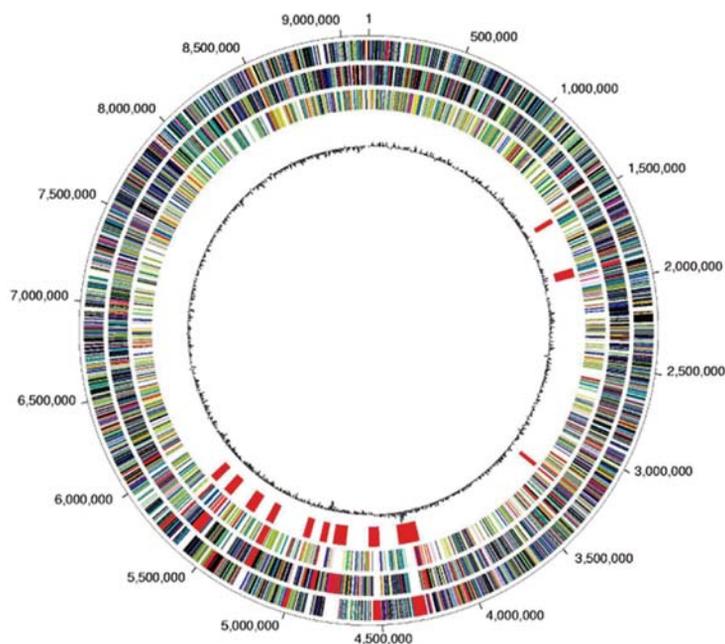


Die Rolle des ungewöhnlichen
response Regulators FrzZ im
Lebenszyklus des Bodenbakteriums
Myxococcus xanthus



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
beim Fachbereich Biologie u. Chemie der
Justus-Liebig-Universität Giessen

Justus-Liebig-Universität Giessen
Institut für Mikro- und Molekularbiologie

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

Die Rolle des ungewöhnlichen *response*
Regulators FrzZ im Lebenszyklus des
Bodenbakteriums
Myxococcus xanthus

vorgelegt von
Dipl. Biologin Carolin Gröger
aus Wetzlar-Dutenhofen

Mai, 2007

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie des Fachbereiches Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. P.R. Schreiner

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Klug
Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. T. Trenczek
Institut für Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht am: 21.05.2007

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2007

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Signaltransduktion: Mechanismen und Systeme	3
2.2	Bakterielle Zwei-Komponenten Systeme (ZKS)	5
2.2.1	Histidinkinasen (HK)	6
2.2.2	<i>response</i> Regulatoren (RR)	7
2.3	Die Myxobakterien und <i>Myxococcus xanthus</i>	9
2.3.1	Fruchtkörperbildung in <i>M. xanthus</i>	11
2.3.2	Motilität in <i>M. xanthus</i>	12
2.3.3	Chemotaxissysteme in <i>M. xanthus</i>	15
2.3.4	Das <i>frz</i> -System und der <i>response</i> Regulator FrzZ	16
2.3.5	Komponenten der Signaltransduktion in <i>M. xanthus</i>	20
2.4	Zielsetzung dieser Arbeit	21
3	MATERIAL	22
3.1	Verwendete Antibiotika	22
3.2	Antikörper	22
3.3	Enzyme	22
3.4	Größenstandards DNA/Proteine	23
3.5	Materialien für die Säulenchromatografie	23
3.6	Molekularbiologische Reagenziensätze	23
3.7	Radioaktiv markierte Nukleotide	23
3.8	Nährmedien und Agarplatten	23
3.8.1	Medien und Agarplatten für <i>E. coli</i>	23
3.8.2	Medien und Agarplatten für <i>M. xanthus</i>	24
3.8.3	Medien und Agarplatten für <i>S. cerevisiae</i>	25
3.9	Bakterienstämme	27
3.9.1	Verwendete <i>E. coli</i> Stämme	27
3.9.2	Verwendeter <i>S. cerevisiae</i> Stamm	27
3.9.3	Verwendete <i>M. xanthus</i> Stämme	28
3.9.4	Konstruierte <i>M. xanthus</i> Stämme	28
3.10	Plasmide	30
3.11	Oligonukleotide	33
3.12	Puffer und Lösungen	35
3.12.1	Puffer und Lösungen für Restriktionsendonukleasen	35
3.12.2	Puffer und Lösungen für DNA modifizierende Enzyme	35

3.13	Chemikalien	35
3.14	Spezielle Artikel und Geräte	36
4	METHODEN	37
4.1	Mikrobiologische Methoden	37
4.1.1	Flüssigkulturen von <i>E. coli</i> , <i>M. xanthus</i> und <i>S. cerevisiae</i>	37
4.1.2	Herstellung von Plattenkulturen	37
4.1.3	Bestimmung der Gesamtzellzahl einer Bakterienkultur	38
4.1.3.1	Bestimmung der optischen Dichte (OD)	38
4.1.3.2	Bestimmung der Gesamtzellzahl mit der Zählkammer	38
4.1.4	Herstellung von Dauerkulturen	38
4.1.5	Erstellen der Wachstumskurve einer Flüssigkultur	39
4.1.6	Bestimmung der Verdopplungszeit t_d einer Bakterienkultur	39
4.1.7	Transformation	39
4.1.7.1	Elektroporation von <i>E. coli</i>	39
4.1.7.2	Elektroporation von <i>M. xanthus</i>	40
4.1.7.3	Lithium Acetat-Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	41
4.1.8	Transduktion von <i>M. xanthus</i>	41
4.1.8.1	Herstellung des Phagenlysats	42
4.1.8.2	Transduktion des Rezipientenstamms	42
4.1.9	Überexpression von Fremdprotein in <i>E. coli</i>	43
4.1.9.1	Überexpression von His ₆ -FrzZ	43
4.1.9.2	Überexpression von His ₆ -Pph1	44
4.1.9.3	Überexpression von <i>Strep</i> -Pph1, <i>Strep</i> -FrzE und <i>Strep</i> -FrzE _{ΔCheY}	44
4.1.10	Phänotypische Charakterisierung von <i>M. xanthus</i>	44
4.1.10.1	Schwärmverhalten (<i>colony expansion assay</i>) (modifiziert nach Shi and Zusman, 1993)	44
4.1.10.2	Morphologische Differenzierung unter Nährstoffmangelbedingungen	45
4.1.10.3	Bestimmung der Sporulationseffizienz	45
4.1.10.4	Typ IV Pili Scherungsassay (<i>pili shear-off assay</i>) (modifiziert nach Wu and Kaiser, 1997)	45
4.2	Isolierung und Aufarbeitung von Nukleinsäuren	46
4.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA (Birnboim and Doly, 1979)	46
4.2.1.1	Plasmid-Minipräparation	46
4.2.1.2	Plasmid-Midipräparation	47
4.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	47
4.2.3	Isolierung von genomischer DNA aus <i>M. xanthus</i>	48
4.2.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>M. xanthus</i> (modifiziert nach Oelmüller et al., 1990)	48
4.2.5	Quantifizierung von Nukleinsäuren	49

4.2.6	Fällung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	50
4.2.6.1	Ethanol-fällung	50
4.2.6.2	Phenol/Chloroform-Präzipitation	50
4.2.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	51
4.2.8	Reinigung von Nukleinsäurefragmenten nach PCR und anderen enzymatischen Modifikationen	51
4.3	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	51
4.3.1	Restriktion von DNA	51
4.3.2	Ligation von DNA	52
4.3.2.1	Ligation von PCR-Fragmenten in den Vektor pCR [®] -Blunt II-TOPO	52
4.3.2.2	Herstellung von <i>blunt-end</i> DNA-Fragmenten	52
4.3.3	Phosphorylierung von DNA	53
4.3.4	Dephosphorylierung von DNA	53
4.4	Molekularbiologische Methoden	53
4.4.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	53
4.4.1.1	PCR-Schnelltest zur Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> Klone	54
4.4.2	<i>real time</i> Reverse Transkriptase-PCR (<i>real time</i> RT-PCR)	55
4.4.2.1	Auswertung der <i>real time</i> RT-PCR nach Pfaffl (2001)	56
4.4.3	<i>Western</i> -Analyse von Proteinen (<i>Western Blot</i>)	57
4.4.3.1	Proteintransfer auf eine PVDF-Membran	58
4.4.3.2	Transfer von <i>Strep-tag</i> Proteinen auf eine PVDF-Membran	58
4.4.3.3	<i>strippen</i> der PVDF-Membran	59
4.4.4	Nachweis radioaktiv markierter Reaktionsprodukte (<i>Phospho Imaging</i>)	60
4.5	Biochemische und physikalische Methoden	60
4.5.1	Gelelektrophorese	60
4.5.1.1	Agarosegele zur DNA-Analyse	60
4.5.1.2	SDS-Polyacrylamidgele zur Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)	61
4.5.1.3	Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	62
4.6	Proteinanalytik	63
4.6.1	Zellaufschlussmethoden	63
4.6.1.1	Zellaufschluss per Ultraschall	63
4.6.1.2	Zellaufschluss im Ribolyser	64
4.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen – der Bradford Assay (Bradford, 1976)	65
4.6.3	Fällungs- und Konzentrierungsmethoden für Proteine	65
4.6.3.1	Ammoniumsulfatfällung	65
4.6.3.2	TCA-Fällung	65
4.6.3.3	Dialyse	65

4.6.3.4	Konzentrierung durch Mikrokonzentratoren	66
4.6.4	Proteinfractionierungsmethode (modifiziert nach Matsuzaki et al., 1996)	66
4.6.5	Chromatografische Proteinaufreinigungsmethoden	67
4.6.5.1	<i>Strep</i> -Tactin Affinitätschromatografie	67
4.6.5.2	Ni ²⁺ -Affinitätschromatografie	68
4.6.5.3	Ausschlusschromatografie (Gelfiltration)	70
4.6.6	Präparation von Einschlusskörperchen (<i>inclusion bodies</i>) (nach McCleary and Zusman, 1990; Acuna et al., 1994)	71
4.6.7	Herstellung von Antikörpern gegen das His ₆ -FrzZ Protein	73
4.6.8	Co-Immunopräzipitation (Co-IP)	73
4.6.8.1	Vorbereitung der Protein-A-Sepharose	73
4.6.8.2	Co-IP mit <i>M. xanthus</i> Zellextrakten	74
4.6.8.3	Immunopräzipitation (IP) mit gereinigtem His ₆ -FrzZ	75
4.6.9	Enzymatische Analytik	75
4.6.9.1	Quantitativer β-Galaktosidase Assay (<i>S. cerevisiae</i>)	75
4.6.9.2	Phosphatase-Aktivitätsmessung – der pNPP-Test	76
4.6.10	<i>In vitro</i> ³² P-Markierung von Proteinen	77
4.6.11	Synthese von Phosphatdonatoren zur artifiziellen Phosphorylierung von His ₆ -FrzZ	78
4.6.11.1	Synthese von Acetyl [³² P]Phosphat nach McCleary and Stock (1994) und artifizielle Phosphorylierung von His ₆ -FrzZ	79
4.6.11.2	Erfassung der radioaktiven Markierung mit Hilfe des Flüssigkeitsszintillationszählers	80
4.6.11.3	Synthese von [³² P]Phosphoramidat nach Buckler and Stock (2000) und artifizielle Phosphorylierung von His ₆ -FrzZ	80
5	ERGEBNISSE	82
5.1	Funktion des FrzZ-Proteins <i>in vivo</i>	82
5.1.1	Komplementationsanalyse in <i>M. xanthus</i>	82
5.1.1.1	Konstruktion des Vektors pSWU30: <i>pro-frzZ</i>	83
5.1.1.2	Konstruktion von pSWU30: <i>pro-frzZ</i> WTneu, E/E, E/N, N/N, N/E, D52N und D220N	84
5.1.2	Komplementation des DZ2Δ <i>frzZ</i> Phänotyps	85
5.1.2.1	Wachstum unter vegetativen Bedingungen	85
5.1.2.2	Akkumulation der FrzZ-Proteine in der DZ2Δ <i>frzZ</i> Mutante	87
5.1.2.3	Schwärmverhalten der DZ2Δ <i>frzZ</i> Mutante unter vegetativen Bedingungen	88
5.1.2.4	Schwärmverhalten der DZ2Δ <i>frzZ</i> Mutante im Vergleich zu den komplementierten Stämmen	89
5.1.2.5	Schwärmverhalten einer <i>frzZ</i> Mutante im Hintergrund der Stämme DK1217 und DK1300	92

5.1.2.6	Morphologische Differenzierung der DZ2Δ <i>frzZ</i> Mutante unter Nährstoffmangelbedingungen	95
5.2	Lokalisierung von FrzZ in der Zelle	96
5.2.1	Zell-Fraktionierungsanalysen	97
5.2.2	Lokalisierung von FrzZ-GFP	99
5.2.2.1	Konstruktion des Vektors pSWU30: <i>pro-frzZ</i> WTneu-GFP	99
5.2.2.2	Akkumulation von FrzZ-GFP	101
5.2.2.3	Betrachtung der Lokalisierung von FrzZ-GFP	103
5.3	Identifikation potenzieller Interaktionspartner von FrzZ	105
5.3.1	Identifikation potenzieller Interaktionspartner durch Co-Immunopräzipitation	105
5.3.1.1	Immunopräzipitation von gereinigtem His ₆ -FrzZ	105
5.3.2	Das Hefe Zwei-Hybrid System – ein theoretischer Überblick	106
5.3.2.1	Untersuchung von FrzZ im Hefe Zwei-Hybrid System	106
5.4	Rolle des TPR-Proteins in <i>M. xanthus</i>	110
5.4.1	Inaktivierung des <i>tpr</i> -Gens (MXAN_1922) in <i>M. xanthus</i>	110
5.4.2	Charakterisierung von TPR <i>in vivo</i>	111
5.4.2.1	Intrazellulärer PilA-Gehalt und PilA-Gehalt der Zelloberfläche der <i>tpr</i> -Insertionsmutanten	112
5.4.2.2	Schwärmverhalten der <i>tpr</i> -Insertionsmutanten unter vegetativen Bedingungen	114
5.5	Analyse der potenziellen Interaktion von FrzZ mit Pph1	116
5.5.1	Akkumulation von FrzZ und Pph1 unter Differenzierungsbedingungen	116
5.5.2	Interaktionsanalyse von FrzZ und Pph1 im Hefe Zwei-Hybrid-System (Gröger, 2002)	118
5.5.3	Komplementation des <i>pph1</i> ⁻ Phänotyps	119
5.5.3.1	Komplementation des Defektes der <i>pph1</i> ⁻ Mutante DZ4314 unter Nährstoffmangelbedingungen	120
5.5.3.2	Komplementation des Defektes der <i>pph1</i> ⁻ Mutante DZ4314 unter vegetativen Bedingungen	123
5.5.3.3	Charakterisierung des Defektes der <i>pph1</i> ⁻ Mutante DZ4314	125
5.5.3.4	<i>fruA</i> -Expression der <i>pph1</i> ⁻ Mutante DZ4314 unter Differenzierungsbedingungen im Vergleich zu den komplementierten Stämmen	127
5.5.3.5	FruA-Akkumulation in der <i>pph1</i> ⁻ Mutante DZ4314 unter Differenzierungsbedingungen im Vergleich zu den komplementierten Stämmen	129
5.5.4	Spezifität der Komplementation des <i>pph1</i> ⁻ Phänotyps	131
5.5.5	Analyse der epistatischen Beziehung von FrzZ und Pph1 – die <i>frzZ pph1</i> ⁻ Doppelmutante	133
5.5.5.1	Wachstum unter vegetativen Bedingungen	134
5.5.5.2	Schwärmverhalten unter vegetativen Bedingungen	135
5.5.5.3	Morphologische Differenzierung unter Nährstoffmangelbedingungen	137

5.5.6	Überexpression und Aufreinigung von FrzZ und Pph1	139
5.5.6.1	Überexpression und Aufreinigung von His ₆ -FrzZ	139
5.5.6.2	Überexpression und Aufreinigung von His ₆ -Pph1	141
5.5.7	<i>In vitro</i> Interaktionsanalysen von His ₆ -FrzZ und His ₆ -Pph1	145
5.5.8	Artifizielle Phosphorylierung von His ₆ -FrzZ	146
5.5.8.1	Artifizielle Phosphorylierung mit Acetyl [³² P]Phosphat	146
5.5.8.2	Artifizielle Phosphorylierung mit [³² P]Phosphoramidat	148
5.5.9	Überexpression und Aufreinigung von <i>Strep</i> -FrzE	151
5.5.9.1	Phosphorylierung von <i>Strep</i> -FrzE und <i>Strep</i> -FrzE _{ΔCheY} mit [³² P]ATP	154
5.5.9.2	Phosphotransfer von <i>Strep</i> -FrzE auf His ₆ -FrzZ	157
5.5.9.3	Phosphotransfer von <i>Strep</i> -FrzE und <i>Strep</i> -FrzE _{ΔCheY} auf His ₆ -FrzZ	158
6	DISKUSSION	161
6.1	Signalverarbeitung durch das <i>frz</i>-System	161
6.1.1	Einfluss der Deletion von <i>frzZ</i> auf die Zellbewegung	162
6.1.2	Komplementationsanalyse des Bewegungsdefektes	164
6.2	Lokalisierung von FrzZ in der Zelle	169
6.3	Identifikation potenzieller FrzZ-Interaktionspartner im Hefe Zwei-Hybrid System	174
6.3.1	Möglichkeit einer Interaktion von FrzZ und TPR	175
6.3.2	Charakterisierung von TPR <i>in vivo</i>	176
6.4	Analyse der potenziellen Interaktion von FrzZ und Pph1	180
6.4.1	Komplementation des <i>pph1</i> ⁻ Phänotyps <i>in vivo</i>	181
6.4.2	Analyse der epistatischen Beziehung von FrzZ und Pph1	185
6.4.3	<i>In vitro</i> Interaktionsanalysen von FrzZ und Pph1	185
6.5	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von FrzZ durch FrzE	187
7	LITERATURVERZEICHNIS	190
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	205
	LEBENS LAUF	208
	DANKSAGUNG	210

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Gleitbewegung, basierend auf den beiden genetisch unterschiedlichen Systemen der A (*adventurous*) und S (*social*) Motilität, ist eine essentielle Grundlage der komplexen Lebensweise des Bodenbakteriums *Myxococcus xanthus*. Das *frz*-Signaltransduktionssystem reguliert die gerichtete Zellbewegung durch die Kontrolle der Umkehrfrequenz beider Motoren unter allen Lebensbedingungen. Die Komponenten dieses Systems weisen Ähnlichkeit zu den Proteinen enterobakterieller Chemotaxissysteme auf, zeigen aber auch einige auffällige Unterschiede. Die vorliegende Arbeit sollte dazu beitragen, verschiedene Aspekte der Signalweitergabe durch das *frz*-System zu klären.

Im Mittelpunkt der durchgeführten Analysen stand der *response* Regulator FrzZ. Dieses Protein vereint zwei der drei CheY-ähnlichen Domänen, die als ausführende Komponenten (*output*) des Systems dienen könnten. Durch die phänotypische Analyse einer *frzZ*-Deletionsmutante, konnte das S-Motilitätssystem als primäres Ziel der Signalweitergabe durch FrzZ identifiziert und damit ein existierendes Modell dieser Vorgänge widerlegt werden. Aus diesen Untersuchungen ging weiterhin hervor, dass FrzZ nicht der alleinige *output* des Systems ist.

Komplementationsanalysen in einem *frzZ*-negativen Hintergrund ermöglichten ein detaillierteres Bild der Funktionsweise des ungewöhnlichen Regulators. Zunächst konnte die Hypothese eines phosphorylierungsabhängigen Aktivierungsmechanismus für FrzZ untermauert werden, da verschiedene Substitutionen der beiden konservierten Aspartatreste (D), korrespondierend zu D54 in CheY aus *Escherichia coli*, inaktive Proteine hervorbrachten. Keines der so generierten Proteine beeinflusste den Phänotyp einer *frzZ*-Deletionsmutante oder komplementierte deren Defekte. Diese Analysen machten weiterhin deutlich, dass die eingesetzte Mutagenese-Strategie, in welcher eine Glutamat-Substitution eine Phosphorylierung simulieren sollte, im Falle des myxobakteriellen *response* Regulators nicht zu einer konstitutiven Aktivierung führte. Im Gegensatz dazu kam es durch die Reintegration von FrzZ-Varianten, die über jeweils eine funktionelle Phosphorylierungsstelle verfügten, zu einer partiellen Komplementation der Defekte einer *frzZ*-Deletion. Eine vollständige Wiederherstellung des Wildtypphänotyps wurde dagegen nur durch die Expression einer Wildtypkopie des *frzZ*-Gens erreicht. Das Vorhandensein einer funktionellen Domäne ist folglich essentiell für die Aktivität des *response* Regulators. Die volle Funktionsfähigkeit wird dagegen nur erreicht, wenn beide Domänen unverändert vorliegen. Durch ähnliche Analysen, die unter Ausschaltung der synergistischen Effekte der beiden Motilitätssysteme unternommen wurde, konnte

weiterhin gezeigt werden, dass die Funktionen, welche die beiden Domänen des *response* Regulators in der Regulation der Zellbewegung einnehmen, sich voneinander unterscheiden.

Eine Beteiligung von FrzZ an der Kontrolle beider Motilitätssysteme wurde durch die Ergebnisse der Studien zur Lokalisierung des Regulators untermauert. Diese zeigten, dass eine Fusion von FrzZ mit dem GFP-Protein (*green fluorescent protein*) in den Zellen an beiden Polen vorhanden ist. Die Analyse fraktionierten Zellextraktes verschiedener *M. xanthus* Stämme implizierte weiterhin die Bildung von Rezeptor-Signal-Komplexen, wie man sie aus chemotaktischen Organismen kennt. Es konnte gezeigt werden, dass eine entsprechende Co-Lokalisierung des Regulators vom Vorhandensein der Kinase FrzE abhängig ist, aber auch durch die Präsenz der Ser/Thr-Phosphatase Pph1 beeinflusst wird. Eine bereits früher vermutete regulatorische Funktion verschiedener *frz*-Komponenten an Genexpressionsvorgängen, konnte durch die Beobachtung bestätigt werden, dass im Hintergrund einer *frzCD*-Mutante, in welcher der Rezeptor des Systems nicht exprimiert wurde, auch kein FrzZ akkumulierte.

Als möglicher Interaktionspartner des *response* Regulators konnte ein Protein (= TPR) identifiziert werden, das sich durch den Besitz von sechs TPR-Motiven (*tetratricopeptide repeats*) auszeichnet. Die Inaktivierung des korrespondierenden Gens führte zu einem charakteristischen Phänotyp, dessen Analyse eine verstärkte Bildung von Typ VI Pili auf den Zelloberflächen bestätigte. Dieser Effekt konnte auch in einer PilC-Punktmutante, nicht aber in einer PilC-Deletionsmutante beobachtet werden, was auf eine Wechselwirkung dieser beiden Proteine, in Form einer Inhibition von PilC durch TPR, hindeutet. PilC ist an der Extrusion der Typ VI Pili, nicht aber an der Synthese der strukturellen Untereinheiten beteiligt. Es wurde ein Modell postuliert, das eine Möglichkeit der Regulation des sozialen Gleitens durch FrzZ vorschlägt, in welchem TPR die Interaktionsbasis einer Wechselwirkung des *response* Regulators mit PilC bietet.

Einen weiteren Punkt der vorliegenden Arbeit stellte die Analyse der möglichen Wechselwirkung von FrzZ mit der Ser/Thr-Phosphatase Pph1 dar. Aufbauend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Diplomarbeit (Gröger, 2002) konnte diese potenzielle Interaktion durch verschiedene *in vivo* und *in vitro* Techniken näher beleuchtet werden. Eine funktionelle Wechselwirkung wurde durch die Komplementation der Defekte *pph1*-defizienter Zellen aufgrund der Integration spezifischer *frzZ*-Formen sowie durch den Phänotyp einer konstruierten Doppelmutante weiter untermauert. In den durchgeführten *in vitro* Interaktionsanalysen konnte eine direkte Wechselwirkung der beiden Proteine allerdings nicht experimentell bestätigt werden.

2 EINLEITUNG

In einer sich ständig verändernden Umwelt ist es für jeden Organismus essentiell, sich diesen Veränderungen anzupassen. Besonders drastisch wirken sich solche Einflüsse auf einzellige Organismen wie Bakterien aus, die mit ihrer gesamten Oberfläche in ständigem Kontakt zu ihrer Umwelt stehen. Die Fähigkeit der Bakterien, auf verschiedenste Umweltfaktoren wie Licht, Temperatur oder die Verfügbarkeit von Sauerstoff und Nährstoffen zu reagieren, hatte man bereits Ende des 19ten Jahrhunderts entdeckt. Es folgte die Identifikation beteiligter Gene und deren Genprodukte (Silverman and Simon, 1977), bis hin zur Aufklärung der atomaren Strukturen, die uns heute zur Verfügung stehen. Die Weiterleitung und Umwandlung eines Umweltreizes in eine zelluläre Antwort bezeichnet man allgemein als Signaltransduktion. Die dadurch hervorgerufene Antwortstrategie kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen und so zu einer Veränderung der Expressionsmuster von Genen (Transkriptionsebene), der Modifikation der Proteinsynthese (Translationsebene) oder der Modulation der Aktivität und Stabilität von Proteinen führen.

2.1 Signaltransduktion: Mechanismen und Systeme

Ein sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten oft beschrittener Weg der Signalübertragung ist die posttranslationale Modifikation von Proteinen durch Phosphorylierung. Dadurch werden verschiedene zelluläre Prozesse, wie beispielsweise die Zelldifferenzierung, Chemo- und Phototaxis, Stoffwechsel oder Infektiosität und Biofilmbildung reguliert (Kennelly and Potts, 1999). Während in Eukaryonten hauptsächlich die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin phosphoryliert werden (O-Phosphorylierung), nutzen Prokaryonten vorwiegend Histidin- und Aspartatreste. In eukaryontischen Proteinen ist eine solche Modifikation aufgrund der Natur der geschaffenen Phosphoesterbindung irreversibel und muss katalytisch durch sogenannte Phosphatasen gelöst werden. Histidinkinasen (HK) dagegen bewirken die Bildung einer Phosphoamidatbindung. Dies ist ein reversibler, aber dennoch gerichteter Prozess, so dass zur Dephosphorylierung auch hier eine Proteinphosphatase benötigt wird.

Das einfachste System der Signaltransduktion kommt ohne Proteinphosphorylierung aus und wird als Ein-Komponenten Regulationssystem (EKS) bezeichnet. Diese Proteine vereinen zwei funktionelle Domänen und können Signale gleichzeitig wahrnehmen und beantworten. EKS sind die in Bakterien am häufigsten vorkommenden Transkriptionsaktivatoren (Ulrich et al., 2005). Das AraC Protein aus *E. coli* beispielsweise

wird durch die Bindung von L-Arabinose aktiviert und bewirkt dann direkt die Transkription von Genen, die zur Verwertung dieses Zuckers benötigt werden (Schleif, 2003). Auch in Archaeen scheinen EKS eine wichtige Rolle in der Genregulation zu spielen (Aravind and Koonin, 1999), während sie in Eukaryonten bisher nicht identifiziert werden konnten (Cashin et al., 2005).

In Zwei-Komponenten Systemen (ZKS) liegen die Domäne zur Signalwahrnehmung und die Effektor-domäne getrennt voneinander auf zwei unterschiedlichen Proteinen vor. Sie stellen die in Bakterien vorherrschende Form der Signaltransduktion dar. ZKS bestehen im einfachsten Fall aus einer Histidinkinase (HK) und einem *response* Regulator (RR). Die Sensorkinase autophosphoryliert auf einen Reiz hin ATP-abhängig an einem Histidinrest und überträgt die Phosphorylgruppe dann auf einen Aspartatrest des *response* Regulators. In komplexeren ZKS können auch mehrere Histidinkinasen einen *response* Regulator oder eine Kinase verschiedene Regulator-Proteine phosphorylieren. ZKS, die mehrere phosphorylierbare Komponenten enthalten, aber einen klassischen Phosphotransfer zwischen Histidin- und Aspartatresten aufweisen, bezeichnet man als Phosphorelais-Systeme (Hoch, 2000). Das am Besten untersuchte System reguliert die Sporulation in *Bacillus subtilis* und besteht aus fünf Komponenten (Perraud et al., 1999; Stephenson and Hoch, 2002). Der Vorteil dieser Organisation besteht darin, dass Phosphorelais-Systeme auf verschiedenen Ebenen reguliert werden können (Bijlsma and Groisman, 2003).

Man findet ZKS in allen drei Domänen des Lebens. Während sie die Signaltransduktion in Bakterien dominieren, sind sie in niederen Eukaryonten und Archaeen eher selten und fehlen in höheren Eukaryonten, wie Tieren oder dem Menschen, vollkommen (Koretke et al., 2000; West and Stock, 2001). Das Bakterium *E. coli* beispielsweise besitzt etwa 30 ZKS (Mizuno, 1997), die mannigfaltige Reaktionen, wie die Regulation des osmotischen Drucks oder die Aufnahme von Nitrat und Phosphat steuern. In Pilzen wie *Neurospora crassa* und *Candida albicans* sind ZKS in die Hyphenbildung und Osmoregulation involviert (Stock et al., 2000), während sie in Pflanzen beispielsweise die Ethylen-gesteuerte Fruchtreifung der Tomate kontrollieren (zur Übersicht Grefen and Harter, 2004; Wilkinson et al., 1995). In diesen Organismen findet man ZKS oft in Netzwerke eingebunden, in denen konventionelle, eukaryontische Proteine wie MAP-Kinasen (MAPK, *mitogen activated protein kinase*) oder Protein-Kinase A dem ZKS nachgeschaltet sind und die zelluläre Antwort bewirken (West and Stock, 2001). Durch die Analyse prokaryontischer Genome wird jedoch zunehmend deutlich, dass es zwischen den Komponenten prokaryontischer und eukaryontischer Signaltransduktion keine eindeutige

Trennung gibt. So konnten bisher in allen untersuchten bakteriellen und archaealen Genomen auch putative Kinasen und Phosphatasen des eukaryontischen Typs identifiziert werden (Kennelly and Potts, 1999; Smith and King, 1995).

2.2 Bakterielle Zwei-Komponenten Systeme (ZKS)

Die Mehrheit bakterieller ZKS ist sehr simpel aufgebaut. Sowohl die Histidinkinase als auch der *response* Regulator sind durch ihre Modulbauweise gekennzeichnet und bestehen in den meisten Fällen aus je zwei Domänen (Abb. 2.1, A.). Durch den Transfer der Phosphorylgruppe von der Sensorkinase auf den cytoplasmatischen *response* Regulator wird dieser aktiviert, das transduzierte Signal meist direkt zu beantworten. Durch zahlreiche Kombinationen der verschiedenen Module entstehen erweiterte und komplexere Netzwerke, die man als Phosphorelais-Kaskaden bezeichnet (Abb. 2.1, B.).

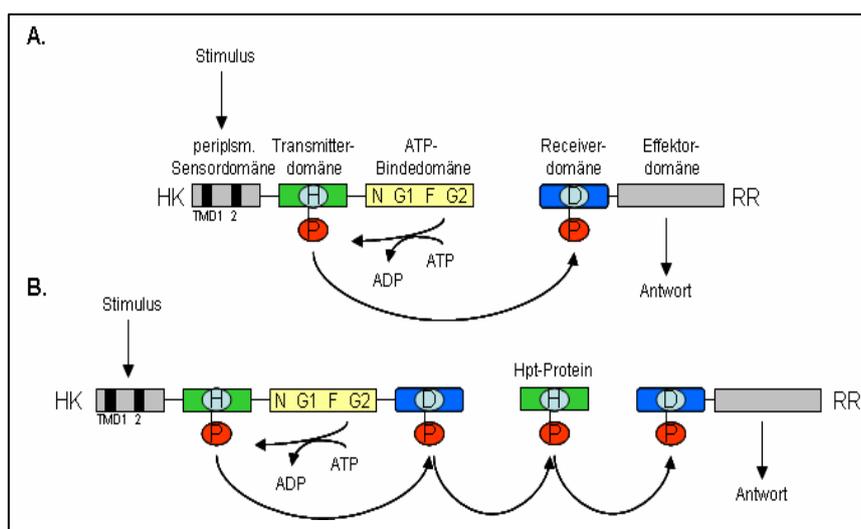


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Signaltransduktion durch Zwei-Komponenten Regulationsysteme (ZKS) (nach West and Stock, 2001). In **A.**: ZKS bestehend aus einer membrangebundenen Histidinkinase (HK) und einem cytoplasmatischen *response* Regulator (RR) mit den charakteristischen Domänen. Ein Stimulus, der an der Sensordomäne der HK eingeht, führt, vermittelt durch die konservierten Aminosäuremotive der N-, G1-, F- und G2-Box der ATP-Bindedomäne, zur Hydrolyse von ATP und zur Phosphorylierung des konservierten Histidinrestes (H) der Transmitterdomäne der HK. Die Phosphorylgruppe wird auf den konservierten Aspartatrest (D) der Receiverdomäne des RR übertragen, wodurch dessen Effektor-domäne eine Konformationsänderung erfährt und aktiviert wird. In **B.**: ein mehrere Komponenten umfassendes Phosphorelais-System. Der Phosphotransfer erfolgt zunächst von der Transmitterdomäne über eine zusätzliche Receiverdomäne der Hybridkinase (D) auf eine separate Hpt-Domäne (H) und dann auf die Receiverdomäne (D) des RR. Der Phosphotransfer von Histidin- zu Aspartatresten bleibt gewahrt.

2.2.1 Histidinkinasen (HK)

Histidinkinasen (HK) sind eine sehr heterogene Familie meist membrangebundener Proteine. Sie bestehen aus einer periplasmatischen Sensor- oder Inputdomäne, die durch mindestens zwei membrandurchspannende Domänen (TMD) von der cytoplasmatischen Kinasedomäne abgetrennt ist (siehe Abb. 2.1). Die Sensordomäne ist wenig konserviert, was die Vielzahl an Reizen widerspiegelt, die durch HK wahrgenommen werden. Cytoplasmatische HK, wie beispielsweise CheA aus dem Chemotaxissystem von *E. coli* (Stock et al., 1988) oder der Stickstoffsensor NtrB (McFarlane and Merrick, 1985), enthalten keine transmembranen Domänen. Wie im Falle des Sauerstoffsensors FixL aus *Sinorhizobium meliloti* gezeigt wurde (Rodgers et al., 1996), nehmen sie eingehende Reize über andere sensorische Komponenten wie PAS-Domänen auf. Diese kontrollieren Veränderungen verschiedener intrazellulärer Faktoren, wie des Lichts oder des Sauerstoffgehalts, wobei die Spezifität für einen bestimmten Reiz durch einen assoziierten Cofaktor der PAS-Domäne bestimmt wird (Taylor and Zhulin, 1999).

Die Kinasedomäne wird weiter unterteilt in zwei Subdomänen, die Transmitterdomäne, in welcher der phosphorylierbare Histidinrest liegt, und die katalytische ATP/ADP- oder Nukleotidbindedomäne (Stock, 1999). Durch die Dimerisierung zweier Kinase-Moleküle bilden die Transmitterdomänen ein Bündel aus vier α -Helices, zu dem jedes Monomer zwei α -Helices und einen phosphorylierbaren Histidinrest beisteuert (Abb. 2.2, A.). Die Phosphorylierung dieser Reste wird durch die hoch konservierte ATP/ADP-Bindedomäne des jeweils anderen Monomers katalysiert. Diese besteht aus ca. 350 Aminosäuren und weist eine α/β -Sandwichstruktur aus fünf antiparallelen β -Faltblättern und vier α -Helices auf (Abb. 2.2, B.) (Tanaka et al., 1998). Die Motive der N-, G1-, F- und G2-Box, die nach den jeweiligen, besonders gut konservierten Aminosäureresten benannt sind, bilden die ATP/ADP-Bindestelle. Diese flexible Region des Proteins ähnelt strukturell den ATPase-Domänen verschiedener Enzyme, wie beispielsweise der Topoisomerase DNA-Gyrase B oder des Reparaturproteins MutL (Bilwes et al., 1999; Tanaka et al., 1998). Das impliziert für die HK einen ähnlichen Aktivierungsmechanismus in Form einer intramolekularen Umordnung, aktiviert durch Nukleotidbindung und -hydrolyse (Stock, 1999).

Sogenannte unorthodoxe oder Hybridkinasen weisen mehr als eine Phosphodonor- und Phosphoakzeptorstelle auf. Sie erlauben dadurch die Integration mehrerer Signale in einen Transduktionsweg und bieten gleichzeitig an mehreren Stellen Raum für eine Regulation der Signalweitergabe (siehe auch Abb. 2.1, B.).

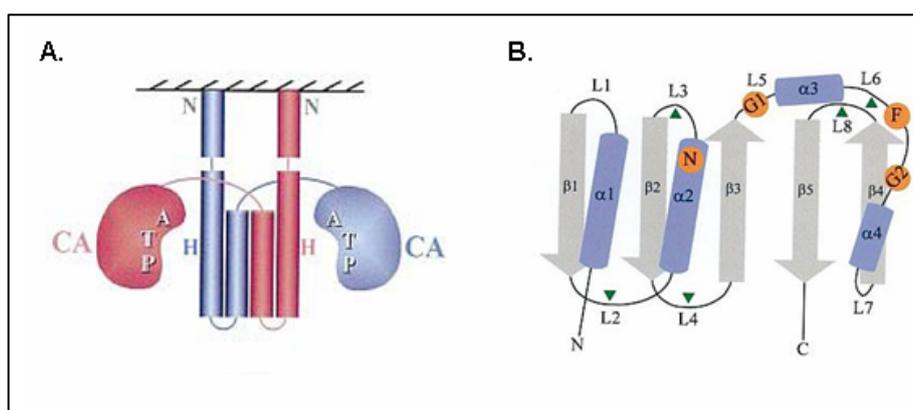


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Domänenorganisation von Histidinkinasen (nach Dutta et al., 1999). In **A.**: Modell der cytoplasmatischen Kinasedomänen eines Kinase-Homodimers. Die Transmitterdomänen beider Monomere bilden zentral ein Bündel aus vier α -Helices. Links und rechts davon liegen die jeweiligen ATP/ADP-Bindedomänen. Die beiden Monomere sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. In **B.**: α/β -Sandwich Modell der katalytischen ATP/ADP-Bindedomäne eines Kinase-Monomers bestehend aus fünf antiparallelen β -Strängen ($\beta 1-5$, grau) und vier α -Helices ($\alpha 1-4$, lila). Die orange unterlegten N-, G1-, F- und G2-Boxen repräsentieren konservierte Regionen, die für die ATP-Bindung wichtig sind. Die mit grünen Dreiecken markierten Bereiche der Aminosäuresequenz können strukturell variieren.

2.2.2 *response* Regulatoren (RR)

Am Ende der Signalweiterleitung stehen *response* Regulatoren (RR), die durch Phosphorylierung aktiviert werden und eine adaptive Antwort auslösen. Diese Proteine setzen sich aus einer ca. 120 Aminosäurereste umfassenden, konservierten Receiverdomäne (N-terminal) und einer variablen, C-terminalen Effektor-domäne zusammen.

Die Mehrheit der *response* Regulatoren sind Transkriptionsfaktoren mit DNA-Bindeaktivität, welche die Transkription verschiedener Zielgene aktivieren oder reprimieren. Aufgrund der strukturellen Homologie ihrer C-terminalen Effektor-domänen werden RR in die OmpR-, FixJ- und NtrC-Familien unterteilt, die nach dem jeweils prominentesten Vertreter benannt sind (Robinson et al., 2000; Stock et al., 2000). Andere Regulator-Proteine besitzen C-terminale Domänen mit einer enzymatischen Aktivität. So bewirkt beispielsweise die Methyltransferase CheB aus *E. coli* im aktivierten Zustand die Demethylierung von Chemorezeptoren (Simms et al., 1985). Das enterobakterielle CheY-Protein kommt dagegen ohne eine Effektor-domäne aus. Dieser *response* Regulator empfängt innerhalb des Chemotaxissystems Phosphorylgruppen von der Sensorkinase CheA und kann so mit dem FliM-Protein des Flagellenmotors assoziieren (Welch et al., 1993).

Der Phosphotransfer von der korrespondierenden Histidinkinase auf den konservierten Aspartatrest wird durch die Receiverdomäne des *response* Regulators katalysiert (Lukat et al., 1992; McCleary and Stock, 1994). Strukturell ist die Receiverdomäne des RR ein

doppelt gewundenes α/β -Protein, das aus einem fünfsträngigen, parallelen β -Faltblatt besteht, welches von fünf α -Helices umgeben ist (Djordjevic et al., 1998; Madhusudan, et al., 1996; Solà et al., 1999; Stock et al., 1989; Volz and Matsamura, 1991). Der phosphorylierbare Aspartatrest im aktiven Zentrum des Proteins (*active-site*) befindet sich an einer Seite des β -Faltblatts, die dem Lösungsmittel zugewandt und von vier konservierten Aminosäureresten, zwei Aspartat-, einem Threonin- und einem Lysinrest, umgeben ist (Abb. 2.3). Die sauren Reste bilden die sogenannte *acid-pocket* und sind an der Koordination eines zweiwertigen Kations beteiligt, welches sowohl für den Phosphotransfer als auch für die Dephosphorylierung des *response* Regulators benötigt wird (Lukat et al., 1990; Lukat et al., 1991; Needham et al., 1993).

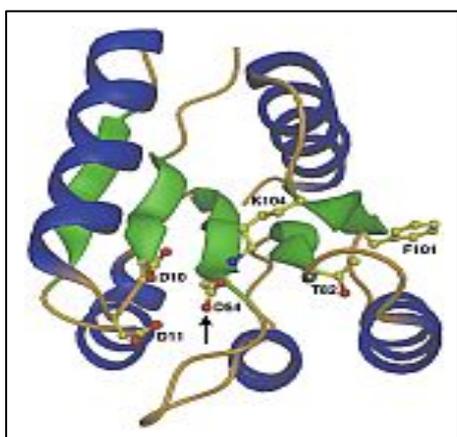


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Aufbaus der Receiverdomäne eines *response* Regulators (nach Foussard et al., 2001). Gezeigt ist das zentrale, fünfsträngige β -Faltblatt (gün), das von fünf α -Helices (blau) umgeben ist sowie das aktive Zentrum. Die Seitenketten der konservierten Aminosäurereste (D10, D11, D54, T82 und K104) sind dargestellt. Der Pfeil kennzeichnet den phosphorylierbaren Aspartatrest (D54). Das Aminosäurerückgrat, das die gezeigten Motive verbindet, ist gelb dargestellt. D: Aspartat, T: Threonin, K: Lysin, F: Phenylalanin.

Es stellt sich die Frage, wie die konservierte Receiverdomäne eine solche Vielzahl unterschiedlicher Effektor-domänen regulieren kann. Die Strukturanalyse phosphorylierter *response* Regulatoren, wie Spo0A, FixJ und CheY, und der Vergleich zu den unmodifizierten Proteinen haben gezeigt, dass die Phosphorylierung eine strukturelle Umgestaltung der Proteine verursacht: die molekulare Oberfläche verändert sich hinsichtlich ihrer Topologie und ihrer elektrostatischen Eigenschaften, wohingegen die Raumstruktur gleich bleibt (Birck et al., 1999; Cho et al., 2000; Gouet et al., 1999; Halkides et al., 2000; Lewis et al., 1999; Lewis et al., 2000). Auf diese Weise werden Protein-Protein- oder Protein-DNA-Interaktionen ermöglicht, die letztendlich zur Beantwortung des weitergeleiteten Stimulus führen. Abhängig von der Art dieser Antwort beträgt die Lebensdauer eines phosphorylierten *response* Regulators wenige Sekunden (z.B. CheY; Hess et al., 1988) bis zu mehreren Stunden (z.B. VanR; Wright et al., 1993). Wird die Dephosphorylierung des Regulators nicht durch diesen selbst katalysiert, so wird

sie durch die Phosphataseaktivität der Sensorkinase oder durch ein separates Enzym mit Phosphataseaktivität, wie z.B. CheZ, erreicht (SilverSmith et al., 2003). Eine zusätzliche Regulation ist in solchen Systemen gegeben, in denen die Histidinkinase mehrere *response* Regulatoren phosphorylieren kann. Im Chemotaxissystem des Bakteriums *E. coli* beispielsweise kommt es zu einer Konkurrenz der *response* Regulatoren CheY und CheB um eine Phosphorylierung durch die Kinase CheA (Li et al., 1995).

2.3 Die Myxobakterien und *Myxococcus xanthus*

Die Myxobakterien bilden eine monophyletische Gruppe Gram-negativer Vertreter, deren vegetative Zellen die Form unbegeißelter Stäbchen haben. Die strikt aeroben Bakterien sind weltweit verbreitet und leben in großer Zahl in der Erde, auf verrottendem Pflanzenmaterial, im Kot von Pflanzenfressern und auf Baumrinden. Dort ernähren sie sich durch die Sekretion hydrolytischer Enzyme und antimikrobieller Agenzien von organischem Material und anderen Mikroorganismen (Reichenbach, 1999). Nur die Vertreter der Unterordnung Sorangineaea (siehe Abb. 2.4) sind in der Lage, durch die Sekretion cellulolytischer Enzyme, Cellulose zu degradieren.

Myxobakterien wurden erstmals 1892 von Roland Thaxter als Bakterien charakterisiert (Thaxter, 1892) und in die δ -Untergruppe der Proteobakterien eingeordnet (Ludwig et al, 1983). Zum heutigen Zeitpunkt kennt man 3 Familien mit 17 Gattungen (Abb. 2.4), von denen der Vertreter *Myxococcus xanthus* der am Besten charakterisierte ist.

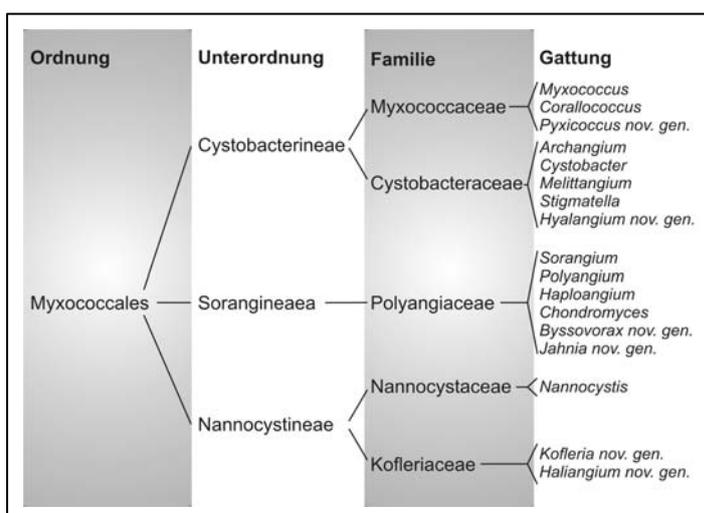


Abbildung 2.4: Taxonomische Unterteilung der Myxobakterien (nach Shimkets et al., 2006).

Die DNA von Myxobakterien hat einen charakteristisch hohen GC-Gehalt von 67% bis 70% (Reichenbach and Dworkin, 1992) und im Vergleich zu anderen Prokaryonten besitzen sie eine beträchtliche Genomgröße, die beispielsweise 9,14 Mbp für *M. xanthus*, 13,03 Mbp für *Sorangium cellulosum* und 9,35 Mbp für *Stigmatella aurantiaca* beträgt (GenDB, Universität Bielefeld, 2007; Neumann et al., 1992). Die Differenz von 4 bis 5 Mbp, verglichen mit allen anderen bisher sequenzierten δ -Proteobakterien, ist größtenteils auf die evolutionäre Duplikation von Genen und auf horizontalen Gentransfer zurückzuführen (Goldman et al., 2006).

Myxobakterien werden aufgrund ihrer Lebensweise als „sozial“ bezeichnet. So wachsen und teilen sie sich als einzelne Zellen, ernähren sich jedoch in Schwärmen. Dies ist einerseits eine Strategie zur Optimierung des Nährstoffangebots, da durch eine hohe Zelldichte die lokale Konzentration lytischer Enzyme gesteigert und der Diffusionsverlust minimiert werden kann. Andererseits wird so das Fortbestehen des Schwarms gesichert. Unter Nährstoffmangel strömen ca. 100.000 Organismen geordnet zusammen und lagern sich übereinander, bis schließlich ein dreidimensionaler Fruchtkörper entstanden ist. In dessen Innerem differenziert sich ein Teil der Zellen zu resistenten Dauerformen (Myxosporen), die auskeimen, wenn die Lebensbedingungen sich wieder verbessert haben (zum Lebenszyklus siehe Abb. 2.5).

Außer der Fähigkeit zur morphologischen Differenzierung ist für die Familie der Myxobakterien auch die Synthese biologisch wirksamer Sekundärmetabolite (Antibiotika) charakteristisch. Unter den Bakterien sind die Myxobakterien mit 5% der Produktion aller Sekundärmetabolite hinter den Actinomyceten (70%) und den Bacillen (6,5%) einzuordnen. Innerhalb der Gruppe steht die Gattung *Sorangium* als Naturstoffproduzent an erster Stelle, gefolgt von *Myxococcus* und *Chondromyces*. Die meisten der gebildeten Substanzen richten sich gegen Pilze, wie z.B. Epothilon oder Soraphen (Gerth et al., 1994; 1996).

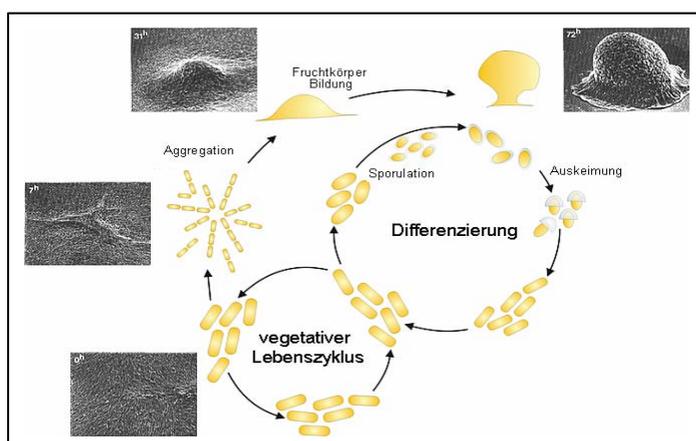


Abbildung 2.5: Lebenszyklus des Myxobakteriums *M. xanthus*. Die schematische Zeichnung ist nicht maßstabsgetreu (modifiziert von Sabrina Doss; nach Dworkin, 1996). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind entnommen aus Kuner and Kaiser, 1982.

2.3.1 Fruchtkörperbildung in *M. xanthus*

Die Entwicklung myxobakterieller Fruchtkörper erfordert einen direkten Zell-Zell-Kontakt und wird durch den Austausch interzellulärer Signale erreicht. Durch die Entdeckung von fünf Komplementationsgruppen unter differenzierungsdefekten Mutanten wurde der Austausch von fünf Signalen (A, B, C, D und E-Signal) postuliert (Downard et al., 1993; LaRossa et al., 1983). Davon werden das A- und das B-Signal während der frühen Entwicklungsphase benötigt, wohingegen das D- und das E-Signal ca. 3 bis 5 Stunden nach Einsetzen des Nährstoffmangels notwendig sind. Die Signalwirkung des C-Signals setzt nach ca. 6 Stunden ein und ist somit das letzte Signal, welches für die Differenzierung von *M. xanthus* benötigt wird (zur Übersicht Kaiser, 2004). Als intrazelluläres Initiationssignal der Differenzierung konnte dagegen das Alarmon (p)ppGpp ermittelt werden (Harris et al., 1998). Von allen extrazellulären Signalen sind bisher nur das A- und das C-Signal biochemisch charakterisiert (Shimkets, 1999).

Das A-Signal sorgt dafür, dass die Fruchtkörperbildung erst eingeleitet wird, wenn eine genügend hohe Zelldichte erreicht ist (*quorum sensing*). Durch die Inaktivierung eines der fünf *asg*-Gene (*asgA – E*), von denen keines das A-Signal selbst kodiert, verlieren *M. xanthus* Zellen die Fähigkeit, dieses Signal zu bilden. Der sogenannte A-Faktor besteht aus einer Mischung von Aminosäuren und Peptiden und wird durch die Aktivität spezifischer Proteasen gebildet, deren Substrat bis heute unbekannt ist (Plamann et al., 1992). Man vermutet für A-Signal-Mutanten einen generellen Defekt des Exports von Proteinen, da Mutanten, die aufgrund eines Sekretionsdefektes isoliert wurden, einen ähnlichen Phänotyp zeigten (Plamann et al., 1994).

Das C-Signal wird durch ein einziges Gen, das *csgA*-Gen, kodiert (Shimkets and Asher, 1988). Das CsgA-Protein weist eine Homologie zu NAD(P)-abhängigen Klasse-II-Alkoholdehydrogenasen (SCAD) auf und besitzt deren konservierte NADP⁺-Bindestelle. Alle Enzyme dieser Familie sind intrazelluläre Proteine, die Reduktions- und Oxidationsreaktionen in Anwesenheit von NAD⁺ oder NADP⁺ katalysieren (Lee et al. 1995). Das C-Signal entsteht durch eine proteolytische Verkürzung des CsgA-Proteins und wird durch End-End-Kontakte von einer Zelle auf eine andere übertragen (Lobedanz and Søgaard-Andersen, 2003). Die Weitergabe des C-Signals (*C-signaling*) ändert die Bewegung des Schwarms, so dass die Zellumkehrfrequenz sinkt und die Zellen schneller gleiten (Jelsbak and Søgaard-Andersen, 2002). Dadurch wird zunächst die Aggregation ermöglicht und die Zellen strömen zusammen. Mit höherer Zelldichte nimmt auch der Level an *C-signaling* zu, da die Zellen sich in einem permanenten End-End-Kontakt zueinander befinden. Überschreitet die Konzentration an C-Signal einen bestimmten

Schwellenwert, wird die Sporulation eingeleitet. C-Signal-Mutanten sind folglich nicht in der Lage zu aggregieren, Fruchtkörper zu bilden und zu sporulieren.

2.3.2 Motilität in *M. xanthus*

Die Grundlage allen sozialen Verhaltens bildet die Motilität des Schwarms. Myxobakterien bewegen sich gleitend fort, gesteuert von zwei unterschiedlichen Bewegungssystemen, dem A (*adventurous*) und dem S (*social*) Motilitätssystem. Ersteres erlaubt die individuelle Fortbewegung einzelner Zellen oder kleiner Gruppen, während das soziale Gleiten Zell-Zell-Kontakte erfordert und nur in großen Gruppen und Schwärmen funktioniert (Kaiser, 1979). Die Fortbewegung ist durch den Einsatz beider Systeme am effizientesten, wobei deren Anteil an der Gesamtbewegung in Abhängigkeit von der Beschaffenheit des jeweiligen Untergrundes variiert (Shi and Zusman 1993). An der Ausführung beider Bewegungen sind Dutzende verschiedener Gene beteiligt. So basiert das S-Motilitätssystem auf dem Vorhandensein extrazellulärer Strukturen, wie der Typ IV Pili (Kaiser, 1979), einer Lipopolysaccharidschicht (LPS) (Bowden and Kaplan, 1989) und einer Matrix aus Polysacchariden und Proteinen, die man als Fibrillen bezeichnet (Arnold and Shimkets, 1988).

Typ IV Pili (TFP) sind flexible Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 6 nm und einer Länge von 4 bis 10 μm (siehe Abb. 2.6, linkes Bild). Pili sind unipolare Organellen und werden nur am jeweiligen Vorderende einer Zelle ausgebildet (Kaiser, 1979). In *M. xanthus* wurden 17 Gene entdeckt, die meist ausgeprägte Homologie zu den Genen aufweisen, deren Produkte auch in *Neisseria gonorrhoeae* und *Pseudomonas aeruginosa* an der Synthese, der Prozessierung, dem Zusammenbau und der Funktion von Typ IV Pili beteiligt sind (zur Übersicht Nudleman and Kaiser, 2004; Wall and Kaiser, 1999). Mutationen in fast allen *pil*-Genen bewirken, dass die Zellen keine Pili ausbilden können und keine S-Motilität zeigen (Phänotyp: Pili⁻/S⁻). Solche Stämme sind nicht in der Lage zu aggregieren und Fruchtkörper zu bilden. Eine Mutation des *pilT*-Gens ruft dagegen einen Pili⁺/S⁻ Phänotyp hervor. Entsprechende Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche mehr Typ IV Pili als Wildtypzellen (Wu et al., 1997) und zeigen eine zeitlich verzögerte Differenzierung.

Die Lipopolysaccharidschicht (LPS) der äußeren Membran von *M. xanthus* entspricht in ihrem Aufbau dem LPS Gram-negativer Bakterien im Allgemeinen und besteht aus Lipid A, dem Kernpolysaccharid und dem O-Polysaccharid oder O-Antigen (Fink and Zissler, 1989). Ungewöhnlich ist die Modifikation des O-Antigens während der Differenzierung durch die Methylierung eines Aminozuckers (Panassenko et al., 1989). Alle LPS Mutanten, die bisher untersucht wurden, zeigen Aggregations- sowie

Sporulationsdefekte. Obwohl ihre Zelloberflächen mehr Typ IV Pili aufweisen als die von Wildtypzellen, ist das S-Bewegungssystem nicht funktionell (Bowden and Kaplan, 1998).

Weitere Oberflächenbestandteile der *M. xanthus* Zelle, die wichtig für die S-Motilität sind, sind die Fibrillen. Diese filamentösen Strukturen bedecken die ganze Zelloberfläche und schließen benachbarte Zellen in eine extrazelluläre Matrix (ECM) ein (siehe Abb. 2.6, rechtes Bild). Fibrillen bestehen aus gleichen Mengen an Proteinen und Polysacchariden und werden nur bei hoher Zelldichte und unter Nährstoffmangel gebildet (Behmlander and Dworkin, 1991; 1994). *M. xanthus* Stämme ohne Fibrillen zeichnen sich durch ein homogenes Wachstum in Flüssigkultur aus (*dsp*-Mutanten; *dispersed growth*). Die Zellen agglutinieren nicht und zeigen keine S-Motilität, woraus eine defekte Aggregation und Sporulation resultieren. Ähnlich wie LPS-defekte Stämme, weisen auch Fibrillen-Mutanten mehr Typ IV Pili auf ihrer Oberfläche auf als Wildtypzellen. Es konnte gezeigt werden, dass der S-Bewegungsdefekt in beiden Fällen durch das Fehlen des Polysaccharidanteils der ECM und speziell durch die Abwesenheit von Aminozuckern verursacht wird. Die Zellen bilden Typ IV Pili aus, können diese aber nicht zurückziehen (Li et al., 2003).

Die Abhängigkeit TFP-vermittelter zellulärer Prozesse von einer polysaccharidhaltigen ECM ist nicht nur auf *M. xanthus* begrenzt. So ist zum Beispiel auch für das Bakterium *P. aeruginosa* das Vorhandensein beider Komponenten wichtig für die Bildung von Biofilmen oder zur Adhärenz an eukaryotische Zelloberflächen (Chiang and Burrows, 2003; Klausen et al., 2003).

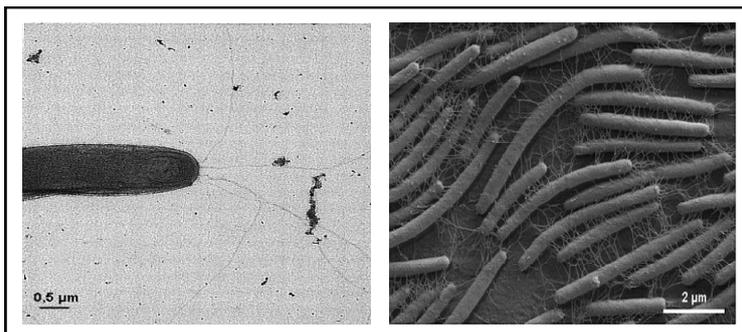


Abbildung 2.6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *M. xanthus* Wildtypzellen. Das linke Bild zeigt die polaren Typ IV Pili einer negativ gefärbten Zelle (aus Kaiser, 1979). Das rechte Bild zeigt die Fibrillen mehrerer Zellen, die eine extrazelluläre Matrix (ECM) bilden (aus Kearns and Shimkets, 2001).

Der Mechanismus, der das A-System antreibt, ist weniger gut untersucht. Ultrastrukturanalysen zeigen das Vorhandensein drüsenartiger Komplexe an den Polen von *M. xanthus* Zellen (Abb. 2.7). Ähnliche Strukturen sind bereits aus Cyanobakterien bekannt (Wolgemuth et al., 2002). Dort durchspannen die sogenannten JPCs (*junctional*

pore complexes) die Gram-negative Zellwand beweglicher Vertreter, wie *Phormidium uncinatum* oder *Anabaena variabilis* und sondern einen Polyelektrolytschleim in einer Frequenz ab, die der Fortbewegung der Zellen pro Zeiteinheit entspricht (Hoiczky and Baumeister, 1998). Obwohl die Strukturen der Myxobakterien an beiden Zellpolen zu finden sind, wird nur am jeweiligen Hinterende aktiv Schleim sekretiert (Wolgemuth et al., 2002). Dieser Schleim gelangt nach einem Modell in dehydrierter Form in die A-Motilitätsdrüsen, wo er hydriert wird und an Volumen zunimmt. Dies bewirkt das Ausstoßen des Schleims und generiert eine Antriebskraft, welche die Zelle voranschleibt.

Ein alternatives Modell schlägt zusätzlich das Vorhandensein von Proteinkomplexen vor, die sich in der Zelle entlang eines helikalen Filaments zum Hinterende bewegen. Durch die gleichzeitige Adhärenz dieser Motorkomplexe an das Substrat wird die Zelle durch die Bewegung der Proteine vorangeschoben und dreht sich dabei um ihre Längsachse (Mignon et al., 2007). Damit würde die Gleitbewegung von *M. xanthus* Zellen der von Vertretern der parasitären Apikomplexa ähneln (Baum et al., 2006).

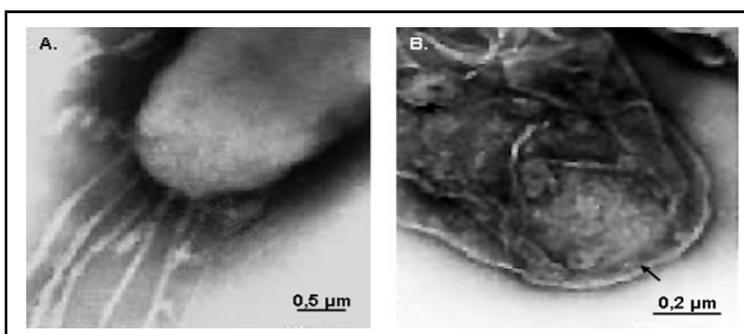


Abbildung 2.7: Elektronenmikroskopische Aufnahme gleitender *M. xanthus* Wildtypzellen. In **A.**: Aufnahme von Schleimbändern, die vom hinteren Zellpol ausströmen. In **B.**: Aufnahme des Pols einer isolierten Zelle. Der Pfeil zeigt eine der ringförmigen Strukturen an, von denen mehrere am Zellpol vorhanden sind (aus Wolgemuth and Oster, 2004).

Das Gleiten der Myxobakterien ähnelt der Fortbewegungsweise vieler Gram-negativer Bakterien, von denen am Besten die *twitching* Motilität in *N. gonorrhoeae* und *P. aeruginosa* untersucht ist (zur Übersicht Mattick 2002). Auch in diesen Systemen wird eine Fortbewegung durch die Retraktion adhärenter Typ IV Pili erreicht (Merz et al., 2000; Skerker and Berg, 2001). Für *M. xanthus* Zellen ist das Substrat, an das sich die ausgebildeten Pili anheften, die Polysaccharidmatrix benachbarter Zellen, die sich nicht mehr als eine Zelllänge entfernt befinden (Li et al., 2003). Die Retraktion der Pili zieht die Zelle voran, während am hinteren Ende aktiv Elektrolytschleim ausgestoßen wird, der das Bakterium gleichzeitig anschiebt. Das Umkehren der Bewegungsrichtung muss durch die gleichzeitige Verlagerung der Aktivität beider Motilitätssysteme an den jeweils

entgegengesetzten Zellpol erreicht werden. Dabei kann sowohl ein Anhalten als auch ein Revertieren die Richtung der Zellbewegung ändern.

2.3.3 Chemotaxissysteme in *M. xanthus*

Chemotaxissysteme sind weiterentwickelte Zwei-Komponenten Systeme (ZKS), welche die gerichtete Bewegung einzelner Zellen in Reaktion auf Stoffkonzentrationsgradienten steuern. So ist es den Zellen möglich, sich auf potenzielle Futterquellen zuzubewegen, während vermeintlich schädliche Bereiche der Umgebung gemieden werden. Das am Besten untersuchte System ist das des Enterobakteriums *E. coli*, welches zeitliche Veränderungen in der Konzentration von Lock- oder Schreckstoffen wahrnimmt. Dies erfolgt über membrangebundene Rezeptoren (MCPs, *methyl-accepting chemotaxis proteins*), an welche die cytoplasmatische Histidinkinase CheA, vermittelt durch das Protein CheW, zu sogenannten Rezeptor-Signal-Komplexen (RSKs) assoziiert vorliegt (Maddock and Shapiro, 1993). Durch die Bindung von Liganden an die MCPs wird der Fluss von Phosphorylgruppen von der Kinase auf den *response* Regulator CheY verändert, der in seinem aktivierten Zustand direkt mit Komponenten des Flagellenmotors der Zelle interagiert und dessen Schlagrichtung beeinflusst (Alon et al., 1998; Scharf et al., 1998). Der Stimulation folgt ein Adaptionseignis, indem die Rezeptoren des Systems durch die Methyltransferase CheR modifiziert werden. Diese Methylierung ist ein reversibler Prozess und durch die enzymatische Aktivität der Methylesterase CheB umkehrbar, wurde das Protein zuvor durch einen Phosphotransfer von der Kinase CheA aktiviert (Levit and Stock, 2002). Außer durch die Konkurrenz mit der Methylesterase wird die Konzentration an Phospho-CheY in diesem System weiterhin durch das Protein CheZ beeinflusst. Die Phosphatase liegt assoziiert mit den RSKs vor und dephosphoryliert CheY (Zhao et al., 2002).

Zahlreiche bakterielle und archaeale Spezies zeigen vielfältige Modifikationen, die Natur der Komponenten eines Chemotaxissystems und die Anzahl der kodierten Systeme betreffend (zur Übersicht Szurmant and Ordal, 2004). In Organismen, die über mehrere *che*-Operons verfügen, ist häufig nur ein Teil dieser Systeme tatsächlich an der Regulation der Zellbewegung beteiligt. So bewirkte beispielsweise in *Rhodobacter sphaeroides* die Deletion des ersten Chemotaxis-Operons (*che Op₁*) nur eine minimale Beeinträchtigung der Chemotaxis, während eine Inaktivierung des zweiten oder dritten Genclusters (*che Op₂*, *che Op₃*) diese vollständig inhibierte (Porter et al., 2006).

M. xanthus verfügt über neun Chemotaxis-Gencluster (Armitage et al., 2003), von denen bisher vier charakterisiert werden konnten (siehe Abb. 2.8). Nur für das *frz*-System konnte eine direkte Regulation von Motilität gezeigt werden (Sun et al., 2000; Ward and Zusman, 1999). Im Gegensatz dazu ist der *dif*-Lokus an der Regulation der Biosynthese der extrazellulären Fibrillen beteiligt, welche essentiell für die S-Motilität sind. Da in erster Linie die Expression der entsprechenden Gene reguliert wird, sind auftretende Bewegungsdefekte in *dif*-Mutanten sekundärer Natur (Yang et al., 1998; Bellenger et al., 2002). Das *che3*-System steuert, ebenfalls durch Genregulation, den Übergang vom vegetativen Lebenszyklus in die Differenzierung (Kirby and Zusman, 2003), während der *che4*-Lokus die Zellbewegung durch das S-Motilitätssystem unter bestimmten Bedingungen zu modulieren scheint (Vlamakis et al., 2004).

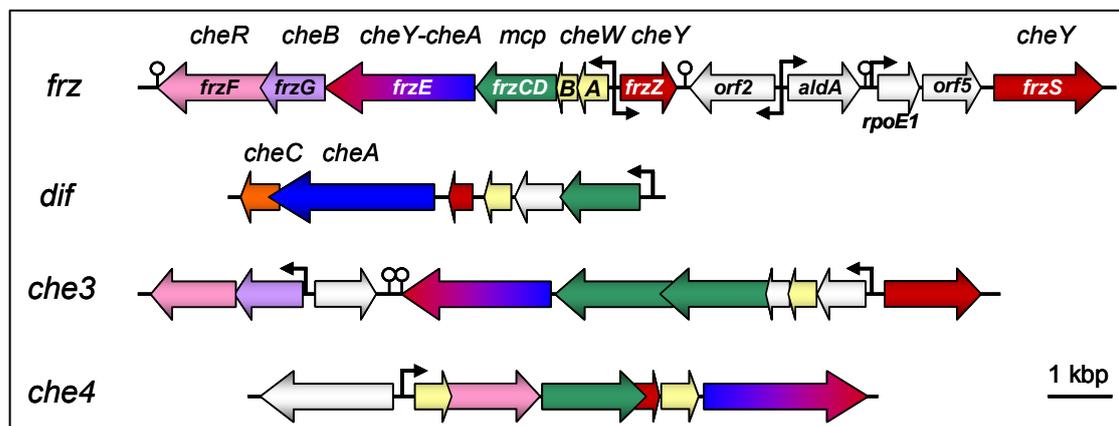


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der charakterisierten Chemotaxissysteme aus *M. xanthus*. Die Genloki sind maßstabsgetreu verkleinert, homologe Gene sind jeweils in derselben Farbe dargestellt (nach J.R. Kirby). Die Gene des *frz*-Systems sind namentlich gekennzeichnet (Bezeichnungen innerhalb und unterhalb der Pfeile). Es gilt der Farbcode: *mcp*-Homolog (grün), *cheW*-Homolog (gelb), *cheY*-Homolog (rot), *cheA*-Homolog (blau), *cheB*-Homolog (lila), *cheR*-Homolog (rosa), *cheC*-Homolog (orange) und Hybridkinase, d.h. *cheY-cheA*-Homolog (blau-rot). Die weißen Pfeile entsprechen nicht *che*-homologen Genen oder hypothetischen Genen. Identifizierte Transkriptionsstartstellen sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet, Terminationsstellen durch *hairpin*-Strukturen. Die Daten entstammen der Genomdatenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

2.3.4 Das *frz*-System und der *response* Regulator FrzZ

Unter vegetativen Bedingungen bewegen sich *M. xanthus* Zellen mit einer Geschwindigkeit von 1 bis 5 $\mu\text{m}/\text{min}$ entlang ihrer Längsachse. Sie stoppen ca. alle 10 min und gleiten dann entweder in die gleiche Richtung weiter oder revertieren. Das *frz*-Signaltransduktionssystem steuert diese gerichtete Bewegung durch die Kontrolle der

Umkehrfrequenz. Sowohl während des vegetativen Wachstums als auch während der Differenzierung wird so die Dauer der Gleitperioden definiert und den aktuellen Bedingungen angepasst (Blackhart and Zusman, 1985a, b). Mutationen in einem der *frz*-Gene resultieren meist in einer reduzierten Zellumkehrfrequenz, die zu einer eingeschränkten Bewegungsfähigkeit unter vegetativen Bedingungen und einer defekten Aggregation führt. Die Zellen sind in der Lage zu aggregieren, bilden dabei aber krause (*frizzy*) Filamente und an der Peripherie der Kolonie häufig ringförmige Strukturen (*swirls*) aus. Obwohl keine Fruchtkörper gebildet werden, ist die Sporulation in *frz*-Mutanten nicht beeinträchtigt (Zusman, 1982).

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der meisten Proteine des *frz*-Systems zu den Komponenten enterobakterieller Chemotaxissysteme wurde für die Regulation der Zellbewegung in *M. xanthus* ein ähnlicher Mechanismus postuliert (McBride et al., 1989). Die Kernkomponenten des *frz*-Systems sind FrzCD, ein MCP-Homolog ohne transmembrane Domänen, FrzA, ein Protein, das Ähnlichkeit zu dem Kopplungsprotein CheW des enterobakteriellen Systems zeigt und die Hybridkinase FrzE. Die Inaktivierung eines dieser Proteine führt zu einem vollständigen Verlust der gerichteten Zellbewegung. Die kodierenden Gene werden innerhalb eines 7,5 kbp Operons zusammen mit dem *frzB*-Gen, das wahrscheinlich ein weiteres Kopplungsprotein kodiert, und den Genen *frzG* und *frzF* abgelesen (siehe Abb. 2.8). FrzCD ist ein cytoplasmatischer Rezeptor, dessen C-terminaler Bereich für die Signalwahrnehmung und -weitergabe essentiell ist (Bustamante et al., 2004). Eine Mutation dieser Region bringt Zellen hervor, die hyperrevertieren, so dass es zu keiner Netto-Bewegung kommt und sie unbeweglich erscheinen. Eine vollständige Deletion des *frzCD*-Genlokus bewirkt dagegen den zuvor beschriebenen Phänotyp. Der N-Terminus des Proteins zeigt Ähnlichkeit zu dem Haupt-Sigmafaktor RpoD aus *B. subtilis*, der dort unter vegetativen Bedingungen sowie in der frühen stationären Phase die Transkription von Genen initiiert (Gitt et al., 1985; McBride et al., 1989). Auch für das myxobakterielle Protein gibt es Hinweise darauf, dass es, zusätzlich zu seiner Rolle in der Motilitätssteuerung, Genexpression reguliert (Weinberg and Zusman, 1989; Zusman and McBride, 1991). FrzCD wird in Abhängigkeit verschiedener Stimuli von der Methyltransferase FrzF modifiziert (McBride et al., 1992). So konnte unter Nährstoffmangelbedingungen eine rasche Methylierung des Rezeptors gezeigt werden, die indirekt durch das zuvor beschriebene C-Signal vermittelt wird (Søgaard-Andersen and Kaiser, 1996).

Der N-terminale Bereich des FrzF-Proteins zeigt Homologie zu der enterobakteriellen Methyltransferase CheR, während der C-Terminus über keinerlei Ähnlichkeit zu

bekanntesten Proteinen verfügt. Dort finden sich drei TPR-Motive (*tetratricopeptide repeats*), die in einer Vielzahl strukturell unterschiedlicher Proteine genutzt werden, um beispielsweise Protein-Protein-Interaktionen zu koordinieren (zur Übersicht D'Andrea and Regan, 2003). Ein solches Ereignis wurde auch als Aktivierungsmechanismus des FrzF-Proteins vorgeschlagen (Bustamante et al., 2004). Die Demethylierung von FrzCD erfolgt durch das Protein FrzG, welches strukturell der Methylesterase CheB aus *E. coli* ähnelt (31% Identität). Während dieses Protein durch einen Phosphotransfer aktiviert werden muss, wird für FrzG eine konstitutive Aktivität postuliert (McCleary et al., 1990). Eine Mutation des korrespondierenden Gens bringt Zellen hervor, die sich in ihrer Bewegungsfähigkeit nur wenig von Wildtypzellen unterscheiden.

Die Kinase FrzE ist ein Hybridprotein, das in seinem N-terminalen Bereich Homologie zu der enterobakteriellen Histidinkinase CheA zeigt, während der C-Terminus dem *response* Regulator CheY ähnelt (siehe Abb. 2.8). Verbunden werden beide durch eine Folge von 68 Aminosäuren, die sich zu 72% aus Alanin- und Prolinresten (AP-reicher *linker*) zusammensetzt (McCleary and Zusman, 1990a). Ähnliche Verbindungen findet man häufig in Kommunikationsproteinen modularer Bauweise (zur Übersicht Parkinson and Kofoid, 1992). Aufgrund der Aminosäurekomposition können in diesen Bereichen keine Sekundärstrukturen gebildet werden. Dadurch wird die Interaktion zwischen den verbundenen Domänen optimiert, was wahrscheinlich essentiell für die Aktivität dieser Proteine ist (Radford et al., 1989). FrzE zeigt eine Autophosphorylierungsaktivität, wobei biochemische Studien *in vitro* die stabile Phosphorylierung eines Aspartatrestes belegen (McCleary and Zusman, 1990b). Vermittelt durch den flexiblen *linker* wäre ein intramolekularer Phosphotransfer von der CheA- auf die eigene CheY-Domäne möglich. Die Kopplung von FrzE an den Rezeptor des Systems, FrzCD, wird dagegen wahrscheinlich durch das CheW-Homolog FrzA erreicht (McBride et al., 1989).

Ca. 6 kbp stromabwärts des *frzA-F* Operons liegt das *frzS*-Gen, welches in einem 3,4 kbp Operon zusammen mit zwei weiteren Genen transkribiert wird (siehe Abb. 2.8). Das Genprodukt setzt sich aus einem C-terminalen *coiled-coil* Motiv, ähnlich dem eukaryontischer Myosine, und einer N-terminalen, CheY-ähnlichen Domäne zusammen. Aufgrund der großen Entfernung zu den anderen *frz*-Genen und da nur eine Insertion in das *frzS*-Gens, nicht aber eine vollständige Deletion den charakteristischen Phänotyp bewirkt (Ward et al., 2000), ist es fraglich, ob man dieses Gen tatsächlich zum *frz*-Signaltransduktionssystem zählen sollte. Zelluläre Lokalisierungsstudien zeigten, dass FrzS wahrscheinlich Teil eines Multiproteinkomplexes ist, der den Wechsel der Pili-Extrusion an das jeweilige Vorderende der Zelle kontrolliert (Mignon et al., 2005).

Domänenstruktur die Konsequenz eines lange zurückliegenden Duplikationsereignisses ist, währenddessen sich jede Domäne möglicherweise an eine eigene Funktion angepasst hat. Dies wurde durch Protein-Interaktionsanalysen unterstützt, die für Z1 eine Interaktion mit einem ABC-Transporter (AbcA) und dem ECF-Sigmafaktor RpoE1 (siehe Abb. 2.8) zeigten (Ward et al., 1998a, b). Als Interaktionspartner der zweiten Domäne wurde dagegen die PP2C-Phosphatase Pph1 identifiziert (Treuner-Lange et al., 2001).

Verbunden werden die beiden CheY-ähnlichen Domänen durch eine Folge von 39 Aminosäuren, die hauptsächlich aus Alanin- (38,5%) und Prolinresten (33,3%) besteht (Abb. 2.9, A.). Dies lässt vermutlich nur eine eingeschränkte Bewegung der beiden Domänen zu, wie bereits für die Hybridkinase FrzE beschrieben. Die konservierten Aminosäurereste des aktiven Zentrums sind in beiden Domänen erhalten, ebenso wie die Reste, die man durch Strukturanalysen aktiver und inaktiver *response* Regulatoren als wichtig für die Interaktion mit dem Flagellenmotor identifiziert hat (Abb. 2.9, B.) (Lee et al., 2001a, b). Die einzige Ausnahme bildet der Glutamatrest korrespondierend zu E89 in CheY, der die essentielle Umlagerung der Seitenkette des aromatischen Tyrosinrestes innerhalb des fünften β -Faltblatts (β_5) stabilisiert und nur in der zweiten Domäne des myxobakteriellen *response* Regulators konserviert ist (Abb. 2.9, B.).

2.3.5 Komponenten der Signaltransduktion in *M. xanthus*

Die Komplettierung der Sequenzanalyse des Wildtypstammes DK1622 unterstreicht die Rolle, die in der Regulation des komplexen Lebenszyklus des Bakteriums *M. xanthus* den Proteinen des eukaryontischen Typs zukommt. Wie bereits erwähnt, ist das myxobakterielle Genom durch Duplikationsereignisse stark vergrößert (Goldman, 2006). Dadurch sind insbesondere Gengruppen mit regulatorischer Funktion und Motilitätsgene sowie typisch prokaryontische Gene der Signaltransduktion (Zwei-Komponenten Systeme, Chemotaxissysteme), aber auch Serin/Threonin Protein-Kinasen (STPKs) und σ^{54} -abhängige Enhancer Bindeproteine (EBPs) überrepräsentiert.

Mit 97 Genen, die Ser/Thr Protein-Kinasen (STPKs) kodieren, übertrifft *M. xanthus* die Anzahl aller anderen bisher sequenzierten prokaryontischen Genome. Untersuchungen zeigten bislang die Beteiligung von 6 dieser Enzyme an der Signaltransduktion während der Differenzierung (Hanlon et al., 1997; Munoz-Dorado, 1991; Nariya and Inouye 2003; Udo et al., 1995; Zhang et al., 1996). Die von STPKs geschaffenen Phosphoester-Bindungen können nur katalysiert durch entsprechende Phosphatasen wieder gelöst werden. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte erst eine von insgesamt vier Ser/Thr-Phosphatasen in *M. xanthus* charakterisiert werden (Treuner-Lange et al., 2001). Das

Enzym Pph1 zeigt eine starke Homologie zu eukaryontischen PP2C-Phosphatasen und gehört zu einer neuen Gruppe von bakteriellen Protein-Phosphatasen. Es zeigt eine Mn^{2+} - oder Mg^{2+} -abhängige Aktivität und wird nicht durch die Inhibitorsubstanz Okadeinsäure gehemmt.

2.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Bodenbakterium *M. xanthus* stellt aufgrund seines komplexen Lebenszyklus, bestehend aus gruppengesteuertem Schwärmen und Jagen sowie der multizellulären Bildung von Fruchtkörpern, ein hervorragendes Modellsystem zur Untersuchung von zellulären Kommunikations- und Signaltransduktionsprozessen dar. Die Zellen bewegen sich dabei durch Gleiten fort, indem die beiden genetisch unterschiedlichen Systeme der A- und S-Motilität genutzt werden (Hodgkin and Kaiser, 1979a, b). Durch die Beeinflussung beider Motilitätssysteme kontrolliert der *frz*-Lokus die Zellumkehrfrequenz und steuert die gerichtete Bewegung des Schwarms (Blackhart and Zusman, 1985a, b; Bustamante et al., 2004). Die Komponenten dieses Signaltransduktionssystems zeigen Ähnlichkeit zu den Proteinen enterobakterieller Chemotaxissysteme, so dass für das myxobakterielle System eine ähnliche Funktion vorhergesagt wurde (McBride et al., 1989). Da jedoch einige auffällige Unterschiede zu den gut charakterisierten Systemen der Enterobakterien bestehen, blieben viele Aspekte der Signaltransduktion durch das *frz*-System bisher im Unklaren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zum Einen die Funktion des *response* Regulators FrzZ aus *M. xanthus* aufgeklärt und dessen Lokalisierung in der Zelle bestimmt werden. Dieses Protein stellt aufgrund seiner Domänenkomposition möglicherweise die ausführende Komponente des *frz*-Systems dar (*output*). Da auch das Ziel der Signalweitergabe durch das System noch unbekannt ist, sollten durch den Einsatz verschiedener Techniken weiterhin Interaktionspartner des FrzZ-Proteins identifiziert und charakterisiert werden. Ein dritter Punkt der vorliegenden Arbeit war die weiterführende Analyse der von Treuner-Lange et al. (2001) entdeckten Interaktion des *response* Regulators mit der Ser/Thr-Phosphatase Pph1, aufbauend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Diplomarbeit (Gröger, 2002). Da zunehmend deutlicher wird, wie wichtig diese typisch eukaryontischen Proteine in der Signaltransduktion von Bakterien wie *M. xanthus* sind, stellte die Aufklärung der regulatorischen Netzwerke eine große Herausforderung dar.

3 MATERIAL

3.1 Verwendete Antibiotika

Tabelle 3.1: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration (µg/ml)	
		<i>E. coli</i>	<i>M. xanthus</i>
Ampicillin (Roth)	25 mg/ml in ddH ₂ O	50	50
Kanamycin (Gibco)	25 mg/ml in ddH ₂ O	50	50 - 200
Tetracyclin (Roth)	25 mg/ml in Ethanol	25	—
Chloramphenicol (Roth)	17 mg/ml in Ethanol	34	—
Gentamycin (Serva)	10 mg/ml in ddH ₂ O	10	10
Oxytetracyclin (Sigma)	12 mg/ml in 1 M Tris-Cl (pH 9,0)	—	12

3.2 Antikörper

Anti- <i>rabbit</i> Konjugat mit Meerrettichperoxidase (POD)	Sigma
Anti- <i>Strep</i> -Tactin Konjugat mit Meerrettichperoxidase (POD)	IBA BioTAGnology, Göttingen
Anti-FrZ (Kaninchenserum)	Trudeau et al., 1996 Pineda AK-Service, Berlin
Anti-Pph1 (Kaninchenserum)	Treuner-Lange et al., 2001
Anti-FruA (Kaninchenserum)	zur Verfügung gestellt von L. Søgaard-Andersen
Anti-PilA (Kaninchenserum)	Wu and Kaiser, 1997

3.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Kälbern (CIAP, 1 U/µl)	Fermentas
Deoxyribonuclease I, RNase-frei (DNase I, 50 U/µl)	Fermentas
Klenow Fragment (10 U/µl)	Fermentas
Lysozym	Boehringer
Proteinase K (20 mg/ml)	Fermentas
<i>Pfu</i> DNA Polymerase (rekombinant, 2,5 U/µl)	Fermentas
<i>Taq</i> DNA Polymerase (rekombinant, 5 U/µl)	Fermentas
T4-DNA Ligase (5 U/µl)	Fermentas
T4-DNA Polymerase (rekombinant, 5 U/µl)	Fermentas
T4-DNA Polynukleotidkinase (PNK, 5 U/µl)	Fermentas

RNasin (40 U/μl)	Promega
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Fermentas

3.4 Größenstandards DNA/Proteine

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, <i>ready-to-use</i>	Fermentas
<i>Prestained</i> Protein Molecular Weight Marker	Fermentas

3.5 Materialien für die Säulenchromatografie

Protino®-Ni-TED 2000 packed columns	Macherey-Nagel
<i>Ready-to-use Strep-Tactin</i> Sepharose® Column	IBA BioTAGnology
Superdex 200 HR 10/300 (Gelfiltration)	Amersham Pharmacia Biotech

3.6 Molekularbiologische Reagenziensätze

E.Z.N.A.® Gel <i>extraction Kit (Classic-Line)</i>	pEQLab
E.Z.N.A.® <i>Plasmid Miniprep Kit I und II (Classic-Line)</i>	pEQLab
QIAquick PCR <i>purification Kit</i>	Qiagen
OneStep RT-PCR <i>Kit</i>	Qiagen
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning <i>Kit</i>	Invitrogen
EnzCheck® Phosphate Assay Kit	Molecular Probes

3.7 Radioaktiv markierte Nukleotide

[γ- ³² P]ATP	Hartmann Analytics
-------------------------	--------------------

3.8 Nährmedien und Agarplatten

3.8.1 Medien und Agarplatten für *E. coli*

LB Medium	Trypton Pepton	10	g
(Sambrook et al., 1989)	Hefeextrakt	5	g
	NaCl	10	g
	ad 1000 ml ddH ₂ O; autoklavieren		

<u>LBON Medium</u>	Trypton Pepton	10	g
(Bhandari and Gowrishankar, 1997)	Hefeextrakt	5	g
	ad 1000 ml ddH ₂ O; autoklavieren		
<u>LB/LBON Agarplatten</u>	Agar (1,5 %)	7,5	g
	ad 500 ml LB/LBON-Medium; autoklavieren		
3.8.2 Medien und Agarplatten für <i>M. xanthus</i>			
<u>CYE Medium</u>	Bacto Casiton	10	g
(Campos and Zusman, 1975)	Bacto Hefeextrakt	5	g
	1 M MOPS pH 7,6	10	ml
	0,8 M MgSO ₄ × 7 H ₂ O	10	ml
	ad 1000 ml ddH ₂ O; autoklavieren		
<u>CYE Agarplatten</u>	Bacto Agar (1,5 %)	7,5	g
	ad 500 ml CYE Medium		
<u>CTT Medium</u>	Bacto Casiton	10	g
(Hodgkin and Kaiser, 1977)	1 M Tris-Cl, pH 8,0	10	ml
	K-PO ₄ , pH 7,7	1	ml
	0,8 M MgSO ₄ × 7 H ₂ O	10	ml
	ad 1000 ml ddH ₂ O; autoklavieren		
<u>½ CTT Medium</u>	Bacto Casiton	5	g
	1 M Tris-Cl, pH 8,0	10	ml
	K-PO ₄ , pH 7,7	1	ml
	0,8 M MgSO ₄ × 7 H ₂ O	10	ml
	ad 1000 ml ddH ₂ O; autoklavieren		

<u>CF Medium</u>	1 M MOPS pH 7,6	10	ml
(Hagen et al., 1978)	0,1 M KH ₂ PO ₄	10	ml
	0,8 M MgSO ₄ × 7 H ₂ O	10	ml
	2 % (NH ₄) ₂ SO ₄	10	ml
	20 % Na-Citrat	10	ml
	1,5 % Bacto Casiton	10	ml
	ad 990 ml ddH ₂ O; autoklavieren und 10 ml Na-Pyruvat Lösung (Endkonzentration: 0,1%) hinzufügen		

<u>CF Medium - Nährstoffe</u>	1 M MOPS pH 7,6	10	ml
	0,1 M KH ₂ PO ₄	10	ml
	0,8 M MgSO ₄ × 7 H ₂ O	10	ml
	ad 990 ml ddH ₂ O; autoklavieren und 10 ml Na-Pyruvat Lösung (Endkonzentration: 0,1%) hinzufügen		

<u>Na-Pyruvat Lösung</u>	Na-Pyruvat	10	g
	ad 100 ml ddH ₂ O; steril filtrieren		

<u>CF Agarplatten</u>	Bacto Agar (1,5 %)	7,5	g
	ad 500 ml CF Medium		

3.8.3 Medien und Agarplatten für *S. cerevisiae*

<u>YPAD Medium</u>	Trypton Pepton	20	g
	Hefe Extrakt	10	g
	auf pH 5,8 einstellen, 40 mg Adenin-Hemisulfat zugeben und mit ddH ₂ O auf 960 ml auffüllen; autoklavieren und 40 ml Glukose-Lösung (Endkonzentration: 2%) hinzufügen		

<u>Glukose-Lösung</u>	Glukose	50	g
	ad 100 ml ddH ₂ O; steril filtrieren		

<u>YPAD Agarplatten</u>	Agar (1,5 %)	7,5	g
	ad 500 ml YPAD Medium		

<u>SD Medium</u>	D-Sorbit	182,18	g
	Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren	6,7	g
	auf pH 5,8 einstellen mit ddH ₂ O auf 860 ml auffüllen; autoklavieren und 100 ml 10x Aminosäure-Lösung, sowie 40 ml Glukose-Lösung (Endkonzentration: 2%) hinzufügen		
<u>SD Agarplatten</u>	Agar (1,5 %)	7,5	g
	ad 500 ml SD Medium		
<u>10x Aminosäure-Lösung</u>	L-Isoleucin	0,3	g
	L-Valin	1,5	g
	L-Adenin-Hemisulfat	0,2	g
	L-Arginin HCl	0,2	g
	L-Histidin HCl × 1 H ₂ O	0,2	g
	L-Leucin	1	g
	L-Lysin HCl	0,3	g
	L-Methionin	0,2	g
	L-Phenylalanin	0,5	g
	L-Threonin	2	g
	L-Tryptophan	0,2	g
	L-Tyrosin	0,3	g
	L-Uracil	0,2	g
	L-Glutamat	1	g
	L-Aspartat	1	g
L-Serin	0,4	g	
	ad 1000 ml ddH ₂ O; autoklavieren		

3.9. Bakterienstämme

3.9.1 Verwendete *E. coli* Stämme

Tabelle 3.2: In dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
BL21	<i>F- dcm ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal lon</i>	Invitrogen, Carlsbad USA
BL21(DE3)	<i>F- dcm ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal lon</i> (<i>λ</i> lts857 <i>indl Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene</i> 1)	Studier and Moffat, 1986
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15)</i> <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
GJ1158	<i>F- dcm ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal lon</i> (<i>proUp::T7 RNAP::malQ-lacZ</i>)	Bhandari and Gowrishankar, 1997
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96</i> <i>relA1 thi Δ(lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺</i> <i>lacI^q lacZΔM15]</i>	Yanisch-Perron et al., 1985
Top10	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR</i> <i>araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galk</i> <i>rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen, Carlsbad USA

3.9.2 Verwendeter *S. cerevisiae* Stamm

Tabelle 3.3: In dieser Arbeit verwendeter *S. cerevisiae* Stamm

Stamm	Beschreibung	Referenz
PJ96-4A	<i>MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-</i> <i>200 gal4Δ gal180Δ LYS2::GAL1-HIS3</i> <i>GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	James et al., 1996

3.9.3 Verwendete *M. xanthus* Stämme

Tabelle 3.4: In dieser Arbeit verwendete *M. xanthus* Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
DZ2	Wildtypstamm von <i>M. xanthus</i>	Campos and Zusman, 1975
DK1622	Wildtypstamm von <i>M. xanthus</i>	Kaiser, 1979
DZ4484	DZ2 Δ frzZ, Deletion der Codons 16-280	Bustamante et al., 2004
DZ4176	DZ2frzZ::pBR322:frzZ _{SphI-XhoI} , Kan ^r	Trudeau et al., 1996
DZ4314	DZ2::pATP3, <i>pph1205</i> , Kan ^r	Treuner-Lange et al., 2001
DZ4148	DZ2frzE::Tn5Q226, Kan ^r	Shi et al., 1993
DZ4169	DZ2frzCD::Tn5tac1Q4017	Shi et al., 1993
DK9032	Δ frz(A'-E')::Kan ^r , Mx8 (DZF3558) \rightarrow (DK1622)	Søgaard-Andersen et al., 1996
DZ2asgB	Entstanden durch Phagen-Transduktion mit Lysat des <i>M. xanthus</i> Stamms DK2636, Kan ^r	A. Treuner-Lange, 2005 (unveröffentlicht)
DK1217	<i>aglB1</i> , Bewegungsphenotyp (A ⁻ S ⁺)	Hodgkin and Kaiser, 1979
DK1300	<i>sglG1(pilC</i> Punktmutante), Bewegungsphenotyp (A ⁺ S ⁻)	Hodgkin and Kaiser, 1979
DK10417	<i>aglB1</i> Δ <i>pilC</i> , Bewegungsphenotyp (A ⁻ S ⁻)	Dale Kaiser, Stammsammlung

3.9.4 Konstruierte *M. xanthus* Stämme

Tabelle 3.5: In dieser Arbeit konstruierte *M. xanthus* Stämme

Stamm/Genotyp	Beschreibung
DZ2 Δ frzZ::pSWU30	Chromosomale Integration des Plasmids pSWU30 in DZ2 Δ frzZ; durch <i>attB-attP</i> vermittelte Rekombination in die Anheftungsstelle (<i>attachment-site attB</i>) des Myxo-Bakteriophagen Mx8; Oxy ^r

Stamm/Genotyp	Beschreibung
DZ2ΔfrzZ::pSWU30:pro-frzZ WTneu, E/E, E/N, N/N, N/E, D52N, D220N	Chromosomale Integration des Plasmids pSWU30, das ein 765 bp <i>XhoI-EcoRI</i> Fragment des entsprechenden pRSETB: <i>frzZ</i> -Plasmids enthält, in DZ2ΔfrzZ; zur Komplementationsanalyse; Oxy ^r
DZ2ΔfrzZMxpph1	Inaktivierung des chromosomalen <i>pph1</i> -Gens in DZ2ΔfrzZ; durch Phagen-Transduktion mit Lysat des <i>M. xanthus</i> Stamms DZ4314; Kan ^r
DK1217MxfrzZ	Inaktivierung des chromosomalen <i>frzZ</i> -Gens in DK1217; durch Phagen-Transduktion mit Lysat des <i>M. xanthus</i> Stamms DZ4176; Kan ^r
DK1217MxfrzZ::pSWU30	Chromosomale Integration des Plasmids pSWU30 in DK1217MxfrzZ; durch <i>attB-attP</i> vermittelte Rekombination in die Anheftungsstelle des Myxo-Bakteriophagen Mx8; Kan ^r , Oxy ^r
DK1217MxfrzZ::pSWU30:pro-frzZ WTneu, N/N, D52N, D220N	Chromosomale Integration des Plasmids pSWU30, das ein 765 bp <i>XhoI-EcoRI</i> Fragment des entsprechenden pRSETB: <i>frzZ</i> -Plasmids enthält, in DK1217MxfrzZ; zur Komplementationsanalyse; Kan ^r , Oxy ^r
DK1300MxfrzZ	Inaktivierung des chromosomalen <i>frzZ</i> -Gens in DK1300; durch Phagen-Transduktion mit Lysat des <i>M. xanthus</i> Stamms DZ4176; Kan ^r
DK1300MxfrzZ::pSWU30	Chromosomale Integration des Plasmids pSWU30 in DK1300; durch <i>attB-attP</i> vermittelte Rekombination in die Anheftungsstelle des Myxo-Bakteriophagen Mx8; Kan ^r , Oxy ^r
DK1300MxfrzZ::pSWU30:pro-frzZ WTneu, N/N, D52N, D220N	Chromosomale Integration des Plasmids pSWU30, das ein 765 bp <i>XhoI-EcoRI</i> Fragment des entsprechenden pRSETB: <i>frzZ</i> -Plasmids enthält, in DK1300; zur Komplementationsanalyse; Kan ^r , Oxy ^r
DZ2ΔfrzZ::pSWU30:pro-frzZ WTneu-GFP	Chromosomale Integration des Plasmids pSWU30: <i>pro-frzZ</i> WTneu-GFP in DZ2ΔfrzZ, DZ2ΔfrzZMxpph1 und DZ4314; durch <i>attB-attP</i> vermittelte Rekombination in die Anheftungsstelle des Myxo-Bakteriophagen Mx8; Kan ^r , Oxy ^r
DZ2ΔfrzZMxpph1::pSWU30:pro-frzZ WTneu-GFP	
DZ4314::pSWU30:pro-frzZ WTneu-GFP	

Stamm/Genotyp	Beschreibung
DK1217MxfrzZ::pSWU30: <i>pro-frzZ</i> WTneu-GFP	Chromosomale Integration des Plasmids pSWU30: <i>pro-frzZ</i> WTneu-GFP in DK1217MxfrzZ und DK1300MxfrzZ; durch <i>attB-attP</i> vermittelte Rekombination in die Anheftungsstelle des Myxo-Bakteriophagen Mx8; Kan ^r , Oxy ^r
DK1300MxfrzZ::pSWU30: <i>pro-frzZ</i> WTneu-GFP	
DZ2 <i>tprint</i>	Inaktivierung des chromosomalen <i>tpr</i> -Gens der Stämme DZ2, DZ2Δ <i>frzZ</i> , DK1217, DK1300 und DK10417; durch homologe Rekombination des Plasmids pCR®-Blunt II-TOPO: <i>tprint</i> in den chromosomalen <i>tpr</i> -Lokus; Kan ^r
DZ2Δ <i>frzZtprint</i>	
DK1217 <i>tprint</i>	
DK1300 <i>tprint</i>	
DK10417 <i>tprint</i>	
DZ4314::pSWU30	Chromosomale Integration des Plasmids pSWU30 in DZ4314; durch <i>attB-attP</i> vermittelte Rekombination in die Anheftungsstelle des Myxo-Bakteriophagen Mx8; Kan ^r , Oxy ^r
DZ4314::pSWU30: <i>pro-frzZ</i> WTneu, E/E, E/N, N/N, N/E, D52N, D220N	Chromosomale Integration des Plasmids pSWU30, das ein 765 bp <i>XhoI-EcoRI</i> Fragment des entsprechenden pRSETB: <i>frzZ</i> -Plasmids enthält, in DZ4314; zur Komplementationsanalyse; Kan ^r , Oxy ^r
DZ2 <i>asgB</i> ::pSWU30	Chromosomale Integration des Plasmids pSWU30 in DZ2 <i>asgB</i> ; durch <i>attB-attP</i> vermittelte Rekombination in die Anheftungsstelle des Myxo-Bakteriophagen Mx8; Kan ^r , Oxy ^r
DZ2 <i>asgB</i> ::pSWU30: <i>pro-frzZ</i> WTneu, N/E, D220N	Chromosomale Integration des Plasmids pSWU30, das ein 765 bp <i>XhoI-EcoRI</i> Fragment des entsprechenden pRSETB: <i>frzZ</i> -Plasmids enthält, in DZ2 <i>asgB</i> ; zur Komplementationsanalyse; Kan ^r , Oxy ^r

3.10 Plasmide

Tabelle 3.6: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
Cosmid 3B5	ca. 20.000 bp; enthält das gesamte <i>frz</i> -Operon sowie das <i>rpoE1</i> -Operon;	Ward et al., 2000

Plasmid	Beschreibung	Referenz
p53	7400 bp; murines p53 ⁽⁷²⁻³⁹⁰⁾ <i>trp1</i> , Amp ^r	Stratagene
pSV40	8400 bp; großes SV-40 T-Antigen ⁽⁸⁴⁻⁷⁰⁸⁾ <i>leu2</i> , Amp ^r	Stratagene
pLaminC	7000 bp; humanes LaminC ⁽⁶⁷⁻²³⁰⁾ <i>trp1</i> , Amp ^r	Stratagene
pGAL4	11.500 bp; Wildtyp Gal-4 Protein <i>leu2</i> , Amp ^r	Stratagene
pGAD-C1	Gal-4-Aktivierungsdomänenfusion von 500 bis 2000 bp großen Stücken genomischer DNA von <i>M. xanthus</i> <i>leu2</i> , Amp ^r	Zur Verfügung gestellt von Linda Plamann, University of Missouri- Kansas City, USA
pGAD-C2		
pGAD-C3		
pBD:frzE	8837 bp; <i>frzE</i> -Gal-4-Bindedomänenfusion; <i>trp1</i> , Cm ^r	Ward et al., 1998
pBD:frzZ	7373 bp; <i>frzZ</i> -Gal-4-Bindedomänenfusion; <i>trp1</i> , Cm ^r	Treuner-Lange et al., 2001
pGBK-T7:frzZ WT, E/E, E/N, N/N, N/E	7383 bp; trägt ein 889 bp <i>EcoRI-EcoRI</i> <i>frzZ</i> -Fragment des entsprechenden pRSETB: <i>frzZ</i> Plasmids; <i>frzZ</i> -Gal-4- Bindedomänenfusion; <i>trp1</i> , Kan ^r	Gröger, 2002
pRSETB:frzZ	3828 bp; pRSETB mit dem 889 bp <i>EcoRI- EcoRI frzZ</i> -Fragment aus pBD: <i>frzZ</i> ; Amp ^r	Gröger, 2002
pRSETB:frzZ E/E, E/N, N/N, N/E, D52N, D220N	3828 bp; durch gerichtete Mutagenese entstandene Austausch der Aspartatreste (D) in Position 52 und 220 des <i>frzZ</i> -Gens zu Glutamat (E) und Asparagin (N); Amp ^r ;	Gröger, 2002
pQE30:pph1	4211 bp; enthält ein <i>BamHI-Sall</i> - geschnittenes PCR Fragment von <i>pph1</i> als N-terminale His ₆ -Fusion; Amp ^r	Treuner-Lange et al., 2001
pRSETA:pph1	3682 bp; enthält das 785 bp <i>BamHI- HindIII pph1</i> -Fragment aus pQE30: <i>pph1</i> ; Amp ^r	A. Treuner-Lange, 2002
pSWU30	6530 bp; enthält die DNA-Sequenz der Anheftungsstelle des Myxo- Bakteriophagen Mx8; Oxy ^r	Zur Verfügung gestellt von S. Wu

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pSWU30:pro-frzZ	7505 bp; enthält ein 975 bp PCR-Fragment (<i>primer: frzZpro+2, frzZstopSall</i>) des <i>frzZ</i> -Gens mit dessen Promotor-Region, kloniert in die <i>SmaI</i> -Schnittstelle; Oxy ^r	diese Arbeit
pSWU30:pro-frzZ WTneu, E/E, E/N, N/N, N/E, D52N, D220N	7289 bp; enthält das 765 bp <i>XhoI-EcoRI</i> Fragment aus pRSETB: <i>frzZ</i> , E/E, E/N, N/N, N/E, D52N oder D220N; Oxy ^r	diese Arbeit
pASK-IBA15plus	3282 bp; Überexpressionsplasmid; Überexpression rekombinanter Proteine mit N-terminalem <i>Strep-tag</i> unter Kontrolle des Tetracyclin Promotors; Amp ^r	IBA BioTAGnology
pASK-IBA15plus:p$ph1$	4016 bp; enthält das 785 bp <i>BamHI-HindIII pph1</i> -Fragment aus pRSETA: <i>p$ph1$</i> ; Amp ^r	diese Arbeit
pASK-IBA15plus:frzE	5634 bp; enthält das 2352 bp <i>EcoRI-EcoRI frzE</i> -Fragment aus pBD: <i>frzE</i> ; Amp ^r	diese Arbeit
pASK-IBA15plus:frzEΔ_{cheY}	5237 bp; <i>EcoRV</i> linearisierter Vektor pASK-IBA15plus: <i>frzE</i> , dem durch partiellen <i>BsrDI</i> -Verdau 397 bp entfernt wurden; kodiert für C-terminal verkürzte Form von FrzE; Amp ^r	diese Arbeit
pCR[®]-Blunt II-TOPO	3519 bp; TOPO [®] -aktivierter Vektor zur Subklonierung von <i>blunt-end</i> PCR-Produkten; Kan ^r	Invitrogen, Carlsbad USA
pCR[®]-Blunt II-TOPO:tprint	4125 bp; enthält ein 605 bp <i>tprint</i> -PCR-Fragment (<i>primer: tprint+, tprint-</i>); Kan ^r	diese Arbeit
pFCrGFP	3678 bp; enthält das <i>gfp</i> -Gen (<i>gfp = green fluorescent protein</i>) aus <i>Aequorea victoria</i> ; Amp ^r	BioCat GmbH, Heidelberg
pCR[®]-Blunt II-TOPO:Agel-GFP	4248 bp; enthält ein 729 bp PCR-Fragment aus pFCrGFP, das das <i>gfp</i> -Gen mit einer <i>Agel</i> -Schnittstelle versieht; Kan ^r	diese Arbeit
pSWU30:pro-frzZ WTneu-GFP	7948 bp; enthält das 699 bp <i>Agel-EcoRI</i> Fragment aus pCR [®] -Blunt II-TOPO:Agel-GFP; FrzZ wird so C-terminal mit GFP fusioniert; Oxy ^r	diese Arbeit

3.11 Oligonukleotide

Tabelle 3.7: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'
pRSET5' 20 nt, komplementär zu dem Vektor pRSETB, bindet <i>upstream</i> der MCS; <i>sense</i>	GGGATCTGTACGACGATGAC
pRSET3' 20 nt, komplementär zu dem Vektor pRSETB, bindet <i>downstream</i> der MCS; <i>antisense</i>	CAGCTTCCTTTCTGGGCTTTG
frzZpro+2 20 nt; komplementär zur Promotorregion des <i>frzZ</i> -Gens, bindet 92 bp <i>upstream</i> des Translationsstarts; <i>sense</i>	GAGGACCTGACGACCAGCCC
frzZstopSalI 29 nt; fügt eine SalI Schnittstelle unmittelbar <i>downstream</i> des <i>frzZ</i> - <u>Stopcodons</u> ein; <i>antisense</i>	ACGCGT CGACT ACTCGTTACCGGTGGGCA
attB1 20 nt; komplementär zur <i>attB1</i> -Region im Chromosom von <i>M. xanthus</i> ; <i>sense</i>	GTCGACTGCGCAGGTCCGCG
attR1 20 nt; komplementär zur <i>attB2</i> -Region im Chromosom von <i>M. xanthus</i> ; <i>antisense</i>	CCGGGCGGCCTTGCGGAATG
attPF 17 nt; komplementär zum 5'-Bereich der <i>att</i> -homologen Region (<i>attP</i> = <i>phage attachment site</i>) des Plasmids pSWU30; <i>sense</i>	ACATTGACGTGGAGGCC
attPR 17 nt; komplementär zum 3'-Bereich der <i>att</i> -homologen Region (<i>attP</i> = <i>phage attachment site</i>) des Plasmids pSWU30; <i>antisense</i>	TGCGGGTGAGACTCAGG
frzZAgelGFP 29 nt; im 5'-Bereich komplementär zum Ende des <i>frzZ</i> -Gens bis unmittelbar oberhalb des Stopcodons; dann komplementär zum <u>Beginn</u> des <i>gfp</i> -Genes in pFCrGFP; <i>sense</i>	ACCGGTAACGAGATGGCCAAGGGCGAGGA
GFP-stop 19 nt; komplementär zum Ende des <i>gfp</i> -Gens in pFCrGFP; <i>antisense</i>	TTACTTGTACAGCTCGTCC

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'
M13F 17 nt; bindet <i>upstream</i> der MCS der meisten kommerziellen Vektoren; <i>sense</i>	TGTAAAACGACGGCCAG
M13R 17 nt; bindet <i>downstream</i> der MCS der meisten kommerziellen Vektoren; <i>antisense</i>	CAGGAAACAGCTATGAC
tprint+ 17 nt; komplementär zur Position 212 innerhalb der <i>tpr</i> -Nukleotidsequenz; <i>sense</i>	AGCGCTACGAGCAGAAG
tprint- 17 nt; komplementär zur Position 816 innerhalb der <i>tpr</i> -Nukleotidsequenz; <i>antisense</i>	CTTGTAGAGCGCCTTGTC
tpr+167 17 nt; komplementär zur Position 167 <i>upstream</i> des Start des <i>tpr</i> -Gens; <i>sense</i>	CCGAGGCGCGGAGTTC
tpr-881 17 nt; komplementär zur Position 881 <i>downstream</i> des Stopcodon des <i>tpr</i> -Gens; <i>antisense</i>	ACCAGCGTCAGGAAGGA
pASK-IBAF 20 nt; komplementär zu den pASK-IBA Vektoren, bindet <i>upstream</i> der MCS; <i>sense</i>	GAGTTATTTTACCACTCCCT
pASK-IBAR 17 nt, komplementär zu den pASK-IBA Vektoren, bindet <i>downstream</i> der MCS; <i>antisense</i>	CGCAGTAGCGGTAAACG
frzint1 22 nt, komplementär zur Position 155 innerhalb der <i>frzZ</i> -Nukleotidsequenz; <i>sense</i>	CGTCAACATGCCGGAGATGTTC
frzint2r 22 nt, komplementär zur Position 306 innerhalb der <i>frzZ</i> -Nukleotidsequenz; <i>antisense</i>	TCAGGATGTACCCGTCCGCCCC
Mxf_{ruA}+ 20 nt; genutzt für die <i>real time</i> RT-PCR; komplementär zur Position 288 innerhalb der <i>fruA</i> -Nukleotidsequenz; <i>sense</i>	GGTGAGCACACCGGAAATCA

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'
Mxf_{ruA}-	TCGTTCTCAGGAGCTGCAC
20 nt; genutzt für die <i>real time</i> RT-PCR; komplementär zur Position 440 innerhalb der <i>fruA</i> -Nukleotidsequenz; <i>antisense</i>	
Mxr_{poZ}+	CGTTACCGTCGAAGACTGC
19 nt; genutzt für die <i>real time</i> RT-PCR; komplementär zur Position 9 innerhalb der <i>rpoZ</i> -Nukleotidsequenz; <i>sense</i>	
Mxr_{poZ}-	GTCACGGTCGAACTTCACG
19 nt; genutzt für die <i>real time</i> RT-PCR; komplementär zur Position 189 innerhalb der <i>rpoZ</i> -Nukleotidsequenz; <i>antisense</i>	

3.12 Puffer und Lösungen

3.12.1 Puffer und Lösungen für Restriktionsendonukleasen

Die Enzympuffer für die Restriktionsendonukleasen von New England Biolabs und Fermentas wurden von dem jeweiligen Hersteller als 10x Puffer geliefert und sind hier nicht im Einzelnen aufgelistet. Sie wurden so verwendet, dass sie im Reaktionsansatz 1x konzentriert vorlagen. Falls es das Enzym erforderte, wurde 10x BSA (Bovines Serum Albumin; 1 mg/ml) zugegeben, so dass im Reaktionsansatz eine Endkonzentration von 100 µg/ml erreicht wurde.

3.12.2 Puffer und Lösungen für DNA modifizierende Enzyme

Ebenfalls nicht aufgeführt sind die Enzympuffer der DNA modifizierenden Enzyme (siehe Punkt 2.3), sowie die Puffer der verwendeten Reagenziensätze (siehe Punkt 2.6). Diese Puffer wurden ebenfalls als 10x bzw. 5x Puffer geliefert und nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.13 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Sigma (München), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Becton-Dickinson (Heidelberg) und IBA BioTAGnology (Göttingen) bezogen und sind nicht im Einzelnen aufgelistet.

3.14 Spezielle Artikel und Geräte

Centricon (Mikrokonzentrador, 50 kDa <i>cut-off</i>)	Amicon
Chromatografieanlage BioLogic HR System	Bio-Rad
Dialyseschläuche <i>ZelluTrans</i>	Roth
Digitalkamera Nikon Coolpix 995	Nikon
Elektrophoresegelkammern	Bio-Rad
Elektroporation <i>E. coli</i> Pulser	Bio-Rad
Elektroporationsküvetten (0,1 cm)	Bio-Rad
Flüssigkeitsszintillationszähler LS-6000TA	Beckmann
Geltrockner	
Glasperlen (\varnothing 0,1 – 0,11 mm)	B. Braun, Melsungen
<i>Imaging</i> Platte für den <i>Molecular Imager</i> ®FX	Fuji
Kühlzentrifugen RC-5B, RC-5C Plus	Sorvall
Mikroskop Nikon Eclipse E200	Nikon
<i>Molecular Imager</i> ®FX	Fuji
PCR-Maschine Gene Amp PCR System 2400	Perkin-Elmer
pH-Meter cG820	Schott Geräte
Protein-A-Sepharose CL-4B	Amersham
PVDF-Membran Immobilon P, 0,45 μ m	Roth
Reinstwasseranlage Typ Hp6 UV/UF	TKA
Ribolyser	Hybaid AGS
Rotor-Gene 3000 <i>real time</i> PCR <i>cycler</i>	Corbett Research
Röntgenfilme CEA RP New (13 × 18 cm)	CEA, Strängnäs (Schweden)
Semi-Trocken- <i>Blot</i> -Apparatur	Keutz
Speed-Vac-Concentrator (Vakuumzentrifuge)	Savant
Spektralfotometer (Ultraspec 3000pro)	Pharmacia Biotech
Stereoskop Nikon SMZ800	Nikon
Sterilfilter	Nalgene
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus Sepatech
Ultraschallgerät Sonoplus GM70 (Sonifier)	Bandelin
Ultrazentrifuge Optima™ TLX Ultracentrifuge	Beckman Coulter
Videodokumentationsanlage für Gele	Herolab
Vivaspin (Mikrokonzentrador, 3 kDa <i>cut-off</i>)	Vivascience
Whatmann Papier, 3 mm, 5 mm	Roth

4 METHODEN

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Flüssigkulturen von *E. coli*, *M. xanthus* und *S. cerevisiae*

E. coli Flüssigkulturen werden bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) in LB Medium kultiviert, wobei Antibiotika und Supplemente in den üblichen Konzentrationen verwendet werden (Sambrook et al., 1989). Um die Zellen optimal mit Sauerstoff zu versorgen, werden die Kulturgefäße (Erlenmeyerkolben) nur zu 1/10 ihres Nennvolumens gefüllt. Das Animpfen von Flüssigkulturen erfolgt mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers oder einer sterilen Impföse. Durch die Zugabe von Antibiotika kann auf Bakterienstämme mit der entsprechenden Resistenz selektioniert werden.

Die Kultivierung von *M. xanthus* erfolgt in CYE oder CTT Medium bei einer Temperatur von 32°C unter Schütteln (250 rpm). Als Kulturgefäße dienen Erlenmeyerkolben, wobei auch hier zur ausreichenden Belüftung ein maximales Volumenverhältnis von Medium zu Gefäß von 1/10 eingehalten wird. Durch die Zugabe von Antibiotika kann auf Stämme mit der entsprechenden Resistenz selektioniert werden, die bei diesem Organismus an das Chromosom gekoppelt vorliegt.

S. cerevisiae Zellen werden in YPAD oder SD Medium angezogen und unter Schütteln (140 rpm) bei 32°C inkubiert. Da Hefe-Stämme im Rahmen dieser Arbeit für Protein-Interaktionsanalysen (Hefe Zwei-Hybrid System) verwendet wurden, wurde eine Selektion auf plasmidtragende Klone in SD Medium durch die Auswahl der enthaltenen Aminosäuren vorgenommen.

4.1.2 Herstellung von Plattenkulturen

Zur Herstellung von Plattenkulturen werden Zellen unter sterilen Bedingungen mit einer Impföse auf einer LB (*E. coli*), einer CYE (*M. xanthus*) oder einer YPAD Agarplatte (*S. cerevisiae*) ausgestrichen. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37°C (*E. coli*) oder für 2 bis 4 Tage bei 32°C (*M. xanthus*, *S. cerevisiae*). Für *E. coli* und *M. xanthus* Plattenkulturen kann durch die Zugabe von Antibiotika auf Stämme mit der entsprechenden Resistenz selektioniert werden. Plasmidtragende Hefestämme werden durch die Auswahl der Aminosäuren in den Agarplatten selektioniert.

4.1.3 Bestimmung der Gesamtzellzahl einer Bakterienkultur

4.1.3.1 Bestimmung der optischen Dichte (OD)

Diese Methode macht sich den Effekt der Lichtstreuung an den Zellen in einer Flüssigkultur zu Nutze. Aus der fotometrisch bestimmten optischen Dichte (OD) lässt sich dann die Gesamtzellzahl der Kultur errechnen. Die OD-Bestimmung erfolgt bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gegen zellfreies Medium. Für die Bestimmung der Zellzahl gilt:

<i>E. coli</i>	$OD_{600} = 1$	entspricht ca. 5×10^8 Zellen/ml
<i>M. xanthus</i>	$OD_{600} = 1$	entspricht ca. $2,5 \times 10^9$ Zellen/ml
<i>S. cerevisiae</i>	$OD_{600} = 0,1$	entspricht ca. 1×10^6 Zellen/ml

4.1.3.2 Bestimmung der Gesamtzellzahl mit der Zählkammer

Auch durch mikroskopische Auszählung lässt sich die Gesamtzellzahl einer Bakterienkultur bestimmen. Zu diesem Zweck benutzt man eine Zählkammer, in der die Zellen in einem definierten Volumen in einer dünnen Schicht ausgebreitet vorliegen. Die gebräuchlichste Zählkammer trägt eine Netzeinteilung nach Thoma und besteht aus einem quadratischen Areal, das in 16 Kleinquadrate eingeteilt ist. Jedes Kleinquadrat hat eine Kantenlänge von 0,05 mm und einen Abstand von 0,01 mm zu dem korrekt aufgelegten Deckglas. Daraus ergibt sich ein Volumen von $0,05 \times 0,05 \times 0,01 = 25 \times 10^{-6}$ mm³ über jedem Kleinquadrat. Um nun auf eine übliche Bezugsgröße (1 ml = 1 cm³) zu kommen, muss mit dem so genannten Kammerfaktor (4×10^6) multipliziert werden. Für die Zellzahlbestimmung gilt also:

$$\text{Zellzahl/Kleinquadrat} \times \text{Kammerfaktor} = \text{Zellzahl/ml}$$

4.1.4 Herstellung von Dauerkulturen

Um Bakterien- oder Hefekulturen über einen längeren Zeitraum aufbewahren zu können, werden Dauerkulturen angelegt. Dazu werden von einer über Nacht (*E. coli*) bzw. in 1 bis 2 Tagen (*M. xanthus*) gewachsenen Kultur 0,9 ml in ein Kryoröhrchen überführt und 0,1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben. DMSO wird als Gefrierschutzmittel eingesetzt, da es als polare Verbindung Wasser bindet und somit Makromoleküle stabilisiert. In den Zellen werden dadurch der Wasserentzug, die Konzentrierung der Elektrolyte und die Bildung von Eiskristallen verhindert. Die Röhrchen werden bei -80°C gelagert.

4.1.5 Erstellen der Wachstumskurve einer Flüssigkultur

Um das Wachstum von *E. coli* und *M. xanthus* Kulturen zu untersuchen, wird eine Übernachtkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,15 bis 0,2 eingestellt und unter optimalen Wachstumsbedingungen inkubiert. Ausgehend vom Zeitpunkt 0 min werden für die *E. coli* Kultur alle 30 min Proben entnommen und deren OD bei 600 nm oder 550 nm mit Hilfe des Fotometers bestimmt.

M. xanthus verdoppelt sich unter optimalen Bedingungen ca. alle 2 h. Das Wachstum einer solchen Kultur wird über mehrere Tage verfolgt bis die stationäre Phase erreicht ist, wobei zweimal am Tag Proben zur Bestimmung der OD₆₀₀ entnommen werden. Zur grafischen Darstellung der Wachstumskurve wird der OD-Wert in halblogarithmischer Skalierung gegen die Zeit aufgetragen.

4.1.6 Bestimmung der Verdopplungszeit t_d einer Bakterienkultur

Um die Verdopplungszeit t_d einer Bakterienkultur zu ermitteln, wird dieser zu bestimmten Zeitpunkten eine Probe entnommen und deren OD₆₀₀ bestimmt. Durch die halblogarithmische Auftragung dieser Werte gegen die Zeit ergibt sich während der exponentiellen Wachstumsphase eine Gerade, deren Steigung der Wachstumskonstanten μ entspricht. Die Verdopplungszeit t_d errechnet sich dann nach der Gleichung:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

4.1.7 Transformation

Durch eine Transformation nehmen Zellen Fremd-DNA (z.B. Plasmid-DNA) aus der Umgebung auf, was zu einer Veränderung ihres Genotyps führt. Man unterscheidet verschiedene physikalische und chemische Methoden der Transformation. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *E. coli* und *M. xanthus* Zellen durch die physikalische Methode der Elektroporation transformiert, wohingegen auf *S. cerevisiae* Zellen eine chemische Transformation (Lithium Acetat-Transformation) angewendet wurde. Um eine Transformation zu ermöglichen, werden kompetente Zellen benötigt.

4.1.7.1 Elektroporation von *E. coli*

Zur Herstellung elektrokompeter *E. coli* Zellen wird eine 50 ml Flüssigkultur in LB Medium über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag werden 500 ml LB Medium mit dieser Vorkultur angeimpft. Nach Erreichen der exponentiellen

Wachstumsphase (OD_{600} 0,5 - 0,8) wird die Kultur für 20 min auf Eis abgekühlt und dann unter sterilen Bedingungen in Zentrifugenbecher überführt. Alle nachfolgenden Schritte finden auf Eis bzw. bei 4°C statt. Die Zellen werden durch Zentrifugation geerntet (4.000 rpm, 10 min, 4°C), zweimal in 1 Vol. eiskaltem sterilem Wasser und zweimal in je 30 ml eiskaltem 10%igem Glycerin gewaschen. Zur Aufbewahrung werden die Zellen in 0,5 bis 0,75 ml 10%igem Glycerin aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Pro Transformationsreaktion werden 40 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 bis 3 µl (20 - 500 ng) Fremd-DNA gemischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgt mit einer Spannung von 2,2 kV für ca. 5 ms in einem *E. coli*-Elektro Pulser. Sofort nach dem Strompuls werden die Zellen in 1 ml LB Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wird der Transformationsansatz auf LB Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.1.7.2 Elektroporation von *M. xanthus*

Für die Elektroporation müssen *M. xanthus* Zellen immer frisch präpariert werden. Eine Lagerung bei -80°C ist in diesem Fall nicht möglich. Zur Herstellung elektrokompetenter *M. xanthus* Zellen wird eine Vorkultur des entsprechenden Stamms in der frühen exponentiellen Wachstumsphase geerntet (OD_{600} 0,5 - 0,6). Pro Transformationsreaktion werden zweimal 1,5 ml Zellen abzentrifugiert (12.000 rpm, 4 min, RT). Das Zellpellet wird dreimal in 1 ml sterilem ddH₂O gewaschen, in 40 µl ddH₂O aufgenommen und auf Eis gelagert. 1,5 bis 1,7 µl der zu transformierenden DNA werden in die dafür vorgesehene Probe gegeben und in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgt bei einer Spannung von 0,65 kV für ca. 5 ms in einem *E. coli*-Elektro Pulser. Anschließend wird die Probe mit 1 ml warmen CYE Medium aus der Küvette gespült und in einen vorbereiteten 50 ml Erlenmeyerkolben überführt, in dem sich bereits 1,5 ml CYE Medium befinden. Die Regeneration erfolgt bei 32°C unter Schütteln für mindestens zwei Generationszeiten. Dann kann durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums auf Klone selektioniert werden, welche die Fremd-DNA durch Rekombination in das Chromosom aufgenommen haben. Im Anschluss an die Selektionsphase der Flüssigkultur wird diese zu gleichen Teilen mit 1%igem CYE Agar gemischt, auf Platten mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum ausgebracht und bei 32°C für 4 bis 7 Tage inkubiert.

4.1.7.3 Lithium Acetat-Transformation von *S. cerevisiae*

Bei der hier beschriebenen Methode werden zwei Plasmide in einem Schritt in *S. cerevisiae* Zellen transformiert. Die Transformation wird nach dem *Quick and Easy TRAF0 Protocol* von Gietz und Woods (2002) durchgeführt. Die verwendeten Zellen sollten dabei relativ frisch sein. Pro Reaktionsansatz werden ca. 25 µl Zellen steril von einer Plattenkultur abgenommen und in 1 ml ddH₂O suspendiert. Die Zellen werden dann bei 13.000 rpm für 15 sec pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 1 ml Lithium Acetat (100 mM) resuspendiert. Das Volumen an Zellsuspension für eine Transformationsreaktion wird nun in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und für 5 sec bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet mit folgenden Reagenzien überschichtet:

Transformationsansatz	PEG (50% w/v)	24 µl
	1 M Lithium Acetat	36 µl
	Lachssperma DNA (2 mg/ml) (geschert durch kochen)	50 µl
	Plasmid DNA (0,1 - 5 µg)	5 µl
	ddH ₂ O	20 µl

Das Zellpellet wird nun resuspendiert und bei 42°C für 20 min inkubiert. Es schließt sich eine Zentrifugation für 10 sec bei 13.000 rpm an. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet wird in 200 bis 400 µl ddH₂O resuspendiert. Die Zellen können nun auf die entsprechenden SD Agarplatten ausgebracht werden. Nach 2 bis 3, aber spätestens nach 7 Tagen Inkubation bei 32°C sollten Klone sichtbar sein.

4.1.8 Transduktion von *M. xanthus*

Als unspezifische Transduktion bezeichnet man die Übertragung von Bakterien-DNA durch einen virulenten Bakteriophagen. Dabei macht man sich zu Nutze, dass bei der Lyse des Phagen neben der eigenen DNA auch Teile der Wirts-DNA verpackt werden. Solche Phagenpartikel können dann weitere Zellen infizieren, wobei sich die transduzierte bakterielle DNA nicht autonom replizieren, aber durch Rekombination in das Empfänger-Chromosom integrieren kann. Diese Art des DNA-Transfers nutzt man, um bereits durchgeführte und geprüfte Mutationen von einem *M. xanthus* Stamm auf einen anderen zu übertragen.

4.1.8.1 Herstellung des Phagenlysats

Der Donorstamm mit der entsprechenden Mutation wird über Nacht in 10 ml CTT Medium angezogen. Am nächsten Tag werden je 100 µl Zellen in einem sterilen 12 ml Greinerröhrchen mit 100 µl des Phagenlysats gemischt. Man setzt verschiedene Verdünnungen sowie unverdünntes Phagenlysats ein. Ein Röhrchen bleibt frei von Lysat und dient als Kontrolle dafür, dass unter den gewählten Bedingungen bakterielles Wachstum erfolgt. Der Ansatz wird für 20 min bei RT inkubiert und dabei nicht bewegt. Anschließend werden 2,5 ml 0,5%iger CTT Agar hinzugefügt und die ganze Reaktion auf frische ½ CTT Agarplatten mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum plattiert. Die Inkubation erfolgt bei 28°C für ca. 48 h in einer feuchten Kammer. Sind Phagenplaques sichtbar, werden die Platten mit TM Puffer überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wird der Überstand abgenommen, bei 8.000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert und steril filtriert (0,2 µm Millipore Filter). Das Phagenlysats kann nun, mit einem Tropfen Chloroform versehen, in einem Schraubdeckeleppendorfgesäß bei 4°C aufbewahrt werden. Eine Titerbestimmung zur Ermittlung der Qualität des Phagenlysats erfolgt wie oben beschrieben. Nach 48 h Inkubation bei 28°C werden die entstandenen Plaques gezählt und quantifiziert um die effizienteste Verdünnung zu bestimmen.

<u>TM Puffer</u>	Tris-Cl	10	mM
	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	8	mM

4.1.8.2 Transduktion des Rezipientenstamms

Der Rezipientenstamm wird über Nacht in 10 ml CTT Medium angezogen und sollte zur Transduktion eine OD₆₀₀ von 1 haben. Wie unter 4.1.8.1 beschrieben werden 100 µl Zellen mit der zuvor ermittelten optimalen Verdünnung des Phagenlysats gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Zur Kontrolle bleibt ein Ansatz ohne Lysat. Die Reaktionen werden dann mit 2,5 ml 0,5%igem CTT Agar gemischt und auf ½ CTT Agarplatten mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum ausgebracht. Für den Kontrollansatz empfiehlt es sich, eine Hälfte mit Selektionsantibiotikum zu versetzen, um eine spontane Resistenz des Empfängerstamms auszuschließen. Die Inkubation erfolgt bei 34°C. Aufgrund des Selektionsdrucks können nur solche Bakterien wachsen, in deren Chromosom die Fremd-DNA integriert wurde und die entsprechende Resistenz vermittelt. Erste Klone erscheinen meist nach 4 bis 7 Tagen.

4.1.9 Überexpression von Fremdprotein in *E. coli*

In dieser Arbeit wurde zum einen das His₆-tag System der Firma Invitrogen mit den *E. coli* Stämmen GJ1158 (pRSETB:*frzZ*) und BL21(DE3) (pRSETA:*pph1*) verwendet. DNA wird hier unterhalb (*downstream*) und im gleichen Leserahmen (*in frame*) mit einer Sequenz kloniert, die ein N-terminales Fusionspeptid kodiert. Diese Sequenz enthält ein Translations-Initiationscodon (ATG), eine Ribosomen-Bindestelle (RBS) und eine Erkennungssequenz für das Enzym Enterokinase. Außerdem kodiert sie einen Schwanz von sechs Histidinresten, der als Metall-Bindestelle fungiert und es ermöglicht, das rekombinante Protein durch Metall-Affinitätschromatografie zu reinigen. Die Sequenz steht unter Kontrolle eines T7/*lac*-Promotors. Überexpression kann also in *E. coli* Stämmen stattfinden, die ein Gen für das Enzym T7-RNA Polymerase besitzen.

Des Weiteren wurde das *Strep-tag* System der Firma IBA BioTAGnology mit dem *E. coli* Stamm BL21 (pASK-IBA15plus:*frzE*, *frzE*_{Δ*cheY*} und *pph1*) genutzt. Die DNA wird hier mit einem N-terminalen *tag* aus 8 Aminosäureresten gekoppelt, der hohe Affinität zu Streptavidin (*Strep-Tactin*[®]) aufweist und über entsprechende Säulenmatrices gereinigt werden kann. Die IBA-Vektoren tragen den Promotor- und Operator-Bereich des *tetA* Resistenzgens. Im nicht-induzierten Zustand ist der Promotor durch den natürlichen Repressor, der ebenfalls auf den Plasmiden kodiert ist, blockiert und die Gene seines Kontrollbereichs werden nicht abgelesen. Durch die Zugabe von AHT (in DMF) in einer nicht antibiotisch wirksamen Konzentration (bis 200 ng/ml) wird die Transkription induziert.

4.1.9.1 Überexpression von His₆-FrzZ

Zur Überexpression des *response* Regulators FrzZ wird in dieser Arbeit der *E. coli* Stamm GJ1158 verwendet. Hier steht das T7-RNA Polymerase Gen unter Kontrolle des osmosensiblen *proU*-Promotors, der durch Zugabe von NaCl angeschaltet wird. Die so überexprimierten Proteine neigen weniger stark zur Bildung unfunktionaler Aggregate (*inclusion bodies*) (Bhandari and Gowrishankar, 1997). Die Selektion auf positive Transformanten erfolgt durch die Ampicillinresistenz des Klonierungsvektors pRSETB:*frzZ*. Die Zellen werden zunächst in NaCl-freiem LBON Medium angezogen und bei einer OD₆₀₀ von 0,5 durch die Zugabe von NaCl (Endkonzentration: 0,3 M) induziert. Direkt vor der Induktion wird der Kulturen ein Aliquot (0,5 ml) entnommen, um als uninduzierte Kontrolle zum Vergleich zu dem Proteinmuster induzierter Kulturen zu dienen. Die Kulturen werden für 4 h bei 19°C unter Schütteln inkubiert und anschließend durch Zentrifugation für 10 min bei 5.500 rpm und 4°C geerntet. Das Zellsediment wird bei -20°C gelagert oder direkt zur weiteren Bearbeitung verwendet.

4.1.9.2 Überexpression von His₆-Pph1

Zur Überexpression der Phosphatase Pph1 wird in dieser Arbeit der *E. coli* Stamm BL21(DE3) verwendet. Dieser λ DE3-lysogene *E. coli* Stamm trägt das T7-RNA Polymerase Gen unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors, der durch die Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert wird. Übernachtskulturen werden in LB Medium angezogen und die Überexpressionskulturen bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1 induziert. Nach einer Inkubation für 4 h bei 32°C werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet.

4.1.9.3 Überexpression von *Strep*-Pph1, *Strep*-FrzE und *Strep*-FrzE _{Δ CheY}

Zur Überexpression der Phosphatase Pph1, der Kinase FrzE und der C-terminal verkürzten Version der Kinase FrzE _{Δ CheY} wird in dieser Arbeit der *E. coli* Stamm BL21 verwendet. Die Übernachtskulturen werden in LB Medium angezogen und die Überexpressionskulturen bei Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD₆₀₀ 0,5 - 0,8) durch die Zugabe von 200 ng/ml AHT induziert. Nach einer Inkubation von 4 h bei 32°C werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet.

4.1.10 Phänotypische Charakterisierung von *M. xanthus*

4.1.10.1 Schwärmverhalten (*colony expansion assay*) (modifiziert nach Shi and Zusman, 1993)

Um das Schwärmverhalten von *M. xanthus* Zellen zu untersuchen, wird eine exponentiell wachsende Kultur bei 12.500 rpm für 4 min zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet in einem entsprechenden Volumen CYE Medium aufgenommen, um eine OD₆₀₀ von 10 ($\approx 5 \times 10^9$ Zellen/ml) einzustellen. Von dieser konzentrierten Suspension werden 5 μ l auf CYE Agarplatten mit einem Agargehalt von 0,3% oder 1,5% getropft. Der Koloniedurchmesser zum Zeitpunkt t_0 wird fotografisch dokumentiert. Die so betropften Platten werden bei 32°C in einer feuchten Kammer inkubiert, wobei die Softagarplatten (0,3% Agar) nicht invertiert werden können. Nach 5 Tagen wird der Durchmesser der Kolonien erneut bestimmt und der Zuwachs (*expansion*) ermittelt. Die Kolonieausdehnung dient als direktes Maß für die Schwärmfähigkeit des jeweiligen *M. xanthus* Stamms.

4.1.10.2 **Morphologische Differenzierung unter Nährstoffmangelbedingungen**

Um die morphologische Differenzierung einzuleiten, wird eine exponentiell wachsende *M. xanthus* Kultur bei 12.500 rpm für 4 min zentrifugiert. Die pelletierten Zellen werden zweimal mit 1 Vol. CF Medium ohne Nährstoffe gewaschen und in einem entsprechenden Volumen CF Medium aufgenommen, um eine OD₆₀₀ von 10 ($\sim 5 \times 10^9$ Zellen/ml) einzustellen. Von dieser Suspension werden 10 µl auf CF Agarplatten getropft und 5 bis 7 Tage bei 32°C inkubiert. Der Fortgang der Differenzierung wird fotografisch dokumentiert. Sollen die Zellen genutzt werden, um während der Differenzierung Protein oder Gesamt-RNA zu isolieren, wird ein entsprechend größeres Kulturvolumen eingesetzt und genauso behandelt. Zu bestimmten Zeitpunkten werden die Zellen mit einer sterilisierten Rasierklinge von den Platten gelöst, in ddH₂O aufgenommen und bis zur weiteren Behandlung bei -20°C aufbewahrt.

4.1.10.3 **Bestimmung der Sporulationseffizienz**

Um die Sporulationseffizienz eines *M. xanthus* Stamms zu bestimmen, werden die differenzierten Zellen nach 5 bis 7 Tagen mit einer sterilisierten Rasierklinge von den CF Agarplatten gelöst und in 1 ml ddH₂O aufgenommen. Durch die anschließende Inkubation bei 50°C für 1 h und eine Ultraschall-Behandlung mit dem Gerät Bandelin Sonoplus GM70 MS 72 LD (es wird die Sonotrode MS 73 verwendet, wobei einmal für 30 sec bei 30%iger Intensität sonifiziert wird), werden verbliebene vegetative Zellen abgetötet. Die Gesamtsporenanzahl (*total spores, ts*) kann dann durch Auszählen mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt werden. Um die Anzahl an keimungsfähigen Sporen (*colony forming units, cfu*) zu quantifizieren, werden Verdünnungen der Sporensuspension auf CYE Agarplatten ausgebracht und bei 32°C inkubiert. Die durch Keimung entstandenen Kolonien werden nach 5 bis 7 Tagen gezählt. Das Verhältnis von lebensfähigen Sporen zu gebildeten Sporen ist ein Maß für die Sporulationseffizienz des getesteten Stamms.

4.1.10.4 **Typ IV Pili Scherungsassay (*pili shear-off assay*) (modifiziert nach Wu and Kaiser, 1997)**

Um die Typ IV Pili der Zelloberfläche von *M. xanthus* Zellen abzuscheren, wird mit einer sterilen Impföse ca. 50 mg Zellmaterial von relativ frischen CYE Plattenkulturen abgenommen und vorsichtig in 250 µl Tris-Cl (pH 7,4) resuspendiert. Durch Vortexen der Suspension für zweimal 2 min werden die Pili von der Zelloberfläche abgeschert. Durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 20 min bei 4°C werden ganze Zellen und

Zellbruchstücke pelletiert, während die Typ IV Pili im klaren Überstand verbleiben. Dieser Schritt wird einmal wiederholt, um kontaminierendes Zellmaterial sicher von den gescherten Pili abzutrennen. Das Zellpellet wird nun im Ribolyser aufgebrochen und zur Analyse des intrazellulären PilA-Gehalts mittels des *Western Blot* Verfahrens verwendet. Dem klaren Überstand wird MgCl_2 (Endkonzentration: 10 mM) zugegeben. Durch eine Inkubation von 2 h bei 4°C präzipitieren die Pili und können durch eine Zentrifugation mit 14.000 rpm für 15 min und 4°C geerntet werden. Das Präzipitat wird zu Analyse in 15 μl 1x SDS Auftragspuffer aufgenommen, für 5 min bei 95°C inkubiert und dann über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine werden anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen und mit PilA-spezifischem Antikörper detektiert. Für die Analyse der ganzen Zellen wird die Proteinkonzentration des gewonnenen Zellextrakts bestimmt. 30 μg jeder Probe werden mit 1/5 Vol. 5x SDS Auftragspuffer versetzt, gekocht und ebenfalls durch eine SDS-PAGE und einen *Western Blot* analysiert.

4.2 Isolierung und Aufarbeitung von Nukleinsäuren

4.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA (Birnboim and Doly, 1979)

Der Isolierung von Plasmid-DNA liegt das Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) zugrunde. Die Bakterienzellen werden bei alkalischem pH-Wert lysiert. Das eingesetzte SDS (Natriumdodecylsulfat) denaturiert zelluläre Proteine sowie chromosomale DNA und Plasmid-DNA. Durch Zugabe von Kalium Acetat wird die Lösung neutralisiert. Unter den hohen Salzkonzentrationen renaturiert die Plasmid-DNA und kann so von der chromosomalen DNA getrennt werden, die zusammen mit anderen zellulären Bestandteilen durch eine Zentrifugation präzipitiert wird.

4.2.1.1 Plasmid-Minipräparation

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* in einem kleinen Maßstab werden zweimal 1,5 ml einer 5 ml Übernachtskultur bei 13.000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen werden in 100 μl kalter Lösung 1 resuspendiert. Danach werden 200 μl Lösung 2 zugegeben und die Suspension mehrmals invertiert. In dieser Zeit erfolgt die Lyse der Bakterienzellen. Nach Zugabe von 150 μl Lösung 3 wird der Ansatz erneut gemischt und es bildet sich ein weißer Niederschlag. Dieser wird durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 min sedimentiert. Der klare Überstand (ca. 400 μl) enthält die Plasmid-DNA und wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Ihm werden 1/10 Vol. (40 μl) 3 M Natrium Acetat (pH 5,2) sowie 1 ml eiskaltes 100%iges Ethanol zur Fällung

hinzugefügt. Nach einer Zentrifugation bei 13.000 rpm für 20 min wird das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl ddH₂O aufgenommen.

Lösung 1

Glukose	50	mM
Tris-Cl (pH 8,0)	25	mM
EDTA (pH 8,0)	10	mM
autoklavieren; bei 4°C aufbewahren		
vor Gebrauch Zugabe von		
RNase A	0,1	mg/ml

Lösung 2

NaOH	200	mM
SDS	1	%

Lösung 3

Kalium Acetat	3	M
Essigsäure	2	M

4.2.1.2 Plasmid-Midipräparation

Für Klonierungen und zur Sequenzierung müssen größere bzw. reinere Mengen an Plasmid-DNA isoliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte deren Präparation mit Hilfe des E.Z.N.A.[®] *Plasmid Miniprep Kit II* (Classic-Line) der Firma pEQLab gemäß den Angaben des Herstellers.

4.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* erfolgt nach dem „*Yeast Smash and Grab DNA Miniprep*“ Protokoll nach Rose et al., (1990). Zur Aufreinigung der DNA werden zweimal 1,5 ml einer Flüssigkultur abzentrifugiert (13.000 rpm, 1 min, RT). Diesem Pellet werden 0,3 g sterile Glasperlen (Ø 0,1 – 0,11 mm; B. Braun, Melsungen) und 200 µl Hefe Lysepuffer zugefügt. Durch das Zusetzen von 200 µl eines Phenol-Chloroform Gemischs (1:1) und zweiminütiges Vortexen werden die Zellen aufgebrochen. Die Phasentrennung erfolgt durch eine anschließende Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 min. Die DNA befindet sich in der oberen, wässrigen Phase. Sie wird vorsichtig abgenommen, in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und durch eine Ethanolpräzipitation ausgefällt. Nach einmaligem Waschen in 70%igem Ethanol kann die DNA getrocknet und in ddH₂O aufgenommen werden.

<u>Hefe Lysepuffer</u>	Tris-Cl (pH 8,0)	10	mM
	NaCl	100	mM
	EDTA	1	mM
	SDS	1	%
	Triton X-100	2	%

4.2.3 Isolierung von genomischer DNA aus *M. xanthus*

Für die Isolierung genomischer DNA aus *M. xanthus* werden zweimal 1,5 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur bei 12.400 rpm für 4 min abzentrifugiert. Das Pellet wird in 567 µl TE Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 30 µl 10%iger (w/v) SDS-Lösung und 3 µl Proteinase K (Endkonzentration: 0,1 mg/ml) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl 5 M NaCl wird die Lösung gemischt, mit 80 µl warmer CTAB/NaCl Lösung versetzt und für 10 min bei 65°C inkubiert. Es folgt die Zugabe von 180 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und eine Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm. Der klare Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 180 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm wird der klare Überstand erneut in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die Präzipitation der genomischen DNA erfolgt durch die Zugabe von 0,6 Vol. Isopropanol. Die Nukleinsäure kann nun vorsichtig mit der Pipettenspitze entnommen oder durch eine kurze Zentrifugation pelletiert werden. Die DNA wird dann in 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 bis 100 µl ddH₂O aufgenommen.

<u>TE Puffer</u>	Tris-Cl (pH 8,0)	10	mM
	EDTA	1	mM

<u>CTAB/NaCl Lösung</u>	NaCl	2,05	g
	Cetyltrimethylammonium bromid (CTAB)	5	g
	ad 50 ml ddH ₂ O		

4.2.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus *M. xanthus* (modifiziert nach Oelmüller et al., 1990)

Die Arbeitsschritte werden so weit wie möglich auf Eis oder bei 4°C durchgeführt, um den Abbau von mRNA durch zelleigene RNasen zu minimieren. Durch Zentrifugation (12.500 rpm, 4 min) pelletierte vegetative oder differenzierte *M. xanthus* Zellen werden in 1 ml

eiskaltem AE Puffer aufgenommen, mit 20 µl 25%iger (w/v) SDS-Lösung versetzt und in 200 µl heißes Phenol-H₂O überführt. Es folgt eine Inkubation für 10 min bei 60°C unter kräftigem Schütteln, wobei die Zellen aufbrechen. Anschließend erfolgt die Phasentrennung durch eine niedertourige Zentrifugation (8.000 rpm, 15 min, 4°C). Die obere, wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen und mit Natrium Acetat (pH 5,2; Endkonzentration: 200 mM) versetzt. Der Phenolisierungsschritt zur Entfernung von Proteinen wird noch mindestens zweimal wiederholt, bis die wässrige Phase klar ist. Die Präzipitation der Nukleinsäuren erfolgt durch die Zugabe von 2,5 Vol. eiskaltem 96%igem Ethanol und einer Inkubation bei -20°C für mindestens 2 h. Durch eine hochtourige Zentrifugation (13.000 rpm, 30 min, 4°C) werden die gefällten Nukleinsäuren pelletiert, anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur vollständigen Entfernung der DNA wird das Sediment in 200 µl DNase Puffer aufgenommen, mit 25 U RNase-freier DNase I (Fermentas) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt eine zweimalige Phenol/Chloroform Extraktion und eine erneute Ethanolfällung. Die RNA wird nun in 50 µl TE Puffer oder ddH₂O aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die Konzentration der isolierten RNA wird fotometrisch anhand einer 1:300 Verdünnung in ddH₂O bestimmt. Die Qualität der Nukleinsäure kann in einem Agarosegel überprüft werden.

<u>AE Puffer</u>	Natrium Acetat	40	mM
	EDTA	1	mM
	ad 100 ml ddH ₂ O; pH 5,5		

Die RNA wird weiterhin mittels einer PCR-Reaktion auf DNA-Kontaminationen überprüft. Dabei wird 1 µl einer 40 ng/µl Verdünnung in ddH₂O als *template* in eine PCR-Reaktion mit spezifischen *primern* eingesetzt und anschließend auf einem Agarosegel analysiert.

4.2.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt mittels fotometrischer Messung der Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich dabei aus der Absorption, dem Verdünnungsfaktor und einem für jede Nukleinsäure spezifischen Faktor.

Für die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration gilt:

ds DNA	1 A_{260} = 50 $\mu\text{g/ml}$
ss DNA	1 A_{260} = 30 $\mu\text{g/ml}$
RNA	1 A_{260} = 40 $\mu\text{g/ml}$
Oligonukleotide	1 A_{260} = 30 $\mu\text{g/ml}$

(A_{260} = Absorption bei 260 nm)

Aus dem Verhältnis der gemessenen Absorption bei 260 nm und 280 nm erhält man zusätzlich eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäurelösung. Das Verhältnis $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ sollte für DNA 1,8 und für RNA 2 betragen.

4.2.6 Fällung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

4.2.6.1 Ethanolfällung

Nach der Zugabe von Alkohol kommt es in der Gegenwart monovalenter Kationen zur Aggregation gelöster Nukleinsäure-Moleküle, weil deren Löslichkeit durch die Sättigung der negativ geladenen Phosphatgruppen herabgesetzt wird. Die Nukleinsäuren präzipitieren, während niedermolekulare Verbindungen gelöst bleiben. Dadurch lassen sich die Konzentration und die Reinheit der Nukleinsäuren erhöhen. Zur Ethanolpräzipitation wird der Ansatz mit 1/10 Vol. 3 M Natrium Acetat Lösung (pH 5,2) sowie 2,5 Vol. eiskaltem 96%igem Ethanol versetzt und anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren oder 30 min bei -20°C gelagert. Durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C für 15 min werden die Nukleinsäuren pelletiert und können anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen werden. Nach dem Trocknen werden die Nukleinsäuren in ddH_2O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

4.2.6.2 Phenol/Chloroform-Präzipitation

Eine Phenol/Chloroform-Präzipitation wird zur Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen durchgeführt. Dazu wird die Lösung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und gemischt. Zur Verbesserung der Phasentrennung schließt sich eine Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm an. Die obere, wässrige Phase enthält die Nukleinsäuren. Sie wird vorsichtig abgenommen und durch eine Ethanolfällung präzipitiert.

4.2.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente zur Weiterverwendung aus präparativen Agarosegelen zu isolieren, wird das E.Z.N.A.[®] *Gel extraction Kit* (Classic-Line) der Firma pEQLab nach den Herstellerangaben verwendet. Das Prinzip basiert auf der irreversiblen Verflüssigung der Agarose und der Bindung der im Gel befindlichen DNA an das Säulenmaterial. Zunächst müssen die gewünschten Fragmente mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden. Das zum Färben verwendete Ethidiumbromid interkaliert mit der doppelsträngigen DNA, so dass diese sichtbar wird, wenn man die Chemikalie mit langwelligem UV-Licht anregt. Es ist darauf zu achten, die Exposition so kurz wie möglich zu halten, da das UV-Licht die DNA sonst schädigt. Anschließend wird mit Hilfe des *Kits* das gewünschte DNA-Fragment aus der Agarose isoliert. Die so gewonnene DNA kann sofort weiterverwendet oder bei -20°C gelagert werden.

4.2.8 Reinigung von Nukleinsäurefragmenten nach PCR und anderen enzymatischen Modifikationen

Die Reinigung von DNA-Fragmenten nach PCR und anderen enzymatischen Modifikationen erfolgt mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* der Firma Qiagen. Der Reagenziensatz ist für einzel- oder doppelsträngige DNA-Produkte zwischen 100 bp und 10 kbp Größe geeignet. Die im *Kit* enthaltenen Puffer und Säulen werden dabei nach den Angaben der Herstellerfirma verwendet.

Auch für Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung eingesetzt werden soll und nicht über das E.Z.N.A.[®] *Plasmid Miniprep Kit II* (Classic-Line) isoliert wurde, empfiehlt sich eine zusätzliche Reinigung durch den oben beschriebenen Reagenziensatz.

4.3 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

4.3.1 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen katalysieren innerhalb ihrer spezifischen Erkennungssequenz eine hydrolytische Spaltung der DNA, wobei glatte (*blunt*) oder 5'- bzw. 3'-überhängende (*sticky*) DNA-Enden entstehen. Die Restriktion von Plasmid-DNA wird gemäß den Standardvorschriften (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Dabei werden die Reaktionsbedingungen und Enzympuffer entsprechend den Empfehlungen des Herstellers gewählt. Das Erhitzen eines Reaktionsansatzes für 20 min auf 65 bis 80°C gewährleistet meist die Inaktivierung der Restriktionsendonuklease. Die Vollständigkeit der Restriktion wird auf einem Agarosegel überprüft.

4.3.2 Ligation von DNA

Unter Ligation versteht man die Ausbildung einer neuen Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe der Enden zweier linearisierter DNA-Moleküle, katalysiert durch das Enzym T4-DNA Ligase. Für die Aktivierung der Phosphatgruppe benötigt die DNA-Ligase den Cofaktor ATP. Katalysiert werden die Verknüpfung verschiedener DNA-Moleküle (Vektor, *insert*) oder die Zirkularisierung eines linearen DNA-Moleküls (Vektor), wobei das Enzym sowohl überhängende als auch glatte DNA-Enden verbinden kann. Verwendet wurde die T4-DNA Ligase der Firma Fermentas, die nach den Angaben des Herstellers eingesetzt wurde

4.3.2.1 Ligation von PCR-Fragmenten in den Vektor pCR[®]-Blunt II-TOPO

Da eine Restriktion von PCR-Fragmenten an den jeweiligen Enden schwierig ist, kann die Klonierung des ungeschnittenen Fragments in einen speziell dafür konstruierten Vektor hilfreich sein. Der pCR[®]-Blunt II-TOPO Vektor der Firma Invitrogen wurde konstruiert, um gereinigte *blunt-end* PCR Fragmente ohne weitere Vorbehandlung zu integrieren. Des Weiteren sind in dessen Nukleotidsequenz die gängigen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme vorhanden, um das Fragment leicht wieder herauszuschneiden und in den eigentlich vorgesehenen Vektor klonieren zu können. Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit das Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning *Kit* der Firma Invitrogen nach den Angaben des Herstellers verwendet.

4.3.2.2 Herstellung von *blunt-end* DNA-Fragmenten

Zur Herstellung ligierbarer Enden ist es manchmal nötig, nicht kompatible 3'- oder 5'-Enden, die von unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen gebildet wurden, zu entfernen. Das geschieht mit Hilfe des Klenow Fragments der *E. coli* DNA-Polymerase I oder der T4-DNA Polymerase (Sambrook et al., 1989). Beide Enzyme besitzen die Polymerase Aktivität der 5'-3'-DNA-Synthese sowie die 3'-5'-Exonuklease Aktivität, wohingegen die 5'-3'-Exonuklease Aktivität nicht vorhanden ist.

Mit diesen Enzymen können überhängende 5'-DNA-Enden mit Nukleotiden aufgefüllt oder überhängende 3'-Enden abgebaut werden. Die Verwendung beider Enzyme zur Herstellung von DNA-Fragmenten mit *blunt-ends* erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers Fermentas.

4.3.3 Phosphorylierung von DNA

Um die Ligierbarkeit von PCR-Produkten zu erhöhen, werden diese an ihrem 5'-Ende phosphoryliert. Das zu diesem Zweck eingesetzte Enzym T4-DNA Polynukleotidkinase (PNK, Fermentas) katalysiert den reversiblen Transfer der γ -Phosphatgruppe von ATP auf die 5'-Hydroxylgruppe von DNA, aber auch von RNA, Oligonukleotiden oder 3'-Monophosphaten und wurde entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet.

4.3.4 Dephosphorylierung von DNA

Das Enzym Alkalische Phosphatase katalysiert die Freisetzung von terminalen 5'-Phosphatgruppen von DNA, RNA, Ribo- und Desoxyribonukleosid-Triphosphaten. Bei Klonierungen wird dadurch die Rezirkularisierung eines linearisierten Vektors ohne den Einbau von Fremd-DNA minimiert, da diese Phosphatgruppe essentiell für die Ligation ist. Verwendet wurde in dieser Arbeit die Alkalische Phosphatase aus Kälber Intestinum (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, CIAP) der Firma Fermentas, wobei die Behandlung gemäß den Empfehlungen des Herstellers erfolgte.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht auf der enzymatischen Amplifikation von DNA, wobei selbst kleinste Nukleinsäuremengen stark vervielfältigt werden können. Dazu wird das DNA-*template* in sukzessiven Zyklen von Denaturierung (Trennung des Doppelstrangs in die Einzelstränge), *primer annealing* (Hybridisierung zweier komplementärer Oligodeoxynukleotide an die doppelsträngige DNA) und Synthese (DNA-Elongation) exponentiell vervielfältigt. Durch 20 bis 35 Wiederholungen des Zyklus kommt es zu einer exponentiellen Anreicherung der 10^6 - bis 10^7 -fachen Menge des ursprünglichen *templates*, also der Ausgangs-DNA, an der die beiden komplementären *primer* gegenläufig binden können.

Neben *template* und *primer*, welche im Überschuss zugesetzt werden, fügt man dem PCR-Ansatz eine thermostabile DNA-Polymerase (z.B. *Taq* Polymerase aus *Thermus aquaticus* oder *Pfu* Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*), freie dNTPs und die entsprechenden Puffer hinzu. In einem *thermocycler* wird das Reaktionsgemisch einem zyklisch ablaufenden Temperaturprogramm unterworfen. Ein typischer PCR-Ansatz sowie ein Standard-PCR-Programm, wie im Rahmen dieser Arbeit verwendet, setzen sich wie folgt zusammen.

PCR-Reaktionsansatz	DNA- <i>template</i>	1	μl
	5'- <i>primer</i> (50 pmol/μl)	0,6	μl
	3'- <i>primer</i> (50 pmol/μl)	0,6	μl
	10 mM dNTPs	0,6	μl
	DMSO	2,4	μl
	10x Polymerase Puffer	3	μl
	Polymerase (1 U/μl)	1	μl
	ad 30μl ddH ₂ O		

Im Fall des GC-reichen Organismus *M. xanthus* wird der PCR-Reaktion standardmäßig DMSO zugesetzt, um die Spezifität zu steigern und die Amplifikation zu erleichtern. Gerade bei ineffizienten PCRs können die Sensitivität und der Ertrag durch DMSO um das 25-fache gesteigert werden (Wilson et al., 1997).

PCR-Programm		5 min	94°C	Denaturierung des DNA- <i>template</i>
	35x	→	30 sec	94°C Denaturierung des DNA- <i>template</i>
			30 sec	x °C <i>annealing</i> der <i>primer</i>
			0,5 – 2 min	72°C Elongation des Gegenstrangs
			7 min	72°C Abschluss der DNA-Synthese

Die PCR besteht i.d.R. aus 25 bis 50 Zyklen, die *annealing*-Temperatur wird aus der Basenzusammensetzung der *primer* berechnet. Die Synthesezeit richtet sich nach der Länge der zu amplifizierenden DNA (mindestens 1min/1kb). Als Kontrolle wird ein Ansatz ohne *template*-DNA mitgeführt.

4.4.1.1 PCR-Schnelltest zur Selektion rekombinanter *E. coli* Klone

Um schnell und unaufwändig überprüfen zu können, ob *E. coli* Klone das gesuchte *insert* aufweisen, kann ein PCR-Schnelltest durchgeführt werden. Dazu werden Einzelklone mit sterilen Zahnstochern von der Transformationsplatte abgenommen und jeweils in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt. Gleichzeitig streicht man jeden Klon auf einer LB Agarplatte mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (*masterplate*) aus, um im Falle einer positiven PCR-Reaktion weiterhin Zellmaterial zur Verfügung zu haben. Mit *insert*-spezifischen *primern* wird dann eine PCR-Reaktion durchgeführt, um positive Transformanden identifizieren zu können.

4.4.2 *real time* Reverse Transkriptase-PCR (*real time* RT-PCR)

Die *real time* RT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der PCR beruht und als Methode zur Analyse von Genexpressionsmustern genutzt wird. Zunächst wird dabei aus RNA mittels reverser Transkription (RT) cDNA hergestellt. Diese cDNA dient nun als *template* und kann in der anschließenden PCR-Reaktion amplifiziert werden. Bei der *real time* RT-PCR kann man darüberhinaus die Entstehung der Produkte in Echtzeit (*real time*) messen. Dies geschieht durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. *SYBR Green I*) oder Sonden, die in bestimmten Schritten des PCR-Zyklus an die Ziel-DNA binden und in dieser Form Blaulicht der Wellenlänge 480 nm absorbieren. Das Fluoreszenzsignal, der durch die Lichtquelle angeregten Fluoreszenzfarbstoffe, korreliert dabei quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt.

In dieser Arbeit wurde das OneStep RT-PCR *Kit* der Firma Qiagen verwendet, welches es erlaubt, die cDNA-Synthese und die anschließende Amplifikation des *template* in einem Schritt (*one step*) ablaufen zu lassen. Ein typischer Reaktionsansatz sowie ein Standard-*real time* RT-PCR-Programm, wie im Rahmen dieser Arbeit verwendet, setzen sich wie folgt zusammen:

RT-PCR Reaktionsansatz	Gesamt-RNA (40 ng/μl)	1	μl
	5x RT-PCR Puffer	2	μl
	dNTPs (10 mM)	0,4	μl
	5'- <i>primer</i> (10 pmol/μl)	1,2	μl
	3'- <i>primer</i> (10 pmol/μl)	1,2	μl
	RT-PCR Enzyme	0,4	μl
	Q-Solution	2	μl
	RNasin (40 U/μl)	0,1	μl
	<i>SYBR Green I</i> (1:1000)	0,2	μl
	ad 10 μl RNase-freies H ₂ O		

Für die experimentelle Durchführung der *real time* RT-PCR Experimente wurde der *Rotor-Gene 3000 real time PCR cycler* (Corbett Research) verwendet.

RT-PCR Programm	30 min	50°C	reverse Transkription	
	15 min	96°C	Inaktivierung der reversen Transkriptase sowie Aktivierung der <i>HotStartTaq</i> DNA Polymerase	
	x Zyklen	15 sec	96°C	Denaturierung des DNA- <i>template</i>
		20 sec	x °C	<i>annealing</i> der <i>primer</i>
		30 sec	72°C	Elongation des Gegenstrangs
	7 min	72°C	Abschluss der DNA-Synthese	

Die reverse Transkriptase und die *HotStartTaq* DNA Polymerase liegen in einer Mischung vor, wobei die Polymerase während des cDNA-Synthese-Schritts inaktiv ist und erst durch Erhitzen auf 96°C aktiviert wird. Dieser Schritt inaktiviert die reverse Transkriptase und verhindert so, dass weiteres *template* gebildet wird, während gleichzeitig die Amplifizierung und die Quantifizierung stattfinden.

4.4.2.1 Auswertung der *real time* RT-PCR nach Pfaffl (2001)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Analyse der Genexpression die relative Quantifizierung nach Pfaffl (2001) genutzt. Dabei wird die Expression des Ziel-Gens auf die Expression eines nicht regulierten Referenzgens (*housekeeping gene*) normalisiert. In derselben RNA-Probe wird die Expression beider Gene erfasst und die ermittelten Werte des Zielgens werden relativ zu seiner internen Kontrolle angegeben. Dies ist nötig, um PCR-spezifische Störfaktoren, wie z.B. Unterschiede in der RNA-Ausgangsmenge oder Fehler bei der cDNA-Synthese, verlässlicher korrigieren zu können. Die Berechnung der relativen Expression erfolgt nach Pfaffl (2001) mit folgender Formel:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Ziel}})^{\Delta \text{CP}_{\text{Ziel}}(t_0 - t_x)}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta \text{CP}_{\text{Ref}}(t_0 - t_x)}}$$

Dabei gilt: E = Effizienz der *real time* RT-PCR für das Ziel- bzw. das Referenzgen

CP = *crossing point*, Anzahl der PCR-Zyklen die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen; wird als Zyklenzahl der PCR angegeben und kann frei gewählt werden; sollte innerhalb der exponentiellen Phase der Reaktion liegen

t = CP zum Zeitpunkt t_0 bzw. t_x

Idealerweise ist das Referenzgen nicht reguliert, d.h. die CPs zu t_0 und t_x sind gleich und heben sich in der Berechnung auf. Der Nenner entspricht dann einem Wert von 1 und die berechnete Ratio ist nur von den Expressionsunterschieden des Zielgens abhängig.

Es stehen verschiedene *housekeeping* Gene zur Verfügung, wie beispielsweise das *rpoZ*-Gen, welches eine Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase kodiert. Verschiedene Studien zeigten jedoch, dass auch die Expression dieser Referenzgene aktiv reguliert wird und deshalb variieren kann (Vandecasteele et al., 2001; Eleaume and Jabbouri, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch trotzdem das *rpoZ*-Gen als Referenz genutzt. Seine Expression wurde zuvor unter den individuellen Bedingungen des jeweiligen Experiments geprüft.

Für die Bestimmung der Effektivität der PCR Reaktion wird eine Standardkurve aus unterschiedlichen Endkonzentrationen der Gesamt-RNA (8 ng, 4 ng, 2 ng, 0,8 ng, 0,4 ng, und 0,2 ng) erstellt. Aus deren Steigung wird die Effizienz der Reaktion durch die *Rotor-Gene 4.6* Software bestimmt.

4.4.3 Western-Analyse von Proteinen (*Western Blot*)

Zu den empfindlichsten immunologischen Verfahren zum Nachweis bestimmter Proteine zählt der so genannte *Western Blot*. Die Proteine werden zunächst über ein Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und dann mit Hilfe einer Semi-Trocken-*Blot* Apparatur auf eine Membran übertragen. Der Transfer erfolgt bei 0,8 mA/cm² in Transferpuffer. Auf diese Membran kann nach dem Absättigen der reaktiven Gruppen der erste Antikörper gegeben werden, der das gesuchte Protein hochspezifisch erkennt. Durch Waschen werden nicht gebundene Reste dieses ersten Antikörpers entfernt und ein zweiter Antikörper, konjugiert mit einem Enzym wie Alkalischer Phosphatase oder Meerrettichperoxidase, wird zugegeben. Dieser erkennt und bindet den ersten Antikörper. Durch die Zugabe eines Substrates, das von dem konjugierten Enzym des zweiten Antikörpers umgesetzt wird, entstehen auf der Höhe der detektierten Proteinbanden unlösliche, stabil gefärbte Produkte oder Chemilumineszenz, die detektiert werden können.

<u>Transferpuffer</u>	Tris-Cl (pH 9,2)	48	mM
	Glycin	39	mM
	SDS	0,0375	%
	Methanol	20	%
	ad 500 ml ddH ₂ O		

4.4.3.1 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

Die PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid Membran Immobilon P, Roth) wird entsprechend der Angaben des Herstellers vorbereitet und nach erfolgtem Transfer über Nacht in Tris-PM Puffer bei 4°C abgesättigt. Die Detektion des gesuchten Proteins erfolgt durch die Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper (1:10.000, in Tris-PM) für 2 h bei RT. Es schließen sich ein Waschschrift für 30 min in Waschpuffer und die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (1:10.000, in Tris-PM) an. Dann wird die Membran nochmals für 30 min gewaschen und mit einer 1:1 Mischung der Detektionslösungen ECL1 und ECL 2 für 2 min bedeckt. Diese Mischung enthält das Substrat Luminol, welches durch das konjugierte Enzym des zweiten Antikörpers umgesetzt wird. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol in Gegenwart von H₂O₂, so dass Licht auf der Höhe der detektierten Proteine emittiert wird. Diese Chemilumineszenz wird durch die Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

<u>Tris-PM Puffer</u>	Tris	20	mM
	NaCl	250	mM
	auf pH 7,5 einstellen		
	Milchpulver immer frisch zugeben	95,8	g/l
<u>Waschpuffer</u>	Tween-20	0,1	%
	in Tris-PM Puffer		
<u>ECL 1</u>	Tris-Cl (pH 8,5)	100	mM
	Luminol (in DMSO)	2,5	mM
	Paracoumarinsäure	0,4	mM
<u>ECL 2</u>	Tris-Cl (pH 8,5)	100	mM
	H ₂ O ₂	5,4	mM

4.4.3.2 Transfer von *Strep-tag* Proteinen auf eine PVDF-Membran

Um Proteine mit einem *Strep-tag* zu detektieren wird nach den Angaben der Firma IBA BioTAGnology verfahren. Nach erfolgtem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wird PBS-*blocking* Puffer verwendet, um die Membran abzusättigen. Am nächsten Tag erfolgt die Detektion des gesuchten Proteins, indem die Membran zunächst dreimal für 5

min mit PBS-Tween Puffer gewaschen wird. Nun wird die Membran für 2 h mit dem *Streptactin horse radish peroxidase*-Konjugat (1:4.000, in PBS-Tween) inkubiert und anschließend zweimal für 1 min in PBS-Tween Puffer und zweimal für 1 min in 1x PBS gewaschen. Die Detektion erfolgt auch hier durch das Bedecken der Membran mit einer 1:1 Mischung der beiden ECL-Lösungen und die Visualisierung der Chemilumineszenz per Röntgenfilm.

<u>1x PBS</u>	KH ₂ PO ₄	4	mM
	Na ₂ HPO ₄	16	mM
	NaCl	115	mM
	auf pH 7,4 einstellen		

<u>PBS-blocking Puffer</u>	BSA	3	%
	Tween-20	0,5	%
	in 1x PBS		

<u>PBS-Tween Puffer</u>	Tween-20	0,1	%
	in 1x PBS		

4.4.3.3 *strippen* der PVDF-Membran

Um die PVDF-Membran für eine weitere Detektion mit einem anderen ersten Antikörper verwenden zu können, müssen die bereits gebundenen Antikörperkonjugate zunächst abgelöst werden (*strippen*). Dies geschieht, indem der *Blot* für ca. 45 min in der *stripping*-Lösung bei 60°C unter Schütteln inkubiert wird. Die Membran wird dann dreimal für 5 min in TBST und anschließend zweimal für 5 min in ddH₂O gewaschen, um verbliebenes β-Mercaptoethanol wieder zu entfernen. Dieses würde sich störend auf die anschließende Detektion auswirken, die erneut mit dem Absättigung der reaktiven Gruppen beginnt.

<u>TBST</u>	Tris	50	mM
	NaCl	150	mM
	Tween-20	20	%

<u>stripping-Lösung</u>	Tris-Cl (pH 6,8)	62,5	mM
	SDS	2	%
	β-Mercaptoethanol	100	mM

4.4.4 Nachweis radioaktiv markierter Reaktionsprodukte (Phospho *Imaging*)

Mit Hilfe des Phospho *Imaging*-Systems können radioaktiv markierte Reaktionsprodukte sichtbar gemacht werden. Die elektrophoretisch aufgetrennten Reaktionsgemische werden dazu in Form eines Gels oder einer *Western Blot* Membran auf speziellen *Imaging* Platten (*phospho imaging screens*) exponiert, die ca. 250-mal sensitiver gegenüber β -Strahlung als Röntgenfilme sind. Diese bestehen aus einer Schicht von radiosensitiven Phosphorkristallen, die auf einer Polyesterplatte aufgezogen sind. Nach der Exposition wird die Platte von einem Analysator (*Personal Molecular Imager®FX*) eingelesen, der die Veränderung des Ladungszustandes der Platte messen und durch die entsprechende Software graphisch darstellen kann.

4.5 Biochemische und physikalische Methoden

4.5.1 Gelelektrophorese

4.5.1.1 Agarosegele zur DNA-Analyse

Die Konzentration der Agarose im Gel variiert in Abhängigkeit der Größe der aufzutrennenden DNA zwischen 1% und 2% (w/v). Die benötigte Menge an Agarose wird in dem entsprechenden Volumen 1x TBE Puffer aufgeköcht, bis sie sich vollständig gelöst hat. Anschließend wird die flüssige Agarose in einen rechteckigen Flachbettschlitten gegossen und bis zum vollständigen Erstarren bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die aufzutrennenden Proben werden mit 1/5 Vol. DNA Auftragspuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard werden 3 μ l 1 kb-Größenmarker (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas) mit auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt in 1x TBE-Puffer bei einer Stromstärke von ca. 50 mA (Spannung von ca. 150 V). Anschließend wird das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 μ g EtBr/ml H₂O) gefärbt, unter UV- Licht betrachtet und fotografiert.

<u>5x DNA Auftragspuffer</u>			
	Harnstoff	4	M
	Saccharose	50	%
	EDTA	50	mM
	Bromphenolblau	0,1	%
	Xylencyanol	0,1	%
	in ddH ₂ O; pH 7,0		

<u>10× TBE Puffer</u>	Tris	108	g
	Borsäure	55	g
	EDTA	18,6	g
	ad 1000 ml ddH ₂ O		

4.5.1.2 **SDS-Polyacrylamidgele zur Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)**

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) ist die am weitesten verbreitete Elektrophoresetechnik für Proteine. Die Trennung erfolgt vorwiegend nach dem Molekulargewicht, da das anionische Detergenz SDS die Proteine denaturiert und ihnen eine negative Oberflächenladung verleiht. Die hohe Trennschärfe wird durch die Diskontinuität dieser Technik erreicht. Das weitmaschigere Sammelgel dient der Aufkonzentrierung der Proben, während das engmaschigere Trenngel zum gewünschten Sieb- oder Trenneffekt führt. Der prozentuale Anteil an Acrylamid bestimmt den Vernetzungsgrad des Gels und somit dessen Trennleistung.

Die Elektrophorese wird in vertikalen Gelkammern der Firma BioRad mit einer Gelgröße von 10,2 cm × 7,3 cm durchgeführt. Zur Herstellung der Plattengele werden die Glasplatten und die Abstandhalter mit 70%igem Ethanol gereinigt, zusammengebaut und in einem BioRad Gelkammerhalter eingespannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hauptsächlich 12%ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet, die sich wie folgt zusammensetzen:

<u>12%iges Trenngel</u>	Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	4	ml
	Trenngelpuffer	2,5	ml
	ddH ₂ O	3,3	ml
	SDS (10 %)	0,1	ml
	APS (10%)	0,1	ml
	TEMED	0,004	ml
<u>Trenngelpuffer</u>	Tris-Cl (pH 8,8)	1,5	M

Nach dem Gießen des Trenngels wird dieses mit 1-Butanol überschichtet, um eine glatte Gelkante zu erhalten. Ist das Gel polymerisiert wird der Alkohol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen.

<u>5%iges Sammelgel</u>	Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	0,67	ml
	Sammelgelpuffer	0,5	ml
	ddH ₂ O	2,7	ml
	SDS (10%)	0,04	ml
	APS (10 %)	0,04	ml
	TEMED	0,004	ml
<u>Sammelgelpuffer</u>	Tris-Cl (pH 6,8)	1	M

Ist auch das Sammelgel vollständig polymerisiert, werden die Proteinproben mit 1/5 Vol. Auftragspuffer versetzt und vor dem Auftragen 5 min bei 95°C inkubiert. Der Gellauf erfolgt mit einer Stromstärke von 80 mA für das Sammelgel und 150 mA für das Trenngel in 1x Tris-Glycin Puffer.

<u>5x SDS-PAGE</u>	Glycerin	0,5	ml
<u>Auftragspuffer</u>	Bromphenolblau (0,1 %)	0,3	ml
	SDS (10 %)	0,4	ml
	β-Mercaptoethanol	0,2	ml
	4x Sammelgelpuffer	0,25	ml
	ad 2 ml ddH ₂ O		
<u>10x Tris-Glycin Puffer</u>	Tris	250	mM
<u>SDS-PAGE</u>	Glycin	1,92	M
(Laemmli, 1970)	SDS	1	%

4.5.1.3 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Um Proteinbanden in Polyacrylamidgelen sichtbar zu machen, wird die sensitive Methode der Silberfärbung angewendet. Diese beruht auf der Reaktion von Silbernitrat mit Proteinen unter sauren Bedingungen, gefolgt von einer Reduktion der Silberionen zu metallischem Silber durch Formaldehyd unter alkalischen Bedingungen. Die reaktiven Proteingruppen sind nach allgemeiner Auffassung die freien Amine und die Schwefelgruppen. Die Silberfärbung führt dabei zu braunen, schwarzen, gelben oder orange-farbenen bis roten Banden. Dies ist auf Brechungseffekte an verschiedenen großen Silberpartikeln zurückzuführen.

Zunächst wird das Polyacrylamidgel für mindestens 30 min in der Fixier-Lösung inkubiert. Anschließend wird es zweimal für je 10 min in 50%igem Ethanol gewaschen und dann 1 min in Thiosulfat-Lösung geschwenkt. Um überschüssiges Thiosulfat zu entfernen, wird das Gel nun dreimal für jeweils 5 sec mit H₂O gewaschen und dann für 15 min in frisch angesetzter Silbernitrat-Lösung inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit H₂O wird das Gel bis zum Erreichen der gewünschten Bandenintensität in der Entwickler-Lösung geschüttelt. Die Färbung wird dann durch Zugabe der Stop-Lösung beendet.

<u>Fixierer</u>	Methanol	50	%
	Essigsäure	12	%
	Formaldehyd	0,5	ml/l
<u>Thiosulfat-Lösung</u>	Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O	0,2	g/l
<u>Silbernitrat-Lösung</u>	AgNO ₃	0,2	g/100 ml
<u>Entwickler</u>	Na ₂ CO ₃	60	g
	Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O Lösung	20	ml
	Formaldehyd	0,5	ml
	ad 1000 ml ddH ₂ O		
<u>Stop-Lösung</u>	EDTA	50	mM

4.6 Proteinanalytik

4.6.1 Zellaufschlussmethoden

Für die Aufreinigung der in *E. coli* überexprimierten Proteine sowie zur Analyse der Akkumulation von Proteinen in *M. xanthus*, wird ein cytoplasmatischer Proteinextrakt der jeweiligen Zellen benötigt. Alle Arbeitsschritte werden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt, um den Proteinabbau zu minimieren.

4.6.1.1 Zellaufschluss per Ultraschall

Für den Zellaufschluss von *E. coli* Zellen zur chromatografischen Aufreinigung überexprimierter Proteine, werden die Zellen wie unter Punkt 4.1.9 beschrieben behandelt. Das Zellpellet wird in 2 bis 5 ml des jeweiligen Zellaufbruchpuffers (siehe 4.6.5

und 4.6.6) resuspendiert. Nach der Zugabe von Lysozym (in ddH₂O) in einer Konzentration von 1 mg/ml wird die Suspension für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt der Zellaufbruch mit Hilfe des Ultraschallgeräts Bandelin Sonoplus GM70 MS 72 LD (es wird die Sonotrode MS 73 verwendet, wobei dreimal für 60 sec bei 70%iger Intensität sonifiziert wird). Nach dem ersten Puls wird der Zellsuspension der Proteaseinhibitor PMSF in einer Konzentration von 0,1 mM zugesetzt. Zur Sedimentation von Zellbruchstücken und nicht aufgebrochenen Zellen schließt sich eine Zentrifugation bei 10.000 rpm für 15 min und 4°C an. Der klare Überstand enthält die löslichen Proteine und wird auf Eis oder bei -20°C zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

<u>PMSF (100 mM)</u>	PMSF	0,1742	g
	ad 10 ml 96%igen Ethanol		

4.6.1.2 Zellaufschluss im Ribolyser

Der Zellaufbruch geringer Zellmengen von *M. xanthus* Zellen erfolgt unter Anwendung des Ribolysers (Hybaid AGS, Heidelberg). Die Zellen werden zunächst durch eine Zentrifugation bei 12.500 rpm für 4 min pelletiert. Der Zellaufbruch erfolgt durch die Zugabe von 1 Vol. Glasperlen (\varnothing 0,1 – 0,11 mm; B. Braun, Melsungen) und 50 bis 200 μ l Zellaufbruchpuffer, abhängig von der Größe des Zellpellet. So präpariert werden die Zellen im Ribolyser fünfmal 5 sec mit drei Wiederholungen bei einer Stärke von 6,5 aufgebrochen. Nach dem ersten Zyklus setzt man den Proben den Proteaseinhibitor PMSF in einer Konzentration von 0,1 mM zu und kühlt die Ansätze zwischendurch auf Eis. Nach dem Zellaufbruch werden die Proben bei 13.000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der klare Überstand enthält die löslichen Proteine und wird auf Eis oder bei -20°C zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

<u>M. xanthus</u>	Tris-Cl (pH 7,5)	50	mM
<u>Zellaufbruchpuffer</u>	EDTA	1	mM
	MnCl ₂	5	mM
	MgCl ₂	5	mM
	Benzamidin	1	mM

4.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen - der Bradford Assay (Bradford, 1976)

Mit Hilfe der colorimetrischen Bestimmung nach Bradford (1976) lässt sich die Proteinkonzentration einer Lösung bestimmen. Diese Methode basiert auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurer Lösung an Proteine. Dadurch verschiebt sich deren Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm, so dass schon wenige µg Protein nachgewiesen werden können. Die Konzentration lässt sich dabei aus einer Eichkurve ablesen, die zuvor mit Proteinlösungen definierter Konzentrationen angelegt worden ist. Zur Messung werden 800 µl H₂O und 1 bis 5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung in einer 1 ml Einwegküvette vorgelegt. Diesem Ansatz werden 200 µl Bradford Reagenz (Roti Quant) beigemischt. Nach zehnmütiger Inkubation hat sich eine stabile Färbung der Probe eingestellt und die Absorption des Farbreagenz bei 595 nm wird gemessen.

4.6.3 Fällungs- und Konzentrierungsmethoden für Proteine

4.6.3.1 Ammoniumsulfatfällung

Die Ammoniumsulfatfällung kann zur Konzentrierung einer Proteinlösung und zur Anreicherung eines gewünschten Proteins eingesetzt werden (Pingoud und Urbanke, 1997). Einer Proteinlösung wird dabei im Eisbad unter Rühren portionsweise festes, fein zerriebenes Ammoniumsulfat hinzugegeben, bis die gewünschte Konzentration des Reagenz in der Lösung erreicht ist. Nach ca. 30 min Inkubation auf Eis kann der Fällungsansatz bei 15.000 rpm und 0 bis 4°C abzentrifugiert werden. Der Überstand wird vorsichtig dekantiert und der Niederschlag in einem entsprechenden Volumen an Puffer resuspendiert.

4.6.3.2 TCA-Fällung

Die Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA) ist eine sehr effiziente, aber irreversible Fällungsmethode. Dazu wird ein bestimmtes Volumen an Proteinlösung mit TCA in einer Endkonzentration von 10% versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Lösung mit 11.000 rpm für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Das farblose Pellet kann nun in einem entsprechenden Volumen an Puffer aufgenommen werden.

4.6.3.3 Dialyse

Das Prinzip der Dialyse basiert auf einer Veränderung des Milieus, in dem sich die Proteine befinden. Dabei werden niedermolekulare Komponenten ausgetauscht oder aus

der Lösung entfernt, wie z.B. Ammoniumsulfat aus Fällungsansätzen. Zu diesem Zweck werden semipermeable Membranen mit definierter Porengröße verwendet. Durch diese können Proteine aufgrund ihrer Größe/ihres Molekulargewichts nicht hindurch, während anorganische Salze und niedermolekulare Verbindungen diffundieren können. In dieser Arbeit wurden *ZelluTrans* Dialyseschläuche der Firma Roth verwendet, die zur Konzentrierung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von mehr als 3500 kDa geeignet sind. Der gefüllte Dialyseschlauch wird in einen Behälter mit dem 100-fachen Vol. des entsprechenden Puffers gelegt und unter leichtem Rühren für 12 bis 24 h bei 4°C belassen. Zur Konzentrierung von Proteinlösungen wird gegen einen Puffer dialysiert, der zu ca. 50 % aus Glycerin besteht, um der Probe Wasser zu entziehen.

4.6.3.4 Konzentrierung durch Mikrokonzentratoren

Ein Mikrokonzentrador dient der Konzentrierung von Lösungen mit einem Volumen von maximal 2 ml. Dieser Methode liegt das Prinzip der Ultrazentrifugation der Lösung durch eine Membran zugrunde, deren Poren nur Moleküle unterhalb einer bestimmten Größe (Ausschlussvolumen, *cut-off* in kDa) passieren können. Größere Moleküle werden zurückgehalten und somit konzentriert. Die in dieser Arbeit verwendeten Mikrokonzentratoren der Firma Centricon haben ein Ausschlussvolumen von 50 kDa, die der Firma Vivaspin ein Ausschlussvolumen von 3 kDa. Beide Produkte wurden entsprechend der Herstellerempfehlungen eingesetzt.

4.6.4 Proteinfractionierungsmethode (modifiziert nach Matsuzaki et al., 1996)

Um einen Zellextrakt weiter in die periplasmatische, die cytoplasmatische und die partikuläre Fraktion aufzutrennen, werden 50 ml einer exponentiell wachsenden *M. xanthus* Kultur durch eine Zentrifugation bei 12.000 rpm für 5 min geerntet. Alle weiteren Schritte finden auf Eis oder bei 4°C statt, um einen Abbau der zellulären Proteine zu verhindern. Das Pellet wird zunächst in 2,5 ml Saccharose Puffer aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Durch die hohe Osmolarität der Lösung und das vorhandene EDTA wird die äußere Membran der Zellen instabil und permeabilisiert. Dabei bleiben die Sphaeroblasten intakt, während die periplasmatischen Proteine austreten. Diese verbleiben nach einer Zentrifugation bei 10.000×g für 10 min im klaren Überstand und werden vorsichtig abgenommen. Die Sphaeroblasten werden nun in 500 µl Tris-Cl Puffer resuspendiert und durch eine Ultraschall-Behandlung aufgebrochen (unter Verwendung der Sonotrode MS 73, mit 90%iger Arbeitsleistung für 15 sec). Verbliebene Zelltrümmer

werden durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min abgetrennt. Um die partikuläre Fraktion von der cytoplasmatischen Fraktion zu trennen, wird der resultierende Überstand einer Ultrazentrifugation (1 h bei 58.000 rpm) unterzogen. Die pelletierten Membranbestandteile werden zur anschließenden Analyse in 200 µl Tris-Cl Puffer gelöst. Die Lagerung der zellulären Fraktionen erfolgt bei -20°C.

<u>Saccharose Puffer</u>	Tris-Cl	50	mM
	EDTA	1	mM
	Saccharose	500	mM
<u>Tris-Cl Puffer</u>	Tris-Cl (pH 7,5)	50	mM
	EDTA	1	mM
	PMSF	1	mM

4.6.5 Chromatografische Proteinaufreinigungsmethoden

Chromatografie ist ein Verfahren, das die Auftrennung eines Stoffgemischs durch die unterschiedliche Verteilung seiner Einzelbestandteile zwischen einer stationären und einer mobilen Phase erlaubt. Aufgrund der Wechselwirkungen der Probe mit der stationären Phase und der mobilen Phase werden die einzelnen Komponenten unterschiedlich schnell weitertransportiert und können somit voneinander getrennt werden. Anhand der Natur dieser Wechselwirkungen unterscheidet man verschiedene Arten der Chromatografie, wie die Affinitäts- und die Ausschlusschromatografie.

Bei der Affinitätschromatografie wird für jeden Analyten eine spezifische chemische Verbindung als stationäre Phase eingesetzt, die aufgrund nicht-kovalenter Kräfte eine Trennung bewirkt. Im Gegensatz dazu beruht die Ausschlusschromatografie auf einem Siebeffekt, indem man als ruhende Phase Stoffe verwendet, welche die Komponenten der mobilen Phase an Hand ihrer Größe trennen.

4.6.5.1 ***Strep-Tactin* Affinitätschromatografie**

Überexpressionsproteine, die mit einem *Strep-tag* versehen sind, können durch ihre Affinität zu *Strep-Tactin*, einem stabilen Streptavidin-Derivat, aus einem komplexen Gemisch gereinigt werden (siehe auch *Expression and purification of proteins using Strep-tag and/or 6xHistidine-tag – a comprehensive manual*, Mai 2005, IBA BioTAGnology). Die Überexpression der entsprechenden Fusionsproteine erfolgt dabei wie unter Punkt 4.1.9.3 beschrieben.

Die Zellen werden per Ultraschall aufgebrochen und die so gewonnenen Extrakte nach den Angaben der Firma IBA BioTAGnology aufgereinigt. Verwendet wurden vorgepackte *Strep-Tactin* Sepharose[®] Säulchen mit einem Fassungsvermögen von 0,2 ml.

<u>Zellaufbruchpuffer</u> für <i>Strep-Pph1</i>	Tris-Cl (pH 8,0)	100	mM
	NaCl	150	mM
	Benzamidin	1	mM
<u>Waschpuffer</u>	Tris-Cl (pH 8,0)	100	mM
	NaCl	150	mM
	MgCl ₂	10	mM
	EDTA (pH 8,0)	1	mM
<u>Elutionspuffer</u>	Tris-Cl (pH 8,0)	100	mM
	NaCl	150	mM
	MgCl ₂	10	mM
	EDTA (pH 8,0)	1	mM
	Desthiobiotin (pH 8,0)	2,5	mM

4.6.5.2 Ni²⁺-Affinitätschromatografie

Bei dieser Form der Affinitätschromatografie werden in *E. coli* überexprimierte und mit einem *tag* aus 6 Histidinresten versehene Proteine spezifisch über ihre Interaktion mit dem Säulenmaterial der vorgepackten Protino[®] Ni-TED 2000 Säulen der Firma Macherey-Nagel gereinigt (siehe auch *Purification of Polyhistidine-Tagged Proteins*, April 2006, Rev. 03, Macherey-Nagel). Die Überexpression erfolgt dabei wie unter Punkt 4.1.9 beschrieben. Die Zellen werden per Ultraschall aufgebrochen und die so gewonnenen Extrakte nach den Angaben der Firma Macherey-Nagel aufgereinigt, wobei die verwendeten Puffer für jedes der gereinigten His-*tag* Proteine modifiziert wurden.

Nach dem Waschen der Säule mit je 4 ml Waschpuffer erfolgt die Elution der spezifisch gebundenen Proteine in Schritten von je 1,5 ml Volumen. Dabei wird die Proteinkonzentration jeder Fraktion mit Hilfe des Bradford Assay verfolgt. Dieser Vorgang wird fortgesetzt, bis keine quantifizierbaren Mengen an Protein mehr von der Säule eluieren.

Reinigung von His₆-FrzZ

<u>Zellaufbruchpuffer</u>	Tris-Cl (pH 8)	50	mM
<u>(1x LEW)</u>	NaCl	150	mM
	β-Mercaptoethanol	30	mM
<u>Waschpuffer</u>	Imidazol	20	mM
	in 1x LEW (FrzZ ZAP)		
<u>Elutionspuffer</u>	Imidazol	50 - 500	mM
	in 1x LEW (FrzZ ZAP)		

Reinigung von His₆-Pph1

<u>Zellaufbruchpuffer</u>	Tris-Cl (pH 7,5)	50	mM
<u>für His₆-Pph1</u>	NaCl	50	mM
	EDTA	1	mM
	EGTA	0,1	mM
	DTT	2	mM
	Benzamidin	1	mM
<u>Waschpuffer</u>	NaCl	100	mM
	MgCl ₂	10	mM
	in His ₆ -Pph1 Zellaufbruchpuffer		
<u>Elutionspuffer</u>	NaCl	250 mM – 2 M	
	MgCl ₂	10	mM
	in His ₆ -Pph1 Zellaufbruchpuffer		

Für das rekombinante Protein His₆-Pph1 schließt sich an die Reinigung durch Ni²⁺-Affinitätschromatografie ein weiterer Reinigungsschritt in Form einer Gelfiltration an. Aus diesem Grund wurden die Elutionsfraktionen der Protino[®] Ni-TED 2000 Säulen vereinigt und die Proteine durch die Zugabe von Ammoniumsulfat (80% Sättigung) gefällt. Das Präzipitat wurde durch eine Zentrifugation pelletiert und in Gelfiltrationspuffer gelöst.

4.6.5.3 Ausschlusschromatografie (Gelfiltration)

Alle Arbeiten werden bei 4°C an der *BioLogic Workstation* (Bio-Rad) durchgeführt. Fraktionen werden durch den Fraktionskollektor Model 2/28 (Bio-Rad) gesammelt. Dabei gemessene Daten, wie der auftretende Druck in der Säule und die Absorption der mobilen Phase bei einer OD von 280 nm, werden gesammelt und durch das Computerprogramm *BioLogic HR Chromatography System* (Bio-Rad) verwaltet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Gelfiltrationssäule Superdex 200 HR 10/300 der Firma Amersham Pharmacia Biotech genutzt. Als stationäre Phase wird hier Dextran verwendet, das kovalent mit Agarose von einem hohen Vernetzungsgrad verknüpft ist.

Alle Puffer, die bei der Gelfiltration verwendet werden, werden per Filtration durch einen Sterilfilter (Nalgene) mit einer Porengröße von 0,45 µm von Verunreinigungen gesäubert und anschließend entgast.

Eichung der Gelfiltrationssäule

Zunächst muss die Gelfiltrationssäule Superdex 200 HR 10/300 geeicht werden, um verlässliche Angaben über den Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht und dem Elutionsvolumen eines Proteins machen zu können. Zu diesem Zweck werden Standardansätze in je 500 µl Gelfiltrationspuffer gelöst (siehe Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Eichung der Gelfiltrationssäule Superdex 200 HR 10/300. In dieser Tabelle sind die Standardproteine, ihr Molekulargewicht und die zur Eichung eingesetzte Konzentration angegeben.

Standard	Molekulargewicht (Da)	eingesetzte Konzentration
Thyroglobulin (<i>bovine</i>)	670.000	2 mg/ml
BSA	66.000	8 mg/ml
Ovalbumin (<i>chicken</i>)	44.000	2,5 mg/ml
Carboanhydrase	29.000	2 mg/ml
Myoglobin (<i>horse</i>)	17.000	5 mg/ml
Vitamin B ₁₂	1.350	0,1 mg/ml

Zur Eichung wurde die Säule mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min betrieben und mit Gelfiltrationspuffer äquilibriert. Als erstes wurde Thyroglobulin auf die Säule aufgetragen, um das Ausschlussvolumen zu ermitteln. Im zweiten Lauf wurden

BSA und Ovalbumin geladen und im dritten Lauf dienten Carboanhydrase, Myoglobin und Vitamin B₁₂ als Standard. Eine Eichgerade wird erstellt, indem man das Elutionsvolumen des jeweiligen Proteins in Bezug zu seinem Molekulargewicht setzt.

Gelfiltration von His₆-Pph1

Nach der Eichung der Gelfiltrationssäule wird die Ammoniumsulfat-gefällte Probe auf die Superdex 200 HR 10/300 Säule aufgetragen und mit einer Flussrate von 0,4 bis 0,8 ml/min mit Gelfiltrationspuffer eluiert. Es werden Fraktionen von 250 µl oder 500 µl Vol. gesammelt, die später durch die Auftrennung über eine 12%ige SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung und durch enzymatische Aktivitätstests untersucht werden.

<u>Gelfiltrationspuffer</u>			
	Tris-Cl (pH 7,5)	10	mM
	NaCl	150	mM
	MgCl ₂	5	mM
	EDTA	0,5	mM
	DTT	10	mM
	ε-Aminocaprinsäure	1	mM
	Glycerin	5	%
	TWEEN-20	0,05	%

4.6.6 Präparation von Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) (nach McCleary and Zusman, 1990b; Acuna et al., 1995)

Bei der Überexpression von Fremdprotein in *E. coli* Zellen werden gelegentlich sphaerische Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) gebildet, in denen das Protein in der Regel vollständig synthetisiert, aber nur partiell gefaltet vorliegt. Der Bildung von *inclusion bodies* kann normalerweise durch die Wahl geeigneter Expressionsbedingungen entgegengewirkt werden. Da im Falle der Kinase FrzE aber bereits ein Protokoll zur Aufreinigung des Proteins aus Einschlusskörperchen veröffentlicht ist, schien der Aufwand, ein individuelles Reinigungsprotokoll für lösliches Protein zu entwickeln, unangebracht. Außerdem zeigten Versuche, *Strep*-FrzE über den Affinitäts-*tag* zu reinigen, dass die gebildete Menge an Kinase einen erheblichen Teil des Gesamtproteins der Zelle ausmacht. Demnach wird in diesem Fall durch die Bildung der Einschlusskörperchen eine beträchtliche Konzentrierung des Proteins erreicht.

Die Überexpression der Kinase erfolgt wie unter 4.1.9.3 beschrieben. Das Zellpellet wird in Zellaufbruchpuffer resuspendiert und per Ultraschall aufgebrochen. Durch eine

anschließende Zentrifugation für 10 min bei 9.000 rpm und 4°C werden ganze Zellen, Zelltrümmer und *inclusion bodies* sedimentiert. Das Pellet wird nun dreimal in je 5 ml Puffer A gewaschen, um Membranbestandteile zu solubilisieren. Die freigesetzten Einschlusskörperchen werden durch eine Zentrifugation bei 10.000 rpm für 10 min und 4°C gewonnen und in 4 ml Puffer B aufgenommen. Zur vollständigen Lyse der Aggregate wird die Suspension für 2 h auf Eis inkubiert und immer wieder invertiert. Durch eine Zentrifugation bei 16.000 rpm für 20 min bei 4°C werden verbliebene, nicht gelöste Aggregate abgetrennt. Die Proteinkonzentration des Überstandes wird mit Hilfe des Bradford Assay fotometrisch bestimmt. Zur Renaturierung der Proteine wird das ionische Detergenz GndHCl (Guanidinium Hydrochlorid) durch eine anschließende Dialyse gegen 500 ml Puffer C entfernt, wobei das Dialysat in Puffer C ohne Glycerin auf eine Konzentration von 2 mg/ml eingestellt wird. Die Dialyse erfolgt über Nacht, der Dialysepuffer wird einmal gewechselt. Hat sich doch ein Präzipitat im Dialyseschlauch gebildet, wird dieses abzentrifugiert und verworfen. Der klare Überstand wird aliquotiert und bei -20°C für kürzere Zeiträume oder bei -80°C aufbewahrt.

<u>Zellaufbruchpuffer</u>	Tris-Cl (pH 8)	100	mM
	NaCl	150	mM
	Benzamidin	1	mM
<u>Puffer A</u>	HEPES (pH 7,2)	10	mM
	EDTA	5	mM
	Triton X-100	0,1	%
<u>Puffer B</u>	HEPES (pH 7,2)	50	mM
	GndHCl	6	M
<u>Puffer C</u>	HEPES (pH 7,2)	10	mM
	MnCl ₂	10	mM
	MgCl ₂	10	mM
	DTT	1	mM
	Glycerin	50	%

4.6.7 Herstellung von Antikörpern gegen das His₆-FrzZ Protein

Die Herstellung polyklonaler Antikörper in Kaninchen, gegen das Protein FrzZ aus *M. xanthus*, erfolgte durch die Firma Pineda Antikörperservice, Berlin. Zu diesem Zweck wurde das überexprimierte, rekombinante His₆-FrzZ Wildtyp Protein mittels Ni²⁺-Affinitätschromatografie unter nativen Bedingungen bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die Proteinreinheit und Konzentration wurde durch Auftrennung mittels einer SDS-PAGE verfolgt und fotometrisch mit Hilfe des Bradford Assay kontrolliert. 300 µg des gereinigten Proteins wurden der Firma Pineda Antikörperservice zur wiederholten Immunisierung eines Kaninchens übersendet, dessen Präimmenserum zuvor auf unspezifische Reaktionen gegen *M. xanthus* Zellextrakt getestet wurde. Nach Erhalt der Antikörper wurde deren Spezifität und optimale Arbeitskonzentration mittels *Western Blot* Analyse gegen *M. xanthus* Zellextrakt sowie gegen gereinigtes FrzZ Protein bestimmt.

4.6.8 Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

Mit Hilfe der Co-Immunopräzipitation können Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wird an Sepharose immobilisiertes Protein-A aus *Staphylococcus aureus* genutzt, das mit hoher Affinität Antikörper (in erster Linie den Fc-Anteil des IgG) vieler Spezies bindet. Mit dieser Art der Affinitätschromatografie können Antikörper aus Seren und, über die Kopplung der Antikörper an die immobilisierte Sepharose, Proteinen aus komplexen Gemischen aufgereinigt werden. Liegt das Protein dabei mit anderen Proteinen assoziiert vor, werden diese co-präzipitiert.

4.6.8.1 Vorbereitung der Protein-A-Sepharose

Zunächst wird der Antikörper (anti-FrzZ, aus Kaninchen) durch das Reagenz Dimethylpimelimidat (DMP) kovalent an die Protein-A-Sepharose gekoppelt. Dazu werden 0,3 g Protein-A-Sepharose (CL-4B, Amersham) in 1 ml 1x PBS für 2 h bei RT auf einem Drehrad zum Quellen inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 30 sec mit 10.000×g wird der Überstand vorsichtig entfernt. Die Sepharose wird nun mit 1 ml Antiserum vermischt und erneut für 1 h bei RT auf dem Drehrad inkubiert. Durch eine Zentrifugation bei 10.000×g für 30 sec wird die Sepharose pelletiert und nachfolgend dreimal mit 10 ml 0,2 M Natriumborat (pH 9,0) gewaschen. Im Anschluss wird das Säulenmaterial in 10 ml einer Natriumborat (pH 9,0)/20 mM DMP-Lösung aufgenommen und für 30 min bei RT auf dem Drehrad inkubiert. Die Kopplungsreaktion wird durch die Zugabe von 0,2 M Ethanolamin (pH 8,0) in einer zweistündigen Inkubation beendet. Die mit Antikörper gekoppelte

Protein-A-Sepharose (*beads*) wird nun einmal mit 10 ml 1x PBS und anschließend mit 5 ml Glycin (pH 3,0) gewaschen, um nicht-kovalent gebundene Antikörper zu entfernen. Durch erneutes drei- bis viermaliges Waschen mit 1x PBS wird der pH-Wert wieder neutralisiert. Anschließend wird die Sepharose in 2 ml 1x PBS aufgenommen und mindestens eine Nacht bei 4°C gelagert.

1x PBS	KH ₂ PO ₄	4	mM
	Na ₂ HPO ₄	16	mM
	NaCl	115	mM
	auf pH 8,0 einstellen		

4.6.8.2 Co-IP mit *M. xanthus* Zellextrakten

Im Rahmen dieser Arbeit sollten durch Co-IP Interaktionspartner des *response* Regulators FrzZ identifiziert werden. Als Ausgangsmaterial für eine Co-Immunopräzipitation dienen exponentiell wachsende Flüssigkulturen (200 ml), die durch eine Zentrifugation bei 12.500 rpm für 5 min geerntet werden. Zur Präparation des Zellextraktes werden die Pellets in einem möglichst kleinen Volumen Co-IP Zellaufbruchpuffer resuspendiert und mit Hilfe des Ultraschallgeräts Bandelin Sonoplus GM70 MS 72 LD aufgebrochen (es wird die Sonotrode MS 73 verwendet, wobei dreimal für 60 sec bei 70%iger Intensität sonifiziert wird). Zur Sedimentation von Zellbruchstücken und nicht aufgebrochenen Zellen schließt sich eine Zentrifugation bei 15.000 rpm für 15 min und 4°C an.

200 µl der mit Antikörper gekoppelte Protein-A-Sepharose werden zunächst dreimal mit 1 ml Co-IP Zellaufbruchpuffer gewaschen und dann mit 1 ml des Proteinextraktes gemischt und für 2 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach der Sedimentation der *beads* durch Zentrifugation mit 10.000×g bei 4°C für 30 sec wird der Überstand abgenommen. Durch zehnmaliges Waschen mit je 1 ml Co-IP Zellaufbruchpuffer werden unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Die Elution der spezifisch gebundenen Proteine erfolgt durch zehnmaliges Waschen der *beads* mit 0,1 M Glycin (pH 1,8). Jede Elutionsfraktion wird durch Zugabe von ca. 1/10 Vol. Tris-Cl (pH 8,5) neutralisiert. Je 20 µl der einzelnen Wasch- und Elutionsfraktionen werden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Silberfärbung des Gels untersucht.

<u>Co-IP Zellaufbruchpuffer</u>	Tris-Cl (pH 7,5)	50	mM
	MgCl ₂	5	mM
	MnCl ₂	5	mM
	EDTA	1	mM
	Benzamidin	1	mM

4.6.8.3 Immunopräzipitation (IP) mit gereinigtem His₆-FrzZ

Um die Spezifität des an die Protein-A-Sepharose gekoppelten Antikörpers zu testen, wurde eine Immunopräzipitation mit affinitätschromatografisch gereinigtem His₆-FrzZ Protein durchgeführt. Zu diesem Zweck werden 200 µl *beads* dreimal mit je 1 ml His₆-FrzZ Zellaufbruchpuffer, dem Imidazol (100 mM) zugesetzt ist, gewaschen. Anschließend wird die vorbehandelte Protein-A-Sepharose mit 500 µl His₆-FrzZ E/N (≈ 120 µg Protein) für 2 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach der Sedimentation der *beads* werden unspezifisch gebundene Proteine durch zehnmaliges Waschen mit je 1 ml His₆-FrzZ Zellaufbruchpuffer + 100 mM Imidazol entfernt. Die Elution der spezifisch gebundenen Proteine erfolgt durch zehnmaliges Waschen mit je 0,1 M Glycin (pH 1,8). Jede Elutionsfraktion wird durch Zugabe von ca. 1/10 Vol. Tris-Cl (pH 8,5) neutralisiert, bevor 20 µl der einzelnen Wasch- und Elutionsfraktionen über eine SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung des Gels analysiert werden.

4.6.9 Enzymatische Analytik

Die hier beschriebenen Methoden zur Analyse enzymatischer Aktivität beruhen auf der fotometrischen Detektion der katalysierten Umsetzung eines Substrates durch das Enzym.

4.6.9.1 Quantitativer β-Galaktosidase Assay (*S. cerevisiae*)

Dieser Assay wird im Rahmen der Hefe Zwei-Hybrid Analyse genutzt, um die Interaktion zweier Proteine anhand der Aktivität des Enzyms β-Galaktosidase quantifizieren zu können. Die Proteine sind auf zwei Plasmiden kodiert und entweder mit der DNA-Bindedomäne (BD) des Transkriptionsaktivators Gal-4 oder mit dessen Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert. Interagieren die beiden Proteine miteinander, gelangen AD und BD in räumliche Nähe und die Transkription bestimmter Reportergene, wie z.B. des *lacZ*-Gens, wird angeschaltet.

Vorselektionierte *S. cerevisiae* Kulturen, die sowohl den AD- als auch den BD-Vektor tragen, werden über Nacht in SD Medium angezogen. Am Tag des Experiments wird ein

Teil der Kultur in 3 ml YPAD Medium überführt und 3 bis 5 h bei 32°C unter Schütteln (140 rpm) inkubiert. Sobald die Kulturen eine OD_{600} von 0,5 bis 0,8 erreicht haben, werden zweimal 1,5 ml bei 13.000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 1 ml Puffer Z gewaschen, erneut zentrifugiert und in 150 μ l Puffer Z aufgenommen (20-fach konzentriert). Um die Zellen aufzubrechen, werden 100 μ l Suspension in ein neues Eppendorfgefäß überführt, zunächst für 1 min in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und dann bei 37°C wieder aufgetaut. Dieser Zyklus wird insgesamt dreimal wiederholt. Als Leerwert für die anschließende fotometrische Messung werden zwei zusätzliche Reaktionsgefäße mit je 100 μ l Puffer Z bereitgestellt. Zu allen Ansätzen werden dann 700 μ l Puffer Z + β -Mercaptoethanol gegeben. Die Zeitmessung startet mit der Zugabe von 160 μ l ONPG-Lösung. Aktive β -Galaktosidase hydrolysiert das Lactosederivat ONPG (*o*-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid) zu gelb gefärbten *ortho*-Nitrophenol und Galaktose. Die Reaktionsgefäße werden solange bei 30°C inkubiert, bis sich eine Gelbfärbung einstellt. Als Positivkontrollen dienen Hefe-Klone, welche die beiden interagierenden Proteine p53 und das SV40 T-Antigen co-exprimieren. Diese Proben färben sich innerhalb von 30 bis 60 min gelb, während die Färbung schwächerer Interaktionen bis zu 24 h dauern kann. Um die Reaktion zu beenden, werden den Ansätzen je 0,4 ml 1 M Na_2CO_3 zugesetzt. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min. Der Überstand wird in Küvetten überführt und die Absorption bei 420 nm wird fotometrisch bestimmt.

Die Enzym-Aktivität der β -Galaktosidase berechnet sich in Miller-Einheiten (Miller, 1972). Eine Einheit ist dabei definiert als die Menge an Enzym, die pro Minute 1 μ mol ONPG hydrolysiert. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\beta\text{-Galaktosidase Einheiten} = \frac{1000 \times OD_{420}}{(t \times V \times OD_{600})}$$

Dabei gilt:

- t = Inkubationszeit (min)
- V = eingesetztes Kulturvolumen (0,1 ml) \times Konzentrationsfaktor
- OD_{600} = OD_{600} von 1 ml Kultur

4.6.9.2 Phosphatase-Aktivitätsmessung - der pNPP-Test

Zur Bestimmung der Phosphataseaktivität wird eine direkte optische Messung der Umsetzung des Substrats p-Nitrophenylphosphat (pNPP) herangezogen, das für viele Phosphatasen als Substrat dienen kann (Mackintosh, 1993). Durch die katalysierte Abspaltung eines Phosphatrestes von pNPP entsteht das chromogene p-Nitrophenolat-

Ion. Die Akkumulation dieses Reaktionsprodukts im Reaktionsansatz kann aufgrund der intensiven gelben Färbung bei 400 nm fotometrisch detektiert werden.

Wenn alle Einstellungen vorgenommen sind und das Fotometer auf den enzymfreien Leerwert als Ausgangspunkt der Umsetzung eingestellt ist, wird die Reaktion durch die Zugabe der Proteinprobe gestartet. Die Absorption wird bei 400 nm über 10 min verfolgt. Die *Swift Applications software* von Pharmacia Biotech speichert und verarbeitet die gewonnenen Daten, so dass die Umsetzung von pNPP im Spektralfotometer direkt verfolgt und für jeden Reaktionsverlauf die Steigung mit der höchsten Linearität berechnet werden kann.

Reaktionsansatz	2x pNPP-Puffer	500	µl
	MnCl ₂	5	mM
	pNPP	5	mM
	ad 1000 µl ddH ₂ O		
<u>2x pNPP-Puffer</u>	Tris-Cl (pH 8,0)	40	mM
	NaCl	80	mM
	DTT	4	mM
<u>pNPP (50 mM)</u>	pNPP	0,1856	g
	ad 10 ml ddH ₂ O		

4.6.10 *In vitro* ³²P-Markierung von Proteinen

Durch eine *in vitro* Phosphorylierung in Gegenwart von [γ -³²P]ATP (Hartmann Analytics, Braunschweig) wurden die gereinigten, rekombinanten Formen der Kinase FrzE aus *M. xanthus* (*Strep*-FrzE und *Strep*-FrzE_{ΔCheY}) mit radioaktivem Phosphor markiert und so die Phosphorylierung der Proteine detektierbar gemacht.

Reaktionsansatz	5x Reaktionspuffer	1/5	Vol.
	[γ - ³² P]ATP	5	µCi
	<i>Strep</i> -FrzE und/oder <i>Strep</i> -FrzE _{ΔCheY}	10	µM
	ad 30 µl ddH ₂ O		

<u>5× Reaktionspuffer</u>	HEPES (pH 7,2)	250	mM
	MgCl ₂	50	mM
	MnCl ₂	50	mM
	DTT	0,5	mM

Jeder Ansatz wird mindestens 15 min bei RT inkubiert und dann mit 1/5 Vol. 5x SDS EDTA Auftragspuffer versetzt, um die Reaktion zu stoppen. Die Proben werden ohne vorherige Inkubation bei 95°C über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wird dann zunächst für 15 bis 30 min in Fixierer gelagert und anschließend auf 5 Lagen Whatmann Papier (3 mm, Roth) unter Vakuum getrocknet. Das Gel wird in eine Kassette überführt und auf einer *Imaging* Platte (*phospho imaging screen*) exponiert. Diese wird nach ca. 12 h von einem Analysator (*Personal Molecular Imager®FX*) eingelesen und ausgewertet.

<u>Fixierer</u>	Methanol	10	%
	Essigsäure	40	%
	in ddH ₂ O		

<u>5× SDS EDTA</u>	Tris-Cl (pH 8,6)	62,5	mM
<u>Auftragspuffer</u>	EDTA	150	mM
	SDS	12,5	%
	β-Mercaptoethanol	5	%
	Glycerin	62,5	%
	Bromphenolblau	0,1	%
	in ddH ₂ O		

4.6.11 **Synthese von Phosphat-Donatoren zur artifiziellen Phosphorylierung von His₆-FrZZ**

In Abwesenheit der korrespondierenden Kinase kann ein *response* Regulator auch unter Nutzung der Phosphorylgruppe niedermolekularer Verbindungen, sogenannter *small molecular weight phospho donors*, autophosphorylieren (Lukat et al., 1992). Um eine Phosphorylierung sichtbar zu machen, können die entsprechenden Substanzen unter Verwendung von [³²-P]Phosphat synthetisiert werden, so dass entsprechend phosphorylierte Proteine durch das *Phospho Imaging* Verfahren detektiert werden können.

4.6.11.1 **Synthese von Acetyl [³²-P]Phosphat nach McCleary und Stock (1994) und *in vitro* Phosphorylierung von His₆-FrzZ**

Acetyl [³²-P]Phosphat wurde nach dem Protokoll von McCleary und Stock (1994) synthetisiert. Alle beschriebenen Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Zunächst werden in einem 12 ml Reaktionsgefäß folgende Komponenten miteinander durch Rühren vermischt:

Reaktionsansatz	Pyridin	240	µl
	K ₂ HPO ₄ (2 M)	63	µl
	H ₃ [³² -P]PO ₄	500	µCi
	ad 387 µl ddH ₂ O		

Diesem Ansatz werden dann langsam 27,5 µl Essigsäureanhydrid zugegeben. Nach einer zweiminütigen Inkubation werden der Reaktion 108 µl LiOH (4 M) zugesetzt, um den Ansatz nach einer weiteren Inkubation von 3 min zu gleichen Teilen auf 6 *safe-lock* Eppendorfreaktionsgefäße zu verteilen. Um das Acetyl [³²-P]Phosphat aus der Lösung zu fällen, werden nachfolgend in jedes Gefäß 958,3 µl eiskaltes 100%iges Ethanol gegeben. Nach einer Inkubation auf Eis für 1 h kann das Präzipitat durch Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min, 4°C) pelletiert werden. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem 70%igem EtOH wird das Pellet zunächst in 125 µl ddH₂O aufgenommen.

Um das Acetyl [³²-P]Phosphat von phosphorylierten Kontaminationen zu reinigen, werden jeder Reaktion erneut 58,3 µl eiskaltes 100%iges EtOH zugesetzt. Nach einer Inkubation von 15 min kann das Präzipitat durch eine Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min, 4°C) geerntet und anschließend unter Vakuum getrocknet werden. Jedes Pellet wird in einem Volumen von 200 µl 100 mM Tris-Cl (pH 7,0) aufgenommen.

Zur Phosphorylierung von His₆-FrzZ wird folgender Reaktionsansatz genutzt:

Reaktionsansatz	10x Reaktionspuffer	1/10	Vol.
	Acetyl [³² -P]Phosphat	4	µl
	His ₆ -FrzZ	10	µg
	ad 20 µl ddH ₂ O		
<u>10x Reaktionspuffer</u>	Tris-Cl (pH 7,0)	500	mM
	MgCl ₂	50	mM
	DTT	5	mM

Jeder Ansatz wird mindestens 15 min bei 37°C inkubiert und dann durch die TCA-Fällung des Proteinanteils gestoppt. Das so gewonnene Pellet wird in 20 µl 1x Reaktionspuffer aufgenommen. Die spezifische Aktivität des gelösten Pellet und des Überstandes wird in Zerfällen/min (*cpm*, *counts per million*) in einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Für das synthetisierte Acetyl [³²-P]Phosphat konnten 866,10 *cpm* (+/- 4,81%) pro µl Lösung gemessen werden.

4.6.11.2 Erfassung der radioaktiven Markierung mit Hilfe des Flüssigkeitsszintillationszählers

Beim radioaktiven Zerfall eines instabilen Isotops wird normalerweise die freiwerdende Energie zunächst auf das Lösungsmittel übertragen, welches die Energie an einen Szintillator, wie 2,5-Diphenyloxazol (PPO), weitergibt. Fällt dieser aus seinem angeregten Zustand zurück in seine stabile Form, gibt er die Energie als Licht einer Wellenlänge ab, die von der Photozelle im Zählgerät registriert werden kann. Die eingegangenen Impulse werden addiert und die Summe nach Ablauf der Zählzeit ausgedruckt. Die Energieübertragung vom zerfallenen Atom bis zur Photozelle erfolgt mit einem 99,5%igen Energieverlust.

Für ³²P ist eine Radioaktivitätsmessung aufgrund der Cerenkov-Strahlung auch ohne die Zugabe eines Szintillators möglich. Die zu untersuchenden, mit Acetyl [³²-P]Phosphat markierten Proben wurden in einem Flüssigkeitsszintillationszähler der Firma Beckmann unter Verwendung des ³²P-Programms vermessen. Es wurde die Anzahl der gemessenen Zerfälle (*cpm*, *counts per minute*) pro eingesetztes Volumen bestimmt.

4.6.11.3 Synthese von [³²-P]Phosphoramidat nach Buckler und Stock (2000) und *in vitro* Phosphorylierung von His₆-FrzZ

Nach Buckler und Stock (2000) werden zur Synthese von radioaktiv-markiertem Ammoniumhydrogen-Phosphoramidat [(NH₄)H³²PO₃NH₂] zunächst bei RT 50 mg Diammoniumphosphat in einem 1,5 ml *safe-lock* Eppendorfreaktionsgefäß in 175 µl ddH₂O gelöst. Zu dieser Lösung werden nun 8,1 mCi radioaktive Orthophosphorsäure und 75 µl Ethylisocyanat zugesetzt. Das Reaktionsgefäß wird dicht verschlossen und dann aufrecht bei 30°C unter Schütteln (100 rpm) inkubiert. Nach 1 h Inkubation werden dem Reaktionsansatz vorsichtig 400 µl konzentriertes Ammoniumhydroxyd (28% w/v) zugegeben. Diese Lösung muss mit tropfgeschützten Pipettenspitzen pipettiert werden, um das Auslaufen des Reagenz zu verhindern. Das erneut dicht verschlossene Reaktionsgefäß wird nun für weitere 2 h bei 50°C aufrecht unter Schütteln inkubiert und

dann kurz entlüftet. Alle weiteren Arbeiten finden bei 4°C statt. Zunächst wird durch eine Inkubation von 30 min bis zu 1 h das Orthophosphat-Nebenprodukt präzipitiert, welches dann durch eine Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min) abgetrennt werden kann. Der Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und durch die schrittweise Zugabe von Eisessig auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Eisessig gefriert bei 4°C und muss in einem Wasserbad auf RT gehalten werden. Durch die Anhebung des pH-Werts präzipitiert das Produkt Ammoniumhydrogen-Phosphoramidat und kann nach 1 h durch Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min) geerntet werden. Das Pellet wird dann viermal mit je 400 µl eiskaltem Methanol gewaschen und anschließend unter Vakuum getrocknet. Durch Auswiegen wird das Gewicht des Pellet bestimmt, das dann in einem entsprechenden Volumen ddH₂O aufgenommen wird, um eine Konzentration von 0,5 M zu erhalten. Das theoretische Molekulargewicht von (NH₄)H³²PO₃NH₂ beträgt 114,05 g/mol.

Zur Phosphorylierung von His₆-FrzZ wird nach Buckler und Stock (2000) folgender Reaktionsansatz genutzt:

Reaktionsansatz	(NH ₄)H ³² PO ₃ NH ₂	50	mM
	His ₆ -FrzZ	5	µg (≈ 6,7 µM)
	MgCl ₂	5	mM
	MnCl ₂	5	mM
	ad 20 µl ddH ₂ O		

Jeder Ansatz wird mindestens 2 h bei 37°C inkubiert und dann durch die Zugabe von 5 µl 5x SDS Auftragspuffer gestoppt. Zur Dephosphorylierung werden der Reaktion 10 µl (5 µg ≈ 5,2 µM) der durch Ni²⁺-Affinitätschromatografie und Gelfiltration gereinigten His₆-Pph1 zugesetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 1 h bei 37°C wird auch diese Reaktion durch die Zugabe von 1/5 Vol. 5x SDS Auftragspuffer gestoppt. Die Analyse der Proteine erfolgt durch die Auftrennung über eine SDS-PAGE. Radioaktiv phosphorylierte Proteine werden durch die Exposition des getrockneten Gels auf einer *Imaging* Platte (*phospho imaging screen*) sichtbar gemacht. Diese wird nach ca. 12 h von einem Analysator (*Personal Molecular Imager®FX*) eingelesen und ausgewertet.

5 ERGEBNISSE

Der ungewöhnliche *response* Regulator FrzZ ist Teil des so genannten *frz*-Systems aus *Myxococcus xanthus*, das an der Regulation der Zellumkehrfrequenz und damit an der gerichteten Bewegung von *M. xanthus* Zellen beteiligt ist (Blackhart and Zusman, 1985b; Trudeau et al., 1996). Aufgrund der Homologie der *frz*-Genprodukte zu Proteinen enterobakterieller Chemotaxissysteme wurde für das *M. xanthus* System eine ähnliche Funktion vorhergesagt (zur Übersicht McBride et al., 1993). Viele der transduzierten Signale und die Signalweitergabe innerhalb des *frz*-Systems sind bisher aber noch genauso unbekannt wie die Interaktionspartner, die unterhalb des *frz*-Systems in der Signalkaskade liegen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zum Einen die Funktion des FrzZ-Proteins im *frz*-System genauer untersucht und neue Interaktionspartner des ungewöhnlichen *response* Regulators identifiziert und charakterisiert werden. Weiterhin sollte die potenzielle Interaktion mit der Ser/Thr Phosphatase Pph1, die bereits früher gezeigt wurde (Treuner-Lange et al., 2001), genauer analysiert werden.

5.1 Funktion des FrzZ-Proteins *in vivo*

5.1.1 Komplementationsanalyse in *M. xanthus*

Um Informationen über die *in vivo* aktive Form des FrzZ-Proteins zu erhalten, wurden Komplementationsanalysen in *M. xanthus* Stämmen mit verschiedenen Gendefekten durchgeführt. Da bisher noch keine Plasmide identifiziert wurden, die selbständig in diesem Organismus replizieren können, muss die entsprechende DNA-Sequenz zur Komplementation in das Chromosom integriert werden. Zu diesem Zweck nutzt man die *attP-attB* vermittelte Rekombination, bei der sogenannte *attP*-Plasmide ortsspezifisch integrieren (Magrini et al., 1999). Dieser Prozess wird durch das Enzym Integrase des Myxophagen Mx8 katalysiert, das auf *attP*-Plasmiden durch das *int*-Gen kodiert wird. Im Chromosom von *M. xanthus* findet man zwei nahe beieinander liegende Bereiche, *attB1* und *attB2*, in die eine Integration bevorzugt in Ersteren stattfindet. Es entsteht ein lineares Prophagen-Chromosom mit zwei endständigen Wirts-Phagen-Verbindungen (*attL* und *attR*). Die so gebildeten Merodiploide sind stabiler als solche, die durch homologe Rekombination entstanden sind (Magrini et al., 1999). Allerdings wird durch diese Art der Rekombination ein Cluster von drei Genen (*trnD2*, *trnD1* und *trnV*) unterbrochen, die tRNAs der Aminosäuren Aspartat (D) und Valin (V) kodieren, wobei in *M. xanthus* bisher kein erkennbarer Phänotyp festgestellt werden konnte (Li and Shimkets, 1988).

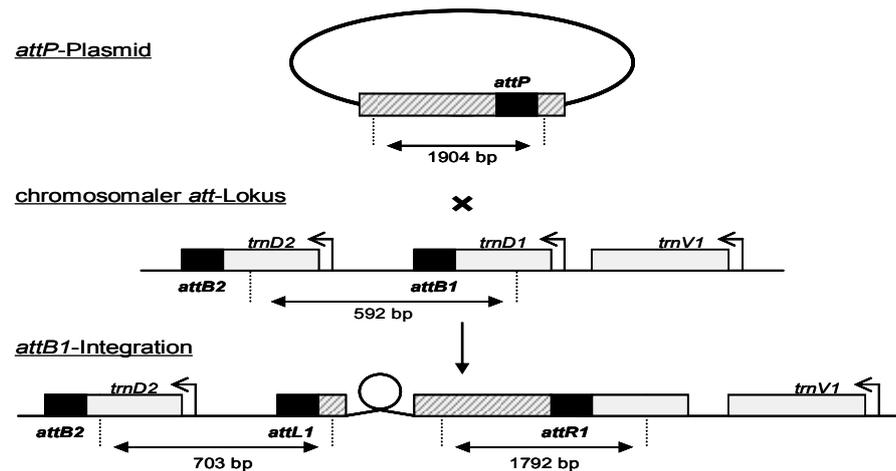


Abbildung 5.1: Model der Integration des Myxophagen Mx8 in den *attB1*-Lokus des *M. xanthus* Chromosoms und deren Nachweis durch PCR mit spezifischen Oligonukleotiden. Durch Amplifikation mit je einem chromosom- und einem plasmidspezifischen *primer* (*attB1* + *attPR*, *attR1* + *attPF*) entstehen ein 703 bp und ein 1792 bp großes Fragment. Das 1904 bp Fragment der *att*-Sequenz des Vektors (*attPR* + *attPF*) sowie das 592 bp große Fragment des chromosomalen *att*-Lokus (*attB1* + *attR1*) lassen sich bei einer Integration nicht mehr amplifizieren.

5.1.1.1 Konstruktion des Vektors pSWU30:*pro-frzZ*

Zunächst wurde das *frz*-Wildtypgen unter Kontrolle seines natürlichen Promotors in den *attP*-Vektor pSWU30 kloniert. Durch eine PCR-Reaktion (*Pfu* Polymerase, Fermentas), unter Verwendung der *primer* *frzZpro+2* und *frzZstopSall* und dem *Sall* verdauten Cosmid 3B5 als *template*, konnte ein 975 bp großes Fragment amplifiziert werden. Dieses *blunt-end* Fragment wurde über die *SmaI*-Schnittstelle in den Vektor pSWU30 ligiert und in den *E. coli* Stamm JM109 transformiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB Agarplatten mit Oxytetracyclin ausgebracht, um über die entsprechende Resistenz des Vektors auf positive Transformanden zu selektionieren. Die so entstandenen Kolonien wurden durch einen PCR-Schnelltest mit verschiedenen *frzZ*-spezifischen *primer*-Kombinationen (*frzint1* mit *frzint2r*, *frzZpro+2* mit *frzint2r*) überprüft. Von Klonen, die in diesem Test die entsprechenden Signale von 151 bp bzw. 398 bp Größe zeigten, wurde die Plasmid-DNA isoliert. Durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym *SphI* konnte dann die richtige Orientierung der Insertion des *frzZ*-Gens in pSWU30 überprüft werden.

Auch zur anschließenden Sequenzierung der Plasmid-DNA eines Klons wurden die internen *primer* *frzint1* und *frzint2r* genutzt, die in einem Abstand von 151 bp an die *frzZ*-Nukleotidsequenz binden und den Klon als richtig identifizierten. Eine Sequenzierreaktion, die zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt wurde und den Übergang des Genfragments in den Vektor überprüfen sollte, zeigte allerdings ein fehlerhaftes 3'-Ende des *frzZ*-Gens. Durch eine Verschiebung des Leserahmens wurde das native Stopcodon

nicht mehr als solches erkannt und überlesen. Wie in *Western Blot* Analysen gezeigt werden konnte, war das resultierende Genprodukt instabil und deshalb nicht in der Lage, den Phänotyp der DZ2Δ*frzZ* Mutante zu komplementieren (Daten nicht gezeigt).

5.1.1.2 **Konstruktion von pSWU30:*pro-frzZ* WTneu, E/E, E/N, N/N, N/E, D52N und D220N**

Um nicht nur die Komplementation durch die Wildtypform des *frzZ*-Gens, sondern auch die Wirkung der mutagenisierten Varianten (Gröger, 2002) in einem *frzZ* Hintergrund untersuchen zu können, wurde das Plasmid pSWU30:*pro-frzZ* zunächst mit *EcoRI* und *XhoI* verdaut. *XhoI* erkennt eine Stelle innerhalb der *frzZ*-Sequenz, wohingegen *EcoRI* einmalig in pSWU30 schneidet. Dadurch wurde ein 983 bp großes Fragment entfernt. Dieselbe Strategie wurde auf die Überexpressionsplasmide pRSETB:*frzZ* WT, E/E, E/N, N/N, N/E, D52N und D220N angewendet. Die so gebildeten Fragmente von 765 bp Länge schlossen die wichtigen Aspartatreste der Positionen 52 und 220 des *frzZ*-Gens mit ein und wurden in den vorbereiteten *attP*-Vektor kloniert. In den vier doppelt-mutagenisierten Plasmiden waren die phosphorylierbaren Aspartatreste beider Domänen des *frzZ*-Genprodukts in der vorangegangenen Diplomarbeit zu Glutamat (E) oder Asparagin (N) ausgetauscht worden (Gröger, 2002). Wie für den *response* Regulator NtrC beschrieben, sollte eine Glutamat-Substitution eine Phosphorylierung simulieren, während ein Austausch zu Asparagin dies verhindern sollte (Klose et al., 1993). Im Falle der beiden *single-site* Mutanten pRSETB:*frzZ* D52N und D220N unterband die Asparagin-Substitution dagegen nur die Modifikation der veränderten Domäne, so dass im gesamten Protein eine funktionelle *active-site* zur Verfügung stand.

Die so konstruierten Plasmide, sowie der leere Vektor pSWU30, konnten per Elektroporation in verschiedene *M. xanthus* Stämme transformiert werden. Die entstandenen Kolonien wurden zunächst auf eine Oxytetracyclinresistenz überprüft. Zur genaueren Analyse wurde die chromosomale DNA entsprechender Klone isoliert und mittels PCR mit einer Kombination aus plasmid- und chromosomspezifischen *primern* (*attB1* mit *attPR*, *attR1* mit *attPF*; siehe Abb. 5.1) auf eine erfolgreiche Insertion hin getestet. Als Negativkontrolle diente immer eine PCR-Reaktion unter Verwendung der spezifischen *primer* für den chromosomalen *att*-Lokus, deren 592 bp Signal durch eine Insertion unter den gewählten Bedingungen nicht mehr amplifizierbar war. Unter allen getesteten *M. xanthus* Klonen zeigte keiner eine erfolgreiche Integration des pSWU30 Plasmids in den *attB2*-Lokus, so dass die Rekombination bei 100% der getesteten Klone in den *attB1*-Lokus erfolgt war.

5.1.2 Komplementation des $DZ2\Delta frzZ$ Phänotyps

Durch Inaktivierung der chromosomalen Kopie des *frzZ*-Gens entstehen Zellen mit einer typisch niedrigen Zellumkehrfrequenz (Trudeau et al., 1996) und einem Schwärmdedefekt unter vegetativen Bedingungen (Shi et al., 1993). Bei Nährstofflimitierung sind solche Zellen nicht in der Lage, Fruchtkörper zu bilden und zeigen den typischen *frizzy* Phänotyp (Zusman, 1982). Um sicherzustellen, dass dieser Phänotyp alleine auf das Fehlen des *frzZ*-Gens zurückzuführen ist, sollte die Deletionsmutante $DZ2\Delta frzZ$ (DZ4484) durch die ortsspezifische Integration der plasmidkodierten Kopie des *frzZ*-Wildtypgens komplementiert werden. Die mutagenisierten Formen des *frzZ*-Gens wurden auf die gleiche Weise in das Chromosom eingebracht, um Aufschluss über die *in vivo* aktive Form des *response* Regulators zu geben.

5.1.2.1 Wachstum unter vegetativen Bedingungen

Durch die Aufzeichnung der Wachstumskurven entsprechender Flüssigkulturen wurde die *frzZ* Mutante $DZ2\Delta frzZ$ zunächst in Bezug auf das Wachstum unter vegetativen Bedingungen mit dem Wildtyp DZ2 und den Stämmen verglichen, in deren Chromosom eines der zuvor beschriebenen Plasmide durch ortsspezifische Rekombination integriert worden war. Zu diesem Zweck wurden gut gewachsene Übernachtskulturen auf eine OD_{600} von 0,15 bis 0,2 in CYE Medium eingestellt und bei 32°C unter Schütteln inkubiert. Zur Bestimmung der optischen Dichte wurden ca. alle 12 Stunden Proben entnommen und fotometrisch bei 600 nm quantifiziert (Abb. 5.2).

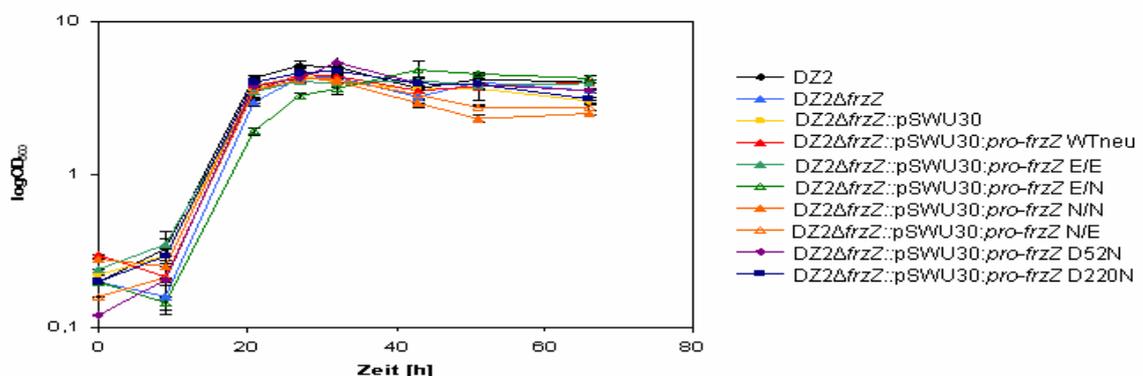


Abbildung 5.2: Wachstumskurven der Stämme DZ2, $DZ2\Delta frzZ$, $DZ2\Delta frzZ::pSWU30$ und $DZ2\Delta frzZ::pSWU30::pro-frzZ$ WTneu, E/E, E/N, N/N, N/E, D52N und D220N. Die OD_{600} der jeweiligen Flüssigkultur wurde zu den angegebenen Zeitpunkten fotometrisch bestimmt und in halblogarithmischer Skalierung ($\log OD_{600}$) gegen die Zeit (h) aufgetragen. Die gezeigten Werte geben den Mittelwert der Doppelansätze eines Experiments wieder. Die Fehlerbalken geben die maximale Abweichung vom Mittelwert an.

Dem Verlauf der in Abbildung 5.2 dargestellten Wachstumskurven ist zu entnehmen, dass die optische Dichte einiger *M. xanthus* Kulturen nach dem Start des Experiments zunächst absank. Diese Beobachtung war wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Zellen während des Überimpfens bei ungenügendem Schütteln aneinander hafteten und so zunächst keine homogenen Kulturen entstanden. Der Stamm DZ2 Δ frzZ::pSWU30:pro-frzZ E/N startete in diesem Experiment mit der niedrigsten Zellzahl nach neun Stunden in die exponentielle Wachstumsphase. Seine Entwicklung verlief dann ähnlich wie die der anderen Stämme, die nach ca. 30 Stunden in die stationäre Phase eintraten. Dieser Übergang erfolgte bei DZ2 Δ frzZ::pSWU30:pro-frzZ E/N mit vergleichbar vielen Zellen, wenn auch zeitlich verzögert. Für die Verdopplungszeit während der exponentiellen Wachstumsphase konnte für alle getesteten Stämme ein Wert von 3 bis 3,5 Stunden bestimmt werden (Abb. 5.3).

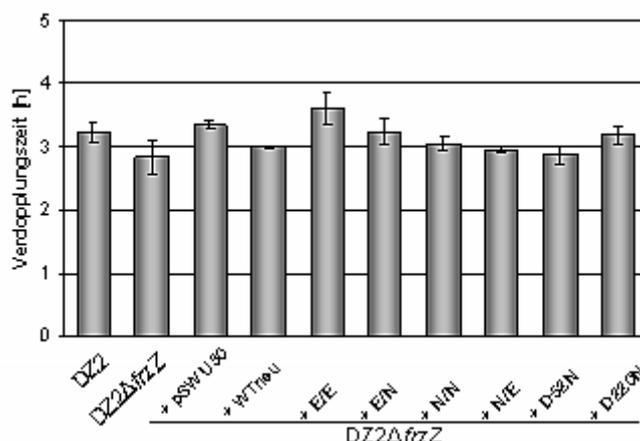


Abbildung 5.3: Verdopplungszeit der Stämme DZ2, DZ2 Δ frzZ, DZ2 Δ frzZ::pSWU30 und DZ2 Δ frzZ::pSWU30:pro-frzZ WTneu, E/E, E/N, N/N, N/E, D52N und D220N während der exponentiellen Wachstumsphase (t_{9h} bis t_{21h}). Die gezeigten Werte geben den Mittelwert der Doppelansätze eines Experiments wieder. Die Fehlerbalken geben die maximale Abweichung vom Mittelwert an.

Wie aus den Abbildungen 5.2 und 5.3 deutlich wird, unterschied sich der *frzZ*-defekte Stamm DZ2 Δ frzZ im vegetativen Wachstum nicht vom Wildtyp DZ2. Dasselbe traf auch auf die Negativkontrolle, den *frzZ* Stamm mit dem ortsspezifisch integrierten, leeren Vektor pSWU30 sowie die Stämme DZ2 Δ frzZ::pSWU30:pro-frzZ WTneu, E/E, E/N, N/N, N/E, D52N und D220N zu. Diesen Ergebnisse lassen die Aussage zu, dass die chromosomale Integration der verschiedenen Varianten des *frzZ*-Gens durch *attP-attB* vermittelte Rekombination das Wachstum des Hintergrundstamms DZ2 Δ frzZ nicht beeinflusst.

5.1.2.2 Akkumulation der FrzZ-Proteine in der DZ2Δ*frzZ* Mutante

Kloniert in den Vektor pSWU30 steht das *frzZ*-Gen, oder eine mutagenisierte Variante des Gens, unter Kontrolle seines natürlichen Promotors. Durch *attP-attB* vermittelte Rekombination wird es jedoch nicht in den nativen Lokus, sondern in die Anheftungsstelle des Myxo-Bakteriophagen Mx8 des *M. xanthus* Chromosoms integriert. Um nun sicherzustellen, dass die Stabilität der verschiedenen FrzZ-Proteine dadurch nicht verändert wird, wurde deren Akkumulation in der *frzZ* Mutante DZ2Δ*frzZ* überprüft. Der Level der Proteinakkumulation wurde weiterhin mit dem des Produkts der chromosomalen Kopie des *frzZ*-Gens im Wildtyp DZ2 verglichen. Zu diesem Zweck wurde aus parallel angezogenen Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase ein cytoplasmatischer Proteinextrakt gewonnen und über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen und mit FrzZ-spezifischem Antikörper detektiert. Das Ergebnis ist in der Abbildung 5.4 dargestellt.

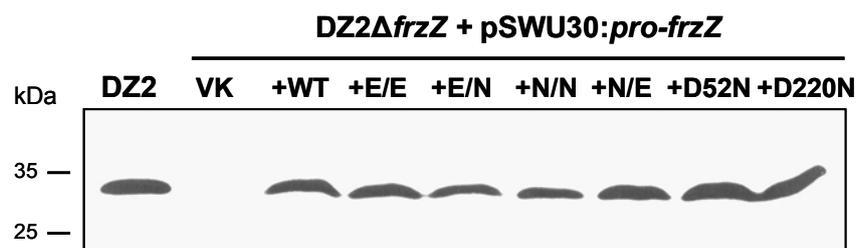


Abbildung 5.4: Western Blot Analyse der Akkumulation von FrzZ WT in den Stämmen DZ2 und DZ2Δ*frzZ* sowie der mutagenisierten Varianten FrzZ E/E, E/N, N/N, N/E, D52N und D220N in DZ2Δ*frzZ*. Es wurden 30 µg Protein/Spur geladen. Die Detektion erfolgte mit FrzZ-spezifischem Antikörper (Trudeau et al., 1996).

Durch die ortsspezifische Integration in die *attB1*-Stelle des Chromosoms konnte keine Beeinflussung der Akkumulationslevel der verschiedenen FrzZ-Proteine festgestellt werden. Des Weiteren wurden die Produkte des *frzZ*-Wildtypgens und der mutagenisierten Varianten in den Zellen in einer Menge nachgewiesen, die mit der des FrzZ-Proteins im Wildtyp DZ2 vergleichbar war. Folglich hatte die Veränderung der Nukleotidsequenz keine Auswirkung auf die Akkumulation der Genprodukte. Die Vektorkontrolle, ein Extrakt des Stamms DZ2Δ*frzZ*, in dessen Chromosom das leere pSWU30 Plasmid integriert wurde, zeigte erwartungsgemäß kein Signal.

5.1.2.3 Schwärmverhalten der DZ2 Δ frzZ Mutante unter vegetativen Bedingungen

Zunächst wurde der Einfluss der Deletion des *frzZ*-Gens auf das Schwärmverhalten von *M. xanthus* Zellen unter vegetativen Bedingungen untersucht. Zu diesem Zweck wurden Kolonien des Wildtypstamms DZ2 und der *frzZ* Mutante DZ2 Δ frzZ auf CYE Platten von verschiedenem Agargehalt getropft und ihr morphologisches Erscheinungsbild miteinander verglichen.

M. xanthus Zellen sind als Schwärmerkolonien organisiert und bewegen sich auf festen Oberflächen durch Gleiten fort. Dabei ergänzen sich die beiden Systeme der A- und S-Motilität, deren Anteil an der Gesamtbewegung in Abhängigkeit von der Beschaffenheit des Untergrundes variiert. Auf weichem Untergrund basiert die Zellbewegung hauptsächlich auf den Komponenten des S-Motilitätssystems. Platten mit einem höheren Agargehalt fordern dagegen das A-System stärker (Shi and Zusman, 1993). Der Schwärmdefekt der *frzZ* Mutante zeigte sich unter vegetativen Bedingungen besonders auf Agarplatten mit einer niedrigen Agarkonzentration. Daraus wurde daraus geschlossen, dass das FrzZ-Protein an der Regulation des S-Motilitätssystems beteiligt ist (Trudeau et al., 1996). Die Abbildung 5.5 zeigt vergrößerte Aufnahmen des Kolonierandes einer DZ2 und einer DZ2 Δ frzZ Kolonie, die auf 1,5%ige (obere Reihe) und 0,3%ige CYE Agarplatten (untere Reihe) getropft wurden.

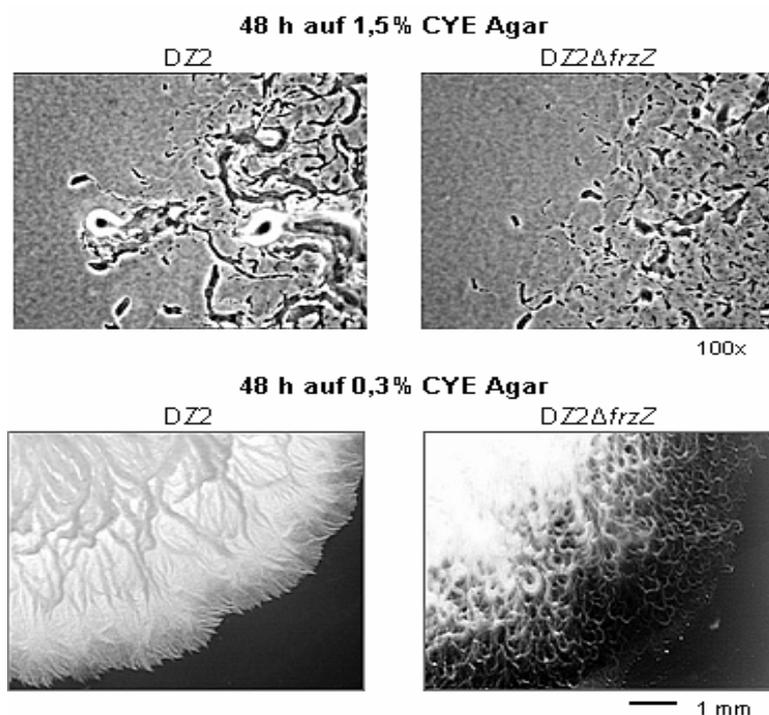


Abbildung 5.5: Betrachtung des Schwärmverhaltens des Stamms DZ2 Δ frzZ im Vergleich zu DZ2 Wildtyp auf 1,5% CYE Agar (obere Reihe) und 0,3% CYE Agar (untere Reihe). Exponentiell wachsende Flüssigkulturen wurden durch Zentrifugation geerntet und aufkonzentriert. 5 μ l einer Suspension mit einer OD₆₀₀ von 10 wurden auf CYE Agarplatten getropft. Nach zwei Tagen wurde der Rand der Kolonie fotografiert. Die Bilder der oberen Reihe sind mikroskopisch 100-fach vergrößert, während die Bilder der unteren Reihe durch ein Stereoskop aufgenommen wurden. Der schwarze Balken markiert einen Bereich von 1 mm.

Auf den höherprozentigen Agarplatten sah man bei DZ2 Wildtyp deutlich die typischen pfeilförmigen Köpfchen von Zellgruppen, die sich hauptsächlich durch S-Motilität fortbewegten und durch die massive Absonderung von Schleim weiß erschienen. Am Rand der Kolonie befanden sich in der Mehrzahl größere Gruppen. Im Gegensatz dazu zeigte der Kolonierand der *frzZ* Mutante mehr Einzelzellen und kleinere Gruppen, die sich mittels A-Motilität bewegten. In Richtung des Zentrums der Kolonie (rechter Bildrand) reichte die Zone der Einzelbewegungen der *frzZ* Zellen wesentlich weiter als bei DZ2 Wildtyp. Daraus lässt sich schließen, dass der Mangel an S-Motilität kein Phänomen ist, das durch eine niedrigere Zelldichte am Rand der Kolonie verursacht wird.

Auf den weichen Agarplatten wurde der Motilitätsdefekt der *DZ2ΔfrzZ* Mutante noch deutlicher. Die Zellen waren nicht in der Lage, gleichmäßig vom Zentrum der Kolonie aus zu schwärmen und die glatte Kante, die der Wildtypstamm DZ2 zeigte, zerfiel in die typischen Wirbel. Auch erreichte eine Kolonie des Stamms *DZ2ΔfrzZ* unter diesen Bedingungen nie einen ähnlich großen Durchmesser wie eine Wildtypkolonie. Die Beobachtungen von Trudeau et al. (1996) konnten also bestätigt werden. Der *frzZ*-Gendefekt scheint hauptsächlich Auswirkungen auf das System der sozialen Zellbewegung zu haben.

5.1.2.4 Schwärmverhalten der *DZ2ΔfrzZ* Mutante im Vergleich zu den komplementierten Stämmen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Schwärmverhalten der *frzZ* Mutante *DZ2ΔfrzZ* auch mit der Schwärmfähigkeit der Stämme verglichen, in deren Chromosom der unveränderte Vektor pSWU30 oder eines der mutagenisierten *frzZ*-Gene durch ortsspezifische Integration eingebracht worden war. Ziel dieses Versuchs war es, zu ermitteln, ob die Funktionalität des *response* Regulators *in vivo* von einer Aktivierung durch die Phosphorylierung einer oder beider Domänen abhängt. In den vier doppelt-mutagenisierten Plasmiden waren die phosphorylierbaren Reste beider Domänen des *frzZ*-Genprodukts ausgetauscht, um eine Phosphorylierung zu simulieren bzw. zu verhindern, während in den beiden *single-site* Mutanten pSWU30:*pro-frzZ* D52N und D220N nur die Phosphorylierung der veränderten Domäne unterbunden wurde.

Das Schwärmverhalten wurde durch *colony expansion* Versuche untersucht, wie unter Punkt 4.1.10.1 beschrieben. Zu diesem Zweck wurde eine exponentiell wachsende Kultur des jeweiligen Stamms aufkonzentriert und auf CYE Platten mit einem Agargehalt von 0,3% (Softagar) und 1,5% (Hartagar) getropft. Nach fünf Tagen wurde die Expansion der Kolonien ermittelt und mit dem Koloniezuwachs des Wildtypstamms DZ2 verglichen.

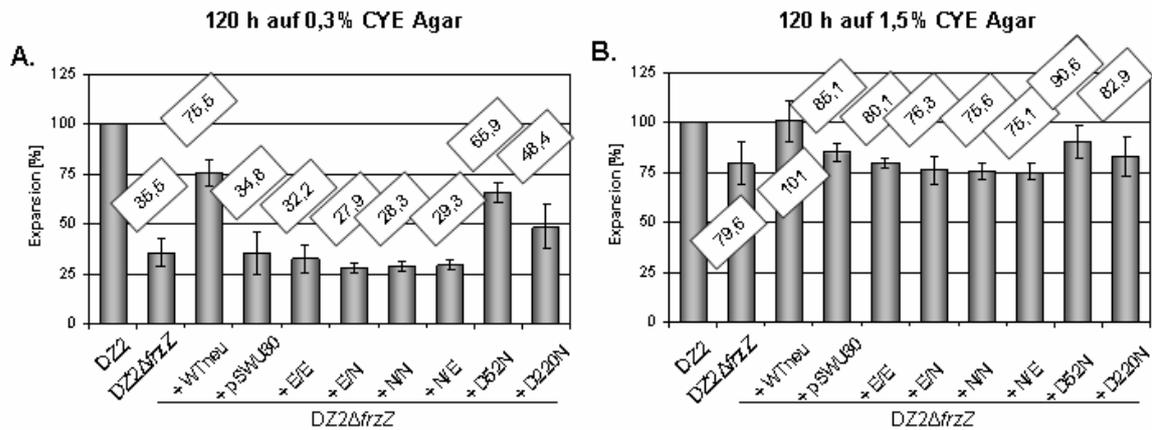


Abbildung 5.6: Colony expansion Assay der DZ2ΔfrzZ Mutante auf 0,3% CYE Agar (A.) und 1,5% CYE Agar (B.) im Vergleich zu den Stämmen DZ2, DZ2ΔfrzZ::pSWU30 und DZ2ΔfrzZ::pSWU30:pro-frzZ WTneu, E/E, E/N, N/N, N/E, D52N und D220N. Exponentiell wachsende Flüssigkulturen wurden durch Zentrifugation geerntet und aufkonzentriert. 5 µl einer Suspension mit einer OD₆₀₀ von 10 wurden auf CYE Agarplatten getropft. Der Zuwachs des Koloniedurchmessers aller Stämme nach fünf Tagen wurde prozentual auf den des Wildtyps DZ2 (≈ 100%) bezogen. Die gezeigten Werte (in %) geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten an, in denen jeweils ein Dreifachansatz für jeden getesteten Stamm untersucht wurde. Die Fehlerbalken geben die maximale Abweichung vom Mittelwert an.

Die Abbildung 5.6 zeigt das Ergebnis des vergleichenden colony expansion Assay. Unter beiden getesteten Bedingungen ergab sich eine ähnliche Verteilung der Expansionswerte der einzelnen Stämme, wobei auf den 1,5%igen Agarplatten die erzielten Absolutwerte höher waren. Hier trat der Schwärmdedefekt der frzZ Mutante erneut weniger stark zu Tage. Eine Kolonie des Stamms DZ2ΔfrzZ erreichte auf Hart- sowie auf Softagarplatten eine Expansion, die im Bereich der Werte lag, die auch für die Negativkontrolle DZ2ΔfrzZ::pSWU30 zu beobachten waren. Im Vergleich dazu zeigten die Stämme DZ2ΔfrzZ::pSWU30:pro-frzZ E/E, E/N, N/N und N/E eine reduzierte Schwärmfähigkeit und einen geringeren Koloniedurchmesser. Durch die Integration des frzZ-Wildtypgens in den Stamm DZ2ΔfrzZ wurde dagegen auf hartem Untergrund eine vollständige Komplementation des Schwärmdedefekts der frzZ Mutante erreicht. Auf Softagarplatten steigerte sich der Koloniedurchmesser auf 75,5% des Werts, der im Mittel für den Wildtyp DZ2 zu beobachten war. Die Integration der Plasmide pSWU30:pro-frzZ D52N und D220N führte sowohl auf 0,3%igen als auch auf 1,5%igen Agarplatten zu einer partiellen Komplementation. Der Koloniedurchmesser der entsprechenden Stämme steigerte sich auf weichem Untergrund auf 65,9% bzw. 48,5% einer Wildtypkolonie, während auf Hartagarplatten 90,6% und 82,9% erreicht wurden.

Das deutete darauf hin, dass das Vorhandensein mindestens einer unveränderten, phosphorylierbaren CheY-ähnlichen Domäne wichtig für die Funktion des response Regulators FrzZ ist. Des Weiteren simulierte die Glutamat-Substitution der active-site

Aspartatreste *in vivo* offensichtlich keine Phosphorylierung und brachte damit aktives Protein hervor. Andernfalls hätte auch die Integration der Glutamat-substituierten Konstrukte *frzZ* E/E und *frzZ* E/N oder N/E zu einer Komplementation führen müssen.

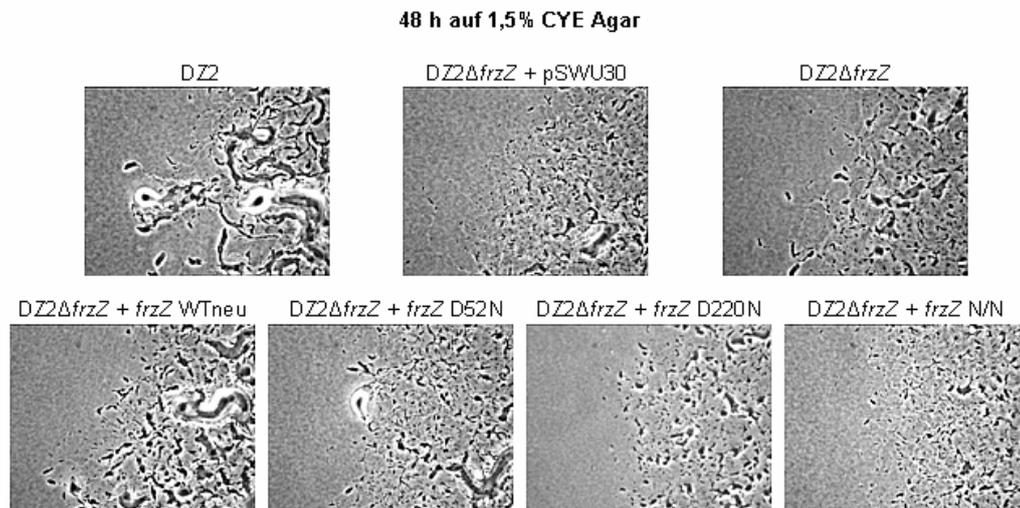


Abbildung 5.7: Mikroskopische Betrachtung (100-fach vergrößert) des Kolonierands der Stämme DZ2, DZ2Δ*frzZ*, DZ2Δ*frzZ*::pSWU30 und DZ2Δ*frzZ*::pSWU30:*pro-frzZ* WTneu, D52N, D220N und N/N auf 1,5%igen CYE Agarplatten. Exponentiell wachsende Flüssigkulturen wurden durch Zentrifugation geerntet und aufkonzentriert. 5 µl einer Suspension mit einer OD₆₀₀ von 10 wurden auf CYE Agarplatten getropft. Nach fünf Tagen wurde der Rand der Kolonie fotografiert.

Die Abbildung 5.7 zeigt die mikroskopische Betrachtung des Kolonierandes der auf 1,5% CYE Agar getropften Stämme DZ2, DZ2Δ*frzZ*, DZ2Δ*frzZ*::pSWU30 und DZ2Δ*frzZ*::pSWU30:*pro-frzZ* WTneu, D52N, D220N und N/N. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Komplementation des Schwärmdéfekts der *frzZ* Mutante DZ2Δ*frzZ* mit einer Verbesserung der S-Motilität einherging. Durch die Integration der Wildtypkopie des *frzZ*-Gens sowie der Plasmide pSWU30:*pro-frzZ* D52N und D220N wurde im *colony expansion* Assay die Ausdehnung der entsprechenden Kolonien signifikant verbessert. Die Morphologie des Kolonierandes dieser Stämme zeigte gleichzeitig eine deutliche Steigerung der Zellbewegung durch S-Motilität. Wurde dagegen der leere *attP*-Vektor oder das *frzZ* N/N-Konstrukt in das Chromosom der *frzZ* Mutante integriert, erbrachte das weder eine Komplementation des Schwärmdéfektes (siehe Abb. 5.6) noch änderte sich der Phänotyp der *frzZ* Mutante. Auch die anderen doppelt-mutagenisierten *frzZ*-Formen bewirkten im *colony expansion* Assay keine Komplementation des Schwärmdéfekts der *frzZ* Mutante (Daten nicht gezeigt).

5.1.2.5 Schwärmverhalten einer *frzZ* Mutante im Hintergrund der Stämme DK1217 und DK1300

Um herauszufinden, ob der Bewegungsdefekt der *frzZ* Mutante $DZ2\Delta frzZ$ ausschließlich das S-Motilitätssystem betraf, wurde die Funktionalität beider Systeme unabhängig voneinander analysiert. Zu diesem Zweck wurde der zu untersuchende Gendefekt in einen *M. xanthus* Stamm transduziert, der nur über ein funktionelles Motilitätssystem verfügt. Betrifft die neu eingeführte Mutation dasselbe System, entsteht eine unbewegliche Doppelmutante. Als Rezipientenstämme wurden im Rahmen dieser Analyse die Stämme DK1217 (*aglB1*⁻, Phänotyp A⁺S⁺) und DK1300 (*sglG1*⁻, Phänotyp A⁺S⁻) gewählt, die aus dem vollbeweglichen Wildtypstamm DK1622 hervorgegangen sind (Hodgkin and Kaiser, 1979a, b).

Zur Transduktion des *frzZ*-Gendefekts in die *frzZ*⁺ Rezipientenstämme DK1217 und DK1300 wurde zunächst ein Phagenlysat des Stamms DZ4176 hergestellt. Dieser *M. xanthus* Stamm ist eine kanamycinresistente *frzZ*-Insertionsmutante, die denselben Phänotyp wie die Deletionsmutante DZ4484 ($DZ2\Delta frzZ$) aufwies und ebenfalls kein FrzZ-Protein akkumulierte (Daten nicht gezeigt). Die Transduktionsansätze wurden zur Selektion auf CYE Agarplatten mit Kanamycin ausgebracht. Resistente Kolonien wurden dann in Flüssigkultur angezogen, um deren cytoplasmatische Zellextrakte per *Western Blot* Verfahren auf eine FrzZ-Akkumulation hin zu überprüfen (Abb. 5.8).

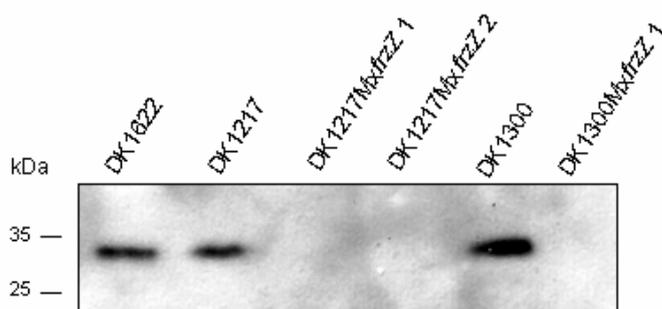


Abbildung 5.8: *Western Blot* Analyse der FrzZ-Akkumulation in DK1217MxfrzZ 1, 2 und DK1300MxfrzZ. Als Positivkontrolle dienen der Wildtyp DK1622 und die *frzZ*⁺ Rezipientenstämme DK1217 und DK1300. Es wurden 30 µg Protein/Spur geladen. Die Detektion erfolgte mit FrzZ-spezifischem Antikörper (Trudeau et al., 1996).

Das FrzZ-Protein war in beiden getesteten DK1217MxfrzZ Klonen (1, 2) und dem DK1300MxfrzZ Klon nicht mehr nachzuweisen. Es wurde mit DK1217MxfrzZ 1 weitergearbeitet, der nachfolgend als DK1217MxfrzZ bezeichnet wird. Um eine mögliche Komplementation des *frzZ*-Defekts in diesem Hintergrund untersuchen zu können, wurden nachfolgend die *attP*-Vektoren pSWU30:*pro-frzZ* WTneu, N/N, D52N und D220N sowie der leere Vektor pSWU30 durch Elektroporation in die Stämme DK1217MxfrzZ und

DK1300MxfrzZ transformiert. Die Variante des *frzZ*-Gens N/N diente dabei als Exempel für eine nicht-komplementierende Form, während durch die Integration des *frzZ*-Wildtypgens sowie der Einzelmutanten *frzZ* D52N und D220N in den vorangegangenen Experimenten eine zumindest partielle Wiederherstellung des Wildtyp-phänotyps zu beobachten war. Aus der Transformationsreaktion hervorgegangene Kolonien wurden zunächst auf eine Oxytetracyclinresistenz hin überprüft, die durch den Vektor vermittelt wurde, um sie anschließend einer *Western Blot* Analyse zu unterziehen (Daten nicht gezeigt). In positiven Transformanden war eine FrzZ-Akkumulation nun wieder nachweisbar. Die als richtig identifizierten Klone jeder Transformationsreaktion sowie die Elternstämme DK1217MxfrzZ und DK1300MxfrzZ und die Kontrollen DK1217, DK1300 und Wildtyp DK1622 wurden nachfolgend in *colony expansion* Experimenten auf ihre Schwärmfähigkeit hin untersucht. Die Abbildung 5.9 zeigt die gemittelten Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. Es wurde jeweils ein Dreifachansatz jedes Stamms, wie unter Punkt 4.1.10.1 beschrieben, vorbereitet und auf CYE Agarplatten getropft. Der S⁺ Stamm DK1217 wurde dabei auf CYE Softagarplatten (0,3% Agar) betrachtet, der A⁺ Stamm DK1300 auf CYE Hartagarplatten (1,5% Agar).

Zunächst ließ sich feststellen, dass, unabhängig von der Beschaffenheit des Untergrundes, nur das Vorhandensein beider Motilitätssysteme eine vollständige Bewegungsfähigkeit ermöglichte. So erreichte weder der S-motile Stamm DK1217 auf weichem Untergrund die Expansion einer Wildtypkolonie noch schaffte das der A-motile Stamm DK1300 auf festen Agarplatten (Abb. 5.9, A. und C.). Weiterhin brachte die Inaktivierung der chromosomalen *frzZ*-Kopie des S-motilen Stamms DK1217 (DK1217MxfrzZ) keine unbeweglichen Zellen hervor. Dies wäre zu erwarten gewesen, wäre das *frzZ*-Gen ein reines S-Motilitätsgen. Die Inaktivierung führte in diesem Hintergrund zu einer Verringerung der Kolonieausdehnung auf 79,6% des Stamms DK1217 (Abb. 5.9, B.). Durch die Integration der Wildtypkopie des *frzZ*-Gens und der beiden Plasmide pSWU30:*pro-frzZ* D52N und D220N war dagegen erneut eine Komplementation zu beobachten. Im Gegensatz zu den Analysen im Hintergrund des Stamms DZ2Δ*frzZ*, dessen Bewegungsdefekt durch die Integration des Plasmids pSWU30:*pro-frzZ* D52N in höherem Maße komplementiert wurde, war hier ein besseres Ergebnis durch das Vorhandensein der unveränderten ersten Domäne des FrzZ-Proteins (*frzZ* D220N) zu beobachten.

Für das A-Motilitätssystem konnte dagegen durch die Inaktivierung des *frzZ*-Gens nur eine geringe Beeinflussung festgestellt werden. Eine Kolonie des Stamms DK1300MxfrzZ erreichte 91,1% der Expansion des Elternstamms DK1300. Allerdings zeigt der Stamm

DK1300MxfrzZ::pSWU30:pro-frzZ D220N eine Verbesserung des Bewegungsdefektes und die Kolonie erreichte 86% des Ausdehnung der Wildtypkolonie (Abb. 5.9, C.) bzw. 111% der Expansion des Elternstamms DK1300MxfrzZ (Abb. 5.9, D.).

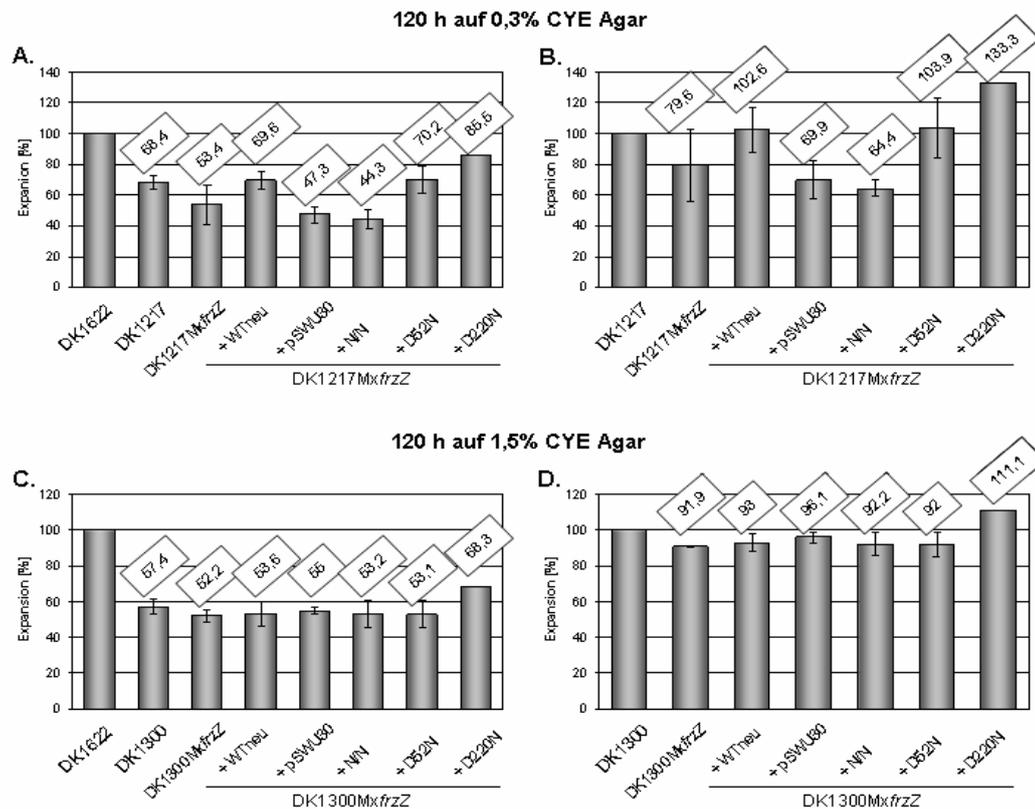


Abbildung 5.9 Colony expansion Assay des Stamms DK1217MxfrzZ auf 0,3% CYE Agar (A. und B.) und des Stamms DK1300MxfrzZ auf 1,5% CYE Agar (C. und D.), im Vergleich zu DK1622 Wildtyp und den mit pSWU30 sowie pSWU30:pro-frzZ WTneu, N/N, D52N und D220N komplementierten Stämmen. Der Zuwachs des Koloniedurchmessers aller Stämme nach fünf Tagen wurde prozentual auf den des Wildtyps DK1622 ($\approx 100\%$) (A. und C.) oder auf den der Elternstämme DK1217MxfrzZ (B.) bzw. DK1300MxfrzZ (D.) bezogen. Die gezeigten Werte (in %) geben den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten an, in denen jeweils ein Dreifachansatz für jeden getesteten Stamm untersucht wurde. Die Fehlerbalken geben die maximale Abweichung vom Mittelwert an.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in einem Hintergrund, der die gegenseitige Beeinflussung beider Motilitätssysteme ausschaltete, durch die Inaktivierung des *frzZ*-Gens eine stärkere Beeinflussung des S-Motilitätssystems festgestellt werden konnte. Diese Beobachtung widersprach dem bisher postulierten Modell der Signaltransduktion durch das *frz*-System, welches FrzZ als alleinigen Signalgeber des A-Motilitätssystems darstellt (Bustamante et al., 2004).

5.1.2.6 Morphologische Differenzierung der DZ2 Δ frzZ Mutante unter Nährstoffmangelbedingungen

Zellen, denen eines der *frz*-Gene fehlt, wurden aufgrund ihres Differenzierungsdefektes entdeckt und nach ihrem typischen Phänotyp benannt (Morrison and Zusman, 1979; Zusman, 1982). Sie sind in der Lage, zu aggregieren, bilden dabei aber keine geordneten Fruchtkörper, sondern krause (*frizzy*) Filamente und an der Peripherie der Kolonie häufig ringförmige Strukturen (*swirls*). *Frz*-Mutanten zeigen keinen Sporulationsdefekt. Bedingt durch die veränderte Morphologie der Aggregate wurden meist aber weniger Sporen gezählt werden, als für differenzierte Wildtypkolonien.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Bewegungsdefekt der *frzZ* Mutante DZ4484 unter vegetativen Bedingungen komplementierbar ist, sollte dies auch für den Aggregationsdefekt untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Differenzierung durch Nährstoffmangel eingeleitet und fotografisch dokumentiert. Das reproduzierbare Ergebnis dieser Versuchsreihe ist in Abbildung 5.10 dargestellt.

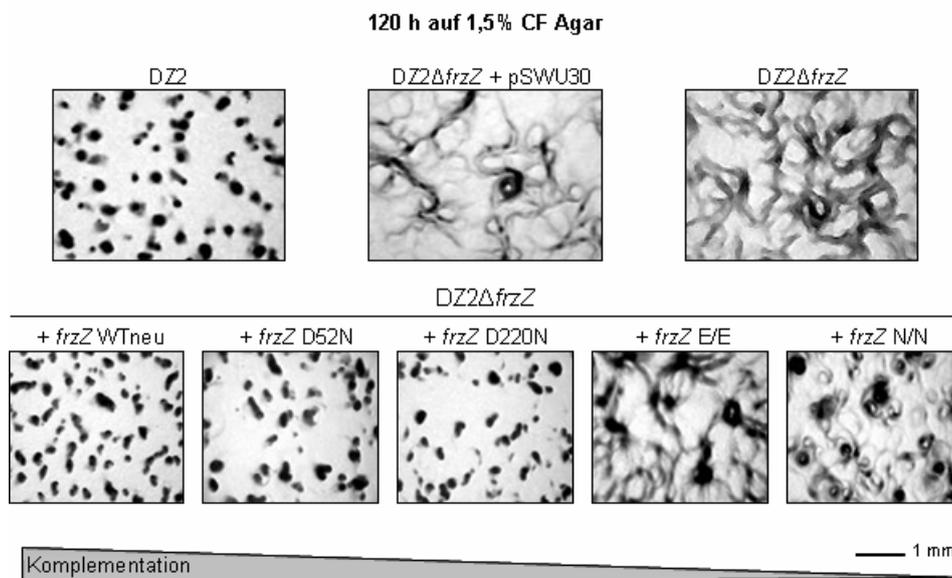


Abbildung 5.10: Morphologische Differenzierung der Stämme DZ2 und DZ2 Δ frzZ (obere Reihe, linkes und rechtes Bild) im Vergleich zu den Stämmen DZ2 Δ frzZ::pSWU30:*pro-frzZ* WTneu, D52N D220N, E/E und N/N (untere Reihe, von links) und der Negativkontrolle DZ2 Δ frzZ::pSWU30 (obere Reihe, Mitte). Nicht gezeigt sind die Stämme DZ2 Δ frzZ::pSWU30:*pro-frzZ* E/N und N/E. Zur Vorbereitung wurden exponentiell wachsende Kulturen durch Zentrifugation geerntet und mit CF Medium ohne Nährstoffe gewaschen, um verbliebene Nährstoffe zu entfernen. 5 μ l einer Suspension mit einer OD₆₀₀ von 10 wurden auf CF Agarplatten getropft. Die gezeigten Bilder sind repräsentative Aufnahmen eines der drei Ansätze für jeden getesteten Stamm aus einem von drei unabhängigen Experimenten und zeigen das Zentrum der Kolonie nach fünf Tagen.

Die Abbildung 5.10 zeigt in der oberen Reihe die Differenzierung der Kontrollen, des Wildtyps DZ2 und der *frzZ* Mutante DZ2 Δ *frzZ*, sowie die der Negativkontrolle DZ2 Δ *frzZ* mit dem integrierten leeren Vektor pSWU30. Es ist zu erkennen, dass die *frzZ* Mutante, im Gegensatz zu DZ2 Wildtyp, nicht in der Lage war, innerhalb von fünf Tagen erfolgreich zu aggregieren. Es bildeten sich die typischen Filamente von Zellen, nicht aber sporengefüllte Fruchtkörper. Einen vergleichbaren Phänotyp zeigte auch die Negativkontrolle.

In der unteren Reihe der Abbildung sind Aufnahmen angeordnet, welche die Veränderung des Phänotyps der *frzZ* Mutante DZ2 Δ *frzZ* durch die *attP-attB* vermittelte Integration verschiedener Formen des *frzZ*-Gens zeigen. Deren Fähigkeit zur Komplementation des Differenzierungsdefekts nimmt dabei von rechts nach links zu. Auch in diesem Experiment konnte keine der vier doppelt-mutagenisierten Formen des *frzZ*-Gens den Differenzierungsdefekt der *frzZ* Mutante komplementieren. Exemplarisch ist in Abbildung 5.10 der Phänotyp der Stämme DZ2 Δ *frzZ*::pSWU30:*pro-frzZ* E/E und N/N dargestellt. In beiden Fällen waren die typischen Filamente von Zellen zu beobachten, die sich in Kreisen um Aggregationszentren bewegten, über dieses Stadium aber nicht hinaus kamen. Wie schon unter vegetativen Bedingungen gezeigt, komplementierte dagegen die Integration der beiden *single-site* Mutanten *frzZ* D52N und D220N den Defekt des Elternstamms und versetzte DZ2 Δ *frzZ* in die Lage, erfolgreich zu aggregieren und Fruchtkörper zu bilden. Vergleicht man deren Morphologie mit denen des Wildtyps DZ2, so sieht man, dass die Strukturen kleiner und unregelmäßiger sind. Auch werden von diesen Stämmen weniger Fruchtkörper gebildet. Eine vollständige Wiederherstellung des Wildtypphänotyps konnte dagegen auch unter Differenzierungsbedingungen nur durch die Integration des unveränderten *frzZ*-Gens erreicht werden. Die gebildeten Fruchtkörper entsprachen in Morphologie und Anzahl den von DZ2 Wildtyp gebildeten Strukturen.

5.2 Lokalisierung von FrzZ in der Zelle

Das Chemotaxissystem des Bakteriums *E. coli* war das erste System für das experimentell gezeigt werden konnte, dass die membranständigen Rezeptorproteine an den Zellpolen zu so genannten Rezeptor-Signal-Komplexen (RSKs) zusammengelagert sind. Deren Bildung hängt weiterhin vom Vorhandensein der assoziierten Proteine CheW und CheA ab (Maddock and Shapiro, 1993), so dass eine Signalweitergabe an den *response* Regulator CheY durch direkten Kontakt mit dem RSK vermittelt wird.

Die Untersuchung komplexerer Systeme und auch die Entdeckung solcher RSKs in Organismen, die über mehrere Chemotaxis-Operons verfügen, zeigten, dass diese Organisationsform eher der Regel als der Ausnahme entspricht (Alley et al., 1992; Harrison et al., 1999; Gestwicki et al., 2000; Wadhams et al., 2000). Auch für MCPs ohne transmembrane Domänen konnten ähnliche Zusammenlagerungen im Cytoplasma gezeigt werden (Storch et al., 1999; Wadhams et al., 2002).

FrzCD ist das MCP-homologe Rezeptorprotein des *frz*-Chemotaxissystems aus *M. xanthus*. Dem cytoplasmatischen Protein fehlen membrandurchspannende Domänen. Erwartungsgemäß lokalisiert es nicht an den Zellpolen, sondern bildet Ansammlungen im Cytoplasma (Armitage, 2003). Eine Analyse des fraktionierten Zellextrakts vegetativer *M. xanthus* Zellen zeigte, dass FrzCD zwar ein lösliches Protein ist, zu einem gewissen Anteil aber assoziiert mit Membranen, Membranbestandteilen oder großen Proteinkomplexen vorliegt (McBride et al., 1992). Eine Organisation in Signal-Komplexen, wie oben beschrieben, ist also auch in diesem Fall zu erwarten.

5.2.1 Zell-Fraktionierungsanalysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Lokalisierungsstudien für den *response* Regulator FrzZ durchgeführt. Ziel dieser Versuche war es, aufgrund der Lokalisierung des Proteins in der Zelle, eine Aussage über eine mögliche Interaktion mit den Kernkomponenten des *frz*-Systems, FrzCD, FrzA und FrzE, sowie über die Ziele der Signalweitergabe durch das System treffen zu können. Da die FrzZ Akkumulation in *M. xanthus* Stämmen mit verschiedenen Gendefekten untersucht wurde, konnte weiterhin der Einfluss der fehlenden Proteine auf die Lokalisierung von FrzZ betrachtet werden.

Zur Fraktionierung wurde zunächst ein Zellextrakt aus vegetativen *M. xanthus* Zellen hergestellt. Dazu wurden 50 ml Flüssigkultur nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,0 bis 1,5 durch Zentrifugation geerntet und in die periplasmatische, die cytoplasmatische und die partikuläre Fraktion getrennt (siehe Punkt 4.6.4). Deren Proteingehalt wurde bestimmt, um gleiche Mengen über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufzutrennen. Die Proteine konnten dann zur *Western Blot* Analyse auf eine PVDF-Membran übertragen werden. Die Detektion erfolgte mit FrzZ-spezifischem Antikörper. Es wurde jeweils eine Kontrolle durchgeführt, indem die bereits detektierte Membran von FrzZ-spezifischem Antikörper befreit (siehe Punkt 4.4.3.3) und mit Pph1-spezifischem Antikörper erneut detektiert wurde. Die Phosphatase Pph1 ist ein cytoplasmatisches Protein und sollte daher nur in der entsprechenden Fraktion zu finden sein. Das Ergebnis dieser Analysen ist in der Abbildung 5.11 dargestellt.

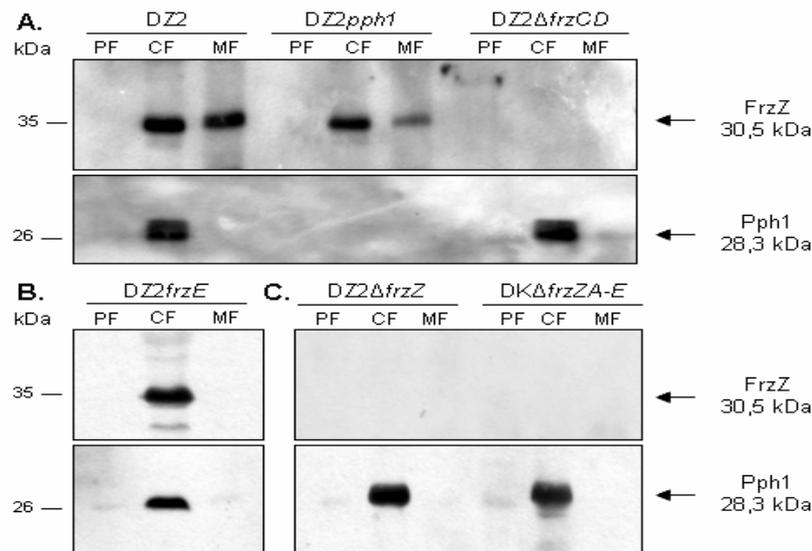


Abbildung 5.11: Western Blot Analyse der Akkumulation von FrzZ (A., B. und C., jeweils oberes Bild) und Pph1 (A., B. und C., jeweils unteres Bild) in fraktionierten Extrakten. Verwendet wurden Extrakte von DZ2 Wildtyp, der *pph1* Mutante DZ2*pph1* (DZ4314), der *frzCD* Mutante DZ2 Δ *frzCD* (DZ4169), der *frzE* Mutante DZ2*frzE* (DZ4148), der *frzZ* Mutante DZ2 Δ *frzZ* (DZ4484) und der *frzZA-E* Mutante DK Δ *frzZA-E* (DK9032). Betrachtet wurden jeweils die periplasmatische Fraktion (PF), die cytoplasmatische Fraktion (CF) und die partikuläre Fraktion (MF) eines Zellextrakts vegetativer Zellen. Es wurden 30 μ g Protein/Spur geladen. Die Detektion erfolgte mit FrzZ-spezifischem (Pineda AK-Service, Berlin) und Pph1-spezifischem Antikörper (Treuner-Lange et al., 2001).

Die Negativkontrolle DZ2 Δ *frzZ* zeigte erwartungsgemäß kein FrzZ-Signal, während detektierbare Mengen des *response* Regulators in Zellen des Wildtyps DZ2, der *pph1* Mutante DZ4314 und der Kinasemutante DZ2*frzE* zu finden waren. Die *frzCD* Mutante DZ4169 und der Stamm DK9032, dem die *frz*-Gene *A*, *CD* und *E* fehlten, zeigten dagegen kein Signal. Das widersprach der Beobachtung von Trudeau et al., die das Vorhandensein von *frzZ* mRNA und die Akkumulation des FrzZ-Proteins in einem *frzCD* Stamm beschrieben haben (Trudeau et al., 1996). Da die Pph1-Kontrolle aber in allen relevanten Hintergründen positive Signale für die Phosphatase in der cytoplasmatischen Fraktion ergab, war für die hier beschriebene Beobachtung nicht von einem technischen Fehler auszugehen.

Ähnlich wie bereits für FrzCD beschrieben, konnte auch der *response* Regulator FrzZ in Wildtypzellen in der cytoplasmatischen sowie in der partikulären Fraktion nachgewiesen werden. Es entfielen jeweils ca. 50% der Gesamtmenge des Proteins auf jede Fraktion. Diese Beobachtung implizierte die Bildung von Rezeptor-Signal-Komplexen unter Beteiligung des *response* Regulators, was die Detektion von FrzZ-Protein in der partikulären Fraktion erklärt. Die Verteilung änderte sich, betrachtete man die Lokalisierung des *response* Regulators in der Kinasemutante DZ2*frzE*. Es akkumulierte

eine geringere Menge an FrzZ und die Verteilung war in diesem Hintergrund vollständig in die cytoplasmatische Fraktion verschoben. Das ließ darauf schließen, dass es in Abwesenheit der Kinase des *frz*-Systems, FrzE, nicht zur Bildung von RSKs kam und FrzZ aus diesem Grund nur in der cytoplasmatischen Fraktion nachzuweisen war.

Im Hintergrund des *frzCD*- Stamms DZ2 Δ *frzCD* und des Stamms DZ2 Δ *frzA-E* konnte kein FrzZ-Protein detektiert werden, während die Menge in dem Stamm DZ2*frzE* verringert war. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass durch die Kernkomponenten des Systems auch Genexpression reguliert werden kann. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung der Gene *frzCD* und *frzE* zu einer verminderten Expression des stromaufwärts gelegenen *frzA*-Gens führte (Weinberg and Zusman, 1989). Da die Promotorbereiche der Gene *frzA* und *frzZ* überlappen, wäre ein ähnlicher Effekt auf das *response* Regulator Gen denkbar.

In der Phosphatasemutante DZ4314 wurde, verglichen mit dem Wildtyp DZ2, ebenfalls eine geringere Menge an FrzZ detektiert, die zu 80% im Cytoplasma lokalisierte. Das könnte bedeuten, dass eine fehlende Dephosphorylierung des *response* Regulators in diesem Hintergrund die Assoziation des Proteins an einen Rezeptor-Komplex behinderte und dass auch hier die Akkumulation des *response* Regulators negativ beeinflusst wurde.

5.2.2 Lokalisierung von FrzZ-GFP

Für das FrzS-Protein aus *M. xanthus*, welches in seiner N-terminalen Domäne Ähnlichkeit zu CheY aufweist und an der Regulation von S-Motilität beteiligt ist, konnte eine polare Lokalisierung in der Zelle gezeigt werden (Ward et al., 2000; Mignon et al., 2005). Eine mit dem *green fluorescent protein* (GFP) gekoppelte Form von FrzS wurde dabei an beiden Zellpolen gefunden, in signifikant größere Menge jedoch am jeweiligen vorderen Ende einer Zelle, welches die Pili ausbildet. Da der *response* Regulator FrzZ unter vegetativen Bedingungen eine ähnliche Funktion zu erfüllen scheint wie FrzS, sollte auch dessen Lokalisierung in der Zelle untersucht werden.

5.2.2.1 Konstruktion des Vektors pSWU30:*pro-frzZ* WTneu-GFP

Zu diesem Zweck wurde das *frzZ*-Wildtypgen transkriptionell mit dem *gfp*-Gen aus *Aequorea victoria* fusioniert. Durch eine PCR-Reaktion (*Pfu* Polymerase, Fermentas), unter Verwendung der *primer frzZAgelGFP* und *GFP-stop*, wurde zunächst das *gfp*-Gen aus dem Vektor pFCrGFP (BioCat GmbH, Heidelberg) amplifiziert. Das 729 bp Fragment erhielt durch den *sense primer* eine 5'-Nukleotidsequenz, die der 3'-Sequenz des *frzZ*-Gens von der *Agel*-Schnittstelle bis unmittelbar vor dessen Stopcodon entsprach (Abb.

5.12, D.). Das *blunt-end* PCR-Produkt wurde in den pCR[®]-Blunt II-TOPO Vektor der Firma Invitrogen kloniert. Die Ligationsreaktion wurde in *E. coli* Top10 Zellen transformiert und auf LB Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert. Kanamycinresistente Klone konnten durch einen PCR-Schnelltest (*primer frzZAgelGFP* mit GFP-stop) und einen Restriktionsverdau mit dem Enzym *EcoRI* auf eine Insertion des *gfp*-Gens hin überprüft werden. Durch den Verdau entstanden aus dem Vektor pCR[®]-Blunt II-TOPO:Agel-GFP zwei Fragmente von 3501 und 717 bp Länge. Die Nukleotidsequenz eines Klons wurde durch eine Sequenzierreaktion unter Verwendung der Oligonukleotide M13F und M13R überprüft und erwies sich als fehlerfrei. Da das mit GFP-fusionierte *frzZ*-Gen durch ortsspezifische Rekombination in das Chromosom von *M. xanthus* Zellen integriert werden sollte, wurde der Vektor pSWU30:*pro-frzZ* WTneu mit den Enzymen *Agel* und *EcoRI* geschnitten. Die *Agel*-Schnittstelle ist einzigartig in der Sequenz des Plasmids und liegt oberhalb des *frzZ*-Stopcodons (Abb. 5.12, B.). Durch den Doppelverdau wurde ein 40 bp DNA-Fragment aus der Nukleotidsequenz entfernt und das *frzZ*-Gen verlor die 14 terminalen Nukleotide.

Ein mit denselben Enzymen aus pCR[®]-Blunt II-TOPO:Agel-GFP heraus getrenntes 699 bp Fragment enthielt das *gfp*-Gen sowie den durch PCR amplifizierten terminalen Bereich des *frzZ*-Gens bis zu dessen *Agel*-Schnittstelle.



Abbildung 5.12: Wichtige Gen- und Proteinsequenzen zur Klonierungsstrategie der transkriptionellen Fusion des *frzZ*-Gens mit dem *gfp*-Gen aus pFCrGFP. Durch PCR-Amplifikation mit dem *primer frzZAgelGFP* (A.) erhält das *gfp*-Gen (C.) am 5'-Ende einen Nukleotidüberhang, der dem 3'-Ende des *frzZ*-Gens (B.) entspricht und dessen *Agel*-Schnittstelle, nicht aber das Stopcodon enthält (D.). Durch die Nutzung einer weiteren, stromabwärts gelegenen *Agel*-Schnittstelle der *gfp*-Sequenz wurde der Anfangsbereich des PCR-Produktes nicht mit in den *attP*-Vektor pSWU30:*pro-frzZ* WTneu kloniert. Dem tatsächlichen Fusionsprodukt (E.) fehlten die beiden letzten Aminosäuren des FrzZ-Proteins und die ersten 8 Aminosäuren des GFP-Proteins.

Eine Ligation in den vorbereiteten *attP*-Vektor mit anschließender Elektroporation in *E. coli* Top10 Zellen brachte oxytetracyclinresistente Klone hervor. Deren Plasmid-DNA wurde zunächst durch einen PCR-Schnelltest unter Verwendung des *primer* Paares *frzZ*AgelGFP (siehe Abb. 5.12, A.) mit GFP-stop überprüft. Die anschließende Sequenzierung der Nukleotidfolge des Vektors pSWU30:*pro-frzZ* WTneu-GFP zeigte jedoch, dass bei dem terminalen Schritt der Klonierung, der Ligation des *gfp* PCR-Produkts aus pCR®-Blunt II-TOPO:Agel-GFP in den *attP*-Vektor durch Restriktion mittels der Enzyme Agel und EcoRI, ein Fehler unterlaufen war. Durch die Nutzung einer weiteren Agel-Schnittstelle des Plasmids pFCrGFP unterhalb des Startcodons des *gfp*-Gens (siehe Abb. 5.12, C.) wurde der 5'-Nukleotidüberhang sowie der Anfang des Gens nicht mitkloniert. Dem tatsächlichen Fusionsprodukt fehlen insgesamt 10 Aminosäuren, wie in der Abbildung 5.12, E. dargestellt und im Text beschrieben ist.

5.2.2.2 Akkumulation von FrzZ-GFP

Das Konstrukt pSWU30:*pro-frzZ* WTneu-GFP wurde durch eine *attP-attB* vermittelte Rekombination in das Chromosom der *M. xanthus* Stämme DZ2Δ*frzZ* (DZ4484), DK1217M*xfrzZ*, DK1300M*xfrzZ*, DZ4314 und der *pph1⁻ frzZ* Doppelmutante DZ2Δ*frzZ*M*xpph1* (siehe auch Punkt 5.5.5) integriert. Die aus der Transformation der Plasmid-DNA hervorgegangenen Kolonien wurden zunächst auf eine Oxytetracyclinresistenz überprüft, die durch den Vektor pSWU30 vermittelt wurde. Zur genaueren Analyse wurden resistente Klone in Flüssigkultur mit den entsprechenden Antibiotika angezogen, um *Western Blot* Analysen durchführen zu können (Abb. 5.13). Die mit GFP fusionierte Form des FrzZ-Proteins ist mit 56,1 kDa deutlich größer als die native Form und konnte so durch den FrzZ-spezifischen Antikörper auch in Stämmen detektiert werden, die über eine chromosomale Wildtypkopie des *frzZ*-Gens verfügen.

In Abbildung 5.13 ist das Ergebnis der *Western Blot* Analyse zum Nachweis der Integration des *attP*-Vektors pSWU30:*pro-frzZ* WTneu-GFP bzw. zur Demonstration einer Akkumulation des kodierten GFP-Fusionsproteins im Hintergrund der *frzZ*-Deletionsmutante DZ2Δ*frzZ* und der Phosphatasemutante DZ4314 gezeigt.

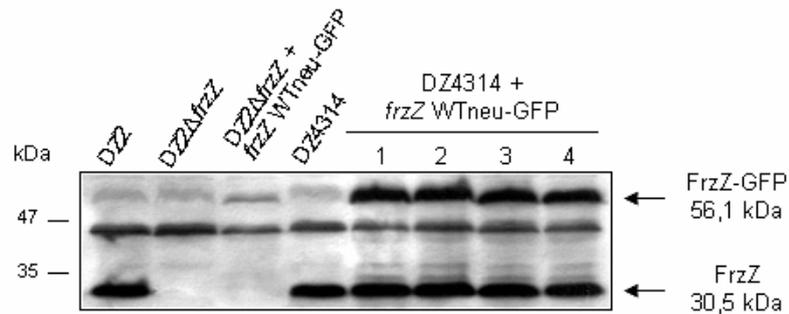


Abbildung 5.13: *Western Blot* Analyse der FrzZ- und FrzZ-GFP Akkumulation. Verwendet wurden ganze Zellen der Stämme DZ2, DZ2ΔfrzZ, DZ2ΔfrzZ::pSWU30:pro-frzZ WTneu-GFP, DZ4314 und von vier Klonen des Stamms DZ4314::pSWU30:pro-frzZ WTneu-GFP (1 – 4). Es wurden gleiche Mengen an ganzen Zellen verwendet, die aus Flüssigkulturen durch Zentrifugation geerntet, in 1x SDS Auftragspuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C inkubiert wurden. Die Detektion erfolgte mit FrzZ-spezifischem Antikörper (Pineda AK-Service, Berlin).

Der FrzZ-spezifische Antikörper war in der Lage, auch das FrzZ-GFP Protein zu erkennen, wie die Signale auf Höhe des 56,1 kDa Proteins in den Spuren der Transformationsklone (+ *frzZ* WTneu-GFP) zeigten. Des Weiteren war der Akkumulationslevel des GFP-fusionierten *response* Regulators in allen Transformationsklonen des Stamms DZ4314 (in der Abb. 5.13: DZ4314 + *frzZ* WTneu-GFP 1-4) mit dem der Wildtypform (30,5 kDa) vergleichbar. Vor dem Hintergrund des Stammes DZ2ΔfrzZ akkumulierte allerdings deutlich weniger FrzZ-GFP. Das konnte durch eine erneute Transformation des Stammes DZ2ΔfrzZ mit pSWU30:pro-frzZ WTneu-GFP Plasmid-DNA verbessert, wenn auch nicht ganz behoben werden. Der DZ2ΔfrzZ::pSWU30:pro-frzZ WTneu-GFP Klon, mit dem schließlich weitergearbeitet wurde, zeigte weiterhin eine verringerte FrzZ-GFP Akkumulation (Daten nicht gezeigt).

Bereits früher konnte durch die Integration eines *frzZ*-Konstruktes mit einem fehlerhaften 3'-Ende eine verminderte Akkumulation des Genproduktes im Hintergrund des Stammes DZ2ΔfrzZ beobachtet werden (siehe Punkt 5.1.1.1). Daraus könnte man ableiten, dass der C-Terminus des FrzZ-Proteins essentiell für dessen Stabilität ist. Dieser Effekt wurde nicht in Stämmen beobachtet, die über eine intakte chromosomale Kopie des *response* Regulator Gens verfügten (siehe Abb. 5.13). Möglicherweise wird also eine veränderte FrzZ-Variante durch das gleichzeitige Vorhandensein intakten Proteins stabilisiert.

5.2.2.3 Betrachtungen der Lokalisierung von FrzZ-GFP

Bevor durch Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisierung des *response* Regulators FrzZ in der Zelle untersucht werden konnte, musste zunächst festgestellt werden, ob die Akkumulation des verkürzten FrzZ-GFP Fusionsproteins die Defekte des *M. xanthus* Stamms DZ2 Δ *frzZ* komplementieren konnte. Zu diesem Zweck wurde zum Einen die Schwärmfähigkeit des Stamms DZ2 Δ *frzZ*::pSWU30:*pro-frzZ* WTneu-GFP unter vegetativen Bedingungen durch *colony expansion* Versuche getestet. In diesen Experimenten konnte kein Unterschied zu dem Wildtypstamm DZ2 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Unter Differenzierungsbedingungen bewirkte die Integration der FrzZ-GFP Fusion in den *frzZ* Stamm allerdings eine langsamere und unvollständige Aggregation der Zellen zu Fruchtkörpern, wie in Abbildung 5.14 dargestellt ist.

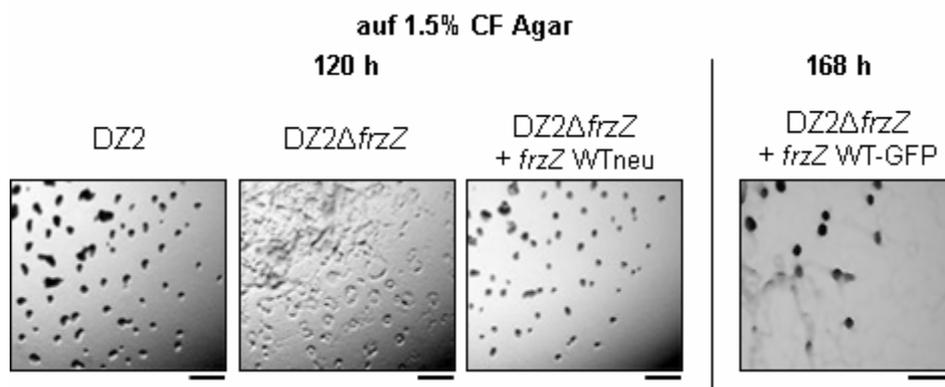


Abbildung 5.14: Morphologische Differenzierung der mit *frzZ* WTneu und *frzZ* WT-GFP komplementierten DZ2 Δ *frzZ* Stämme im Vergleich zu DZ2 Wildtyp und der *frzZ* Mutante DZ2 Δ *frzZ*. Zur Vorbereitung wurden exponentiell wachsende Kulturen durch Zentrifugation geerntet und mit CF Medium ohne Nährstoffe gewaschen, um verbliebene Nährstoffe zu entfernen. 5 μ l einer Suspension mit einer OD₆₀₀ von 10 wurden auf CF Agarplatten getropft. Die gezeigten Bilder sind repräsentative Aufnahmen eines der drei Ansätze für jeden getesteten Stamm aus einem Experiment und zeigen den Kolonierand nach sieben Tagen. Die schwarzen Balken markieren einen Bereich von 1 mm.

Die Abbildung 5.14 zeigt die Differenzierung der Stämme DZ2 Δ *frzZ*::pSWU30:*pro-frzZ* WTneu und WTneu-GFP im Vergleich zu DZ2 Wildtyp und dem Elternstamm DZ2 Δ *frzZ*. Während die Integration der Wildtypkopie des *frzZ*-Gens den Differenzierungsdefekt des Elternstamms komplementieren konnte, bewirkte die mit GFP-fusionierte Form des *response* Regulators eine unvollständige Differenzierung. Es wurden Fruchtkörper gebildet, doch viele Zellen des Schwarms verblieben außerhalb der Strukturen in den typischen Filamenten *frzZ*-defekter Stämme (Abb. 5.14, linker unterer Rand des rechten Bildes). Des Weiteren benötigte der Stamm DZ2 Δ *frzZ*::pSWU30:*pro-frzZ* WTneu-GFP

sieben Tage, um Aggregate und schließlich Fruchtkörper zu bilden. Er zeigte also eine zeitlich leicht verzögerte Differenzierung.

Wie bereits für die Konstruktion und ortsspezifische Integration des Vektors pSWU30:*pro-frzZ* ausgeführt (siehe Punkt 5.1.1.1), zeigte sich hier erneut, dass ein FrzZ-Protein mit einem fehlerhaften C-Terminus den *frzZ* Stamm DZ2Δ*frzZ* nicht vollständig komplementieren konnte. Der Grund dieser Beobachtung könnte darin zu suchen sein, dass die terminalen Aminosäuren einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität des Proteins haben. Das könnte folglich zu einem verringerten Level an FrzZ in den Zellen führen. Aufgrund dieser Ergebnisse erschien es daher nicht sinnvoll, mit der detaillierten Analyse einer verkürzten Version des GFP-fusionierten *response* Regulators *in vivo* fortzufahren. Die in Abbildung 5.15 gezeigten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen können lediglich als Anfang der Etablierung dieser Methode zur Untersuchung der Lokalisierung des FrzZ-Proteins in der lebenden Zelle betrachtet werden.

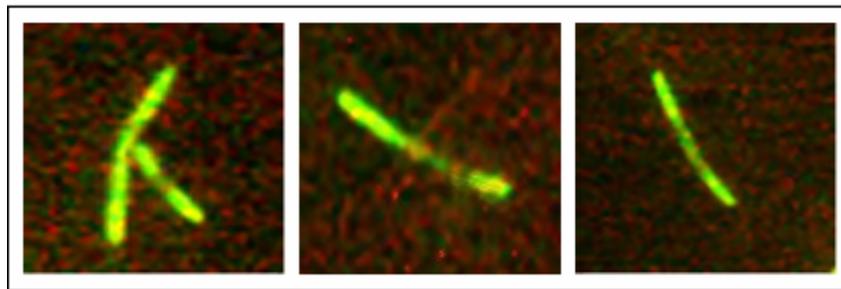


Abbildung 5.15: Mikroskopische Betrachtung (1000fach) der Lokalisierung von FrzZ-GFP in der Zelle. Das linke Bild zeigt zwei, das mittlere und rechte Bild jeweils eine *M. xanthus* Zelle. Gezeigt ist der Stamm DZ2Δ*frzZ*::pSWU30:*pro-frzZ* WTneu-GFP. Das Zellmaterial wurde unmittelbar vor der mikroskopischen Analyse von CYE Platten genommen und in CYE Medium resuspendiert. Ein dünner Flüssigkeitsfilm wurde dann auf Objektträger aufgebracht, die mit Agarose beschichtet waren, um die Gleitbewegung zu ermöglichen.

Für die verkürzte Version des GFP-fusionierten *response* Regulators sah man in 75% der untersuchten Zellen eine polare Lokalisierung. Diese war jedoch keine begrenzte, punktförmige Ansammlung, wie sie für das FrzS-Protein beobachtet werden konnte (Mignon et al., 2005), sondern reicht jeweils bis in das mittlere Drittel einer Zelle hinein. Des Weiteren war gleichzeitig an beiden Polen der Zelle Fluoreszenz zu finden, wobei augenscheinlich kein Unterschied in der Intensität der Signale bestand. Beide Beobachtungen entsprachen den bisherigen Ergebnissen zur Funktion des FrzZ-Proteins *in vivo*, welches an der Regulation des A- sowie des S-Motilitätssystems beteiligt ist und folglich auch an beiden Zellpolen zur gleichen Zeit zu finden sein sollte.

5.3 Identifikation potenzieller Interaktionspartner von FrzZ

5.3.1 Identifikation potenzieller Interaktionspartner durch Co-Immunopräzipitation

Um Interaktionspartner des *response* Regulators FrzZ zu identifizieren, wurde unter anderem eine Co-Immunopräzipitation (Co-IP) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden spezifische anti-FrzZ Antikörper aus Kaninchen (Pineda AK-Service, Berlin) an Protein-A-Sephrose gebunden und mit frischem Zellextrakt aus exponentiell gewachsenen Flüssigkulturen von *M. xanthus* inkubiert (siehe Punkte 4.6.8.1, 4.6.8.2). Durch die Bindung des FrzZ-Proteins aus dem Zellextrakt an die Antikörper sollte es möglich sein, andere Proteine, die mit dem *response* Regulator assoziiert vorliegen, ebenfalls zu präzipitieren. Als Negativkontrolle wurde ein Extrakt der *frzZ* Mutante DZ4484 genutzt.

Die gesammelten Wasch- und Elutionsfraktionen der Co-IP wurden über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht. Es konnten keine Unterschiede im Bandenmuster der genutzten Extrakte detektiert werden, die auf spezifische Interaktionspartner des *response* Regulators FrzZ hingedeutet hätten. Darüberhinaus war das FrzZ-Protein in den Proben des Wildtypextrakts auch durch eine Wiederholung der analytischen Gelelektrophorese mit anschließendem *Western Blot* nicht zu detektieren. Infolgedessen war in diesem Fall keine Co-Präzipitation eines mit FrzZ komplexierten Proteins zu erwarten.

5.3.1.1 Immunopräzipitation von gereinigtem His₆-FrzZ

FrzZ-spezifischer Antikörper, zu dessen Herstellung FrzZ-Protein unter denaturierenden Bedingungen gereinigt und durch die Auftrennung über SDS-Polyacrylamidgele gewonnen wurde (Trudeau et al., 1996), konnte nie erfolgreich in Experimente eingesetzt werden, welche die Erkennung des nativen Proteins erforderten. Um dies zu ermöglichen, wurde das FrzZ-Protein im Rahmen dieser Arbeit unter nativen Bedingungen gereinigt und zur Herstellung neuer Antikörpern genutzt (siehe Punkt 4.6.7).

Um nun sicherzustellen, dass die Co-Immunopräzipitation mit Zellextrakten nicht erneut an dem oben beschriebenen Problem gescheitert war, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Dazu wurde das durch Ni²⁺-Affinitätschromatografie gereinigte His₆-FrzZ E/N-Protein mit den *beads* inkubiert, wie unter Punkt 4.6.8.3 beschrieben. Nach zehnmaligem Waschen wurden die Proteine durch das Absenken des pH-Wertes eluiert. Die Analyse erfolgt durch das Auftrennen der Proben über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel und eine anschließende Silberfärbung, um die Proteinbanden zu visualisieren. Wie eine Konzentrationsbestimmung des Überstandes nach der Inkubation

mit den *beads* zeigte, hatten ca. 50% der eingesetzten Menge an gereinigtem His₆-FrzZ E/N-Protein an die gekoppelte Protein-A-Sepharose gebunden. Da der *response* Regulator in keiner der Waschfraktionen zu detektieren war, erfolgte die Bindung von FrzZ an die Antikörper sehr spezifisch. Im Gegensatz dazu konnte das Protein durch die Silberfärbung jedoch in allen Elutionsfraktionen nachgewiesen werden.

Es war also davon auszugehen, dass eine Immunopräzipitation des *response* Regulators prinzipiell möglich war, da die Antikörper das Protein spezifisch erkannten. Wahrscheinlich war aber der Gehalt an FrzZ in den zuvor genutzten Zellextrakten zu gering, um dieses Verfahren unmodifiziert zur Co-Präzipitation von Interaktionspartnern aus dem zellulären Milieu durchzuführen.

5.3.2 Das Hefe Zwei-Hybrid System – ein theoretischer Überblick

Um *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen untersuchen zu können, macht man sich die Zusammensetzung vieler eukaryontischer Transkriptionsfaktoren aus zwei funktionell unabhängigen Domänen zu Nutze. Die hier verwendete Version des Hefe Zwei-Hybrid Systems beruht auf dem Transkriptionsfaktor GAL4 der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Werden seine DNA-Bindedomäne (BD) und die Aktivierungsdomäne (AD) voneinander getrennt, behalten beide ihre charakteristischen Eigenschaften, die GAL4-vermittelte Transkription findet jedoch nicht mehr statt. Um zwei potenziell miteinander interagierende Proteine untersuchen zu können, wird ein Protein mit der GAL4-BD und das andere mit der GAL4-AD fusioniert. Beide werden in derselben Hefezelle co-exprimiert. Findet eine Interaktion der Proteine statt, gelangen die beiden Domänen des Transkriptionsfaktors GAL4 in räumliche Nähe zueinander und aktivieren die Transkription von Reportergenen.

Im Falle des hier verwendeten Hefestamms PJ96-4A wurden die Gene für die Synthese der Aminosäuren Histidin und Alanin sowie das *lacZ*-Gen, welches für das Enzym β -Galaktosidase kodiert, als Reportergene verwendet. Diese stehen unter der Kontrolle unterschiedlicher, GAL4-induzierbarer Promotoren. Um zunächst auf Hefezellen zu selektionieren, die sowohl die AD- als auch die BD-Fusion enthielten, wurden die Zellen ohne die Aminosäuren Leucin und Tryptophan angezogen. Auch diese Aminosäuren können nur synthetisiert werden, wenn beide GAL4-Domänen in einer Zelle exprimiert werden.

5.3.2.1 Untersuchung von FrzZ im Hefe Zwei-Hybrid System

Für den myxobakteriellen *response* Regulator FrzZ wurden bereits früher Interaktionsstudien mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid Systems durchgeführt. In diesen lagen

die beiden CheY-ähnlichen Domänen des Proteins getrennt voneinander vor. Für die N-terminale Domäne (Z1) konnte eine Interaktion mit einem ABC-Transporter (AbcA) und einem ECF-Sigma-Faktor (RpoE1) gezeigt werden (Ward et al., 1998a, b), während die PP2C-Phosphatase Pph1 als Interaktionspartner der C-terminalen Domäne (Z2) identifiziert wurde (Treuner-Lange et al., 2001).

Kurz vor Beginn dieser Arbeit wurde von Linda Plamann (University of Missouri, Kansas City) eine neue Genbank des *M. xanthus* Genoms erstellt. Zu diesem Zweck wurde die chromosomale DNA mit den Enzymen *Acil*, *HinPII* oder *MspI* geschnitten, die einen 5'-CG Überhang produzierten. Die dabei entstandenen Fragmente sollten in ihrer Länge theoretisch zwischen 500 bp und 2000 bp liegen und konnten als Aktivierungsdomänenfusion in die *ClaI*-Schnittstelle der Vektoren pGAD-C1, C2 und C3 kloniert werden (Thomasson et al., 2002). Dadurch wurden AD-Fusionen in allen drei Leserastern generiert, so dass theoretisch jedes Fragment in einem der drei Vektoren in seinem nativen Leserahmen translatiert werden sollte (James et al., 1996). Mit dieser neuen Genbank wurde in unserem Labor durch die Transformation von *E. coli* Zellen zunächst ermittelt, welche Menge an Plasmid-DNA benötigt wurde, um eine repräsentative Genbank von 2×10^7 Kolonien für jeden der pGAD-Vektoren zu erhalten (Werte nach Parchaliuk et al., 1999; aus <http://research.bmn.com/tto>). Die daraus resultierenden Klone wurden mit einer Salzlösung (NaCl, 150 mM) von den LB Agarplatten abgeschwemmt und zur Plasmidisolierung genutzt. Gleichzeitig wurden Glycerin-Dauerkulturen angelegt.

Die Transformation der Hefezellen wurde wie unter Punkt 4.1.7.3 beschrieben durchgeführt. Es wurden 0,5 mg Genbank Plasmid-DNA und 1 mg des Plasmids pBD:*frzZ*, auf dem das intakte FrzZ-Protein kodiert vorlag, in den Hefe-Stamm PJ96-4A transformiert. Die Reaktionen wurden zunächst auf SD Selektionsplatten ohne Leucin, Tryptophan und Histidin ausgebracht. Nach fünf Tagen wuchsen auf allen Transformationsplatten jeweils über 50 Klone. Diese wurden abgenommen und auf SD Platten ausgestrichen. Diesen fehlte, zusätzlich zu den bereits genannten Aminosäuren, auch Alanin. Auf diesen Platten konnten insgesamt noch 63 Klone wachsen, acht davon auf den Platten des Ansatzes pBD:*frzZ* + pGAD-C1, 30 auf den pBD:*frzZ* + pGAD-C2 Platten und 25 auf den pBD:*frzZ* + pGAD-C3 SD Agarplatten. Alle diese Klone wurden auf ihre β -Galaktosidase Aktivität hin überprüft. Nur zwei Klone zeigten nach Inkubation mit dem Substrat X-Gal eine Blaufärbung. Diese entstammten dem Ansatz pBD:*frzZ* + pGAD-C1 (C1-Z4 und C1-Z5). Sie wurden in Flüssigkultur angezogen und erneut auf ihr Wachstum in SD Medium ohne Leucin, Tryptophan und Alanin überprüft. C1-Z5 konnte in

diesem stringenteren Test nicht überzeugen, während C1-Z4 ein ebenso gutes Wachstum wie die Positivkontrolle (p53 mit pSV40) zeigte. Die Plasmid-DNA dieses Klons wurde anschließend präpariert und das *insert* sequenziert. Unter Verwendung der Programme *blastp* und *blastn* wurde die Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) auf Homologien zu bekannten Proteinen durchsucht.

Die in C1-Z4 identifizierte Nukleotidfolge ergab ein Peptid von 66 Aminosäuren Länge. Eine Datenbanksuche mit dieser Sequenz erbrachte zwei Treffer. In *M. xanthus* konnte ein Protein mit einer zu 100% identischen Aminosäuresequenz identifiziert werden, während ein Protein des Organismus *Stigmatella aurantiaca* einen zu 68% identischen Bereich aufwies. In der Tabelle 5.1 sind die identifizierten Sequenzen, Daten zur Signifikanz der Ergebnisse (*e-Value*) sowie die übereinstimmenden Reste mit der in C1-Z4 identifizierten Aminosäurefolge dargestellt. Alle präsentierten Daten wurden dem Programm *blastp* und der Datenbank des NCBI entnommen.

Tabelle 5.1: Ergebnisse der Hefe Zwei-Hybrid Analyse. Die Tabelle gibt die in C1-Z4 identifizierte Nukleotidfolge als Sequenz von 66 Aminosäuren (*query*) wieder und vergleicht sie mit den homologen Sequenzen (*subject*), die in der NCBI Datenbank identifiziert wurden. Übereinstimmende Reste der Aminosäuresequenz sind rot gedruckt.

	Organismus	Gen	e-Value	Identität
	<i>Myxococcus xanthus</i> DK1622	MXAN_1922	5e-27	66/66 (100%)
Query	1	IETFLIDEDWRSVESVSARLASNDKVIDPSSDLHKQLVKFKLAGRFKLADQLMAESKYEEAAKYI	66	
		IETFLIDEDWRSVESVSARLASNDKVIDPSSDLHKQLVKFKLAGRFKLADQLMAESKYEEAAKYI		
Sbjct	644	IETFLIDEDWRSVESVSARLASNDKVIDPSSDLHKQLVKFKLAGRFKLADQLMAESKYEEAAKYI	709	
	<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1	STIAU_7038	2e-17	58/66 (68%)
Query	1	IETFLIDEDWRSVESVSARLASNDKVIDPSSDLHKQLVKFKLAGRFKLADQLMAESKYEEAAKYI	66	
		+E+FLID+DWRSVE VS RL +N VIDPSS+L+K+LVK+KL+GRFKLADQL+A +Y+EAA KY+		
Sbjct	610	VESFLIDKDWRVSEVSGRLIANKDVIDPSSSELYKELVKYKLSGRFKLADQLLAAGQYDEAAKKYL	675	

Um mehr über die so identifizierten Proteine zu erfahren, wurden durch die Eingabe der kompletten Aminosäuresequenzen in das Programm SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/smart>) ein Modell der Raumstrukturen sowie vorhandener, konservierter Bereiche erstellt. Obwohl nur das myxobakterielle Protein *in vivo* als Interaktionspartner für den *response* Regulator FrzZ in Frage kam, wiesen beide Proteine eine ähnliche Domänenkomposition auf. Diese ist in der Abbildung 5.16 schematisch dargestellt.

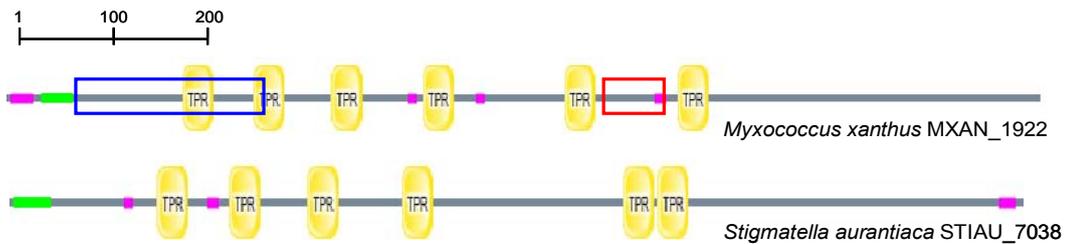


Abbildung 5.16: Modell der Genprodukte von MXAN_1922 und STIAU_7038. Die Strukturanalyse wurde durch die Eingabe der Aminosäuresequenz (aus NCBI *Sequence Viewer* v2.0) in das Programm SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/smart>) erstellt. Im Modell sind Sekundärstrukturen wie konservierte Domänen (TPR-Domänen, gelb), *coiled-coil* Bereiche (grün), aber auch Bereiche geringer Komplexität (pink) dargestellt. Der rote Kasten zeigt den Bereich der Interaktion mit FrzZ, wie er im Hefe Zwei-Hybrid-System identifiziert wurde, der blaue Kasten den zur homologen Rekombination genutzten Sequenzbereich (siehe Punkt 5.4.1). Das Längenmaß zeigt einen Bereich, dem im Proteinmodell 100 bzw. 200 Aminosäuren entsprechen.

Durch den Eintrag der Aminosäuresequenz beider Proteine in das Programm Vektor NTI konnte für das Produkt des Gens MXAN_1922 eine Länge von 1111 Aminosäuren (AS) und ein theoretisches Molekulargewicht von 125,7 kDa kalkuliert werden. Das Genprodukt von STIAU_7038 umfasste 1077 AS und war mit 123 kDa unwesentlich kleiner. Beide Proteine kennzeichneten sich durch den Besitz von sechs TPR-Motiven. TPR-Motive sind Wiederholungen von 34 Aminosäuren, die zuerst in Regulatoren der Zellmitose in Hefe entdeckt wurden (Sikorski et al., 1990). Die Analyse unterschiedlicher TPR-Proteine lieferte eine Konsensussequenz des Motivs, die in der Abbildung 5.17 dargestellt und mit der Aminosäurefolge der sechs TPR-Motive des MXAN_1922 Genprodukts verglichen wurde.



Abbildung 5.17: Vergleich des TPR-Konsensus mit den sechs TPR-Motiven des Genprodukts von MXAN_1922. Übereinstimmende Positionen sind fett gedruckt. Aminosäuren, deren Seitenketten in Größe oder Hydrophobie der Aminosäuren der Konsensussequenz entsprechen, sind rot gedruckt. Die beiden α -Helices des TPR-Motivs sind als roter bzw. blauer Zylinder dargestellt.

Der Vergleich des Konsensus mit den TPR-Motiven des FrzZ-Proteins zeigte eine hohe Konservierung für den *response* Regulator, insbesondere die Aminosäuresequenz der zweiten Helix betreffend (siehe Abb. 5.17). Auch wenn der im Hefe Zwei-Hybrid System identifizierte Sequenzbereich nicht in einer TPR-Domäne lag (siehe Abb. 5.16, roter Kasten), konnte eine Interaktion zwischen dem Genprodukt von MXAN_1922 (das Protein wird im Folgenden als „TPR“ bezeichnet) und dem *response* Regulator FrzZ nicht ausgeschlossen werden und wurde im Folgenden eingehender untersucht.

5.4 Rolle des TPR-Proteins in *M. xanthus*

Durch die Untersuchungen im Hefe Zwei-Hybrid System wurde TPR als potenziell mit dem *response* Regulator FrzZ interagierendes Protein identifiziert. Da über die Funktion von TPR aus *M. xanthus* bisher noch keine Erkenntnisse vorlagen, sollte durch die Inaktivierung des chromosomalen *tpr*-Gens (MXAN_1922) und die anschließende Analyse der Mutante untersucht werden, welche Rolle das Protein in der Zelle spielt.

5.4.1 Inaktivierung des *tpr*-Gens (MXAN_1922) in *M. xanthus*

Die Inaktivierung des chromosomalen *tpr*-Gens erfolgte durch die Insertion eines Vektors durch einfache homologe Rekombination (*single cross-over*) in diesen Bereich der chromosomale DNA. Das Ereignis wurde durch einen Sequenzabschnitt des Plasmids ermöglicht, der homolog zu der Zielsequenz des *tpr*-Gens war. Gleichzeitig vermittelte der Vektor eine Resistenz, über die zunächst auf positive Transformanten selektioniert werden konnte. Nachfolgend konnte so ein Selektionsdruck aufrechterhalten werden, der verhinderte, dass die Fremd-DNA wieder aus dem Chromosom ausgekreuzt wurde.

Als homologer Bereich wurden 604 bp des *tpr*-Gens durch eine PCR-Reaktion (*Pfu* Polymerase, Fermentas) mit den Oligonukleotiden *tprint+* und *tprint-* aus dem DZ2 Wildtyp Chromosom amplifiziert. Das entsprach dem Abschnitt der Aminosäuresequenz des Genprodukts TPR, der in der Abb. 5.16 als blauer Kasten markiert ist. Dieses Fragment wurde über ein Agarosegel aufgetrennt, gereinigt und in den pCR[®]-Blunt II-TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert. Die Ligationsreaktion wurde in *E. coli* Top10 Zellen transformiert und auf LB Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert. Kanamycinresistente Klone wurden durch einen PCR-Schnelltest (*primer tprint+* mit *tprint-*) und einen Restriktionsverdau mit dem Enzym *EcoRI* überprüft. Durch den Verdau des Vektors pCR[®]-Blunt II-TOPO:*tprint* entstanden in positiven Klonen zwei Fragmente von 3501 und 622 bp Länge. Die Nukleotidfolge wurde in einer Sequenzierreaktion unter Nutzung der Oligonukleotide

M13F und M13R überprüft und erwies sich als richtig. Nachfolgend wurde der Vektor pCR[®]-Blunt II-TOPO:*tprint* durch Elektroporation in die *M. xanthus* Stämme DZ2, DZ2 Δ *frzZ*, DK1217, DK1300 und DK10417 transformiert. Die chromosomale DNA kanamycinresistenter Klone dieser Reaktionen wurde präpariert und in PCR-Reaktionen mit verschiedenen Oligonukleotid-Paarungen auf eine Insertion des Plasmids hin untersucht. Die verwendeten *primer* sowie die erwarteten Fragmente sind in der Tabelle 5.2 zusammengefasst.

Tabelle 5.2: Ergebnisse der PCR-Reaktion mit unterschiedlichen *primer* Paaren zur Überprüfung der homologen Rekombination des Plasmids pCR[®]-Blunt II-TOPO:*tprint* in das chromosomale *tpr*-Gen.

Oligonukleotid Paar	Integration	keine Integration
<i>tpr+167</i> , <i>tprint-</i>	✓ 649 bp	✓ 649 bp
<i>tprint+</i> , <i>tpr-881</i>	✓ 669 bp	✓ 669 bp
<i>tpr+167</i> , <i>tpr-881</i>	✗ (4836 bp)	✓ 714 bp

Die Oligonukleotide *tpr+167* und *tpr-881* sind chromosomspezifische *primer*, die stromaufwärts bzw. –abwärts der Zielsequenz des *tpr*-Gens an die DNA binden. Auf unveränderter chromosomaler DNA wurde mit dieser Reaktion ein 714 bp großes Fragment amplifiziert. Hatte ein *single cross-over* Ereignis stattgefunden, war in diesem Bereich zusätzlich das Plasmid pCR[®]-Blunt II-TOPO:*tprint* in die chromosomale DNA inseriert und der zu amplifizierende Bereich vergrößerte sich auf 4836 bp. Das war unter den gewählten Bedingungen der PCR-Reaktion nicht zu zeigen. Für jeden transformierten *M. xanthus* Stamm wurden so mehrere kanamycinresistente Klone überprüft. Es wurde jeweils mit einem Klon weitergearbeitet. Die Stämme werden im Folgenden mit DZ2*tprint*, DZ2 Δ *frzZtprint*, DK1217*tprint*, DK1300*tprint* und DK10417*tprint* bezeichnet.

5.4.2 Charakterisierung von TPR *in vivo*

Bei der Kultivierung in Flüssigkulturen zeigten die *tpr*-Insertionsmutanten ein extrem inhomogenes Wachstum. Auch unter Schütteln bei einer höheren Umdrehungszahl verteilten sich die Zellen nicht gleichmäßig im Medium, sondern hafteten aneinander und

wuchsen am Glas des Kultivierungskolbens in einem dicken Ring auf Höhe des Flüssigkeitsmeniskus.

Ein ähnlicher Phänotyp konnte auch in *M. xanthus* Zellen mit einem *pilT*-Defekt beobachtet werden (Wu et al., 1997). Im Gegensatz zu Mutationen in den anderen *pil*-Genen konnten diese Zellen Pili ausbilden, zeigten jedoch keine S-Motilität. Auf der Oberfläche entsprechender Zellen konnten sogar mehr Typ IV Pili (TFP) detektiert werden, als auf Wildtypzellen (Sun et al., 2000; Wu and Kaiser, 1997). Da das PilT-Protein in bakteriellen Spezies, welche TFP zur Fortbewegung nutzen, an deren ATP-abhängiger Retraktion beteiligt war, resultierte der beobachtete Phänotyp aus einer defekten Retraktion dieser Strukturen (zur Übersicht Nudleman and Kaiser, 2004).

5.4.2.1 Intrazellulärer PilA-Gehalt und PilA-Gehalt der Zelloberfläche der *tpr*-Insertionsmutanten

Um zu untersuchen, ob die Inaktivierung des *tpr*-Gens einen ähnlichen Defekt verursacht haben könnte, wurden die Kontroll-, Eltern- und Mutantenstämme zunächst auf ihren Gehalt an PilA untersucht. PilA ist das Pilin, aus dem sich das Pilus-Filament zusammensetzt. Dies geschieht durch Interaktionen der hydrophoben N-Termini vieler PilA-Monomere, wobei der genaue Assemblierungsmechanismus noch unbekannt ist. Um weiterhin zu unterscheiden, ob die PilA-Akkumulation in den Zellen oder die Ausbildung der Pili beeinflusst war, wurde sowohl der intrazelluläre PilA-Gehalt als auch der PilA-Gehalt der Zelloberfläche untersucht. Wie unter Punkt 4.1.10.4 beschrieben, wurden zu diesem Zweck die Pili von den Zelloberflächen der untersuchten Stämme geschert und präzipitiert. Aus den verbleibenden ganzen Zellen wurde ein Extrakt gewonnen. Beides wurde über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch einen *Western Blot* mit PilA-spezifischem Antikörper detektiert. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 5.18 dargestellt.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass alle untersuchten Stämme einen vergleichbaren intrazellulären Level an PilA aufwiesen (Abb. 5.18, A., C.). Da die Abbildungen 5.18, A. und B. bzw. C. und D. zwei unterschiedlichen Präparationen entstammen, können sie nur in sich zu Vergleichen herangezogen werden. In allen Experimenten erwies es sich als schwierig, die Pili von den Zelloberflächen der Wildtypstämme DZ2 und DK1622 zu präparieren. Vergleicht man die Intensität des PilA-Signals für DK1622 in den Abbildungen 5.18, B. und D., so ist davon auszugehen, dass das Signal für die Wildtypstämme in der Abb. 5.18, B. einen etwas zu geringen extrazellulären PilA-Gehalt widerspiegelt.

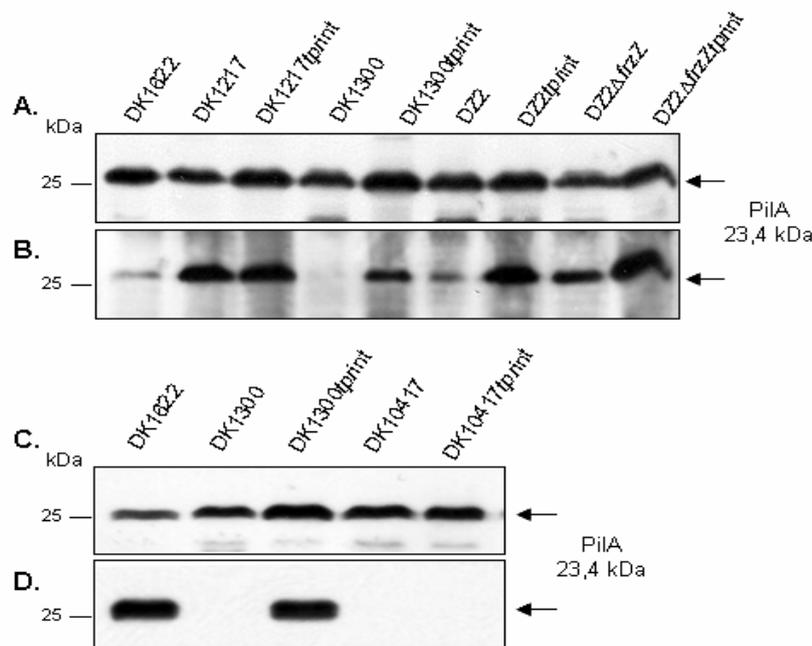


Abbildung 5.18: Western Blot Analyse der intrazellulären PilA-Akkumulation (**A.** und **C.**) sowie des PilA-Gehalts der Zelloberfläche (**B.** und **D.**). Getestet wurden die Wildtypstämme DZ2 und DK1622, die *frzZ* Mutante *DZ2ΔfrzZ*, die bewegungsdefekten Stämme DK1217 (A^+S^+), DK1300 (A^+S^-) und DK10417 (A^-S^-) sowie die dazu gehörigen *tprint* Mutanten. Zur Bestimmung des intrazellulären PilA-Gehalts wurden Zellextrakte verwendet. Es wurden 30 μ g Protein/Spur geladen. Das PilA-Protein der Zelloberfläche wurde durch einen Pili-Scherungsassay gewonnen, in 1x SDS Auftragspuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurde auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion erfolgte mit PilA-spezifischem Antikörper (Wu and Kaiser, 1997).

Der Pili-Scherungsassay zeigte weiterhin, dass die Inaktivierung des *tpr*-Genproduktes einen positiven Effekt auf den extrazellulären PilA Gehalt hatte (Abb. 5.18, B., D.). Für die *tprint* Mutanten der Stämme DK1217, DZ2 und *DZ2ΔfrzZ* war das PilA-Signal der gescherten Pili deutlich stärker, als das der Elternstämme (Abb. 5.18, B.). Auf der Zelloberfläche der *M. xanthus* Elternstämme mit einem defektem S-Motilitätssystem, DK1300 (*pilC*-Punktmutante, Hodgkin and Kaiser 1979b) und DK10417 (*pilC*-Deletionsmutante), konnte dagegen kein PilA detektiert werden (Abb. 5.18, D.). Diese Beobachtung war darauf zurückzuführen, dass das PilC-Protein in *M. xanthus* an der Ausbildung der Pili, nicht aber an der Synthese der strukturellen Untereinheiten beteiligt ist (Nunn et al., 1990; Wall and Kaiser, 1999). Wie aus dem Pili-Scherungsassay deutlich wurde, supprimierte die Inaktivierung des *tpr*-Genproduktes im Fall der *pilC*-Punktmutante DK1300*tprint* diesen Defekt und führte zu einer Akkumulation von PilA auf der Zelloberfläche. Die Intensität des Signals deutete weiterhin auf einen extrazellulären Level an PilA hin, der mit dem des Wildtyps DK1622 vergleichbar war, während die *pilC*-Deletionsmutante DK10417*tprint* dort weiterhin kein PilA-Signal zeigte (Abb. 5.18, D).

5.4.2.2 Schwärmverhalten der *tpr*-Insertionsmutanten unter vegetativen Bedingungen

Mutanten, die auf ihrer Zelloberfläche mehr Pili aufweisen als der Wildtyp, werden als hyperpiliert (*hyperpiliated*) bezeichnet. Charakteristisch für diese Zellen ist das Fehlen von S-Motilität, was wahrscheinlich in allen bisher beschriebenen Fällen auf eine defekte Retraktion der Pili zurückzuführen ist (Bowden and Kaplan, 1998; Sun, 2000; Li et al., 2003). Um eine Aussage über den Einfluss der Inaktivierung des *tpr*-Genprodukts auf die Bewegungsfähigkeit der Zellen machen zu können, wurden die Kontroll-, Eltern- und Mutantenstämme in einem *colony expansion* Versuch analysiert, wie unter Punkt 4.1.10.1 beschrieben (Abb. 5.19).

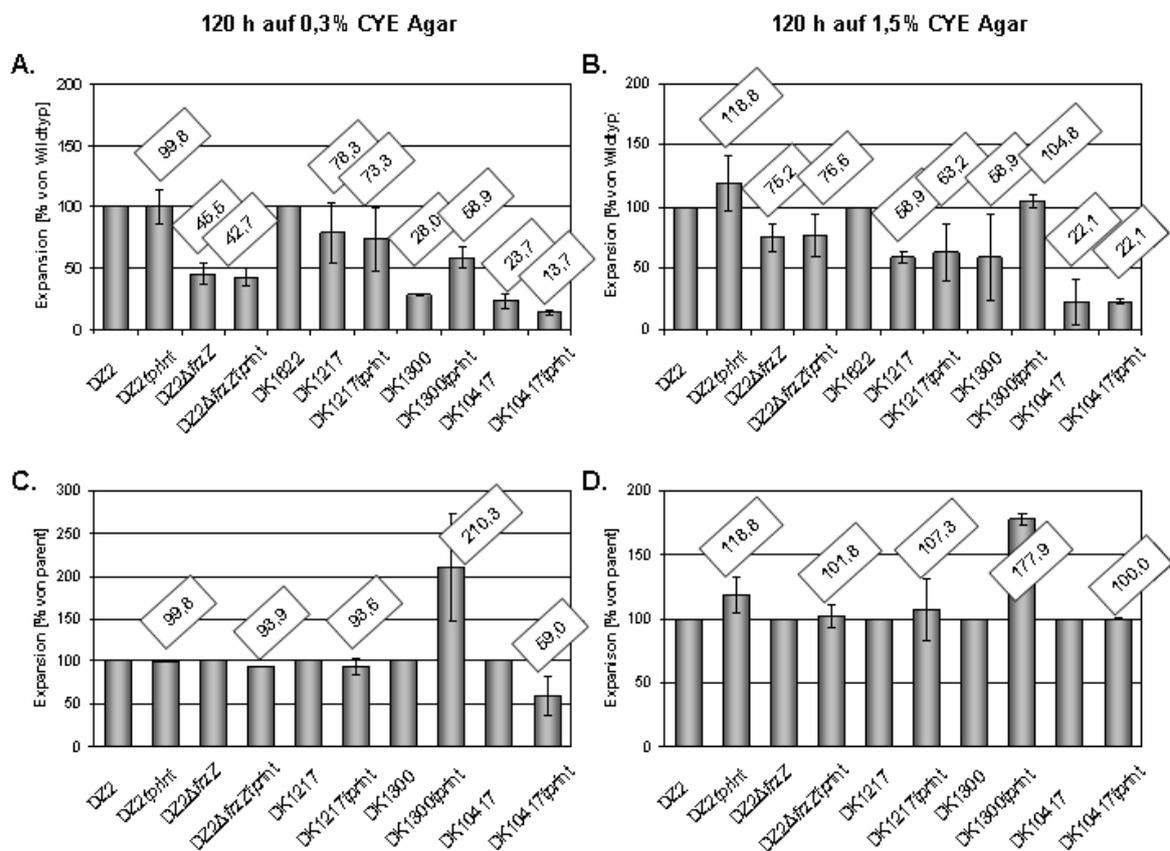


Abbildung 5.19: *Colony expansion* Assay auf 0,3% CYE Agar (A. und C.) und 1,5% CYE Agar (B. und D.). Getestet wurde die Bewegungsfähigkeit der Wildtypstämme DZ2 und DK1622, der *frzZ* Mutante DZ2Δ*frzZ*, der bewegungsdefekten Stämme DK1217 (A^+), DK1300 (A^+) und DK10417 (A^+) sowie der dazu gehörigen *tpr* Mutanten. Exponentiell wachsende Flüssigkulturen wurden durch Zentrifugation geerntet und aufkonzentriert. 5 μ l einer Suspension mit einer OD_{600} von 10 wurden auf CYE Agarplatten getropft. In A. und B. dienen die Wildtypstämme DZ2 und DK1622 als Positivkontrolle und der Koloniezuwachs (Expansion) der jeweiligen Abkömmlinge (DZ oder DK) nach fünf Tagen wurde prozentual auf deren Expansion ($\approx 100\%$) bezogen. In B. und D. wurde die Expansion jeder *tpr* Mutante auf die des Elternstamms ($\approx 100\%$) bezogen. Die gezeigten Werte (in %) geben den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten an, in denen jeweils ein Dreifachansatz für jeden getesteten Stamm untersucht wurde. Die Fehlerbalken geben die maximale Abweichung vom Mittelwert an.

Der Vergleich der Schwärmfähigkeit der Kontrollstämme DZ2 Δ *frzZ*, DK1217, DK1300 und DK10417 mit dem der Wildtypstämme ergab ein Bild, das den Erwartungen entsprach (Abb. 5.19). Die *frzZ* Mutante zeigte eine ca. 60%ige Reduktion ihres Schwärmvermögens auf Softagar, während ihr Bewegungsdefekt auf einem festeren Untergrund weniger stark ausgeprägt war. Der ausschließlich S-motile Stamm DK1217 zeigte sich dagegen auf weichem Untergrund nur wenig beeinträchtigt und erreichte nach fünf Tagen 78,3% der Ausdehnung des Wildtyps, während die Kolonie auf den 1,5%igen Platten eine Reduktion um 41,1% zeigte. Im Gegensatz dazu waren die Zellen des Stammes DK1300 durch eine Punktmutation im *pilC*-Gen nicht in der Lage, Typ IV Pili zu assemblieren und nur zu A-System vermitteltem Gleiten fähig. Entsprechend beeinträchtigt war der Phänotyp auf weichem Untergrund, wo die Kolonie 28% der Ausdehnung von DK1622 erreichte, während die Expansion auf 1,5%igen Platten 58,9% des Wildtyps betrug. Die *pilC*-Deletionsmutante DK10417 zeigte auf weichem Untergrund einen ähnlich starken Defekt und erreichte aufgrund ihres *aglG1*-Gendefektes auch auf festem Untergrund mit 22,1% des Wildtyps nur eine geringe Kolonieausdehnung.

Die Inaktivierung des *tpr*-Genprodukts steigerte die Menge an detektierbarem PilA-Protein auf der Zelloberfläche fast aller getesteten Stämme (siehe Abb. 5.18). Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Phänotyp der Hyperpilierung, wurde das S-Motilitätssystem durch die Insertion in das *tpr*-Gen jedoch nicht inaktiviert, da die Transduktion des Defektes in den S-motilen Stamm DK1217 keine unbeweglichen Kolonien hervorbrachte. Die *tprint* Mutanten der Stämme DZ2, DK1217 und DZ2 Δ *frzZ* zeigten auf weichem Untergrund keine signifikante Änderung des Schwärmverhaltens. Im Fall der *pilC*-Punktmutante DK1300 ließ sich sogar eine Steigerung der S-System abhängigen Zellbewegung feststellen. Die Kolonieausdehnung des Stammes DK1300*tprint* erreichte nach fünf Tagen Inkubation 58,9% der DK1622 Kontrolle (Abb. 5.19, A.). Verglichen mit dem Elternstamm entsprach dieser Wert einer Steigerung von 110,3% (Abb. 5.19, C.). Die Expansion des Stammes DK10417*tprint*, der kein PilA auf der Zelloberfläche akkumulierte (Abb. 5.18, D.), verschlechterte sich dagegen, verglichen mit dem Elternstamm, um 41% und lag nach fünf Tagen nur bei 13,6% des Wildtyps DK1622 (Abb. 5.19, B.).

Auf den Platten mit einem Agargehalt von 1,5%, die das A-Motilitätssystem stärker forderten, sah bei fast allen Stämmen durch die Insertion in das *tpr*-Gen eine leichte, wenn auch nicht signifikante Verbesserung der Kolonieexpansion. Am stärksten war die positive Beeinflussung erneut bei der Mutante DK1300*tprint*, die nach fünf Tagen eine ähnliche Kolonieausdehnung zeigte wie der Wildtyp DK1622.

Der potenzielle Interaktionspartner des *response* Regulators FrzZ, TPR, stellt die erste greifbare Verbindung des *frz*-Systems bzw. des FrzZ-Proteins zu einem Motor der Zelle dar, indem es die Möglichkeit einer Regulation des PilC-Proteins und damit der Typ IV Pili bietet. Dieses Protein ist hoch konserviert in Organismen, die sich unter Nutzung von Typ IV Pili bewegen und ist an der Extrusion dieser Strukturen beteiligt. Es stellt sich allerdings die Frage nach dem Mechanismus und der biologischen Relevanz dieser Interaktion, sollte sich das Ergebnis der Hefe Zwei-Hybrid Analyse als richtig erweisen.

5.5 Analyse der potenziellen Interaktion von FrzZ mit Pph1

In einem früheren Versuch, Interaktionspartner des *response* Regulators FrzZ mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid Systems zu finden, wurde die Ser/Thr-Phosphatase Pph1 identifiziert (Treuner-Lange et al., 2001). Außer dem *pph1*-Gen existieren im Genom des sequenzierten *M. xanthus* Stamms DK1622 noch drei weitere Gene, die für PP2C-Phosphatasen eukaryontischen Typs kodieren (Goldman, 2006). Diese stehen damit 97 Ser/Thr Protein-Kinasen gegenüber, von denen einigen eine wichtige Rolle in der Differenzierung von *M. xanthus* zukommt (Hanlon et al., 1997; Munoz-Dorado, 1991; Nariya and Inouye 2003; Udo et al., 1995; Zhang et al., 1996).

Pph1- und FrzZ-defekte Zellen zeigen einige gemeinsame phänotypische Eigenschaften, die dafür sprechen, dass beide Proteine in einem Signaltransduktionsweg positioniert sind (Treuner-Lange et al., 2001). So ist unter vegetativen Bedingungen auf festen Oberflächen ein Schwärmdedefekt zu beobachten, der in beiden Fällen auf eine verringerte Zellumkehrfrequenz zurückzuführen ist. Bei Nährstoffmangel dagegen sind weder *pph1* noch *frzZ* Zellen in der Lage, zu aggregieren und sporengefüllte Fruchtkörper zu bilden.

Die potenzielle Interaktion zwischen FrzZ und Pph1 wurde bereits während der vorangegangenen Diplomarbeit durch verschiedene Techniken näher untersucht (Gröger, 2002), konnte jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt nicht eindeutig verifiziert und charakterisiert werden. Weiterführende Untersuchungen waren deshalb auch ein wichtiger Punkt der vorliegenden Doktorarbeit.

5.5.1 Akkumulation von FrzZ und Pph1 unter Differenzierungsbedingungen

Für eine Interaktion des *response* Regulators FrzZ mit der PP2C-Phosphatase Pph1 müssen einige physiologische Voraussetzungen erfüllt sein. Zunächst wurde deshalb überprüft, ob beide Proteine zur selben Zeit in der Zelle akkumulieren. Von Pph1 ist

bekannt, dass die Akkumulation des Proteins während der Differenzierung ansteigt (Treuner-Lange et al., 2001). Aus diesem Grund wurde die Akkumulation der Phosphatase sowie des *response* Regulators über einen Zeitraum von 24 Stunden unter Differenzierungsbedingungen verfolgt. Zu diesem Zweck wurden über Nacht gewachsene Flüssigkulturen der Stämme DZ2, DZ2 Δ *frzZ* und der *pph1*-Mutante DZ4314 wie unter Punkt 4.1.10.2 beschrieben behandelt und auf Nährstoffmangelplatten getropft. Nach 6, 12 und 24 Stunden wurden Zellen geerntet und daraus Proteinextrakte gewonnen. Diese wurden über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch das *Western Blot* Verfahren analysiert (Abb. 5.20).

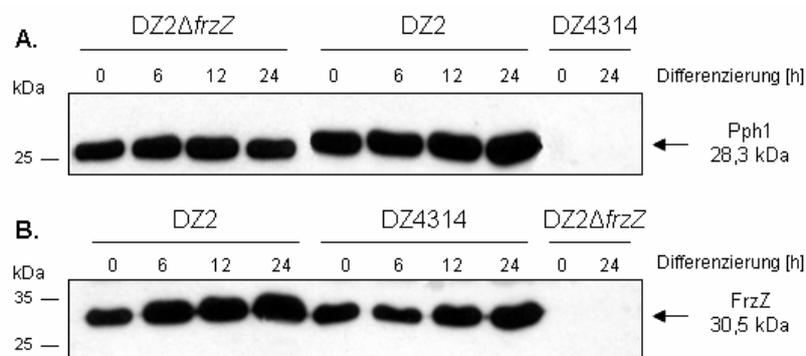


Abbildung 5.20: *Western Blot* Analyse der Pph1- und der FrzZ-Akkumulation. Verwendet wurden Extrakte der Stämme DZ2, der *frzZ* Mutante DZ2 Δ *frzZ* und der *pph1* Mutante DZ4314. Exponentiell wachsende Flüssigkulturen wurden durch Zentrifugation geerntet und aufkonzentriert. 5 μ l einer Suspension mit einer OD₆₀₀ von 10 wurden auf CYE Agarplatten getropft und nach 6, 12 und 24 Stunden geerntet. Es wurden 30 μ g Protein/Spur geladen. Die Detektion erfolgte mit FrzZ-spezifischem (Trudeau et al., 1996) und Pph1-spezifischem Antikörper (Treuner-Lange et al., 2001).

Wie die Abbildung 5.20 zeigt, waren beide Proteine bereits unter vegetativen Bedingungen in den Zellen vorhanden. Ihre Menge stieg jedoch im Verlauf der Differenzierung an. Es fiel weiterhin auf, dass die Akkumulation des FrzZ-Proteins in Zellen des Stamms DZ4314, verglichen mit dem Wildtyp DZ2, geringer war. Derselbe Effekt zeigte sich auch für die Phosphatase Pph1, die ebenfalls in Wildtypzellen stärker akkumulierte als in *frzZ* Zellen. Im Wildtyp DZ2 erreichte der Gehalt an Pph1 im Extrakt des letzten analysierten Zeitpunkts von 24 Stunden Differenzierung seinen höchsten Wert. Vor dem Hintergrund der *frzZ*-Deletionsmutante war das stärkste Signal für den Zeitpunkt 12 Stunden zu verzeichnen, während der 24 Stunden Zeitpunkt ein schwächeres Signal zeigte. Für die Akkumulation des *response* Regulators FrzZ war

sowohl in Wildtypzellen als auch in Zellen des Stamms DZ4314 ein kontinuierlicher Anstieg des Proteinlevels bis zum Zeitpunkt 24 Stunden zu beobachten.

5.5.2 Interaktionsanalyse von FrzZ und Pph1 im Hefe Zwei-Hybrid System (Gröger, 2002)

In der Hefe Zwei-Hybrid Analyse, in welcher die PP2C-Phosphatase Pph1 als potenzieller Interaktionspartner des *response* Regulators entdeckt wurde, lagen die beiden CheY-ähnlichen Domänen des FrzZ-Proteins getrennt voneinander vor. Mit dem intakten Regulator konnte dagegen keine Interaktion gezeigt werden (Treuner-Lange et al., 2001). Dies wurde damit begründet, dass die Trennung der CheY-ähnlichen Domänen der Phosphatase einen artifiziellen Zugang zu dem *response* Regulator-Protein ermöglichte. Dies könnte in einem nativen zellulären Hintergrund möglicherweise durch eine Phosphorylierung von FrzZ erreicht werden. Diese Modifikation ändert die Konformation von Proteinen, was beispielsweise in der Signaltransduktion essentiell ist und macht Proteine zu einem Substrat korrespondierender Phosphatasen (Stock et al., 2000).

Um eine phosphorylierungsabhängige Interaktion der beiden Proteine zu untersuchen, wurde in der vorangegangenen Diplomarbeit die Aminosäuresequenz des *response* Regulators durch gerichtete Mutagenese verändert (Gröger, 2002). Dadurch sollte an den phosphorylierbaren Aspartatresten nach Klose et al. (1993) eine solche Modifikation imitiert bzw. verhindert werden. Es entstanden vier FrzZ-Varianten, welche die vollständig phosphorylierte oder dephosphorylierte Form des *response* Regulators (FrzZ E/E und N/N) sowie eine Phosphorylierung an Domäne Z1 oder Z2 (FrzZ E/N und N/E) simulieren sollten. Diese Konstrukte wurden in einer neuen Interaktionsanalyse unter Nutzung des Hefe Zwei-Hybrid Systems eingesetzt (Gröger, 2002). Hier wurde eine AD-Fusion der Ser/Thr-Phosphatase mit der BD-Fusion des gesamten *frzZ*-Gens oder den mutagenisierten Varianten *frzZ* E/E, E/N, N/N, und N/E in Zellen des Hefestamms PJ96-4A co-exprimiert. In dieser Analyse konnte ebenfalls keine Interaktion zwischen Pph1 und der intakten Wildtypform des *response* Regulators gezeigt werden. In Kombination mit FrzZ E/E bzw. N/E zeigte die Phosphatase allerdings 15,5% und 12,2 % der β -Galaktosidaseaktivität der Positivkontrolle (zur Erklärung des Systems und der Reporter gene siehe Punkt 5.3.2). Setzt man voraus, dass die Glutamat-Substitution der phosphorylierbaren Reste im Hefe-System funktionell war, wurde daraus geschlossen, dass eine Phosphorylierung der zweiten Domäne des *response* Regulators möglicherweise eine Interaktion zwischen FrzZ und Pph1 bedingte (Gröger, 2002).

5.5.3 Komplementation des *pph1*⁻ Phänotyps

Um diese Hypothese *in vivo* zu untersuchen, wurden die *attP*-Vektoren pSWU30:*pro-frzZ* WTneu, E/E, E/N, N/N, N/E, D52N und D220N sowie der Vektor pSWU30 durch Elektroporation in den *pph1*⁻ Stamm DZ4314 transformiert. In diesem Fall hätte eine Analyse der Transformationsklone durch die Detektion mit FrzZ-spezifischem Antikörper nicht gezeigt, ob neben der Wildtypform auch die durch Mutagenese veränderten FrzZ-Varianten in den Zellen akkumulierten. Aus diesem Grund wurde die chromosomale DNA oxytetracyclinresistenter Klone präpariert und durch PCR-Reaktionen mit verschiedenen Oligonukleotid Paarungen auf eine Insertion des Plasmids in den chromosomalen *attB1*-Lokus hin untersucht. Die verwendeten *primer* sowie die erwarteten Fragmente sind der Tabelle 5.3 zu entnehmen.

Tabelle 5.3: Ergebnisse der PCR-Reaktion mit unterschiedlichen *primer* Paaren zur Überprüfung der ortsspezifischen Rekombination der Plasmide pSWU30:*pro-frzZ* WTneu, E/E, E/N, N/N, N/E, D52N und D220N in den *att*-Lokus entsprechender Transformationsklone des *pph1*⁻ Stamms DZ4314.

Oligonukleotid Paar	Integration	keine Integration
<i>attB1</i> , <i>attR1</i>	× (7122 bp)	✓ 592 bp
<i>attB1</i> , <i>attPR</i>	✓ 703 bp	×
<i>attR1</i> , <i>attPF</i>	✓ 1792 bp	×

Durch die Oligonukleotide *attB1* und *attR1* konnte ein Sequenzbereich des chromosomalen *attB1*-Lokus amplifiziert werden. Auf unveränderter chromosomaler DNA entstand mit dieser Reaktion ein Fragment von 592 bp. Hatte eine ortsspezifische Integration in den *attB*-Lokus stattgefunden, war in diesem Bereich zusätzlich das Plasmid in die chromosomale DNA inseriert und der zu amplifizierende Bereich vergrößerte sich auf 7122 bp. Das konnte unter den gewählten Bedingungen der PCR-Reaktion nicht gezeigt werden. Durch die Kombination mit einem der plasmidspezifischen *primer attPF* oder *attPR* konnte dagegen eine Integration des jeweiligen *attP*-Vektors nachgewiesen werden. Es wurden mehrere kanamycinresistente Klone jeder Transformationsreaktion überprüft und mit jeweils einem korrekten Klon weitergearbeitet. Die neu konstruierten Stämme werden im Folgenden mit DZ4314::pSWU30, DZ4314::pSWU30:*pro-frzZ* WTneu, E/E, E/N, N/N, N/E, D52N oder D220N bezeichnet.

5.5.3.1 Komplementation des Defektes der *pph1*⁻ Mutante DZ4314 unter Nährstoffmangelbedingungen

Unter Differenzierungsbedingungen ist die Phosphatasemutante nicht in der Lage, zu aggregieren. Mit ca. 0,02% der Menge an keimungsfähigen Sporen, die für den Wildtyp DZ2 bestimmt werden konnten, zeigen *pph1*-defekte Zellen zusätzlich einen schweren Sporulationsdefekt (Treuner-Lange et al., 2001). Aus den Beobachtungen der Interaktionsanalyse im Hefe Zwei-Hybrid System ging hervor, dass die Dephosphorylierung der zweiten Domäne von FrzZ *in vivo* die Folge einer Interaktion des *response* Regulators mit der Phosphatase Pph1 sein könnte (Gröger, 2002). Sind die Defekte von *pph1*⁻ Zellen auf deren Fehlen zurückzuführen, müsste die Präsenz des putativen Produktes dieser Interaktion zu einer Komplementation führen. Dies sollte durch die Integration der mutagenisierten Formen des *frzZ*-Gens überprüft werden, indem die Differenzierung der entsprechenden Stämme dokumentiert wurde. Die Abbildung 5.21 zeigt das reproduzierbare Ergebnis dieser Versuchsreihe und stellt exemplarisch eines von drei unabhängigen Experimenten dar.

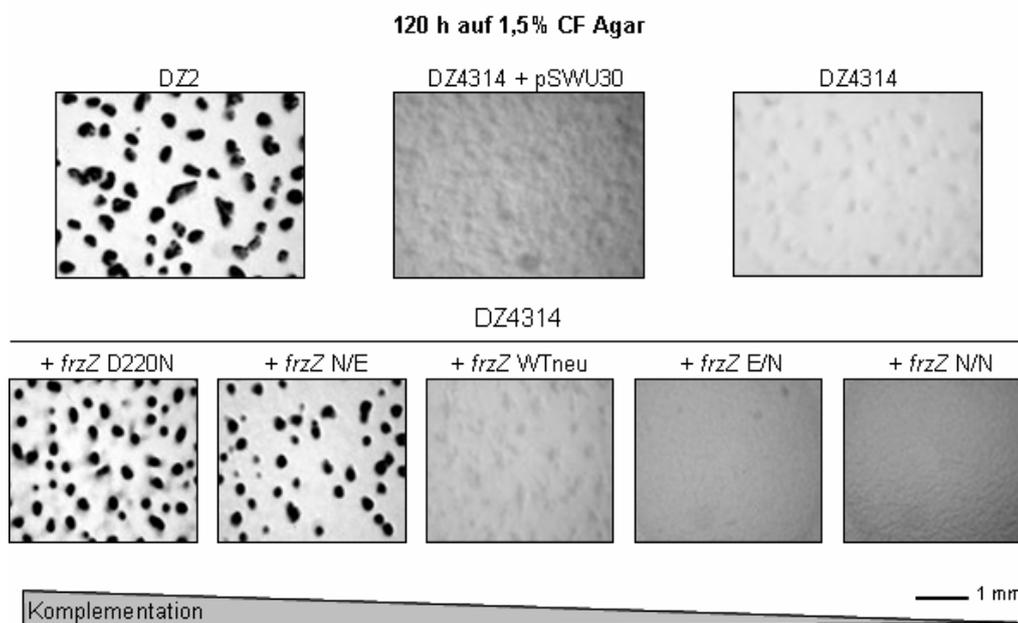


Abbildung 5.21: Morphologische Differenzierung der Stämme DZ2 und DZ4314 (obere Reihe, linkes und rechtes Bild) im Vergleich zu den Stämmen DZ4314::pSWU30:*pro-frzZ* D220N, N/E, WTneu, E/N und N/N (untere Reihe, von links) und der Negativkontrolle DZ4314::pSWU30 (obere Reihe, Mitte). Nicht gezeigt sind die Stämme DZ2Δ*frzZ*::pSWU30:*pro-frzZ* E/E und D52N. Zur Vorbereitung wurden exponentiell wachsende Kulturen durch Zentrifugation geerntet und mit CF Medium ohne Nährstoffe gewaschen, um verbliebene Nährstoffe zu entfernen. 5 µl einer Suspension mit einer OD₆₀₀ von 10 wurden auf CF Agarplatten getropft. Die gezeigten Bilder sind repräsentative Aufnahmen eines der drei Ansätze für jeden getesteten Stamm aus einem von drei unabhängigen Experimenten und zeigen das Zentrum der Kolonie nach fünf Tagen.

Die Abbildung 5.21 zeigt in der oberen Reihe Bilder der Differenzierung der Kontrollen, des Wildtyps DZ2 und der *pph1* Mutante DZ4314 sowie die der Negativkontrolle DZ4314 mit dem integrierten leeren Vektor pSWU30. Nach fünf Tagen Inkubation bei 32°C war die Differenzierung des Wildtypstamms DZ2 abgeschlossen und es hatten sich Fruchtkörper gebildet. Im Gegensatz dazu arretierte der *pph1* Stamm DZ4314 in einem frühen Stadium der Differenzierung und zeigte den bereits beschriebenen Phänotyp. Einen vergleichbaren Phänotyp zeigte auch die Negativkontrolle woraus geschlossen werden konnte, dass der *attP*-Vektor allein den Phänotyp des Elternstamms nicht veränderte.

In der unteren Reihe der Abbildung 5.21 sind Aufnahmen angeordnet, welche die Veränderung des Phänotyps der *pph1* Mutante DZ4314 aufgrund der *attP-attB* vermittelten Integration verschiedener Formen des *frzZ*-Gens zeigen. Der Grad der Komplementation des Differenzierungsdefekts nimmt dabei von rechts nach links zu. Die Integration von *frzZ* E/N oder N/N, der putativ an Domäne Z1 phosphorylierten und an Domäne Z2 unphosphorylierten bzw. der vollständig dephosphorylierten Form des *response* Regulators, bewirkte keine Komplementation des Differenzierungsdefekts der *pph1* Mutante. Auch die Integration der *attP*-Vektoren, welche für *frzZ* E/E und D52N kodieren, konnte keine Antwort der Zellen auf den Nährstoffmangel hervorrufen (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu kam es durch die Integration der Plasmide pSWU30:*pro-frzZ* N/E und D220N in das Chromosom von DZ4314 zu einer Aggregation der Zellen und zur Bildung von Fruchtkörpern. In beiden Fällen waren die Strukturen etwas kleiner als die des Wildtyps DZ2. Im Falle des *frzZ* N/E-Konstruktes wurden im Vergleich weniger Fruchtkörper gebildet, wohingegen DZ4314::pSWU30:*pro-frzZ* D220N eine größere Anzahl von Strukturen hervorbrachte. Davon waren viele nach fünf Tagen Differenzierung noch von einem durchscheinenden Hof an Zellen umgeben, die den Fruchtkörper nicht erreicht hatten. Die Umrisse der Fruchtkörper erschienen dadurch unregelmäßiger.

Um zu untersuchen, ob durch die Komplementation des Aggregationsdefektes der *pph1* Mutante DZ4314 auch der Sporulationsdefekt dieses Stamms behoben werden konnte, wurde die Sporulationseffizienz der komplementierten Stämme bestimmt. Die auf Nährstoffmangelplatten getropften Zellen wurden zu diesem Zweck nach fünf Tagen geerntet. Verbliebene vegetative Zellen wurden durch eine einstündige Inkubation bei 50°C und eine anschließende Ultraschall-Behandlung abgetötet. Die Gesamtzahl an Sporen (*ts*) wurde mit Hilfe der Zählkammer nach Thoma bestimmt. Zur Ermittlung der Anzahl an keimungsfähigen Sporen (*cfu*) wurde die Suspension jedes getesteten Stamms in mehreren Verdünnungsschritten auf CYE Agarplatten ausgebracht und die gebildeten

Kolonien nach fünf Tagen gezählt. Der prozentuale Anteil der *cfu* an der Gesamtmenge gebildeter Sporen dient als Maß für die Effizienz der Sporulation. Die Tabelle 5.4 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experiments.

Tabelle 5.4: Sporulationseffizienz des Wildtypstamms DZ2, der internen Negativkontrolle DZ4314::pSWU30 und der Stämme DZ4314::pSWU30*pro-frzZ* D220N und N/E. Die Tabelle gibt die gemittelten Werte der *total spores* (*ts*) und *colony forming units* (*cfu*) eines Experiments pro ml an, in dem ein Doppelansatz jedes zu untersuchenden Stamms auf CF Agarplatten getropft wurde. Die Fehler sind in % der Gesamtmenge an *ts* oder *cfu* angegeben.

Stamm (Genotyp)	Auf 1,5% CF Agar				
	<i>ts/ml</i>	% von Wildtyp	<i>cfu/ml</i>	% von Wildtyp	Effizienz (%)
DZ2	$2,06 \times 10^8$ +/- 7,74%	100,00	$5,38 \times 10^6$ +/- 56,28%	100,00	2,61
DZ4314::pSWU30	$6,25 \times 10^5$ +/- 50,00%	0,30	$4,60 \times 10^2$ +/- 52,17%	0,01	0,073
DZ4314::pSWU30:<i>pro-frzZ</i> N/E	$4,16 \times 10^7$ +/- 24,81%	20,18	$2,52 \times 10^4$ +/- 150,33%	0,47	0,061
DZ4314::pSWU30:<i>pro-frzZ</i> D220N	$1,03 \times 10^8$ +/- 7,88%	50,08	$2,35 \times 10^4$ +/- 197,66%	0,44	0,023

Durch die beiden Formen des *response* Regulators, die den Aggregationsdefekt des Elternstamms DZ4314 komplementieren konnten, stieg auch die Anzahl an Sporen (*ts*) auf 20,18% bzw. 50,08% des Werts an, der für den Wildtyp DZ2 ermittelt wurde. Wie bereits die phänotypische Analyse vermuten ließ, war dies kein Effekt, der auf den *attP*-Vektor pSWU30 allein zurückzuführen war, denn die interne Negativkontrolle lag mit 0,3% der Gesamtsporenanzahl von DZ2 signifikant darunter. Die Anzahl an lebensfähigen Sporen (*cfu*) bewegte sich für beide getesteten *frzZ*-Konstrukte unterhalb von 0,5% des Wertes für den Wildtyp. Die ermittelte Anzahl an *cfu* der internen Negativkontrolle lag dagegen in dem Bereich, wie er bereits zuvor für den Stamm DZ4314 beschrieben wurde (Treuner-Lange et al., 2001).

Die Sporulationseffizienz ist der prozentuale Anteil der keimungsfähigen Sporen an der Gesamtmenge. Betrachtet man die Werte der Tabelle 5.4, so sieht man, dass für den Wildtyp DZ2 in diesem Experiment nur 2,61% der gebildeten Sporen keimungsfähig waren. Sowohl die Integration des Plasmids pSWU30:*pro-frzZ* N/E als auch die des D220N-Konstrukts führte zu einer Sporulationseffizienz, die schlechter als die der Negativkontrolle war. Durch die Akkumulation dieser beiden Formen des *response*

Regulators wurde also, verglichen mit dem Elternstamm, nur die Gesamtanzahl an Sporen erhöht. Der Anteil an *cfu* sank dagegen ab, so dass sich insgesamt die Sporulationseffizienz der Stämme verschlechterte. Der Sporulationsdefekt der *pph1*⁻ Mutante DZ4314 konnte folglich nicht komplementiert werden.

Im Unterschied zu den Analysen im Hintergrund der *frzZ* Mutante DZ2Δ*frzZ* konnte der Aggregationsdefekt der *pph1*⁻ Mutante DZ4314, die über die chromosomale Wildtypkopie des *frzZ*-Gens verfügt, nur durch die zusätzliche Integration des *frzZ* D220N-Konstrukts, nicht aber durch *frzZ* D52N komplementiert werden. In der Phosphatasemutante war es folglich von Bedeutung, welche der Domänen des gebildeten FrzZ-Proteins durch eine Asparagin-Substitution unfunktionell war. Wäre die Dephosphorylierung der zweiten Domäne des *response* Regulators das Ergebnis einer Interaktion mit der Phosphatase, so stellt sich die Frage, warum nicht auch die Integration der Konstrukte *frzZ* E/N oder N/N in den Stamm DZ4314 einen ähnlichen Effekt bewirkte. Dies kann durch die vorliegenden Daten nicht erklärt werden. Ähnlich wie auch die Beobachtung, dass stattdessen durch die Integration des doppelt-mutagenisierten Konstrukts *frzZ* N/E eine Komplementation erreicht wurde, während die Integration des *frzZ* E/E-Konstruktes, welches ebenfalls eine Glutamat-Substitution des Aspartatrestes der zweiten Domäne aufwies, keinen solchen Effekt auslöste.

5.5.3.2 Komplementation des Defektes der *pph1*⁻ Mutante DZ4314 unter vegetativen Bedingungen

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob die Integration der komplementierenden *frzZ*-Konstrukte den Aggregationsdefekt des *pph1*⁻ Stamms DZ4314 durch eine Beeinflussung der Zellbewegung behoben hatte. Zu diesem Zweck wurde das vegetative Schwärmverhalten der *pph1*⁻ Mutante untersucht und mit dem des Wildtypstamms DZ2, der internen Negativkontrolle DZ4314::pSWU30 und der Stämme DZ4314::pSWU30:*frzZ* WTneu, N/E, D52N und D220N verglichen.

Das Schwärmverhalten wurde durch einen *colony expansion* Versuch analysiert. Dazu wurden exponentiell wachsende Kulturen der zu untersuchenden Stämme aufkonzentriert und auf CYE Platten mit einem Agargehalt von 0,3% oder 1,5% aufgetropft. Nach fünf Tagen wurde die Expansion der Kolonien ermittelt und mit der des Wildtyps DZ2 und der des Elternstamms DZ4314 verglichen. Die gemittelten Ergebnisse eines Experiments sind in der Abbildung 5.22 dargestellt.

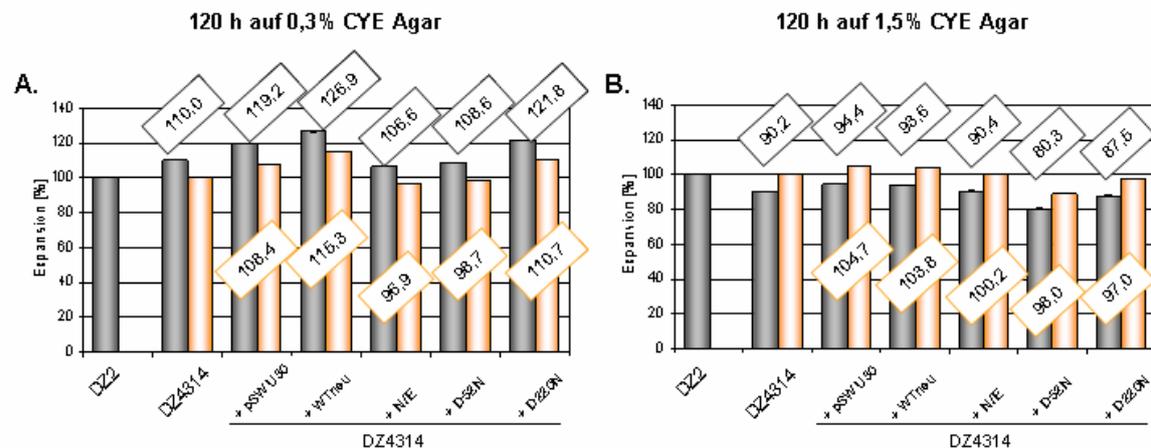


Abbildung 5.22: Colony expansion Assay der *pph1* Mutante DZ4314 im Vergleich zu DZ2 Wildtyp und den Stämmen DZ4314::pSWU30 sowie DZ4314::pSWU30;pro-*frzZ* WT neu, N/E, D52N und D220N auf 0,3% CYE Agar (A.) und 1,5% CYE Agar (B.). Exponentiell wachsende Flüssigkulturen wurden durch Zentrifugation geerntet und aufkonzentriert. 5 µl einer Suspension mit einer OD₆₀₀ von 10 wurden auf CYE Agarplatten getropft. Die grauen Balken zeigen die Expansion aller Stämme (in %) bezogen auf DZ2 Wildtyp (≈100%), die gelben Balken die Expansion (in %) bezogen auf den Elternstamm DZ4314 (≈100%). Die gezeigten Werte entstammen einem Experiment. Es wurde ein Dreifachansatz für jeden getesteten Stamm untersucht. Die Fehlerbalken geben die maximale Abweichung vom Mittelwert an.

Der *colony expansion* Assay wurde für die Phosphatasemutante nur einmal durchgeführt, da weder auf Soft- noch auf Hartagarplatten ein signifikanter Schwärmedefekt festgestellt werden konnte. Auf weichem Untergrund schwärmte der Stamm DZ4314 etwas besser als der Wildtyp DZ2, während die Kolonie auf den 1,5%igen Platten etwas weniger gut expandierte. Die interne Negativkontrolle, der Stamm DZ4314::pSWU30, expandierte unter beiden Bedingungen weiter als die *pph1* Mutante, so dass die zusätzliche leichte Steigerung des Koloniedurchmessers, den die Integration der Wildtypkopie des *frzZ*-Gens in den Stamm DZ4314 bewirkte, als nicht-signifikant betrachtet wurde. Für die Konstrukte *frzZ* N/E und D220N, die den Differenzierungsdefekt *pph1*-negativer Zellen komplementierten, ließ sich kein eindeutiger Trend feststellen. Beide Stämme zeigten auf den Hartagarplatten eine weitere Expansion als das nicht-komplementierende Konstrukt *frzZ* D52N. Diese lag jedoch in beiden Fällen im Bereich der internen Negativkontrolle und war aus diesem Grund nicht signifikant.

Im Falle des *frzZ* Stamms DZ4484 (DZ2Δ*frzZ*) konnte der Bewegungsdefekt durch den Koloniedurchmesser festgestellt und beurteilt werden. Für die *pph1* Mutante DZ4314 war dies nicht möglich, da der Defekt des Elternstamms allein zu gering war, um eine signifikante Komplementation durch eines der integrierten *frzZ*-Konstrukte zuzulassen. Der Aspekt einer möglichen Komplementation der Bewegungsfähigkeit der

Phosphatasemutante durch die Akkumulation einer Form des *response* Regulators, die sonst nur durch eine Interaktion der beiden Proteine entstehen würde, konnte folglich nicht durch *colony expansion* Experimente untersucht werden.

5.5.3.3 Charakterisierung des Defektes der *pph1*⁻ Mutante DZ4314

Die molekulare Grundlage des Defektes der *pph1*⁻ Mutante DZ4314 ist wahrscheinlich in der fehlgesteuerten Expression eines wichtigen Regulator-Proteins zu suchen, welches bereits unter vegetativen Bedingungen eine Rolle spielt. In der Differenzierung führt dies zunächst zu einer Deregulation des A-Signal-abhängigen *quorum sensing*, wie man anhand der Expressionsanalyse des differenzierungsgesteuerten *spi*-Gens festgestellt hat (A. Treuner-Lange, unveröffentlicht). Durch die transkriptionelle Fusion der Promotorregion von *M. xanthus* Genen mit dem promotorfreien *lacZ*-Gen des Tn5/*lac* Transposons, kann deren Expression durch die damit gekoppelte β -Galaktosidaseaktivität bestimmt werden (Kroos et al., 1986). Das *spi*-Gen (Ω 4521) ist das erste, für die Differenzierung wichtige Gen, dessen Expression auf diese Weise verfolgt werden kann. Es wird in Wildtypzellen durch den A-Faktor angeschaltet. Die enzymatische Aktivität der β -Galaktosidase steigt in diesen Zellen ein bis zwei Stunden nach Beginn der Differenzierung um das 10-fache an (Kroos et al., 1986), während in *asg*-Mutanten keine Enzymaktivität zu verzeichnen ist (Kuspa et al., 1986). In DZ4314 Zellen wird dieses Gen bereits unter vegetativen Bedingungen angeschaltet, während seine Expression unter Differenzierungsbedingungen zu gering ist, um die Aggregation einzuleiten (A. Treuner-Lange, unveröffentlicht).

Wie durch *real time* RT-PCR-Experimente im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, war in *pph1*-defekten Zellen auch die relative Expression des *fruA*-Gens unter Nährstoffmangelbedingungen, verglichen mit dem Wildtyp DZ2, vermindert (Abb. 5.23). Auch die Expression dieses Gens wird während der frühen Differenzierung in Abhängigkeit des A-Signals induziert, während die Aktivierung C-Signal-abhängig erfolgt (Ellehauge et al., 1998). Vermittelt durch das *frz*-Signaltransduktionssystem wird so zunächst die Aggregation der Zellen eingeleitet und später die Transkription von Sporulationsgenen initiiert (zur Übersicht Kaiser, 2004).

Die Bestimmung der relativen Expression des *fruA*-Gens erfolgte für die getesteten Stämme DZ2 und DZ4314 unter Verwendung des *primer* Paares Mx*fruA*⁺ und Mx*fruA*⁻, für das zuvor eine Reaktionseffizienz von 2,4 ermittelt werden konnte. Das *rpoZ*-Gen, welches für die ω -Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase kodiert, diente als

Referenzgen und wurde durch das *primer* Paar *MxrpoZ+*, *MxrpoZ-* (Effizienz: 2,1) amplifiziert. Das Ergebnis dieser Analyse ist in der Abbildung 5.23 dargestellt.

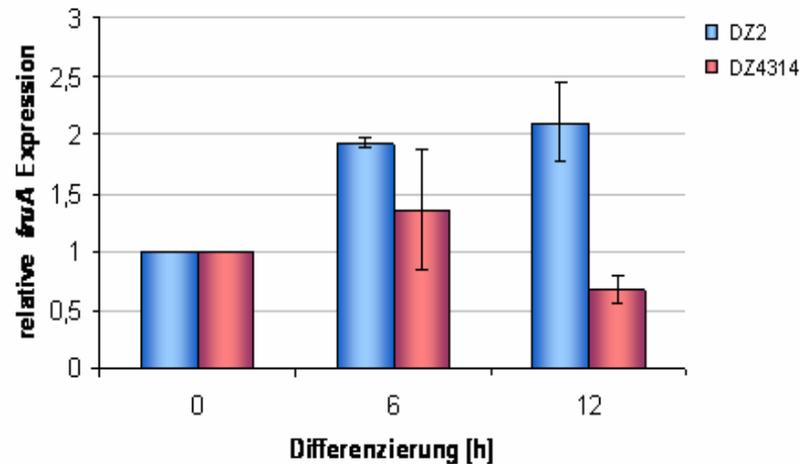


Abbildung 5.23: Relative Expression des *fruA*-Gens in *M. xanthus* DZ2 und DZ4314. Zur Vorbereitung wurden exponentiell wachsende Kulturen durch Zentrifugation geerntet und mit CF Medium ohne Nährstoffe gewaschen, um verbliebene Nährstoffe zu entfernen. 5 μ l einer Suspension mit einer OD_{600} von 10 wurden auf CF Agarplatten getropft. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und die Gesamt-RNA präpariert. Die Werte geben die Änderung der *fruA*-Expression zu den jeweiligen Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrollexpression zum 0-h-Zeitpunkt wieder. Es wurden zwei unabhängige Experimente betrachtet, in denen die relative *fruA*-Expression jeder Probe in einem Doppelansatz bestimmt wurde. Die Fehler geben die maximale Abweichung von Mittelwert an.

Der Wildtypstamm DZ2 zeigte nach 6 Stunden Differenzierung einen Anstieg in der relativen *fruA*-Expression auf 1,9 und nach 12 Stunden einen weiteren Anstieg auf einen Wert von 2,1. Für den *pph1*⁻ Stamm DZ4314 war nach 6 Stunden ebenfalls ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Dieser lag mit einem Wert von 1,3 aber unterhalb der Zunahme des Wildtyps DZ2. Für den 12 Stunden Zeitpunkt ließ sich hier eine Abnahme der relativen *fruA*-Expression auf einen Wert von 0,7 bestimmen. Während für den Wildtyp ein Anstieg der relativen *fruA*-Expression bis zu einem Zeitpunkt von 12 Stunden in der Differenzierung zu verzeichnen war, zeigte die *pph1*⁻ Mutante DZ4314 eine verminderte Expression bzw. eine Abnahme der Expression, welche die Aggregations- und Sporulationsdefekte dieses Stamms erklären könnte, da das FruA-Protein, wie oben ausgeführt, als Transkriptionsregulator eine zentrale Rolle während der Differenzierung einnimmt und essentiell für beide Prozesse ist.

Verfolgt man dagegen in dem *pph1*⁻ Stamm DZ4314 die Expression des *lacZ*-Reporters $\Omega 4403$, der in Abhängigkeit des C-Signals nach ca. 12 Stunden Differenzierung angeschaltet wird (Kroos and Kaiser, 1987), zeigt die Phosphatasemutante kein

verändertes Expressionsmuster (A. Teuner-Lange, unveröffentlicht). Wie auch Experimente zeigten, in denen die Phosphatasemutante einen *csgA*-defekten Stamm unter Nährstoffmangelbedingungen extrazellulär komplementieren konnte, ist das C-*signaling* in DZ4314 folglich nicht beeinträchtigt (T. Knauber und A. Treuner-Lange, unveröffentlicht). Was also wurde auf molekularer Ebene durch die zusätzliche Akkumulation der N/E- und der D220N-Form des *response* Regulators FrzZ im Hintergrund des Stammes DZ4314 komplementiert?

5.5.3.4 *fruA*-Expression der *pph1* Mutante DZ4314 unter Differenzierungsbedingungen im Vergleich zu den komplementierten Stämmen

Wie zuvor geschildert, zeigte die Phosphatasemutante DZ4314 eine verminderte *fruA*-Expression, was wahrscheinlich den Aggregations- und den schweren Sporulationsdefekt dieser Zellen bedingt. Durch die Integration der *attP*-Vektoren, die für die mutagenisierten Formen des *response* Regulators FrzZ N/E und D220N kodieren, konnte der Aggregationsdefekt, nicht aber die verminderte Bildung lebensfähiger Sporen komplementiert werden. Aufgrund dieser Beobachtung wurde der Effekt auf molekularer Ebene zunächst durch die Analyse der relativen Expression des *fruA*-Gens in den Kontrollstämmen DZ2 und DZ4314::pSWU30 sowie den komplementierten Stämmen DZ4314::pSWU30:*pro-frzZ* D220N und N/E mittels *real time* RT-PCR untersucht.

In der Abbildung 5.24 ist das Ergebnis der *real time* RT-PCR Analyse der beschriebenen Stämme während der Differenzierung dargestellt. Die Quantifizierung der relativen Expression des *fruA*-Gens erfolgte unter Verwendung des *primer* Paares Mx*fruA*⁺ und Mx*fruA*⁻, für das zuvor eine Reaktionseffizienz von 2,1 ermittelt werden konnte. Das *rpoZ*-Gen diente erneut als Referenzgen und wurde in der PCR-Reaktion durch das *primer* Paar Mx*rpoZ*⁺, Mx*rpoZ*⁻ amplifiziert (Effizienz: 1,6).

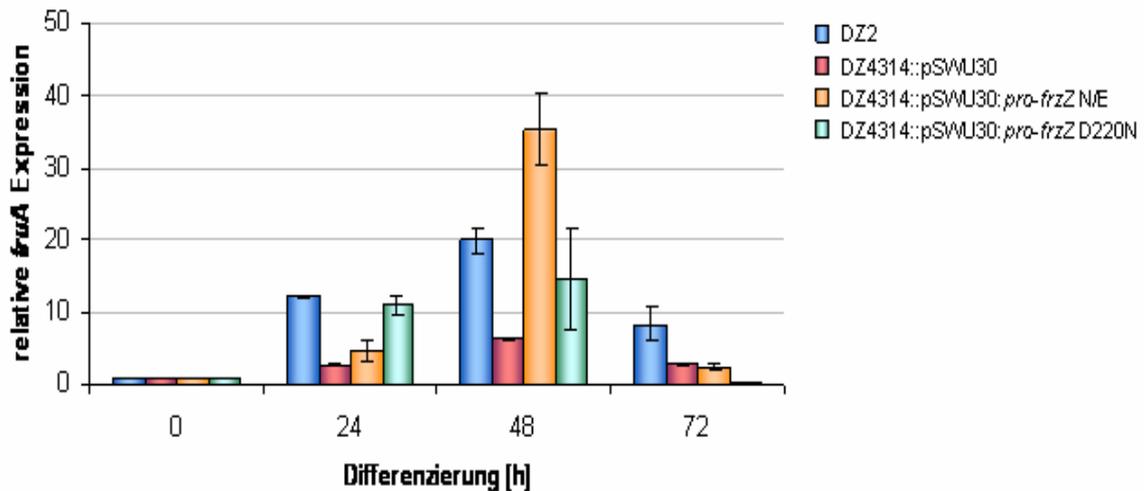


Abbildung 5.24: Relative Expression des *fruA*-Gens in *M. xanthus* DZ2, der Negativkontrolle DZ4314::pSWU30 und den beiden Stämmen DZ4314::pSWU30;*pro-frzZ* N/E und *frzZ* D220N. Zur Vorbereitung wurden exponentiell wachsende Kulturen durch Zentrifugation geerntet und mit CF Medium ohne Nährstoffe gewaschen, um verbliebene Nährstoffe zu entfernen. 5 μ l einer Suspension mit einer OD₆₀₀ von 10 wurden auf CF Agarplatten getropft. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und die Gesamt-RNA präpariert. Die Werte geben die Änderung der *fruA*-Expression zu den jeweiligen Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrollexpression zum 0-h-Zeitpunkt wieder. Es wurde ein Experiment betrachtet, in dem die relative *fruA*-Expression jeder Probe in einem Doppelansatz bestimmt wurde. Die Fehler geben die maximale Abweichung von Mittelwert an.

Zur Auswertung dieses Experiments ist zu beachten, dass der Differenzierungsprozess durch die experimentelle Durchführung zur Präparation des Zellmaterials, im Gegensatz zu der zuvor gezeigten *real time* RT-PCR Analyse, verlangsamt ablief. Der Fortgang der Differenzierung wurde fotografisch dokumentiert und ist in der Abbildung 5.25 gezeigt. Für den Wildtyp DZ2 war bis zu einem Zeitpunkt von 48 Stunden in der Differenzierung eine Zunahme der relativen *fruA*-Expression auf einen Wert von 20,5 zu beobachten. Bis zum letzten analysierten Zeitpunkt erfolgte dann eine Abnahme bis auf einen Wert von 8,3. Die interne Negativkontrolle, der Stamm DZ4314::pSWU30, zeigte ebenfalls bis zu einem Zeitpunkt von 48 Stunden eine Zunahme der relativen Expression des *fruA*-Gens auf einen Wert von 6,8. Der nach 72 Stunden Differenzierung erreichte Wert von 2,7 lag dann unterhalb der *fruA*-Expression des Wildtyps zu diesem Zeitpunkt.

Die *fruA*-Expression der beiden komplementierten *pph1* Stämme zeigte ebenfalls zu einem Zeitpunkt von 48 Stunden Differenzierung ein Maximum. Dieses lag für den Stamm DZ4314::pSWU30;*pro-frzZ* D220N mit einem Wert von 14,5 jedoch unterhalb des Wertes des Wildtyps DZ2 zu diesem Zeitpunkt. Bis zu dem letzten analysierten Zeitpunkt sank die *fruA*-Expression dieses Stamms dann auf einen Wert von 0,3. DZ4314 Zellen mit dem

integrierten *frzZ* N/E-Konstrukt zeigten dagegen in den ersten 24 Stunden eine geringere Zunahme der *fruA*-Expression, die allerdings nach 48 Stunden mit einem Wert von 35,3 ihr Maximum erreichte und dem höchsten Wert der relativen *fruA*-Expression entsprach, der in diesem Experiment gemessen wurde. Der letzte Messpunkt lag nach 72 Stunden Differenzierung mit einem Wert von 2,3 im Bereich der internen Negativkontrolle zu diesem Zeitpunkt.

Durch die Integration der beiden Plasmide pSWU30:*pro-frzZ* D220N und N/E konnte also die relative *fruA*-Expression der *pph1*⁻ Mutante DZ4314 im Vergleich zu der internen Negativkontrolle signifikant gesteigert werden.

5.5.3.5 FruA-Akkumulation in der *pph1*⁻ Mutante DZ4314 unter Differenzierungsbedingungen im Vergleich zu den komplementierten Stämmen

Nachfolgend wurde untersucht, ob der positive Einfluss der beiden komplementierenden *frzZ*-Konstrukte auf die Expression des *fruA*-Gens auch zu einer nachweisbaren Steigerung der Akkumulation des FruA-Proteins im Hintergrund des Stamms DZ4314 führte. Zu diesem Zweck wurden *Western Blot* Analysen von Zellextrakten durchgeführt. Diese wurden aus demselben Zellmaterial präpariert, welches auch zur Gewinnung der RNA-Proben für die *real time* RT-PCR Analyse genutzt wurde. So konnte ein direkter Vergleich dieser Proben hinsichtlich der Beeinflussung der Genexpression sowie der Protein-Akkumulation erfolgen.

Die Abbildung 5.25 zeigt das Ergebnis dieser Analyse. In einem *M. xanthus* Wildtypstamm wird die Transkription des *fruA*-Gens ab einem Zeitpunkt von ca. 6 Stunden in der Differenzierung initiiert (Ogawa et al., 1996). Entsprechend zeigte der *Western Blot* kein FruA-Signal in der vegetativen 0-Stunden-Probe dieses Extrakts. Erst in der 12-Stunden-Probe konnte das Protein durch den spezifischen FruA-Antikörper nachgewiesen werden. Der Level an FruA stieg bis zu einem Zeitpunkt von 48 Stunden Differenzierung in Zellen des Wildtyps an und nahm dann wieder ab.

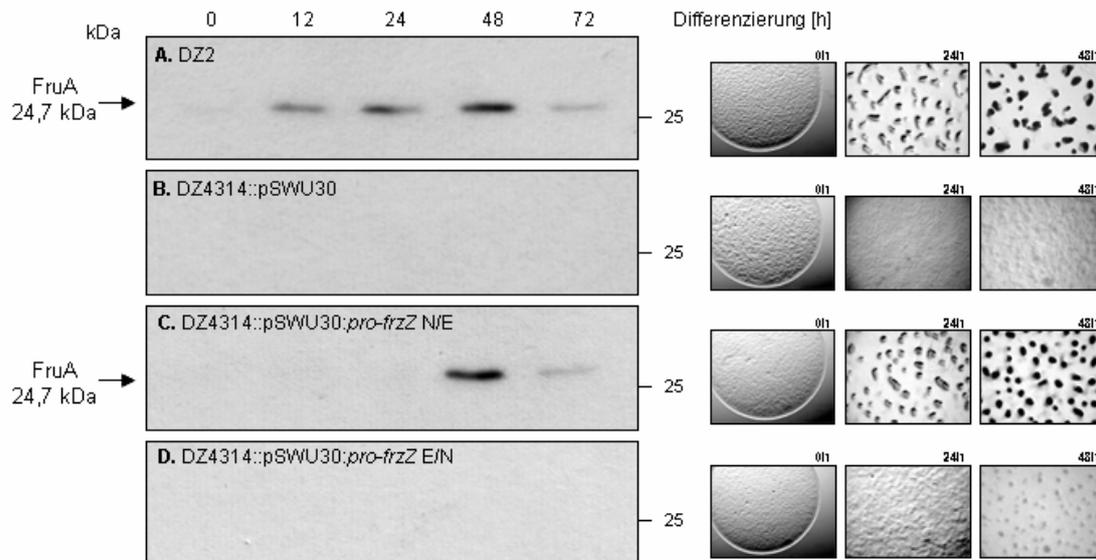


Abbildung 5.25: Western Blot Analyse der FruA-Akkumulation. Verwendet wurden Proteinextrakte von *M. xanthus* DZ2 (A.), der Negativkontrolle DZ4314::pSWU30 (B.) und der beiden Stämme DZ4314::pSWU30;*pro-frzZ* N/E (C.) und E/N (D.). Nicht gezeigt ist der Stamm DZ4314::pSWU30;*pro-frzZ* D220N. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden gleiche Mengen an differenzierten Zellen von CF Agarplatten geerntet und Proteinextrakte hergestellt. Der Fortgang der Differenzierung wurde dabei fotografisch dokumentiert und ist für jeden Stamm zur rechten Seite des jeweiligen Blot abgebildet. Es wurden 30 µg Protein/Spur geladen. Die Detektion erfolgte mit FruA-spezifischem Antikörper (L. Søgaard-Andersen).

Für die interne Negativkontrolle, den Stamm DZ4314::pSWU30, konnte zu keinem Zeitpunkt der Differenzierung ein FruA-Signal detektiert werden, ebenso wie für den Stamm DZ4314::pSWU30;*pro-frzZ* E/N. In beiden Fällen konnte durch die genotypische Veränderung unter Nährstoffmangel keine morphologische Differenzierung der Zellen festgestellt werden (Abb. 5.25, rechter Teil; siehe auch Abb. 5.21). Im Gegensatz dazu konnte durch die Integration des *frzZ*-Konstruktes N/E eine FruA-Akkumulation in *pph1*⁻ Zellen des Stamms DZ4314 nachgewiesen werden. Ähnlich wie für den Wildtyp DZ2 zeigte sich das stärkste Signal zu einem Zeitpunkt von 48 Stunden Differenzierung. Die Intensität des Signals nahm bis zu dem nächsten analysierten Zeitpunkt von 72 Stunden wieder ab. Im Unterschied zu den Proben des Wildtypstamms zeigte sich vor dem 48-Stunden-Zeitpunkt für DZ4314::pSWU30;*pro-frzZ* N/E jedoch kein FruA-Signal, obwohl keine zeitliche Verzögerung im Fortgang der Differenzierung festgestellt werden konnte (Abb. 5.25, rechter Teil).

Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass eine Komplementation des Aggregationsdefektes der *pph1*⁻ Mutante DZ4314 spezifisch durch die Integration der Plasmide pSWU30;*pro-frzZ* N/E und D220N erfolgte, die eine Steigerung der relativen *fruA*-Expression (siehe Abb. 5.24) und der Akkumulation des FruA-Proteins (Abb. 5.25)

bewirkten. Warum dies nicht auch zu einer Komplementation des Sporulationsdefektes der Phosphatasemutante führte, konnte dagegen anhand der vorliegenden Daten nicht geklärt werden.

5.5.4 Spezifität der Komplementation des *pph1*⁻ Phänotyps

Um die Spezifität der Komplementation der Defekte der *pph1*-Mutante DZ4314 zu untersuchen, wurden die komplementierenden Formen des *response* Regulators FrzZ, *frzZ* D220N und N/E, in einen *asgB*-defekten *M. xanthus* Stamm integriert. Zellen mit einem Defekt in einem der fünf *asg*-Gene sind nicht in der Lage, das erste interzelluläre Signal der Differenzierung, den A-Faktor, zu bilden. Infolgedessen wird das essentielle *fruA*-Gen nicht exprimiert und die Zellen arretieren noch vor der Bildung von Aggregaten. Durch den ähnlichen molekularen Defekt einer *asg*-Mutante entsteht ein Phänotyp, der mit dem der Phosphatasemutante DZ4314 vergleichbar ist.

Um im Hintergrund des Stammes DZ2 arbeiten zu können, wurde zunächst der *asgB*-Defekt des Stammes DK2636 durch Phagentransduktion in den Wildtypstamm DZ2 überführt. Positive Klone wurden durch ihre Kanamycinresistenz selektioniert und phänotypisch überprüft (durchgeführt von A. Treuner-Lange). Durch eine *attP-attB* vermittelte Rekombination konnten dann die Plasmide pSWU30:*pro-frzZ* WTneu, N/E, D220N und der leere Vektor pSWU30 in den Stamm DZ2:*asgB* integriert werden. Oxytetracyclinresistente Klone der Transformationsreaktion konnten nicht durch die Detektion mit FrzZ-spezifischem Antikörper identifiziert werden, da auch die chromosomale Wildtypkopie des *frzZ*-Gens im Genom vorhanden war. Aus diesem Grund wurde die chromosomale DNA resistenter Klone präpariert und durch PCR-Reaktionen mit verschiedenen Oligonukleotid Paarungen auf die ortspezifische Integration der *attP*-Plasmide hin untersucht. Die verwendeten *primer* sowie die erwarteten Fragmente sind der Tabelle 5.4 unter Punkt 5.5.3 zu entnehmen. Nachfolgend wurde die morphologische Differenzierung des Elternstammes DZ2:*asgB* sowie der Stämme DZ2:*asgB*::pSWU30 und DZ2:*asgB*::pSWU30:*pro-frzZ* WTneu, N/E und D220N analysiert (Abb. 5.26).

Die Abbildung 5.26 zeigt in der oberen Reihe Bilder der Differenzierung der Kontrollen, des Wildtyps DZ2 und der Mutante DZ2:*asgB*, sowie der Negativkontrolle DZ2:*asgB* mit dem integrierten leeren Vektor pSWU30. Während der Wildtypstamm DZ2 unter den getesteten Bedingungen normalerweise bereits nach fünf Tagen die Differenzierung abgeschlossen hatte, war die Fruchtkörperbildung in diesem Experiment nach sieben Tagen noch nicht vollständig. Am Rand der Kolonie verblieben Aggregate von Zellen, die weiterhin durchscheinend erschienen. Die Mutante DZ2:*asgB* arretierte dagegen wie

erwartet in einem frühen Stadium der Differenzierung. Im Zentrum der entsprechenden Kolonie sah man einige Zellaggregate, während die Zellen am Rand als einlagige Schicht verblieben. Die interne Negativkontrolle zeigte, dass durch die Integration des *attP*-Plasmids pSWU30 alleine der Phänotyp des Elternstamms DZ2*asgB* nicht verändert wurde. Das Erscheinungsbild des Stamms DZ2*asgB*::pSWU30 entsprach dem des A-Signal-defekten Elternstamms.

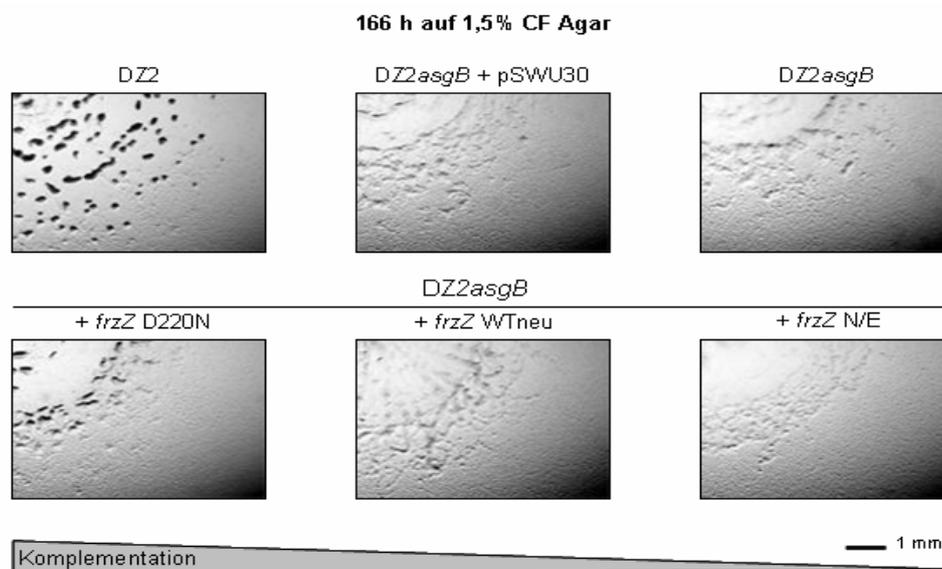


Abbildung 5.26: Morphologische Differenzierung der Stämme DZ2 und DZ2*asgB* (obere Reihe, linkes und rechtes Bild) im Vergleich zu den Stämmen DZ2*asgB*::pSWU30:*pro-frzZ* D220N, WTneu und N/E (untere Reihe, von links) und der Negativkontrolle DZ4314::pSWU30 (obere Reihe, Mitte). Zur Vorbereitung wurden exponentiell wachsende Kulturen durch Zentrifugation geerntet und mit CF Medium ohne Nährstoffe gewaschen, um verbliebene Nährstoffe zu entfernen. 5 μ l einer Suspension mit einer OD₆₀₀ von 10 wurden auf CF Agarplatten getropft. Die gezeigten Bilder sind repräsentative Aufnahmen eines der drei Ansätze für jeden getesteten Stamm aus einem Experiment und zeigen den Rand der Kolonie nach sieben Tagen.

In der unteren Reihe der Abbildung 5.26 sind Aufnahmen angeordnet, welche die Veränderung des Phänotyps des Stamms DZ2*asgB* aufgrund der *attP-attB* vermittelten Integration verschiedener Formen des *frzZ*-Gens zeigen. Die Integration des *frzZ* N/E oder des *frzZ* WTneu-Konstrukts änderte wenig am Phänotyp des Elternstamms. Die künstlich erhöhte Zelldichte im Zentrum der Kolonie brachte einige Aggregate hervor, die über dieses Stadium der Differenzierung allerdings nicht hinaus kamen. Im Gegensatz dazu schienen die Zellen des Stamms DZ2*asgB*::pSWU30:*pro-frzZ* D220N, verglichen mit dem Elternstamm, ein wenig weiter in der Differenzierung zu kommen und bildeten im

Zentrum der Kolonie Aggregate, von denen die größten ein wenig dunkler erschienen. Zum Rand der Kolonie hin nahm die Anzahl dieser Aggregate ab.

Ein Stamm, der aufgrund eines A-Signal-Defekts und einer dadurch verminderten *fruA*-Expression einen Phänotyp zeigte, der dem der *pph1*⁻ Mutante DZ4314 ähnelte, konnte durch Integration der Plasmide pSWU30:*pro-frzZ* D220N und N/E nicht komplementiert werden. Der beobachtete Effekt auf den Phänotyp des Stamms DZ4314 war folglich als spezifisch zu betrachten.

5.5.5 Analyse der epistatischen Beziehung von FrzZ und Pph1 - die *frzZ pph1*⁻ Doppelmutante

Wie bereits ausgeführt, zeigen *pph1*⁻ und *frzZ* Zellen sowohl unter vegetativen als auch unter Differenzierungsbedingungen einige gemeinsame phänotypische Eigenschaften, die dafür sprechen, dass die PP2C-Phosphatase und der *response* Regulator in einem Signaltransduktionsweg positioniert sind. Um ein direktes Aufeinanderfolgen der beiden Proteine in einer Wirkkette zu untersuchen, sollte die epistatische Beziehung des *pph1*- und des *frzZ*-Gens zueinander analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde eine Doppelmutante konstruiert. Entspricht der Phänotyp der Doppelmutante einer der beiden Einzelmutanten, ist das betreffende Gen epistatisch zu dem jeweils anderen und das korrespondierende Genprodukt liegt in der Wirkkette zuoberst.

Zu diesem Zweck wurde ein Phagenlysat der kanamycinresistenten *pph1*-Insertionsmutante DZ4314 hergestellt und der Rezipientenstamm DZ2Δ*frzZ* damit transduziert. Die Transduktionsansätze wurde zur Selektion auf CYE Agarplatten mit Kanamycin ausgebracht. Resistente Kolonien wurden in Flüssigkultur angezogen, um deren cytoplasmatische Zellextrakte per *Western Blot* Verfahren auf eine Akkumulation des Pph1- und des FrzZ-Proteins hin überprüfen zu können (Abb. 5.27).

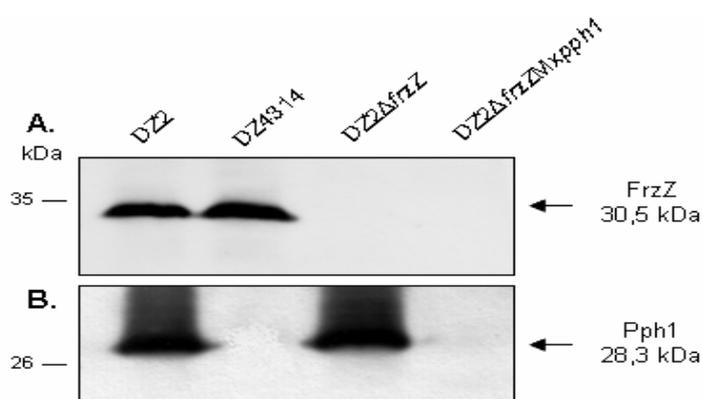


Abbildung 5.27: *Western Blot* Analyse der FrzZ- und der Pph1-Akkumulation. Verwendet wurden Extrakte der Stämme DZ2, DZ2Δ*frzZ*, DZ4314 und DZ2Δ*frzZ*M*xpph1*. Es wurden 30 µg Protein/Spur geladen. Die Detektion erfolgte mit FrzZ-spezifischem (Pineda AK-Service, Berlin) und Pph1-spezifischem Antikörper (Treuner-Lange et al., 2001).

In Zellen des Wildtyps DZ2 konnte sowohl das FrzZ- als auch das Pph1-Protein durch die spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Im Extrakt des *pph1*⁻ Stamms DZ4314 dagegen konnte nur der *response* Regulator detektiert werden, während das Pph1-Protein fehlte. In *frzZ* Zellen des Stamms DZ4484 wurde die Phosphatase, nicht aber das FrzZ-Protein durch den Antikörper erkannt. Die potenzielle Doppelmutante DZ2Δ*frzZ*M*xpph1* zeigte im *Western Blot* weder ein FrzZ- noch ein Pph1-Signal und konnte damit als *pph1*⁻ *frzZ*⁻ defekter Stamm verifiziert werden.

5.5.5.1 Wachstum unter vegetativen Bedingungen

Um den Stamm DZ2Δ*frzZ*M*xpph1* in Bezug auf das Wachstum unter vegetativen Bedingungen mit den Elternstämmen und DZ2 Wildtyp vergleichen zu können, wurde der Populationszuwachs entsprechender Flüssigkulturen als Funktion der Zeit aufgezeichnet. Dazu wurden gut gewachsene Übernachtskulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,15 bis 0,2 in CYE Medium eingestellt und bei 32°C unter Schütteln inkubiert. Zur Bestimmung der optischen Dichte wurden ca. alle 12 Stunden Proben entnommen und fotometrisch bei 600 nm quantifiziert. Dieser Versuch wurde zweimal durchgeführt, wobei das Wachstum von Doppelansätzen der einzelnen Kulturen bestimmt wurde. In Abbildung 5.28 wird aufgrund der Klarheit der Darstellung keine Standardabweichung der einzelnen Werte angegeben. Der Trend, den die Abbildung zeigt, war jedoch in beiden Experimenten zu erkennen. Die Tabelle 5.5 fasst die charakteristischen Werte der Wachstumskurven jedes Stammes zusammen und gibt Zahlenwerte für die Anzahl der Verdopplungen pro Stunde und die Verdopplungszeit an.

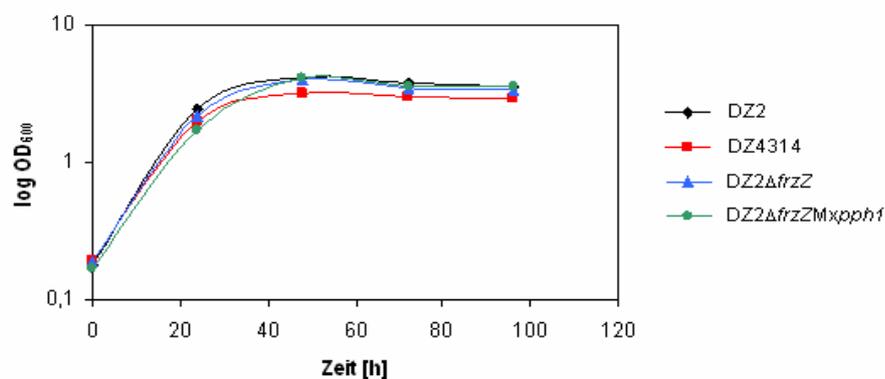


Abbildung 5.28: Wachstumskurven von DZ2 Wildtyp, DZ4314, DZ2Δ*frzZ* und DZ2Δ*frzZ*M*xpph1*. Die OD₆₀₀ der jeweiligen Flüssigkultur wurde zu den angegebenen Zeitpunkten fotometrisch bestimmt und ist in halblogarithmischer Skalierung (log OD₆₀₀) gegen die Zeit (h) aufgetragen. Die gezeigten Werte geben den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten wieder.

Wie aus der Abbildung 5.28 hervorgeht, waren die Wachstumsraten aller vier Stämme vergleichbar. Während der exponentiellen Wachstumsphase (t_{0h} bis t_{24h}) erreichten die Zellen ca. 0,2 Verdopplungen pro Stunde, was einer Verdopplungszeit von 3,2 Stunden (DZ2) bis 3,6 Stunden ($DZ2\Delta frzZMxpph1$) entsprach. Für die Phosphatasemutante DZ4314 war der Wachstumsertrag im Vergleich geringer und der Stamm trat mit weniger Zellen in die stationäre Phase ein. Dies konnte für die $pph1^- frzZ^-$ Doppelmutante nicht beobachtet werden. Deren vegetatives Wachstum war damit dem des $frzZ^-$ Stamms $DZ2\Delta frzZ$ vergleichbar und zeigte keinen Unterschied zu dem des Wildtyps DZ2 (siehe auch 5.1.2.1).

Tabelle 5.5: Charakteristika der Wachstumskurven der Stämme DZ2, DZ4314, $DZ2\Delta frzZ$ und $DZ2\Delta frzZMx4pph1$ während der exponentiellen Wachstumsphase (t_{0h} bis t_{24h}).

Stamm (Genotyp)	Verdopplungen/h	Verdopplungszeit (h)
DZ2	0,22	3,17
DZ4314	0,20	3,53
DZ2ΔfrzZ	0,21	3,38
DZ2ΔfrzZMxpph1	0,19	3,59

5.5.5.2 Schwärmverhalten unter vegetativen Bedingungen

In den vorangegangenen *colony expansion* Versuchen wurden die Phosphatasemutante DZ4314 und der $frzZ^-$ Stamm DZ4484 ($DZ2\Delta frzZ$) immer getrennt voneinander untersucht und nie direkt verglichen. Dabei konnte für $DZ2\Delta frzZ$ vor allem eine Beeinträchtigung des S-Motilitätssystems festgestellt werden (siehe auch Punkte 5.1.2.3, 5.1.2.4), während $pph1^-$ defekte Zellen mit dieser Art der Analyse unter keiner der getesteten Bedingungen einen Defekt zeigten (siehe Punkt 5.5.3.2).

Um das Schwärmverhalten der Doppelmutante $DZ2\Delta frzZMxpph1$ mit dem der Stämme DZ4314, $DZ2\Delta frzZ$ und des Wildtyps DZ2 vergleichen zu können, wurden exponentiell wachsende Kulturen aufkonzentriert und auf CYE Platten mit einem Agargehalt von 0,3% oder 1,5% aufgetropft. Nach fünf Tagen wurde der Zuwachs (Expansion) der Kolonien ermittelt und mit der Positivkontrolle, dem Wildtyp DZ2, verglichen. Die Abbildung 5.29 zeigt die gemittelten Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten, in denen jeweils ein Dreifachansatz für jeden Stamm untersucht wurde.

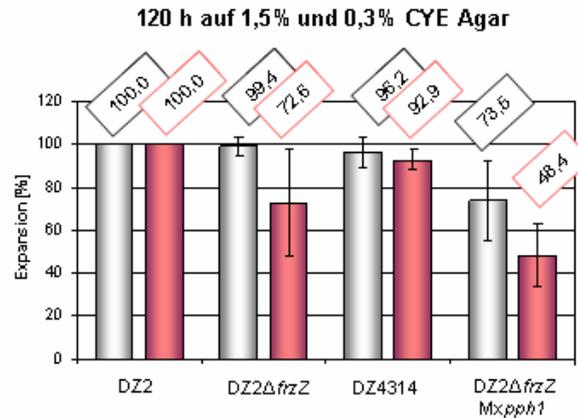


Abbildung 5.29: *Colony expansion* Assay der Stämme DZ2, DZ2ΔfrzZ, DZ4314 und DZ2ΔfrzZMxpph1. Zu diesem Zweck wurden exponentiell wachsende Flüssigkulturen durch Zentrifugation geerntet und aufkonzentriert. 5 µl einer Suspension mit einer OD₆₀₀ von 10 wurden auf CYE Agarplatten getropft. Die grauen Balken zeigen die Expansion (in %) auf 1,5% CYE Agar, die roten Balken zeigen die Expansion (in %) auf 0,3% CYE Agar. Der Wildtyp DZ2 diente als Positivkontrolle, die Expansion der Teststämme wurde prozentual auf die des Wildtyps (≈ 100%) bezogen. Die gezeigten Werte geben den Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten an, in denen jeweils ein Dreifachansatz für jeden getesteten Stamm untersucht wurde. Die Fehlerbalken geben die maximale Abweichung vom Mittelwert an.

Der Stamm DZ2ΔfrzZ zeigte auf den Softagarplatten, verglichen mit dem Wildtyp, ein deutlich vermindertes Schwärmen. Der Koloniedurchmesser betrug nach fünf Tagen Inkubation im Mittel 72,6% des Durchmessers der DZ2 Kolonie. Auf festem Untergrund dagegen war mit 99,4% der Expansion des Wildtyps in diesem Experiment kein signifikanter Defekt zu beobachten. Die Schwärmfähigkeit des *pph1* Stamms DZ4314 war ebenfalls unter diesen Bedingungen nicht beeinträchtigt. Der Koloniedurchmesser lag auf den Hartagarplatten bei 96,2% des Wertes, den die Wildtypkolonie zeigte. Auf weichem Untergrund war mit gemittelten 92,9% eine minimale Reduktion der Kolonieexpansion zu beobachten. Die Doppelmutante DZ2ΔfrzZMxpph1 zeigte in diesem Versuch sowohl auf 1,5%igen als auch auf 0,3%igen Agarplatten eine deutlich verminderte Schwärmfähigkeit. Auf festem Untergrund lag der Koloniedurchmesser nach fünf Tagen Inkubation bei 73,5%, auf den Softagarplatten bei 48,4% der Expansion des Wildtyps DZ2.

Bezieht man frühere *colony expansion* Versuche in die Betrachtung der Schwärmfähigkeit des *M. xanthus* Stamms DZ2ΔfrzZ mit ein (siehe Punkte 5.1.2.3, 5.1.2.4), so war der erreichte Koloniedurchmesser in den in Abb. 5.29 gemittelten Analysen auf beiden Untergründen größer als zuvor beobachtet. Für den *pph1* Stamm DZ4314 konnte dagegen erneut keine Beeinträchtigung der Bewegungsfähigkeit beobachtet werden (siehe 5.5.3.2). Aufgrund dessen entsprach der Phänotyp der *pph1* frzZ Doppelmutante mit einer Beeinträchtigung beider Motilitätssysteme auch in Bezug auf das vegetative Schwärmen eher dem frzZ-defekten Elternstamm.

5.5.5.3 Morphologische Differenzierung unter Nährstoffmangelbedingungen

Nachfolgend wurde die morphologische Differenzierung der Doppelmutante *DZ2ΔfrzZMxpph1* untersucht und mit den Stämmen *DZ4314*, *DZ2ΔfrzZ* sowie dem Wildtyp *DZ2* verglichen. Zellen mit einem *frzZ*-Defekt sind in der Lage, zu aggregieren, bilden dabei aber keine Fruchtkörper, sondern krause Filamente. An der Peripherie der Kolonie entstehen häufig ringförmige Strukturen, die man als *swirls* bezeichnet. Aufgrund der veränderten Morphologie werden meist weniger Sporen gezählt, als für differenzierte Wildtypkolonien. Im Gegensatz dazu arretieren Zellen mit einem *pph1*-Defekt zu einem frühen Zeitpunkt der Differenzierung und bilden im Zentrum der Kolonie wenige, flache Aggregate (*mounds*). Sie zeigen einen Sporulationsdefekt, der sowohl die Gesamtanzahl an Sporen als auch deren Keimungsfähigkeit betrifft.

Der Nährstoffmangel wurde durch das Waschen exponentiell gewachsener Flüssigkulturen mit nährstofffreiem CF Medium eingeleitet. Die konzentrierten Zellsuspensionen wurden dann auf CF Agarplatten aufgetropft und fünf Tage bei 32°C inkubiert. Ein Experiment ist exemplarisch in der Abbildung 5.30 dargestellt.

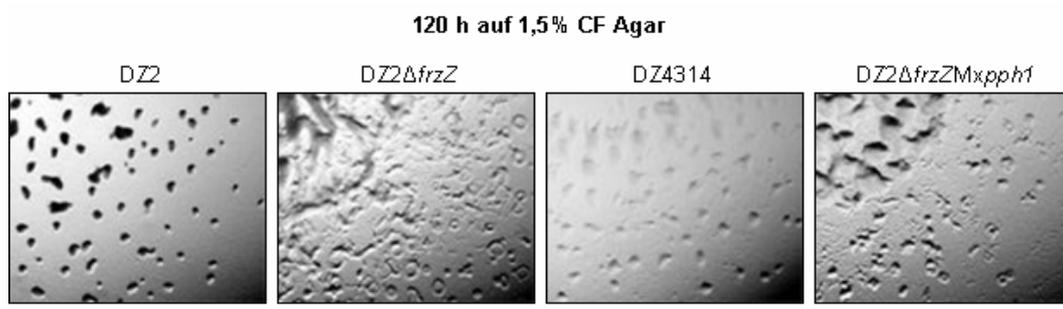


Abbildung 5.30: Morphologische Differenzierung der Stämme *DZ2*, *DZ2ΔfrzZ*, *DZ4314* und *DZ2ΔfrzZMxpph1*. Zur Vorbereitung wurden exponentiell gewachsene Kulturen zweimal mit CF Medium ohne Nährstoffe gewaschen, um verbliebene Nährstoffe zu entfernen. 5 µl einer Suspension mit einer OD_{600} von 10 wurden auf CF Agarplatten getropft. Die Bilder zeigen den Rand der Kolonie und sind repräsentative Aufnahmen aus einem Experiment. Die schwarzen Balken markieren einen Bereich von 1 mm.

Aus Abbildung 5.30 wird deutlich, dass der Differenzierungsphänotyp der *pph1 frzZ* Doppelmutante dem des Stamms *DZ2ΔfrzZ* ähnelte. Die Kolonien zeigten nach fünf Tagen dunklere Aggregate im Zentrum, während die Zellen an der Peripherie die typischen ringförmigen Strukturen bildeten. Diese zeigte auch der *frzZ* Stamm, doch waren die *swirls* hier größer und zahlreicher, als für die Doppelmutante zu beobachten

war. Deren Aggregate erschienen eher filamentös und langgestreckt. Im Gegensatz dazu bildete die Phosphatasemutante flache, durchscheinende Zellansammlungen, die wie die Fruchtkörper angeordnet waren, welche der Wildtypstamm DZ2 nach fünf Tagen Inkubation bildete.

Nach dieser Zeitspanne wurden die Zellen von den Platten abgenommen und zur Bestimmung der Gesamtsporenanzahl (*ts*) und der lebensfähigen Sporen (*cfu*), wie unter 4.1.10.3 beschrieben, behandelt. Die ermittelten Werte der Tabelle 5.6 entstammen einem Experiment, in dem für jeden getesteten Stamm ein Dreifachansatz untersucht wurde. Die durch Keimung entstandenen Kolonien wurden nach fünf Tagen Inkubation gezählt. Der prozentuale Anteil der lebensfähigen Sporen an der Gesamtzahl gebildeter Dauerformen, die Sporulationseffizienz, wurde ebenfalls ermittelt.

Tabelle 5.6: Sporulationseffizienz der Stämme DZ2, DZ2 Δ frzZ, DZ4314 und DZ2 Δ frzZMx4pph1. Die Tabelle gibt die gemittelten Werte der *total spores* (*ts*) und *colony forming units* (*cfu*) eines Experiments pro ml an, in dem ein Dreifachansatz jedes zu untersuchenden Stamms auf CF Agarplatten getropft wurde. Die Fehler sind in % der Gesamtmenge an *ts* oder *cfu* angegeben.

Auf 1,5% CF Agar					
Stamm (Genotyp)	<i>ts/ml</i>	% von Wildtyp	<i>cfu/ml</i>	% von Wildtyp	Effizienz (%)
DZ2	5,93 x 10 ⁶ +/- 16,17%	100,00	1,94 x 10 ⁴ +/- 38,25%	100,00	0,33
DZ2ΔfrzZ	6,22 x 10 ⁶ +/- 11,56%	104,92	1,90 x 10 ⁴ +/- 5,26%	97,77	0,31
DZ4314^a	1,72 x 10 ⁶ +/- 30,91%	29,00	1,25 x 10 ²	0,64	0,0073
DZ2ΔfrzZMxpph1	3,33 x 10 ⁷ +/- 9,11%	562,39	1,06 x 10 ⁵ +/- 32,33%	544,43	0,32

a. Für den *cfu/ml*-Wert des Stamms DZ4314 kann kein Fehler angegeben werden, da nur für eine Verdünnung der Sporensuspension Kolonien quantifiziert werden konnten.

Der *frzZ* Stamm DZ4484 zeigte wie erwartet keinen Sporulationsdefekt. Sowohl die ermittelte Gesamtzahl als auch die Zahl der keimungsfähigen Sporen ähnelte den Werten, die für den Wildtyp DZ2 ermittelt wurden. Die Sporulationseffizienz beider Stämme war vergleichbar und lag für DZ2 Δ frzZ bei 0,31% und für DZ2 bei 0,33%. Der *pph1*⁻ Stamm DZ4314 bildete in diesem Experiment mit 29% der Menge an *ts*, die für DZ2 Wildtyp nach fünf Tagen ausgezählt werden konnten, ungewöhnlich viele Sporen. Davon erwiesen sich jedoch nur 0,64% als keimungsfähig. Das entsprach einer Sporulationseffizienz von

0,0073% und demonstrierte erneut den Sporulationsdefekt dieser Mutante. Die Doppelmutante bildete unter Nährstoffmangel in diesem Experiment 562,39% der Gesamtsporenanzahl, die für den Wildtypstamm ermittelt werden konnte. Aufgrund der größeren Gesamtmenge an Sporen keimten, verglichen mit DZ2, 5,4-mal so viele Dauerformen aus. Die Sporulationseffizienz erreicht mit 0,32% allerdings einen ähnlichen Wert, wie er für den Wildtyp DZ2 und die *frzZ* Mutante DZ2 Δ *frzZ* quantifiziert werden konnte. Die *pph1* *frzZ* Doppelmutante zeigte folglich keinen Sporulationsdefekt. Abgesehen von der größeren Gesamtmenge an gebildeten Sporen, glich der Phänotyp des Stamms DZ2 Δ *frzZ*Mx*pph1* auch unter Differenzierungsbedingungen dem der *frzZ* Mutante DZ2 Δ *frzZ*.

Bezieht man alle zuvor beschriebenen Experimente zur epistatischen Beziehung des *response* Regulators und der PP2C-Phosphatase mit ein, so ist *frzZ* epistatisch zu *pph1*. Der *response* Regulator müsste in einer gemeinsamen Wirkkette oberhalb der Phosphatase liegen.

5.5.6 Überexpression und Aufreinigung von FrzZ und Pph1

Zur Überprüfung einer direkten Interaktion des *response* Regulators FrzZ mit der PP2C-Phosphatase Pph1 wurden beide Proteine im Rahmen dieser Arbeit überexprimiert und aufgereinigt, um *in vitro* Interaktionsanalysen durchführen zu können.

5.5.6.1 Überexpression und Aufreinigung von His₆-FrzZ

Die Konstruktion des Plasmids pRSETB:*frzZ* zur Überexpression des *response* Regulators wurde in der vorangegangenen Diplomarbeit durchgeführt (Gröger, 2002) und ist nachfolgend in Kürze beschrieben. Durch Restriktion mit dem Enzym *EcoRI* konnte das 889 bp große *frzZ*-Fragment aus dem Vektor pBD:*frzZ* (Treuner-Lange et al., 2001) in das Plasmid pRSETB der Firma Invitrogen kloniert werden. Durch die gewählte Strategie inserierte das Fragment *downstream* und *in frame* mit einer Sequenz, die ein N-terminales Fusionspeptid kodierte. Dieses stand unter Kontrolle des T7-Promotors und erlaubte durch die Fusion mit einer Folge von sechs Histidinresten (His₆, Metall-Affinitäts-tag) die Aufreinigung des His₆-FrzZ Proteins durch Ni²⁺-Affinitätschromatografie (Punkt 4.1.9).

Die Aufreinigung erfolgte über vorgepackte Protino[®] Ni-TED 2000 Säulen der Firma Macherey-Nagel unter nativen Bedingungen. Es wurden die modifizierten Puffer verwendet, die unter 4.6.5.2 beschrieben sind. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit je 4 ml His₆-FrzZ Waschpuffer erfolgte die Elution der spezifisch gebundenen Proteine durch einen Imidazolgradienten. Von der ersten Waschfraktion, dem Proteinextrakt und

dem Durchlauf wurden jeweils 10 µg Protein mit 1/5 Vol. 5x SDS Auftragspuffer gemischt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Für die Analyse der zweiten Waschfraktion und der Elutionsfraktionen wurden 20 µl Probe mit 5 µl 5x SDS Auftragspuffer versetzt und genauso behandelt. Nach der Auftrennung der Proben über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteinbanden durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht.

Durch den Austausch der phosphorylierbaren Aspartatreste wurden die Eigenschaften der verschiedenen Formen von FrzZ nicht verändert, so dass keine Unterschiede im Laufverhalten der Proteine oder in der Qualität ihrer Reinigung festgestellt werden konnten. Exemplarisch ist in der Abbildung 5.31 die Aufreinigung des Proteins His₆-FrzZ D220N dargestellt.



Abbildung 5.31: Silbergefärbtes 12%iges SDS-Polyacrylamidgel nach der Aufreinigung von His₆-FrzZ D220N. Auftrennung des Zellextraktes (*Ex*, 10 µg), des Durchlaufs (*DL*, 10 µg), der Wasch- (*W1*, 10 µg; *W2*) und Elutionsfraktionen (*E1* - 6). *M*: Prestained Proteinmarker, Fermentas.

Deutlich sah man im Zellextrakt (*Ex*) die Bande des *response* Regulator-Proteins, das mit hoher Spezifität an das Säulenmaterial band. Viele unspezifisch gebundene Proteine eluierten durch den Imidazol-Gehalt des Waschpuffers (20 mM Imidazol) bereits in der ersten Waschfraktion (*W1*), so dass die zweite Waschfraktion (*W2*) nur wenige Proteinbanden zeigte. Durch den Anstieg der Imidazol-Konzentration löste sich His₆-FrzZ D220N bereits in der ersten Elutionsfraktion (50 mM Imidazol) vom Säulenmaterial. Die größte Menge eluierte in den Fraktionen zwei bis vier (100, 250 und 500 mM Imidazol). Eine kleine Menge des FrzZ-Proteins war auch in der Elutionsfraktion fünf, noch weniger in der sechsten Elutionsfraktion sichtbar (500 mM Imidazol).

5.5.6.2 Überexpression und Aufreinigung von His₆-Pph1

Die PP2C-Phosphatase Pph1 sollte ebenfalls unter Nutzung des His₆-tag Systems der Firma Invitrogen überexprimiert und chromatografisch aufgereinigt werden. Durch Restriktion mit den Enzymen *Bam*HI und *Hind*III wurde das 785 bp große *pph1*-Fragment aus dem Vektor pQE30:*pph1* (Treuner-Lange et al., 2001) in das Plasmid pRSETA kloniert, um ein N-terminales Fusionspeptid mit einem Metall-Affinitäts-tag zu generieren.

Die Aufreinigung durch Ni²⁺-Affinitätschromatografie erfolgte ebenfalls über vorgepackte Protino[®] Ni-TED 2000 Säulen der Firma Macherey-Nagel unter nativen Bedingungen. Es wurden die modifizierten Puffer verwendet, die unter 4.6.5.2 beschrieben sind. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit je 4 ml His₆-Pph1 Waschpuffer erfolgte die Elution der spezifisch gebundenen Proteine durch einen NaCl-Gradienten. Von der ersten Waschfraktion, dem Proteinextrakt und dem Durchlauf wurden jeweils 10 µg Protein mit 1/5 Vol. 5x SDS Auftragspuffer gemischt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Für die Analyse der zweiten Waschfraktion und der Elutionsfraktionen wurden 20 µl Probe mit 5 µl 5x SDS Auftragspuffer versetzt und genauso behandelt. Nach der Auftrennung der Proben über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteinbanden durch eine Silberfärbung des Gels sichtbar gemacht (Abb. 5.32).

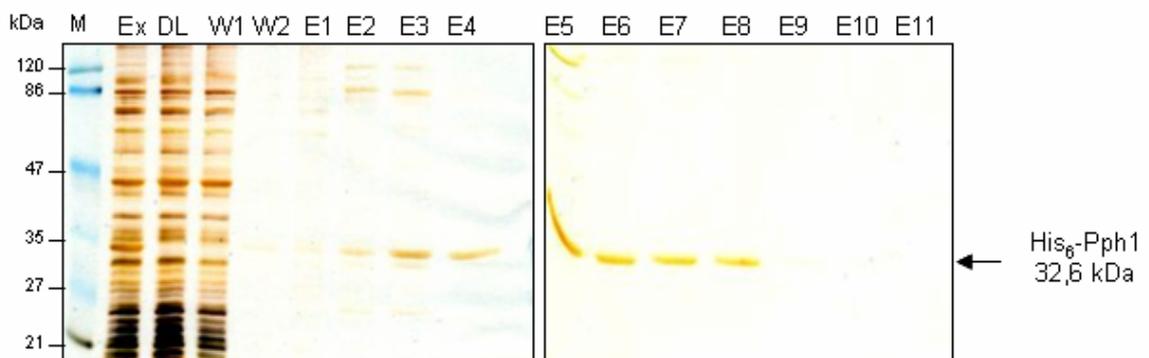


Abbildung 5.32: Silbergefärbte 12%ige SDS-Polyacrylamidgelle nach der Aufreinigung von His₆-Pph1. Auftrennung des Zellextraktes (*Ex*, 10 µg), des Durchlaufs (*DL*, 10 µg), der Wasch- (*W1*, 10 µg; *W2*) und Elutionsfraktionen (*E1* - *11*). *M*: *Prestained* Proteinmarker, Fermentas.

Das 32,6 kDa große His₆-Protein band ebenfalls sehr spezifisch an das Säulenmaterial, wie das Fehlen der His₆-Pph1 Bande im Durchlauf (*DL*) beweist. Viele unspezifisch gebundene Proteine eluierten bereits in der ersten Waschfraktion (*W1*), so dass die zweite Waschfraktion (*W2*) nur wenige Proteinbanden zeigte. Auch eine geringe

Menge Pph1-Protein löste sich unter diesen Bedingungen bereits von dem Säulenmaterial. Der Salzgehalt des Elutionspuffers steigerte sich von 250 mM in Elutionsfraktion zwei (*E2*), über 500 mM (*E3*, *E4*), 750 mM (*E5*), 1 M (*E6*) und 1,5 M (*E7* bis *E9*) bis auf 2 M NaCl (ab *E10*). Ab der dritten Elutionsfraktion blieb die Menge an Pph1, die die Säule verließ, nahezu konstant, bis in Fraktion neun nur noch ein kleine Menge His₆-Pph1 durch die Silberfärbung sichtbar gemacht werden konnte.

Durch die Bestimmung der spezifischen Aktivität der Phosphatase (siehe Punkt 4.6.9.2) konnte gezeigt werden, dass sich ein Großteil des überexprimierten Pph1-Proteins nach dem Zellaufbruch und der anschließenden Zentrifugation nicht im Überstand, sondern im Zellpellet befand (Daten nicht gezeigt). Um die Phosphatase daraus zu lösen, wurde das Zellpellet in einem kleinen Volumen His₆-Pph1 Waschpuffer aufgenommen, dem 20% Xylitol zugesetzt waren. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis und mehrmaligem Invertieren des Reaktionsgefäßes wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation sedimentiert. Der gewonnene Überstand (2. Überstand) wurde erneut über eine Protino[®] Ni-TED 2000 Säule gegeben, wie beschrieben gewaschen und durch einen NaCl-Gradienten eluiert. Soweit möglich, wurden 10 µg Protein jeder Fraktion über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel getrennt und durch Silberfärbung analysiert (Abb. 5.33).

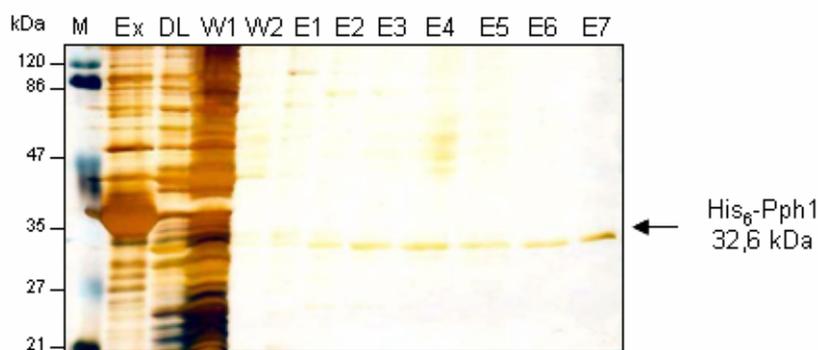


Abbildung 5.33: Silbergefärbtes 12%iges SDS-Polyacrylamidgel nach der Aufreinigung des 2. Überstands von His₆-Pph1. Auftrennung des 2. Überstands (*Ex*, 10 µg), des Durchlaufs (*DL*, 10 µg), der Wasch- (*W1*, 10 µg; *W2*) und Elutionsfraktionen (*E1* - *E7*). *M*: Prestained Proteinmarker, Fermentas.

Durch die oben beschriebene Behandlung konnte eine große Menge an His₆-Pph1 aus dem Zellpellet gelöst werden, wie die Bande in der Spur des 2. Überstands (*Ex*) beweist. Das Protein zeigte weiterhin eine gute Bindung an das Säulenmaterial, von dem es sich aber unabhängig von der NaCl-Konzentration des Wasch- oder Elutionspuffers wieder löste. Eine gleichbleibend dünne Pph1-Bande konnte in allen analysierten Fraktionen sichtbar gemacht werden, während der Hauptanteil des Proteins auf der Säule verblieb. Die NaCl-Konzentration der Elutionsschritte stieg, wie zuvor beschrieben, bis auf 1,5 M

(E7) an. Erst durch die Zugabe von Imidazol in einer Konzentration von 500 mM zu 3 ml His₆-Pph1 Elutionspuffer (1,5 M NaCl) konnte das Protein von der Säule gelöst werden (nicht gezeigt).

Da das Reagenz Imidazol und der hohe Salzgehalt der Elutionsfraktionen die enzymatische Aktivität der Phosphatase inhibierten, wurden sie durch einen weiteren Reinigungsschritt in Form einer Gelfiltration wieder entfernt. Dazu wurden die Elutionsfraktionen der Reinigung des ersten (Abb. 5.32) und zweiten Überstandes (Abb. 5.33) vereinigt, die Proteine durch die Zugabe von Ammoniumsulfat (80% Sättigung) gefällt und das erhaltene Pellet in Gelfiltrationspuffer (siehe Punkt 4.6.5.3) gelöst. Die Beladung und der Betrieb der Gelfiltrationssäule Superdex 200 HR 10/300 der Firma Amersham Pharmacia Biotech erfolgten dabei nach den Angaben des Herstellers.

In Abbildung 5.34 ist ein typisches Laufprofil der Gelfiltration von His₆-Pph1 gezeigt, welches durch das Computerprogramm *BioLogic HR Chromatography System* der Firma Bio-Rad erstellt wurde. Die Abbildung 5.35 zeigt das silbergefärbte 12%ige SDS-Polyacrylamidgel, über welches die Fraktionen des rot-markierten Bereichs des Elutionsprofils der Gelfiltration nachfolgend analysiert wurden.

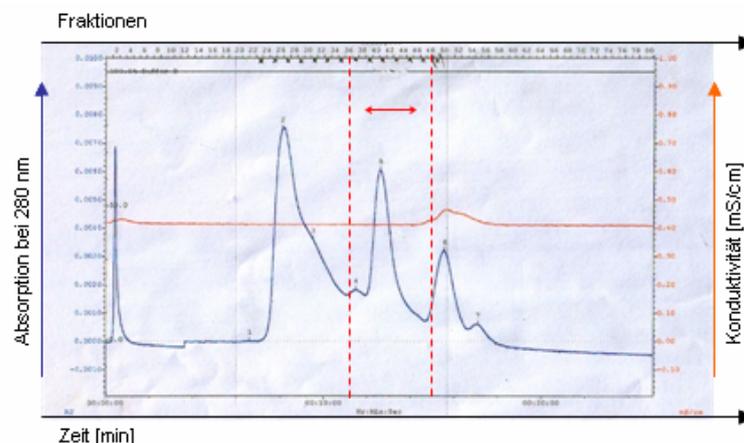


Abbildung 5.34: Elutionsprofil der Gelfiltration von His₆-Pph1. In diesem Experiment wurde die Säule Superdex 200 HR 10/300 (Amersham Pharmacia Biotech) mit einer Geschwindigkeit von 0,8 ml/min betrieben. Es wurden Fraktionen von 0,25 ml Vol. gesammelt. Der rot-markierte Bereich zeigt die Fraktionen an, die nachfolgend durch eine SDS-PAGE analysiert wurden.

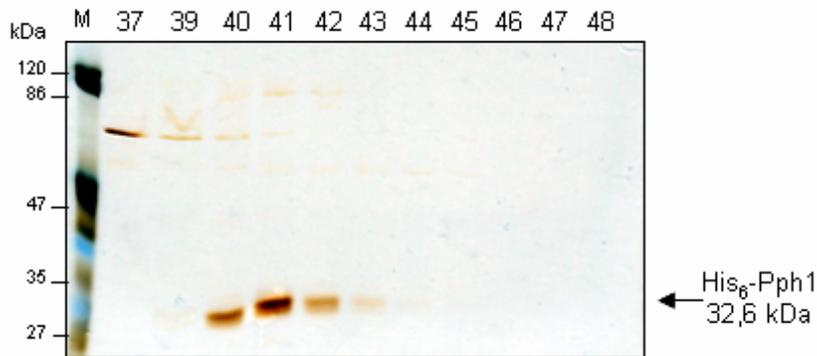


Abbildung 5.35: Silbergefärbtes 12%iges SDS-Polyacrylamidgel nach der Gelfiltration von His₆-Pph1. Auftrennung der Fraktionen 37, 39 und 40 bis 48. Es wurden jeweils 20 µl Fraktion mit 1/5 Vol. 5x SDS Auftragspuffer versetzt und aufgetragen. M: Prestained Proteinmarker, Fermentas.

Tabelle 5.7: Proteinkonzentration und Aktivitätswerte (pNPP-Test) der analysierten Gelfiltrationsfraktionen.

Fraktion	Protein (µg/µl)	pNPP (Δε)	Spezifische Aktivität (Δε/µg Protein)	Gesamtprotein (mg)	Units
vorher^a	22,67	0,931	$8,21 \times 10^{-3}$	90,67	744,40
37	0,12	0,004	$6,79 \times 10^{-3}$	0,01	0,07
39	0,13	0,006	$9,45 \times 10^{-3}$	0,01	0,09
40	0,29	0,008	$5,43 \times 10^{-3}$	0,02	0,11
41	0,45	0,008	$6,79 \times 10^{-3}$	0,03	0,20
42	0,30	0,008	$4,01 \times 10^{-3}$	0,02	0,08
43	0,21	0,006	$2,67 \times 10^{-3}$	0,01	0,03
44	0,10	0,006	$5,63 \times 10^{-3}$	0,01	0,06
45^b	—	0,004	$8,02 \times 10^{-3}$	0,01	0,08

a. Das vorher Material ist der Extrakt vereinigt mit dem 2.Überstand der Affinitätschromatografie.

b. Für alle folgenden Fraktionen erbrachte weder die Konzentrationsbestimmung noch der Aktivitätstest ein Ergebnis

Die Tabelle 5.7 zeigt die Werte der Proteinkonzentrationsbestimmung der analysierten Gelfiltrationsfraktionen und die enzymatische Aktivität jeder Fraktion. Die Aktivität der gereinigten Phosphatase wurde mit Hilfe eines Tests bestimmt, der die Umsetzung einer definierten Menge des Substrats pNPP (p-Nitrophenylphosphat) über einen bestimmten Zeitraum photometrisch quantifiziert und als spezifische Aktivität der eingesetzten Menge an Protein berechnet. Die Aktivität des gesamten Volumens einer Fraktion wird in relativen Einheiten (Units) ausgedrückt und bezieht die spezifische Aktivität auf die Gesamtmenge an Protein in mg. Die ermittelten Werte machten deutlich, dass von der ursprünglich vorhandenen Aktivität von 744,4 Units bis zu diesem Schritt der Aufreinigung

mehr als 99% verloren gingen. Die beschriebene kombinierte Reinigungsmethode des rekombinanten His₆-Pph1 Proteins aus Ni²⁺-Affinitätschromatografie und einer anschließenden Ausschlusschromatografie war demnach wenig effizient.

5.5.7 *In vitro* Interaktionsanalysen von His₆-FrzZ und His₆-Pph1

Mit den gereinigten Proteinen His₆-FrzZ und His₆-Pph1 wurden *in vitro* Interaktionsanalysen durchgeführt, um eine direkte Interaktion des *response* Regulators FrzZ mit der PP2C-Phosphatase nachweisen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Verfahren angewendet, von denen hier nur auf die Dephosphorylierung des artifiziell phosphorylierten *response* Regulators genauer eingegangen werden soll. Eine Übersicht aller Verfahren mit einer kurzen Beschreibung der Methode und der erzielten Ergebnisse ist der Tabelle 5.8 dargestellt.

Tabelle 5.8: In dieser Arbeit angewendete Verfahren zur Interaktionsanalyse von FrzZ und Pph1.

Verfahren	Beschreibung	Ergebnis
FPLC-Analyse (Gelfiltration)	Durch Komplexbildung von His ₆ -FrzZ und His ₆ -Pph1 Verschiebung des Elutionsvolumens zu einem entsprechend höheren Molekulargewicht	keine Komplexbildung; keine Verschiebung der Einzel-peaks
Enzymatischer P_i↑ Assay (EnzCheck® Phosphate Assay Kit, Molecular Probes)	Spektrofotometrische Methode zur Quantifizierung von freigesetztem inorganischem Phosphat aus enzymatischen Reaktionen	keine P _i -Freisetzung
Far Western Blot Analyse	Inkubation von immobilisiertem His ₆ -FrzZ mit gereinigtem His ₆ -Pph1; Detektion mit spezifischem anti-Pph1 Antikörper und umgekehrt	keine Detektion
Co-Immunopräzipitation (siehe auch 4.6.8 und 5.3.1)	Co-Präzipitation von Interaktionspartnern durch hochspezifische Antigen-Antikörperreaktion von FrzZ	keine Co-Präzipitation
Dephosphorylierung von artifiziell phosphoryliertem His₆-FrzZ	Radioaktive <i>in vitro</i> Phosphorylierung von His ₆ -FrzZ mit Phosphat-Donatoren (<i>small molecular weight phospho-donors</i>); Entfernen des <i>labels</i> durch Inkubation mit der Phosphatase Pph1	Dephosphorylierung von mit [³² -P]Phosphoramidat markiertem His ₆ -FrzZ; (Nachfolgend dargestellt)

5.5.8 Artificielle Phosphorylierung von His₆-FrzZ

Es ist anzunehmen, dass das Problem der *in vitro* Interaktionsanalyse des *response* Regulators FrzZ mit der PP2C-Phosphatase Pph1 bei vielen der angewandten Techniken in der nicht vorhandenen Phosphorylierung des Regulators zu suchen ist und FrzZ in einer unphosphorylierten Form kein Substrat für die Phosphatase darstellt.

Obwohl *reponse* Regulatoren in vielen Fällen durch eine korrespondierende Histidin-Kinase phosphoryliert werden, konnte auch eine Kreuzreaktion zwischen Kinasen und Regulatoren verschiedener Systeme (Verhamme et al., 2002) sowie eine Autophosphorylierung des Regulator-Proteins gezeigt werden, die unabhängig vom Vorhandensein einer Kinase stattfand (Kim et al., 2001). Als Phosphat-Donatoren dienten dabei Moleküle, die aufgrund ihrer geringen Größe als *small molecular weight phospho-donors* bezeichnet wurden. So konnten beispielsweise die *response* Regulatoren CheY, NtrC, OmpR, NarL, Spo0F und DctD durch die Moleküle Acetylphosphat, Phosphoramidat, Carbamoylphosphat und Berylliumfluorid phosphoryliert werden (Lukat et al., 1992; Yan et al., 1999; Buckler and Stock, 2000).

5.5.8.1 Artificielle Phosphorylierung mit Acetyl [³²-P]Phosphat

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu dem enterobakteriellen *response* Regulator CheY wurde zunächst geprüft, ob das FrzZ-Protein durch Acetylphosphat phosphoryliert werden kann. Der Phosphat-Donator wurde zu diesem Zweck als radioaktive Verbindung synthetisiert (siehe Punkt 4.6.11.1). Zur *in vitro* Phosphorylierung wurden 50 µg gereinigtes His₆-FrzZ mit Acetyl [³²-P]Phosphat (theoretisch 20.786,4 *cpm*; siehe auch 4.6.11.1) in einem Gesamtvolumen von 100 µl inkubiert. Nach 0, 15, 30, 60, 120 und 180 min wurden dieser Reaktion jeweils 20 µl entnommen und der Proteinanteil durch eine TCA-Fällung präzipitiert. Das Pellet wurde anschließend in 1x Phosphorylierungspuffer aufgenommen. Die spezifische Aktivität von Pellet und Überstand wurden dann durch Messung der Zerfälle pro Zeiteinheit (*cpm/min*) im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt und miteinander verglichen. Die spezifische Aktivität der Kontrollen ist der Tabelle 5.9 zu entnehmen, während die Abbildung 5.36 die prozentuale Verteilung der gemessenen *cpm*-Werte auf Proteinanteil und Überstand nach 180 min Inkubation zeigt. Sie vergleicht dabei die getesteten His₆-FrzZ-Formen WT, N/N und D52N mit der internen Negativkontrolle Rinderserumalbumin (BSA).

Tabelle 5.9: Bestimmung der spezifischen Aktivität der Kontrollen zur artifiziellen Phosphorylierung von His₆-FrzZ mittels der Messung der Zerfälle (*cpm*)/min im Flüssigkeits-szintillationszähler. Gemessen wurden 4 µl Acteyl [³²-P] Phosphat (*K*₁), 4 µl Acteyl [³²-P]phosphat mit 1/10 Vol. 10x Reaktionspuffer in Wasser (*K*₂), 20 µl 1x Phosphatpuffer (*K*₃) und 10 µg BSA, das genauso wie die 180 min Probe von His₆-FrzZ behandelt und in Pellet (*K*₄) und Überstand (*K*₅) geteilt wurde.

Kontrolle	<i>cpm</i>	Fehler (<i>cpm</i>)
<i>K</i> ₁	1642,05	81,11
<i>K</i> ₂	1716,13	82,89
<i>K</i> ₃	59,01	15,37
<i>K</i> ₄	71,00	16,86
<i>K</i> ₅	1502,25	77,51

Die Messung der spezifischen Aktivität der Acteyl [³²-P]Phosphat-Kontrolle unter Reaktionsbedingungen (*K*₂) ergab, dass statt der theoretisch eingesetzten Menge an *cpm* nur die Hälfte tatsächlich in diesem Experiment zur Verfügung stand (Tab. 5.9). Unter Reaktionsbedingungen zeigte dieselbe Menge an Phosphat-Donator eine etwas höhere spezifische Aktivität (*K*₂ verglichen mit *K*₁), was durch einen Effekt des Reaktionspuffers auf die Messung erklärt werden könnte. Der Reaktionspuffer an sich zeigte eine gewisse Eigenaktivität, wie die Zerfallsmessung der entsprechenden Kontrolle (*K*₃) bestätigte.

Verteilung der spezifischen Aktivität nach 180 min

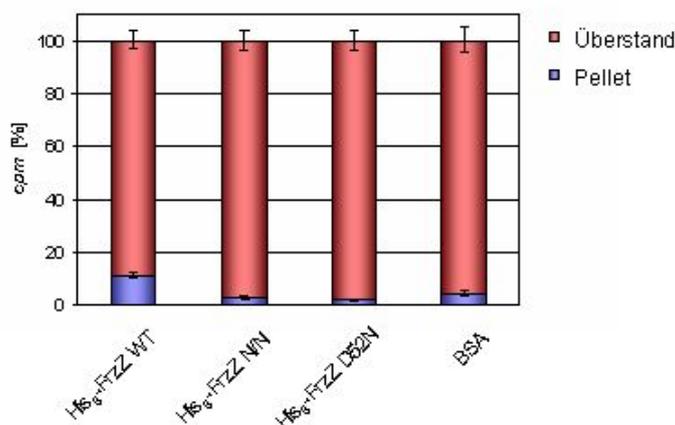


Abbildung 5.36: Prozentuale Verteilung der gemessenen *cpm*-Werte der artifiziellen Phosphorylierung von His₆-FrzZ mit Acteyl [³²-P]Phosphat nach 180 min auf den Proteinanteil (Pellet) und den Überstand. Gemessen wurde die Phosphorylierung der His₆-FrzZ Formen WT, N/N und D52N sowie der Kontrolle BSA. Der Proteinanteil wurde durch TCA-Präzipitation aus dem Gesamtansatz gefällt.

Für die interne Negativkontrolle, die Inkubation von 50 µg Rinderserumalbumin mit Acteyl [³²-P]Phosphat unter denselben Bedingungen, die auch auf His₆-FrzZ angewendet wurden, konnte eine Verteilung der spezifischen Aktivität auf Proteinanteil und Überstand von 4,51% zu 95,49% gezeigt werden (Abb. 5.36). Damit entfiel hier ein größerer Anteil der spezifischen Aktivität auf das Proteinpellet, als beispielsweise für die D52N-Form des *response* Regulators gemessen werden konnte. Für diese Variante des FrzZ-Proteins, in der nur die zweite Domäne phosphorylierbar war, wurden für den Proteinanteil 1,94% der gemessenen spezifischen Aktivität bestimmt. Für die nicht phosphorylierbare Form FrzZ N/N entfielen dagegen mit 2,97% ein größerer Anteil auf das Pellet. Die vollständig phosphorylierbare His₆-FrzZ WT-Form zeigte mit 11,23% der spezifischen Aktivität für den Proteinanteil den höchsten prozentualen Anteil, der in diesem Experiment gemessen werden konnte.

Eine zunehmende Phosphorylierung des Proteinanteils sollte mit einer Abnahme der spezifischen Aktivität des Überstands über die Zeit einhergehen. Das konnte jedoch für keine der drei getesteten Formen des *response* Regulators über die Dauer des Experiments festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die spezifische Aktivität der Proteinpellets war vergleichsweise niedrig und veränderte sich kaum. Weiterhin konnte kein signifikanter Unterschied in der Phosphorylierung der unterschiedlichen getesteten Formen des *response* Regulators festgestellt werden. Da auch die interne Negativkontrolle in vergleichbarer Weise mit Acteyl [³²-P]Phosphat reagierte (siehe Tab. 5.9 und Abb. 5.36), war davon auszugehen, dass der *response* Regulator FrzZ *in vitro* nicht durch diesen Phosphat-Donator phosphoryliert wurde.

5.5.8.2 Artifiziale Phosphorylierung mit [³²-P]Phosphoramidat

Für die Methylesterase CheB konnte durch Autophosphorylierung mittels des Phosphat-Donators Phosphoramidat eine enzymatische Aktivität verzeichnet werden, wie sie *in vivo* durch einen Phosphotransfer von der korrespondierenden Kinase CheA erreicht wurde (Lukat et al., 1991). Um eine Phosphorylierung des *response* Regulators FrzZ durch diesen Phosphat-Donator zu untersuchen, wurde radioaktives Phosphoramidat synthetisiert (siehe Punkt 4.6.11.3) und *in vitro* zur Phosphorylierung verschiedener Formen des FrzZ-Proteins eingesetzt.

Zu diesem Zweck wurden 10 µg gereinigtes His₆-FrzZ (6,7 µM) in einem Gesamtvolumen von 40 µl mit [³²-P]Phosphoramidat (50 mM) in der Gegenwart der divalenten Kationen MgCl₂ und MnCl₂ (jeweils 5 mM) inkubiert. Zur Kontrolle wurde das Regulator-Protein durch 10 µg BSA ersetzt und unter identischen Reaktionsbedingungen

behandelt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C wurde die Hälfte der Reaktion durch die Zugabe von 1/5 Vol. 5x SDS Auftragspuffer gestoppt. Der zweiten Hälfte des Ansatzes wurden 5 µg gereinigtes His₆-Pph1 Protein (5,2 µM) zugesetzt. Nach einer weiteren Stunde bei 37°C wurde auch diese Reaktion durch die Zugabe von 1/5 Vol. 5x SDS Auftragspuffer beendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel, welches nachfolgend getrocknet und per Phospho *Imaging* Verfahren analysiert wurde (Abb. 5.37, A.). Als Ladungskontrolle wurden die Proteinbanden eines identisch beladenen Gels durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht (Abb. 5.37, B.).

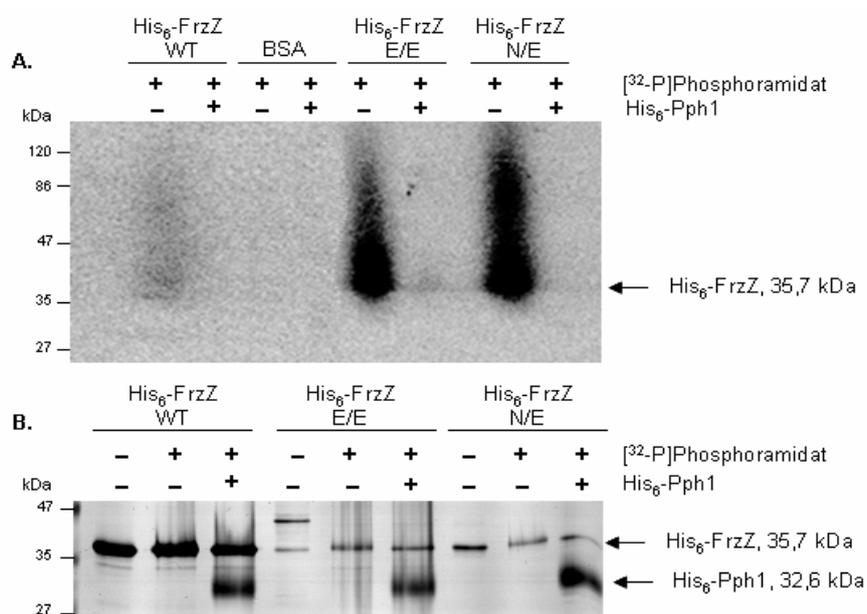


Abbildung 5.37: Analyse der artifiziellen Phosphorylierung von His₆-FrzZ mit [³²P]Phosphoramidat. Analysiert wurde die Phosphorylierung der His₆-FrzZ Formen WT, E/E und N/E. Die Phosphorylierungsreaktion wurde entweder nach 2 Stunden Inkubation gestoppt oder unter Zugabe von His₆-Pph1 für eine weitere Stunde bei 37°C belassen. Die Auftrennung der Proben erfolgte über 12%ige SDS-Polyacrylamidgels bei Raumtemperatur. **A.** zeigt das Phospho *Image* eines Gels mit der Kontrolle BSA, **B.** die Silberfärbung eines identisch beladenen Gels, über welches die getesteten FrzZ-Formen aufgetrennt wurden.

Die Abbildung 5.37 A. zeigte eine Phosphorylierung des *response* Regulators FrzZ mit radioaktivem Phosphoramidat, während das Rinderserumalbumin unphosphoryliert blieb. Unter Zugabe der gereinigten PP2C-Phosphatase Pph1 und einer weiteren Inkubation der Reaktion für eine Stunde bei 37°C verschwand die radioaktive Markierung von den Proteinen. Außer der Wildtypform des Regulator-Proteins wurden zwei weitere Formen eingesetzt, deren phosphorylierbare Aspartatreste durch Mutagenese ausgetauscht

waren. Es verwundert daher, dass His₆-FrzZ WT die schwächste radioaktive Markierung aufwies, während die N/E-Form des *response* Regulators das stärkste Signal zeigte. Es stellt sich die Frage nach der Spezifität der Phosphorylierung durch [³²-P]Phosphoramidat hinsichtlich der genutzten Aminosäurereste der FrzZ-Proteine.

Unter Verwendung des Phosphat-Donators Phosphoramidat wurde bereits früher eine unspezifische Phosphorylierung von *response* Regulatoren gezeigt, deren *active-site* Aspartatreste durch die Aminosäure Asparagin substituiert waren (Buckler and Stock, 2000). Diese Beobachtung wurde mit der alternativen Phosphorylierung vorhandener Histidinreste begründet (Buckler and Stock, 2000). Da alle in diesem Versuch eingesetzten Formen des *response* Regulators FrzZ über jeweils einen Histidinrest verfügten, wäre durch ein solches Ereignis die Differenz der Intensität der beobachteten Signale nicht zu erklären. Durch die Mutagenese verminderte sich die Anzahl der Aspartatreste. Im Gegensatz dazu erhöhte sich die Anzahl der Asparagin- und Glutamatreste der Aminosäuresequenz. Eine dadurch vermittelte Konformationsänderung könnte jedoch die Phosphorylierung eines alternativen Restes positiv beeinflusst haben und so das Resultat der *in vitro* Phosphorylierung für die verschiedenen Formen des FrzZ-Proteins erklären.

Betrachtete man die Ladungskontrolle in Abb. 5.37 B., so fiel weiterhin auf, dass es nicht gelungen war, vergleichbare Mengen an His₆-FrzZ Protein in die *in vitro* Phosphorylierung einzusetzen. Der Intensitätsunterschied in der radioaktiven Markierung der mutagenisierten FrzZ-Formen könnte durch eine höhere Proteinkonzentration des N/E-Proteins zu erklären sein, nicht aber das vergleichsweise schwache Signal der His₆-FrzZ WT-Form. In dem silbergefärbten Polyacrylamidgel (Abb. 5.37, B.) zeigte sich in Gegenwart von [³²-P]Phosphoramidat weiterhin eine Verschiebung (*shift*) der Proteinbanden nach oben, was auf ein verändertes Laufverhalten der Proteine durch den Phosphat-Donators schließen ließ. Dadurch wäre auch die diffuse radioaktive Markierung der FrzZ-Proteine auf dem Phospho *Imaging screen* (Abb 5.37, A.) zu erklären.

Es konnte gezeigt werden, dass His₆-FrzZ durch [³²-P]Phosphoramidat phosphorylierbar ist. Durch die Zugabe der gereinigten PP2C-Phosphatase His₆-Pph1 wurde die radioaktive Markierung von den Proteinen entfernt, so dass *in vitro* eine Interaktion der beiden Proteine bestätigt werden konnte. Da allerdings die Natur der Phosphorylierung des *response* Regulators durch den Phosphat-Donator unklar blieb, kann keine Aussage über die Spezifität dieser Interaktion getroffen werden. Weiterhin bleibt unklar, ob die Phosphatase das FrzZ-Protein auch *in vivo* dephosphorylieren würde.

5.5.9 Überexpression und Aufreinigung von *Strep*-FrzE

Da sich die artifizielle Phosphorylierung des *response* Regulators FrzZ durch Phosphat-Donatoren als schwierig erwies, sollte dessen putative Kinase FrzE überexprimiert und gereinigt werden. Zu diesem Zweck wurde das vollständige FrzE-Protein sowie eine C-terminal verkürzte Version, welcher die CheY-ähnliche Receiverdomäne fehlte (FrzE_{ΔCheY}), als Fusionsproteine mit einem N-Terminalen *Strep*-tag überexprimiert.

Durch Restriktion mit der Endonuklease *EcoRI* wurde zunächst das 2352 bp große *frzE*-Fragment aus dem Vektor pBD:*frzE* (Ward et al., 1998) in das Plasmid pASK-IBA15plus der Firma IBA BioTAGnology kloniert. Die Ligationsreaktion wurde durch Elektroporation in *E. coli* BL21 Zellen transformiert. Die Selektion auf positive Transformanten erfolgte durch die Zugabe von Ampicillin. Resistente Klone konnten zunächst durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym *SacI* auf die richtige Orientierung des *frzE*-Fragments hin überprüft werden, was anschließend durch die Sequenzierung der Nukleotidfolge verifiziert wurde.

Um die Kinase ohne ihre C-terminale Receiverdomäne zu exprimieren, wurde der Vektor pASK-IBA15plus:*frzE* durch einen Verdau mit dem Enzym *EcoRV* linearisiert. Der nachfolgende partielle Verdau mit der Endonuklease *BsrDI* fand unter suboptimalen Reaktionsbedingungen statt (50°C Reaktionstemperatur, 1,5 U Enzym/ 70 µl Reaktionsvolumen). Dieses Enzym schnitt den Vektor pASK-IBA15plus:*frzE* an drei Stellen. Um das *frzE*-Gen C-terminal zu verkürzen, sollte nur die *BsrDI*-Schnittstelle an Position 2256 genutzt werden (siehe Abb. 5.38).

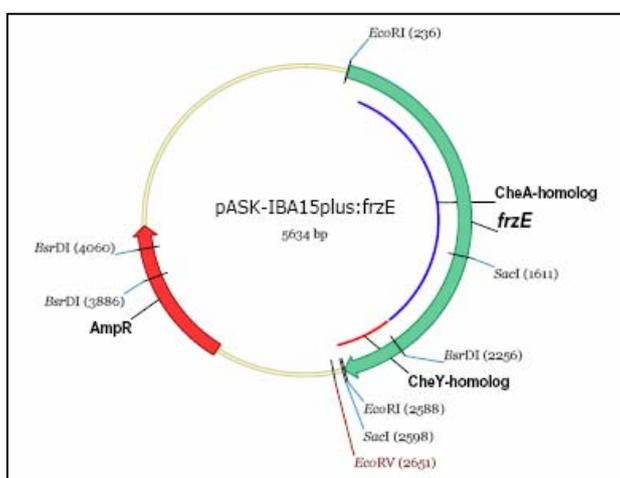


Abbildung 5.38: Restriktionskarte des Plasmids pASK-IBA15plus:*frzE*. Dargestellt ist das *frzE*-Gen (grüner Pfeil), das Amp^R-Gen (roter Pfeil), die CheA- und CheY-homologen Bereiche der Nukleotidsequenz (blaue bzw. rote Linie) sowie die Restriktionsschnittstellen, die zur Klonierung genutzt wurden. Die Plasmidkarte wurde mit dem Programm Vektor NTI erstellt.

Um einen vollständigen Verdau der Plasmid-DNA zu vermeiden, wurde die enzymatische Spaltung von je 20 µl der Reaktion nach 5, 15, 30 und 60 min Dauer durch Hitzeinaktivierung beendet. Unter Nutzung der T4-DNA Polymerase (Fermentas) konnte anschließend der DNA-Überhang der *Bsr*DI-Reaktion aufgefüllt werden, bevor die glatten Enden durch eine Ligationsreaktion verbunden wurden. Die Selektion auf positive Transformanten erfolgte durch das Ausbringen der Reaktion auf LB Agarplatten mit Ampicillin. Auch die Nukleotidfolge des Vektors pASK-IBA15plus:*frzE*_{Δ*cheY*} wurde durch eine Sequenzierreaktion überprüft.

Die Abbildung 5.39 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenz des *response* Regulators CheY aus *E. coli* (CheY_{*E. coli*}) mit der C-terminalen Region des FrzE-Proteins (FrzE-RR). Über einen Bereich von 119 AS erwies sich die myxobakterielle Kinase zu 30% mit dem enterobakteriellen Protein identisch. Die Aminosäurereste des aktiven Zentrums und die Reste, die man als wichtig für die Interaktion mit dem Flagellenmotor identifiziert hatte (Lee et al., 2001a, b), waren konserviert. Der grau hinterlegte Bereich der 75 C-terminalen Aminosäuren der FrzE-Sequenz, einschließlich des phosphorylierbaren Aspartatrestes D709 (korrespondierend zu D57 in CheY_{*E. coli*}), fehlte in dem C-terminal verkürzten Protein FrzE_{Δ*cheY*}.

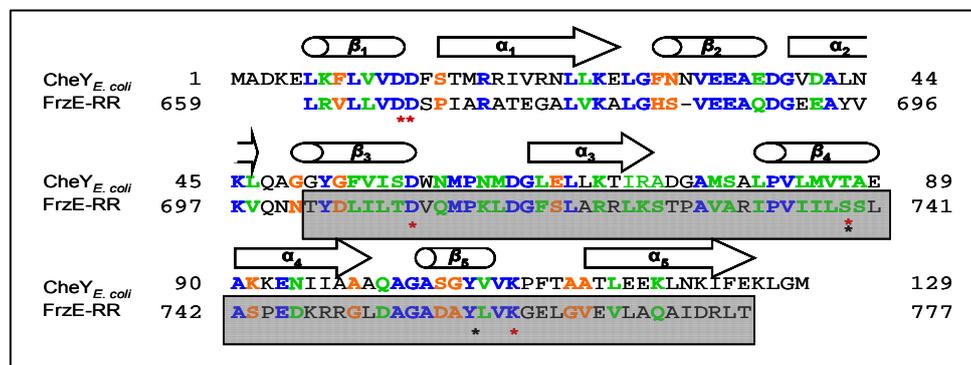


Abbildung 5.39: Vergleich (*alignment*) der Aminosäuresequenz der CheY-ähnliche Domäne (RR) der myxobakteriellen Hybridkinase FrzE mit CheY aus *E. coli*. Das *alignment* wurde mit dem Programm CLUSTALW der *Biology WorkBench* 3.2 (<http://workbench.sdsc.edu>) erstellt. Konservierte Reste sind blau, stark konservierte Seitenketten grün und schwach konservierte Seitenketten orange dargestellt. Die mit einem roten Stern markierten Aminosäuren sind die konservierten Reste der Phosphorylierungsstelle, die mit einem schwarzen Stern gekennzeichneten Reste werden in CheY zusätzlich zur Interaktion mit dem Flagellenmotor benötigt (nach Lee et al., 2001a, b). Die mit einem grauen Kasten hinterlegten Aminosäurereste fehlen der C-terminal verkürzten Form der Kinase FrzE_{Δ*cheY*}. Die schematische Darstellung von Sekundärstrukturen entspricht der Vorhersage für CheY und wurde mit dem Programm GOR4 der *Biology WorkBench* 3.2 erstellt.

Die Überexpression der rekombinanten Proteine ist unter Punkt 4.1.9.3 beschrieben. Zur Aufreinigung wurden die Zellen zunächst per Ultraschall aufgebrochen. Da die Kinase in Form von Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) in den produzierenden *E. coli* Zellen vorlag, wurde zur Aufreinigung das Protokoll nach McCleary und Zusman (1990) und Acuna et al. (1995) angewendet (4.6.6).

Die Abbildung 5.40 A. zeigt die Silberfärbung eines 12%igen SDS-Polyacrylamidgels. Hier wurde das Proteinmuster uninduzierter Zellen mit dem induzierter Zellen verglichen. In Letzteren wurde durch die Zugabe von AHT die Expression des vollständigen *frzE*-Gens angeschaltet. In Abbildung 5.40 B. ist das Ergebnis der Dialyse dargestellt, die sich zur Renaturierung der Proteine *Strep-FrzE* und *Strep-FrzE*_{ΔCheY} an die Aufreinigung anschloss. Aus dieser Abbildung wird deutlich, dass sowohl die vollständige Version der Kinase *Strep-FrzE* als auch das C-terminal verkürzte Protein *Strep-FrzE*_{ΔCheY} in den SDS-Gelen höher lokalisiert, als es das kalkulierte Molekulargewicht von 86,8 kDa bzw. 74,9 kDa implizierte. McCleary und Zusman (1990) beobachteten Ähnliches und schrieben die langsamere Migration dieser Proteine, verglichen mit anderen globulären Proteinen ähnlicher Größe, der Domänenkomposition und insbesondere dem flexiblen *linker* zwischen dem CheA- und der CheY-homologen Bereich der Hybridkinase zu.

Um ein geringeres Volumen in die anschließenden *in vitro* Phosphorylierungs-Assays einsetzen zu können, wurden die dialysierten Proben unter Verwendung von Mikrokonzentratoren der Firmen Amicon (50 kDa *cut-off*) oder Vivascience (3 kDa *cut-off*) nach den Herstellerangaben aufkonzentriert.

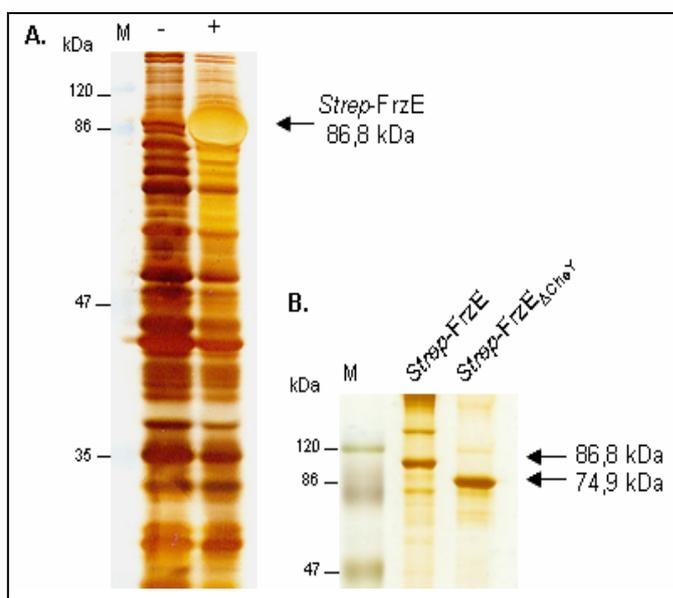


Abbildung 5.40: Silbergefärbte 12%ige SDS-Polyacrylamidgels der Überexpression von *Strep-FrzE* (A.) und der Aufreinigung von *Strep-FrzE* und *Strep-FrzE*_{ΔCheY} (B.). In A. wurden zur Auftrennung der Proteine ganze Zellen verwendet, die mit AHT induziert (+) oder uninduziert (-) 4 Stunden bei 32°C inkubiert wurden. Dazu wurde ein Kulturvolumen entsprechen einer OD₆₀₀ von 1 in 1x SDS Auftragspuffer aufgenommen vor dem Auftrag für 5 min bei 95°C inkubiert. In B. erfolgte der Auftrag von 10 µg des Dialysats der rekombinanten Proteine. M: *Prestained* Proteinmarker, Fermentas.

5.5.9.1 Phosphorylierung von *Strep*-FrzE und *Strep*-FrzE $_{\Delta$ CheY mit [γ - 32 P]ATP

Histidinkinasen autophosphorylieren durch die Bildung einer Phosphoramidatbindung unter Verwendung von ATP zunächst an einem konservierten Histidinrest und übertragen die Phosphorylgruppe dann auf einen Aspartatrest des korrespondierenden *response* Regulators (Übersicht in West and Stock, 2001). Die myxobakterielle Kinase FrzE ist ein Hybridprotein, dessen N-terminaler Bereich Homologie zu der enterobakteriellen Histidin-Kinase CheA zeigt, während der C-Terminus Ähnlichkeit zu dem *response* Regulator CheY aufweist (siehe Abb. 5.39). Die phosphorylierbaren Aminosäurereste beider Proteinspezies sind dabei konserviert und es konnte ein interner Phosphotransfer von der Kinase- auf die Regulatordomäne gezeigt werden (McCleary and Zusman, 1990; Acuna et al., 1995). Die phänotypische Analyse verschieden konstruierter *frzE*-Mutanten legte zur Steuerung der gerichteten Zellbewegung neben der Phosphorylierung des eigenen CheY-Anteils auch den Phosphotransfer von der Kinase auf ein zweites Regulator-Protein, wie beispielsweise FrzZ, nahe (Li et al., 2005).

Zunächst sollte eine Autophosphorylierung der gereinigten, vollständigen Kinase (*Strep*-FrzE) in Gegenwart von radioaktivem [γ - 32 P]ATP erreicht werden. Zu diesem Zweck wurde über Mikrokonzentratoren (Amicon, 50 kDa *cut-off*) aufkonzentriertes *Strep*-FrzE Protein (10 μ M) in der Gegenwart divalenter Kationen in einem Reaktionsansatz mit 1 μ Ci [γ - 32 P]ATP/ 10 μ l Reaktionsvolumen bei Raumtemperatur für zwei und vier Stunden inkubiert (siehe auch 4.6.11.3). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1/5 Vol. 5x SDS EDTA Auftragspuffer gestoppt. Die Proben wurden dann über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das anschließend unter Vakuum bei 80°C getrocknet und ca. 12 Stunden auf einer Phospho *Imaging* Platte (Phospho *Imaging* screen) exponiert wurde. Die Abbildung 5.41 zeigt ein Bild des analysierten Phospho *Imaging* screens.

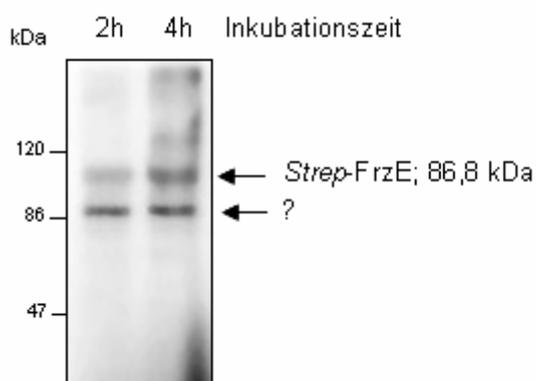


Abbildung 5.41: Phospho *Image* der Analyse der *in vitro* Phosphorylierung des *Strep*-FrzE Proteins (10 μ M) mit [γ - 32 P]ATP (1 μ Ci/10 μ l Reaktionsvolumen). Die mit Auftragspuffer versetzten Proben wurden vor der Auftrennung durch eine 12%ige SDS-PAGE nicht gekocht.

Die Abbildung 5.41 zeigt die Autophosphorylierung der Kinase FrzE (*Strep*-FrzE; 86,8 kDa, oberer schwarzer Pfeil) unter Nutzung des γ -Phosphatrests von radioaktiv markiertem ATP. Durch eine längere Inkubation ließ sich die Menge an phosphorylierter Kinase nur leicht steigern, während vermehrt unspezifische Signale und Degradationsprodukte auftauchten. Weitere Experimente zeigten, dass unter denselben Reaktionsbedingungen eine vergleichbare Menge an phosphoryliertem FrzE-Protein bereits nach 20 min Inkubationsdauer detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Unterhalb der FrzE-Bande tauchte ein zweites Protein auf, welches ebenfalls Autophosphorylierungsaktivität zeigte (Abb. 5.41, unterer schwarzer Pfeil). Eine dünne Bande in dieser Höhe war bereits nach der Dialyse des gereinigten *Strep*-FrzE Proteins zu sehen und entsprach in etwa der Größe der C-terminal verkürzten Form der Kinase *Strep*-FrzE $_{\Delta\text{CheY}}$ (Abb. 5.40, B.). Dieser Effekt wurde bereits beschrieben und sollte auf ein FrzE-Abbauprodukt zurückzuführen sein, welches C-terminal um 50 Aminosäurereste verkürzt war (McCleary and Zusman, 1990). Diese Erklärung konnte insofern bestätigt werden, als dass das vollständige *Strep*-FrzE Protein bei längerer Lagerung zunehmend abgebaut wurde und ein stabiles Zwischenprodukt entstand (siehe auch Abb. 5.40, B.). Dieses lokalisiert in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel auf Höhe der 86 kDa Markerbande. Setzte man für dieses Protein ein ähnliches Laufverhalten voraus, wie es die gereinigten Proteine *Strep*-FrzE und *Strep*-FrzE $_{\Delta\text{CheY}}$ zeigten, so ergab sich für das vermeintliche Abbauprodukt eine theoretisch Verkürzung um ca. 80 Aminosäuren relativ zu *Strep*-FrzE.

Die Abb. 5.42 vergleicht das Laufverhalten beider Formen der Kinase aus zwei unterschiedlichen Präparationen, die in einem Abstand von acht Wochen zueinander gemacht wurden. Die aktuellste Aufreinigung ist in der Abbildung mit einem Stern (*) gekennzeichnet und zum Zeitpunkt der Analyse ganz frisch. In Abb. 5.42 B. ist ein silbergefärbtes, 12%iges SDS-Polyacrylamidgel gezeigt, auf das jeweils 10 μg Protein geladen und elektrophoretisch getrennt wurden. Die Abb. 5.42 A. zeigt den *Western Blot* eines identischen Gels, auf welchem das N-terminale Fusionspeptid der Kinase-Formen durch einen spezifischen anti-*Strep* Antikörper (IBA BioTAGnology) detektiert wurde.

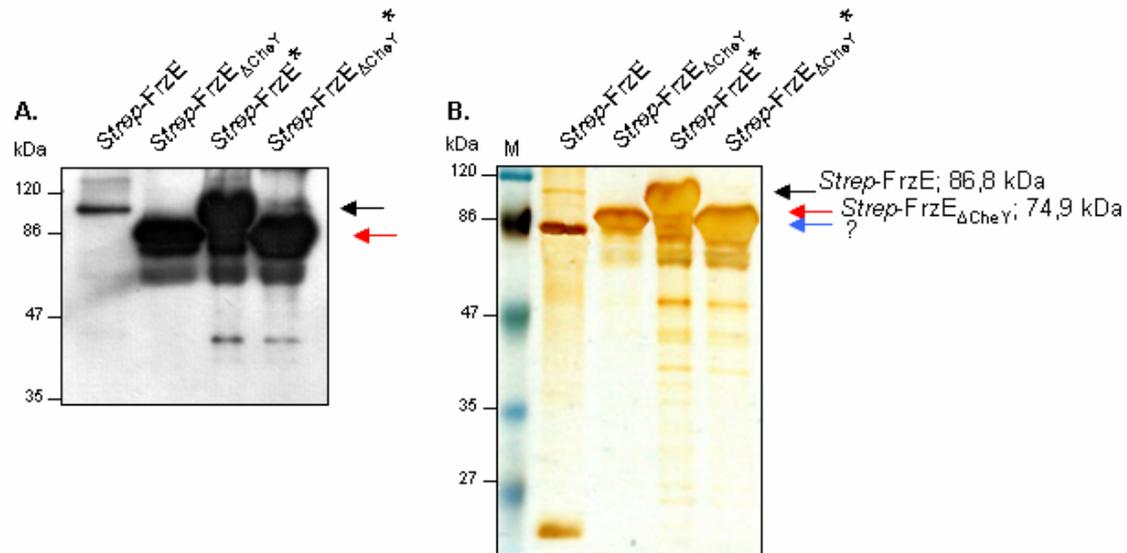


Abbildung 5.42: Analyse von zwei Präparationen der Proteine *Strep-FrzE* und *Strep-FrzE_{ΔCheY}*. In **A.**: *Western Blot* Analyse eines 12%igen SDS-Polyacrylamidgels der Aufreinigung von *Strep-FrzE* (schwarzer Pfeil) und *Strep-FrzE_{ΔCheY}* (roter Pfeil). Die Detektion erfolgte mit *Strep*-spezifischem Antikörper (IBA BioTAGnology). In **B.**: Silberfärbung eines identischen Gels. Es wurde jeweils 10 µg Protein mit 1/5 Vol. 5x SDS Auftragspuffer gemischt und vor dem Auftrag 5 min bei 95°C inkubiert. *M.*: *Prestained* Proteinmarker, Fermentas.

Während das unverkürzte 86,8 kDa FrzE-Protein (*Strep-FrzE*) der älteren Aufreinigung zu ca. 95% degradiert war (Abb. 5.42, B., schwarzer Pfeil), erwies sich die C-terminale verkürzte Form *Strep-FrzE_{ΔCheY}* auch nach acht Wochen Lagerung bei -20°C als stabil (Abb. 5.42, B., roter Pfeil). Das bestätigte auch die *Western Blot* Analyse eines identisch beladenen Gels (Abb. 5.42, A.). Auf diesem konnte das vollständige *Strep-FrzE* Protein der älteren Präparation nur noch in geringer Menge detektiert werden (Abb. 5.42, A., schwarzer Pfeil), obwohl für alle Proben identische Mengen an Gesamtprotein geladen wurden. Im Gegensatz dazu war die Intensität des *Strep-FrzE_{ΔCheY}* Signals der älteren Aufreinigung mit dem der frisch präparierten Proteine vergleichbar (Abb. 5.42, rote Pfeile).

Das Abbauprodukt der Kinase *Strep-FrzE*, welches im silbergefärbten Polyacrylamidgel deutlich zu erkennen war (Abb. 5.42, B., blauer Pfeil), wurde dagegen auf dem *Western Blot* nicht durch den spezifischen anti-*Strep-tag* Antikörper erkannt (Abb. 5.42, A.). Da sich der fusionierte Affinitäts-*tag* am N-Terminus der Proteine befand, konnte daraus geschlossen werden, dass es sich bei dem potenziellen Abbauprodukt des unverkürzten FrzE-Proteins *Strep-FrzE* nicht um eine C-terminale, sondern wahrscheinlich um eine N-terminale Degradation handelte. Eine C-terminale Verkürzung konnte allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden. Diese könnte eine

Konformationsänderung des FrzE-Proteins bedingt haben, durch welche der *Strep-tag* verborgen wurde und deshalb nicht mehr durch den spezifischen Antikörper detektierbar war.

5.5.9.2 Phosphotransfer von *Strep-FrzE* auf *His₆-FrzZ*

Um einen Transfer der Phosphorylgruppe auf den *response* Regulator FrzZ zu erreichen, wurde die Kinase zunächst in einem Reaktionsansatz mit [γ - 32 P]ATP für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Ansatz wurde dann auf mehrere Reaktionsgefäße verteilt, in die zuvor eine der gereinigten Formen des *response* Regulators FrzZ vorgelegt worden war. Um mit beiden Proteinen in dem HEPES-Puffersystem arbeiten zu können, welches für die Kinase beschrieben worden war (siehe Punkt 4.6.10), wurden die gereinigten FrzZ-Proteine zuvor durch Dialyse umgepuffert.

In der Phosphotransferreaktion befand sich schließlich die Kinase in einer Konzentration von 10 μ M zusammen mit *His₆-FrzZ* WT, N/N, D52N oder D220N (5 μ M) und 1 μ Ci [γ - 32 P]ATP/10 μ l. In der Negativkontrolle der Transferreaktion wurde das Volumen des *response* Regulator-Proteins durch Wasser ersetzt. Nach einer weiteren Inkubation von einer Stunde wurden die Reaktionen durch die Zugabe von 1/5 Vol. 5x SDS EDTA Auftragspuffer gestoppt, über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch eine anschließende 12-stündige Exposition auf einer Phospho *Imaging* Platte analysiert. Die Abbildung 5.43 zeigt ein Bild der analysierten Phospho *Imaging* Platte.

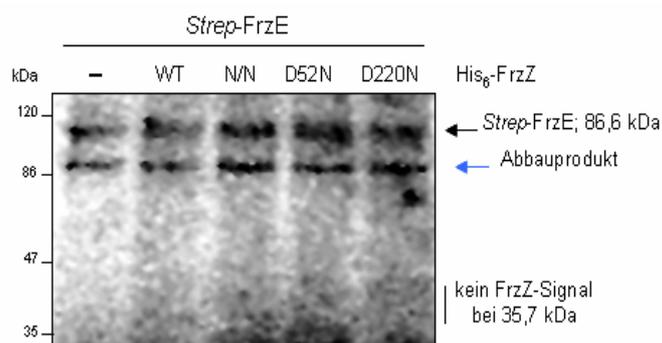


Abbildung 5.43: Phospho *Image* der Analyse des Phosphotransfers von der Kinase *Strep-FrzE* auf verschiedenen Formen des *response* Regulators *His₆-FrzZ*. Die Kinase wurde 1 Stunde bei RT mit [γ - 32 P]ATP vor-inkubiert. Kinase und *response* Regulator (molares Verhältnis von 2:1) wurden in der Phosphotransferreaktion in Gegenwart von 1 μ Ci [γ - 32 P]ATP/10 μ l Reaktionsvolumen bei RT für 1 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1/5 Vol. 5x SDS EDTA Auftragspuffer gestoppt. Die Proben wurden vor der Auftrennung durch eine 12%ige SDS-PAGE nicht gekocht.

Die ausgewertete Phospho *Imaging* Platte zeigte erneut die Autophosphorylierung des 86,8 kDa *Strep*-FrzE Proteins (Abb. 5.43, schwarzer Pfeil) sowie ein Signal für das potenzielle, N-terminal verkürzte Abbauprodukt (Abb. 5.43, blauer Pfeil). Während für das gereinigte His₆-FrzZ N/N-Protein aufgrund der Asparagin-Substitution beider Domänen keine *in vitro* Phosphorylierung durch die Kinase FrzE zu erwarten war, konnte auch für die vollständig phosphorylierbare WT-Form und die beiden einfach mutagenisierten Konstrukte FrzZ D52N und D220N keine Übertragung von Phosphorylgruppen beobachtet werden. Die entsprechenden Signale auf einer Höhe von 35,7 kDa fehlten auf dem *screen* in allen Spuren.

5.5.9.3 Phosphotransfer von *Strep*-FrzE und *Strep*-FrzE_{ΔCheY} auf His₆-FrzZ

Nachfolgend wurde untersucht, ob der Phosphotransfer auf den *response* Regulator FrzZ möglicherweise durch eine intramolekulare Wechselwirkung der CheA- mit der CheY-homologen Domäne der unveränderten Kinase *Strep*-FrzE unterbunden wurde. Zu diesem Zweck wurde eine Mischung, die zu gleichen Teilen aus den gereinigten Proteinen *Strep*-FrzE und *Strep*-FrzE_{ΔCheY} bestand, in die Phosphotransferreaktion eingesetzt. Diese wurde in einem molaren Verhältnis von 2:1 mit den oben beschriebenen Formen des FrzZ-Proteins in Gegenwart von 1 μCi [γ -³²P]ATP/10 μl Reaktionsvolumen inkubiert. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die Reaktionen durch die Zugabe von 1/5 Vol. 5x SDS EDTA Auftragspuffer beendet und über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Durch eine anschließende 12-stündige Exposition auf einer Phospho *Imaging* Platte wurde das getrocknete Gel analysiert. Die Auswertung ist in der Abbildung 5.44 gezeigt.

Auch durch die Mischung der unveränderten mit der C-terminal verkürzten Version der Kinase *Strep*-FrzE_{ΔCheY} konnte erneut kein Phosphotransfer auf eine Form des *response* Regulators FrzZ beobachtet werden. Das unspezifische Signal, das in der Abbildung 5.44 im Größenbereich des His-*getaggt*en FrzZ-Proteins (35,7 kDa) zu erkennen ist, stammte wahrscheinlich von einem Degradationsprodukt der Kinase FrzE. Das entsprechende Signal war in weiteren Experimenten auch in der Negativkontrolle zu beobachten und die Signalintensität nahm proportional zum Alter der Proteinpräparation zu (Daten nicht gezeigt). Das ließ vermuten, dass zu einem Transfer von Phosphorylgruppen von der Kinase auf den *response* Regulator FrzZ in diesem System noch weitere Proteine benötigt werden. So konnte beispielsweise *in vitro* für die Histidinkinase CheA in

Gegenwart eines MCPs und des CheW Kopplungsproteins ebenfalls eine größere Autophosphorylierungsaktivität gezeigt werden (Borkovich and Simon, 1990).

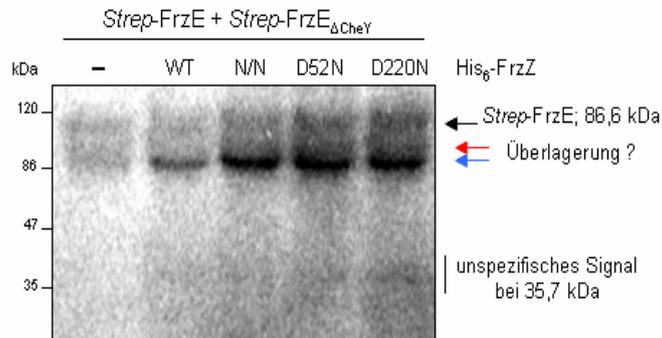


Abbildung 5.44: Phospho *Image* der Analyse des Phosphotransfers einer anteilig gleichen Mischung der Kinaseproteine *Strep-FrzE* und *Strep-FrzE_{ΔCheY}* auf verschiedenen Formen des *response Regulators* His₆-FrzZ. Der Kinasemix wurde nicht vor-inkubiert und mit den Formen des *response Regulators* His₆-FrzZ WT, N/N, D52N und D220N in einem molaren Verhältnis von 2:1, in Gegenwart von 1 μ Ci [γ -³²P]ATP/10 μ l Reaktionsvolumen bei RT für 1 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1/5 Vol. 5x SDS EDTA Auftragspuffer gestoppt. Die Proben wurden vor der Auftrennung durch eine 12%ige SDS-PAGE nicht gekocht.

Verglichen mit der Negativkontrolle entstand allerdings in den Proben, die auch das FrzZ-Protein enthielten, ein stärkeres Signal auf Höhe des *Strep-FrzE_{ΔCheY}* Proteins (74,9 kDa) oder der 86 kDa Markerbande (Abb. 5.44). Aufgrund der fast identischen Molekülgröße des *Strep-FrzE_{ΔCheY}* Proteins und des potenziellen Abbauproduktes der unverkürzten Kinase *Strep-FrzE*, das ebenfalls eine Autophosphorylierungsaktivität zeigte (siehe auch Abb. 5.41, 5.43), könnte es sich hier um einer Überlagerung der Signale beider Proteine handeln. Diese Signalverstärkung war in Abwesenheit der C-terminal verkürzten Version der Kinase in der vorangegangenen Analyse nicht zu beobachten. Dort zeigte sich in der Spur der Negativkontrolle ein Signal auf Höhe der 86 kDa Markerbande, dessen Intensität vergleichbar mit denen der Proben war, die in Gegenwart des *response Regulators* inkubiert wurden (siehe Abb. 5.43).

Das es in einer Mischung beider Formen der Kinase durch die Gegenwart des *response Regulators* FrzZ zu einer Verstärkung der Autophosphorylierung kam, könnte dafür sprechen, dass es auch in Abwesenheit des Rezeptor- und Kopplungsproteins des Signaltransduktionssystems zu einer Wechselwirkung der Kinase und des *response Regulators* kam. Dadurch wurde zunächst die Autophosphorylierungsaktivität der Kinase gesteigert. Es blieb unklar, ob ein Phosphotransfer auf den *response Regulator* FrzZ nicht stattfand oder aufgrund seiner Kurzlebigkeit nicht zu visualisieren war.

Drei unabhängige Wiederholungen des unter 5.5.9.3. beschriebenen Versuchs, in denen ein Phosphotransfer durch eine Mischung der beiden gereinigten Proteine *Strep*-FrzE und *Strep*-FrzE $_{\Delta\text{CheY}}$ erreicht werden sollte, zeigten, dass die Degradation der vollständigen Kinase *Strep*-FrzE über die Zeit fortschritt. In der Auswertung dieser Experimente durch das Phospho *Imaging* Verfahren konnten nun keine Signale mehr für das 86,8 kDa Protein detektiert werden, dass in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel knapp unterhalb der 120 kDa Markerbande lokalisierte (siehe auch Abb. 5.41, 5.43).

Chronologisch geordnet sind alle drei Wiederholungen, die über einen Zeitraum von zwei Wochen durchgeführt wurden, in der Abbildung 5.45 dargestellt. Das untere Phospho *Image* zeigt die aktuellste Wiederholung.

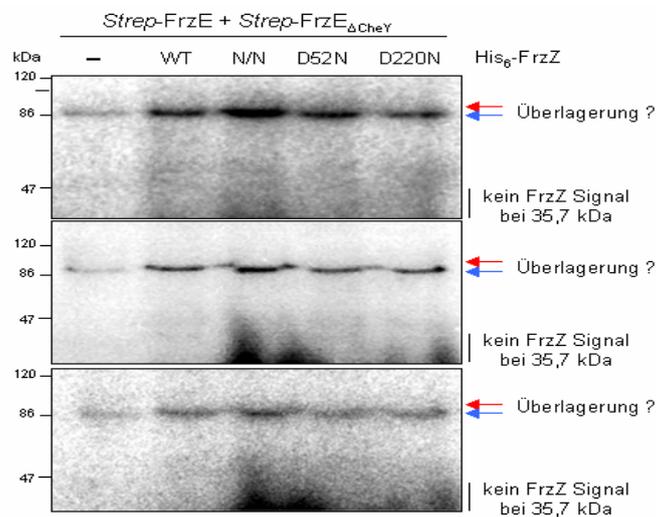


Abbildung 5.45: Phospho *Images* von drei unabhängigen Experimenten zur Analyse der Verstärkung der Autophosphorylierungsaktivität der Proteinbande auf Höhe der 86 kDa Markerbande in Gegenwart von His₆-FrzZ. In die Autophosphorylierungs-/Phosphotransferreaktion wurde eine Mischung der gereinigten Proteine *Strep*-FrzE und *Strep*-FrzE $_{\Delta\text{CheY}}$ zu gleichen Teilen eingesetzt und mit den Formen des *response* Regulators His₆-FrzZ WT, N/N, D52N und D220N inkubiert. Der Kinasemix wurde nicht vor-inkubiert und mit dem *response* Regulator in einem molaren Verhältnis von 2:1, in Gegenwart von 1 μCi [γ -³²P]ATP/10 μl Reaktionsvolumen bei RT für 1 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1/5 Vol. 5x SDS EDTA Auftragspuffer gestoppt. Die Proben wurden vor der Auftrennung durch eine 12%ige SDS-PAGE nicht gekocht.

Erneut konnte in keinem der Experimente unter den gewählten Bedingungen ein Transfer von Phosphorylgruppen auf eine der eingesetzten Formen des *response* Regulators FrzZ gezeigt werden. Die Auswertung aller drei Phospho *Imaging* screens zeigte allerdings erneut eine Verstärkung des radioaktiven *label* auf Höhe der 86 kDa Bande des Proteinmarkers. Dieser Effekt war nur in Anwesenheit von His₆-FrzZ Protein in der Reaktion zu beobachten (Abb. 5.45, rote und blaue Pfeile).

6 DISKUSSION

6.1 Signalverarbeitung durch das *frz*-System

Das *frz*-Signaltransduktionssystem verfügt über drei CheY-homologe Domänen, die als *output* des Systems dienen könnten. Zusätzlich zu der auch hier vorhandenen Hybridkinase FrzE (C-terminale CheY-Domäne) sind die beiden verbleibenden Domänen in dem Protein FrzZ vereint. Da in Chemotaxissystemen mit multiplen CheY-ähnlichen Domänen i.d.R. nur eine der Signalweitergabe an die stromabwärts gelegenen Zielproteine dient (Porter et al., 2006; Sourjik and Schmitt, 1998), stellt sich auch für das *frz*-System die Frage nach der Identität dieser Domäne.

Die Deletion des *frzE*-Gens führt zu einer verminderten Zellumkehrfrequenz und ruft den typischen Aggregationsphänotyp hervor (Bustamante et al., 2004). Inaktiviert man dagegen nur die C-terminale CheY-Domäne (*frzE_{ΔcheY}*), zeigt sich in diesen Zellen die durch das A-Motilitätssystem vermittelte Zellumkehrfrequenz signifikant erhöht (Bustamante et al., 2004). Weiterhin sind *frzE_{ΔcheY}*-Mutanten in der Lage, unter Differenzierungsbedingungen Fruchtkörper zu bilden. Bustamante et al. zogen aus diesen Analysen den Schluss, dass es bei der Signalweitergabe durch das *frz*-System auf Höhe der Hybridkinase FrzE zu einer Teilung des Signalweges kommen muss, wie in der Abbildung 6.1 dargestellt (Bustamante et al., 2004).

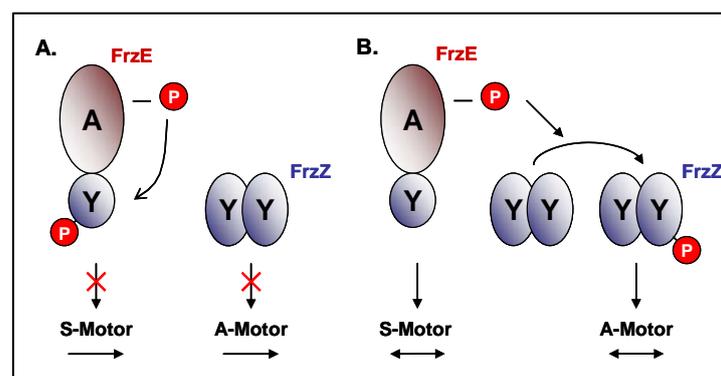


Abbildung 6.1: Modell der Teilung des Signalweges durch das *frz*-System auf Höhe der Hybridkinase FrzE (nach Bustamante et al., 2004). Das FrzE-Protein ist der *output* für das S-Motilitätssystem, während ein anderer *response* Regulator, wie FrzZ, mit dem A-Motilitätssystem kommuniziert. Durch eine Übertragung der Phosphorylgruppe der CheA-homologen Domäne des FrzE-Proteins auf die eigene CheY-Domäne (A.) erfolgt keine Signaltransduktion zum S-Motor. Gleichzeitig bleibt das FrzZ-Protein unphosphoryliert und es wird kein Signal zum Revertieren an den A-Motor weitergeben. Die Zelle gleitet. Erfolgt ein Phosphotransfer von FrzE auf FrzZ (B.), vermittelt die eigene, unphosphorylierte CheY-Domäne das Zellumkehrsignal an den S-Motor, während phosphoryliertes FrzZ dem A-Motor das *reversal*-Signal erteilt. Der erzielte Motilitätsphänotyp wird durch die Pfeile unterhalb des angesprochenen Motors markiert. Ein einfacher Pfeil symbolisiert „Gleiten“, während der doppelköpfige Pfeil „Revertieren“ symbolisiert.

Das Revertieren des S-Motilitätssystems soll durch die CheY-homologe Domäne der Hybridkinase FrzE in ihrer unphosphorylierten Form durch direkte Protein-Protein-Interaktionen mit den entsprechenden Motorkomponenten vermittelt werden (Abb. 6.1, B.). Zur Regulation des A-Motilitätssystems wird dagegen der Phosphotransfer auf einen zusätzlichen *response* Regulator wie FrzZ gefordert (Bustamante et al., 2004).

Aus mehreren Gründen erscheint es jedoch unwahrscheinlich, dass FrzE direkt als *output* des *frz*-Systems wirkt. Zum Einen führt eine Deletion der C-terminalen CheY-Domäne der Hybridkinase nicht zu einem Verlust der Signaltransduktion, während *frzZ*-defekte Zellen einen entsprechenden Phänotyp zeigen (Bustamante et al., 2004, Trudeau et al., 1996). Des Weiteren impliziert die immunologische Analyse fraktionierten Zellextrakts auch in *M. xanthus* die Bildung von Rezeptor-Signal-Komplexen (RSKs) (Armitage, 2003; McBride et al., 1992; siehe auch Punkt 6.2). Durch fluoreszenzmikroskopische Analysen konnte beispielsweise für *E. coli* gezeigt werden, dass die Kinase CheA mit Rezeptor-Clustern assoziiert vorliegt und nicht frei in der Zelle beweglich ist (Sourjik and Berg, 2000). Da dies auch in *M. xanthus* eine direkte Interaktion der Kinase mit den polaren Motorkomponenten sehr unwahrscheinlich macht, könnte durch einen Phosphotransfer von FrzE auf ein diffusibles Molekül, wie den *response* Regulator FrzZ, das Signal zur Zellumkehr auf die stromabwärts gelegenen Zielproteine übertragen werden.

Auch die genetische Lokalisation des *frzZ*-Gens, relativ zu den anderen Komponenten des Systems, deutet eine solche Funktion für den *response* Regulator an. Ähnlich wie der einzige *output* des *che3*-Systems in *M. xanthus*, *crdA*, stellt auch *frzZ* eine monocistronische Transkriptionseinheit dar, welche in der entgegengesetzten Richtung zu den Genen *frzZA-F* abgelesen wird. Im myxobakteriellen *dif*-System wird das kodierte CheY-Homolog *difD* dagegen als transkriptionelle Einheit mit den übrigen Genen abgelesen (siehe Abb. 2.8). Dieses Protein agiert nach einem Modell als Phosphat-Senke der Kinase DifE, ist aber nicht direkt an der Signalweitergabe beteiligt (Black and Yang, 2004).

6.1.1 Einfluss der Deletion von *frzZ* auf die Zellbewegung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Deletion des *frzZ*-Gens auf die Bewegungsfähigkeit verschiedener *M. xanthus* Stämme getestet. Auf diesem Weg sollte das von Bustamante et al. (2004) postulierte Modell der Signalteilung auf Höhe der Hybridkinase FrzE hinsichtlich der Funktion des FrzZ-Proteins als Signalgeber des A-Motors untersucht werden.

Die mikroskopische Betrachtung des Randes von Wildtyp- und *frzZ*-defekten Kolonien auf 1,5%igen, nährstoffreichen Agarplatten, zeugte für die Mutante von einem eindeutigen Mangel an S-Motilität (siehe Punkt 5.1.2.3). Auf weichem Untergrund machte sich dieses Bewegungsdefizit besonders in der verminderten Ausdehnung entsprechender Kolonien bemerkbar. Die Quantifizierung dieses Effektes ergab für *frzZ*-negative Zellen eine Verminderung der Kolonieausdehnung um 64,5% auf einem weichen, nährstoffreichen Untergrund und um 20,4% auf einem harten Untergrund (siehe Abb. 5.6). Da unter vegetativen Bedingungen durch die Inaktivierung des *frzZ*-Gens kein vermindertes Wachstum zu beobachten war (siehe Punkt 5.1.2.1), kann die reduzierte Expansion nicht das Ergebnis einer geringeren Zellteilungsrate sein.

Wie Shi und Zusman zeigen konnten, variiert der Anteil von A- und S-Motilität an der Gesamtbewegung von *M. xanthus* Zellen abhängig von der Beschaffenheit des jeweiligen Untergrundes (Shi and Zusman, 1993). Auf weichem Untergrund basiert die Fortbewegung hauptsächlich auf dem sozialen System, während ein harter Untergrund das A-System stärker fordert. Hillesland und Velicer konnten weiterhin belegen, dass dieser Synergismus im Falle des S-Systems stark vom Nährstoffgehalt des Substrats abhängig ist. Eine Dominanz zeigt sich hier nur auf weichem, nährstoffreichem Untergrund (Hillesland and Velicer, 2005). Die experimentellen Bedingungen der *colony expansion* Versuche dieser Arbeit waren demnach so gewählt, dass die von Shi und Zusman (1993) beschriebenen Verhältnisse zu Tage treten sollten. Um dennoch synergistische Effekte der beiden Systeme auszuschließen, wurde der *frzZ*-Defekt durch Phagentransduktion in *M. xanthus* Stämme eingebracht, die nur über ein funktionelles Motilitätssystem verfügen.

Keiner der so entstandenen Stämme zeigte einen unbeweglichen Phänotyp, wie er nach dem Bustamante-Modell aufgrund der Signalteilung zu erwarten gewesen wäre (siehe Abb. 6.1). Durch die Abwesenheit von FrzZ wäre es zunächst nicht mehr zu einer direkten Signalweitergabe an das A-Motilitätssystem gekommen. Des Weiteren hätte ein Phosphotransfer von der Kinasedomäne des FrzE-Proteins ausschließlich auf die eigene Receiverdomäne stattfinden können. Das hätte auch die Signaltransduktion auf die S-Motorkomponenten unterbunden. Da durch die Inaktivierung des *frz*-Systems die Zellumkehrfrequenz sinkt, aber nicht vollständig zum Erliegen kommt, hätte sich nach Bustamante et al. (2004) keine vollständige Bewegungsunfähigkeit, zumindest aber eine gleichermaßen starke Beeinträchtigung des jeweils verbliebenen Bewegungssystems zeigen müssen.

Ein ähnlicher Effekt wäre allerdings auch zu erwarten gewesen, wenn der *response* Regulator FrzZ den einzigen *output* des *frz*-Systems darstellt und in der Hierarchie der Komponenten unterhalb von FrzE anzusiedeln ist.

Weiterhin brachte die Inaktivierung des *frzZ*-Gens in dem ausschließlich A-motilen Stamm DK1300 keine unbeweglichen Zellen hervor. Dies hätte man erwarten müssen, wäre FrzZ, wie von Bustamante et al. (2004) postuliert, essentiell für die Steuerung des A-Motors. Im Gegensatz dazu war die Kolonieverbreitung des S-motilen Stamms DK1217Mx*frzZ* auf 0,3%igen, nährstoffreichen Agarplatten sogar signifikant stärker beeinträchtigt, als durch die Inaktivierung des Regulators in dem Stamm DK1300 zu beobachten war (siehe Abb. 5.8).

Anhand der erzielten Ergebnisse kann das von Bustamante et al. (2004) postulierte Modell hinsichtlich der Signalteilung auf Höhe der Kinase FrzE als unzutreffend bezeichnet werden, da die Abwesenheit des FrzZ-Proteins nicht zu einer gleichermaßen starken Beeinträchtigung beider Motilitätssysteme führt. Weiterhin ist die Aussage zulässig, dass der *response* Regulator FrzZ hauptsächlich das S-Motilitätssystem des myxobakteriellen Gleitens beeinflusst, aber nicht den alleinigen *output* des *frz*-Systems darstellt. Zur Regulation des A-Motilitätssystems käme ein weiteres, bisher unidentifiziertes Protein in Betracht, das in die Signalweitergabe durch das *frz*-System eingebunden ist.

Um die Hierarchie und die zugehörigen Komponenten des *frz*-Signalweges endgültig zu klären, wäre es sinnvoll, nach Mutationen zu suchen, die den konstitutiv aktiven Phänotyp der Deletion des essentiellen C-Terminus des FrzCD-Proteins supprimieren. Diese Methode könnte auch zur Identifikation der Ziele der Signaltransduktion durch das *frz*-System führen, solange diese nicht direkt den Motoren der Zellbewegung zuzuordnen sind. In diesem Fall würde beispielsweise eine Transposon-Mutagenese unbewegliche Zellen hervorbringen, die aufgrund ihres Phänotyps nicht als Suppressoren zu erkennen wären. Aufgrund der Homologie der Proteine des myxobakteriellen Systems zu den enterobakteriellen Che-Proteinen ist weiterhin davon auszugehen, dass in dieser Analyse auch die Hybridkinase FrzE und der *response* Regulator FrzZ identifiziert werden. Deren epistatische Beziehung könnte durch die Konstruktion einer *frzZ frzE_{ΔcheY}* Doppelmutante geklärt werden.

6.1.2 Komplementationsanalyse des Bewegungsdefektes

Um zu untersuchen, ob die CheY-ähnlichen Domänen des *response* Regulators FrzZ in der Zelle unterschiedliche Funktionen erfüllen, wurden Komplementationsanalysen mit

verschiedenen, in ihrer Nukleotidsequenz veränderten Varianten des *frzZ*-Gens durchgeführt. Aufgrund ihrer vergleichsweise geringen Aminosäureidentität zueinander (25,5%) erscheint es möglich, dass das ursprüngliche Ergebnis der Duplikation einer Domäne von FrzZ (persönliche Mitteilung von D.E. Whitworth) mittlerweile zum Erwerb einer eigenen Funktion jeder Domäne geführt hat. Wie globale Studien belegen, sind Duplikations-Ereignisse die Grundlage der Evolution (Gevers et al., 2004), wobei nicht benötigtes oder funktionsloses Material jedoch i.d.R. eliminiert wird. Im Falle von FrzZ wurde eine abweichende Funktion beider Domänen durch die Ergebnisse von Interaktionsanalysen gestützt, die für beide unterschiedliche potenzielle Interaktionspartner identifizierten (Treuner-Lange et al., 2001; Ward et al., 1998a, b). Davon wurde im Rahmen dieser Arbeit nur die putative Wechselwirkung mit der PP2C-Phosphatase Pph1 weiter untersucht, deren Ergebnis zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert wird (siehe Punkt 6.4).

Die strukturelle Konserviertheit beider Domänen impliziert auch für FrzZ einen phosphorylierungsabhängigen Aktivierungsmechanismus, wie er für den enterobakteriellen *response* Regulator CheY gezeigt werden konnte (Lee et al., 2001a, b). Um eine Aussage über die aktive Form von FrzZ treffen zu können, wurden die Aspartatreste korrespondierend zu D57 in CheY_{*E. coli*} durch Mutagenese verändert, wie von Klose et al. für den *response* Regulator NtrC publiziert (Klose et al., 1993). Durch die gewählte Strategie konnten vier Varianten erzeugt werden, welche an den potenziellen Phosphorylierungsstellen beider Domänen einen Aminosäureaustausch aufweisen. Dadurch sollte eine vollständig phosphorylierte (FrzZ E/E), dephosphorylierte (FrzZ N/N) oder jeweils an einer Domäne phosphorylierte (FrzZ E/N, N/E) Form des Proteins simuliert werden. Des Weiteren wurden zwei *single-site* Mutanten konstruiert, in denen jeweils eine der Domänen durch eine Asparagin-Substitution veränderte wurde, während die *active-site* der zweiten Domäne weiterhin nutzbar ist (Gröger, 2002). Diese wurden durch ortsspezifische Rekombination unter Kontrolle des natürlichen Promotors in die Anheftungsstelle des Myxobakteriophagen Mx8 in das Chromosom des jeweiligen *M. xanthus* Stamms integriert (Magrini et al., 1999; siehe Punkt 5.1.1).

Da ein FrzZ-spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, wurden keine Expressionsstudien der integrierten *frzZ*-Varianten unternommen. Die immunologische Analyse der gebildeten Produkte zeigte allerdings keinen Unterschied zum Akkumulationslevel des *response* Regulators in einem Wildtypstamm (siehe Punkt 5.1.2.2). Des Weiteren konnte für die so erzeugten Stämme keine Beeinträchtigung des vegetativen Wachstums festgestellt werden (siehe Punkt 5.1.2.1).

Die Akkumulation der doppelt-mutagenisierten Proteine FrzZ E/E, E/N, N/N und N/E erzielte weder unter vegetativen noch unter Differenzierungsbedingungen eine Veränderung des Phänotyps *frzZ*-defekter Zellen (siehe Abb. 5.6, 5.7, 5.10). Durch eine Glutamat-Substitution des phosphorylierbaren Aspartatrestes konnte für manche *response* Regulatoren *in vitro* eine konstitutive Aktivität festgestellt werden. Das ließ sich bisher aber nur in wenigen Fällen auch auf *in vivo* Versuche übertragen. Aus den Beobachtungen der Komplementationsanalysen dieser Arbeit kann festgestellt werden, dass ein solcher Aminosäureaustausch auch im Falle von FrzZ *in vivo* nicht zu einer konstitutiven Aktivität führt. Vielmehr sind die entsprechenden Genprodukte in *frzZ*-defekten Zellen wahrscheinlich unfunktionell und werden deshalb nicht in die nachfolgenden Betrachtungen miteinbezogen.

Wie zu erwarten, wurde durch die Reintegration des unveränderten *frzZ*-Gens in einen *frzZ*-negativen *M. xanthus* Stamm eine vollständige Komplementation aller Defekte erreicht. Durch die Integration der beiden *single-site* Mutanten *frzZ* D52N und D220N war sowohl unter vegetativen Bedingungen als auch in der Differenzierung eine partielle Komplementation zu verzeichnen (siehe Punkte 5.1.2.4, 5.1.2.5 und 5.1.2.6).

Daraus kann ein phosphorylierungsabhängiger Aktivierungsmechanismus für FrzZ abgeleitet werden, da das Vorhandensein mindestens einer funktionellen Phosphorylierungsstelle (D52 oder D220) essentiell für die Funktion des *response* Regulators ist. Die volle Funktionsfähigkeit wird dagegen nur erreicht, wenn beide Domänen unverändert sind. Unter vegetativen Bedingungen zeigte die mikroskopische Betrachtung weiterhin eine Zunahme der S-Motilität am Rand komplementierter Kolonien, die durch die Integration der doppelt-mutagenisierten *frzZ*-Konstrukte nicht zu beobachten war (siehe Abb. 5.7). Eine Komplementation in diesem Hintergrund geht folglich mit einer Verbesserung des sozialen Gleitens einher.

Die Integration der beiden *single-site* Mutanten führte zu unterschiedlichen Ergebnissen, abhängig von dem betrachteten *M. xanthus* Hintergrundstamm. So wurde der Bewegungsdefekt der *frzZ*-Deletion in DZ2 (*DZ2ΔfrzZ*) in den *colony expansion* Versuchen zu einem höheren Maße durch *frzZ* D52N komplementiert (siehe Abb. 5.6). Im Hintergrund von Stämmen, die nur über jeweils ein funktionelles Bewegungssystem verfügen, konnte der Bewegungsdefekt durch die Deletion des *response* Regulator-Gens ebenfalls durch die Reintegration der Wildtypform und durch *frzZ* D52N komplementiert werden. Durch *frzZ* D220N wurde hier eine Super-Komplementation erreicht, so dass die Expansion einer entsprechenden Kolonie im Versuch die der unveränderten

Elternstämme übertraf (siehe Abb. 5.9). Diesen Ergebnissen ist eine größere Bedeutung beizumessen, da nur hier die gegenseitige Beeinflussung des A- und des S-Motilitätssystems ausgeschaltet war.

Wie ist nun die super-optimale Signaltransduktion durch das FrzZ D220N-Protein zu erklären? In diesem Protein ist nur die N-terminale (Z1), nicht aber die C-terminale (Z2) CheY-Domäne modifizierbar. Vorstellbar wäre daher, dass in dem vollständig phosphorylierbaren Wildtypprotein die Kommunikation mit stromabwärts gelegenen Zielen hauptsächlich über die phosphorylierte erste Domäne (Z1) von FrzZ erfolgt. Die C-terminale Domäne könnte dagegen *in vivo* das Ziel einer Dephosphorylierung durch andere Proteine sein, um die Aktivität des *response* Regulators zu modifizieren. In FrzZ D220N wäre durch die Asparagin-Substitution kein inter- oder intramolekularer Phosphotransfer auf Z2 möglich. Dadurch könnte eine solche Modifikation nicht erfolgen, was einen gesteigerten Fluss von Phosphorylgruppen von Z1 auf die Motoren zur Folge hätte.

Da auch die Integration des Konstruktes *frzZ* D52N den Bewegungsdefekt *frzZ*-negativer Elternstämme komplementiert, lässt dies die Aussage zu, dass die phosphorylierte zweite Domäne des *response* Regulators ebenfalls mit den stromabwärts gelegenen Komponenten der Signalkaskade kommunizieren kann (siehe Abb. 5.9). Die geringeren Expansionswerte entsprechender Kolonien, verglichen mit der Integration von *frzZ* D220N, zeugen allerdings von einer weniger effizienten Signalweitergabe. Dies könnte in einer schwächeren Interaktion mit den Motorkomponenten begründet liegen. Auch die bereits angedeutete Modifikation von Z2 durch Dephosphorylierung könnte die Signaltransduktion negativ beeinflussen.

Eine weitere Möglichkeit wäre eine unterschiedliche Phosphorylierbarkeit der beiden Domänen des *response* Regulators durch die korrespondierende Kinase. Auch dies würde dazu führen, dass die nachfolgenden Ereignisse schneller bzw. langsamer vermittelt werden. Ein Beispiel für die Konkurrenz von zwei ähnlichen Receiverdomänen um Phosphatgruppen, stellt die Phosphorylierung der Proteine CheY und CheB im Chemotaxissystem des Enterobakteriums *E. coli* dar. Die Receiverdomänen dieser Proteine zeigen mit 25% einen vergleichbaren Grad der Aminosäureidentität, wie die Domänen des myxobakteriellen *response* Regulators. Beide interagieren nachweislich mit derselben Domäne der Histidinkinase CheA, nutzen dabei aber eine leicht veränderte Kontaktfläche (*interface*) (Li et al., 1995; Swanson et al., 1995). Dies führt dazu, dass zunächst die Exzitation des Systems durch phosphoryliertes CheY erfolgt, während die Aktivierung der Methylesterase zeitlich verzögert abläuft (Hess et al., 1988).

Durch die Integration des unveränderten *frzZ*-Konstruktes wurde eine vergleichbare Kolonieausdehnung erzielt, wie für *frzZ* D52N beobachtet werden konnte (siehe Abb. 5.9). Das wäre dadurch zu erklären, dass *in vivo* im zellulären FrzZ-*pool* tatsächlich ein bestimmtes Verhältnis den Phosphorylierungsstatus der beiden Domänen betreffend eingestellt wird, um die Signaltransduktion zu optimieren. Es bleibt zu klären, ob dies ausschließlich durch eine Modifikation des *response* Regulators geschieht oder ob auch eine Interaktion der beiden Domänen dabei eine Rolle spielt. Durch die Verbindung der beiden Domänen, eine Folge von 39 Resten, die sich zu 38,5% und 33,3% aus den Aminosäuren Alanin und Prolin zusammensetzt, könnte beispielsweise eine Flexibilität vermittelt werden, welche deren Interaktion optimiert. Ähnliche Verbindungen, sogenannte AP-reiche *linker*, kennt man aus einer Vielzahl von Kommunikationsproteinen modularer Bauweise (zur Übersicht Parkinson and Kofoid, 1992). Aufgrund der Natur der Prolinreste können in diesen Bereichen keine Sekundärstrukturen gebildet werden, was beispielsweise essentiell für die Aktivität des Pyruvat-Dehydrogenase Multienzymkomplexes in *E. coli* ist (Radford et al., 1989).

Als ein Mechanismus, der in diesem Zusammenhang zunehmend an Bedeutung gewinnt, könnte auch die Isomerisierung eines Prolinrestes des *linkers* zur Regulation der Proteinaktivität von FrzZ in Frage kommen (zur Übersicht Andreotti, 2003). Prolin nimmt unter den Aminosäuren als einzige Iminosäure eine besondere Position ein. Das an der Peptidbindung zur vorherigen Aminosäure beteiligte Stickstoffatom ist gleichzeitig Teil eines relativ starren Pyrrolidinrings, so dass die Drehbarkeit um die sogenannte Prolylpeptidbindung sehr stark eingeschränkt ist. Die native Struktur gefalteter Proteine legt normalerweise den Konformationszustand aller Peptidbindungen fest. Eine wachsende Anzahl an Proteinen zeigt jedoch eine strukturelle Heterogenität bezüglich der Konformation der Prolylpeptidbindungen (Balbach and Schmid, 2000). Eine Prolin-Isomerisierung scheint beispielsweise ein Mechanismus zur Regulation der Tyrosinkinase Itk zu sein, die an der Aktivierung immunokompetenter T-Zellen beteiligt ist (Brazin et al., 2002). Katalysiert durch die Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase (PPIase) Cyclophilin A wird durch eine Prolin-Isomerisierung die Ligandenspezifität dieses Enzyms bestimmt (Brazin et al., 2002). Für die Mehrzahl der Proteine, für die ein solcher Mechanismus in Frage kommt, wie das Calcium-Bindeprotein Calbindin D_{9k}, konnten bisher allerdings keine experimentellen Beweise einer Interaktion mit PPIasen erbracht werden (Kördel et al., 1990). Im Genom von *M. xanthus* werden allerdings acht solcher Enzyme kodiert.

Die hier erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivierung des *response* Regulators FrzZ einem phosphorylierungsabhängigen Mechanismus unterliegt. Weiterhin

scheinen sich die beiden CheY-ähnlichen Domänen des Proteins funktionell zu unterscheiden. Nach den vorliegenden Daten kommt der N-terminalen Domäne eine größere Bedeutung in der Regulation der Zellbewegung zu, deren molekularer Mechanismus allerdings zu klären bleibt. Die vermutete effizientere Phosphorylierung dieser Domäne durch die korrespondierende Kinase, wie auch eine Interaktion der beiden Domänen, beispielsweise in Form eines intramolekularen Phosphotransfers, könnten durch *in vitro* Versuche biochemisch analysiert werden. Für den Beweis einer stärkeren Interaktion der N-terminalen Domäne Z1 mit dem Ziel der Signaltransduktion durch FrzZ fehlt bislang allerdings die experimentelle Grundlage, da diese Komponente noch unbekannt ist.

6.2 Lokalisierung von FrzZ in der Zelle

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien zur Lokalisierung des *response* Regulators FrzZ in der Zelle, sollten eine Aussage über eine direkte Interaktion des Proteins mit den Kernkomponenten des *frz*-Signaltransduktionssystems, FrzCD, FrzA und FrzE, ermöglichen. Dies wurde experimentell durch die Analyse fraktionierten Zellextraktes aus verschiedenen *M. xanthus* Stämmen erreicht. Des Weiteren wurde die Positionierung einer mit dem GFP-Protein (*green fluorescent protein*) fusionierten Variante von FrzZ in lebenden Zellen untersucht, um dadurch Aufschluss über eine mögliche Interaktion des Proteins mit den Motorkomponenten zu erhalten. Durch diese Technik hatten Mignon et al. (2005) die polare Lokalisierung des FrzS-Proteins aus *M. xanthus* beobachten können. Dieses Protein ist ausschließlich am sozialen Gleiten beteiligt und wurde in signifikant größerer Menge am jeweiligen Vorderende der Zellen gefunden, wo die Extrusion der Pili erfolgt (Mignon et al., 2005).

Das GFP-Protein und dessen Varianten sind mittlerweile unverzichtbare Werkzeuge zur Determination der Lokalisierung, der Struktur oder der Dynamik von Molekülen in lebenden Zellen, da sie die nicht-invasive Analyse des gewünschten Parameters ermöglichen (zur Übersicht Margolin, 2000). Im Falle des *frzZ*-Gens wurde die transkriptionelle GFP-Fusion durch ortsspezifische Integration unter Kontrolle des nativen Promotors in das *M. xanthus* Chromosom integriert. Um die oberhalb des Startcodons des *frzZ*-Gens liegende Nukleotidsequenz nicht zu verändern (siehe Abb. 6.2), erschien es deshalb ratsam, eine C-terminale GFP-Fusion zu konstruieren. Das resultierende Protein wies allerdings eine Deletion von zehn Aminosäureresten auf, welche die zwei C-terminalen Reste von FrzZ sowie die acht N-terminalen Reste des GFP-Proteins betraf (siehe Abb. 5.12). Die Integration dieses Konstruktes in einen *frzZ*-deletierten *M. xanthus*

Stamm (DZ2 Δ frzZ) führte zu einem geringeren Akkumulationslevel von FrzZ-GFP. Dieser Effekt zeigte sich nicht im Hintergrund der Stämme, die zusätzlich über die chromosomale Wildtypkopie des *response* Regulators verfügten (siehe Abb. 5.13). Ähnliches konnte bereits im Zusammenhang mit der ortsspezifischen Integration eines unfusionierten, vermeintlichen *frzZ*-Wildtypgens in die *frzZ*-Deletionsmutante beobachtet werden (siehe Punkt 5.1.1.1). Diese Kopie des *response* Regulators zeigte in der Sequenzierung ebenfalls ein fehlerhaftes 3'-Ende und führte wahrscheinlich zur Expression eines instabilen Produktes, denn das akkumulierte FrzZ-Protein konnte die Defekte des Elternstamms nicht komplementieren. Wie Bindungsstudien zeigten, ist gereinigtes FrzZ-Protein nicht in der Lage, autoregulatorisch auf die eigene Expression zu wirken, so dass ein solcher Effekt als Erklärung ausgeschlossen werden kann (Daten nicht gezeigt).

Die Integration des GFP-fusionierten *response* Regulators in den Stamm DZ2 Δ frzZ resultierte in einer Wiederherstellung des Bewegungsdefektes unter vegetativen Bedingungen (siehe Punkt 5.2.2.3). Der Differenzierungsdefekt des Elternstamms konnte allerdings nicht vollständig komplementiert werden, so dass auch hier die Akkumulation eines weniger stabilen Proteins vermutet werden kann. Da eine verminderte Akkumulation von FrzZ-GFP nicht in Stämmen zu beobachten war, die über die intakte Wildtypkopie des *response* Regulators verfügen, kann weiterhin gefolgert werden, dass die zusätzliche Gegenwart des unveränderten Genproduktes die fehlerhafte, instabilere Variante auf eine bisher unbekannte Weise stabilisiert.

Die Determination der Lokalisierung des *response* Regulators CheY und anderer Chemotaxisproteine in *E. coli*, erfolgte durch die Analyse von N- und C-terminalen Fusionen mit der GFP-Variante YFP (*yellow fluorescent protein*). Entsprechende Konstrukte wurden in den Zellen *in trans* unter Kontrolle des induzierbaren Arabinose-Promotors exprimiert (Sourjik and Berg, 2000). Obwohl das Bewegungsdefizit entsprechender Stämme dadurch nicht vollständig komplementiert werden konnte, wurde die zelluläre Lokalisierung der Fusionsproteine auch in diesem Fall weiter untersucht. Es erscheint daher legitim, die vorläufigen Ergebnisse der Lokalisierungsstudien der GFP-Fusion des mykobakteriellen FrzZ-Proteins, die sich leider nur auf den Stamm DZ2 Δ frzZ beziehen, hier zu diskutieren.

In entsprechenden Zellen konnte eine gut sichtbare Strahlung beobachtet werden (siehe Abb. 5.15), die in *M. xanthus* Zellen ohne das *gfp*-Konstrukt nicht sichtbar war. Das lässt die Aussage zu, dass, obwohl von der Aminosäuredeletion des Konstruktes auch die ersten acht Reste des GFP-Proteins betroffen sind, dessen β -Faltblattstruktur und Fluoreszenz dadurch nicht negativ beeinflusst werden. Für den fusionierten *response*

Regulator zeigte sich in der Mehrzahl der Zellen eine polare Lokalisierung, die sich bis in das mittlere Drittel jeder Zelle erstreckte. Im Gegensatz zu den Beobachtungen, die für FrzS gemacht wurden (Mignon et al. 2005), war jedoch kein Unterschied in der Intensität der Ansammlungen an beiden Zellpolen zu beobachten. Da das *frz*-System an der Regulation der Zellumkehr durch beide Motilitätssysteme beteiligt ist, entsprechen die Beobachtungen jedoch den Erwartungen und deuten damit auf eine mögliche Interaktion des FrzZ-Proteins mit den Motorkomponenten der Zelle hin. Weiterführende Untersuchungen sollten dennoch mit einem *frzZ-gfp* Konstrukt von korrekter Sequenz durchgeführt werden, um verlässliche Aussagen über die zelluläre Lokalisation des *response* Regulators treffen zu können. Das wäre auch für die Untersuchungen in *M. xanthus* Stämmen mit weiteren Gendefekten essentiell, um ausschließlich den Einfluss des Fehlens der entsprechenden Genprodukte auf die Positionierung von FrzZ untersuchen zu können. Des Weiteren sollte außer der bisher geplanten C-terminalen auch eine N-terminale Fusion von FrzZ mit dem GFP-Protein generiert werden. Dadurch könnte ausgeschlossen werden, dass die unvollständige Komplementation des Differenzierungsdefektes *frzZ*-deletierter Zellen nicht auf die fehlenden Aminosäurereste des bisherigen Fusionsproteins, sondern auf die Konstruktion der GFP-Fusion an sich zurückzuführen ist.

Durch die immunologische Analyse fraktionierten Zellextrakts hinsichtlich der Lokalisierung des Rezeptors des *frz*-Systems, FrzCD, konnten McBride et al. zeigen, dass das lösliche Protein zu einem gewissen Anteil mit Membranen, Membranbestandteilen oder großen Proteinkomplexen assoziiert vorliegt (McBride et al., 1992). Dieses Ergebnis lässt auch in *M. xanthus* auf die Bildung von Rezeptor-Signal-Komplexen (RSKs) schließen. Diese Organisationsform ist in allen chemotaktischen Bakterien und Archaeen hoch konserviert und verleiht den Signaltransduktionswegen wahrscheinlich die nötige Empfindlichkeit zur Regulation zellulärer Reaktionen (zur Übersicht Wadhams and Armitage, 2004). In *E. coli* konnte man die Bildung von RSKs durch fluoreszenzmikroskopische Analysen nachweisen (Sourjik and Berg, 2000). Tausende der verschiedenen MCPs des Organismus bilden dabei organisierte Cluster an den Zellpolen, an welche CheW- und CheA-Moleküle in einem bestimmten mengenmäßigen Verhältnis assoziiert vorliegen (Francis et al., 2004; Maddock and Shapiro 1993; Wadhams et al., 2000). Im Gegensatz zu den polaren Ansammlungen transmembranener MCPs, scheinen lösliche Rezeptor-Proteinen, wie das TlpC-Protein aus *R. sphaeroides* oder FrzCD aus *M. xanthus*, vor allem Cluster im Cytoplasma der Zellen zu bilden (Armitage, 2003; Wadhams et al., 2000; Zhang et al., 2007).

Ähnlich wie für FrzCD beschrieben, konnte auch für das FrzZ-Protein eine Assoziation mit Membranbestandteilen oder großen Proteinkomplexen gezeigt werden (siehe Abb. 5.11). In fraktioniertem Zellextrakt des Wildtypstamms DZ2 entfiel jeweils die Hälfte der detektierten Gesamtmenge an FrzZ auf die cytoplasmatische und die partikuläre Fraktion, was erneut die Bildung von RSKs in diesem Organismus andeutet. In einem *frzE*-defekten Stamm zeigte sich ein geringerer FrzZ-Level und die Lokalisierung des *response* Regulators war vollständig in die lösliche Fraktion verschoben. Nach Weinberg und Zusman ist auch die Kinase FrzE an der Expression der stromaufwärts gelegenen Gene beteiligt (Weinberg and Zusman, 1989). Ähnlich wie bereits für den *frzCD*-defekten Stamm DZ2 Δ *frzCD* vermutet, könnte das Fehlen der Kinase zu einer geringeren Expression des *frzZ*-Gens und dadurch zu einer verminderten Akkumulation des Proteins führen. Das hier im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen Rezeptormutante dennoch FrzZ-Protein detektiert wurde, könnte durch einen polaren Effekt der Inaktivierung des *frzCD*-Gens auf die Expression des stromabwärts liegenden *frzE*-Gens zu erklären sein. In dem Stamm DZ2 Δ *frzCD* wäre folglich auch der zelluläre Level an FrzE-Protein reduziert, so dass sich die Expression stromaufwärts liegender Gene zusätzlich verringert. Die Verschiebung des detektierten FrzZ-Proteins in dem Stamm DZ2*frzE* in die Fraktion der löslichen Proteine deutet weiterhin an, dass die Co-Lokalisierung des *response* Regulators mit den Rezeptor-Komplexen vom Vorhandensein der Kinase FrzE abhängig ist. Eine solche Abhängigkeit konnte durch Analysen des YFP-fusionierten CheY-Proteins aus *E. coli* bereits für den enterobakteriellen *response* Regulator nachgewiesen werden (Sourjik and Berg, 2000). Während in Wildtypzellen durch eine Co-Lokalisierung von CheY mit den MCPs zwei Typen von Ansammlungen in der Zelle entstehen (stark fluoreszierende, polare Cluster und schwächere, laterale Cluster), zeigt das Protein in *cheA*-Mutanten eine diffuse Verteilung im Cytoplasma (Sourjik and Berg, 2000).

Die Lokalisierungsstudien in einem *pph1*-defekten *M. xanthus* Stamm (DZ2*pph1*) zeigten ebenfalls einen, im Vergleich zu DZ2, geringeren Level an FrzZ-Protein. Dies konnte durch weitere Akkumulationsanalysen bestätigt werden und war gleichermaßen für die Pph1-Akkumulation in *frzZ*-defekten Zellen zu beobachten (siehe Abb. 5.20). Es findet folglich eine gegenseitige Beeinflussung von *response* Regulator und Phosphatase statt, wobei an dieser Stelle nicht geklärt werden kann, ob dies auf Transkriptions- oder Translationsebene, oder durch die Modulation der Aktivität und Stabilität gebildeter mRNAs bzw. Proteine erfolgt. Im Hintergrund des Stammes DZ2*pph1*, der über ein funktionelles *frzE*-Gen verfügt, war weiterhin eine Verschiebung der FrzZ-Lokalisierung in die cytoplasmatische Fraktion zu beobachten. Daraus kann man schließen, dass, wie

bereits unter Punkt 6.2.1.2 vermutet, die Phosphatase *in vivo* möglicherweise den Phosphorylierungszustand des *response* Regulators modifiziert. Eine mangelnde Dephosphorylierung erschwert dabei offensichtlich die Co-Lokalisierung von FrzZ mit den RSKs, wodurch die Verschiebung der detektierten Menge des Regulators in die cytoplasmatische Fraktion zu erklären wäre. Ein Modifikations-Ereignis könnte folglich die Co-Lokalisation von FrzZ mit den membrangebundenen RSKs negativ, aber auch positiv beeinflussen und dadurch die Signalweitergabe durch FrzZ bzw. das gesamte *frz*-System regulieren.

6.3 Identifikation potenzieller FrzZ-Interaktionspartner im Hefe Zwei-Hybrid System

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Hefe Zwei-Hybrid System genutzt, um mögliche Interaktionspartner des *response* Regulators FrzZ zu identifizieren. Dieses System bietet gegenüber anderen Methoden der Detektion von Protein-Interaktionen viele Vorteile (zur Übersicht Tucker et al., 2001; Vidal and Legrain, 1999). Zum Einen können interessante Moleküle *in vivo* untersucht werden, wodurch die artifiziellen Bedingungen vieler *in vitro*-Techniken zu vermeiden sind. Weiterhin erfordert dieses System nur wenige Klonierungsschritte und nicht die mitunter problematische Expression und Aufreinigung der Proteine.

Eine Ursache für das Auftreten von falsch negativen Interaktionen, stellen dagegen posttranslationale Modifikationen dar. Protein-Protein-Wechselwirkungen, die beispielsweise eine Glykosilierung oder posttranslationale Phosphorylierung erfordern, können im Hefe Zwei-Hybrid System häufig nicht detektiert werden. Beispielsweise konnten Gregor et al. mit dieser Technik die bereits bekannte Interaktion zwischen Kinase und *response* Regulator des RegB/RegA Zwei-Komponenten Systems (ZKS) aus *Rhodobacter capsulatus* zunächst nicht nachweisen (Gregor et al., 2007). Dies wurde erst durch den Einsatz einer konstitutiv aktiven Form des Regulators möglich, welche das Protein ständig in einer Konformation hielt, die der phosphorylierten Form ähnelte (Du et al., 1998; Gregor et al., 2007).

Eine fehlende Modifikation könnte auch im Falle des myxobakteriellen *response* Regulators FrzZ ursächlich für die quantitativ unbefriedigenden Ergebnisse dieser Analyse gewesen sein, da alle bisherigen Ergebnisse auf eine Phosphorylierung als Aktivierungsmechanismus des Proteins hindeuten.

6.3.1 Möglichkeit einer Interaktion von FrzZ und TPR

Der einzige mittels des Hefe-Systems identifizierte potenzielle Interaktionspartner von FrzZ zeichnet sich durch den Besitz von sechs TPR-Motiven aus (*tetratricopeptide repeats*) (siehe Abb. 5.16). Diese Wiederholungen von 34 Aminosäuren findet man in allen Domänen des Lebens, wo sie in den verschiedensten Zellkompartimenten vorkommen. TPR-Proteine vermitteln Protein-Protein-Interaktionen oder organisieren Multiproteinkomplexe (zur Übersicht D'Andrea and Regan, 2003). In Eukaryonten konnte die Beteiligung TPR-haltiger Proteine an einer Reihe zellulärer Funktionen, wie der Kontrolle des Zellzyklus, der Transkription, dem Proteintransport und der Proteinfaltung, nachgewiesen werden (Lamb et al., 1994; Tzamarias and Struhl 1995; van der Leij et al., 1993). Die in Prokaryonten am Besten untersuchten TPR-Proteine sind die Klasse II-Chaperone der Typ III-Sekretionssysteme (TTSS) Gram-negativer Bakterien. Diese Proteine sind am Transport sogenannter Translokatoren beteiligt, welche die strukturelle Grundlage zur Sekretion von Proteinen in das extrazelluläre Medium sowie bei pathogenen Vertretern zur Translokation von Effektorproteinen in die Wirtszellen bilden (zur Übersicht Parsot et al., 2003). Bislang sind keine Strukturdaten eines Klasse II-Chaperons verfügbar, doch weisen alle der ca. 20 kDa großen Proteine nur drei TPR-Motive auf (Edqvist et al., 2005; Pallen et al., 2003).

Der im Hefe-System identifizierte Bereich der Interaktion mit FrzZ erstreckt sich auf die 66 Aminosäurereste der Positionen 644 bis 710 des insgesamt 1111 Reste umfassenden TPR-Proteins und liegt damit nicht in einem der namensgebenden Motive (siehe Abb. 5.16, roter Kasten). Wie durch die Analyse der Organisation des Hsp70/Hsp90 Multichaperon-Komplexes durch das TPR-haltige Co-Chaperon Hop (*heatshock organizing protein*) gezeigt werden konnte, tragen aber auch die Aminosäuren außerhalb des strukturellen TPR-Konsensus zur Substratspezifität der einzelnen Domänen bei, indem sie einzigartige, charakteristische Oberflächen bilden (Scheufler et al., 2000). Die Anzahl und Anordnung der TPR-Motive eines Proteins sind dabei Variablen, durch welche individuell unterschiedliche biochemische Funktionen erfüllt werden können. Ein Vergleich des ermittelten TPR-Konsensus mit den Motiven des in *M. xanthus* identifizierten Proteins, ergab eine hohe Konserviertheit der enthaltenen TPR-Motive (siehe Abb. 5.17). Da bisher noch keine Struktur eines prokaryontischen TPR-Proteins aufgeklärt werden konnte, kann nicht mit Sicherheit von einem vergleichbaren Mechanismus der Substraterkennung und Interaktion ausgegangen werden, wie er z.B. für die Organisation des Hsp-Chaperon-Komplexes durch Hop gezeigt werden konnte. Hier sind die Aminosäurereste des äußersten C-Terminus beider Chaperone für die Bindung an Hop

und andere Co-Chaperone verantwortlich (Pratt and Toft, 1997). Die Spezifität der Bindung von Hsp70 bzw. Hsp90 an eine bestimmte TPR-Domäne von Hop wird dagegen über Kontakte mit weiter N-terminal gelegenen Resten der Chaperone vermittelt.

Da der Vergleich der im Hefe-System identifizierten Sequenz bei 7.388 im Genom von *M. xanthus* kodierten Proteinen aber nur diese eine, vollkommene Übereinstimmung ergab (siehe Punkt 5.3.2.1), ist eine Interaktion von FrzZ mit dem im Hefe Zwei-Hybrid System identifizierten TPR-Protein folglich nicht zwingend als falsch-positiver Befund zu werten. Ähnlich der Organisation des Hsp70/Hsp90 Multichaperon-Komplexes der Eukaryonten könnte man sich in *M. xanthus* darüber hinaus, vermittelt durch TPR, die Beteiligung weiterer Proteine an der Signalweitergabe zu den stromabwärts gelegenen Komponenten vorstellen.

6.3.2 Charakterisierung von TPR *in vivo*

Zur Charakterisierung der Funktion des TPR-Proteins *in vivo* wurde das *tpr*-Gen in verschiedenen *M. xanthus* Stämme durch Einsetzen einer Kanamycin-Resistenzkassette unterbrochen (siehe Punkt 5.4.1). Ein erfolgreiches *single cross-over* brachte kanamycin-resistente Klone hervor und wurde mittels PCR nachgewiesen. Alle *tpr*-Mutanten zeigten in Flüssigkultur einen charakteristischen Phänotyp, indem die Zellen stark aneinander hafteten. Ein ähnlicher Phänotyp wurde auch in *M. xanthus* Zellen mit einem *pilT*-Defekt beobachtet (Wu et al., 1997). Mutationen in fast allen *pil*-Genen bewirken, dass die Zellen keine Typ VI Pili (TFP) ausbilden und keine S-Motilität zeigen. Eine Mutation im *pilT*-Gen ruft dagegen einen Pili⁺/S⁻ Phänotyp hervor. Das PilT-Protein weist, ähnlich wie das PilB-Protein, Nukleotid-Bindekassetten oder Walker-Motive auf (Walker et al., 1982) und ist in *M. xanthus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Synechocystis* PCC6803 an der ATP-abhängigen Retraktion der TFP beteiligt (zur Übersicht Nudleman and Kaiser, 2004). Zellen mit einem *pilT*-Defekt können diese Strukturen folglich nicht zurückziehen und besitzen auf der Zelloberfläche mehr Typ IV Pili als Wildtypzellen (Sun et al., 2000; Wu and Kaiser, 1997).

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der TFP-Extrusion und dem TPR-Protein zu untersuchen, wurde der intra- und extrazelluläre PilA-Gehalt der *tpr*-Mutanten bestimmt. Diese Analyse zeigte im Vergleich zu den Elternstämmen eine signifikante Erhöhung der Menge der Pilus-Untereinheit auf den Zelloberflächen (siehe Abb. 5.18). Eine Bewertung der Bewegungsfähigkeit der entsprechenden Stämme mittels *colony expansion* Versuchen ergab jedoch, dass deren Schwärmfähigkeit auf 0,3%igen, nährstoffreichen Agarplatten nicht beeinträchtigt war und folglich kein S-Motilitätsdefekt

vorliegt. Auch führte die Inaktivierung des *tpr*-Gens in dem *M. xanthus* Stamm DK1217, der nur zu S-System vermitteltem Gleiten befähigt ist, nicht zur Entstehung unbeweglicher Zellen, wie andernfalls zu erwarten gewesen wäre (siehe Abb. 5.19).

Weiterhin konnte durch die Inaktivierung des *tpr*-Gens der *pilC*-Defekt des Stamms DK1300 supprimiert werden (siehe Abb. 5.18, D.). PilC-homologe Proteine konnten neben den Motorproteinen PilB und PilT, der Prepilin-Peptidase PilD und dem Sekretin PilQ in allen bisher untersuchten Spezies identifiziert werden, welche Typ VI Pili zur Fortbewegung nutzen (zur Übersicht Mattick, 2002). Lokalisiert in der inneren Membran ist PilC an der Ausbildung der Pili, nicht aber an der Synthese der strukturellen Untereinheiten beteiligt. In entsprechenden Mutanten ist das PilA-Protein folglich intrazellulär, nicht aber auf der Zelloberfläche detektierbar (Nunn et al., 1990; Wall and Kaiser, 1997). Die molekulare Grundlage der Funktion des PilC-Proteins konnte allerdings bisher noch in keinem Organismus aufgeklärt werden. Von den zwei in dieser Analyse genutzten Stämmen, die aufgrund eines *pilC*-Defektes ein nicht-funktionelles S-Motilitätssystem aufweisen, konnte durch die Inaktivierung des *tpr*-Gens nur in DK1300, nicht aber in DK10417, der Export von PilA-Protein auf die Zelloberfläche wiederhergestellt werden (siehe Abb. 5.18). Im Gegensatz zu der *pilC*-Deletionsmutante DK10417 weist der Stamm DK1300 lediglich eine Punktmutation in dem entsprechenden Gen auf (Hodgkin and Kaiser, 1979b). Es wäre folglich möglich, dass in diesem Hintergrund eine modifizierte Form des Genprodukts gebildet wird, welche in der Gegenwart des TPR-Proteins nicht funktionell ist.

Der für die *tpr*-Mutanten aller Stämme mit Ausnahme der *pilC*-Deletionsmutante DK10417 beobachtete Phänotyp deutet darauf hin, dass die Assemblierung von TFP oder der Export von PilA-Monomeren auf die Zelloberfläche *in vivo* negativ durch das TPR-Protein beeinflusst wird. Der Phänotyp der *tpr*-Inaktivierung in der *pilC*-Punktmutante DK1300 könnte weiterhin bedeuten, dass diese Regulation durch die Einflussnahme des TPR-Proteins auf PilC erfolgt. Da Ersteres durch das Hefe Zwei-Hybrid System als potenzieller Interaktionspartner des *response* Regulators FrzZ identifiziert wurde, könnte ein Zusammenhang mit der Regulation der PilC-Funktion durch TPR bestehen. Da TPR-Proteine, wie oben ausgeführt, der Koordination von Protein-Protein-Interaktionen dienen, stellt das in Abbildung 6.3 gezeigte Modell eine Vermutung über eine FrzZ-gesteuerte Regulation des TFP-vermittelten Gleitens durch PilC dar, worin das TPR-Protein als Plattform dieser Interaktion genutzt wird.

Das Signal, welches durch das *frz*-System vermittelt wird, ist der Befehl zur Richtungsumkehr bzw. zu einem Wechsel der Aktivität beider Motoren an den jeweils

entgegengesetzten Zellpol. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der *response* Regulator FrzZ dabei hauptsächlich das S-Motilitätssystem beeinflusst. Des Weiteren kann für dieses Protein nach den vorliegenden Daten von einem phosphorylierungsabhängigen Aktivierungsmechanismus ausgegangen werden (siehe Punkt 6.1.2).

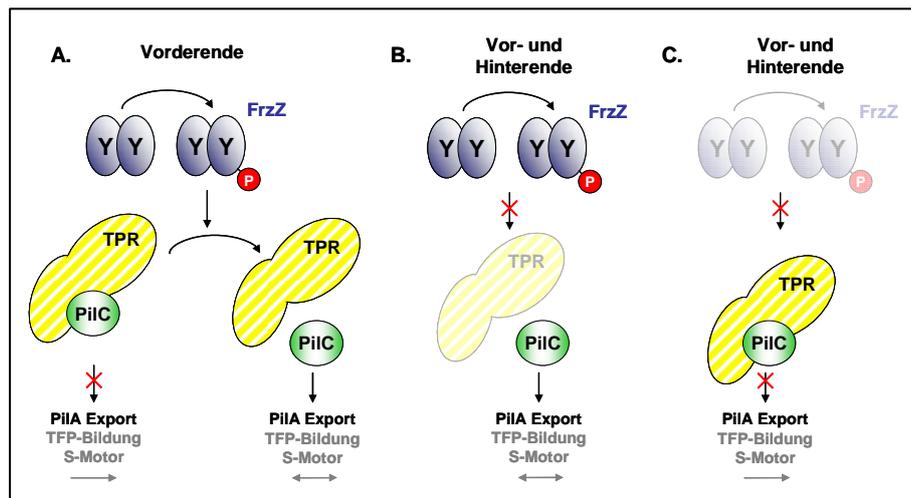


Abbildung 6.3: Modell einer möglichen Interaktion von FrzZ und PiIC, vermittelt durch das TPR-Protein. In **A.:** Verhältnisse in der Wildtypzelle. Phosphoryliertes FrzZ transduziert das Signal zum Revertieren durch die Aufhebung der Inhibition von PiIC durch TPR. Dies erfolgt durch einen noch ungeklärten Mechanismus nur am neuen Vorderende der Zelle, wo freies PiIC nun die Extrusion der Typ IV Pili vermittelt. Das Hinterende der Zelle wird dagegen durch die Inhibition des PiIC-Proteins durch TPR definiert, wodurch hier keine Pili ausgebildet werden. Die Signaltransduktion durch das *frz*-System bewirkt die Richtungsumkehr der Zellen (doppelköpfige Pfeile) und unterbleibt in Gleitperioden (einfache Pfeile). In **B.:** Verhältnisse durch die Inaktivierung des *tpr*-Gens. Hier erfolgt keine Inhibition von PiIC, so dass es, unabhängig von einer Aktivierung durch phosphoryliertes FrzZ, an beiden Polen zur Ausbildung von Pili/zum Export von PiIA kommt. In **C.:** Verhältnisse durch die Deletion des *frzZ*-Gens. Es erfolgt keine Aufhebung des negativen Effektes von TPR auf PiIC, so dass der Gehalt an TFP/PiIA auf der Zelloberfläche vermindert ist. Die Zellen sind darüber hinaus nicht zu S-System vermitteltem Revertieren befähigt.

Das Revertieren des S-Motors könnte nun durch die Aktivierung der TFP-Extrusion am neuen Vorderende der Zelle geschehen, indem phosphoryliertes FrzZ die Inhibition des PiIC-Proteins durch TPR löst. „Freies“ PiIC könnte im Folgenden die Extrusion der Pili induzieren bzw. diesen Vorgang durch seine uneingeschränkte Beteiligung ermöglichen (Abb. 6.3, A.) Am Hinterende einer *M. xanthus* Zelle würde PiIC weiterhin durch TPR inhibiert vorliegen und es in Folge dessen nicht zur Ausbildung von TFP/zum Export von PiIA-Monomeren kommen. Gleitperioden würden dann durch das Unterbleiben der Signaltransduktion durch das *frz*-System an beiden Zellpolen definiert.

Der erhöhte PilA-Gehalt *tpr*-defekter Zellen wäre demnach durch die mangelnde Inhibition des PilC-Proteins zu erklären. Durch das Fehlen des TPR-Proteins als Interaktionsbasis erfolgt dieser Effekt hier unabhängig von einer Aktivierung durch phosphoryliertes FrzZ. Das Vorderende der Zelle könnte nicht länger durch die alleinige Extrusion von Typ IV Pili definiert werden, vielmehr käme es an beiden Zellpolen zur Erhöhung der Menge an exportiertem PilA (Abb. 6.3, B.). Die *colony expansion* Versuche entsprechender Mutanten zeigten, dass sich die Bewegungsfähigkeit der Stämme dadurch nicht verminderte (siehe Abb. 5.19). Das lässt den Schluss zu, dass es in *tpr*-defekten Zellen trotz der signifikant höheren Menge an PilA auf den Zelloberflächen nicht zur Bildung funktionsfähiger TFP kommt. Das erklärt auch die Beobachtung, dass eine Kolonie des Stamms DK1300*tprint* die Ausdehnung des Elternstamms übertrifft, im Vergleich zu dem korrespondierenden Wildtypstamm DK1622 aber weiterhin eine Reduktion um 41,1% zeigt.

In Zellen mit einem *frzZ*-Defekt wäre dagegen nicht mit einer Steigerung des extrazellulären PilA-Gehalts zu rechnen, da die Inhibierung des PilC-Proteins hier nicht aufgehoben werden kann (Abb. 6.3, C.). Aus der immunologischen Detektion war dies nicht klar ersichtlich, da aufgrund der Schwierigkeiten in der Präparation der TFP der Wildtypstämme eine aussagekräftige Kontrolle fehlte (siehe Abb. 5.18, B., DZ2 und DZ2Δ*frzZ*). Entsprechende Zellen zeigten im *colony expansion* Assay mit einer verminderten Umkehrfrequenz und einer dadurch reduzierten Bewegungsfähigkeit allerdings einen Phänotyp, der der Voraussage entspricht und auf eine verminderte Pilierung hindeutet. Die gleichzeitige Inaktivierung des *frzZ*- und des *tpr*-Gens führte, verglichen mit dem *frzZ*-defekten Elternstamm, zu einer Steigerung des extrazellulären PilA-Gehalts (siehe Abb. 5.18, B., DZ2Δ*frzZtprint*). Dieser Phänotyp schließt eine direkte Interaktion von FrzZ und PilC aus. Die Aktivität des Motorproteins ist folglich nicht direkt von einer Interaktion mit FrzZ abhängig. PilC bedarf lediglich der Freisetzung von TPR, um eine erhöhte Akkumulation von PilA auf der Zelloberfläche zu vermitteln.

Der potenzielle Interaktionspartner des *response* Regulators FrzZ, TPR, stellt die erste greifbare Verbindung des *frz*-Systems bzw. des FrzZ-Proteins zu einem Motor der Zelle dar, indem es die Möglichkeit einer Regulation des PilC-Proteins und damit der Extrusion von Typ IV Pili bietet. Das größte Problem des jetzigen Modells dieser Wechselwirkungen stellt das Fehlen weiterer beteiligter Proteine dar. Durch diese könnte beispielsweise, über die bloße Steigerung des extrazellulären PilA-Gehalts hinaus, die Assemblierung funktionsfähiger Pili vermittelt werden. Auch könnte dadurch der Mechanismus geklärt werden, der es ermöglicht, dass eine Signaltransduktion durch das *frz*-System nur an

einem Zellpol die Extrusion von TFP vermittelt, während dies am Hinterende der Zelle unterbleibt. Zu diesem Zweck kämen Interaktionspartner in Frage, die im Gegensatz zu FrzZ unipolar lokalisiert sind, wie beispielsweise das FrzS-Protein, welches ausschließlich an der Regulation des sozialen Gleitens beteiligt ist (Mignon et al., 2005).

Da auch die Identifikation falsch-positiver Interaktionen ein Problem des Hefe Zwei-Hybrid Systems darstellt, ist es natürlich notwendig, die potenzielle Interaktion zwischen TPR und FrzZ einer genauen Prüfung hinsichtlich ihrer Funktionalität zu unterziehen. Auch kann der Mechanismus einer solchen Wechselwirkung nur durch *in vitro* Analysen geklärt werden. Die biologische Relevanz einer solchen Interaktion ist jedoch klar ersichtlich, da die Koordination der sozialen Bewegung der Zellen eines *M. xanthus* Schwarms essentiell für die Lebensweise der Bakterien ist. Die physiologische Vernetzung wird dabei, neben den Typ VI Pili, durch weitere Oberflächenbestandteile vermittelt. Zur Erklärung des Phänotyps, der durch die Inaktivierung des *tpr*-Gens hervorgerufen wird, wären folglich auch eine Erhöhung des extrazellulären Gehalts an Fibrillen oder eine Veränderung des Lipopolysaccharid-O-Antigens denkbar, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht wurden. Des Weiteren muss sicher gestellt werden, dass die Konstruktion einer *tpr*-Insertionsmutante nach der beschriebenen Strategie tatsächlich zu einer Inaktivierung des Gens geführt hat. Dies könnte beispielsweise durch die Detektion des Genproduktes mittels des *Western Blot* Verfahrens bewerkstelligt werden, welches in den konstruierten Mutanten nicht mehr nachzuweisen sein sollte.

6.4 Analyse der potenziellen Interaktion von FrzZ und Pph1

Die Phosphatase Pph1 wurde bereits früher im Zuge der Suche nach Interaktionspartnern des *response* Regulators FrzZ mittels des Hefe Zwei-Hybrid Systems identifiziert (Treuner-Lange et al., 2001). In dieser Analyse wurden die beiden CheY-homologen Domänen des FrzZ-Proteins getrennt voneinander eingesetzt und die Phosphatase interagiert ausschließlich mit der C-terminalen Domäne Z2. Während der vorangegangenen Diplomarbeit wurden die doppelt-mutagenisierten *frzZ*-Konstrukte, *frzZ* E/E, E/N, N/N und N/E, in einer erneuten Hefe Zwei-Hybrid Analyse eingesetzt, um eine phosphorylierungsabhängige Interaktion beider Proteine zu überprüfen (Gröger, 2002). Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, dass die Wechselwirkung beider Proteine von einer Phosphorylierung der C-terminalen CheY-Domäne des *response* Regulators abhängig ist (Gröger, 2002; siehe auch Punkt 5.5.2).

Obwohl bisher keine Interaktion eines Serin- und Threoninreste modifizierenden Enzyms mit einem Protein des klassischen Histidin-Aspartat Phosphotransfers gezeigt werden konnte (zur Übersicht Shi, 2004), waren weiterführende Untersuchungen ein wichtiger Punkt der vorliegenden Arbeit.

6.4.1 Komplementation des *pph1* Phänotyps *in vivo*

Ziel der durchgeführten Komplementationsanalysen in dem *pph1*-defekten *M. xanthus* Stamm DZ4314 war es, Defekte, die durch das Fehlern der Phosphatase bzw. einer durch dieses Enzym katalysierten Modifikation von FrzZ verursacht wurden, durch die Reintegration des entsprechenden Produktes aufzuheben.

Für eine *pph1*-Mutante konnte auf festem Untergrund ein Bewegungsdefekt beobachtet werden, der sich unter vegetativen Bedingungen in einer verminderten Zellumkehrfrequenz äußert. Bei Nährstofflimitierung arretieren diese Zellen sehr früh in der Differenzierung und bilden keine Fruchtkörper. Des Weiteren weisen sie einen schweren Sporulationsdefekt auf (Treuner-Lange et al., 2001). Aufbauend auf den Ergebnissen der Hefe Zwei-Hybrid Analyse der vorangegangenen Diplomarbeit wurden die mutagenisierten *frzZ*-Isoformen durch ortsspezifische Rekombination in die Mx8-Anhaftungsstelle des Chromosoms der *pph1*-Insertionsmutante integriert (siehe Punkt 5.5.3). Durch den Austausch beider *active-site* Aspartatreste sollten FrzZ-Proteine akkumulieren, welche die phosphorylierte (FrzZ E/E), dephosphorylierte (FrzZ N/N) oder jeweils an einer Domäne phosphorylierte bzw. dephosphorylierte (FrzZ E/N, N/E) Form des *response* Regulators simulieren. Weiterhin wurden auch die beiden *single-site* Mutanten, *frzZ* D52N und D220N, in *pph1*-defekte Zellen integriert, durch die im Hintergrund der *frzZ*-Deletionsmutante DZ2 Δ *frzZ* ein Komplementation erzielt werden konnte (siehe Punkt 6.1.2). Dadurch sollte es ermöglicht werden, die angedeutete phosphorylierungsabhängige Interaktion beider Proteine zu überprüfen.

Die Defekte *pph1*-negativer Zellen unter vegetativen Bedingungen erwiesen sich als geringfügig, um eine Komplementation durch Wachstums- oder *colony expansion* Versuche zuzulassen (siehe Punkt 5.5.3.2). Unter Differenzierungsbedingungen zeigte sich allerdings, dass die Akkumulation der FrzZ-Konstrukte D220N und N/E den Aggregationsdefekt des Elternstamms beheben konnten (siehe Abb. 5.21). Durch diese beiden Formen des *response* Regulators konnte auch eine signifikante Zunahme der Gesamtanzahl an Sporen auf 20,18% bzw. 50,08% des Wertes beobachtet werden, der für den Wildtypstamms ermittelt wurde. Die Keimungsfähigkeit der gebildeten Dauerformen ließ sich jedoch nicht erhöhen (siehe Tab. 5.4).

Das veränderte FrzZ D220N-Protein verfügt über die funktionelle *active-site* der N-terminalen Domäne, während die zweite Domäne eine Asparagin-Substitution aufweist, welche eine Modifikation unterbindet. Wäre die Dephosphorylierung dieser Domäne *in vivo*, wie vermutet, das Ergebnis einer Interaktion mit der Phosphatase, so stellt sich die Frage, warum die Integration der Konstrukte mit einem vergleichbaren Aminosäureaustausch (*frzZ* E/N oder N/N) keinen solchen Effekt bewirkt. Es kann allerdings festgestellt werden, dass die Komplementation spezifisch durch *frzZ* D220N ausgelöst wird, da, im Gegensatz zu den Beobachtungen, die für die *frzZ*-Deletionsmutante DZ2Δ*frzZ* gemacht wurden (siehe Punkt 6.2.1.2), hier durch *frzZ* D52N keine Komplementation zu verzeichnen war.

Die funktionelle erste Domäne in FrzZ D220N kann allerdings nicht zur Erklärung dieser Beobachtung beitragen, da auch durch die Integration des doppelt-mutagenisierten Konstrukts *frzZ* N/E eine Komplementation erreicht wurde. In dieser Form steht keiner der phosphorylierbaren Reste von FrzZ für eine Modifikation zur Verfügung. Eine Glutamat-Substitution sollte ursprünglich eine Phosphorylierung dieser Domäne des *response* Regulators simulieren. Dies hatte allerdings in den entsprechenden Analysen im Hintergrund *frzZ*-defekter Zellen keine Auswirkungen auf den Phänotyp des Elternstamms, so dass der Aminosäureaustausch als nicht-funktionell charakterisiert wurde (siehe Abb. 5.6; Punkt 5.1.2.6). Das scheint im Hintergrund des *pph1*-defekten Stamms DZ4314 ähnlich zu sein, da die Integration des *frzZ* E/E-Konstrukts, welches ebenfalls eine Glutamat-Substitution des Aspartatrestes der zweiten Domäne aufweist, nicht zu einer Komplementation der Differenzierungsdefekte führte.

Anhand der vorliegenden Daten können die beobachteten Effekte durch die Integration von *frzZ* D220N und *frzZ* N/E nicht erklärt werden und bedürfen weiterer Untersuchungen. Die im Hefe-System angedeutete Dephosphorylierung der C-terminalen Domäne des *response* Regulators als Produkt einer Interaktion von FrzZ und Pph1, konnte nicht bestätigt werden. Die erzielte Komplementation kann allerdings als spezifisch angesehen werden, da die Defekte einer A-Signal Mutante (DZ2*asgB*; zur Konstruktion siehe Punkt 5.5.4), die aufgrund mangelnder *fruA*-Expression ähnliche phänotypische Eigenschaften wie eine *pph1*-Mutante aufweist, nicht durch die Integration der Konstrukte *frzZ* D220N und *frzZ* N/E behoben werden konnten (siehe Abb. 5.26).

Im Unterschied zu den Analysen im Hintergrund eines *frzZ*-defekten Elternstamms verfügt die *pph1*-Insertionsmutante DZ4314 weiterhin über die intakte, chromosomale Kopie des *response* Regulators. Durch die Integration der *frzZ*-Konstrukte D220N und N/E kommt es folglich zu einer zusätzlichen Akkumulation von FrzZ-Protein. Durch die Kombination mit der Wildtypform könnte in der Phosphatase-Mutante ein FrzZ-*pool* entstanden sein, der den Differenzierungsdefekt der Zellen durch eine artifizielle Änderung der Zellbewegung komplementiert. Dies wird in Wildtypzellen bei Nährstofflimitierung durch das C-Signal ausgelöst und durch das *frz*-Signaltransduktionssystem vermittelt. Durch eine Reduktion der Umkehrfrequenz und die Erhöhung der Gleitgeschwindigkeit wird so zunächst die Aggregation des Schwarms ermöglicht (Jelsbak and Søgaard-Andersen, 2002). Mit höherer Zelldichte steigt der Level des *C-signaling* an, weil sich die Zellen in einem permanenten End-End-Kontakt zueinander befinden. Daraus ergibt sich eine positive Rückkopplung auf die Aggregation (siehe Abb. 6.4, A.). Überschreitet die Konzentration an C-Faktor einen bestimmten Schwellenwert, wird die Sporulation eingeleitet (zur Übersicht Kaiser, 2004).

Beide Prozesse werden nicht direkt durch den C-Faktor vermittelt, sondern bedürfen der C-Signal-abhängigen Aktivierung des *response* Regulators FruA (Ellehaug et al., 1998). Nur die Aktivierung, nicht aber die Expression des *fruA*-Gens ist C-Signal-abhängig (Ellehaug et al., 1998; siehe Abb. 6.4). In Wildtypzellen wird diese Transkription durch frühe Signale der Differenzierung und durch das DevT-Protein positiv beeinflusst (Boysen et al., 2002; Ellehaug et al., 1998). Daraus ergibt sich ein zweiter positiver Regulationsmechanismus: stimuliert durch DevT erhöhte sich die *fruA*-Expression und damit der zelluläre Level an FruA-Protein, welches C-Signal-abhängig aktiviert wird (zur Übersicht Kaiser, 2004; siehe Abb. 6.4, B.). Ein Modell, das die zellulären Verhältnisse unter Differenzierungsbedingungen erklärt, ist in der Abbildung 6.4 dargestellt.

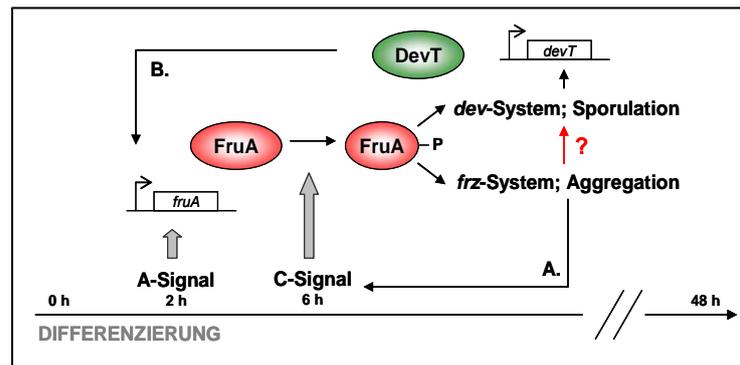


Abbildung 6.4: Modell der Regulation von Aggregation und Sporulation in *M. xanthus* während der Differenzierung. Das A-Signal induziert die Transkription von *fruA* und die Akkumulation des *response* Regulators nach 3 - 6h Nährstoffmangel. Durch das von Zelle zu Zelle weitergegebene C-Signal wird das FruA-Protein durch einen bisher unbekanntem Mechanismus aktiviert. Unterhalb des aktivierten *response* Regulators teilt sich der Signalweg. Die Antwort auf den Nährstoffmangel erfolgt zunächst durch die Änderung der Bewegungsweise der Zellen, vermittelt durch das *frz*-System. Die Zellen gleiten schneller und revertieren weniger, wodurch sie in einen permanenten End-End-Kontakt miteinander geraten und der Level an C-Signal sich weiter erhöht (positive Rückkopplung, A.). Ist ein gewisser Grenzwert erreicht, wird durch aktiviertes FruA-Protein das *dev*-System angeschaltet und die Sporulation eingeleitet. Durch die vermehrte Expression des DevT-Proteins kommt es zu einer positiven Rückkopplung auf die *fruA*-Expression (B.). Der rote Pfeil stellt eine unbestätigte Verbindung zwischen dem *frz*- und dem *dev*-System dar, die zur Kontrolle der zeitlichen Regulation von Aggregation und Differenzierung dienen könnte.

Wie durch *real time* RT-PCR-Experimente im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, war in *pph1*-defekten Zellen die relative Expression des *fruA*-Gens unter Nährstoffmangelbedingungen vermindert (Abb. 5.24). Die zusätzliche Integration von *frzZ* D220N und N/E steigert dessen Expression und die Akkumulation des Genproduktes in diesem Hintergrund, wodurch sich auch die Menge an gebildeten Sporen signifikant erhöht (siehe Abb. 5.24, 5.25). Dies könnte durch die Komplementation einer Verbindung zwischen *frz*- und *dev*-Kaskade zu erklären sein (Abb. 6.4, roter Pfeil), einem Signalweg der in *pph1*-negativen Zellen durch das Fehlen der Phosphatase nicht genutzt werden kann, weil die nötige Modifikation des *response* Regulators fehlt.

Die Frage, warum durch die Integration der komplementierenden *frzZ*-Konstrukte nicht auch die defekte Bildung keimungsfähiger Sporen behoben wurde, kann durch dieses Modell nicht zufriedenstellend beantwortet werden. Möglich wäre, dass Pph1 während der Differenzierung weitere Zielproteine enzymatisch modifiziert, die eine Rolle in der Bildung keimungsfähiger Sporen haben. Das Fehlen dieser Interaktionen könnte nicht durch die vermehrte Akkumulation von FrzZ behoben werden. Die biologische Relevanz der vorgeschlagenen Querverbindung ergibt sich aus der Notwendigkeit, die Abfolge von Aggregation und Sporulation zu regulieren, um das Überleben des Schwarms zu sichern. Der molekulare Mechanismus einer solchen Beeinflussung bleibt zu klären. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst *real time* RT-PCR-Experimente durchgeführt, die den

Level an *devT*-RNA in den komplementierten DZ4314 Stämmen und damit eine (direkte oder indirekte) transkriptionelle Regulation des *dev*-Operons durch das *frz*-System untersuchen sollten. Diese Analysen führten bisher jedoch zu keinem Ergebnis.

6.4.2 Analyse der epistatischen Beziehung von FrzZ und Pph1

Um die epistatische Beziehung von *frzZ* und *pph1* zu analysieren, wurde eine Doppelmutante konstruiert, der sowohl eine funktionelle Kopie des *response* Regulators als auch der Phosphatase fehlt. Liegen beide Gene in derselben Wirkkette direkt untereinander, so wäre zu erwarten, dass der Phänotyp der Doppelmutante dem einer der beiden Einzelmutanten entspricht.

Das Wachstum unter vegetativen Bedingungen, aber auch der Phänotyp differenzierter Zellen der Doppelmutante entspricht eher dem des *frzZ*-defekten Elternstamms als dem der Phosphatase-Mutante (siehe Abb. 5.28, 5.29 und 5.30). Hinsichtlich der Menge gebildeter Sporen zeigte sich für Doppelmutante ein Phänotyp, der keinem der beiden Elternstämme glich. Es wurden 5,6-mal so viele Sporen gezählt, wie für den Wildtypstamm quantifiziert werden konnten (siehe Tab. 5.6). Dieses Ergebnis ist nicht auf einen Bewegungsdefekt der entsprechenden Zellen zurückzuführen, da in *colony expansion* Versuchen keine schwerwiegende Beeinträchtigung der Doppelmutante festgestellt werden konnte (siehe Abb. 5.29). Der Anteil keimungsfähiger Sporen an der Gesamtmenge gebildeter Dauerformen (Sporulationseffizienz) erwies sich dagegen als vergleichbar mit dem Wildtyp und der *frzZ*-Mutante (siehe Tab. 5.6).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *frzZ* in Bezug auf Motilität und Aggregation, aber auch auf Sporulation epistatisch zu *pph1* ist und das entsprechende Genprodukt in der Signaltransduktion oberhalb der Phosphatase liegt. Daraus kann man ableiten, dass die potenzielle Interaktion beider Proteine in der Signaltransduktion durch das *frz*-System keine zentrale, sondern lediglich eine modulierende Rolle spielt, wie bereits mehrfach vermutet.

6.4.3 *In vitro* Interaktionsanalysen von FrzZ und Pph1

Wie bereits ausgeführt, werden im Hefe Zwei-Hybrid System nicht nur biologisch relevante Interaktionen detektiert. Daher ist es nötig, eine in diesem System identifizierte Wechselwirkung auch durch *in vitro* Interaktionsanalysen nachzuweisen. Die Voraussetzung dafür und für die weiterführende biochemische Charakterisierung einer Wechselwirkung von FrzZ und Pph1 war daher die heterologe Überexpression und Aufreinigung der Proteine.

Beide wurden zunächst als N-terminale Fusionsproteine mit einem His₆-tag in *E. coli* überexprimiert. Während der *response* Regulator durch diese Technik bis zur Homogenität gereinigt werden konnte (siehe Abb. 5.31), erwies sich dies für die Phosphatase als schwierig. Die erhaltenen Mengen an His₆-Pph1 waren deutlich geringer, weil eine große Menge an Protein nach dem Zellaufbruch in dem, durch Zentrifugation erhaltenen, Pellet vorlag. Durch die Behandlung mit Xylitol konnte dieses Problem behoben werden (siehe Abb. 5.33). Dadurch wurden aber offensichtlich die Bindungseigenschaften von His₆-Pph1 an das Nickel-haltige Säulenmaterial verändert, so dass eine Elution des Proteins nur noch durch den Einsatz von Imidazol bewirkt werden konnte. Das Reagenz inhibierte jedoch die Aktivität der Phosphatase, so dass sich ein weiterer Reinigungsschritt in Form einer Gelfiltration anschloss. Diese führte zwar zu hoch reinem His₆-Pph1 Protein (siehe Abb. 5.35), war aber mit einem signifikanten Aktivitätsverlust verbunden (siehe Tab. 5.7).

Die mangelnde Phosphorylierung des *response* Regulators FrzZ stellte wahrscheinlich das Kernproblem aller Bestrebungen dar, *in vitro* eine Interaktion mit der PP2C-Phosphatase Pph1 zu zeigen. Aus diesem Grund wurden Versuche unternommen, FrzZ artifiziell zu phosphorylieren (siehe Punkt 5.5.8). Als Phosphat-Donatoren dienten dabei Acetylphosphat und Phosphoramidat, durch deren Nutzung beispielsweise die *response* Regulatoren CheY, NtrC, OmpR, NarL, Spo0F und DctD phosphoryliert werden konnten (Lukat et al., 1992; Yan et al., 1999; Buckler and Stock, 2000). Die Spezifität der *response* Regulatoren gegenüber den Phosphat-Donatoren ist unterschiedlich. So lässt sich das CheY-Protein beispielsweise sehr gut durch Acetylphosphat phosphorylieren, während die Methylesterase CheB nur Phosphoramidat nutzen kann (Buckler and Stock, 2000). Während sich His₆-FrzZ trotz seiner strukturellen Ähnlichkeit zu CheY durch Acetylphosphat nicht phosphorylieren ließ, wurde durch den Einsatz von Phosphoramidat lediglich eine unspezifische Phosphorylierung erreicht (siehe Abb. 5.36, 5.37). Unter Verwendung dieses Phosphat-Donators wurde bereits früher eine unspezifische Phosphorylierung von *response* Regulatoren gezeigt, deren *active-site* Aspartatreste durch die Aminosäure Asparagin substituiert waren (Buckler and Stock, 2000). Diese Beobachtung wurde mit der alternativen Phosphorylierung vorhandener Histidinreste begründet und konnte beispielsweise für das Protein RNase A beobachtet werden, das nicht zur Superfamilie der *response* Regulatoren gehört, aber drei Histidinreste aufweist (Buckler and Stock, 2000). Neben der Wildtypform des FrzZ-Proteins, wurden auch die doppelt-mutagenisierten Varianten His₆-FrzZ E/E und N/E in eine *in vitro* Phosphorylierung durch [³²-P]Phosphoramidat eingesetzt. Da alle drei Proteine über

jeweils einen Histidinrest verfügen, konnte ein solches Ereignis die Differenz der Intensität der beobachteten Signale jedoch nicht erklären, die für His₆-FrzZ E/E und N/E stärker waren als für die Wildtypform des *response* Regulators (siehe Abb. 5.37). Da sich durch die Mutagenese lediglich die Anzahl der Asparagin- und Glutamatreste der Proteinsequenz erhöht, wäre als Erklärung einer Konformationsänderung aufgrund der Aminosäureaustausche in Betracht zu ziehen. Dadurch könnte die Phosphorylierung eines alternativen Restes positiv beeinflusst worden sein. Ähnliche Beobachtungen sind bisher im Zusammenhang mit Phosphoramidat jedoch nicht bekannt.

Durch die Inkubation der Reaktionsansätze mit His₆-Pph1 wurde die radioaktive Markierung von allen FrzZ-Formen entfernt (siehe Abb. 5.37). In biochemischen Analysen konnte für gereinigtes His₆-Pph1 Protein bisher lediglich eine Dephosphorylierung der Serin- oder Threoninreste phosphorylierter Peptide gezeigt werden (Treuner-Lange et al., 2001). Das lässt eine Histidin-Phosphorylierung unwahrscheinlich erscheinen, spricht prinzipiell aber auch gegen eine Dephosphorylierung von Aspartatresten, wie man sie für den *response* Regulator FrzZ als Aktivierungsmechanismus vermuten kann. Da die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der Lokalisierungsstudien, der *in vivo* Komplementation und der Epistasis-Experimente eine solchen Interaktion jedoch untermauern und die Natur der phosphorylierten Reste in FrzZ bisher unbekannt ist, erscheint eine Interaktion von FrzZ und Pph1 weiterhin möglich. Weiterführende *in vitro* Analysen sollten allerdings nur mit den gereinigten, aktiven Proteinen durchgeführt werden. Gegen Ende der vorliegenden Arbeit konnte eine weitere Strategie zur Reinigung der PP2C-Phosphatase entwickelt werden, die mit einer wesentlich höheren Ausbeute an reinem und aktivem Protein verknüpft war. Pph1 wurde darin als N-terminales Fusionprotein mit einem *Strep-tag* versehen exprimiert und gereinigt. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgt ausschließlich durch einen Salz-Gradienten, wodurch die Phosphataseaktivität nicht negativ beeinflusst und bereits nach einem Schritt eine nahezu homogene Aufreinigung erhalten wurde. Auf diese Weise isoliertes *Strep*-Pph1 Protein kam allerdings bei den unter 5.5.7 und 5.5.8 beschriebenen Interaktionsanalysen nicht zum Einsatz.

6.5 *In vitro* Phosphorylierung von FrzZ durch FrzE

Da sich die artifizielle Phosphorylierung des *response* Regulators His₆-FrzZ durch Phosphat-Donatoren als schwierig erwies, wurde die putative Kinase des Proteins, FrzE, überexprimiert und gereinigt, um zur *in vitro* Phosphorylierung von FrzZ eingesetzt zu werden. Zu diesem Zweck wurden das vollständige FrzE-Protein sowie eine C-terminal

verkürzte Version, der die CheY-ähnliche Receiverdomäne fehlt ($\text{FrzE}_{\Delta\text{CheY}}$), als Fusionsproteine mit einem N-Terminalen *Strep-tag* überexprimiert (siehe Abb. 5.40). Durch die Inkubation mit radioaktiv markiertem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ konnte eine Autophosphorylierung beider Formen des gereinigten FrzE-Proteins gezeigt werden (siehe Abb. 5.41, für $\text{FrzE}_{\Delta\text{CheY}}$ Daten nicht gezeigt).

M. xanthus Proteine scheinen aufgrund ihrer Aminosäurekomposition während der heterologen Expression und der Aufreinigung in *E. coli* vermehrt das Ziel proteolytischer Degradation zu sein, so dass dies häufig in Gegenwart starker Proteaseinhibitoren durchgeführt wird (persönliche Mitteilung von D.R. Zusman). So beschrieben beispielsweise McCleary und Zusman ein FrzE-Nebenprodukt, welches C-terminal um 50 Aminosäurereste verkürzt ist (McCleary and Zusman, 1990). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch in der hier durchgeführten Aufreinigung der Kinase gemacht (siehe Abb. 5.41). In einer *Western Blot* Analyse konnte allerdings das N-terminale *Strep*-Fusionspeptid dieser verkürzten Form nicht detektiert werden (siehe Abb. 5.42), so dass eher eine N- als eine C-terminale Verkürzung vermutet werden kann. Letzteres ist jedoch nicht vollständig auszuschließen. Das verkürzte Produkt der Aufreinigung von *Strep*-FrzE zeigt ebenfalls eine Autophosphorylierungsaktivität (siehe Abb. 5.41).

Weder die Inkubation von gereinigtem His_6 -FrzZ-Protein mit der vollständigen Form der Kinase *Strep*-FrzE noch eine Mischung aus *Strep*-FrzE und C-terminal verkürztem *Strep*- $\text{FrzE}_{\Delta\text{CheY}}$ -Protein bewirkten einen Phosphortransfer auf den *response* Regulator (siehe Abb. 5.43, 5.44). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass zu einem Transfer von Phosphorylgruppen von der Kinase auf den *response* Regulator im *frz*-System weitere Proteine benötigt werden. In *E. coli* kann beispielsweise die Autophosphorylierungsaktivität der Histidinkinase CheA durch die Gegenwart eines Rezeptors und des Kopplungsproteins CheW signifikant gesteigert werden (Borkovich and Simon, 1990).

In der Gegenwart des *response* Regulators FrzZ konnte allerdings eine Zunahme der Autokinaseaktivität von FrzE beobachtet werden (siehe Abb. 5.44, 5.45). Dieser Effekt zeigte sich allerdings nur in einer Mischung des C-terminal verkürzten *Strep*- $\text{FrzE}_{\Delta\text{CheY}}$ -Proteins und der vollständigen Form der Kinase *Strep*-FrzE, wobei die radioaktive Markierung stets auf Höhe der 86 kDa Markerbande lokalisierte (siehe Abb. 5.44, 5.45). Dies entspricht der Größe des C-terminal verkürzten Proteins *Strep*- $\text{FrzE}_{\Delta\text{CheY}}$ sowie des potenziellen Abbauprodukts von *Strep*-FrzE (siehe Abb. 5.43). Es stellt sich die Frage, ob es trotz der Abwesenheit von Rezeptor- und Kopplungsprotein des *frz*-Systems zu einer Wechselwirkung mit dem *response* Regulators kommt, die eine gesteigerte Autophosphorylierungsaktivität der Kinase zur Folge hat. Es bleibt unklar, ob ein

Phosphotransfer auf das FrzZ-Protein dabei nicht stattfindet oder aufgrund seiner Kurzlebigkeit nicht zu visualisieren ist.

Die potenzielle Wechselwirkung könnte dadurch zu erklären sein, dass aktive Kinasen als Homodimere vorliegen, in denen ein Monomer die Phosphorylierung des jeweils anderen katalysiert. Für die myxobakterielle Hybridkinase FrzE konnte *in vitro* ein Phosphotransfer von der isolierten, CheA-ähnlichen Kinasedomäne auf den CheY-homologen Teil des Proteins gezeigt werden (Acuna et al., 1994). Diese intramolekulare Reaktion wurde bereits früher als Aktivierungsmechanismus der Kinase postuliert, da biochemische Analysen die stabile Phosphorylierung eines Aspartatrestes implizierten (McCleary and Zusman, 1990). Handelt es sich bei der verkürzten Form des Proteins *Strep*-FrzE tatsächlich um ein N-terminal degradiertes Produkt (um ca. 80 AS), wäre die putative Phosphorylierungsstelle, der konservierte Histidinrest an Position 49 der Aminosäuresequenz, in diesem Protein nicht präsent. Der CheY-Deletion *Strep*-FrzE $_{\Delta\text{CheY}}$ fehlt dagegen der Aspartatrest an Position 709. In einer Mischung beider Proteine könnten sich theoretisch drei Sorten von Dimeren bilden. Nur in Heterodimeren, bestehend aus je einer der unvollständigen Formen der Kinase FrzE, dem potenziellen, N-terminal verkürzten Abbauprodukt und dem Protein *Strep*-FrzE $_{\Delta\text{CheY}}$, wären sowohl der Histidinrest H49 als auch der Aspartatrest D709 präsent, so dass eine intramolekulare Transphosphorylierung stattfinden könnte.

Um einen Phosphotransfer auf FrzZ zu erreichen, erscheint es sinnvoll, die fehlenden Komponenten eines Rezeptor-Signal-Komplexes zu ergänzen. Da sich die Aufreinigung der MCP- und CheW-homologen myxobakteriellen Proteine in einem begrenzten Zeitraum nicht verwirklichen lässt, sollten weiterführende Analysen neben den gereinigten Proteinen FrzE und FrzZ die präparierte partikuläre oder Membranfraktion eines *M. xanthus* Zellextrakts enthalten. So könnten die benötigten Komponenten aus dem zellulären Milieu rekrutiert werden, um *in vitro* einen Phosphotransfer auf den *response* Regulator zu erreichen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Acuna, G., Shi, W., Trudeau, K. and Zusman, D.R. (1995) The 'CheA' and 'CheY' domains of *Myxococcus xanthus* FrzE function independently in vitro as an autokinase and a phosphate acceptor respectively. *FEBS letters* **358**: 31-33.
- Alley, M.R., Maddock, J.R. and Shapiro, L. (1992) Polar localization of a bacterial chemoreceptor. *Genes Dev.* **6**: 825-836.
- Alon, U., Camarena, L., Surette, M.G., Aguera y Arcas, B., Liu, Y., Leibler, S. and Stock, J.B. (1998) Response regulator output in bacterial chemotaxis. *EMBO J.* **17**: 4238-4248.
- Andreotti, A.H. (2003) Native state proline isomerization: an intrinsic molecular switch. *Biochemistry* **42**: 9515-9524.
- Aravind, L. and Koonin E.V. (1999) DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in archaea. *Nucleic Acid Res.* **27**: 4658-4670.
- Armitage, J.P. (2003) Taxing questions in development. *Trends Microbiol.* **11**: 239-242.
- Arnold, J.W. and Shimkets, L.J. (1988) Cell surface properties correlated with cohesion in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **170**: 5771-5777.
- Balbach, J. and Schmid, F.X (2000) Prolyl isomerisation and its catalysis in protein folding. In: Mechanisms of Protein Folding, eds.: Pain, R.H., Oxford University Press, Oxford, pp. 212-237.
- Baum, J., Papenfuss, A.T., Baum, B., Speed, T.P. and Cowman, A.F. (2006) Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 621-628.
- Behmlander, R.M. and Dworkin, M. (1991) Extracellular fibrils and contact-mediated interactions in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **173**: 7810-7821.
- Behmlander, R.M. and Dworkin, M. (1994) Biochemical and structural analysis of the extracellular matrix fibrils of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **176**: 6295-6303.
- Bellenger, K., Ma, X., Shi, W. and Yang, Z. (2002) A CheW homologue is required for *Myxococcus xanthus* fruiting body development, social gliding motility, and fibril biogenesis. *J. Bacteriol.* **184**: 5654-5660.
- Bhandari, P. and Gowrishankar, J. (1997) An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as an inducer. *J. Bacteriol.* **179**: 4403-4406.
- Bijlsma, J.J. and Groisman, E.A. (2003) Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. *Trends Microbiol.* **11**: 359-366.
- Bilwes, A.M., Alex, L.A., Crane, B.R. and Simon, M.I. (1999) Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* **96**: 131-141.
- Birck, C., Mourey, L., Gouet, P., Fabry, B., Schumacher, J., Rousseau, P., Kanh, D. and Samama, J.-P. (1999) Conformational changes induced by phosphorylation of the FixJ receiver domain. *Structure* **7**: 1505-1515.

- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Black, W.P. and Yang, Z. (2004) *Myxococcus xanthus* homologs DifD and DifG negatively regulate fibril polysaccharide production. *J. Bacteriol.* **186**: 1001-1008.
- Blackhart, B.D. and Zusman, D.R. (1985a) Cloning and complementation analysis of the "Frizzy" genes of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Gen. Genet.* **198**: 243-254.
- Blackhart, B.D. and Zusman, D.R. (1985b) "Frizzy" genes of *Myxococcus xanthus* are involved in control of frequency of reversal of gliding motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 8767-8770.
- Borkovich, K.A. and Simon, M.I. (1990) The dynamics of protein phosphorylation in bacterial chemotaxis. *Cell* **63**: 1339-1348.
- Bowden, M.G and Kaplan, H.B. (1998) The *Myxococcus xanthus* lipopolysaccharide O-antigen is required for social motility and multicellular development. *Mol. Microbiol.* **30**: 275-284.
- Boysen, A, Ellehaug, E., Julien, B. and Søgaard-Andersen, L. (2002) The DevT protein stimulates synthesis of FruA, a signal transduction protein required for fruiting body morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **184**: 1540-1546.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brazin, K.N., Mallis, R.J., Fulton, D.B. and Andreotti, A.H. (2002) Regulation of the tyrosine kinase Itk by the peptidyl-prolyl isomerase cyclophilin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 1899-1904.
- Buckler, D.R. and Stock, A.M. (2000) Synthesis of [³²P]Phosphoramidate for use as a low molecular weight phosphor donor reagent. *Analyt. Biochem.* **283**: 222-227.
- Bustamante, V.H., Martínez-Flores, I., Vlamakis, H.C. and Zusman D.R. (2004) Analysis of the Frz signal transduction system of *Myxococcus xanthus* shows importance of the conserved C-terminal region of the cytoplasmic chemoreceptor FrzCD in sensing signals. *Mol. Microbiol.* **53**: 1501-1513.
- Campos, J.M. and Zusman, D.R. (1975) Regulation of development in *Myxococcus xanthus*: effect of 3' : 5'-cyclic AMP, ADP and nutrition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 518-522.
- Cashin, P., Goldsack, L., Hall, D. and O'Toole R. (2006) Contrasting the transduction mechanism in bacterial and eukaryotic gene transcription. *FEMS Microbiol. letters* **261**: 155-164.
- Chiang, P. and Burrows, L.L. (2003) Biofilm formation by hyperpilated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **185**: 2374-2378.
- Cho, H.S., Lee, S.Y., Yan, D., Pan, X., Parkinson, J.S., Kustu, S., Wemmer, D.E. and Pelton, J.G. (2000) NMR structure of activated CheY. *J. Mol. Biol.* **297**: 543-551.

- D'Andrea, L.D. and Regan, L. (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem. Sci.* **28**: 655-662.
- Djordjevic, S., Goudreau, P.N., Xu, Q., Stock, A.M. and West, A.H. (1998) Structural basis for methyltransferase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 1381-1386.
- Downard, J., Ramaswamy, S.V. and Kil, K.-S. (1993) Identification of *esg*, a genetic locus involved in cell-cell signalling during *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **175**: 7762-7770.
- Du, S., Bird, T.H. and Bauer, C.E. (1998) DNA-binding characteristics of RegA. A constitutively active anaerobic activator of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Biol. Chem.* **273**: 18509-18513.
- Dutta, R., Qin, L. and Inouye, M. (1999) Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol. Microbiol.* **34**: 633-640.
- Dworkin, M. (1996) Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol. Rev.* **60**: 70-102.
- Edqvist, P.J., Bröms, J.E., Betts, H.J., Forsberg, A., Pallen., M.J. and Francis, M.F. (2005) Tetratricopeptide repeats in the type III secretion chaperon, LcrH: their role in substrate binding and secretion. *Mol. Microbiol.* **59**: 31-44.
- Eleaume, H. and Jabbouri, S. (2004) Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* gene expression during in vitro growth. *J. Microbiol. Methods* **59**: 363-370.
- Ellehaug, E., Nørregaard-Madsen, M. and Søgaard-Andersen, L. (1998) The FruA signal transduction protein provides a checkpoint for the temporal co-ordination of intercellular signals in *Myxococcus xanthus* in development. *Mol. Microbiol.* **30**: 807-817.
- Fields, S., and Sternglanz, R. (1994) The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends in Genet.* **10**: 286-292.
- Foussard, M., Cabantous, S., Pédelacq, J.-D., Guillet, V., Tranier, S., Mourey, L., Birck, C. and Samama, J.-P. (2001) The molecular puzzle of two-component signalling cascades. *Microbes and Infection* **3**: 417-424.
- Francis, N.R., Wolanin, P.M., Stock, J.B., Derosier, D.J. and Thomas, D.R. (2004) Three-dimensional structure and organization of a receptor/signaling complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 17480-17485.
- Gerth, K., Bedorf, N., Irschik, H., Höfle, G. and Reichenbach, H. (1994) The soraphens: a family of novel antifungal compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria), I., Soraphen A1 alpha: fermentation, isolation, biological properties. *J. Antibiot.* **47**: 23-31.
- Gerth, K., Bedorf, N., Irschik, H., Höfle, G. and Reichenbach, H. (1996) Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **49**: 560-563.

- Gestwicki, J.E., Lamanna, A.C., Harshey, R.M., McCarter, L.L., Kiessling, L.L. and Adler, J. (2000) Evolutionary conservation of methyl-accepting chemotaxis protein location in Bacteria and Archaea. *J. Bacteriol.* **182**: 6499-6502.
- Gevers, D., Vandepoele, K., Simillion, C. and Van de Peer, Y. (2004) Gene duplication and biased function of paralogs in bacterial genomes. *Trends Microbiol.* **12**: 148-154.
- Gietz, R.D. and Woods, R.A. (2002) Transformation of yeast by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology* **350**: 87-96.
- Gitt, M.A., Wang, F.F. and Doi, R.H. (1985) A strong sequence homology exists between the major RNA polymerase sigma factors of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **260**: 7178-7185.
- Goldman, B.S., Nierman, W.C., Kaiser, D., Slater, S.C., Durkin, A.S., Eisen, J.A, Ronning, C.M., Barbazuk, W.B., Blanchard, M., Field, C., Halling, C., Hinkle, G., Iartchuk, O., Kim, H.S., Mackenzie, C., Madupu, R., Miller, N., Shvartsbeyn, A., Sullivan, S.A., Vaudin, M., Wiegand, R. and Kaplan, H. (2006) Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 15200-15202.
- Gouet, P., Fabry, B., Guillet, V., Birck, C., Mourey, L., Kahn, D. and Samama, J.-P. (1999) Structural transitions in the FixJ receiver domain. *Structure* **7**: 1517-1526.
- Grefen, C. and Harter, K. (2004) Plant Two-component systems: principles, functions, complexity and cross-talk. *Planta* **219**: 733-742.
- Gregor, J., Zeller, T., Balzer, A., Haberzettl, K and Klug, G. (2007) Bacterial regulatory networks include direct contact of response regulator proteins: interaction of RegA and NtrX in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* (in press).
- Gröger, C. (2002) Interaktionsanalyse des *response* Regulators FrzZ mit der Proteinphosphatase Pph1 aus *Myxococcus xanthus*. Diplomarbeit.
- Hagen, D.C., Bretscher, A.P. and Kaiser, D. (1978) Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* **64**: 284-296.
- Halkides, C.J., McEvoy, M.M., Casper, E., Matsumura, P., Volz, K. and Dahlquist, F.W. (2000) The 1.9 Å resolution crystal structure of phospho-CheY, an analogue of the active form of the response regulator CheY. *Biochemistry* **39**: 5280-5286.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hanlon, W.A., Inouye, M. and Inouye, S. (1997) Pkn9, a Ser/Thr protein kinase involved in the development of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **23**: 459-471.
- Harris, B.Z., Kaiser, D. and Singer, M. (1998) The guanosine nucleotide (p)ppGpp initiates development and A-Factor production in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev.* **12**: 1022-1035.
- Harrison, D.M., Skidmore, J., Armitage, J.P. and Maddock, J.R. (1999) Localization and environmental regulation of MCP-like proteins in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* **31**: 885-892.

- Hess, J.F., Oosawa, K., Kaplan, N. und Simon, M.I. (1988) Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. *Cell* **53**: 79-87.
- Hillesland, K.L. and Velicer, G.J. (2005) Resource level affects relative performance of the two motility systems of *Myxococcus xanthus*. *Microbial Ecology* **49**: 558-566.
- Hoch, J.A. (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 165-170.
- Hodgkin, J. and Kaiser, D. (1977) Cell-to-cell stimulation of movement in nonmotile mutants of *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 2938-2942.
- Hodgkin, J. and Kaiser, D. (1979a) Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (*myxobacterales*): genes controlling movement of single cells. *Mol. Gen. Genet.* **171**: 167-176.
- Hodgkin, J. and Kaiser, D. (1979b) Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (*myxobacterales*): two gene systems control movement. *Mol. Gen. Genet.* **171**: 177-191.
- Hoiczyk, E. and Baumeister, W. (1998) The junctional pore complex, a prokaryotic secretion organelle, is the molecular motor underlying gliding motility in cyanobacteria. *Curr. Biol.* **8**: 1161-1168.
- Inouye, M., Inouye, S. and Zusman, D. (1979) Biosynthesis and self-assembly of protein S, a developmental-specific protein of *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 209-213.
- James, P., Halladay, J. and Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436.
- Jelsbak, L. and Søgaard-Andersen, L. (2002) Pattern formation by a cell surface-associated morphogen in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 2032-2037.
- Kaiser, D. (1979) Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 5952-5956.
- Kaiser, D. (2004) Signaling in myxobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**: 75-98.
- Kearns, D.B. and Shimkets, L.J. (2001) Lipid chemotaxis and signal transduction in *Myxococcus xanthus*. *Trends Microbiol.* **9**: 126-129.
- Kennelly, P.J. and Potts, M. (1999) Life among the primitives: O-phosphatases in prokaryotes. *Front. Biosci.* **4**: 372-385.
- Kentner, D. and Sourjik, V. (2006) Spatial organization of the bacterial chemotaxis system. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 619-624.
- Kim, S.B., Shin, B.S., Choi, S.K., Kim, C.K., and Park, S.H. (2001) Involvement of acetyl phosphate in the *in vivo* activation of the response regulator ComA in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. letters* **195**: 179-183.

- Kirby, J.R. and Zusman, D.R. (2003) Chemosensory regulation of developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 2008-2013.
- Klausen, M., Aas-Jørgensen, A., Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. (2003) Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol. Microbiol.* **50**: 61-68.
- Klose, K.E., Weiss, D.S. and Kustu, S. (1993) Glutamate at the site of phosphorylation of nitrogen-regulatory protein NtrC mimics aspartyl-phosphate and activates the protein. *J. Mol. Biol.* **232**: 67-78.
- Kördel, J., Drakenberg, T., Forsén, S. and Thulin, E. (1990) Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase does not affect the Pro-43 *cis-trans* isomerization rate in folded calbindin D_{9k}. *FEBS letters* **263**: 27-30.
- Koretke, K.K., Lupas, A.N., Warren, P.V., Rosenberg, M. and Brown, J.R. (2000) Evolution of two-component signal transduction. *Mol. Biol. Evol.* **17**: 1956-1970.
- Kroos, L. and Kaiser, D. (1987) Expression of many developmentally regulated genes in *Myxococcus* depends on a sequence of cell interactions. *Genes Dev.* **1**: 840-854.
- Kroos, L., Kuspa, A. and Kaiser, D. (1986) A global analysis of developmentally regulated genes in *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* **117**: 252-266.
- Kuner, J. M. and Kaiser, D. (1982). Fruiting body morphogenesis in submerged cultures of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **151**: 458-461.
- Kuspa, A., Kroos, L. and Kaiser, D. (1986) Intercellular signalling is required for developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* **117**: 267-276.
- Laemmli, U.K (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lamb, J.R., Michaud, W.A., Sikorski, R.S. and Hieter, P.A (1994) Cdc16p, Cdc23p and Cdc27p form a complex essential for mitosis. *EMBO J.* **13**: 4312-4328.
- LaRossa, R., Kuner, J., Hagen, D., Manoil, C. and Kaiser D. (1983) Developmental cell interactions in *Myxococcus*: analysis of mutants. *J. Bacteriol.* **153**: 1394-1404.
- Lee, B.-U., Lee, K., Mendez, J. and Shimkets, L.J. (1995) A tactile sensory system of *Myxococcus xanthus* involves an extracellular NAD(P)⁺-containing protein. *Genes Dev.* **9**: 2964-2973.
- Lee, S.-Y., Cho, H.S., Pelton, J.G., Yan, D., Henderson, R.K., King, D.S., Huang, L.-S., Kustu, S., Berry, E.A. and Wemmer, D.E. (2001a) Crystal structure of an activated response regulator bound to its target. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 52-56.
- Lee, S.-Y., Cho, H.S., Pelton, J.G., Yan, D., Berry, E.A. and Wemmer, D.E. (2001b) Crystal structure of activated CheY; comparison with other activated response regulators. *J. Biol. Chem.* **276**: 16425-16431.
- Levit, M.N. and Stock, J.B. (2002) Receptor methylation controls the magnitude of stimulus-response coupling in bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **277**: 36760-36765.

- Lewis, R.J., Brannigan, J.A., Muchová, K. Barák, I. and Wilkinson, A.J. (1999) Phosphorylated aspartat in the structure of a response regulator protein. *J. Mol. Biol.* **294**: 9-15.
- Lewis, R.J., Muchová, K., Brannigan, J.A., Barák, I., Leonard, G. and Wilkinson, A.J. (2000) Domain swapping in the sporulation response regulator Spo0A. *J. Mol. Biol.* **297**: 757-770.
- Li, J., Swanson, R.V., Simon, M.I. and Weis, R.M. (1995) Response regulators CheB and CheY exhibit competitive binding to the kinase CheA. *Biochemistry* **34**: 14626-14636.
- Li, S.F. and Shimkets, L.J. (1988) Site-specific integration and expression of a developmental promoter in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **170**: 5552-5556.
- Li, Y., Bustamante, V.H., Lux, R., Zusman, D.R. and Shi, W. (2005) Divergent regulatory pathways control A and S motility in *Myxococcus xanthus* through FrzE, a CheA-CheY fusion protein. *J. Bacteriol.* **187**: 1716-1723.
- Li, Y., Sun, H., Lu, A., Lux, R., Zusman, D.R. and Shi, W. (2003) Extracellular polysaccharides mediate pilus retraction during social motility of *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 5443-5448.
- Lobedanz, S. and Søgaard-Andersen, L. (2003) Identification of the C-signal, a contact-dependent morphogen coordinating multiple developmental responses in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev.* **17**: 2151-2161.
- Ludwig, W., Schleifer, H.H., Reichenbach, H. and Stackebrandt, E. (1983). A phylogenetic analysis of the myxobacteria *Myxococcus fulvus*, *Stigmatella aurantiaca*, *Cystobacter fuscus*, *Sorangium cellulosum* and *Nannocystis exedens*. *Arch. Microbiol.* **135**: 58-62.
- Lukat, G.S., Lee, B.H., Mottonen, J.M., Stock, A.M. und Stock, J.B. (1991) Roles of the highly conserved aspartate and lysine residues in the response regulator of bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **266**: 8348-8354.
- Lukat, G.S., McCleary, W.R., Stock, A.M. and Stock, J.B. (1992) Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 718-722.
- Lukat, G.S., Stock, A.M. und Stock, J.B. (1990) Divalent metal ion binding to the CheY protein and its significance to phosphotransfer in bacterial chemotaxis. *Biochemistry* **29**: 5436-5442.
- Mackintosh, C. (1993) Assay and purification of (serine/threonine) phosphatases. In *Protein Phosphorylation. A practical Approach*, ed. Hardie, H.G.. Oxford: Oxford University Press, pp. 197-230.
- Maddock, J.R. and Shapiro, L. (1993) Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science* **259**: 1717-1723.
- Madhusudan, Zapf, J., Whiteley, J.M., Hoch, J.A., Xoung, N.H. and Varughese, K.I. (1996) Crystal structure of a phosphatase-resistant mutant of Sporulation response regulator Spo0F from *Bacillus subtilis*. *Structure* **4**: 679-690.

- Magrini, V., Creighton, C. and Youderian, P. (1999) Site-specific recombination of the temperate *Myxococcus xanthus* phage Mx8: Genetic elements required for integration. *J. Bacteriol.* **181**: 4050-4061.
- Margolin, W. (2000) Green fluorescent protein as a reporter for macromolecular localization in bacterial cells. *Methods* **20**: 62-72.
- Matsuzaki, M., Yamaguchi, Y., Masiu, H. and Satho, T. (1996) Stabilization by GroEL, a molecular chaperone, and a periplasmic fraction, as well as refolding in the presence of dithiothreitol, of acid-unfolded dimethyl sulfoxid reductase, a periplasmic protein of *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. *Plant Cell Physiol.* **37**: 333-339.
- Mattick, J.S. (2002) Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 289-314.
- McBride, M.J. and Zusman, D.R. (1993) FrzCD, a methyl-accepting taxis protein from *Myxococcus xanthus*, shows modulated methylation during fruiting body formation. *J. Bacteriol.* **175**: 4936-4940.
- McBride, M.J., Hartzell, P. and Zusman D.R. (1993) Motility and tactic behavior of *Myxococcus xanthus*. In: *Myxobacteria II*, eds.: M. Dworkin and D. Kaiser. Washington, DC: *Am. Soc. Microbiol.*, pp. 285-305.
- McBride, M.J., Köhler, T. and Zusman, D.R. (1992) Methylation of FrzCD, a methyl-accepting taxis protein of *Myxococcus xanthus*, is correlated with factors affecting cell behaviour. *J. Bacteriol.* **174**: 4246-4257.
- McBride, M.J., Weinberg, R.A. and Zusman, D.R. (1989) "Fizzy" aggregation genes of the gliding bacterium *Myxococcus xanthus* show sequence similarities to the chemotaxis genes of enteric bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 424-428.
- McCleary, W.R. and Stock, J.B. (1994) Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J. Biol. Chem.* **269**: 31567-31572.
- McCleary, W.R. and Zusman, D.R. (1990a) FrzE of *Myxococcus xanthus* is homologous to both CheA and CheY of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5898-5902.
- McCleary, W.R. and Zusman, D.R. (1990b) Purification and characterization of the *Myxococcus xanthus* FrzE protein shows that it has autophosphorylation activity. *J. Bacteriol.* **172**: 6661-6668.
- McCleary, W.R., McBride, M.J. and Zusman, D.R. (1990) Developmental sensory transduction in *Myxococcus xanthus* involves methylation and demethylation of FrzCD. *J. Bacteriol.* **172**: 4877-4887.
- McFarlane, S.A. and Merrick, M. (1985) The nucleotide sequence of the nitrogen regulation gene *ntrB* and the *glnA-ntrBC* intergenic region of *Klebsiella pneumoniae*. *Nucleic Acid Res.* **13**: 7591-7606 .
- Mertz, A., Sheetz, M. and So, M. (2000) Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* **407**: 98-102.

- Mignon, T., Merlie, J.P. and Zusman, D.R (2005) Regulated pole-to-pole oscillation of a gliding motility protein. *Science* **310**: 855-857.
- Mignon, T., Shaevitz, J.W., Hartzell, P.L. and Zusman, D.R. (2007) Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility. *Science* **315**: 853-856.
- Mizuno, T. (1997) Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res.* **4**: 161-168.
- Morrison, C.E. and Zusman, D.R. (1979) *Myxococcus xanthus* mutants with temperature-sensitive, stage-specific defects: evidence for independent pathways in development. *J. Bacteriol.* **140**: 1036-1042.
- Munoz-Dorado, J., Inouye, S. and Inouye, E. (1991) A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development in *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell* **67**: 995-1006.
- Nariya, H. and Inouye, S. (2003) An effective sporulation of *Myxococcus xanthus* requires glycogen consumption via Pkn4-activated 6-Phosphofructose kinase. *Mol. Microbiol.* **49**: 517-528.
- Needham, J.V., Chen, T.Y. und Falke, J.J. (1993) Novel ion specificity of a carboxylate cluster Mg(II) binding site: strong charge selectivity and weak size selectivity. *Biochemistry* **32**: 3363-3367.
- Neumann, B., Pospiech, A. und Schairer, H.U. (1992) Size and stability of the genomes of the myxobacteria *Stigmatella aurantiaca* and *Stigmatella erecta*. *J. Bacteriol.* **174**: 6307-6310.
- Nudleman, E. and Kaiser, D. (2004) Pulling together with type IV pili. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 52-62.
- Nunn, D., Bergmann, S. and Lory, S. (1990) Products of three accessory genes, *pilB*, *pilC* and *pilD* are required for biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pili. *J. Bacteriol.* **172**: 2911-2919.
- Oelmüller, U., Krüger, N., Steinbüchel, A. and Friedrich, C. (1990) Isolation of prokaryotic RNA and detection of soecific mRNA with biotinylated probes. *J. Microbiol. Methods.* **11**: 73-81.
- Ogawa, M. Fujitani. S., Mao, X., Inouye, S. and Komano, T. (1996) FruA, a putative transcription factor essential for the development of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **22**: 757-767.
- Pallen, M.J., Francis, M.S., and Futterer, K. (2003) Tetratricopeptide-like repeats in type-III-secretion chaperones and regulators. *FEMS Microbiol. letters* **223**: 53-60.
- Panasenko, S.M., Jann, B. and Jann, K. (1989) Novel change in the carbohydrate portion of *Myxococcus xanthus* by lipopolysaccharide during development. *J. Bacteriol.* **171**: 1835-1840.

- Parchaliuk, D.L., Kirkpatrick, R.D., Agatep, R., Simon, S.L and Gietz, R.D. (1999) Yeast two-hybrid system screening: Part A-screen preparation. *Technical Tips Online* **1**: 66:PO1616 (<http://research.bmn.com/tto>).
- Parkinson, J.S. and Kofoid, E.C. (1992) Communication modules in bacterial signalling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 71-112.
- Parsot, C., Hamiaux, C. and Page, A.L. (2003) The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 7-14.
- Perraud, A.L., Weiss, V. and Gross, R. (1999) Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol.* **7**: 115-120.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**: 2001-2007.
- Pingoud, A. and Urbanke, C. (1997) *Arbeitsmethoden der Biochemie*, Walter de Gruyter Co., D-10785 Berlin.
- Plamann, L., Davis, J.M., Cantwell, B. and Mayor, J. (1994) Evidence that *asgB* encodes a DNA-binding protein essential for growth and development of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **176**: 2013-2020.
- Plamann, L., Kuspa, A. and Kaiser, D. (1992) Proteins that rescue A-signaling-defective mutants of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **174**: 3311-3318.
- Porter, S.L., Wadhams, G.H., Martin, A.C., Byles, E.D., Lancaster, D.E and Armitage, J.P. (2006) The CheYs of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Biol. Chem.* **43**: 32694-32704.
- Pratt, W.B., and Toft, D.O. (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* **18**: 306–360.
- Radford, S.E., Laue, E.D., Perham, R.N., Martin, S.R. and Appella, E. (1989) Conformational flexibility and folding of synthetic peptides representing an interdomain segment of polypeptide chain in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**: 767-775.
- Reichenbach, H. (1999) The ecology of the myxobacteria. *Environm. Microbiol.* **1**: 15-21.
- Reichenbach, R. and Dworkin, M. (1992) *The order Myxobacterales*. Springer-Verlag KG, Berlin.
- Robinson, V.L., Buckler, D.R. und Stock, A.M. (2000) A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 626-633.
- Rodgers, K.R., Lukat-Rodgers, G.S. and Barron, J.A. (1996) Structural basis for legend discrimination and response initiation in the heme-based oxygen sensor FixL. *Biochemistry* **35**: 9539-9548.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

- Scharf, B.E., Fahrner, K.A., Turner, L. and Berg, H.C. (1998) Control of direction of flagellar rotation in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 201-206.
- Scheuffler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U. and Moarefi, I. (2000) Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**: 199-210.
- Schleif, R. (2003) AraC protein: a love-hate relationship. *Bioassays* **25**: 274-282.
- Shi, L. (2004) Manganese-dependent protein o-phosphatases in prokaryotes and their biological functions. *Frontiers in Bioscience* **9**: 1382–1397.
- Shi, W. and Zusman, D.R. (1993) The two motility systems of *Myxococcus xanthus* show different selective advantages on various surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 3378-3382.
- Shi, W., Köhler, T. and Zusman, D.R. (1993) Chemotaxis plays a role in the social behaviour of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **9**: 601-611.
- Shimkets, L.J. (1999) Intercellular signaling during fruiting-body development of *Myxococcus xanthus*. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 525-49.
- Shimkets, L.J. and Asher, S.J. (1988) Use of recombinant techniques to examine the structure of the *csgA* locus of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Gen. Genet.* **211**: 63-71.
- Shimkets, L.J., Dworkin, M. and Reichenbach, H. (2006) *The Myxobacteria*, in *The Prokaryotes*, Vol. 7, Springer, New York, ed. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H. and Stackebrandt E., pp 31-115.
- Sikorski, R.S., Boguski, M.S., Goebel, M. and Hieter, P.A. (1990) A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell* **60**: 307-317.
- Silverman, M. and Simon, M. (1977) Chemotaxis in *Escherichia coli*: methylation of che gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 3317-3321.
- Silversmith, R.E., Guanga, G.P., Betts, L., Chu, C., Zhao, R. und Bourret, R.B. (2003) CheZ-mediated dephosphorylation of the *Escherichia coli* chemotaxis response regulator CheY: role for CheY glutamate 89. *J. Bacteriol.* **185**: 1495-1502.
- Simms, S.A., Keane, M.G. and Stock, J.B. (1985) Multiple forms of the CheB methylesterase in bacterial chemosensing. *J. Biol. Chem.* **260**: 10161-10168.
- Skerker, J.M. and Berg, H.C. (2001) Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 6901-6904.
- Smith, R.F. and King, K.Y. (1995) Identification of a eukaryotic-like protein kinase gene in Archaeobacteria. *Protein Sci.* **4**: 126-129.
- Søgaard-Andersen, L. and Kaiser, D. (1996) C-factor, a cell-surface associated intercellular signalling protein, stimulates the cytoplasmic Frz signal transduction system in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2675-2679.

- Søgaard-Andersen, L., Slack, F.J., Kimsey, H. and Kaiser, D. (1996) Intercellular C-signaling in *Myxococcus xanthus* involves a branched signal transduction pathway. *Genes Dev.* **10**: 740-754.
- Solà, M., Gomis-Ruth, F.X., Serrano, L., González, A. and Coll, M. (1999) Three-dimensional crystal structure of the transcription factor PhoB receiver domain. *J. Mol. Biol.* **285**: 675-687.
- Sourjik, V. and Berg, H.C. (2000) Localization of components of the chemotaxis machinery of *Escherichia coli* using fluorescent protein fusions. *Mol. Microbiol.* **37**: 740-751.
- Sourjik, V. and Schmitt, R. (1998) Phosphotransfer between CheA, CheY1, and CheY2 in the chemotaxis signal transduction chain of *Rhizobium meliloti*. *Biochemistry* **37**: 2327-2335.
- Stephenson, K. and Hoch, J.A. (2002) Evolution of signalling in the sporulation phosphorelay. *Mol. Microbiol.* **46**: 297-304.
- Stock, A.M., Chen, T., Welsh, D. and Stock, J.B. (1988) CheA-Protein, a central regulator of bacterial chemotaxis, belongs to a family of proteins that control gene expression in response to changing environmental conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 1403-1407.
- Stock, A.M., Mottonen, J.M., Stock, J.B. and Schutt, C.E. (1989) Three-dimensional structure of CheY, the response regulator of bacterial chemotaxis. *Nature* **337**: 745-749.
- Stock, A.M., Robinson, V.L. and Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 183-215.
- Stock, J.B. (1999) Signal transduction: Gyating protein kinases. *Curr. Biol.* **9**: R364-367
- Storch, K.F., Rudolph, J. and Oesterhelt, D. (1999) Car: a cytoplasmic sensor responsible for arginine chemotaxis in the archaeon *Halobacterium salinarium*. *EMBO J.* **18**: 1146-1158.
- Studier, F.W. and Moffat, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.
- Sun, H., Zusman, D.R. and Shi, W. (2000) Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is the motility apparatus controlled by the *frz* chemosensory system. *Curr. Biol.* **10**: 1143-1146.
- Swanson, R.V., Lowry, D.F., Matsumura, P. and McEvoy, M.M. (1995) Localized perturbations in CheY structure monitored by NMR identify a CheA binding interface. *Nat. Struct. Biol.* **2**: 906-910.
- Szurmant, H. and Ordal, G.W. (2004) Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 301-319.
- Tanaka, T., Saha, S.K., Tnonmori, C., Ishima, R., Liu, D., Tong, K.I., Park, H., Dutta, R., Qin, L., Swindells, M.B., Yamazaki, T., Ono, A.M., Kainosho, M., Inouye, M. and Ikura, M. (1998) NMR structure of the histidine kinase domain of *E. coli* osmosensor EnvZ. *Nature* **396**: 88-92.

- Taylor, B.L. and Zhulin, I.B. (1999) PAS Domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 479-506.
- Thaxter, R. (1892) Contribution from the Cryptogamic Laboratory of Harvard University, XVIII. On the Myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes. *Bot. Gaz.* **14**: 389-406.
- Thomasson, B., Link, J., Stassinopoulos, A.G., Burke, N., Plamann, L. and Hartzell, P.L. (2002) MglA, a small GTPase, interacts with a tyrosine kinase to control type IV pili-mediated motility and development of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **46**: 1399-1413.
- Treuner-Lange, A., Ward, M.J. and Zusman, D.R. (2001) Pph1 from *Myxococcus xanthus* is a protein phosphatase involved in vegetative growth and development. *Mol. Microbiol.* **40**: 126-140.
- Trudeau, K.G., Ward, M.J. and Zusman, D.R. (1996) Identification and characterization of FrzZ, a novel response regulator necessary for swarming and fruiting-body formation in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **20**: 645-655.
- Tucker, C.L., Gera, J.F. und Uetz, P. (2001) Towards an understanding of complex protein networks. *Trends Cell. Biol.* **11**:102-106.
- Tzamarias, D. and Struhl, K. (1995) Distinct TPR motifs of Cyc8 are involved in recruiting the Cyc8-Tup1 corepressor complex to differentially regulated promoters. *Genes Dev.* **9**: 821-831.
- Udo, H., Munoz-Dorado, J., Inouye, M. and Inouye, S. (1995) *Myxococcus xanthus*, a gram-negative bacterium, contains a transmembrane protein serine/threonine kinase that blocks the secretion of beta-lactamase by phosphorylation. *Genes Dev.* **9**: 972-983.
- Ulrich, L.E., Koonin, E.V. and Zhulin I.B. (2005) One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* **13**: 52-56.
- van der Leij, I., Franse, E.E., Elgersma, Y., Distel, B. and Tabak, H.F. (1993) PAS10 is a tetratricopeptide-repeat protein that is essential for the import of most matrix proteins into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 11782-11786.
- Vandercastele, S.J., Peetermans, W.E., Merckx, R., and Van Eldere, J. (2001) Quantification of expression of *Staphylococcus epidermidis* housekeeping genes with Taqman quantitative PCR during in vitro growth and under different conditions. *J. Bacteriol.* **183**: 7094-7101.
- Verhamme, D.T., Arents, J.C., Postma, P.W., Creilaard, W. and Hellingwerf, K.J. (2002) Investigation of *in vivo* cross-talk between key two-component systems of *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**: 69-78.
- Vidal, M. and Legrain, P. (1999) Yeast forward and reverse 'n'-hybrid systems. *Nucleic Acids Res.* **27**: 919-929.
- Vlamakis, H.C., Kirby, J.R. and Zusman, D.R. (2004) The Che4 pathway of *Myxococcus xanthus* regulates type IV pilus-mediated motility. *Mol. Microbiol.* **52**: 1799-1811.

- Volz, K. and Matsamura, P. (1991) Crystal structure of *Escherichia coli* CheY refined at 1.7-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **266**: 15511-15519.
- Wadhams, G.H. and Armitage, J.P. (2004) Making sense of it all: Bacterial chemotaxis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 1024-1037.
- Wadhams, G.H., Martin, A.C. and Armitage, J.P. (2000) Identification and localization of a methyl-accepting chemotaxis protein in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* **36**: 1222-1233.
- Wadhams, G.H., Martin, A.C., Porter, S.L., Maddock, J.R., Mantotta, J.C., King, H.M. and Armitage, J.P. (2002) TlpC, a novel chemotaxis protein in *Rhodobacter sphaeroides*, localizes to a discrete region in the cytoplasm. *Mol. Microbiol.* **46**: 1211-1221.
- Walker, J.E, Saraste, M., Runswick, M.J. and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO* **1**: 945-951.
- Wall, D. and Kaiser, D. (1999) Type IV pili and cell motility. *Mol. Microbiol.* **23**: 1-10.
- Ward, M.J, Lew, H., Treuner-Lange, A. and Zusman, D.R. (1998a) Regulation of motility behaviour in *Myxococcus xanthus* may require an extracytoplasmic-function sigma factor. *J. Bacteriol.* **180**: 5668-5675.
- Ward, M.J. and Zusman, D.R. (1999) Motility in *Myxococcus xanthus* and its role in developmental aggregation. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 624-629.
- Ward, M.J., Lew, H. and Zusman, D.R. (2000) Social motility in *Myxococcus xanthus* requires FrzS, a protein with an extensive coiled-coil domain. *Mol. Microbiol.* **37**: 1357-1371.
- Ward, M.J., Mok, K.C., Astling, D.P., Lew, H. and Zusman, D.R. (1998b) An ABC Transporter plays a developmental aggregation role in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **180**: 5697-5703.
- Weinberg, R.A. and Zusman, D.R. (1989) Evidence that the *Myxococcus xanthus* frz genes are developmentally regulated. *J. Bacteriol.* **171**: 6174-6186.
- Welch, M., Osawa, K., Aizawa, S. und Eisenbach, M. (1993) Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8787-8791.
- West, A.H. and Stock, A.M. (2001) Histidin kinases and response regulator proteins in two-component signalling systems. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 369-376.
- Wilkinson, J.Q., Lanahan, M.B., Yen, H.-C., Giovannoni, J.J. and Klee, H.J. (1995) An Ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *never-ripe*. *Science* **270**: 1807-1809.
- Wolgemuth, C. and Oster, G. (2004) The junctional pore complex and the propulsion of bacterial cells. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 72-77.

- Wolgemuth, C., Hoiczky, E., Kaiser, D. and Oster, G. (2002) How Myxobacteria glide. *Curr. Biol.* **12**: 369-377.
- Wright, G.D., Holman, T.R. und Walsh, C.T. (1993) Purification and characterization of VanR and the cytosolic domain of VanS: a two-component regulatory system required for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147. *Biochemistry* **32**: 5057-5063.
- Wu, S.S. and Kaiser, D. (1997) Regulation of the expression of the *pilA* gene in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **179**: 7748-7758.
- Wu, S.S., Wu, J. and Kaiser, D. (1997) The *Myxococcus xanthus pilT* locus is required for social gliding motility although pili are still produced. *Mol. Microbiol.* **23**: 109-121.
- Yan, D., Cho, H.S., Hastings, C.A., Igo, M.M., Lee, S.-Y., Pelton, J.G., Stewart, V., Wemmer, D.E. and Kustu, S. (1999) Beryll fluoride mimics phosphorylation of NtrC and other bacterial response regulators. *Biochemistry* **96**: 14789-14794.
- Yang, Z., Geng, Y., Xu, D., Kaplan, H.B. and Shi, W. (1998) A new set of chemotaxis homologues is essential for *Myxococcus xanthus* social motility. *Mol. Microbiol.* **30**: 1123-1130.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Zhang, P., Khursigara, C.M., Hartnell, L.M. and Subramaniam, S. (2007) Direct visualization of *Escherichia coli* chemotaxis receptor arrays using cryo-electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 3777-3781.
- Zhang, W., Inouye, M. and Inouye, S. (1996) Reciprocal regulation of differentiation of *Myxococcus xanthus* by Pkn5 and Pkn6, eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases. *Mol. Microbiol.* **20**: 435-447.
- Zhao, R., Collins, E.J., Bourret, R.B. and Siversmith, R.E. (2002) Structure and catalytic mechanism of the *E. coli* chemotaxis phosphatase CheZ. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 570-575.
- Zusman, D.R. (1982) "Frizzy" mutants: a new class of aggregation-defective developmental mutants of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **150**: 1430-1437
- Zusman, D.R. and McBride, M.J. (1991) Sensory transduction in the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **5**: 2323-2329.

Produktbezogene Handbücher

Expression and purification of proteins using Strep-tag and/or 6xHistidine-tag – a comprehensive manual, Mai 2005, IBA BioTAGnology

Purification of Polyhistidine-Tagged Proteins, April 2006, Rev. 03, Macherey-Nagel

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin, Ampere oder Absorption
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
Ca	Calcium
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	<i>counts per minute</i>
Da	Dalton
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxyribonukleotid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
et al.	und andere (<i>et alteri</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm oder Gravitationskonstante
G	Guanin
h	Stunde
i.d.R.	in der Regel
IPTG	Isopropylthiogalaktosid

k	Kilo
K	Kalium
kbp	Kilobasenpaare
Km	Kanamycin
λ	Wellenlänge
l	Liter
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase Gen
LB	Luria-Bertani
Lsg.	Lösung
μ	Mikro
m	Milli
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
Mbp	Megabasenpaare
MCS	<i>multiple cloning site</i>
Mg	Magnesium
min	Minute
MOPS	3-Morpholino-1-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Nano
Na	Natrium
NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
Oxy	Oxytetracyclin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid; Serin-Protease Inhibitor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)

RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
t _d	Verdopplungszeit
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Base-Sodium (Natrium)-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamid
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
V	Volt
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht (<i>weight</i>) pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-Galaktosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Carolin Gröger
Geburtsdatum	23. Mai 1977
Geburtsort	Giessen, Hessen
Familienstand	ledig

Berufserfahrung

01/2005 - 05/2005	Forschungsaufenthalt am <i>Georgia Institute of Technology</i> , Atlanta, Georgia, USA
seit 02/2003	Doktorandin am Institut für Mikro- und Molekularbiologie, Justus-Liebig-Universität, Giessen; Thema: Die Rolle des ungewöhnlichen <i>response</i> Regulators FrzZ im Lebenszyklus des Bodenbakteriums <i>Myxococcus xanthus</i>
10/2002 - 12/2002	Doktorandin am Institut für Zellbiologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn

Studium

06/2002	Abschluss als Diplombiologin, Prädikat „sehr gut“
07/2001 - 06/2002	Diplomarbeit am Institut für Mikro- und Molekularbiologie, Justus-Liebig-Universität, Giessen
07/2001	Diplom-Hauptprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Zoologie, Molekularbiologie und Botanik, Note: 1,1
04/1999	Vordiplom in den Fächern Botanik, Zoologie, Physik und Chemie, Note: 1,1
09/1996	Immatrikulation an der Justus-Liebig-Universität, Giessen im Fachbereich Biologie (Diplom)

Schul Ausbildung

1993 - 1996	Goetheschule, Wetzlar (gymnasiale Oberstufe) Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Note: 2,3
1987 - 1993	Lahntalschule, Atzbach (integrierte Gesamtschule)
1983 - 1987	Grundschule, Dutenhofen

Präsentationen

Ort	VAAM 2002, Göttingen (Deutschland)
Art	Poster
Thema	Site-directed mutagenesis and interaction analysis of the response regulator FrzZ
Ort	VAAM 2003, Berlin (Deutschland)
Art	Poster
Thema	Examining the role of the unusual response regulator FrzZ in <i>Myxococcus xanthus</i>
Ort	Myxo 2004, LO-Skolen (Dänemark)
Art	Vortrag
Thema	The potential interaction of the response regulator FrzZ and the Ser/Thr phosphatase Pph1 of <i>Myxococcus xanthus</i>
Ort	Myxo 2004, LO-Skolen (Dänemark)
Art	Vortrag
Thema	Analysis of PP2C-type phosphatases in <i>Myxococcus xanthus</i>
Ort	European Myxo Meeting 2006, Marburg (Deutschland)
Art	Vortrag
Thema	The response regulator FrzZ of <i>Myxococcus xanthus</i>
Ort	VAAM 2006, Jena (Deutschland)
Art	Vortrag
Thema	Characterization of the unusual response regulator FrzZ in <i>Myxococcus xanthus</i>
Ort	Myxo 2007, Granada (Spanien)
Art	Poster
Thema	<i>frzZ</i> and beyond – searching for FrzZ interaction partners

Publikationen

published by	CRC Press LLC, Boca Raton (USA), 2005
Art	Buchkapitel
Titel	Comparative genome analysis of signal transduction proteins in clostridia. Handbook an Clostridia; edited by Peter Dürre

Danke,

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Allen, die zur Verwirklichung dieser Arbeit beigetragen haben.

- Frau Prof. Dr. Gabriele Klug, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglichte und jederzeit für Fragen und Ratschläge zur Verfügung stand!
- Frau Prof. Dr. Tina Trenczek, für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur, und das Interesse an meiner Arbeit!
- Herrn HD Dr. Christoph Forreiter, der als dritter Prüfer Teil meiner Prüfungskommission und ein wichtiger *input* in Sachen Proteinaktivierung war!
- Frau Dr. Anke Treuner-Lange, unter deren Leitung diese Arbeit angefertigt wurde. Anke, wenn einer meinen Arbeitsplatz benutzen darf, dann Du!
- Tanja Zeller, Nicole Kloft und Carina Kleinschlömer meinen unglaublich kompetenten Korrektureusen, deren Fragen und Anmerkungen sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!
- meinen Mädels Sabrina, Antje und Tina, die immer ein offenes Ohr oder eine helfende Hand für mich hatten und deren Freundschaft mir so viel bedeutet!
- allen Kollegen des Instituts für das nette Arbeitsklima und die vielen lustigen Mittagessen, die immer sehr zu meiner Entspannung beigetragen haben.
- meiner wunderbaren Familie (allen Grögers, Häuser, Müllers und Schwarzes) und meinen Freunden, für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre uneingeschränkte Unterstützung während der Zeit des Studiums und der Promotion!
- meinem Schatz Gernot für die tausend kleinen und großen Dinge, die Du für mich tust und über die ich oft so leichtfertig hinweggehe. Danke für Dein Vertrauen in mich und Deine Liebe, in den guten wie in den schlechteren Zeiten!