-Feldbrügge, S. Huntley, N. Hamann, R. Hedderich & L. Søgaard-Andersen, (2008) Bioinformatics and experimental analysis of proteins of two-component systems in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **190**: 613-624.
- Shin, J. S., K. S. Ryu, J. Ko, A. Lee & B. S. Choi, (2010) Structural characterization reveals that a PilZ domain protein undergoes substantial conformational change upon binding to cyclic dimeric guanosine monophosphate. *Protein Sci*.
- Simm, R., M. Morr, A. Kader, M. Nimtz & U. Romling, (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* **53**: 1123-1134.
- Singer, M. & D. Kaiser, (1995) Ectopic production of guanosine penta- and tetraphosphate can initiate early developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev* **9**: 1633-1644.
- Skotnicka, D., (persönliche Korrespondenz). In., pp.
- Slater, H., A. Alvarez-Morales, C. E. Barber, M. J. Daniels & J. M. Dow, (2000) A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* **38**: 986-1003.
- 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.
- Spangler, C., A. Böhm, U. Jenal, R. Seifert & V. Kaefer, (2010) A liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry method for quantitation of cyclic di-guanosine monophosphate. *J Microbiol Methods* **81**: 226-231.
- Spratt, B. G., P. J. Hedge, S. te Heesen, A. Edelman & J. K. Broome-Smith, (1986) Kanamycin-resistant vectors that are analogues of plasmids pUC8, pUC9, pEMBL8 and pEMBL9. *Gene* **41**: 337-342.
- Spröer, C., H. Reichenbach & E. Stackebrandt, (1999) The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 3**: 1255-1262.
- Stauff, D. L. & B. L. Bassler, (2011) Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA recognition and gene regulation by the CviR receptor. *J Bacteriol* **193**: 3871-3878.
- Stock, A. M., V. L. Robinson & P. N. Goudreau, (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183-215.
- Studier, F. W., (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**: 207-234.

- Subramanian, G., R. Mural, S. L. Hoffman, J. C. Venter & S. Broder, (2001) Microbial disease in humans: A genomic perspective. *Mol Diagn* **6**: 243-252.
- Sudarsan, N., E. R. Lee, Z. Weinberg, R. H. Moy, J. N. Kim, K. H. Link & R. R. Breaker, (2008) Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* **321**: 411-413.
- Sun, M., M. Wartel, E. Cascales, J. W. Shaevitz & T. Mignot, (2011) Motor-driven intracellular transport powers bacterial gliding motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 7559-7564.
- Takeda, S., Y. Fujisawa, M. Matsubara, H. Aiba & T. Mizuno, (2001) A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC → YojN → RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. *Mol Microbiol* **40**: 440-450.
- Tchigvintsev, A., X. Xu, A. Singer, C. Chang, G. Brown, M. Proudfoot, H. Cui, R. Flick, W. F. Anderson, A. Joachimiak, M. Y. Galperin, A. Savchenko & A. F. Yakunin, (2010) Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. *J Mol Biol* **402**: 524-538.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin & D. G. Higgins, (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**: 4876-4882.
- Thormann, K. M., S. Duttler, R. M. Saville, M. Hyodo, S. Shukla, Y. Hayakawa & A. M. Spormann, (2006) Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP. *J Bacteriol* **188**: 2681-2691.
- Tischler, A. D. & A. Camilli, (2005) Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect Immun* **73**: 5873-5882.
- Towbin, H., T. Staehelin & J. Gordon, (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354.
- Tran, N. T., C. D. Den Hengst, J. P. Gomez-Escribano & M. J. Buttner, (2011) Identification and characterization of CdgB, a diguanylate cyclase involved in developmental processes in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **193**: 3100-3108.
- Tsokos, C. G., B. S. Perchuk & M. T. Laub, (2011) A dynamic complex of signaling proteins uses polar localization to regulate cell-fate asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Dev Cell* **20**: 329-341.
- Tucker, N. P., B. D'Autreaux, F. K. Yousafzai, S. A. Fairhurst, S. Spiro & R. Dixon, (2008) Analysis of the nitric oxide-sensing non-heme iron center in the NorR regulatory protein. *J Biol Chem* **283**: 908-918.
- Tusher, V. G., R. Tibshirani & G. Chu, (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 5116-5121.
- Ulrich, L. E. & I. B. Zhulin, (2010) The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic Acids Res* **38**: D401-407.
- Valla, S., D. H. Coucheron, E. Fjaervik, J. Kjosbakken, H. Weinhouse, P. Ross, D. Amikam & M. Benziman, (1989) Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: complementation of cellulose-negative mutants by the UDPG pyrophosphorylase structural gene. *Mol Gen Genet* **217**: 26-30.
- van Hijum, S. A., M. H. Medema & O. P. Kuipers, (2009) Mechanisms and evolution of control logic in prokaryotic transcriptional regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 481-509, Table of Contents.
- Vos, M. H., L. Bouzhir-Sima, J. C. Lambry, H. Luo, J. J. Eaton-Rye, A. Ioanoviciu, P. R. Ortiz de Montellano & U. Liebl, (2012) Ultrafast Ligand Dynamics in the Heme-Based GAF Sensor Domains of the Histidine Kinases DosS and DosT from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* **51**: 159-166.
- 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.
- Wegener-Feldbrügge, S. & L. Søgaard-Andersen, (2009) The atypical hybrid histidine protein kinase RodK in *Myxococcus xanthus*: spatial proximity supersedes kinetic preference in phosphotransfer reactions. *J Bacteriol* **191**: 1765-1776.
- Weinberg, Z., J. E. Barrick, Z. Yao, A. Roth, J. N. Kim, J. Gore, J. X. Wang, E. R. Lee, K. F. Block, N. Sudarsan, S. Neph, M. Tompa, W. L. Ruzzo & R. R. Breaker, (2007) Identification of 22 candidate structured RNAs in bacteria using the CMfinder comparative genomics pipeline. *Nucleic Acids Res* **35**: 4809-4819.
- Weis, S., (2007) Identifizierung und Charakterisierung zweier für die Entwicklung essentieller Serin/Threonin-Proteinkinasen in *Myxococcus xanthus*. In: Dissertation. Philipps-Universität Marburg, pp. 130.
- Wenzel, S. C. & R. Müller, (2005) Formation of novel secondary metabolites by bacterial multimodular assembly lines: deviations from textbook biosynthetic logic. *Curr Opin Chem Biol* **9**: 447-458.
- Wheeler, R. T. & L. Shapiro, (1999) Differential localization of two histidine kinases controlling bacterial cell differentiation. *Mol Cell* **4**: 683-694.
- Wireman, J. W. & M. Dworkin, (1975) Morphogenesis and developmental interactions in myxobacteria. *Science* **189**: 516-523.
- Wood, P. J. & R. G. Fulcher, (1978) Interaction of Some Dyes with Cereal Beta-Glucans. *Cereal Chemistry* **55**: 952-966.

- 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, (1997) Regulation of expression of the *pilA* gene in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **179**: 7748-7758.
- Wu, S. S., J. Wu & D. Kaiser, (1997) The *Myxococcus xanthus pilT* locus is required for social gliding motility although pili are still produced. *Mol Microbiol* **23**: 109-121.
- 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.-y. Duan, M. Esmaeiliyan & H. B. Kaplan, (2008) Composition, Structure, and Function of the *Myxococcus xanthus* Cell Envelope. In: Myxobacteria. Multicellularity and Differentiation. D. E. Whitworth (ed). pp. 229-240.
- Yang, Z., Y. Geng, D. Xu, H. B. Kaplan & W. Shi, (1998) A new set of chemotaxis homologues is essential for *Myxococcus xanthus* social motility. *Mol Microbiol* **30**: 1123-1130.
- 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.
- Yoder-Himes, D. R. & L. Kroos, (2006) Regulation of the *Myxococcus xanthus* C-signal-dependent Omega4400 promoter by the essential developmental protein FruA. *J Bacteriol* **188**: 5167-5176.
- 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.
- Zhang, C. C., (1996) Bacterial signalling involving eukaryotic-type protein kinases. *Mol Microbiol* **20**: 9-15.
- Zhang, X., (2005) Characterization of DigR, a novel response regulator protein in *Myxococcus xanthus*. In: Masterarbeit. University of Southern Denmark, Odense, pp.
- Zogaj, X., M. Nimtz, M. Röhde, W. Bokranz & U. Romling, (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* **39**: 1452-1463.
- 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.

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren („ <u>a</u> mino <u>a</u> cids“)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
c-di-GMP	Bis-(3'-5')-zyklisches di-Guanosinmonophosphat
Cam	Chloramphenicol
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix (<u>e</u> xtrac <u>e</u> llular <u>m</u> atrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<u>E</u> lectrophoretic <u>M</u> obility <u>S</u> hift <u>A</u> ssay
EPS	<u>E</u> xopolysaccharide
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HEX	Hexachlorfluorescein
HK	<u>H</u> istidin <u>k</u> inase
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<u>h</u> orser <u>a</u> dish <u>p</u> eroxidase)
IgG	Immunglobulin G
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
LB	<u>L</u> ysogeny <u>B</u> roth
MALDI	<u>M</u> atrix- <u>A</u> ssisted <u>L</u> aser- <u>D</u> esorption <u>I</u> onization
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
poly-(dIdC)	Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid sodium salt
rpm	Umdrehungen pro Minute (<u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute)
RR	Antwortregulator (<u>r</u> esponse <u>r</u> egulator)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	<u>s</u> odium <u>s</u> aline <u>c</u> itrate
Tet	Tetrazyklin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
WT	Wildtyp
% (v/v)	Volumenanteil (<u>v</u> olume per <u>v</u> olume)
% (w/v)	Massenanteil (<u>w</u> eight per <u>v</u> olume)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismen von Zwei-Komponenten-Systemen.....	12
Abbildung 2: Der c-di-GMP Metabolismus.....	15
Abbildung 3: Bewegungsstudie der Deletionsmutante Δ <i>sgmT</i> (SA3502).....	29
Abbildung 4: Untersuchungen zum Aufbau der Typ-IV-Pili in Δ <i>sgmT</i>	30
Abbildung 5: Quantifizierung des Exopolysaccharid-Anteils in Δ <i>sgmT</i>	31
Abbildung 6: Nachweis des extrazellulären Matrix-Proteins FibA in Δ <i>sgmT</i>	32
Abbildung 7: Nachweis des LPS O-Antigens in Δ <i>sgmT</i>	33
Abbildung 8: Konservierung des genetischen Kontexts von <i>sgmT</i> und Domänenstruktur von SgmT.....	34
Abbildung 9: Sequenzvergleich von SgmT ^{GGDEF} mit anderen GGDEF-Domänen.....	36
Abbildung 10: S-Bewegungsstudie und Immunblot der Punkt-/Domänen- und Deletionsmutanten von <i>sgmT</i> ..	38
Abbildung 11: EPS-Quantifizierung und FibA-Immunblot Analyse in <i>sgmT</i> -Mutanten.....	39
Abbildung 12: Entwicklungsstudie der <i>sgmT</i> -Mutanten auf TPM-Agar.....	40
Abbildung 13: Nachweis der spezifischen c-di-GMP-Bindung von SgmT.....	42
Abbildung 14: S-Bewegungsstudie und Immunblot Analysen der SgmT-YFP-Fusionsmutanten.....	43
Abbildung 15: Zelluläre Lokalisierung von SgmT-YFP.....	45
Abbildung 16: Lokalisierung von SgmT-YFP während der Zellbewegung.....	47
Abbildung 17: Konservierung des genetischen Kontexts von <i>digR</i>	49
Abbildung 18: Phänotypischer Vergleich der Deletionsmutanten Δ <i>sgmT</i> und Δ <i>digR</i>	51
Abbildung 19: Vergleichende Transkriptomanalysen von Δ <i>sgmT</i> und Δ <i>digR</i>	54
Abbildung 20: Phosphogruppentransferstudien mit SgmT und DigR.....	56
Abbildung 21: Unterschiedlich-exprimierte Gene in Δ <i>sgmT</i> und Δ <i>digR</i> im Vergleich zum Wildtyp.....	60
Abbildung 22: Identifikation des Transkriptionsstarts und einer DigR-Bindestelle im <i>fibA</i> -Promotor.....	63
Abbildung 23: EMSA-Studien zur Verifikation der DigR-Bindestelle im <i>fibA</i> -Promotor.....	65
Abbildung 24: Identifikation von DigR-Bindestellen stark-regulierter Gene.....	69
Abbildung 25: Bewegungs- und Entwicklungsstudie von Δ <i>MXAN2424</i> und Δ <i>MXAN2530</i>	75
Abbildung 26: Bewegungsstudie von SA3526, SA3527 und SA3528.....	77
Abbildung 27: Nachweis von StrepII-Fusionsproteinen in vegetativen Zellen.....	78
Abbildung 28: Entwicklungsstudie von SA3526, SA3527 und SA3528.....	79
Abbildung 29: Das regulatorische Modell des SgmT/DigR-Regulons.....	89
Abbildung 30: Schematische Darstellung der Deletion von <i>sgmT</i>	124

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: GGDEF-, EAL- und HD-GYP-Domänenproteine von <i>M. xanthus</i>	72
Tabelle 2: PilZ-Domänenproteine von <i>M. xanthus</i>	73
Tabelle 3: Enzyme und Kits.....	97
Tabelle 4: Geräte.....	98
Tabelle 5: Nährmedien für <i>E. coli</i>	100
Tabelle 6: Autoinduktionsmedium für <i>E. coli</i>	101
Tabelle 7: Antibiotikazusätze in Medien für <i>E. coli</i>	101
Tabelle 8: Nährmedien und Zusätze für <i>M. xanthus</i>	102
Tabelle 9: Antibiotikazusätze in Medien für <i>M. xanthus</i>	102
Tabelle 10: Medien für Bewegungs- und Entwicklungsstudien von <i>M. xanthus</i>	103
Tabelle 11: Verwendete <i>E. coli</i> Stämme.....	104
Tabelle 12: Verwendete <i>M. xanthus</i> Stämme.....	105
Tabelle 13: Oligonukleotide.....	108
Tabelle 14: Vektoren und Plasmide.....	114
Tabelle 15: Pufferlösungen für die Proteinreinigung.....	128
Tabelle 16: Pufferlösungen und Gele für die SDS-PAGE.....	130
Tabelle 17: Pufferlösungen für Protein-Immunblots.....	131
Tabelle 18: Verwendete Antikörper und Konjugate.....	132
Tabelle 19: Verwendete Software.....	140

Danksagung

„Keine Schuld ist dringender, als die, Dank zu sagen.“

Marcus Tullius Cicero

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Curriculum Vitae

Die Printversion dieser Seite enthält persönliche Daten, die nicht für die Online-Veröffentlichung zur Verfügung stehen

Anhänge

Sequenzvergleich Kinasedomäne:

```

SgmT_Mx 326 : LKDEIIAVCSHDLRAPLQVLLGHGRLLQEGP---LEPQQRQSSEAMIRGKKLLGLVESL : 382
HK853_Tm 250 : MKTEFIANISHBLRTPPLTAIKAYABTIYNSLGEGLDLSLKEFLEVIIDQSNHLENLLNEL : 309
EnvZ_Ec 233 : DRTLLMAGVSHDLRTPPLTRIRLATEMMSEQ---DGYLAESINKDIEECNAITBQFIDYL : 288
PhoR_Ec 203 : ARRNFANVSHBLRTPPLVLOGYLEMMNEQP--LEGAVREKALHTMREQTQRMGLVKQL : 260
NtrB_St 129 : AARDLVRGLAHEIRNPLGGLRGAAILSKALP---DPALTEYTKVIIIEQADSVRNLDVRL : 185
KinA_Bs 395 : IAGQLAAGLAHEIRNPLTAIKGFLQLMKPTME-GNEHYFDIVFSELSRIELILSELLMLA : 453
    
```

H-Box

```

SgmT_Mx 383 : L-EKGKGEAARLSHEPRVLDVAQICRDAVNELEILAADRGVS--LRADCPDSIMIGDEV : 439
HK853_Tm 310 : L-DFSRLERKSLQDNREKVDLCDLVE SAVNAIKEFASSHNVNVLVESNVPCPEAYIDPT : 368
EnvZ_Ec 289 : R-TGQEMPMEMADLNAVLGEVIAAESGYEREIETALYP-----GSTBVKMHPPL : 335
PhoR_Ec 261 : L-TLSKIEAAPTHLLNEKVDVPMMLRVVEREAQTLKQKQT---FTFEIDNGLKVSQNGED : 316
NtrB_St 186 : LGPQHPGMHITESLHKVAERVVALVSMELPDNVRLIRDYDPS-----LPELPHDPE : 236
KinA_Bs 454 : K-PQNAVKEYLNLKKLIGEVSAILETQANLNGIFIRTSYEK-----DSLYLNGDQN : 504
    
```

```

SgmT_Mx 440 : KTHEVILQNLITNATHHARQDGE-----VVVSTQRLGRPDGDAAKVQVDDGVTPEDE : 492
HK853_Tm 369 : RIRQVLLNLLNNGVYKSKKDP-----DKYVKVILDEKDG-GVLIIIVEDNGTGIIDHA : 420
EnvZ_Ec 336 : SKRAVANMVVNAARYGNG-----WIKVSSGTEPN-RAWFOVEDDGGIAPBQ : 382
PhoR_Ec 317 : QLRSAISNLVYNAVNHTEPEGT-----HITVRWQRVPH-GAEFSVEDNPGGIAPBQ : 365
NtrB_St 237 : QTEQVLDNIVRNALQALGPEGGITLRTAFQLTLHGERYLAARTVVEDNPGGIPPHL : 296
KinA_Bs 505 : QLKQVFINLIKNAVESMPDGG-----TVDLIITEDEH-SVHVTVRDEGEGLPEKV : 553
    
```

N-Box

D-Box

```

SgmT_Mx 493 : LHLVEDRMRHG-----GKGGTGLGLAICKEFVELHGEBIMAESPPDTCIEVFETPLAQ : 546
HK853_Tm 421 : KDRIFEQSYRVDSSLTTEYVPGTGLGLAITKEIVELHGERTWVSEVVKCSRFVWIPKDR : 480
EnvZ_Ec 383 : RKHLFQPEVRGDSART--ISGTGLGLAIVQRIVDNHNMLELCSERGLSIRAWLPVPV : 440
PhoR_Ec 366 : IPRITERSYRVDKARSRTGGSGGLGLAIVKHAMNHESRLNIBSTVVKCTRESFVILPERL : 425
NtrB_St 297 : QDTLEYPMVSGR-----EGGTGLGLSIAARNLIDQHAKEIETSWPG-HTEFSVYLPIRK : 349
KinA_Bs 554 : LNRIQEPRLTTK-----EKGTGLGLMVFENIENHQEVHVDSSHPEKTAEKISFPPK~ : 606
    
```

F-Box

G-Box

Sequenzvergleich Empfängerdomäne:

```

SgmT_Mx 566 : PRVLVVEDEPEIAAVLSVLR-SKRVYEVARDGAEGLARAKAQRPDLVVMDVFLK : 621
DigR_Mx 3 : IRILVVDDQDCDYLKIMTRECYEVTTDDPTQTWEILRGSDFHLVLDMMMPOM : 59
RR468_Tm 3 : KKVLLVDDSAVLRKIVSNLKKEGYEVIEAENGQIAIEKLSFTPDLLVLDIMMPEVM : 59
OmpR_Ec 5 : YKILVVDDMRRLRALLERYLTEQGFQVRSVANAEQMDRLLTRESFHLVLDLMLPGE : 61
PhoB_Ec 3 : RRILVVEDEAPIREMVCFVLEQNGEQPVEABDYDSA'NQLNEPWPDLILLDMMLEGG : 59
NtrC_St 4 : GIVVVVDDSSIRWVLERALAGALCTTFENGNEVLAALASKTPDVLLSDIRMPGM : 60
Spo0F_Bs 4 : EKILVVDDQYIRILVNEVFNKEGYQTFQAANGLQALDIVTKERPDLVLLDMKIPGM : 60
    
```

```

SgmT_Mx 622 : DGLDAAMALRSSTDTARIPVILLSAHQGVAEKVRSNLGAVDYMSPKPNAVELNRT : 678
DigR_Mx 60 : SGTEVLEQIRKYD--TDVAVIVATAYPTVDTAVASLKAQASDYVKKPMPEOFTTAV : 114
RR468_Tm 60 : DGFTVLLKQLQEKKEWKRIIPVIVLTAKGGEEDSLALSGLARKVMRKPSPSOPLEEV : 116
OmpR_Ec 62 : DGLSICRRLR--SQSNPMBIIMVTAKGEEVDRIVGLIGADDYIPKPNPRELLARI : 116
PhoB_Ec 60 : SGIQFIKHLRRESMTRDIPVVMLTARGEEDRVRGLETGADDYITKPPSPKELVARI : 116
NtrC_St 61 : DGLALLKQIKQRH--PMLVVIIMTAHSDLDAAVSAYQCAFAYLIPKPNIDEAVALV : 115
Spo0F_Bs 61 : DGIEILKRMKVID--ENIRVIIMTAYGELDMIQESKELGALTHFAKPNIDEIRDAV : 115
    
```

Anhang 1: Sequenzvergleiche der Kinase- und Empfängerdomäne von SgmT.

Die Proteinsequenz der Kinase- und Empfängerdomäne von SgmT wurde anderen Sequenzen von Kinase- bzw. Empfängerdomänen verglichen, die in der Literatur beschrieben und analysiert wurden. Links sind die Namen der Proteine sowie die Spezies angegeben, die Kürzel stehen für folgende Organismen: Mx = *M. xanthus*, Tm = *Thermotoga maritima* Ec = *E. coli*, St = *S. typhimurium* und Bs = *B. subtilis*. Die Koordinaten sind jeweils vor und hinter jeder Zeile angegeben. Dieses „Sequenzalignment“ wurde mit „Genedoc“ generiert (Nicholas *et al.*, 1997), die Farbhinterlegung beschreibt die Konservierung (schwarz = 100 %, dunkelgrau ≥ 80 % und hellgrau ≥ 60 %), rot-hinterlegte Aminosäuren in der Empfängerdomäne bilden die Kontaktfläche für die spezifische Interaktion mit der korrespondierenden Kinase (Capra *et al.*, 2010). Essentielle funktionelle Aminosäurereste sind mit „*“ gekennzeichnet und hinterlegte Kinase-Motive benannt (Grebe & Stock, 1999).

Anhang 2: Signifikant unterschiedlich regulierte Gene in Δ *sgmT* und Δ *digR*^a.

ID No. ^b	MXAN	Gene	Annotation	SA3502 Δ <i>sgmT</i> Expression ratio ± standard deviation		SA1804 Δ <i>digR</i> Expression ratio ± standard deviation		Localization signal ^c	Functional category	Phylogenetic distribution ^d
				Micro-arrays	qRT-PCR	Micro-arrays	qRT-PCR			
1	MXAN3175	-	hypothetical protein	-68.3 ± 0.8	-8364.1 ± 1597.3	-50.2 ± 0.4	-5983.1 ± 663.1	Spl	not defined	<i>M. xanthus</i>
2	MXAN0587	-	trypsin domain-containing protein	-21.5 ± 0.7	-406.4 ± 66.5	-22.5 ± 0.7	-393.4 ± 50.9	SplI	protease/peptidase	Conserved
3	MXAN6106	<i>fibA</i>	matrix-associated zinc metalloprotease FibA	-8.3 ± 1.0	-10.8 ± 0.9	-15.2 ± 0.9	-20.3 ± 4.1	SplI	protease/peptidase	Conserved
4	MXAN5033	-	hypothetical protein	-10.9 ± 0.6	-333.1 ± 27.7	-9.5 ± 0.8	-237.8 ± 1.0	SplI	not defined	<i>M. xanthus</i>
5	MXAN2856	-	type II lantibiotic, LanA homolog	-9.5 ± 0.8		-9.5 ± 0.7		CYT	antimicrobial	Myxococcales
6	MXAN4293	<i>dkxM</i>	hypothetical protein	-8.2 ± 1.0		-8.1 ± 0.9		CYT	secondary metabolism	Myxococcales
7	MXAN0504	-	hypothetical protein	-7.1 ± 0.6		-7.9 ± 0.5		Spl	not defined	<i>M. xanthus</i>
8	MXAN2855	-	type II lantibiotic, LanA homolog	-7.4 ± 0.9	-46.6 ± 4.2	-7.8 ± 0.6	-54.7 ± 4.6	CYT	antimicrobial	Conserved
9	MXAN4290	<i>dkxO</i>	putative thioesterase	-8.6 ± 0.8		-7.2 ± 0.9		CYT	secondary metabolism	Conserved
10	MXAN1650	-	trypsin domain-containing protein	-6.2 ± 0.9		-6.8 ± 0.7		Spl	protease/peptidase	Conserved
11	MXAN4291	-	putative acyl carrier protein	-6.6 ± 0.7		-5.8 ± 0.9		CYT	secondary metabolism	Conserved
12	MXAN5125	<i>mrpC</i>	transcriptional regulator MrpC	-6.1 ± 0.8		-5.1 ± 0.8		CYT	signal transduction	Conserved
13	MXAN4746	-	TonB-dependent receptor	-6.1 ± 0.7		-4.2 ± 0.6		Spl/OM	metabolism	Conserved
14	MXAN3964	-	trypsin domain-containing protein	-3.5 ± 0.9		-3.7 ± 1.6		SplI	protease/peptidase	Conserved
15	MXAN5169	-	hypothetical protein	-3.7 ± 0.9		-3.6 ± 0.7		CYT	not defined	<i>M. xanthus</i>
16	MXAN1672	-	hypothetical protein	-3.1 ± 0.9		-3.0 ± 1.1		SplI	not defined	<i>M. xanthus</i>
17	MXAN5040	-	aldehyde dehydrogenase family protein	-2.2 ± 0.8		-2.7 ± 0.9		CYT	energy production	Conserved
18	MXAN4421	-	putative lipoprotein	-2.1 ± 0.8		-2.1 ± 1.2		SplI	not defined	<i>M. xanthus</i>
1	MXAN6255	-	hypothetical protein	42.4 ± 1.5	156.5 ± 13.2	42.8 ± 1.2	183.1 ± 5.8	TMH	not defined	Conserved
2	MXAN5453	-	hypothetical protein	20.6 ± 1.4	60.8 ± 8.3	20.0 ± 1.5	93.3 ± 26.0	CYT	not defined	Conserved
3	MXAN3534	-	hypothetical protein	26.5 ± 1.5		15.4 ± 1.1		CYT	not defined	<i>M. xanthus</i>
4	MXAN3533	-	PheA/TfdB family FAD-binding monooxygenase	20.4 ± 1.3		8.9 ± 1.4		CYT	metabolism	Conserved
5	MXAN6254	-	hypothetical protein	7.9 ± 1.2		8.8 ± 1.4		TMH	not defined	Conserved
6	MXAN3971	-	putative lipoprotein, IF-tail domain	7.9 ± 1.2	7.6 ± 0.2	7.0 ± 1.2	7.3 ± 0.3	Spl	not defined	Conserved
7	MXAN1093	-	DNA-binding response regulator	6.6 ± 1.4	4.9 ± 0.2	5.7 ± 1.2	4.9 ± 0.3	CYT	signal transduction	Conserved

8	MXAN1676	-	oxidase, FAD binding	7.9 ± 1.4		5.6 ± 1.1		CYT	energy production	Conserved
9	MXAN4100	<i>hem B</i>	delta-aminolevulinic acid dehydratase	7.2 ± 1.3		5.3 ± 1.1		CYT	metabolism	Conserved
10	MXAN7212	-	hypothetical protein	4.9 ± 1.4		5.3 ± 1.2		SplI	not defined	Myxococcales
11	MXAN3564		M36 family peptidase	7.0 ± 1.3		5.2 ± 1.2		Spl	protease/peptidase	Conserved
12	MXAN3535	-	hypothetical protein	6.7 ± 1.6		4.9 ± 1.2		CYT	not defined	<i>M. xanthus</i>
13	MXAN7409	-	hypothetical protein	4.8 ± 1.5		4.8 ± 1.2		TMH	not defined	Conserved
14	MXAN6352	-	trypsin domain-containing protein	6.0 ± 1.4		4.6 ± 1.2		Spl	protease/peptidase	Conserved
15	MXAN7352	-	hypothetical protein	8.4 ± 1.4		4.5 ± 1.1		CYT	not defined	Myxococcales
16	MXAN6225	-	putative lipoprotein	5.3 ± 1.4		4.4 ± 1.2		SplI	not defined	Conserved
17	MXAN7351	-	hypothetical protein	7.4 ± 1.4		4.3 ± 1.2		Spl	not defined	Myxococcales
18	MXAN4541	-	hypothetical protein	7.0 ± 1.2		3.7 ± 1.2		TMH	not defined	<i>M. xanthus</i>
19	MXAN5845	-	hypothetical protein with CpxP domain	6.3 ± 1.2		3.6 ± 1.2		Spl	not defined	Conserved
20	MXAN7408	-	hypothetical protein	4.4 ± 1.6		3.5 ± 1.3		CYT	not defined	<i>M. xanthus</i>
21	MXAN6000	-	iron compound ABC transporter, periplasmic iron binding protein	4.0 ± 1.4		3.5 ± 1.2		Spl	metabolism	Conserved
22	MXAN6613	-	SdpC toxin-family protein	5.5 ± 1.4		3.5 ± 1.2		Spl	antimicrobial	Conserved
23	MXAN7353	-	putative beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase	5.7 ± 1.3		3.4 ± 1.2		CYT	metabolism	Conserved
24	MXAN6884	-	hypothetical protein	3.1 ± 1.4		3.3 ± 1.4		CYT	not defined	Myxococcales
25	MXAN6223	-	sensor histidine kinase	3.0 ± 1.3		3.1 ± 1.4		TMH	signal transduction	Conserved
26	MXAN7199	-	putative lipoprotein	3.7 ± 1.3		3.0 ± 1.2		Spl	not defined	Myxococcales
27	MXAN5300	-	Hypothetical	2.7 ± 1.2		3.0 ± 1.3		CYT	not defined	<i>M. xanthus</i>
28	MXAN1674	-	NAD dependent epimerase/dehydratase family protein	4.5 ± 1.3		2.9 ± 1.0		CYT	metabolism	Conserved
29	MXAN6534	-	PTS system mannose/fructose/sorbose family IIB subunit	3.2 ± 1.3		2.9 ± 1.1		CYT	metabolism	Conserved
30	MXAN3540	<i>sdhB</i>	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	3.5 ± 1.3		2.9 ± 1.2		CYT	energy production	Conserved
31	MXAN7401	<i>vegA</i>	vegetative protein	3.2 ± 1.4		2.8 ± 1.2		CYT	not defined	Myxococcales
32	MXAN6227	-	putative lipoprotein	4.0 ± 1.2		2.8 ± 1.2		Spl	not defined	Conserved
33	MXAN4033	-	hypothetical protein	3.6 ± 1.3		2.8 ± 1.1		CYT	not defined	Myxococcales
34	MXAN0730	-	O-methyltransferase family protein	2.4 ± 1.2		2.8 ± 1.2		CYT	secondary metabolism	Conserved
35	MXAN5348	-	M23 peptidase domain-containing protein	2.1 ± 1.2		2.6 ± 1.2		TMH	protease/peptidase	Conserved
36	MXAN2812	-	hypothetical protein	3.1 ± 1.2		2.6 ± 1.2		CYT	not defined	Myxococcales

37	MXAN0522	-	putative lipoprotein	2.6 ± 1.3		2.5 ± 1.2		SpII	not defined	Myxococcales
38	MXAN5127	<i>phhA</i>	phenylalanine 4-monooxygenase	2.6 ± 1.3		2.5 ± 1.3		CYT	metabolism	Conserved
39	MXAN0982	-	hypothetical protein	2.5 ± 1.1		2.5 ± 1.1		SpI	not defined	Conserved
40	MXAN6981	-	hypothetical protein	2.3 ± 1.2		2.5 ± 1.2		CYT	not defined	Conserved
41	MXAN3539	<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	3.0 ± 1.3		2.5 ± 1.2		CYT	energy production	Conserved
42	MXAN5921	-	acyl-CoA dehydrogenase	2.5 ± 1.2		2.4 ± 1.2		CYT	metabolism	Conserved
43	MXAN7513	-	hypothetical protein	3.1 ± 1.4		2.4 ± 1.1		SpI	not defined	<i>M. xanthus</i>
44	MXAN1083	-	NADH dehydrogenase I, K subunit	2.4 ± 1.3		2.4 ± 1.3		TMH	energy production	Conserved
45	MXAN6393	<i>fabZ</i>	beta-hydroxyacyl-(acyl-carrier-protein) dehydratase FabZ	2.0 ± 1.2		2.3 ± 1.1		CYT	metabolism	Conserved
46	MXAN6886	-	putative lipoprotein	2.8 ± 1.3		2.3 ± 1.1		SpII	not defined	Conserved
47	MXAN2892	-	WGR domain-containing protein	2.3 ± 1.0		2.3 ± 1.1		CYT	not defined	Conserved
48	MXAN0212	-	aminotransferase, class I and II family protein	2.3 ± 0.8		2.3 ± 1.3		CYT	metabolism	Conserved
49	MXAN5160	-	DoxD-like family protein	2.1 ± 1.1		2.2 ± 1.2		TMH	not defined	Conserved
50	MXAN2661	-	5'-nucleotidase family protein	3.0 ± 1.3		2.2 ± 1.2		SpI	metabolism	Conserved
51	MXAN6086	<i>coxB</i>	cytochrome c oxidase, subunit II	2.5 ± 1.2		2.2 ± 1.2		TMH	energy production	Conserved
52	MXAN4038	<i>hisC</i>	histidinol-phosphate aminotransferase	2.8 ± 1.3		2.2 ± 1.2		CYT	metabolism	Conserved
53	MXAN7358	<i>tkt</i>	transketolase	2.2 ± 1.2		2.2 ± 1.2		CYT	metabolism	Conserved
54	MXAN2660	-	putative lipoprotein	2.5 ± 1.2		2.2 ± 1.3		SpII	not defined	Myxococcales
55	MXAN1084	-	NADH dehydrogenase I, J subunit	2.1 ± 0.8		2.2 ± 1.3		TMH	energy production	Conserved
56	MXAN1775	-	hypothetical membrane-protein	2.5 ± 1.4		2.2 ± 1.1		TMH	not defined	Conserved
57	MXAN6085	-	SCO1/SenC family protein	2.5 ± 1.2		2.2 ± 1.4		SpI	energy production	Conserved
58	MXAN6337	-	putative isocitrate dehydrogenase, NAD-dependent	2.9 ± 1.1		2.2 ± 1.2		CYT	energy production	Conserved
59	MXAN4176	-	outer membrane efflux protein	2.3 ± 1.3		2.2 ± 1.1		OM	drug resistance	Conserved
60	MXAN5836	-	M3 family peptidase	2.1 ± 0.8		2.1 ± 1.3		SpI	protease/peptidase	Conserved
61	MXAN1161	-	hypothetical protein	2.3 ± 1.2		2.1 ± 1.1		SpI	not defined	Conserved
62	MXAN6976	-	hypothetical protein	2.1 ± 0.7		2.1 ± 1.4		CYT	not defined	Myxococcales
63	MXAN0452	-	putative myo-inositol-1-phosphate synthase	2.5 ± 1.1		2.1 ± 1.3		SpI	metabolism	Conserved
64	MXAN0390	-	ribonuclease activity regulator protein RraA	2.1 ± 0.9		2.1 ± 1.1		CYT	metabolism	Conserved
65	MXAN2600	-	hypothetical protein	2.3 ± 1.3		2.1 ± 1.2		SpI	not defined	Myxococcales

66	MXAN4039	<i>accA</i>	acetyl-CoA carboxylase, carboxyl transferase, alpha subunit	2.5 ± 1.1		2.1 ± 1.2		CYT	metabolism	Conserved
67	MXAN5311	-	hypothetical protein	2.5 ± 1.3		2.1 ± 1.3		CYT	not defined	Myxococcales
68	MXAN6535	-	PTS system mannose/fructose/sorbose family IIA subunit	2.3 ± 1.3		2.1 ± 1.2		CYT	metabolism	Conserved
69	MXAN1954	<i>trxB</i>	thioredoxin-disulfide reductase	2.6 ± 1.2		2.1 ± 1.1		CYT	metabolism	Conserved
70	MXAN4619	-	glycosyl transferase, group 2 family protein	2.0 ± 1.2		2.1 ± 1.1		CYT	energy production	Conserved
71	MXAN3769	-	NUDIX family hydrolase	2.1 ± 1.1		2.1 ± 1.0		CYT	replication	Conserved
72	MXAN3519	<i>gltA</i>	citrate synthase	2.5 ± 1.3		2.1 ± 1.1		CYT	energy production	Conserved
73	MXAN6078	-	putative cytochrome c	2.3 ± 1.2		2.1 ± 1.4		Spl	energy production	Conserved
74	MXAN1807	-	excisionase family DNA-binding protein	2.8 ± 1.0		2.1 ± 1.1		CYT	transcription	Conserved
75	MXAN6783	-	decarboxylase, group II	2.0 ± 1.1		2.1 ± 1.1		CYT	metabolism	Conserved
76	MXAN0481	-	hypothetical protein	2.4 ± 1.0		2.1 ± 0.8		Spl	not defined	Conserved
77	MXAN2536	-	putative long-chain-fatty-acid--CoA ligase	2.4 ± 0.7		2.0 ± 1.1		CYT	metabolism	Conserved
78	MXAN0825	-	hypothetical protein	2.2 ± 1.2		2.0 ± 1.0		Spl	not defined	Conserved
79	MXAN0402	<i>atpB</i>	ATP synthase F0, A subunit	2.0 ± 0.8		2.0 ± 1.3		CYT	energy production	Conserved
80	MXAN5559	-	putative nitrate reductase, gamma subunit	2.1 ± 0.8		2.0 ± 1.2		TMH	energy production	Conserved
81	MXAN5577	<i>ppa</i>	inorganic pyrophosphatase	2.1 ± 1.2		2.0 ± 1.1		CYT	energy production	Conserved
82	MXAN0404	<i>atpF</i>	ATP synthase F0, B subunit	2.1 ± 0.7		2.0 ± 1.2		CYT	energy production	Conserved
83	MXAN6088	<i>coxC</i>	cytochrome c oxidase, subunit III	2.4 ± 1.3		2.0 ± 1.3		TMH	energy production	Conserved
84	MXAN2849	-	hypothetical protein	2.4 ± 1.2		2.0 ± 1.1		CYT	not defined	Conserved
85	MXAN6228	-	hypothetical protein	2.5 ± 1.2		2.0 ± 1.1		CYT	not defined	<i>M. xanthus</i>
86	MXAN6978	-	putative lipoprotein	2.9 ± 1.4		2.0 ± 1.3		SplI	not defined	Myxococcales
	MXAN0962	-	putative lipoprotein, von Willebrand factor type A domain	Not significant		-2.1 ± 0.9		SplI	not defined	Myxococcales
	MXAN5261	-	putative lipoprotein	Not significant		-2.1 ± 0.8		SplI	not defined	Myxococcales
	MXAN0277	-	hypothetical protein	Not significant		2.5 ± 2.1		CYT	not defined	Conserved
	MXAN0433	-	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	Not significant		2.5 ± 1.2		CYT	secondary metabolism	Conserved
	MXAN2558	-	lipoprotein	Not significant		2.4 ± 1.4		SplI	outer membran protein	Conserved
	MXAN0703	-	hypothetical protein	Not significant		2.2 ± 1.0		Spl	not defined	Myxococcales
	MXAN2260	-	potassium efflux system family protein	Not significant		2.2 ± 1.1		TMH	metabolism	Conserved
	MXAN2967	-	RND efflux transporter	Not significant		2.2 ± 1.3		Spl	drug resistance	Conserved

	MXAN6686	-	putative lipoprotein	Not significant	2.2 ± 1.3		SplI	not defined	Myxococcales
	MXAN0824	-	Alpha/beta hydrolase fold family	Not significant	2.1 ± 1.2		CYT	metabolism	Conserved
	MXAN2338	<i>cobA</i>	uroporphyrin-III C-methyltransferase	Not significant	2.1 ± 1.2		CYT	metabolism	Conserved
	MXAN5806	-	putative glutamate-cysteine ligase	Not significant	2.1 ± 1.1		CYT	metabolism	Conserved
	MXAN6569	-	ferrichrome ABC transporter, ATP-binding protein	Not significant	2.1 ± 1.2		CYT	metabolism	Conserved
	MXAN6903	-	amidinotransferase family protein	Not significant	2.1 ± 1.3		CYT	metabolism	Conserved
	MXAN1781	-	glyoxalase family protein	Not significant	2.0 ± 1.1		CYT	metabolism	Conserved
	MXAN5830	-	hypothetical protein	Not significant	2.0 ± 1.1		CYT	not defined	Myxococcales
	MXAN7022	-	putative multidrug resistance protein NorM	Not significant	2.0 ± 1.1		TMH	drug resistance	Conserved
	MXAN0732	<i>roxA</i>	response regulator	2.7 ± 1.3	Not significant		CYT	signal transduction	Conserved
	MXAN4327	-	Glu/Leu/Phe/Val dehydrogenase family protein	2.7 ± 1.3	Not significant		CYT	metabolism	Conserved
	MXAN0805	-	peptidase, M10A/M12A subfamilies	2.6 ± 1.2	Not significant		SplI	protease/peptidase	Myxococcales
	MXAN1001	-	hypothetical protein	2.5 ± 1.1	Not significant		SplI	not defined	Myxococcales
	MXAN3850	-	putative general stress protein GsiB	2.5 ± 1.0	Not significant		CYT	not defined	Conserved
	MXAN5341	<i>frr</i>	ribosome recycling factor	2.5 ± 1.2	Not significant		CYT	translation	Conserved
	MXAN0873	-	adenylate/guanylate cyclase domain-containing protein	2.4 ± 1.0	Not significant		CYT	signal transduction	Conserved
	MXAN1264	<i>pckG</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase	2.4 ± 1.3	Not significant		CYT	energy production	Conserved
	MXAN1561	-	putative lipoprotein	2.4 ± 1.3	Not significant		CYT	not defined	<i>M. xanthus</i>
	MXAN3436		putative transcriptional regulator	2.4 ± 0.7	Not significant		CYT	transcription	Conserved
	MXAN5406	-	hypothetical protein	2.4 ± 1.2	Not significant		CYT	not defined	Conserved
	MXAN6782	-	selenocysteine-containing	2.4 ± 1.2	Not significant		CYT	not defined	<i>M. xanthus</i>
	MXAN0213		AsnC family transcriptional regulator	2.3 ± 1.3	Not significant		CYT	transcription	Conserved
	MXAN2232	-	pirin family protein	2.3 ± 1.3	Not significant		CYT	transcription	Conserved
	MXAN3191	-	diacylglycerol kinase catalytic subunit	2.3 ± 1.2	Not significant		CYT	metabolism	Myxococcales
	MXAN5340	-	response regulator/GGDEF domain-containing protein	2.3 ± 1.2	Not significant		CYT	signal transduction	Myxococcales
	MXAN5750	<i>carF</i>	carotenoid synthesis regulator CarF	2.3 ± 1.3	Not significant		TMH	secondary metabolism	Conserved
	MXAN6036	<i>sucB</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase, E2 component, dihydrolipoamide succinyltransferase	2.3 ± 1.3	Not significant		CYT	energy production	Conserved
	MXAN0652	-	hypothetical protein	2.2 ± 1.0	Not significant		CYT	not defined	Conserved
	MXAN1071	<i>ssb</i>	single-strand binding protein	2.2 ± 1.2	Not significant		CYT	replication	Conserved

	MXAN2589	-	HesB/YadR/YfhF family protein, Fe-S cluster biogenesis	2.2 ± 1.2		Not significant	CYT	metabolism	Conserved	
	MXAN4159	<i>udk</i>	uridine kinase	2.2 ± 1.2		Not significant	CYT	metabolism	Conserved	
	MXAN4213	<i>ribA</i>	GTP cyclohydrolase II	2.2 ± 1.0		Not significant	CYT	metabolism	Conserved	
	MXAN4769	<i>acpP</i>	acyl carrier protein	2.2 ± 1.2		Not significant	CYT	metabolism	Conserved	
	MXAN6035	<i>sucA</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	2.2 ± 1.2		Not significant	CYT	energy production	Conserved	
	MXAN6079	-	putative molybdopterin oxidoreductase, iron-sulfur binding subunit	2.2 ± 1.2		Not significant	CYT	energy production	Conserved	
	MXAN6082	-	cytochrome c family protein	2.2 ± 1.2		Not significant	SpII	energy production	Conserved	
	MXAN6224	-	Fis family DNA-binding response regulator	2.2 ± 1.1		Not significant	CYT	signal transduction	Conserved	
	MXAN6513	-	NUDIX family hydrolase	2.2 ± 1.2		Not significant	CYT	replication	Conserved	
	MXAN0236	<i>dnaN</i>	DNA polymerase III, beta subunit	2.1 ± 1.1		Not significant	CYT	replication	Conserved	
	MXAN0763	-	response regulator	2.1 ± 1.1		Not significant	CYT	signal transduction	<i>M. xanthus</i>	
	MXAN1982	-	putative lipoprotein	2.1 ± 1.1		Not significant	SpI	not defined	Myxococcales	
	MXAN2024	-	glutaredoxin-like protein	2.1 ± 1.2		Not significant	CYT	defense mechanism	Conserved	
	MXAN2479	<i>rho</i>	transcription termination factor Rho	2.1 ± 1.2		Not significant	CYT	transcription	Conserved	
	MXAN2652	<i>trx</i>	thioredoxin	2.1 ± 1.2		Not significant	Cyt	defense mechanism	Conserved	
	MXAN2729	-	NADH dehydrogenase I, D subunit	2.1 ± 1.2		Not significant	CYT	energy production	Conserved	
	MXAN2960	<i>tatA</i>	twin arginine-targeting protein translocase	2.1 ± 1.2		Not significant	TMH	protein secretion	Conserved	
	MXAN2968	-	RND family efflux transporter MFP subunit	2.1 ± 1.1		Not significant	SpII	drug resistance	Conserved	
	MXAN3387	-	hypothetical protein	2.1 ± 1.1		Not significant	CYT	not defined	Conserved	
	MXAN3764	-	peptidylprolyl cis-trans isomerase, cyclophilin-type	2.1 ± 1.2		Not significant	CYT	protein modification	Conserved	
	MXAN4054	<i>clpX</i>	ATP-dependent protease ATP-binding subunit ClpX	2.1 ± 1.2		Not significant	CYT	protein modification	Myxococcales	
	MXAN5752	-	hypothetical protein	2.1 ± 1.2		Not significant	SpII	not defined	Myxococcales	
	MXAN6190	-	solute/sodium symporter (SSS) family protein	2.1 ± 1.2		Not significant	TMH	metabolism	Conserved	
	MXAN6830	<i>panD</i>	aspartate 1-decarboxylase	2.1 ± 1.3		Not significant	CYT	metabolism	Conserved	
	MXAN0855	-	putative chemotaxis protein MotB	2.0 ± 1.1		Not significant	SpII	outer membran protein	Conserved	
	MXAN2666	<i>pdhA</i>	pyruvate dehydrogenase complex, E1 component	2.0 ± 1.2		Not significant	CYT	energy production	Conserved	
	MXAN3012	<i>hslV</i>	ATP-dependent protease peptidase subunit	2.0 ± 1.1		Not significant	CYT	protein modification	Conserved	
	MXAN5703	-	PspA/IM30 family protein	2.0 ± 1.2		Not significant	CYT	transcription	Conserved	
	MXAN2791	<i>prtB</i>	protease B	Not significant	-1.7 ± 0.0	Not significant	-2.1 ± 0.1	SpII	protease/peptidase	Conserved

	MXAN5786	<i>pilC</i>	type 4 fimbrial assembly protein PilC	Not significant	-1.4 ± 0.0	Not significant	-1.2 ± 0.1	TMH	cell motility	Conserved
	MXAN6694	<i>difC</i>	fibril biogenesis regulator DifC	Not significant	-1.5 ± 0.1	Not significant	-1.1 ± 0.2	CYT	signal transduction	Conserved
	MXAN7415	<i>epsZ</i>	sugar transferase	Not significant	1.8 ± 0.1	Not significant	2.0 ± 0.3	Spl	cell envelope biogenesis	Conserved

^a Expression ratios are calculated as the expression in the $\Delta digR$ or $\Delta sgmT$ mutants over the expression in wild type. A negative expression ratio corresponds to a gene that is more highly expressed in the wild type than in the $\Delta sgmT$ or $\Delta digR$ mutants. A positive expression ratio corresponds to a gene that is more highly expressed in $\Delta digR$ or $\Delta sgmT$ mutants than in wild type. Errors represent the standard deviation. Genes highlighted in red (decreased expression in $\Delta sgmT$ and $\Delta digR$ mutants) and blue (increased expression in $\Delta sgmT$ and $\Delta digR$ mutants) contain a DigR binding site in their promoter region (or if part of a potential operon, in the promoter region of the operon).

^b Identification numbers indicate the 18 genes with decreased and 86 genes with increased expression that are significantly regulated in $\Delta digR$ and $\Delta sgmT$ mutants and were analyzed in Fig.3. According to their identification number genes were plotted in Fig.3B. Genes without ID number are significantly regulated only in $\Delta digR$ or $\Delta sgmT$ mutants.

^c Localization signals are indicated as follows: Spl, signal peptide type I; SplII signal peptide type II; TMH, trans-membrane helix; OM, outer membrane; CYT, no localization signal, i.e. no signal peptide, no twin-arginine signal sequence, no trans-membrane helix and no homology to outer membrane proteins. Localization signals were identified using SignalP3 (Bendtsen *et al.*, 2004) and TMHMM2 (Krogh *et al.*, 2001).

^d Phylogenetic distribution of proteins is as follows: Proteins labelled conserved have orthologs in at least one species outside the Myxococcales; proteins labelled Myxococcales have orthologs in at least two of the four Myxococcales species with completely sequenced genomes (*A. dehalogenans*, *S. aurantiaca*, *S. cellulosum*, and *M. xanthus*); proteins labelled *M. xanthus* have no orthologs outside *M. xanthus*; data from (Huntley *et al.*, 2011)

^e These four genes served as controls in the qRT-PCR analysis.

Anhang 3: Promotoren, die eine ähnliche Regulation von SgmT und DigR aufweisen und eine DigR-Bindestelle enthalten.

SgmT/DigR reguliertes Gen	Im Operon mit ^a	Direkt upstream vom Gen			Direkt upstream vom ersten Gen im Operon		
		-35 ^b	-10 ^b	DigR binding site ^c	-35 ^b	-10 ^b	DigR binding site ^c
Aktiviert von SgmT/DigR							
<i>MXAN0504</i>	-	Ja	Nein	upstream von -35	-	-	-
<i>MXAN1672</i>	-	Nein	Ja	zwischen -35 und -10	-	-	-
<i>MXAN2855</i>	<u>2857-2852</u>	NA	NA	NA	Ja	Nein	upstream von -35 von <i>MXAN2857</i>
<i>MXAN2856</i>	<u>2857-2852</u>	NA	NA	NA	Ja	Nein	upstream von -35 von <i>MXAN2857</i>
<i>MXAN3175</i>	-	Ja	Ja	upstream von -35	-	-	-
<i>MXAN4421</i>	-	Ja	Ja	upstream von -35	-	-	-
<i>MXAN4746</i>	-	Ja	Nein	zwischen -35 und -10	-	-	-
<i>MXAN6106</i>	-	Ja	Nein	1 upstream von -35 1 downstream von -10	-	-	-
Reprimiert von SgmT/DigR							
<i>MXAN1676</i>	-	Ja	Ja	downstream von ATG	-	-	-
<i>MXAN5453</i>	-	Ja	Nein	zwischen -35 und -10	-	-	-
<i>MXAN6254</i>	<u>6254-6255</u>	Ja	Ja	überlappend mit -10	-	-	-
<i>MXAN6255</i>	<u>6254-6255</u>	NA	NA	NA	Ja	Ja	überlappend mit -10 von <i>MXAN6254</i>
<i>MXAN7212</i>	-	Ja	Nein	zwischen -35 und -10	-	-	-
<i>MXAN7351</i>	<u>7353-7350</u>	NA	NA	NA	Ja	Ja	überlappend mit -10 von <i>MXAN7353</i>
<i>MXAN7352</i>	<u>7353-7350</u>	NA	NA	NA	Ja	Ja	überlappend mit -10 von <i>MXAN7353</i>
<i>MXAN7353</i>	<u>7353-7350</u>	Ja	Ja	überlappend mit -10	-	-	-

^a Wenn der Abstand zwischen zwei ORFs, die in gleicher Richtung transkribiert werden, weniger als 100 bp beträgt, wurden diese als Gene des gleichen Operon betrachtet. Das erste Gen im Operon ist unterstrichen.

^b Ja: Drei oder mehr konservierte Nukleotide im Vergleich zu den Promotor-Konsensussequenzen in *E. coli*: -35 TTGACA oder -10 TATAAT; Nein: Weniger als drei konservierte Nukleotide im Vergleich zu den Promotor-Konsensussequenzen in *E. coli*: -35 TTGACA oder -10 TATAAT; NA: Nicht anwendbar

^c Die Region ± 200 bp vom Translationsstart wurde auf DigR-Bindestellen untersucht. Der palindromische Teil der DigR-Bindestelle im *fibA*-Promotor (TAATC-N14-GATTA) diente dabei als Matrize, wobei eine Diskrepanz von vier Nukleotiden toleriert wurde. Alle Promotoren von Genen mit negativer Expression in SA3502 (Δ *sgmT*) und SA1804 (Δ *digR*), sowie alle Promotoren mit einer mindestens 4,0-fach erhöhten Expression in SA1804 (Δ *digR*) wurden auf DigR-Bindestellen untersucht. *MXAN7353* wird positiv exprimiert, mit einem Wert $< 4,0$ in SA1804 (Δ *digR*). *MXAN7353* ist dennoch hier aufgelistet, da es vermutlich ein Operon mit *MXAN7351* und *MXAN7352* bildet.

Anhang 4: Promotorsequenzen mit DigR-Bindestellen.

SgmT/DigR aktivierte Promotoren	Promotor Element ^a				DigR-Bindestelle ^{a, b}
	-35	Spacer	-10	Distanz von -10 zum Translationsstart	
<i>MXAN0504</i>	TTGACA	17	CACCTT	-57	-137- <u>TAAGCACAATC</u> ACGTACGCGTTTC
<i>MXAN1672</i>	TTCCGT	15	TACCGT	-39	-59- <u>TATCGGAACACTT</u> ATTACCGTTTA
<i>MXAN2857</i>	TTGACA	17	TTACCT	-73	-158- <u>AAATCACTCCC</u> ACCGTCCCGCTTG
<i>MXAN3175</i>	TTGAAC	18	TAGTAA	-47	-120- <u>CAATCATCC</u> ATATCCACTGAATTA
<i>MXAN4421</i>	TTGCGC	17	TCCCAT	-44	-166- <u>TCATCTTCGGC</u> CCCTGTCGCTGT
<i>MXAN4746</i>	TTGACG	17	TGACGA	-61	-81- <u>CAATCGTTG</u> AGCCAGTGACGATTC
<i>MXAN6106</i>	TTGAAA	17	TCATCG	-33	-119- <u>TAATCGTAA</u> ATAACCTGAAATCTA -25- <u>TAATCTTCCGCT</u> TAGGAGGATTA
SgmT/DigR reprimierte Promotoren					
<i>MXAN1676</i>	TTCATC	16	CATGAC	-140	+139- <u>GAATCACTCG</u> AAGGCTGGGGCTTC
<i>MXAN5453</i>	TTGTAA	19	TCGTGT	-23	-50- <u>TAATCAACG</u> ACGCTCCTGCTAATC
<i>MXAN6254</i>	TTCACC	17	TCTCAT	-28	-31- <u>TCATCGAAA</u> AGACACATGCGATTG
<i>MXAN7212</i>	TTCAAA	18	TGCGAG	-105	-131- <u>AAATCCCGC</u> CCCCGAGAAGATGC
<i>MXAN7353</i>	TTCGTA	16	CTCAAT	-60	-40- <u>CAATCCCCG</u> TCGCCAGGGAATCC

^a Alle Koordinaten beziehen sich auf den jeweiligen vorgeschlagenen Translationsstart.

^b siehe Fußnote ^c in Anhang 3. Übereinstimmende Nukleotide im Vergleich zur Suchsequenz sind unterstrichen dargestellt.

```

          **                               *                               *
Mx : ~~~~MQIRILVVDDEQDNC DY LKLVLTREGYEVVTTT DPTQTVEILRGSDFHLVILDMMPOMSGTEVLEQIRKYD TDVAVIVATAYPTVDTAVASLKAQ : 96
Mm : ~~~~MQIRILVVDDEQDNC DY LKLVLTREGYEVVTTT DPTQTVEILRGSDFHLVILDMMPOMSGTEVLEQIRKYD TDVAVIVATAYPTVDTAVASLKAQ : 96
Mf : ~~~~MQIRILVVDDEQDNC DY LKLVLTREGYEVVTTT DPTQTVEILRGSDFHLVILDMMPOMSGTEVLEQIRKYD TDVAVIVATAYPTVDTAVASLKAQ : 96
Ms : ~~~~MQIRILVVDDEQDNC DY LKLVLTREGYEVVTTT DPTQTVEILRGSDFHLVILDMMPOMSGTEVLEQIRKYD TDVAVIVATAYPTVDTAVASLKAQ : 96
Cc : ~~~~MQIRILVVDDEQDNC DY LKLVLTREGYEVVTTT DPTQTVDILRGSDFHLVILDMMPOMSGTEVLEQIRKYD TDIAVIVATAYPTVDTAVASLKAQ : 96
Sa : ~~~~MQIRILVVDDEQDNC DY LKLVLTREGYEVVTTT DPTQTVDILRGSDFHLVILDMMPOMSGTEVLEQIRKYD TDIAVIVATAYPTVDTAVASLKAQ : 96
Ho : ~~~~MQQLSILVVD DDKVCEYLQDELSSEGYRVSIVNDPTNALEALRQSEYHVVLDIMMPKLNGLDLEQIRQSDDDIAVILITGYPSLETATSSIEHD : 97
Sc : MAIELPAVRILIVDDDRATCDYMTILLRDGYQVKT LGDPTTVEEEVRTGCGYHLIILDLMMPKLDGIEVLKRIKRVNDIAVVIIFTGFPNLES AVASMLD : 101

```

Empfängerdomäne

```

          *
Mx : ASDYVKKPMEPEQFITAVRNALQKKGLSODPEADLHRAIGRTIRDARKTQBELTLKQLARRTGLSVSLLSQIERAESSASISSLYKIASALQLRMGELFGDT : 197
Mm : ASDYVKKPMEPEQFITAVRNALQKKGLSODPEADLHRAIGRTIRDARKTQBELTLKQLARRTGLSVSLLSQIERAESSASISSLYKIASALQLRMGELFGDT : 197
Mf : ASDYVKKPMEPEQFITAVRNALQKKGLSODPEADLHRAIGRTIRDARKTQBELTLKQLARRTGLSVSLLSQIERAESSASISSLYKIASALQLRMGELFGDT : 197
Ms : ASDYVKKPMEPEQFITAVRNALQKKGLSODPEADLHRAIGRTIRDARKTQBELTLKQLARRTGLSVSLLSQIERAESSASISSLYKIASALQLRMGELFGDT : 197
Cc : ASDYVKKPMEPEQFITAAVRNALQKKGLSODPEADLHRAIGRTIRDARKTQBELTLKQLARRTGLSVSLLSQIERAESSASISSLYKIASALQLRMGELFGDT : 197
Sa : ASDYVKKPMEPEQFITAVRNALQKKGLSODPEADLHRAIGRVIRDARKTQBELTLKQLARRTGLSVSLLSQIERAESSASISSLYKIASALQLRMGELFGDT : 197
Ho : VSAYIRKPEFTIAEFREAIQRIAKKGLILRREDELHASIGRNIRELRKIRGLTLKQLSRRTNLSVLSLLSQIERAESSASVSSLFKVATALDVETITELGSEF : 198
Sc : AVDYIKKPEFNVDEFREVLARVMRKKGLARTPEEQLRHVRIGDTIRNLRKDKDLTLKQMARRTGLSVSLLSQIERAESSASISSLYKIAVALESRIQDLEGHY : 202

```

DNA-Bindedomäne

Anhang 5: Sequenzvergleich von DigR unterschiedlicher Myxococcales-Spezies

Die Kürzel auf der linken Seite stehen für die Organismen: Mx = *M. xanthus*, Mm = *M. macrosporus*, Mf = *M. fulvus*, Ms = *M. stipitatus*, Cc = *C. coralloides*, Ho = *H. ochraceum* und Sc = *S. cellulosum*. Die Koordinaten sind auf der rechten Seite angegeben. Dieser Sequenzvergleich wurde mit „Genedoc“ generiert (Nicholas *et al.*, 1997), die Farbhinterlegung beschreibt die Konservierung (schwarz = 100 %, dunkelgrau ≥ 80 % und hellgrau ≥ 60 %), rot-hinterlegte Aminosäuren in der Empfängerdomäne bilden die vermeintliche Kontaktfläche für die spezifische Interaktion mit der korrespondierenden Kinase (Capra *et al.*, 2010). Funktionelle wichtige Aminosäurereste sind mit „*“ gekennzeichnet.