MotL ist ein c-di-GMP-abhängiger negativer Regulator des lateralen Flagellensystems in *Shewanella putrefaciens* CN-32

MotL is a c-di-GMP dependent negative regulator of the lateral flagellar system in *Shewanella putrefaciens* CN-32

Dissertation

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

dem
Fachbereich Biologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
vorgelegt von

Anna Pecina
aus Saarlouis

Gießen (Lahn), 2020

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 2015 bis September 2019 am **Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen** unter der Leitung von Prof. Dr. Kai Thormann durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Justus- Liebig-Universität
als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Kai Thormann
Zweitgutachter: Apl. Prof. Dr. Elena Evguenieva-Hackenberg

Tag der mündlichen Prüfung:

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation („Funktion und Regulation lateraler Flagellensysteme“) selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen (Lahn), den 27.08.2020 ----------

Anna Pecina

Ergebnisse aus Projekten, die in dieser Dissertation nicht ausführlich behandelt werden, sind in der folgenden Originalpublikation veröffentlicht:

1. **ZomB is essential for flagellar motor reversals in *Shewanella putrefaciens* and *Vibrio parahaemolyticus*.** [#]Brenzinger S, [#]**Pecina A**, Mrusek D, Mann P, Völse K, Wimmi S, Ruppert U, Becker A, Ringgaard S, Bange G, Thormann KM. Mol Microbiol. 2018 Sep; 109(5):694-709. doi: 10.1111/mmi.14070. Epub 2018 Aug 1

[#] diese Autoren wirkten gleichberechtigt an der Publikation mit

Zusammenfassung

Der Modellorganismus *Shewanella putrefaciens* CN-32 besitzt zwei distinkte Flagellencluster, die ein polares Flagellum und bis zu fünf zusätzliche laterale Flagellen ausbilden können. Beide Flagellensysteme sind dabei voll funktional und voneinander unabhängig. Es ist eine Vielzahl an posttranslationalen Regulationsmechanismen bekannt, die den Flagellenmotor beeinflussen, um die Flagellenleistung zu steigern oder herabzusetzen. Häufig handelt es sich dabei um Motorbremsen oder molekulare Kupplungen, die in Abhängigkeit der intrazellulären c-di-GMP-Konzentration in ihrer aktiven oder inaktiven Form vorliegen und ihre regulatorische Funktion übernehmen. Der Botenstoff c-di-GMP spielt also eine wichtige Rolle bei der Regulation der Motilität und reguliert unter anderem die Transition von motil zu sessil.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das PilZ-Domänenprotein MotL (SputCN32_3446) in *S. putrefaciens* CN-32 als negativer Regulator des lateralen Flagellensystems agiert und die Funktion des polaren Flagellensystems nicht beeinflusst. Dies wird deutlich, da eine Deletion von *motL* lediglich in dem Stamm Δ*flagP*, der nur noch laterale Flagellen ausbildet, zu einer Steigerung der Ausbreitungseffizienz auf Weichagarplatten führte, während die Deletion von *motL* die Ausbreitungseffizienz im Wildtyp und dem Stamm Δ*flagL*, der nur noch polare Flagellen ausbildet, nicht beeinflusste.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass MotL mittels des konservierten Aminosäuremotivs RxxR_DxSxxG c-di-GMP bindet und dadurch von einer inaktiven Form in eine aktive Form übergeht. MotLAAx, eine c-di-GMP-insensitive Variante von MotL, zeigte auch nach einer Überproduktion keinen negativen Effekt auf die Ausbreitungseffizienz auf Weichagarplatten. Die Überproduktion von MotL in seiner nativen Form hingegen führte zu einer stark verringerten Ausbreitungseffizienz auf Weichagarplatten und auch zu einer deutlich herabgesetzen Schwimmgeschwindigkeit in Flüssigmedium.

Dieser Effekt wurde durch die gleichzeitige Überproduktion von MotL und einer Diguanylatzyklase (DgcA) beziehungsweise einer Phosphodiesterase (PdeH) noch deutlicher. Bei einem artifiziell erhöhten intrazellulären c-di-GMP-Spiegel, also bei einer Überproduktion von DgcA, resultierte die Überproduktion von MotL in einer noch stärkeren Reduktion der Ausbreitungseffizienz und der Schwimmgeschwindigkeit im Vergleich zur alleinigen Überproduktion von MotL. Umgekeht führte die Überproduktion von MotL bei einem artifiziell erniedrigten c-di-GMP-Spiegel, durch gleichzeitige Überproduktion von PdeH, zum Verlust des negativen Effekts, da es hier zu einer Erhöhung des Ausbreitungsradius und der Schwimmgeschwindigkeit im Vergleich zur Überproduktion von MotL alleine kam.

In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sowohl MotL als auch MotLAAx in der Zelle an einer lateralen oder subpolaren Position lokalisieren und mit dem lateralen Rotorprotein $FliM_2$ und dem Statorprotein MotB kolokalisieren. Weitere Interaktionsstudien zeigten für MotL und MotLAAx auch eine Interaktion mit diesen und weiteren Proteinen des lateralen Flagellenmotors.

Somit stellt MotL in *S. putrefaciens* CN-32 eine c-di-GMP-abhängige sterische Bremse mit einer Spezifität für das laterale Flagellensystem dar.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 8

1 Einleitung 9

1.1 Motilität von Bakterien 9

1.1.1 Flagellierungsmuster 9

1.1.2 Schwimmverhalten und Chemotaxis 11

1.1.3 Struktur der bakteriellen Flagelle 12

1.1.4 Regulation des Flagellenmotors 14

1.1.4.1 Motorbremsen 16

1.1.4.2 Kraftverstärker 16

1.1.4.3 Motorkupplungen 17

1.1.4.4 ZomB 18

1.2 Cyclisches Diguanosinmonophosphat (c-di-GMP) 19

1.2.1 Regulation des intrazellulären c-di-GMP-Spiegels 19

1.2.2 Einfluss von c-di-GMP auf den Lebensstil 22

1.2.3 PilZ-Domänenproteine 24

1.2.3.1 YcgR 27

1.2.3.2 FlgZ 29

1.3 *Shewanella putrefaciens* CN-32 30

1.3.1 Motilität in *S. putrefaciens* CN-32 31

1.3.2 C-di-GMP in *S. putrefaciens* CN-32 32

2 Ergebnisse 33

2.1 Regulation der Motilität in *S. putrefaciens* CN-32 33

2.1.1 Das PilZ-Domänenprotein MotL 33

2.1.2 Einfluss von MotL auf die Motilität 35

2.1.3 Einfluss des c-di-GMP-Spiegels auf die Motilität 41

2.1.4 Einfluss des c-di-GMP-Spiegels auf den Effekt von MotL 43

2.1.5 Lokalisation von MotL in der Zelle 46

2.1.6 Einfluss von MotL auf die Bildung der lateralen Flagelle 47

2.1.7 Potentielle Interaktionspartner von MotL 48

2.1.7.1 Mikroskopische Untersuchungen 48

2.1.7.2 *Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid* (BACTH)-System 51

3 Diskussion 53

3.1 Einfluss von MotL auf die Motilität von *S. putrefaciens* CN-32 53

3.2 Potentielle Interaktionspartner von MotL 56
3.3 Hypothetischer Regulationsmechanismus für MotL 58
4 Material und Methoden 60
4.1 Chemikalien und Materialien 60
4.1.1 Bakterienstämme und Plasmide 60
4.1.2 Oligonukleotide 64
4.1.3 Nährmedien 67
4.1.4 Antibiotika und Medienzusätze 67
4.1.5 Enzyme 68
4.1.6 Kits 68
4.1.7 Puffer 69
4.1.8 Geräte 71
4.2 Methoden 72
4.2.1 Kultivierung von Bakterienstämmen 72
4.2.2 Konstruktion rekombinanter Bakterienstämme 72
4.2.2.1 *Gibson Assembly* 72
4.2.2.2 Transformation 72
4.2.2.3 Konjugation 73
4.2.2.4 Herstellung von *in-frame*-Deletionsmutanten 73
4.2.2.5 Herstellung von *in-frame*-Insertionen 73
4.2.3 Mikroskopie 74
4.2.4 Maleimidfärbung 74
4.2.5 Motilitäts-Assays 74
4.2.6 Überproduktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine 74
4.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 75
4.2.8 *Western Blot*-Analyse 76
4.2.9 C-di-GMP-Bindungstest 76
4.2.10 *Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid* (BACTH)-System 77
4.2.11 Bestimmung der Topologie des Membranproteins ZomB 77
5 Literatur 80
6 Appendix 93
Danksagung 97
Lebenslauf 98

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aa = *amino acids* = Aminosäuren

bp = Basenpaare

CCW = *counter clockwise* = im Gegenuhrzeigersinn

cdg = c-di-GMP = cyclisches Diguanosinmonophosphat

CM= *cytoplasmic membrane* = Zytoplasmamembran

CW = *clockwise* = im Uhrzeigersinn

evc = *empty vector control* = Leervektorkontrolle

GDP = Guanosindiphosphat

GTP = Guanosintriphosphat

IM = *inner membrane* = innere Zellmembran

imf = *ion motive force* = Ionengradient

mCherry = *monomeric Cherry* = monomeres rot fluoreszierendes Protein

MCP = Methyl-akzeptierende Chemotaxisproteine

n = Anzahl der Einheiten

OD_{600} = Optische Dichte bei der Wellenlänge 600 nm

OM = *outer membrane* = äußere Zellmembran

PG = Peptidoglykan

pmf = *proton motive force* = Protonengradient

rpm = *revolutions per minute* = Umdrehungen pro Minute

RT = Raumtemperatur

sfGFP = *superfolder green fluorescent protein* = grün fluoreszierendes Protein

üN = über Nacht

üT = über Tag

v/v = *volume per volume* = Volumen pro Volumen

w/v = *weight per volume* = Gewicht pro Volumen

wt = Wildtyp

Δ = Deletion

1 EINLEITUNG

1.1 Motilität von Bakterien

Prokaryotische Zellen haben im Laufe der Evolution verschiedene Mechanismen zur Fortbewegung in Flüssigkeiten oder auf Oberflächen entwickelt. Diese erlauben es ihnen, sich aktiv aus einer Umgebung mit ungeeigneteren Voraussetzungen, wie zum Beispiel Nährstoffmangel oder zu hohem Salzgehalt, fortzubewegen und sich aktiv in eine optimalere Umgebung zu begeben [198]. Zur Bewegung entlang fester Oberflächen können Bakterien verschiedene Formen des Schwärmens, Gleitens oder *twitching* nutzen. Hierzu dienen den Bakterien spezielle Zellfortsätze wie Flagellen [17], Typ-4-Pili (T4P) [85] oder weniger gut charakterisierte Nanomotoren. Unter Schwärmen versteht man weitläufig das schnelle Fortbewegen in Gruppen über Oberflächen das durch zahlreiche Flagellen angetrieben wird [92,120]. Dabei führt der Kontakt der Zellen mit einer festen Oberfläche zu einem Wechsel von schwimmenden zu schwärmenden Zellen. Dieser Wechsel löst ebenfalls eine Veränderung in der Zellmorphologie aus, welcher zu einer Elongation der Zellen führt [191]. Auch kann es zu einer vermehrten Produktion von Biotensiden kommen, wie es zum Beispiel von *Pseudomonas aeruginosa* bekannt ist [52,71,71,99,220]. *Proteus mirablis* ist ein Beispiel für ein peritrich flagelliertes Bakterium, das seine Flagellen unverändert sowohl zum Schwimmen als auch zum Schwärmen benutzt [165]. *Vibrio parahaemolyticus* hingegen besitzt zwei distinkte Flagellensysteme für die jeweilige Art der Fortbewegung, wobei das polare Flagellum zum Schwimmen und das induzierbare laterale Flagellensystem zum Schwärmen genutzt wird [122]. Gleiten benötigt im Gegensatz zum Schwimmen oder Schwärmen keine antreibenden Strukturen wie Flagellen oder Pili und beschreibt eine Art der Fortbewegung über Oberflächen in dünnen wässrigen Filmen [137]. Die genauen Mechanismen auf denen das Gleiten beruht, sind nicht vollständig aufgeklärt. Für *Myxococcus xanthus* zum Beispiel konnte eine Beteiligung von vorrübergehenden Zelladhäsionskomplexen, sogenannten *focal adhesion points,* nachgewiesen werden [124]. *Twitching* ist eine Art der Fortbewegung über feuchte Oberflächen bei der nicht die Flagelle, sondern spezielle Strukturen, sogenannte Typ-4-Pili (T4P), genutzt werden. Dabei werden zunächst polare T4P verlängert und an die Oberfläche angebunden. Durch das Zurückziehen der T4P wird dann die Zelle ähnlich wie mit einer Seilwinde oder einem Greifhaken in ruckenden Bewegungen vorwärts gezogen [85,118,123,194]. Die flagellenvermittelte Fortbewegung in Form des Schwimmens ist die wohl am weitesten verbreitete und schnellste Art der bakteriellen Fortbewegung. Das Schwimmverhalten und die Funktion der Flagelle werden in den folgenden Kapiteln expliziter behandelt.

1.1.1 Flagellierungsmuster

Bereits früh in der mikrobiellen Forschung wurde festgestellt, dass Bakterienspezies sich in der Anzahl und Position ihrer Flagellen unterscheiden [109]. Generell kann man zwischen polaren und lateralen Flagellen unterscheiden. Trotz der Vielzahl an verschiedenen Bakterienarten ist die Anzahl an Flagellierungsmustern begrenzt. Abbildung 1 zeigt die am häufigsten vorkommenden bakteriellen Flagellierungsmuster und die bekanntesten Vertreter, die diese aufweisen. Obwohl die Anordnung der Flagellen sich auf die Zellpole (polare Flagellen) oder die gesamte Oberfläche (laterale Flagellen) beschränkt, unterscheidet sich ihre Anzahl stark und variiert von einer einzigen Flagelle über

maximal 25 Flagellen bei *Bacillus subtilis* bis hin zu über hundert Flagellen bei schwärmenden Zellen von *Vibrio parahaemolyticus* [191].

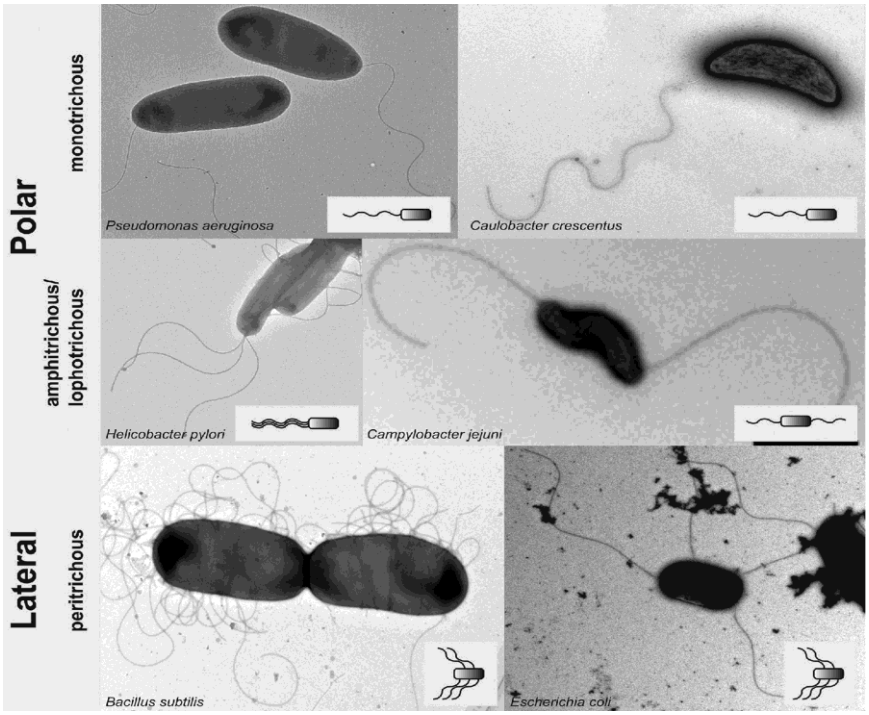

Abbildung 1: Häufig vorkommende Flagellierungsmuster und bekannte Vertreter. Bakterien unterscheiden sich in der Anzahl und Anordnung ihrer Flagellen [109]. Abgebildet sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen Bakterien. Zu den Vertretern der polar flagellierten Bakterien gehören die monotrich flagellierten Spezies *Pseudomonas aeruginosa* und *Caulobacter crescentus*, das lophotrich flagellierte Bakterium *Helicobacter pylori* und das amphitrich flagellierte Bakterium *Campylobacter jejuni*. Zu den Vertretern der lateral flagellierten Spezies zählen unter anderem die peritrich flagellierten Bakterien *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*. Die schematischen Abbildungen in den eingefügten Kästchen sollen die jeweiligen Anordnungen der Flagellen veranschaulichen. Aus Schuhmacher *et al.* (2015) in *FEMS Microbiology Reviews* [187].

Zu den häufig vorkommenden polaren Flagellierungsmustern zählen monotrich flagellierte Bakterien wie manche Arten von *Pseudomonas*, *Shewanella, Vibrio* und *Caulobacter*, die an einem Zellpol eine einzelne Flagelle aufweisen, sowie die amphitrich flagellierten Bakterien wie *Campylobacter,* die an beiden Polen je eine Flagelle aufweisen. Andere Bakterienspezies, wie zum Beispiel *Helicobacter*, sind lophotrich flagelliert und besitzen mehrere Flagellen an einem Pol. Laterale Flagellierungsmuster zeigen zum Beispiel *Bacillus* und *Escherichia*, die peritrich flagelliert sind und mehrere einzelne Flagellen auf der gesamten Zelloberfläche zeigen [187]. Ebenfalls zu den lateral flagellierten Bakterien zählt *Rhodobacter*, der eine einzelne medial angeordnete Flagelle besitzt [6]. Das jeweilige Flagellierungsmuster dient dazu, die Bewegung der Zelle innerhalb ihrer speziestypischen Umgebung optimal zu unterstützen. So eignen sich zum Beispiel polare Flagellen besonders zum schnellen Schwimmen in flüssigen Medien und ein peritriches Flagellierungsmuster bietet Vorteile bei der Bewegung in viskosen Medien oder über Oberflächen [3,92]. Einige Bakterienspezies wie *Azospirillum* oder *Vibrio* besitzen duale Flagellensysteme und sind dazu in der Lage, ihr Flagellierungsmuster an die jeweils vorherrschenden Umweltbedingungen anzupassen [120]. So produziert *V. parahaemolyticus* ständig ein polares Flagellum, welches ausreichend für das Schwimmen in Flüssigmedium ist. Für das Schwimmen in stark viskosem Medium oder das Schwärmen über Oberflächen wird ein zusätzliches laterales Flagellensystem induziert, wodurch eine Vielzahl an lateralen Flagellen auf der gesamten Zelloberfläche gebildet werden [3,191].

1.1.2 Schwimmverhalten und Chemotaxis

Flagellen sind lange dünne helikale Filamente, die sich in drei strukturelle Einheiten unterteilen lassen: den Basalkörper als Drehmotor, den Haken als universelle Verbindung und das Filament als molekulare Schraube [17]. An dem Aufbau und der Funktion einer Flagelle sind mehr als 60 Gene beteiligt [129,127,212]. Der bakterielle Flagellenmotor wird durch einen transmembranen elektrochemischen Ionengradienten, die sogenannte *ion motive force* (IMF), angetrieben und rotiert das Flagellenfilament, wodurch Schub generiert und der Zellkörper vorwärts getrieben wird. Die Motorleistung eines Flagellums variiert stark innerhalb der verschiedenen Spezies. In *E. coli* erreicht der Motor seine Höchstgeschwindigkeit mit 300 Umdrehungen pro Sekunde, wohingegen der Motor des marinen Bakteriums *V. alginolyticus* bis zu 1700 Umdrehungen pro Sekunde schafft [38,113]. Der Flagellenmotor besteht aus mehreren ringförmig angeordneten Rotor- und Stator-Einheiten. Dabei fungiert jede Statoreinheit als Ionenkanal, der Kationen wie Protonen (H^+) oder Natriumionen (Na^+) leitet und dadurch Kraft auf den Rotor ausübt [130,135]. Die Flagellenmotoren von *E. coli* drehen, wie die Mehrheit der Flagellenmotoren, bidirektional also sowohl im Uhrzeigersinn (CW, *clockwise*) als auch gegen den Uhrzeigersinn (CCW, *counterclockwise*) [198,199]. *E. coli* als peritrich flagelliertes Bakterium kann seine linkshändigen helikalen Flagellenfilamente, wenn alle CCW drehen, hinter dem Zellkörper bündeln um gerade nach vorne zu schwimmen (*run*). Wenn ein oder mehrere Motoren die Richtung der Rotation nach CW ändern, wird das Bündel aufgelöst, was die Zelle zum Taumeln (*tumbling*) bringt und den Wechsel der Schwimmrichtung ermöglicht. Die Frequenz, mit der die Rotationsrichtung der Flagelle dabei geändert wird, wird durch Stimuli von außen wie Nährstoffe oder Signalmoleküle bestimmt. Transmembrane Chemorezeptoren und intrazelluläre Phosphotransferasesysteme nehmen Umweltsignale auf und wandeln sie in intrazelluläre Signale um. Diese werden dann entlang einer intrazellulären Signaltransduktionskette zum Flagellenmotor geleitet, um dort die Rotationsrichtung von CCW zu CW zu wechseln. Die Zellen wiederholen dieses *run-tumble* Muster, welches auch als *random walk* bezeichnet wird, um besser geeignete Umweltbedingungen für ihr Überleben zu entdecken [16,18,19]. In Abwesenheit von Gradienten führt der *random walk* zu einer uniformen Ausbreitung in der Umgebung. In Gradienten aus Umwelteinflüssen wird der *random walk* einheitlich, wobei die Zellen die Stimulusstärke ständig überprüfen und die Reorientierung, also das *tumbling*, unterdrücken, solange sie in eine bevorzugte Richtung schwimmen. Dieses Verhalten wird durch ein oder mehrere Chemotaxissysteme kontrolliert, die die Umwelteinflüsse wahrnehmen und dementsprechend die Motorfunktion der Flagelle regulieren [198].

Viele Bakterienspezies sind anders als *E. coli* polar flagelliert, weshalb sie während des Schwimmens andere Fortbewegungsmuster aufweisen. Für *V. alginolyticus* zum Beispiel wurde gezeigt, dass die Rotation der polaren Flagelle im Gegenuhrzeigersinn zum Vorwärtsschwimmen führt und der Wechsel der Rotationsrichtung in den Uhrzeigersinn zu einem Zurückziehen des Zellkörpers führt. Die Reorientierung der Zelle findet hierbei durch eine schnelle Neuausrichtung des Zellkörpers (*flick*) statt, welche durch eine Knickinstabilität des Hakens während der Reorientierung zurück nach CCW auftritt. Diese *run-reverse-flick*-Neuausrichtung findet dabei in einem Winkel von etwa 90° statt und ermöglicht so ein effizientes Ausbreiten und die Chemotaxis [161,197,230]. Einige Bakterienspezies wie *Aeromonas*, *Vibrio spp.* und *Shewanella* besitzen zusätzlich zu einem primären polaren Flagellensystem auch ein distinktes sekundäres Flagellensystem [120,122]. Bei *Vibrio* wird die polare Flagelle für schnelles Schwimmen unter planktonischen Bedingungen genutzt, während das Set an lateralen Flagellen zum Schwärmen über Oberflächen oder dem Schwimmen in viskosen Medien induziert wird um bessere Leistungen zu ermöglichen [8,181]. Auch kann ein zusätzliches

laterales Flagellensystem, wie zum Beispiel bei *Shewanella putrefaciens* CN-32, während der Richtungsneuorientierung beim Schwimmen in planktonischen Medien die Ausbreitungseffizienz erhöhen, indem es den Winkel in dem sich der Zellkörper reorientiert verringert und so zu einer höheren Richtungsbeibehaltung (*directional persistance*) beiträgt [32].

Zusätzlich besitzen Flagellen eine Vielzahl an weiteren Funktionen, die über ihre Rolle als Motilitätsstrukturen hinausgehen. Sie scheinen zur Biofilmbildung beizutragen [158], welche zum Beispiel für *B. subtilis,* die übliche Art des Wachstums in der Umwelt zu sein scheint [1]. In *E. coli*-Makrokolonien scheinen Flagellen eine architektonische Rolle zu übernehmen, die nicht mit der Motilität in Verbindung zu stehen scheint [189]. Des weiteren stellen Flagellen wichtige Virulenzfaktoren dar und ermöglichen es Pathogenen, ihre primäre Infektionsstelle zu finden und so einen ersten Schritt in Richtung einer Infektion zu machen [133,145].

1.1.3 Struktur der bakteriellen Flagelle

Flagellen messen durchschnittlich 20 nm im Durchmesser und etwa 5 bis 20 μm in der Länge und können somit das mehrfache einer Zelllänge erreichen [53]. Die Flagelle besteht aus annähernd 30 Proteinen und ihr Aufbau lässt sich in den Basalkörper, den flexiblen Haken und das Filament unterteilen [40,112]. Der Basalkörper verankert das Flagellenfilament in der Zellmembran, bildet den Exportapparat für die außen liegenden Flagellenstrukturen und sorgt für die Flagellenrotation. Er spannt sich bei gramnegativen Bakterien von der inneren zur äußeren Membran [18]. Der konservierte MS-Ring besteht aus etwa 26 Kopien von FliF [207] und steht über den C-Ring durch eine funktionelle Interaktion mit den Statorproteinen MotA und MotB in Verbindung [215]. Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau eines flagellaren Basalkörpers. Der in die Zellmembran eingebettete Motorkomplex nutzt transmembrane Ionenegradienten, um die Rotation der Flagelle zu betreiben. Während Details der Architektur des Flagellenmotors zwischen den Spezies variieren [37], bleibt der Kernaufbau gleich. Der Motor ist aus mindestens 13 verschiedenen Proteinen zusammengesetzt, die jeweils in mehrfachen Kopien vorliegen. Der flagellare Motor ist eine molekulare Nanomaschine, die um die 38 Proteine für Expression, Struktur und Assemblierung benötigt [128,199]. Wie bei allen rotierenden Motoren bedarf es eines Stators und eines Rotors. Grundsätzlich besteht der Flagellenmotor aus mehreren Ringkomplexen, die in die Zellmembranen und die Zellwand eingebettet sind. Das Drehmoment wird zwischen den beiden Hauptbestandteilen des Motors, dem Rotor und dem Stator, erzeugt. Der Rotor besteht aus zwei Ringsystemen, dem MS-Ring in der zytoplasmatischen Membran und dem C-Ring oder Switchkomplex im Zytoplasma [18]. Letzterer trägt den Namen aufgrund der Interaktion mit dem Chemotaxissystem der Zelle, welche eine Modulation der Motorfunktion, z.B. die Änderung der Drehrichtung (*switch*), und damit eine gerichtete Bewegung erlaubt [28] (siehe auch Kapitel 1.2 Schwimmverhalten und Chemotaxis).

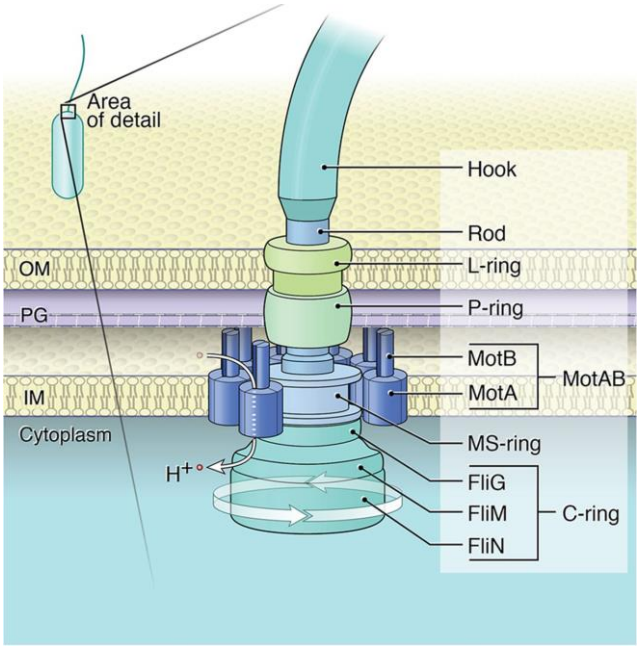

Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines flagellaren Basalkörpers. Die Statorkomplexe bilden einen Ring in der inneren Zellmembran. Jede Statoreinheit besteht aus vier MotA Proteinen und zwei MotB Proteinen, die zusammen je zwei Ionenkanäle pro Einheit bilden. MotB verankert die Statoreinheit in der Peptidoglykanschicht während MotA über elektrostatische Interaktionen mit dem C-Ringprotein FliG die Energie der *ion motive force* (hier durch einen Protonenfluss dargestellt) in ein Drehmoment übersetzt, das die Rotation der Flagelle antreibt. Die Abkürzung OM steht für *outer membrane* (äußere Membran); PG steht für Peptidoglykan und IM steht für innere Membran. Der C-Ring wird auch häufig als Switchkomplex bezeichnet. Die Pfeile sollen die Richtung des Ionenflusses beziehungsweise die Rotationsrichtung der Flagelle veranschaulichen. Aus Baker und O´Toole (2017) in *Journal of Bacteriology* [12].

Der C-Ring ist zusammengesetzt aus 26 FliG-Proteinen [60], die der Interaktion mit den Statorproteinen dienen, 34 Kopien FliM [237] und über 100 Kopien von FliN [238]. Diese Anzahl an Kopien der Proteine entspricht der von *Salmonella typhimurium* und kann in anderen Organismen variieren. Der C-Ring ist mit dem Filament über den MS-Ring verbunden, der aus bis zu 26 FliF-Proteinen besteht [222]. Der zweite wesentliche Bestandteil des Flagellenmotors, der Stator, besteht aus einem Ring von Proteinkompexen, den Statoreinheiten, die in der zytoplasmatischen Membran um den MS-Ring oberhalb des C-Rings angeordnet sind. Bei *E. coli* besteht dieser Ring aus bis zu 11 Statorkomplexen [166]. Jeder dieser Komplexe ist aus vier A- und zwei B-Untereinheiten aufgebaut, zumeist $MotA_4MotB_2$ (bei vielen protonenabhängigen Motoren wie zum Beispiel in *E. coli* [22]) oder $PomA_4PomB_2$ (bei den meisten durch Natriumionen betriebenen Motoren wie zum Beispiel in *V. alginolyticus* [236]). Die A-Untereinheiten weisen jeweils vier Transmembrandomänen auf und interagieren elektrostatisch mit dem darunterliegenden C-Ring. Die B-Untereinheiten besitzen ebenfalls eine Transmembrandomäne und eine periplasmatische Peptidoglykan-Bindedomäne. Letztere ermöglicht eine feste Bindung an die Zellwand und erlaubt damit die Funktion als statisches Element zur Erzeugung des Drehmoments. Je zwei A- und eine B-Untereinheit bilden einen ionenspezifischen Kanal. Der Ionenfluss bewirkt eine Konformationsänderung des Stators ähnlich einer Kolbenbewegung, die über den C-Ring an den Rotor weitergegeben wird [31,128,199].

Der Statorring in *E. coli* ist nicht wirklich starr, sondern überraschend dynamisch. Es befindet sich ein Reservoir von inaktiven Statorkomplexen, die frei diffundierenden können in der Zytoplasmamembran. Aus diesem Reservoir wird etwa alle 30 Sekunden eine Statoreinheit gegen eine aus dem Statorring des Motors ersetzt [107,148]. Diese neue Einheit wird erst durch den Einbau in den Motor aktiviert, sodass der Komplex an die Zellwand bindet und der Ionenfluss ermöglicht wird. Dieser Austausch findet statt, ohne dass die Flagellenrotation dabei unterbrochen wird [148]. Auch FliM-Proteine aus dem C-Ring unterlaufen einem solchen Austausch [50,62]. Dieser Austausch von Motorproteinen könnte entweder notwendig sein, da es durch die Rotation zu einem physikalischen Schaden an den Proteinen kommt und diese somit ihre Funktionalität verlieren oder aber der Austausch ist nicht zwingend notwendig um die Motorfunktion aufrecht zu erhalten, aber bietet einen Vorteil in Hinblick auf den Energieverbrauch oder ermöglicht eine bessere Interaktion

mit regulatorischen Systemen wie dem Chemotaxissystem (siehe Kapitel 1.1.2 Schwimmverhalten und Chemotaxis) und anderen regulatorischen Systemen (siehe Kapitel 1.1.4 Regulation des Flagellenmotors) [31,148]. Auch ermöglicht dieser Proteinaustausch eine hohe Flexibilität in Bezug auf das genutzte Ion, das zum antreiben des Motors genutzt wird. *S. oneidensis* MR-1 zum Beispiel besitzt eine einzelne polare Flagelle, die durch einen einzelnen Rotor angetrieben wird, verfügt aber über zwei distinkte Statorsysteme. Eines dieser beiden Statorsysteme, PomAB, wird durch Na^+-Ionen angetrieben, wohingegen das zweite Statorsystem, MotAB, durch Protonen angetrieben wird und vermutlich über lateralen Gentransfer von einer anderen Spezies erworben wurde. Beide Statorsysteme, PomAB und MotAB, sind in *S. oneidensis* MR-1 zeitgleich im Statorring vorhanden und funktionell. Dies entspricht einem bakteriellen Hybridmotor, der sowohl Natriumionen- als Protonengradienten gleichzeitig nutzt [147,148,217]. Auch *P. aeruginosa* besitzt zwei unterschiedliche Statorsysteme, um eine polare Flagelle zu betreiben, allerdings dienen diese beiden Systeme der Anpassung an äußere Bedingungen und übernehmen verschiedene Funktionen. So dient das Statorset MotAB dem Schwimmen in flüssigen und viskosen Medien, aber es ermöglicht nicht das Schwärmen über Oberflächen. Für das Schwärmen über Oberflächen wird das zweite Statorset MotCD benötigt [11,55].

Der Haken ist etwa 55 nm lang und stellt eine universelle Verbindung zwischen dem Rotorstab und dem Filament dar. Er besteht aus dem Strukturprotein FlgE und das Haubenprotein FlgD wird für den Aufbau benötigt [17,58,179,192]. Am distalen Ende des Hakens bilden die beiden Proteine FlgK und FlgL zwei Zonen, um die Flexibilität und die Stärke der Verbindung zwischen dem Haken und dem Filament zu erhöhen [112]. Mit FlgL ist zunächst auch das Haubenprotein FliD assoziiert, welches später die Assemblierung der Flagellinmonomere zum Filament vermittelt [234].

Das Filament ist der längste Teil des bakteriellen Flagellums und besteht aus mehr als 20.000 Kopien eines einzigen Proteins, dem sogenannten Flagellin. Die Flagelline ordnen sich in einem helikalen Muster aus 11 Untereinheiten pro Windung an und bilden so das Filament [235].

1.1.4 Regulation des Flagellenmotors

Der Phänotyp einer flagellierten Zelle, die sich schwimmend fortbewegen kann, scheint gegenüber dem einer nicht-motilen Zelle von Vorteil. Jedoch sind die Kosten für die Bildung einer Flagelle sehr hoch, da Flagellen aus über 20 strukturellen Proteinen aufgebaut werden, deren Kopienzahl pro Zelle zwischen 10 und über 10.000 liegen. Zusätzlich kann die Anzahl an Flagellen pro Zelle je nach Spezies zwischen einer und bis zu Dutzenden variieren. Ein Teil der Kosten für die Assemblierung von Flagellen ist nährstoffbedingt. Um diesen möglichst gering zu halten, ist die Genexpression stark reguliert [40] und die am meisten benötigten Proteine haben sich so entwickelt, dass sie möglichst keine energetisch kostbaren Aminosäuren benötigen [195]. Ein weiterer wichtiger Kostenfaktor ist die Zeit. Es dauert etwa eine Stunde, um eine funktionsfähige Flagelle aufzubauen [68,91] und dieser Zeitfaktor könnte einer unflagellierten Population, der die Nährstoffe ausgehen, zum Verhängnis werden. Manche Bakterien verfolgen eine sogenannte *bet-hedging*-Strategie, bei der ein Teil der Population nicht-motil und ein anderer motil ist um, diese Kostenfaktoren und Risiken innerhalb einer Population aufzuteilen und so möglichst gering zu halten. Wenn die Kosten zur Ausbildung einer funktionalen Flagelle einmal aufgebracht wurden, gibt es Möglichkeiten, die Flagellenleistung zu steigern oder herabzusetzen, um zum Beispiel den Übergang vom motilen zum sessilen Lebensstil zu ermöglichen oder einen geeigneteren Lebensraum zu besiedeln. Der am besten verstandene Mechanismus ist die Interaktion von CheY-P aus dem chemosensorischen Signalweg in *E. coli*,

welches an FliM bindet und den Rotor dazu bringt, die Richtung der Rotation von CCW zu CW zu ändern. Hierbei kommt es nicht zu einem sofortigen Drehrichtungswechsel des gesamten 45 nm durchmessenden Rings aus FliM-Proteinen, sondern, wie experimentell gezeigt werden konnte, breitet sich der Richtungswechsel als *conformational spread* von einem oder mehreren Ausgangspunkten im Ring aus [10]. Mit dem Thema Chemotaxis befasst sich Kapitel 1.1.2 Schwimmverhalten und Chemotaxis genauer. Auch der metabolische Zustand einer Zelle kann die Motorfunktion beeinflussen [31]. So konnte für Fumarat, einem Intermediat des Zitronensäurezyklus, gezeigt werden, dass dieses die Wahrscheinlichkeit einer CW Rotation durch die Bindung der Fumaratreduktase FRD an FliG erhöht [13,14,46,156]. Nachfolgend werden weitere posttranslationale Regulationsmechanismen, die den Flagellenmotor beschleunigen, verlangsamen oder stoppen können, genauer beschrieben und in Abbildung 3 sind die ihnen zu Grunde liegenden Mechanismen veranschaulicht.

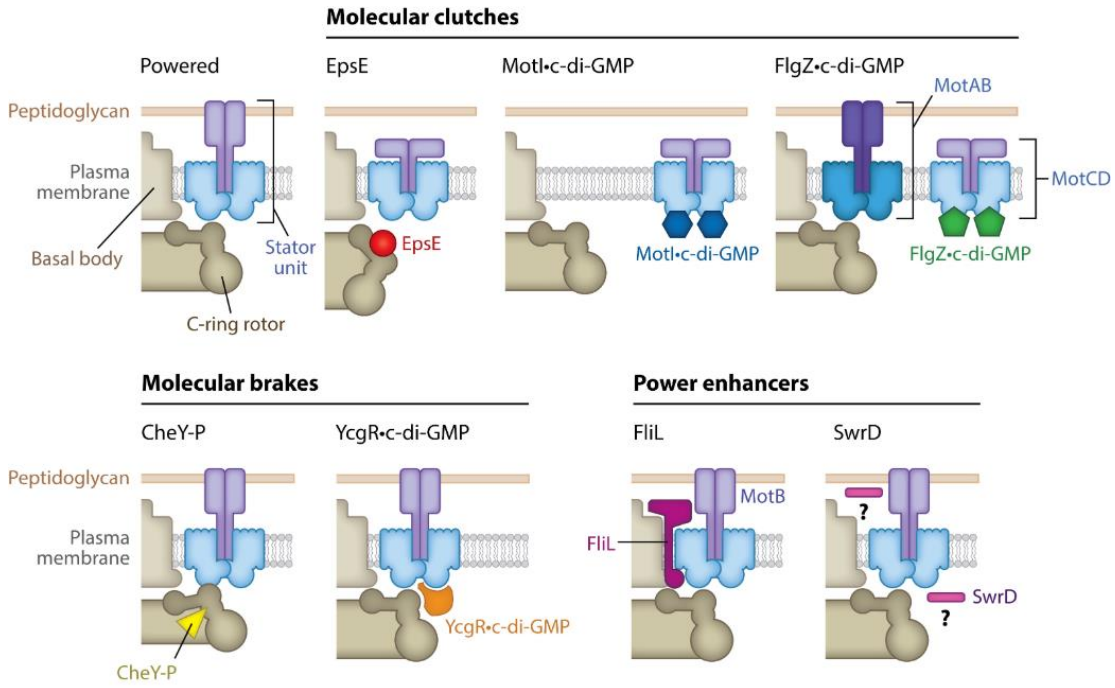

Abbildung 3: Mechanismen funktionaler Regulatoren der bakteriellen Flagelle. Die molekulare Bremse EpsE aus *B. subtilis* (rot) bindet an den Rotor und entkoppelt ihn so vom Stator [23]. MotI aus *B. subtilis* (dunkelblau) hingegen bindet in seiner c-di-GMP-gebundenen Form an die Statoreinheit und entkoppelt diese vom Rotor [204]. FlgZ (grün) aus *P. aeruginosa* bindet, ebenfalls in seiner c-di-GMP-gebundenen Form, an die Statoreinheit und entkoppelt diese vom Rotor [115]. Allerdings besitzt *P. aeruginosa* zwei verschiedene Statoreinheiten. MotAB wird zum Schwimmen in Flüssigkeiten genutzt und MotCD für das Schwärmen über Oberflächen [55]. FlgZ bindet spezifisch an die Statoreinheit MotCD und reguliert so die Fähigkeit des Schwärmens [11,103]. Zu den molekularen Bremsen zählt die phosphorylierte Form von CheY (gelb) aus *R. sphaeroides,* welche an den C-Ring bindet, wodurch dieser stärker mit der Statoreinheit interagiert, was einen Rotationsstop bedingt [154,155]. YcgR (orange) aus *E. coli* bindet in seiner c-di-GMP-gebundenen Form gleichzeitig an den Rotor und an den Stator des Flagellenmotors, wodurch zum einen die Schwimmgeschwindigkeit reduziert und zum anderen die Ausrichtung der Rotation im Gegenuhrzeigersinn gehalten wird [25,59,78,149] (siehe auch Kapitel 1.2.3 PilZ-Domänenproteine). FliL (violett) aus *V. parahaemolyticus* fungiert als Stabilisator und erhöht das Drehmoment, indem es eine Inhibierung des Protonenflusses durch den Stator verhindert [146]. SwrD (rosa) aus *B. subtilis* erhöht ebenfalls das Drehmoment indem es die Interaktion zwischen den Rotoren und den Statoren stabilisiert. Allerdings ist der genaue Mechanismus dazu noch nicht aufgedeckt [70]. Aus Subramanian und Kearns (2019) in *Annual Reviews of Microbiology* [205].

1.1.4.1 Motorbremsen

Chemotaxis-Bremse CheY:

Der unidirektionale Motor von *R. sphaeroides* [6] wird durch den phosphorylierten Chemoeffektor CheY-P als Chemotaxisbremse reguliert. Hierbei führt das Binden von CheY-P an den Motor nicht wie bei dem bidirektionalen Motor von *E. coli* zu einer Richtungsänderung der Rotation, sondern zu einem Anhalten der Rotation. Dies geschieht durch eine Unterbrechung des Energieflusses zwischen Rotor und Stator analog einer elektrostatischen oder sterischen Bremse. Der Stopp des Energieflusses wird dabei durch eine Konformatiosänderung des Rotorproteins FliG bedingt, die dieses nach der Bindung von CheY-P unterläuft [154,155].

Zelladhäsions-Bremse YcgR:

Der scheinbar zufällige Prozess des *cell surface attachments*, also des Annäherns und erstmaligen Anhaftens der Zelle an einer Oberfläche, der eine Vorstufe zur Biofilmbildung darstellt, ist ein stark reguliertes Ereignis [159]. In vielen Bakterienspezies wird dieser Prozess durch erhöhte Konzentrationen an c-di-GMP in der Zelle ausgelöst [73,184]. Während mehrere c-di-GMP-bindende Effektoren in einer einzigen Spezies vorkommen können [73] ist YcgR der einzige derartige identifizierte Effektor in *E. coli* und *Salmonella enterica* (siehe auch Kapitel 1.2.3 PilZ-Domänenproteine). YcgR ist dazu in der Lage, an den Flagellenmotor zu binden und dadurch die Motorleistung zu verändern [25,59,78,149]. In *E. coli* wird der c-di-GMP-Spiegel durch vier Proteine, 3 Diguanylatzyklasen (DGC´s) und eine Phosphodiesterase (PDE), PdeH, reguliert [25]. Wenn die Zellen die stationäre Phase erreichen, stellen sie die Expression von *pdeH* ein [153], wodurch der intrazelluläre c-di-GMP-Spiegel steigt. YcgR, das c-di-GMP gebunden und so seine aktive Form angenommen hat, bindet an den Motor, wodurch dieser eine extreme CCW Ausrichtung annimmt [25,149], welche die Anhaftung an Oberflächen ermöglicht [59]. YcgR bindet in seiner aktiven Form mit der N-terminalen YcgR-N-Domäne an das Statorprotein MotA [25,78] während die C-terminale PilZ-Domäne zeitgleich an weitere Motorproteine bindet [59,78,149]. Die Bindung von YcgR führt zur Reorientierung des an der Generierung des Drehmoments beteiligten C-Terminus von FliG [149], was in einer Reduktion der Motorgeschwindigkeit resultiert und der Funktion einer Bremse entspricht [25] und zeitgleich die Wahrscheinlichkeit für das Verbleiben der Rotationsrichtung in CCW erhöht [149].

1.1.4.2 Kraftverstärker (*power enhancers*)

Rotationsstabilisator HN-S:

Eine interessante Konsequenz aus der Arbeit zu YcgR ist, dass die Signifikanz von HN-S wieder etabliert wurde [101]. HN-S ist ein DNA-Bindeprotein, dass die Expression vieler voneinander unabhängiger Gene steuert [54]. Aber unabhängig von seiner DNA-bindenden Funktion interagiert es auch direkt mit FliG und stabilisiert die Rotation der Flagelle [21,116]. Experimente legen nahe, dass YcgR und HN-S antagonistisch wirken und durch die Stabilisierung der Rotation, durch die Bindung von HN-S an FliG, die Effektivität von YcgR negativ beeinflusst wird [101].

FliL

FliL ist ein Protein mit einer einzelnen Transmembrandomäne, das in vielen verschiedenen Bakterienspezies gefunden wurde und mit Bestandteilen der Flagelle koexprimiert wird [81,163,186]. Die Anwesenheit von FliL beeinflusst die Flagellenaktivität in allen untersuchten Spezies positiv, jedoch variiert die Stärke dieses Einflusses zwischen den Spezies. Während eine Deletion von *fliL* in *C. crescentus* dazu führt, dass die Flagelle nicht mehr rotiert [81], resultiert sie in *E. coli*, *S. enterica*, *V. parahaemolyticus* und *Borrelia burgdorferi* in einem verringerten Ausbreitungsradius in Weichagar und einer geringeren flagellaren Rotationsrate und einem verringerten Drehmoment [136,146,163,239]. FliL lokalisiert zwischen den Statorkomplexen und dem Basalkörper [136] und scheint die Antriebskraft der Flagelle durch direkte Interaktion mit dem Rotor und dem Stator zu erhöhen [146].

1.1.4.3 Motorkupplungen

EpsE:

In *B. subtilis* wurde ein einzelnes Protein, EpsE, entdeckt, das wie eine Kupplung funktioniert und so die Rotation des Motors anhalten kann. Indem EpsE an FliG bindet, wird eine Konformationsänderung bedingt, durch die die Statoren von den Rotoren entkoppelt werden und so der Energietransfer verhindert wird [23].

MotI

Neben EpsE wurde in *B. subtilis* noch eine weitere Kupplung, MotI, gefunden. Diese ist ein PilZ-Domänenprotein und agiert als solches abhängig vom der c-di-GMP-Konzentration in der Zelle. Anders als EpsE interagiert MotI nicht mit dem Rotorprotein FliG, sondern direkt mit dem Statorprotein MotA. Ein Phänotyp von MotI lässt sich allerdings nur dann ausmachen, wenn der c-di-GMP-Spiegel innerhalb der Zelle stark erhöht ist und zusätzlich MotI überproduziert wird. Unter diesen Bedingungen konnte allerdings gezeigt werden, dass MotI direkt mit MotA interagiert, wodurch die Interaktion der Rotoren mit den Statoren verhindert wird und die Statoren sogar abgekoppelt werden [39,204].

FlgZ

FlgZ ist ein PilZ-Domänenprotein aus *P. aeruginosa*, das die Fähigkeit zum Schwärmen inhibiert aber keinen Einfluss auf das Schwimmverhalten in flüssigen Medien zeigt. Die polare Flagelle von *P. aeruginosa* besitzt zwei verschiedene Statorsets, MotAB und MotCD, die beide ausreichen um das Schwimmen in flüssigen Medien zu ermöglichen aber nur MotCD ermöglicht das Schwärmen über feste Oberflächen [55,103]. FlgZ unterbindet das Schwärmen, indem es bei hoher intrazellulärer c-di-GMP-Konzentration, also in seiner c-di-GMP gebundenen Form, direkt an MotC bindet und das Statorset MotCD von dem Flagellenrotor entkoppelt, sodass nur das Statorset MotAB, mit welchem FlgZ nicht interagiert, weiterhin zur Erzeugung eines Drehmoments genutzt werden kann [11,103].

Diese Kontrollmechanismen erhöhen die Komplexität der Regulation für den Flagellenmotor und die Anpassung der Flagellenleistung in Bezug auf multizelluläre Verhaltensweisen, wie das Schwärmen über Oberflächen oder die Bildung eines Biofilms. Auch der zeitliche Aspekt sowie die Stärke des Einflusses, mit denen diese verschiedenen Kontrollmechanismen greifen, sind interessant. So stoppt die Bremse CheY-P in *R. sphaeroides* den Flagellenmotor schnell und komplett, wobei dieser

Effekt unter physiologischen Bedingungen nur eine sehr kurze Zeit anhält (<1s) [154]. Die Bremse YcgR aus *E. coli* hingegen verringert die Leistung des Flagellenmotors vermutlich über die Dauer von Stunden [25]. Und die Kupplung EpsE aus *B. subtilis* stoppt den Motor zwar auch komplett, aber es dauert circa 15 Minuten bis dies eintritt [23]. Die Alternative dazu wäre allerdings das Einstellen der Expression der Motorgene, sodass der Motor ohne neue Proteine über die Zeit unfunktional wird, was zeitaufwendiger und weniger schnell reversibel wäre. Die oben genannten Kontrollmechanismen bieten der Zelle also eine Möglichkeit, die Motorleistung und die Häufigkeit ihrer Richtungswechsel an den aktuellen Zustand ihres Stoffwechsels anzupassen [31].

1.1.4.4 ZomB

Die durch das Chemotaxissystem induzierten Richtungswechsel einer Zelle werden durch die Phosphorylierung des Chemoeffektors CheY ausgelöst [74]. Phosphoryliertes CheY (CheY~P) bindet an ein konserviertes Motiv am N-Terminus von FliM, wodurch dieses nicht mehr mit FliN interagieren kann [28,108,218,228]. Dadurch kommt es zu einer räumlichen Veränderung in der Anordnung von FliM und FliN im C-Ring, welche sich auch auf FliG überträgt. Dies führt zu einer Neuorientierung der Interaktionsfläche zwischen FliG und dem Stator, welche den Wechsel der Rotationsrichtung von CCW zu CW bedingt [150]. In *S. putrefaciens* CN-32 und *V. parahaemolyticus* wird neben den Chemotaxisproteinen ein weiteres Protein, ZomB, zur Regulation der Richtungswechselfrequenz benötigt. ZomB ist einTransmembranprotein, welches in enterischen Bakterien, wie zum Beispiel *E. coli*, nicht vorkommt [29]. Durch eine Deletion von *zomB* verlieren *S. putrefaciens* CN-32 und *V. parahaemolyticus* die Fähigkeit die Richtung der Flagellenrotation zu ändern vollständig. ZomB scheint die Konformationsänderungen im C-Ring und die damit einhergehende, zum Richtungswechsel der Rotation notwendige, Neuorientierung von FliG zu ermöglichen und/oder die Interaktion von CheY~P mit dem C-Ring zu unterstützen [29]. Während die Deletion von *zomB* in *S. putrefaciens* CN-32 keinen Einfluss auf die Ausbreitungseffizienz von Zellen, die nur das laterale Flagellensystem nutzen, zeigt, sind Zellen, die sich nur mittels des polaren Flagellums fortbewegen nicht mehr dazu in der Lage sich durch Weichagarplatten auszubreiten. Der Verlust dieser Ausbreitungseffizienz wird nicht durch einen fehlerhaften Aufbau der Flagelle oder eine Misslokalisation dieser begründet. Auch wird die Schwimmgeschwindigkeit, mit der sich die Zellen mittels der polaren Flagelle in Flüssigmedium fortbewegen, durch eine Deletion von *zomB* nicht herabgesetzt [29]. Allerdings ändert der Wildtyp periodisch (etwa alle 1,9 Sekunden) die Schwimmrichtung, während für Δ*zomB* keine Richtungswechsel mehr festgestellt werden konnten. Zellen, in denen *zomB* deletiert wurde, verlieren also die Fähigkeit die Rotation der Flagelle von CCW zu CW zu ändern und verbleiben so in einem arretierten Zustand des Vorwärtsschwimmens. Dies deutet auf einen Einfuss von ZomB auf die Interaktion der C-Ringproteine mit dem Chemotaxissystem hin. Eine direkte Interaktion zwischen ZomB und den möglichen Bindungspartnern FliF, FliM, FliN und CheY konnte jedoch nicht gezeigt werden [29].

In *S. putrefacies* CN-32 ist das wegweisende Protein (*landmark protein*) HubP für die korrekte Lokalisation des Chemotaxissystems, der Chromosomensegregation und anderer zellulärer Prozesse, die am Zellpol stattfinden verantwortlich [172,208,232]. Auch ZomB lokalisiert abhängig von HubP am Zellpol und die Interaktion mit HubP schützt ZomB zusätzlich direkt oder indirekt vor einer Degradation. ZomB beeinflusst weder die Assemblierung noch die Lokalisation der Chemotaxismaschinerie und beeinträchtigt auch nicht die Signaltransduktion bis zum Regulationsprotein CheY~P, welches direkt an den Flagellenmotor bindet [29]. Damit ergibt sich

für ZomB ein hypothetischer Regulationsmechanismus, in dem es die korrekte Interaktion zwischen CheY~P und FliM/FliN, welche den Wechsel der Rotationsrichtung auslöst, vermittelt. Eine mögliche Alternative dazu wäre eine Interaktion mit FliG, welche die Position der Interaktionsfläche zwischen FliG und dem Stator verändert. Da ZomB keinen Einfluss auf das laterale Flagellensystem zeigt und weder ZomB noch CheY~P an $FliM_2$ binden [29,33], welches die geringste strukturelle Übereinstimmung zwischen den Motorkomponenten des polaren und lateralen Flagellensystems zeigt [32], ist FliM der naheliegenste Kandidat für eine Interaktion mit ZomB. Durch die Notwendigkeit des Vorhandenseins von ZomB um die Rotationsrichtung zu wechseln, ergibt sich für die Zelle eine Möglichkeit die Effizienz der Chemotaxis in Abhängigkeit von intrazellulären oder extrazellulären Signalen zu steuern. So kann etwa über einen Stimulus, wie die Bindung intrazellulärer Moleküle, die direkete Interaktion von ZomB mit dem Motor oder CheY ausgelöst werden. Alternativ kann auch die Menge an ZomB reguliert werden, zum Beispiel über den aktuellen Zustand der Zelle in Bezug auf Nährstoffe und das Energielevel, die Verfügbarkeit von Sauerstoff oder das Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Metabolite. Auf der anderen Seite führt eine stochastische Verteilung von ZomB bei gleichen Umweltbedingungen zu einer heterogenen Population in Bezug auf das chemotaktische Verhalten, was die Ausbreitungseffizienz der Gesamtpopulation in Folge dieser *bet-hedging*-Strategie maximieren würde [29,223].

1.2 Cyclisches Diguanosinmonophosphat (c-di-GMP)

Bereits Mitte der 1980iger Jahre entdeckte die Arbeitsgruppe um Moshe Benziman bei der Erforschung des Biosynthesewegs der Zellulose in *Gluconacetobacter xylinus* (später *Acetobacter xylium* und aktueller Name *Komagataeibacter xylinus*) ein ungewöhnliches Guanyloligonucleotid. Dieses Oligonucleotid wurde als Aktivator der Zellulosesynthase identifiziert und als bis 3´-5´-cyclische Diguanylsäure (c-di-GMP) charakterisiert und synthetisch produziert. Durch reversible Bindung von c-di-GMP an eine regulatorische, sich abseits der katalytisch aktiven befindlichen Bindestelle der Zellulosesynthase wird deren Aktivität allosterisch reguliert [174,176]. Seither wurden neben Diguanylatzyklasen (DGC´s) und Phosphodiesterasen (PDE´s), die der Synthese und Hydrolyse von c-di-GMP dienen (siehe 1.2.1 Regulation des intrazellulären c-di-GMP-Spiegels), auch weitere regulatorische Proteine mit c-di-GMP-abhängiger Funktion beschrieben. Insgesamt wurden in einer Vielzahl an Mikroorganismen verschiedene Mechanismen identifiziert und analysiert, bei denen der ubiquitäre Botenstoff c-di-GMP, auch als *second messenger* bezeichnet, eine wichtige Funktion besitzt. So werden der Wechsel zwischen Virulenz und Resilienz, das Fortschreiten des Zellzyklus bzw. die Differenzierung und das Anpassen des Lebensstils an äußere Bedingungen, also der Wechsel zwischen einem sessilen und einem motilen Lebensstil, und weitere Prozesse abhängig von c-di-GMP reguliert [49,82,83,169,168,210]. In den folgenden Kapiteln werden beispielhaft einige Proteine und Regulationsmechanismen beschrieben, die in den Experimenten zu dieser Doktorarbeit Anwendung fanden und zum grundlegenden Verständnis beitragen.

1.2.1 Regulation des intrazellulären c-di-GMP-Spiegels

Die Arbeitsgruppe um Benziman hat nicht nur c-di-GMP entdeckt und beschrieben sondern auch die Enzyme, die für die Synthese und Hydrolyse von c-di-GMP verantwortlich sind. So etablierten sie den biochemischen Reaktionsweg, der der Synthese und Hydrolyse zugrunde liegt. Sie reinigten die erste Diguanylatzyklase (DGC) und die erste c-di-GMP-abhängige Phosphodiesterase (PDE) auf. Die DGC aus *G. xylinus* synthetisiert aus zwei Molekülen GTP über das Zwischenprodukt

Diguanosintetraphosphat Gp4G ein Molekül cyclisches di-GMP. Die Hydrolyse von c-di-GMP durch die Phosphodiesterase A (PdeA) erfolgt in zwei Stufen. Zunächst wird eine einzelne 3´-5´-Phosphodiesterbindung gespalten, wobei ein inaktives lineares Dinukleotid pGpG entsteht, welches anschließend durch ein zweites Enzym, eine nicht spezifische PDE (PdeB), zu 5´-GMP umgesetzt wird [174–176]. Später wurden Genomstudien durchgeführt und die Sequenzen der gefundenen Enzyme genauer analysiert. Sie identifizierten hierbei sowohl die GGDEF- als auch die EAL-Domäne in den beiden Enzymen DGC und PdeA [209]. Durch weitere Genomstudien und Untersuchungen postulierten sie, dass Proteine, die die GGDEF-Domäne tragen, als Diguanylatzyklasen fungieren und die EAL-Domäne für diese Aktivität nicht benötigt wird [9]. Überproduktionsstudien mit GGDEF- und EAL- Domänenproteinen zeigten später, dass die Proteinfunktion von EAL-Domänenproteinen entgegengesetzt zu der Funktion von GGDEF-Domänenproteinen ist und dieser entgegenwirkt. EAL-Domänenproteine können also Phosphodiesteraseaktivität besitzen und ebenfalls unabhängig von einer GGDEF-Domäne funktional sein [193]. Dabei stellte die Tatsache, dass die DGC, die die Synthese von c-di-GMP aus zwei Molekülen GMP katalysiert, und die PdeA, die die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung katalysiert, dieselbe Anordnung an GGDEF- und EAL-Domänen zeigen, ein Rätsel dar. Theoretisch gibt es zwei mögliche Szenarien, die dies erklären könnten. Zum einen könnte immer nur eine Domäne in den GGDEF-EAL-Tandemproteinen aktiv sein, während die andere inaktiv ist. Es gibt zahlreiche Beispiele die zeigen, dass im Laufe der Evolution enzymatische Domänen ihre katalytische Funktion eingestellt und dafür alternative Funktionen übernommen haben. Dazu zählen häufig das Wahrnehmen (*sensing*) von früheren Substraten und Produkten oder aber das Einnehmen einer Funktion in einer neuen Protein-Protein- oder Protein-Polynukleotid-Interaktion. In dem zweiten Szenario sind beide Domänen des GGDEF-EAL-Tandems katalytisch aktiv, werden aber je nach äußeren Einflüssen oder intrazellulären Signalen unterschiedlich reguliert, sodass unter bestimmten Bedingungen die eine Aktivität sich gegenüber der anderen durchsetzt [67]. Obwohl fast die Hälfte aller bisher beschriebenen GGDEF-EAL-Tandemproteine intakte aktive Zentren (*active sites)* besitzen [190], sind nur wenige Beispiele für wirklich bifunktionale DGC´s/PDE´s bekannt. Eine solche bifunktionale Diguanylatzyklase-Phosphodiesterase ist zum Beispiel das Bacteriophytochrom BphG1 aus *Rhodobacter* [211]. Neben der möglichen Bifunktionalität und dem häufig gemeinsamen Auftreten von GGDEF- und EAL-Domänenproteinen, wirft auch die schiere Anzahl dieser Proteine in manchen Organismen Fragen zu deren Regulation und der Steuerung von c-di-GMP-abhängigen zellulären Prozessen auf. *P. aeruginosa* zum Beispiel besitzt 17 GGDEF-, 16 GGDEF-EAL- und 5 EAL-Domänenproteine [5]. Ein nahe verwandter Organismus zu *Shewanella putrefaciens* CN-32, *Shewanella oneidensis,* besitzt 30 GGDEF-, 22 GGDEF-EAL- und 5 EAL-Domänenproteine [5]. Das Vorkommen der Gene, die für die Enzyme zur Synthese und Hydrolyse von c-di-GMP oder Effektoren codieren, in diesen und weiteren Modellorganismen, deren Genom komplett sequenziert wurde, werden in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Vorkommen der Gene, die für GGDEF-, GGDEF-EAL-, EAL-, HD-GYP- und PilZ-Domänenproteine codieren in ausgewählten Modellorganismen, deren Genom komplett sequenziert ist.

Stamm	Gesamtproteine	GGDEF	GGDEF-EAL	EAL/HD-GYP	PilZ
Colwellia psychrerythraea	4.910	34	25	8	7
***Escherichia coli* K12**	4.242	12	7	10	2
Pseudomonas aeruginosa	5.567	17	16	8	8
Rhodobacter spheroides	4.126	9	7	0	1
Shewanella oneidensis	4.467	30	22	14	4
***Shewanella putrefaciens* CN-32**	3.949	20	21	10	5
Vibrio cholerae	3.835	31	10	21	4

Ausgewählte Beispiele aus Supplement zu [5], ergänzt um *S. putrefaciens* CN-32.

Neben den Enzymen zur Synthese und Hydrolyse von c-di-GMP, spielen auch die Rezeptorproteine eine wichtige Rolle bei der Regulation c-di-GMP-abhängiger Mechanismen. Diese Proteine können c-di-GMP binden und als Effektoren agieren, welche dann mit dem finalen *target* interagieren, wodurch es zu einer Veränderung in der Zelle kommt. Bereits die Gruppe um Benziman identifizierte das erste c-di-GMP *target* als Untereinheit der Zellulosesynthase und konnte einen engen Zusammenhang zwischen c-di-GMP-Bindeprotein und der Aktivität der Zellulosesynthase erkennen [174,176]. Dieses c-di-GMP-Bindeprotein wurde später als C-terminale Domäne der BcsA-Untereinheit der Zellulosesynthase identifiziert. Diese Domäne wurde nach einem nur aus dieser Domäne bestehenden Protein, das zur Assemblierung der Pili in *P. aeruginosa* benötigt wird und Teil des *pil*-Operon ist, PilZ benannt [2,5]. PilZ besteht aus einer einzigen Domäne aus 118 Residuen und zeigt eine signifikante Sequenzähnlichkeit zum C-Terminus von BcsA [5]. Effektorproteine kommen in vielen Organismen ebenfalls in höherer Anzahl vor. So besitzt *P. aeruginosa* zum Beispiel acht und *S. oneidensis* vier Proteine, die eine PilZ-Domäne aufweisen. Neben der PilZ-Domäne existieren noch weitere Domänen, die für c-di-GMP-abhängige Signalwege eine Rolle spielen, wie enzymatisch inaktive GGDEF- und EAL-Domänen [57,131], Transkriptionsaktivatoren wie FleQ [76] oder Riboswitches [206]. In Abbildung 4 ist eine Übersicht eines solchen Netzwerks zur c-di-GMP-abhängigen Regulation der Motilität in einer hypothetischen Zelle schematisch dargestellt.

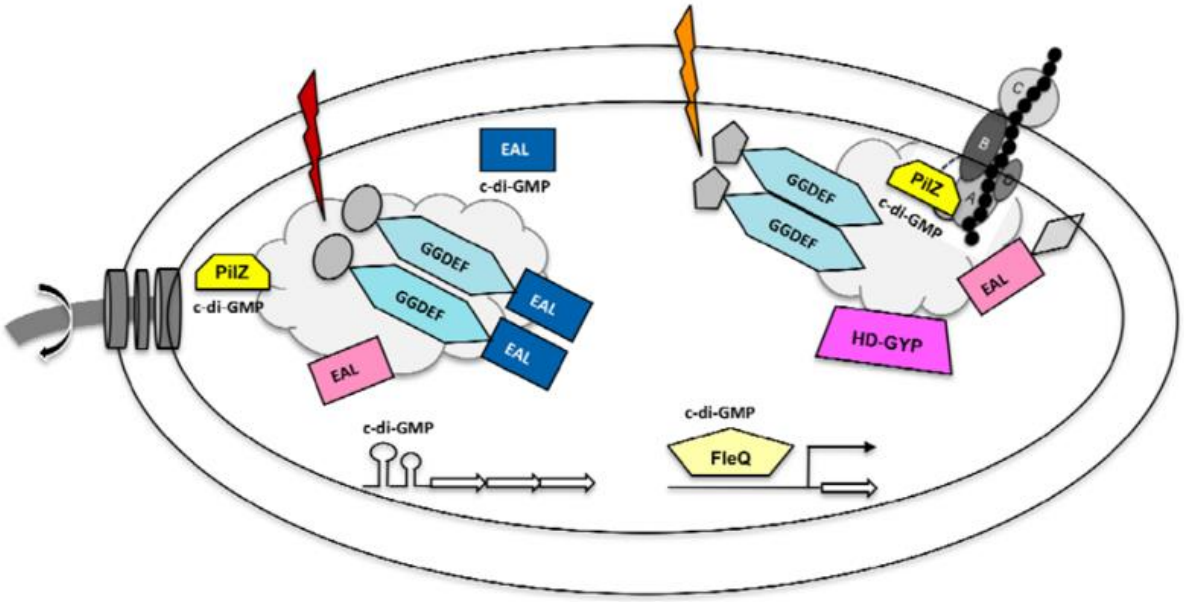

Abbildung 4: C-di-GMP-abhängige Signalwege zur Regulation der Motilität. Schematische Darstellung verschiedener c-di-GMP-abhängiger Regulationsmechanismen in einer hypothetischen Zelle. Wolken um PDE´s, DGC´s, Effektorproteine und *targets* stellen lokale c-di-GMP-Gradienten dar. Die Blitze stellen ein Umweltsignal dar, das die Aktivität der Pde´s und DGC´s reguliert. Die dadurch entstehenden lokalen c-di-GMP-Gradienten werden von Effektorproteine, hier durch PilZ-Domänenproteine repräsentiert, wahrgenommen. Die Effektorproteine interagieren anschließend mit den eigentlichen *targets*, hier der Flagelle und dem Pilus, wodurch diese positiv oder negativ reguliert werden. Ein Riboswitch und der Transkriptionsfaktor FleQ sollen eine mögliche Regulation der Transkription von Flagellengenen veranschaulichen. Aus Gomelsky (2009) in *The second messanger cyclic di-GMP* [67].

Damit ergibt sich für c-di-GMP-abhängig regulierte Signalwege innerhalb der Zelle die Notwendigkeit einer strikten zeitlichen und räumlichen Trennung der verschiedenen regulatorischen Netzwerke, um eine mögliche Überschneidung und somit Fehlleitung der Signale aufgrund der Vielzahl an beteiligten Enzymen, Effektoren und Zielen zu vermeiden. Eine spezielle Gruppe der c-di-GMP-Rezeptoren wird in Kapitel 1.2.3 PilZ-Domänenproteine genauer beschrieben.

1.2.2 Einfluss von c-di-GMP auf den Lebensstil

Bakterien können zwischen einem motilen und einem sessilen Lebensstil wechseln. Je nach äußeren Bedingungen ist einer der Lebensstile im Vergleich zum anderen von Vorteil. Die Fähigkeit motiler Bakterien in wässrigen Medien zu Schwimmen bietet einen großen Vorteil in Anbetracht ihrer Fitness. Denn motile Bakterien können sowohl auf chemische Lockstoffe als auch auf Abwehrstoffe reagieren und damit die Nährstoffversorgung sicherstellen und nicht optimale Umgebungen vermeiden, indem sie neue Lebensräume kolonisieren. Auch das Leben in einem Biofilm bietet Vorteile. Ein charakteristisches Merkmal eines Biofilms ist zum Beispiel seine Toleranz gegenüber verschiedenen Arten von antimikrobiellem Stress. So können in einem Biofilm eingebettete Bakterien eine bis zu 1000fach höhere Toleranz gegenüber einer antimikrobiellen Substanz zeigen als in planktonischer Kultur [65,202]. Die Präsenz einer langsam wachsenden Subpopulation im Inneren des Biofilms, das erschwerte Eindringen der antimikrobiellen Substanzen in den Biofilm und biofilmspezifische Genexpressionsmuster scheinen zur antimikrobiellen Toleranz im Biofilm beizutragen [114,202,203]. Auch die Toleranz gegenüber physikalischem Stress ist im Biofilm erhöht.

Zum Beispiel speichert der Biofilm Feuchtigkeit und verringert so die Gefahr einer Austrocknung der Zellen [35]. In Multispezies-Biofilmen können auch Nährstoffvorteile entstehen, da sich Spezies mit unterschiedlichen Stoffwechseln zusammen tun und sich so gegenseitig durch Koprodukte, die dem anderen als Substrat dienen, versorgen können. Zum Beispiel kommen in Abwässern häufig Biofilme aus nitrifizierenden Bakterien vor, wobei ammoniumoxidierende Bakterien Nitrit produzieren, welches von nitritoxidierenden Bakterien als Substrat genutzt wird [4,94,182]. Auch die Effizienz von horizontalem Gentransfer kann im Biofilm deutlich erhöht werden. So wurde gezeigt, dass die örtliche Stabilität den Austausch von Plasmiden per Konjugation erleichtert. Dies konnte sowohl für Plasmide mit Resistenzen gegen Antibiotika als auch für katabolische Gene gezeigt werden [134,138]. Zusammenfassend lassen sich also viele Vorteile sowohl für das Leben in einem Biofilm als auch für freischwimmende Zellen feststellen. Freischwimmende Bakterien können besser neue Umgebungen entdecken, besiedeln und somit die Ausbreitung sicherstellen, während Zellen im Biofilm besser nicht optimale Bedingungen tolerieren können und somit eine höhere Wahrscheinlichkeit zum Überleben aufweisen. Ein Faktor, der bei der Transition zwischen diesen beiden Lebensstilen eine wichtige Rolle spielt, ist c-di-GMP. Die Biofilmformation ist ein Entwicklungsprozess, der aus mehreren Stufen besteht und bei vielen verschiedenen Spezies gleich abläuft. Diese Stufen bestehen aus der Anhaftung an einer Oberfläche, der Bildung von Zellaggregaten, sogenannten Mikrokolonien, und dem aktiven Austritt von Zellen aus dem Biofilm, auch Dispersion genannt [143,183]. Die Bildung eines strukturierten Biofilms von *P. aeruginosa* setzt zunächst die Bildung eines Zellaggregates auf einer Oberfläche voraus. Dabei migrieren Zellen aus der motilen Subpopulation an die Oberfläche einer nicht-motilen an einer Oberfläche sitzenden Population (*stalk*) und formen so eine pilzähnliche Struktur [97]. Für viele Oberflächenstrukturen verschiedener Bakterien konnte gezeigt werden, dass sie eine Rolle beim Anhaften an Oberflächen und somit bei der Biofilmbildung spielen. Während der initialen Phasen der Biofilmbildung können Zellen ihr Anhaften an der Oberfläche von einem reversiblen in einen irreversiblen Zustand ändern. Dieser Wechsel wird durch alternative Oberflächenstrukturen bedingt. Die Flagelle zum Beispiel trägt bei *E. coli*, *P. aeruginosa*, *V. cholerae* und weiteren motilen Spezies zum initialen reversiblen Anhaften an eine Oberfläche bei [157]. Es wird vermutet, dass die Flagelle die Oberfläche des Bakteriums vergrößert, wodurch die Interaktionsfläche maximiert wird. Für manche Spezies wie *E. coli* und *P. aeruginosa* konnte auch gezeigt werden, dass sie mit der Spitze ihrer Flagellen an abiotische Oberflächen anhaften können [144,157,227]. Auch verschiedene Fimbrien und Pili tragen zur Anheftung an Oberflächen bei. So spielen die Typ4-Pili in *P. aeruginosa*, *curli* in *E. coli* und der mannosesensitive Pilus in *V. cholerae* eine wichtige Rolle als Adhäsionsfaktoren [96,158,226].

Die intrazelluläre c-di-GMP-Konzentration reguliert eine Vielzahl an zellulären Prozessen wie die Motilität, die Pilusausbildung, die Biofilmbildung und auch die Photosynthese [79,95,193,214]. Während in verschiedenen Organismen diverse biochemische Prozesse in Abhängigkeit von unterschiedlichen extrazellulären Signalen durch c-di-GMP reguliert werden, je nach ihrer physiologischen und umwelttechnischen Nische, so kontrolliert dieser *second messenger* generell den Übergang von motilem zu sessilem Wachstum [168]. Hohe intrazelluläre c-di-GMP-Spiegel lösen die Biofilmbildung aus, während niedrige c-di-GMP-Spiegel die Motilität fördern. So resultiert zum Beispiel eine Mutation im Gen des Antisigmafaktors WspF in *P. aeruginosa* in der Bildung einer rauen kleinen Kolonievariante auf festem Medium [75]. Diese Mutation führt zu einer Stimulation der DGC WspR und somit zu einem erhöhten intrazellulären c-di-GMP-Spiegel [48]. Diese wiederrum

induziert eine gesteigerte Biofilmbildung und eine Induktion von Biofilmmatrixkomponenten wie Pel- und Psl-Polysacchariden [196]. Zusammenfassend ist die Biofilmbildung eng mit c-di-GMP-Signalwegen verbunden. Dabei spielt die positive Kontrolle der Eps-Bildung eine große Rolle sobald die Zellen an eine Oberfläche angeheftet sind. Die c-di-GMP-Signalwege regulieren gleichzeitig wichtige planktonische Phänotypen und tragen dazu bei, dass Zellen einen Biofilm verlassen und wieder zum planktonischen Lebensstil übergehen können. Bakterien zeigen bemerkenswerte Fähigkeiten, alternative Mechanismen zu nutzen, um sich passiv oder unterstützt durch Flagellen und Pili [86,111] in verschiedenen Umgebungen zu bewegen [80]. Nachdem Bakterien eine neue Nische entdeckt haben, muss die Zelle dies schnell erkennen und in einen sessilen Lebensstil übergehen, um diesen neuen Lebensraum effektiv zu besiedeln. Bei diesem Übergang spielt c-di-GMP durch die Kontrolle der Motilität eine wichtige Rolle. Dabei verläuft die Transition in mehreren Schritten. Alle motilen Objekte mit einem Motor können folgende Zustände haben: i) in eine bestimmte Richtung in Bewegung sein (*run*), ii) stationär aber mit laufendem Motor (*tumbles* or *reversals*), iii) frei beweglich aber mit Motor aus, iiii) stationär mit ausgeschaltetem Motor [42]. Für c-di-GMP konnte bereits ein Einfluss auf die Expression und Funktion von Flagellen- und Pilussystemen gezeigt werden. So sind die Hauptregulatoren der Flagellenexpression, die Transkriptionsfaktoren und alternativen Sigmafaktoren ein potentieller Eingriffspunkt für die c-di-GMP-Signalwege [42]. Das wohl am besten charakterisierte Beispiel hierfür stellt der flagellare Hauptregulator Sigmafaktor54 FleQ in *P. aeruginosa* [7] und seine Homologe FlrA und FlaK in Vibrio spp. [119] dar. FleQ reguliert in *P. aeruginosa* die Flagellenbiosynthese positiv und die Produktion von Pel-Polysacchariden negativ, solange FleQ kein c-di-GMP gebunden hat [76]. Ein weiterer Angriffspunkt für die c-di-GMP-Signalwege zur Regulation der Flagellenfunktion ist der Flagellenmotor. Hierzu werden einige Beispiele in Kapitel 1.1.4 Regulation des Flagellenmotors genannt und im nächsten Kapitel 1.2.3 PilZ-Domänenproteine zwei Beispiele für eine solche Regulation anhand der PilZ-Domänenproteine YcgR aus *E. coli* und FlgZ aus *P. aeruginosa* genauer beschrieben.

1.2.3 PilZ-Domänenproteine

C-di-GMP ist ein weitverbreiteter *second messenger,* der eine Vielzahl an zellulären Prozessen reguliert, darunter DNA-Reparatur, Transkription, mRNA-Abbau, Motilität, Protein- und Polysaccharid-sekretion, Zellentwicklung und Biofilmbildung [47,84,170,213]. Die zellulären Antworten auf c-di-GMP-Signale werden durch spezifische Regulatoren vermittelt, zu welchen zwei Sorten von Riboswitches und eine große Anzahl von c-di-GMP-bindenden Proteinen gehören. Die Strukturen und Fähigkeiten zur Ligandenbindung von solchen c-di-GMP-Bindeproteinen, die bereits experimentell charakterisiert wurden, sind in mehreren Reviews zusammengefasst [36,43,126]. In den letzten Jahren kamen weitere neue c-di-GMP-Bindeproteine hinzu, von denen einige wie MshEN weitverbreitet sind [167,225] und andere eine relative enge phylogenetische Verteilung aufweisen [56,141]. Der erste c-di-GMP-Rezeptor der identifiziert wurde, ist der C-Terminus der Zellulosesynthase BscA aus *G. xylium* (aktueller Name *Komagataeibacter xylinus*) [5]. Studien zu diesem Protein führten erst zur Entdeckung von c-di-GMP [171,176]. Diese Arbeit beschrieb weitere PilZ-Domänen-besitzende Proteine mit unterschiedlichen Strukturen, darunter PilZ-Dimere, Fusionen von PilZ-Domänen mit einer N-terminalen PilZN-Domäne (auch als YcgR-N-Domäne bezeichnet, PF07317) und PilZNR (YcgR_2,PF12945), eine Fusion mit einem HlyD-Familien-Sekretionsprotein

in dem Alginatbiosyntheseprotein Alg44 und auch Fusionen von PilZ-Domänen mit REC-, GGDEF-, EAL-, HD-GYP-Domänen, Chemorezeptoren aus dem MCP-Signalweg und CheC-Signaldomänen [5]. Anschließende Studien von mehreren PilZ-Domänenproteinen bestätigten die Fähigkeit dieser Domäne, c-di-GMP zu binden und eine Vielzahl an c-di-GMP-regulierten Funktionen zu übernehmen [15,142,177,178]. Verschiedene PilZ-Domänenproteine können c-di-GMP mit einer großen Spanne von Affinitäten binden, was zu einer großen Diversität an c-di-GMP-Signalwegen beiträgt [160]. Kurioserweise ist das namensgebende Protein PilZ aus *P. aeruginosa* nicht dazu in der Lage c-di-GMP zu binden [2,121]. Über die Jahre wurden die Strukturen einiger PilZ-Domänenproteine wie zum Beispiel PlzD aus *V. cholerae*, MapZ aus *P. aeruginosa* und MotI aus *B. subtilis* aufgeklärt [15,164,204]. Dadurch konnten wichtige Rückschlüsse über die c-di-GMP-Bindefähigkeit und die Rollen der konservierten RxxxR und (D/N)xSxxG c-di-GMP-Bindemotive abgeleitet werden [36,43]. Vergleichende Analysen von PilZ-Sequenzen und Strukturen ermöglichten die Identifikation weiterer konservierter Merkmale in PilZ-Domänen und die Klassifikation in drei Hauptklassen von PilZ-Domänenproteinen. Dabei entwickelten sich Multidomänenfusionsproteine mit kanonischen PilZ-Domänen, tetramere PilZ-Domänenproteine und Zwei-Domänen-PilZ-Proteine aus diversen N-terminalen Domänen mit C-terminalen kanonischen PilZ-Domänen [63]. In Abbildung 5 sind Kristallstrukturen verschiedener PilZ-Domänenproteine dargestellt.

In der konstant wachsenden Liste von c-di-GMP-Bindeproteinen besitzen PilZ-Domänenproteine eine einzigartige Position, nicht nur als der erste c-di-GMP-Rezeptor der identifiziert und charakterisiert wurde [5,15,164,178], sondern auch, weil sie zusammen mit den kürzlich beschriebenen MshEN [167,225] und den inaktivierten GGDEF- und EAL-Domänen die einzigen wirklich weit innerhalb der Bakterien verbreiteten c-di-GMP-Bindedomänen darstellen. Andere c-di-GMP-Rezeptoren hingegen haben nur relativ enge phylogenetische Verteilungen und viele von ihnen haben die Fähigkeit, c-di-GMP zu binden, vermutlich als spezifische zusätzliche Adaptionen innerhalb ihrer Proteinsuperfamilien erlangt. Beispiele hierfür sind eine Histidinkinase und ein CheY ähnliches Protein in *C. crescentus* und der Transkriptionsfaktor FleQ in *P. aeruginosa* [56,117,141].

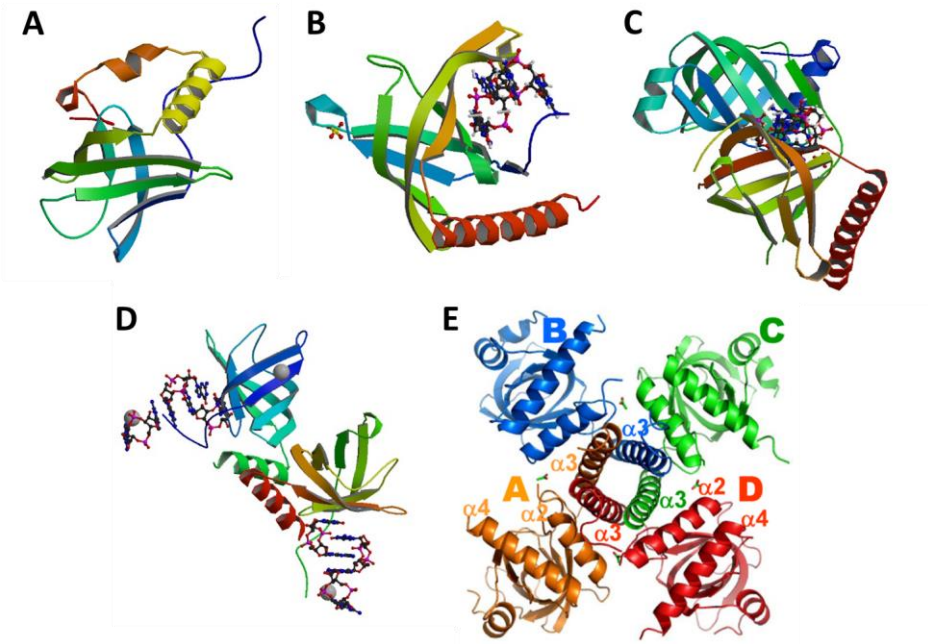

Abbildung 5: Struktureller Aufbau verschiedener PilZ-Domänenproteine. PilZ-Domänen bestehen aus sechs β-Faltblättern, die ein β-*barrel* formen, und einer C-terminalen α-Helix [63]. Der strukturelle Aufbau der Proteine wurde der Proteindatenbank PDB [20] entnommen und wird durch einen Farbverlauf von blau (N-Terminus) nach rot (C-Terminus) veranschaulicht. **A)** Kristallstruktur von MapZ aus *P. aeruginosa* [164]. MapZ ist ein kanonisches PilZ-Domänenprotein mit einer langen C-terminalen α-Helix [63]. **B)** Kristallstruktur der PilZ-Domäne von YcgR aus *E. coli* mit gebundenem Liganden (c-di-GMP) [78]. Die PilZ-Domäne von YcgR weist eine kürzere C-terminale α-Helix auf als kanonische PilZ-Domänenproteine. **C)** Kristallstruktur von YcgR aus *E. coli* mit gebundenem Liganden (c-di-GMP) [78]. YcgR ist ein PilZ-Domänen-Fusionsproteinen und weist neben der C-terminalen PilZ-Domäne noch eine N-terminale YcgR-N-Domäne auf. Durch die Bindung von c-di-GMP unterläuft YcgR einer Konformationsänderung, wodurch die beiden Domänen in engere räumlichere Nähe gebracht werden [78]. **D)** Kristallstruktur der beiden PilZ-Domänen von Alg44 aus *P. aeruginosa* mit gebundenen Liganden (c-di-GMP) [41]. Alg44 weist N-terminale PilZ-Domänen auf, die eine Tandemduplikation einer kanonischen PilZ-Domäne darstellt. Als solche besitzen diese PilZ-Domänen auch eine lange C-terminale α-Helix, die sich durch eine hohe Anzahl an geladenen Aminosäuren auszeichnet und zur Protein-Protein-Interaktion, in diesem Fall zur Bildung eines Homodimers, genutzt wird [63]. **E)** Kristallstruktur der PilZ-Domänen eines tetrameren PilZ-Domänenproteins (tPilZ) aus *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) [110]. Vier Protomere von XCC6012 bilden über starke hydrophobe Wechselwirkungen ein stabiles, symmetrisches Tetramer [110].

PilZ-Domänen bestehen aus sechs β-Strängen und einer C-terminalen α-Helix und finden sich in den Genomen vieler Bakterienstämme. Die β-Stränge sind dabei als zwei antiparallele β-Faltblätter angeordnet, die ein β-*barrel* formen. Die großflächige Verteilung innerhalb der Stämme und ihr Vorkommen in sehr früh entstandenen Stämmen wie *Aquificae* und *Thermotogae* legen nahe, dass diese Form von PilZ-Domänenproteinen die ursprüngliche Form ist, weshalb sie auch als kanonisch bezeichnet wird [63]. Strukturvergleiche zeigen das Vorkommen derselben kanonischen Variante von PilZ-Domänen in Proteinen wie BcsA, YcgR, MotI und MrkH, bei denen die PilZ-Domäne die C-terminale Domäne darstellt. In Alg44 stellt die PilZ-Domäne die N-terminale Domäne dar. Die kanonische PilZ-Domäne unterscheidet sich durch eine lange C-terminale α-Helix, die in den X-PilZ-Domänen-Fusionsproteinen für gewöhnlich nicht vorkommt [63]. Diese Helix ist allerdings in den PilZ-Fusionsproteinen BcsA, Alg44 und PilZ-Dimeren, die eine Tandemduplikation der kanonischen PilZ-Domäne repräsentieren, konserviert und zeichnet sich durch eine hohe Anzahl an

geladenen Aminosäuren, besonders Arginin und Lysin, aus, die vermutlich für Protein-Protein-Interaktionen genutzt werden [63]. So führen Mutationen in dieser Helix in DgrA in *C. crescentus* zu einem abgeschwächten Phänotyp [44] und in YcgR in *E. coli* zum Verlust der Interaktion mit FliM [149]. Während manche alleinstehenden PilZ-Domänenproteine Veränderungen in den konservierten c-di-GMP-Bindemotiven zeigen und teilweise sogar die Fähigkeit zur c-di-GMP-Bindung komplett verloren haben [2,121], zeigen PilZ-Domänen in Fusion mit anderen Domänen diese Veränderungen nicht. Es scheint, als hätten sich die PilZ-Domänen in BscA, Alg44, YcgR, MotI und ähnlichen Proteinen unter strikter Selektion entwickelt und die Fähigkeit c-di-GMP zu binden ihre Funktion in den jeweiligen c-di-GMP-Signalwegen garantiert [63]. Bis auf eine kurze N-terminale α-Helix und die beiden α-helikalen Insertionen in tPilZ, die tetramerbildende Version der PilZ-Domänen, ist diese der kanonischen Version ebenfalls sehr ähnlich. Durch die Interaktion einer dieser zusätzlichen α-Helices bilden vier PilZ-Protomere über starke hydrophobe Wiederholungen ein sehr stabiles Tetramer [110]. Kürzlich wurden durch Sequenz- und Strukturanalysen weitere Varianten von PilZ-Domänen entdeckt, die allerdings nur innerhalb einzelner Phyla, einer Klasse, einer Familie oder sogar nur in einem einzelnen Genus vorkommen. So kommen die Varianten PilZN3 und PilZN4 nur in Spirochäten und Mitgliedern der Aquificae und Fibrobacteres vor, PilZN5 nur in Actinomyceten, PilZN6 in Deltaproteobakterien und PilZN7 in zelluloseabbauenden Clostridien [63]. Im Folgenden werden die beiden PilZ-Domänenproteine YcgR aus *E. coli* und FlgZ aus *P. aeruginosa* und ihr Effekt auf die Motilität genauer beschrieben.

1.2.3.1 YcgR

Ein früher Schritt der Transition von einem motilen zu einem sessilen Lebensstil muss darin bestehen, die Motilität der Zelle zu inhibieren. Die Verknüpfung zwischen c-di-GMP und der Motilität über die Kontrolle der Transkription von Flagellengenen ist bekannt, läuft aber relativ langsam ab und ist deshalb für die Transition unzureichend [76]. Durch die Deletion der Phophodiesterase PdeH bedingte erhöhte intrazelluläre c-di-GMP-Spiegel führen zur Inhibition der Migration von *E. coli* und *Salmonella enterica* in semisolidem Agar. Dieser Phänotyp kann partiell durch eine Inaktivierung des *ycg*R Gens umgekehrt werden [66,101,178]. YcgR besteht aus einer N-terminalen YcgR-N-Domäne und einer C-terminalen PilZ-Domäne. Diese beiden individuellen Dömanen bilden jeweils ein β-*barrel* und sind über einen *loop*, der das konservierte c-di-GMP-Bindemotif RxxxR enthält, miteinander verbunden [78]. Das Binden von c-di-GMP löst eine starke Konformationsänderung aus, welche die YcgR-N-Domäne und die PilZ-Domäne in größere räumliche Nähe bringt [15,78,101,178]. Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie der Mechanismus mit dem YcgR die Flagelle beeinflusst, aussehen könnte. Da kein Unterschied in der Menge an Flagellin oder in der Schwimmgeschwindigkeit der Zellen zwischen dem Wildtyp und der Deletionsmutante von *ycg*R festgestellt werden konnte, wird weder die Stabilität der Flagelle noch die Effizienz des Motors signifikant beeinflusst. Allerdings konnte eine starke CCW-Ausrichtung bei hohem intrazellulärem c-di-GMP-Spiegel (Δ*pdeH*) festgestellt werden. Die zusätzliche Deletion von *ycg*R stellte aber wieder das für den Wildtyp bekannte Verhältnis der Rotationsfrequenzen zwischen CCW und CW her, was auf YcgR als alleinigen Vermittler dieser verstärkten CCW-Ausrichtung hindeutet [59]. YcgR wird in einer anderen Studie als *backstop brake,* also Rücklaufbremse, beschrieben, da dort ebenfalls die starke CCW-Ausrichtung gezeigt, aber zusätzlich auch ein negativer Effekt auf die Schwimmgeschwindigkeit nachgewiesen wurde [149]. Die Frage wie YcgR in seiner c-di-GMP-

gebundenen Form mit dem Flagellenmotor interagiert, wurde bereits 2010 in drei voneinander unabhängigen Studien untersucht, wobei diese zu unterschiedlichen Erkenntnissen führten. Es konnte eine Interaktion von YcgR mit den Motorproteinen MotA [25], FliG und FliM [149] oder nur FliG [59] nachgewiesen werden. Dementsprechend wurden zwei verschiedene Modelle für die YcgR-abhängige Regulation der Motorfunktion postuliert, wonach die Bindung von YcgR an den Motor entweder die Interaktion zwischen den Rotorproteinen FliM und FliG [59] oder dem Rotorprotein FliG und dem Statorprotein MotA [25,149] beeinträchtigt.

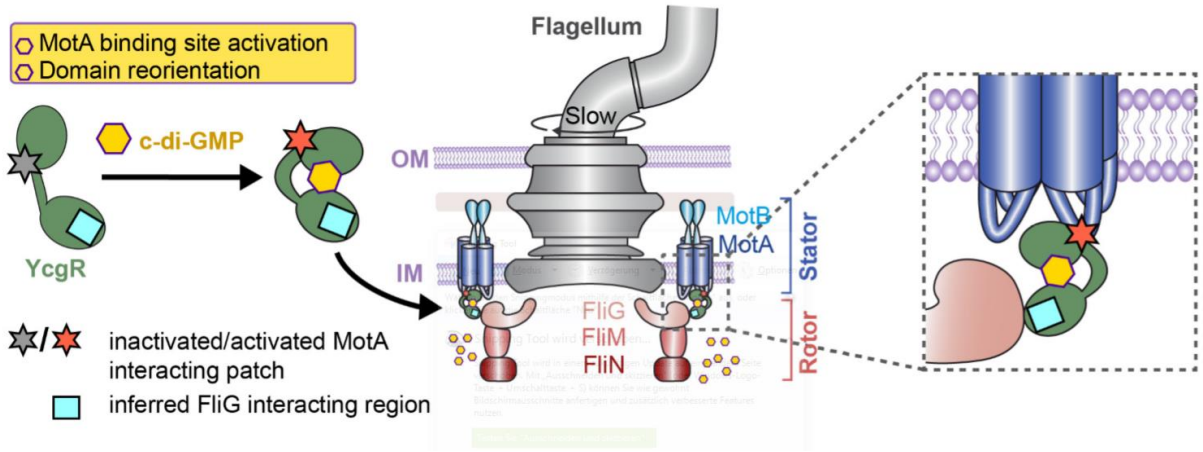

Abbildung 6: Möglicher Regulationsmechanismus von YcgR. Übersicht über die Anordnung des Rotors (rot) und des Stators (blau) im Flagellenmotor. YcgR (grün) unterläuft durch die Bindung von c-di-GMP (gelb) eine Konformationsänderung und geht von einem inaktiven in einen aktiven Zustand über. Diese Konformationsänderung resultiert in einer Annäherung der N-terminalen YcgR-N-Domäne an die C-terminale PilZ-Domäne und der Freigabe der MotA-Interaktionsfläche. Im aktiven Zustand kann YcgR an das Statorprotein MotA binden, wobei es die Interaktionsfläche zwischen MotA und FliG überspannt. Über eine weitere Interaktionsfläche bindet das aktive YcgR zeitgleich an weitere Motorproteine, wobei FliG der bevorzugte Interaktionspartner ist, und interagiert mit diesen. Aus Hou *et al.* (2019) in *Journal of Biological Chemistry* [78].

In einer aktuellen Studie konnte der Regulationsmechanismus nun genauer beschrieben werden, wonach YcgR in seiner c-di-GMP-gebundenen (aktiven) Form sowohl mit dem Stator als auch mit dem Rotor interagiert. Durch die Bindung von c-di-GMP an YcgR kommt es zu einer Konformationsänderung und einer Neuausrichtung der beiden Domänen, wodurch die inaktive Form von YcgR in eine aktive Form übergeht. Diese aktive Form von YcgR bindet über die C-terminale PilZ-Domäne an das Statorprotein MotA, wobei es die Interaktionsfläche zwischen MotA und FliG überspannt. Die N-terminale YcgR-N-Domäne trägt über eine weitere konservierte Region zur Interaktion mit weiteren Motorproteinen, wahrscheinlich FliG, bei. Da sowohl die YcgR-N-Domäne als auch die PilZ-Domäne notwendig sind, um den Energietransfer zwischen Stator und Rotor zu verringern und so die Schwimmgeschwindigkeit herabzusetzen, interagieren beide Domänen vermutlich zeitgleich mit dem Flagellenmotor [78]. In Abbildung 6 ist der postulierte Mechanismus über den YcgR die Flagellenfunktion reguliert dargestellt. Dieser YcgR-c-di-GMP-Mechanismus scheint von *E. coli* während der frühen Stadien in der Transition von einem motilen zu einem sessilen Lebensstil genutzt zu werden, wenn rotierende Flagellen noch benötigt werden. Es wurde bereits gezeigt, dass *E. coli* Zellen mit paralysierten Flagellen signifikant schlechter an abiotische Oberflächen anheften können, als Zellen mit normal funktionierenden oder CCW-ausgerichteten Flagellen [157]. Es konnte gezeigt werden, dass YcgR für die Transition von motil zu sessil in semisoliden Medien sogar noch wichtiger ist als bei Zellen aus planktonischer Kultur, was

eher dem natürlichen Habitat dieses Enterobakteriums, also Schleimhäuten des eukaryotischen Verdauungstrakts und Fäkalien, entspricht [59].

1.2.3.2 FlgZ

Auch in den Pseudomonaden gilt das Paradigma, das ein hoher c-di-GMP-Spiegel mit einem sessilen Lebensstil in Form eines Biofilms und ein niedriger c-di-GMP-Spiegel mit einem motilen Lebensstil assoziiert ist [45,170]. Auch besitzen sie mehrere PilZ-Domänenproteine, wovon das im Folgenden genauer beschriebene FlgZ in allen bisher sequenzierten Pseudomonadengenomen zu finden ist [115]. FlgZ aus *P. putida* konnte aufgereinigt und seine Kristallstruktur bestimmt werden. So konnte auch gezeigt werden, dass FlgZ zwei Moleküle c-di-GMP binden kann und dass diese Bindung den Übergang von einer dimeren zu einer monomeren Form bedingt. Die aktive Form von FlgZ scheint dabei das Monomer zu sein [100]. FlgZ zeigt Homologien zu YcgR, welches die Motilität beeinflusst und als flagellare Rücklaufbremse fungiert [59,101,149,178] und bereits in 1.2.3.1 YcgR beschrieben wurde. FlgZ und YcgR weisen mit einer C-terminalen PilZ-Domäne und einer N-terminalen YcgR-N-Domäne dieselbe Domänenarchitektur auf [63]. Das Gen *flgZ* ist im Flagellenoperon lokalisiert und wird zusammen mit *flgMN* in Abhängigkeit der flagellaren Regulatoren FleQ und FliA kotranskribiert [115]. Eine Mutation bzw. Deletion von *flgZ* führt nicht zu einer Veränderung der Schwimmfähigkeit in *P. putida*. Eine ektopische Überexpression von *flgZ* resultiert hingegen in einer eingeschränkten Motilität. Auch eine Lokalisation von FlgZ unter hohen intrazellulären c-di-GMP-Spiegeln am flagellierten Zellpol deutet auf eine Interaktion mit dem Basalkörper der Flagelle hin [115]. Für *P. aeruginosa* konnte bereits ein Zusammenhang zwischen der c-di-GMP-abhängigen Repression der Schwärmfähigkeit und den flagellaren Statorproteinen MotCD gezeigt werden [103]. *P. aeruginosa* und seine Verwandten unterscheiden sich von vielen anderen flagellierten Bakterien dadurch, dass sie zwei verschiedene Sätze an protonenabhängigen Statoren MotAB und MotCD besitzen [55,219]. Diese beiden Statorsets übernehmen verschiedene Aufgaben, wobei MotCD das Schwärmen über Oberflächen und MotAB das Schwimmen in Flüssigkeiten unterstützt. Das Schwärmverhalten wird durch ein c-di-GMP-Signal angeregt, welches zu einem Austausch der Statoren von MotAB zu MotCD führt [103]. FlgZ interagiert direkt mit der Statoruntereinheit MotC und interagiert nicht mit MotA, da die Lokalisation am flagellierten Pol von der Anwesenheit von MotC abhängt. Sowohl die Interaktion mit MotC als auch die Repression des Schwärmens sind davon abhängig, dass FlgZ c-di-GMP gebunden hat, da ein Aminosäureaustausch in dem konservierten c-di-GMP-Bindemotiv in demselben Phänotyp resultiert wie eine Deletion von *flgZ*. Durch die Interaktion von FlgZ mit MotC wird dessen Zusammenarbeit mit dem Rotor verhindert und ermöglicht so eine schnelle Anpassung des Schwärmverhaltens der Zelle an sich verändernde äußere Bedingungen [11]. In Abbildung 7 ist der Regulationsmechanismus von FlgZ schematisch dargestellt.

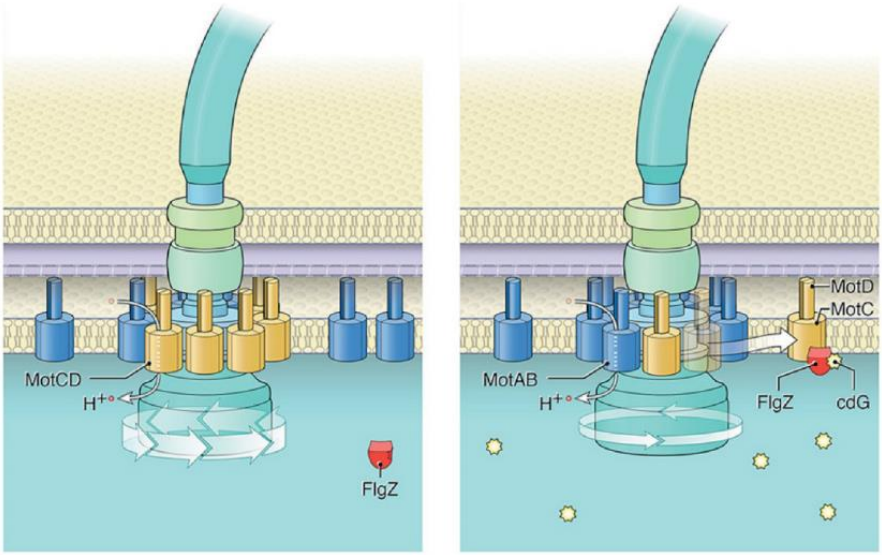

Abbildung 7: Regulationsmechanismus von FlgZ. Links) Übersicht über die Anordnung des Rotors und des Stators. *P. aeruginosa* besitzt zwei verschiedene protonengetriebene Statorsets: MotAB (blau) zum Schwimmen und MotCD (gold) zum Schwärmen. Diese beiden Statorsets können zu variablen Anteilen zur selben Zeit in dem Motorkomplex der polaren Flagelle vorkommen. Unter niedrigen c-di-GMP-Spiegeln diffundiert FlgZ (rot) in seiner c-di-GMP-ungebundenen Form frei im Zytoplasma. **Rechts)** In seiner c-di-GMP-gebundenen Form bindet FlgZ spezifisch an die Statoreinheit MotCD und entkoppelt diese nicht nur vom Rotor, sondern lässt diese aus dem Motor in die umliegende Zellmembran diffundieren, sodass bei hohen c-di-GMP-(cdG)-Spiegeln nur die MotAB-Statoreinheiten die Flagelle antreiben und dadurch das Schwärmverhalten unterdrückt wird. Aus Tusk et al. 2018 in *Journal of Molecular Biology* [221].

1.3 *Shewanella putrefaciens* CN-32

Mitglieder des Genus Shewanella bilden eine diverse Gruppe aus fakultativ anaeroben Bakterien die weltweit verbreitet und sowohl im Salzwasser als auch, im Falle von *S. oneidensis,* im Süßwasser zu finden sind [72,224]. Kennzeichnend für viele Shewanellen ist ihre Fähigkeit, bei der Abwesenheit von Sauerstoff eine Vielzahl an verschiedenen finalen Elektronenakzeptoren nutzen zu können, was es ihnen ermöglicht in diversen Habitaten zu überleben [72]. So wurden Shewanellen aus einer Reihe von Umgebungen mit verschiedenen Salzkonzentrationen, Temperaturen und barischem Druck isoliert [72]und sie spielen verschiedene Rollen als opportunistisches Pathogen [77], Symbiont [69], Epibiont und lebensmittelverderbender Organismus [140]. Generell sind Shewanellen Mitglieder der γ-Proteobakterien und gramnegative Stäbchen von 2-3 µm Länge und 0,4-0,7 µm Durchmesser [224]. Der Genus *Shewanella* weist die größte Bandbreite an respiratorischen Organismen auf. Die annähernd 20 organischen und anorganischen Komponenten, die von *Shewanella* als terminale Elektronenakzeptoren genutzt werden können, beinhalten auch einige toxische Elemente und unlösliche Metalle wie zum Beispiel Uranat [34], Chromat [229], Schwefel [152] und Manganoxide [105]. Des Weiteren zeichnet sich die Gattung durch ihr schnelles Wachstum und ihre Fähigkeit, auch bei geringen Temperaturen um die 4°C zu wachsen und sich zu teilen, aus [26,27,224]. Shewanellen sind meist motil und nutzen eine einzelne polare durch Natriumionen angetriebene Flagelle [98,147]. *Shewanella putrefaciens*, der Vertreter der Gattung der in dieser Arbeit als Modellorganismus genutzt wird, wurde erstmals 1931 von ranziger Butter isoliert [51]. *S. putrefaciens* zeichnet sich ebenfalls durch seine vielseitigen respiratorischen Fähigkeiten und Habitate aus, so wurde zum Beispiel eine Beteiligung an der Biomineralisierung von in Sandstein vorkommenden Uranvorkommen belegt [132] und es konnte auch in humanen klinischen Proben

nachgewiesen werden [77,93]. Außerdem besitzt *S. putrefaciens* CN-32 zwei distinkte Flagellensysteme und kann so neben einer natriumionengetriebenen polaren Flagelle auch mehrere protonengetriebene laterale Flagellen ausbilden [147].

1.3.1 Motilität in *S. putrefaciens* CN-32

Ähnlich zu anderen bakteriellen Spezies kann *S. putrefaciens* CN-32 ein komplettes sekundäres Flagellensystem mit einem dazugehörigen Statorsystem MotAB ausbilden. Das sekundäre Flagellensystem dieser Spezies ist homolog zu dem für *V. parahaemolyticus* beschriebenen. Dieser nutzt unter planktonischen Bedingungen eine einzelne natriumionengetriebene polare Flagelle zum Schwimmen, wohingegen er sein induzierbares protonengetriebenes laterales Flagellensystem zum Schwärmen über Oberflächen oder zum Schwimmen in viskosen Medien nutzt [122]. Beide Flagellensysteme in *S. putrefaciens* CN-32 bilden unabhängig voneinander funktionale Flagellen, wobei dynamische Komponenten des Basalkörpers, wie das Rotorprotein FliM oder die Statoren MotAB, des sekundären Systems, und PomAB, des primären Systems, hoch spezifisch für ihren jeweiligen Flagellenmotor sind. Auch hier ist die polare Flagelle durch die Statoreinheit PomAB natriumionengetrieben und die lateralen Flagellen nutzen einen Protonengradienten durch die Statoreinheit MotAB [32]. Obwohl die Operonstrukturen nahe legen, dass das sekundäre Flagellensystem aus einer Duplikation des primären hervorgegangen ist, sind beide Systeme in Hinblick auf die Homologien auf Proteinebene sehr unterschiedlich. So liegen etwa die Identitätslevel durchschnittlich bei 40 %, wobei FliL mit 60 % die höchste und FliM mit 17 % die niedrigste Übereinstimmung zeigen [32]. Auch fehlen im sekundären Flagellengencluster (*cluster II*) einige Gene, die im primären Flagellengencluster (*cluster I*) vorkommen, wie zum Beispiel die Gene, die für das Chemotaxissystem codieren. Deshalb wurde das sekundäre Flagellengencluster in diesem Organismus vermutlich bereits früher erworben und entstand nicht durch eine Duplikation des eigenen primären Genclusters [32]. Das Fehlen der Gene für ein Chemotaxissystem deutet bereits darauf hin, dass das laterale Flagellensystem von *S. putrefaciens* CN-32 nicht durch Chemotaxis beeinflusst wird, was auch experimentell gezeigt werden konnte [172] und die Drehrichtung dementsprechend dauerhaft im Gegenuhrzeigersinn ist [33]. Die Abwesenheit eines sekundären Flagellensystems in einigen Shewanellen deutet darauf hin, dass dieses im Gegensatz zu dem primären Flagellensystem nicht zwingend benötigt wird, da eine einzelne natriumgetriebene polare Flagelle für das Schwimmen in marinen Umgebungen, also dem typischen Habitat der meisten Vertreter dieses Genus [72], ausreichend ist. Dies legt nahe, dass das zusätzliche laterale Flagellensystem eher eine unterstützende Funktion unter bestimmten Umweltbedingungen übernimmt. So können sich Vertreter von *S. putrefaciens* CN-32, die beide Flagellensysteme exprimieren zum Beispiel in Weichagar weiter radial ausbreiten als solche, die nur das polare Flagellensystem exprimieren. Es konnte bislang keine Fähigkeit zum Schwärmen für *S. putrefaciens* CN-32 gezeigt werden [32]. Da diese Fähigkeit jedoch von vielen speziesspezifischen Faktoren abhängt [92], wäre es möglich, dass die dazu nötigen Faktoren noch nicht identifiziert wurden. Es gibt eine Verbindung zwischen dem Metabolismus und der Expression des lateralen Flagellensystem in *S. putrefaciens* CN-32, da dieses bereits während des planktonischen Wachstums in Komplexmedium, nicht aber in Minimalmedium, exprimiert wird [32] und auch nicht erst nach Kontakt mit einer Oberfläche wie zum Beispiel bei *V. parahaemolyticus* [120,122]. Das zusätzliche laterale Flagellensystem trägt nicht zu einer Erhöhung der Schwimmgeschwindigkeit bei aber es verändert das Schwimmmuster indem es das chemotaktische Verhalten der Zellen begünstigt [32]. Während Zellen mit einer einzelnen polaren Flagelle, die durch den *run-reverse-flick*-Mechanismus

navigieren, ihre Neuorientierung anschließend in einem 90° Winkel beginnen ([161,197,230] und Kapitel 1.1.2 Schwimmverhalten und Chemotaxis), ist der Winkel bei *S. putrefaciens* CN-32 Wildtyp-Zellen, die beide Flagellensysteme exprimieren und zusätzlich zu der einzelnen polaren Flagelle noch ein bis drei laterale Flagellen besitzen, im Durchschnitt geringer. Dieser geringere Winkel führt zu einer höheren Richtungsbeibehaltung wodurch die Ausbreitungseffizienz in der Umgebung gesteigert wird [33].

1.3.2 C-di-GMP in *S. putrefaciens* CN-32

Auch in Shewanellen spielt der intrazelluläre c-di-GMP-Spiegel eine wichtige Rolle bei der Transition des Lebensstils von motil zu sessil. Im Genom von *S. putrefaciens* CN-32 sind zehn Gene lokalisiert, die für putative Phosphodiesterasen (PDE´s) und 20 Gene, die für putative Diguanylatcyclasen (DGC´s) codieren. Weiter 21 Gene codieren für potenziell bifunktionale Proteine, die sowohl eine EAL-Domäne als auch eine GGDEF-Domäne aufweisen [173]. Bisher konnte jedoch erst eines dieser Enzyme identifiziert und charakterisiert werden, das einen Effekt auf die Motilität in *S. putrefaciens* CN-32 zeigt. Das Multidomänenprotein PdeB ist eine transmembrane Phoshodiesterase, welche in Abhängigkeit der Nährstoffbedingungen die flagellenbasierte Motilität reguliert. Deletionsmutanten von *pdeB* zeigen einen erhöhten intrazellulären c-di-GMP-Spiegel und eine deutlich geringere radiale Ausbreitung in Weichagar im Vergleich zum Wildtyp [173]. Obwohl PdeB am flagellierten Zellpol lokalisiert beeinflusst es das sekundäre Flagellensystem. Zum einen führt die Deletion von *pdeB* zu einer geringeren Expression des sekundären Flagellensystems und hat somit eine regulatorische Funktion auf transkriptionaler Ebene. Zum anderen beeinflusst PdeB die Schwimmfähigkeit der beiden Flagellensysteme auch posttranslational [173]. In *S. putrefaciens* CN-32 sind fünf Proteine als PilZ-Domänenproteine annotiert, die als Effektoren für solche posttranslationalen Regulationen dienen könnten.

Zielsetzung dieser Arbeit war die Charakterisierung des posttranslationalen Regulationsmechanismus, durch den die Schwimmfähigkeit von Zellen, die nur laterale Flagellen besitzen (Δ*flagP*), negativ beeinflusst wird.

2 ERGEBNISSE

2.1 Regulation der Motilität in *S. putrefaciens* CN-32

Shewanella putrefaciens CN-32 besitzt zwei distinkte zusammenhängende Genregionen, die beide unter nährstoffreichen Bedingungen während logarithmischem Wachstum in planktonischer Kultur und auf Oberflächen exprimiert werden. Die Beiden Flagellencluster werden als *clusterI* (Sputcn32_2556Sputcn32_2605) und *clusterII* (Sputcn32_3447–Sputcn32_3485) bezeichnet [33]. *Cluster I* beinhaltet die Gene, die für die für den Aufbau einer polaren Flagelle benötigten Proteine codieren. Die Expression von *clusterII* führt zur Bildung von ein bis fünf lateralen Flagellen pro Zelle. Diese beiden Flagellensysteme arbeiten synergistisch jedoch ist jedes einzelne alleine voll funktional. Das polare System ist für den Hauptantrieb und damit die Schwimmgeschwindigkeit der Zelle verantwortlich. Das laterale System unterstützt die Richtungsbeibehaltung indem es den Drehwinkel nach einem Richtungswechsel herabsetzt und so zu einer höheren Richtungsbeständigkeit beiträgt [33]. Unter nährstoffarmen Bedingungen wird nur das polare Flagellensystem exprimiert was vermutlich mit der Aktivität der Phosphodiesterase PdeB zusammenhängt. PdeB ist nur unter nährstoffreichen Bedingungen aktiv und hydrolysiert c-di-GMP, wodurch der intrazelluläre c-di-GMP-Spiegel sinkt und die Expression der lateralen Flagellengene aktiviert wird. Im Umkehrschluss kommt es bei hohen intrazellulären c-di-GMP-Spiegeln kaum zur Bildung von lateralen Flagellen [173]. Wurden diese aber erst einmal komplett ausgebildet, so verbraucht die ständige Rotation der Flagellen viel Energie. Aus diesem Grund muss es weitere posttranslationale Regulatoren zur Kontrolle der Flagellenaktivität geben, sodass die Zelle bei ungünstigeren äußeren Bedingungen diese Energie einsparen kann. Derartige regulatorische Elemente, die posttranslational die Aktivität von Flagellen regulieren, sind häufig PilZ-Domänenproteine, die als Kupplung oder als Bremse agieren können (siehe Kapitel 1.2.3 PilZ-Domänenproteine). In *Shewanella putrefaciens* CN-32 sind fünf solcher PilZ-Domänenproteine im Genom annotiert (SputCN32_1553, SputCN32_2212, SputCN32_2813, SputCN32_2815 und SputCN32_3446). Das folgende Kapitel befasst sich mit dem Gen bzw. dem Genprodukt von SputCN32_3446 MotL. Im Rahmen meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass MotL c-di-GMP-abhängig als negativer Regulator spezifisch auf das laterale Flagellensystem wirkt.

Teile der in diesem Kapitel präsentierten Daten wurden gemeinsam mit Patrick Klüber und Tabea Leonhard als Teil ihrer Bachelorarbeiten unter meiner Betreuung erarbeitet.

2.1.1 Das PilZ-Domänenprotein MotL

Das Gen *motL* (SputCN32_3446) liegt im Gencluster, welches für die lateralen Flagellen codiert (SputCN32_3445 bis SputCN32_3485) direkt im Anschluss an die Gene *motA* (SputCN32_3448) und *motB* (SputCN32_3447). Dieser Aufbau des Genclusters mit homologen Proteinen lässt sich auch bei weiteren Vertretern des Genus *Shewanella* mit putativen dualen Flagellensystemen finden (Abbildung 8). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der Art der Regulation der Flagellenaktivität mittels MotL um einen häufig vorkommenden und vermutlich konservierten Mechanismus handelt.

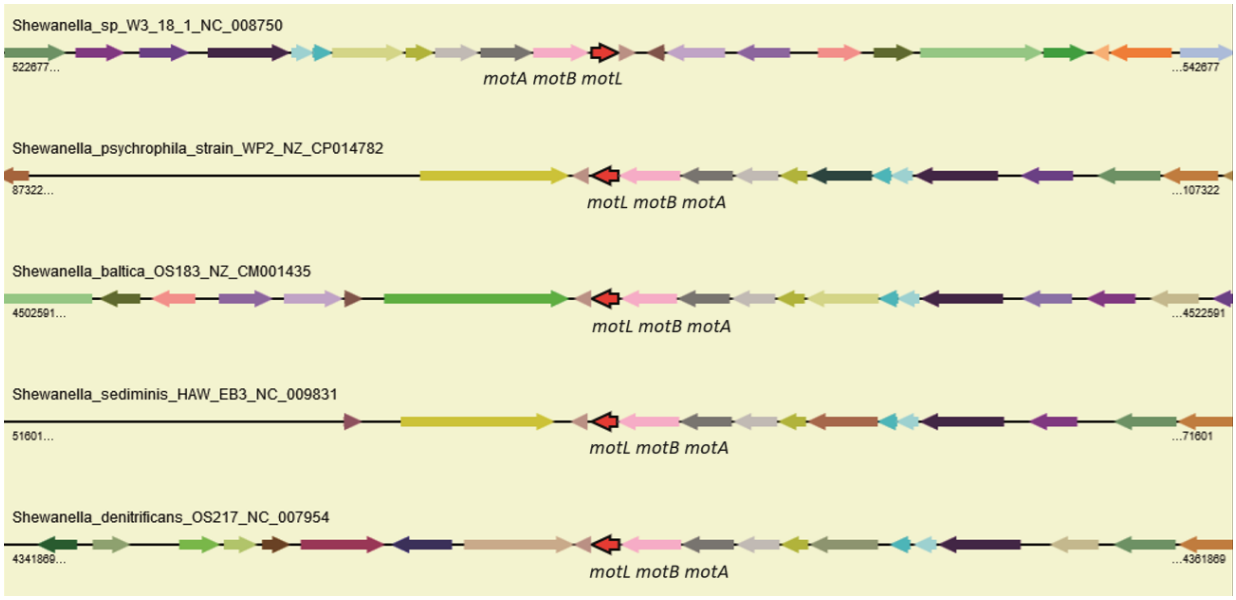

Abbildung 8: Ergebnis der mit EDGAR durchgeführten multiplen Sequenzanalyse. Gesucht wurde nach dem PilZ-Domänenprotein MotL (SputCN32_3446) in allen in der Datenbank (EDGAR [24]) hinterlegten Genomen des Genus *Shewanella*. Homologe Gene wurden mit zwei Ausnahmen (*S. pealeana* und *S. halifaxensis*) in allen Stämmen gefunden, die ebenfalls ein putatives duales Flagellensystem besitzen. Die Anordnung der Gene in diesen Genclustern folgt immer demselben Muster und das homologe Gen zu *motL* (rot) folgt immer auf die Gene für die Statoren *motA* (dunkelgrau) und *motB* (rosa). *Downstream* von *motL* liegt noch ein weiteres Gen, bevor *cluster II* endet. Dieses Gen codiert für ein konserviertes hypothetisches Protein, bei welchem es sich um ein Transmembrandomänenprotein handelt.

MotL weist in seiner Aminosäuresequenz das für PilZ-Domänenproteine typische und stark konservierte Motiv RxxxR_D/NxSxxG auf [36,43] (Abbildung 9). Von dem bereits charakterisierten PilZ-Domänenprotein YcgR aus *E. coli* und *S. enterica* ist bekannt, dass es als Dimer vorliegt und durch die Bindung von c-di-GMP eine Konformationsänderung durchläuft, wodurch es von einer inaktiven in eine aktive Form wechseln kann [15]. FlgZ aus *P. aeruginosa* hingegen liegt in seiner inaktiven Form als Dimer vor und die aktive Form entspricht dem Monomer [100]. Für MotL konnte in einem *bacterial-two-hybrid-assay* gezeigt werden, dass es mit sich selbst interagieren kann (siehe Kapitel 2.1.7.2 *Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid* (BACTH)-System) und dass das besagte PilZ-Domänenmotiv RxxxR und (D/N)xSxxG für die Bindung von c-di-GMP benötigt wird, da MotLAAx, eine Variante in der die konservierten Aminosäuren des Bindemotivs durch Alanine ausgetauscht wurden, nicht mehr dazu in der Lage ist, in einem membranbasierten Ligandenbindungstest c-di-GMP zu binden (Abbildung 9). MotLAAx wird im Folgenden als c-di-GMP insensitive Variante von MotL bezeichnet und als solche in Experimenten verwendet.

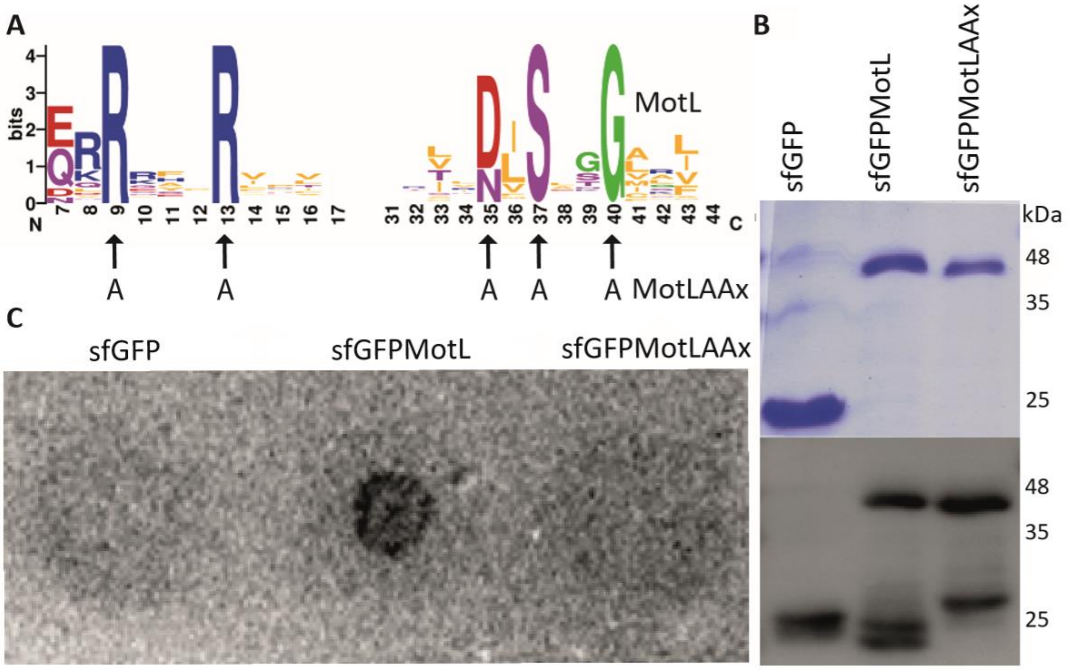

Abbildung 9: C-di-GMP-Bindung von MotL bedarf des konservierten Aminosäuremotivs RxxxR_(D/N)xSxxG. A) Sequenzlogo einiger bekannter PilZ-Domänenproteine (modifiziert aus Galperin und Chou (2019) [63]). Die durch Pfeile hervorgehobenen konservierten Aminosäuren wurden durch Alanine ausgetauscht, um eine c-di-GMP-insensitive Variante von MotL, MotLAAx, zu generieren. **B)** Diese c-di-GMP-insensitive Variante MotLAAx wurde neben sfGFP und sfGFPMotL überproduziert (in Δ*flagP*Δ*motL* mit pBTOK*sfgfp*, pBTOK*sfgfpmotL_pdeH* bzw. pBTOK*sfgfpmotLAAx_pdeH*) und mittels sfgfp-*tag* aufgereinigt. **C)** Die Fähigkeit der aufgereinigten Proteine c-di-GMP zu binden wurde in einem membrangebundenen Ligandenbindungstest mittels radioaktiv markiertem c-di-GMP überprüft [201]. Weder sfGFP noch sfGFPMotLAAx sind im Gegensatz zu sfGFPMotL dazu in der Lage c-di-GMP in einem membranbasierten Ligandenbindungstest zu binden.

2.1.2 Einfluss von MotL auf die Motilität

Die Lokalisation von *motL* im lateralen Flagellencluster legt einen Einfluss von MotL auf die laterale Flagelle und damit auf die Motilität nahe. Das Schwimmverhalten von *S. putrefaciens* CN- 32 wurde zunächst über die radiale Ausbreitung auf Weichagar und anschließend über die Messung der Schwimmgeschwindigkeit einzelner Zellen in planktonischer Kultur bestimmt. Hierzu wurde auf eine Platte mit geringer Weichagarkonzentration je ein Tropfen des zu untersuchenden Stammes aufgebracht, welcher sich anschließend durch Wachstum und Schwimmen der Zellen kreisförmig in und auf dem Agar ausbreitet. Dieser Ausbreitungsradius wurde anschließend ausgemessen und gibt Auskunft über die Schwimmfähigkeit des jeweiligen Stammes auf semisoliden Oberflächen. Zunächst wurde die Auswirkung einer *in-frame*-Deletion von *motL* (Δ*motL*) in verschiedenen Hintergrundstämmen untersucht: Wildtyp (schwimmt mit Hilfe beider Flagellen), Δ*flagP* (schwimmt nur durch laterale Flagellen), Δ*flagL* (schwimmt nur durch polare Flagellen) und Δ*flagP*Δ*flagL* (exprimiert keine Flagelline und ist nicht-motil). Des Weiteren wurde eine Komplementation mit *sfgfpmotL* in Δ*flagP*Δ*motL* auf ihr Schwimmverhalten getestet, um so Rückschlüsse auf die Funktionalität der GFP-markierten Variante von MotL ziehen zu können (Abbildung 10).

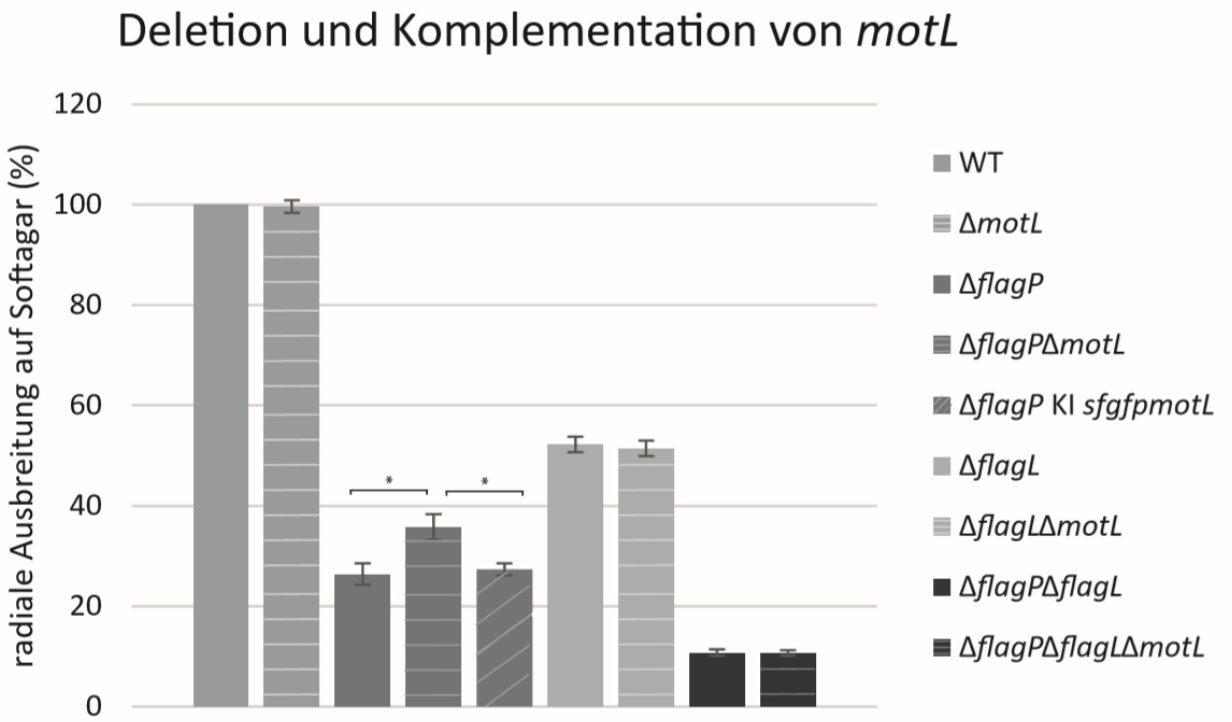

Abbildung 10: Radiale Ausbreitung auf Weichagar nach Deletion und Komplementation von MotL. Die Deletion von *motL* (liniert) hat keinen Einfluss auf die radiale Ausbreitung des Wildtyps (grau). Ebenso zeigt die zusätzliche Deletion von *motL* (liniert) in den Stämmen Δ*flagL* (hellgrau) und Δ*flagP*Δ*flagL* (schwarz) keinen Effekt, was nahelegt, dass MotL keinen Einfluss auf die polare Flagelle ausübt. Die Deletion von *motL* in Δ*flagP* (dunkelgrau liniert) hingegen führt zu einem 10 % größeren Ausbreitungsradius im Vergleich zu dem von Δ*flagP* (dunkelgrau), wodurch ein negativer Effekt von MotL auf das laterale Flagellensystem gezeigt werden konnte. Die Komplementation von Δ*flagP*Δ*motL* mit *sfgfpmotL* (dunkelgrau schraffiert) zeigt, dass die sfGFP-getagte Variante funktional ist und den Ausbreitungsradius wieder in etwa auf den von Δ*flagP* (dunkelgrau) reduziert. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Ein repräsentatives Ergebnis dieser Experimente ist im Appendix in Abbildung 26 zu sehen. Zur statististischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede ($p \leq 0{,}05$) sind durch Sternchen (*) verdeutlicht.

Die Deletion von *motL* hat keinen Einfluss auf die Ausbreitungsradien des Wildtyps, des Stammes der nur funktionale polare Flagellen besitzt (Δ*flagL*) oder des Stammes ohne funktionale Flagellen (Δ*flagP*Δ*flagL)*. Ein Effekt zeigt sich einzig für den Stamm, der nur funktionale laterale Flagellen bildet (Δ*flagP)*. Hier führt die zusätzliche Deletion von *motL* zu einem 10 % größeren Ausbreitungsradius als im Hintergrundstamm Δ*flagP*. Die Komplementation von Δ*flagP*Δ*motL* mit *sfgfpmotL* führt zu einem Ausbreitungsradius vergleichbar mit dem von Δ*flagP,* was darauf schließen lässt, dass die GFP-markierte Variante von MotL (sfGFPMotL) voll funktional ist. Diese GFP-markierte Variante wird aufgrund ihrer Funktionalität in weiteren Experimenten als nachweisbare und aufzureinigende Variante von MotL genutzt. Von einigen PilZ-Domänenproteinen wie MotI aus *B. subtilis* ist bekannt, dass sie anders als MotL erst durch eine Überproduktion einen Phänotypen zeigen [39,204]. Um den Effekt einer Überproduktion von MotL auf die verschiedenen Flagellensysteme von *S. putrefaciens* CN-32 zu überprüfen, wurde eine sfGFP-markierte Variante von MotL mittels pBTOK*sfgfpmotL* ektopisch im Wildtyp, Δ*flagP* und Δ*flagL* überproduziert und die Stämme wurden auf ihre Fähigkeit zur Ausbreitung auf Weichagar untersucht. In allen drei Stämmen führt die Überproduktion von sfGFPMotL nach Induktion verglichen mit den basalen Werten zu einer Differenz in der radialen Ausbreitung. Die Verringerung des Ausbreitungsradius für Δ*flagL* pBTOK*sfgfpmotL* beträgt lediglich 4 %, wohingegen die Ausbreitung beim Wildtyp durch die

Überproduktion von sfGFPMotL um 15 % und bei Δ*flagP* sogar um 27 % verringert wurde (Abbildung 11). Folglich wirkt sich auch eine Überproduktion von MotL in Form von sfGFPMotL hauptsächlich negativ auf die Funktion der lateralen Flagellen und nicht auf die der polaren Flagelle aus.

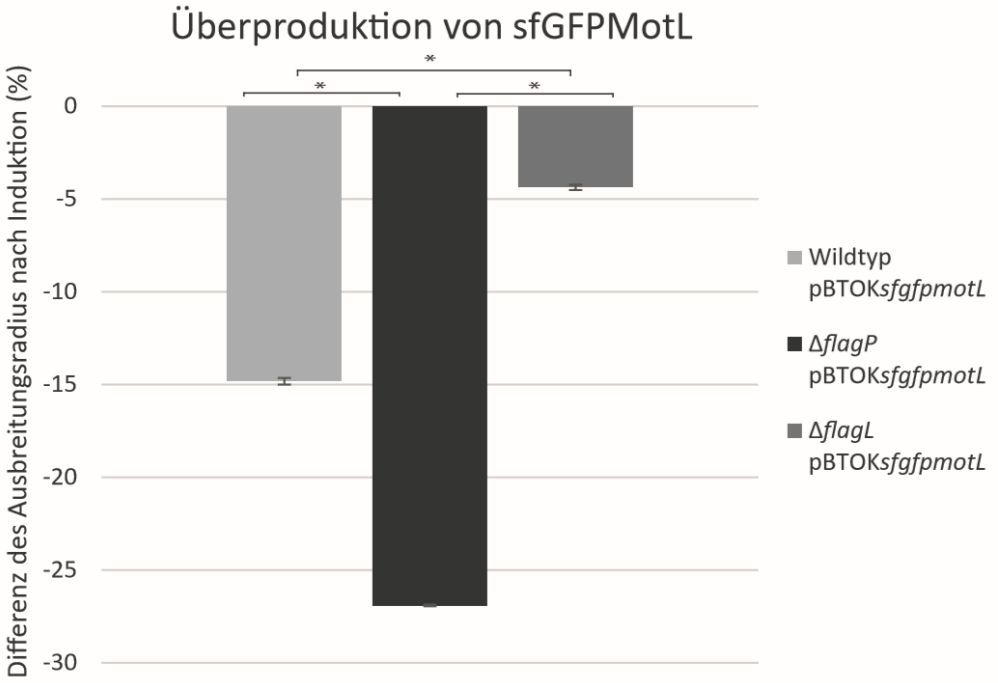

Abbildung 11: Differenz der radialen Ausbreitung auf Softagar nach ektopischer Überproduktion von sfGFPMotL. Die Überproduktion von sfGFPMotL führt zu einer Verringerung der Ausbreitungsradien verglichen zu der Ausbreitung der nicht induzierten Kontrollen von 15 % für den WT (hellgrau), 27 % für Δ*flagP* (schwarz) und 4 % für Δ*flagL* (dunkelgrau). Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Ein repräsentatives Ergebnis dieser Experimente ist im Appendix in Abbildung 27 zu sehen. Zur statististischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede ($p \leq 0{,}05$) sind durch Sternchen (*) veranschaulicht.

Neben dem Effekt auf die Ausbreitungsradien auf semisoliden Oberflächen wurde auch der Einfluss einer Überproduktion von sfGFPMotL auf die Schwimmgeschwindigkeit einzelner Zellen in planktonischer Kultur bestimmt. Hierzu wurden Schwimmvideos aufgenommen und mit der Trackmate Software von fiji [185] ausgewertet. Sowohl für den Wildtyp als auch für Δ*flagP* zeigen sich im Vergleich zur Leervektorkontrolle eine Anhäufung von Zellen mit geringerer Schwimmgeschwindigkeit und eine Reduktion an Zellen mit hohen Schwimmgeschwindigkeiten, nachdem sfGFPMotL ektopisch überproduziert wurde (Abbildung 12). Für Δ*flagL* pBTOK*sfgfpmotL* zeigt sich jedoch kein Unterschied in der Verteilung der Zellen mit einer bestimmten Schwimmgeschwindigkeit im Vergleich zur Leervektorkontrolle (Abbildung 12). MotL hat somit keinen Einfluss auf die Funktion der polaren Flagellen sondern zeigt spezifisch auf die Funktion der lateralen Flagellen einen negativen Effekt.

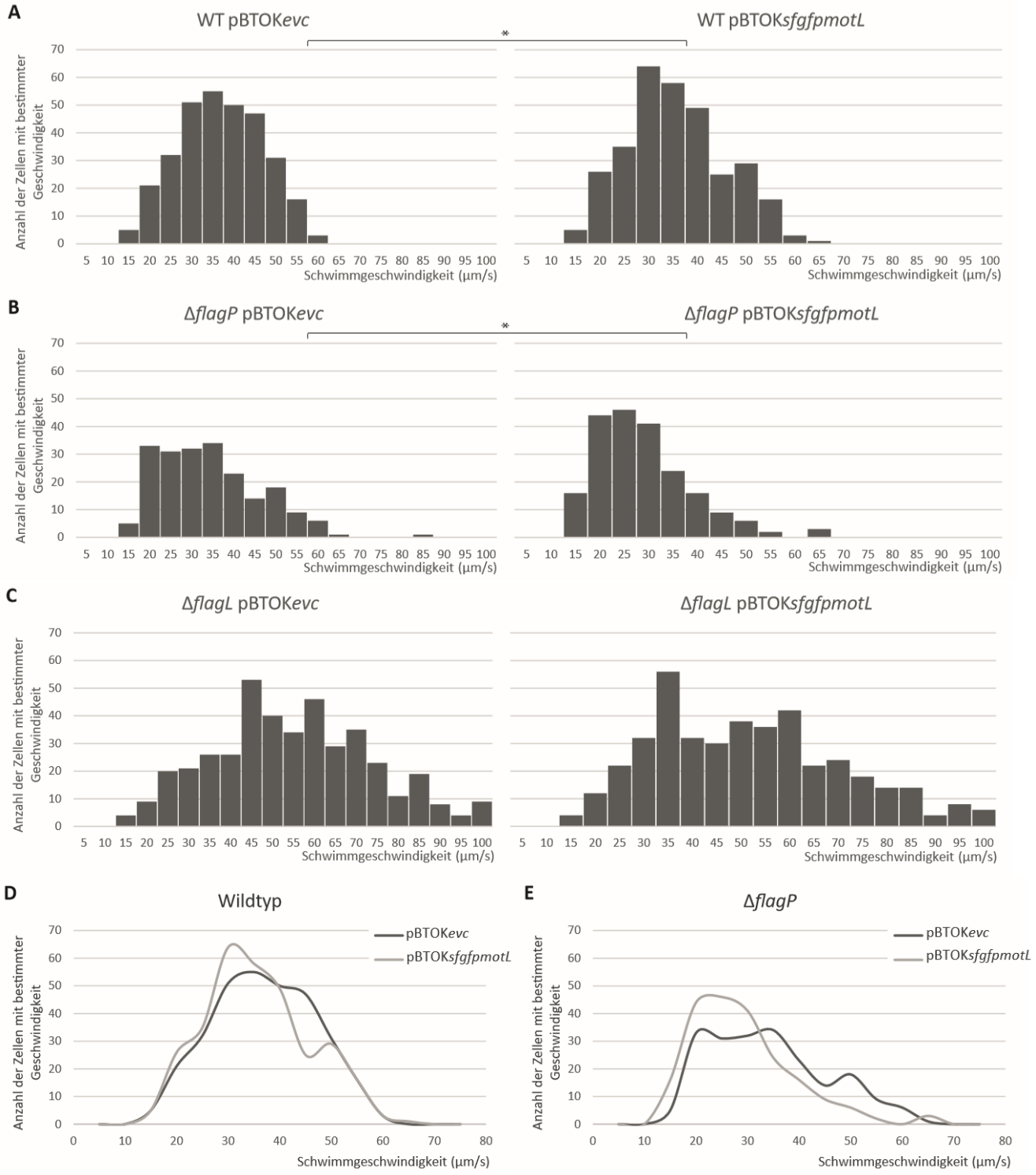

Abbildung 12: Schwimmgeschwindigkeiten nach Überproduktion von sfGFPMotL. Dargestellt in Histogrammen für den **A)** Wildtyp, **B)** Δ*flagP* und **C)** Δ*flagL*. Vereinfachte Darstellung derselben Daten als Kurven für **D)** den Wildtyp und **E)** Δ*flagP*. Die Überproduktion von sfGFPMotL im Wildtyp und in Δ*flagP* führt im Vergleich zur Leervektorkontrolle zu einer Reduktion der Schwimmgeschwindigkeiten, was sich in einer höheren Anzahl an Zellen mit einer geringeren Geschwindigkeit und einer geringeren Anzahl an Zellen mit einer hohen Geschwindigkeit zeigt. Die Überproduktion von sfGFPMotL in Δ*flagL* zeigt keinen Unterschied in der Verteilung der Anzahl an Zellen mit einer bestimmten Schwimmgeschwindigkeit verglichen mit der Leervektorkontrolle. Die Schwimmgeschwindigkeiten wurden für jeweils 312 Zellen des Wildtyps (n=312), 422 Zellen des Stamms Δ*flagL* (n=422) und 207 Zellen des Stammes Δ*flagP* bestimmt (n=207). Zur statistischen Auswertung wurde ein Mann-Whitney-Wilcoxon-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede sind durch Sternchen (*) dargestellt.

Da sowohl die Deletion von *motL* als auch die Überproduktion von sfGFPMotL lediglich einen Effekt auf Zellen zeigt, die das laterale Flagellensystem besitzen, werden im folgendem nur noch die in dem Hintergrundstamm Δ*flagP* generierten Ergebnisse gezeigt.

Um zu überprüfen ob die Überproduktion der c-di-GMP-insensitiven Variante sfGFPMotLAAx (siehe 2.1.1 Das PilZ-Domänenprotein MotL) einen vergleichbaren Effekt wie die Überproduktion von sfGFPMotL hat, wurden die Ausbreitungsradien auf Weichagarplatten (jeweils basal und induziert) der folgenden Stämme miteinander verglichen: Δ*flagP*Δ*motL* pBTOK*evc* (*empty vector control*), Δ*flagP*Δ*motL* pBTOK*sfgfpmotL* und Δ*flagP*Δ*motL* pBTOK*sfgfpmotLAAx* (Abbildung 13).

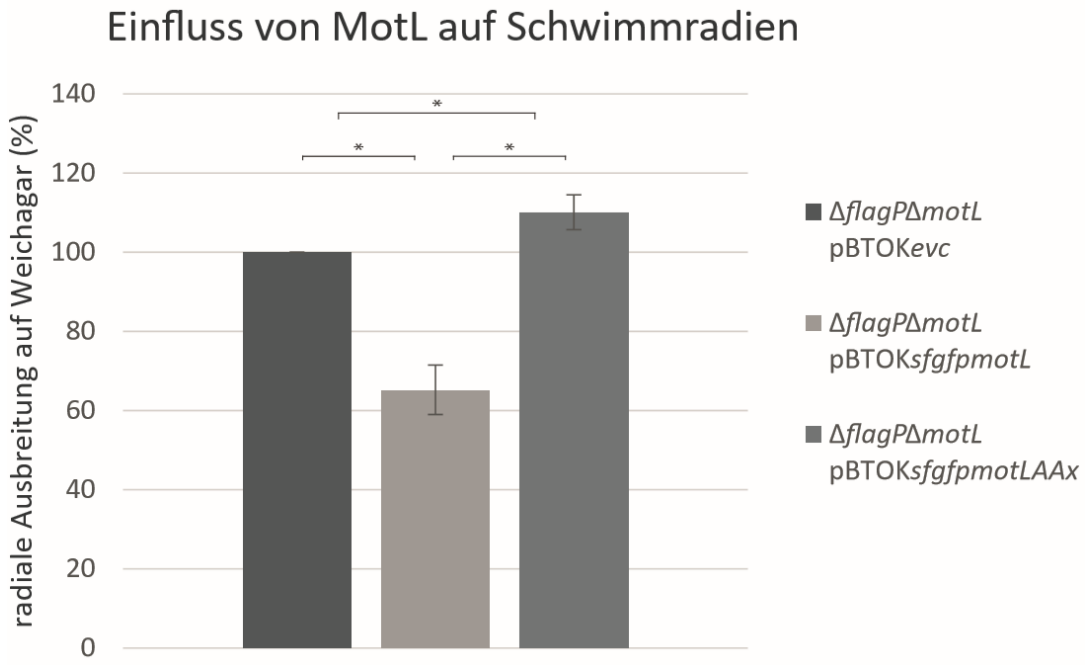

Abbildung 13: Radiale Ausbreitung auf Softagar nach Überproduktion von MotL und MotLAAx. Die Überproduktion von sfGFPMotL in Δ*flagP*Δ*motL* (hellgrau) führt zu einer Reduktion des Ausbreitungsradius um 35 % in Bezug auf die Leervektorkontrolle (*evc,* schwarz), wohingegen die Überproduktion der c-di-GMP-insensitiven Variante sfGFPMotLAAx (dunkelgrau) in einem um etwa 10 % erhöhten Ausbreitungsradius resultiert. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Ein repräsentatives Ergebnis dieser Experimente ist im Appendix in Abbildung 28 zu sehen. Zur statististischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede ($p \leq 0{,}05$) sind durch Sternchen (*) dargestellt.

Die Überproduktion von sfGFPMotL führt zu einer Verringerung des Ausbreitungsradius von 35 % im Vergleich zur Leervektorkontrolle (pBTOK*evc*) und hat somit einen negativen Einfluss auf die Funktion der lateralen Flagellen. Die Überproduktion von sfGFPMotLAAx hingegen führt zu einer Vergrößerung des Ausbreitungsradius um 10 %. Dies zeigt, dass die Bindung von c-di-GMP für den negativen Effekt von MotL notwendig ist. Des Weiteren deutet das Ergebnis für sfGFPMotLAAx darauf hin, dass MotL auch einen positiven Einfluss auf die Flagellenfunktion haben kann solange der c-di-GMP-Spiegel in der Zelle niedrig ist und MotL kein c-di-GMP gebunden hat.

Um auch den Einfluss von sfGFPMotLAAx auf die Schwimmgeschwindigkeit einzelner Zellen in planktonischer Kultur zu bestimmen wurden Schwimmvideos aufgenommen und ausgewertet. Die daraus erhaltenen Schwimmgeschwindigkeiten für die Stämme Δ*flagP*Δ*motL* pBTOK*evc*, Δ*flagP*Δ*motL* pBTOK*sfgfpmotL* und Δ*flagP*Δ*motL* pBTOK*sfgfpmotLAAx* sind Abbildung 14 zu entnehmen.

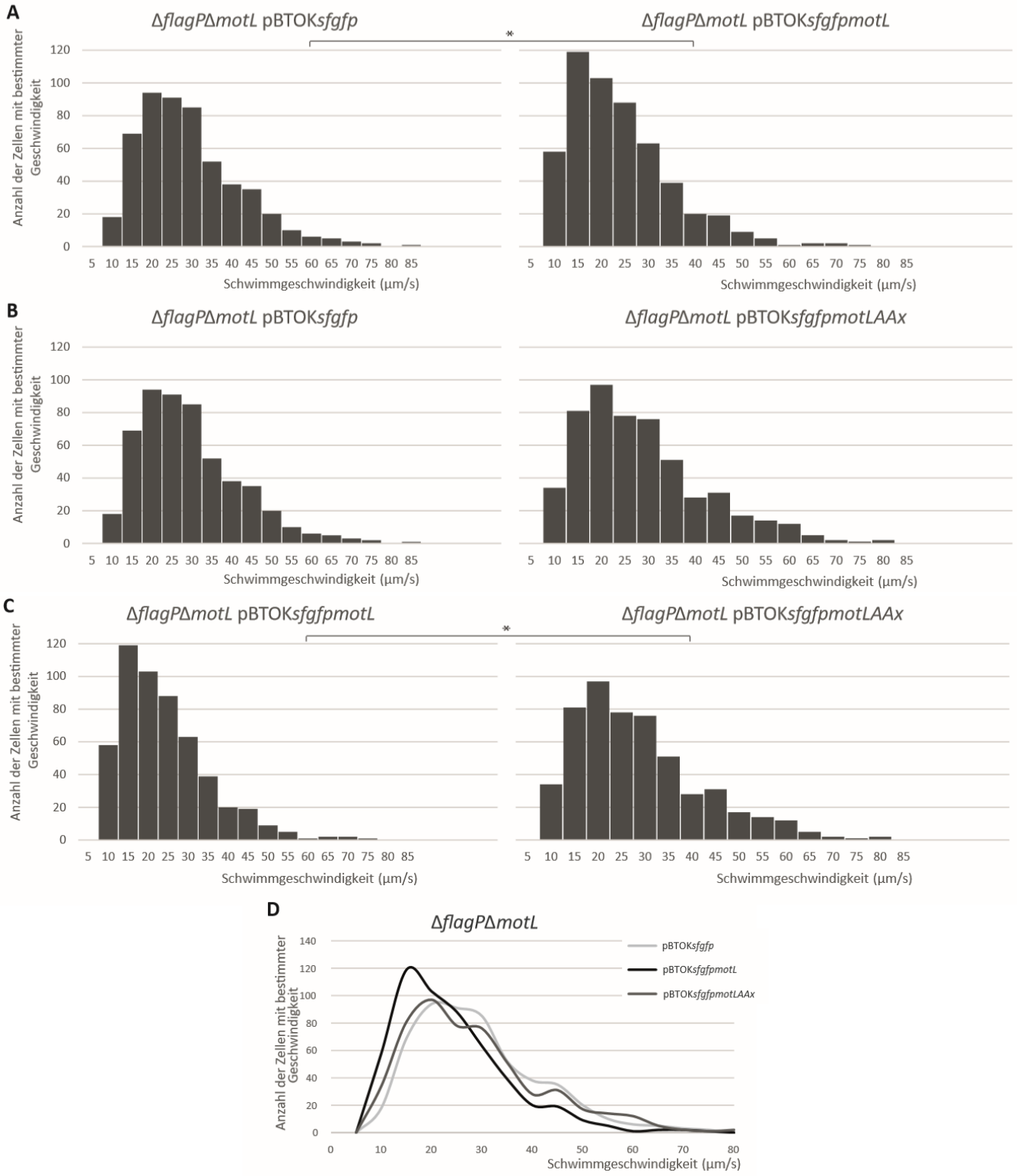

Abbildung 14: Schwimmgeschwindigkeiten nach Überproduktion von MotL und MotLAAx. Dargestellt in Form von **A-C)** Histogrammen und **D)** vereinfacht als Kurven. Die Überproduktion von sfGFPMotL in Δ*flagP*Δ*motL* führt im Vergleich zur Überproduktion von sfGFP und sfGFPMotLAAx zu einer Reduktion der Schwimmgeschwindigkeiten, was in einer höheren Anzahl an Zellen mit einer geringeren Geschwindigkeit und einer geringeren Anzahl an Zellen mit einer hohen Geschwindigkeit resultiert. Die Schwimmgeschwindigkeiten wurden für jeweils 529 Zellen bestimmt (n=529). Zur statistischen Auswertung wurde ein Mann-Whitney-Wilcoxon-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede sind durch Sternchen (*) dargestellt.

Die Überproduktion von sfGFPMotL führt zu einer Anhäufung von langsamen Zellen und einer geringeren Anzahl an schnelleren Zellen im Vergleich zur Überproduktion von sfGFP und sfGFPMotLAAx. Dies zeigt, dass MotL nicht nur den Ausbreitungsradius auf semisoliden Oberflächen (Weichagarplatten) beeinflusst, sondern auch einen direkten negativen Effekt auf die laterale Flagelle und damit deren Schwimmgeschwindigkeit ausüben kann.

2.1.3 Einfluss des c-di-GMP-Spiegels auf die Motilität

Um den Einfluss der intrazellulären c-di-GMP-Konzentration auf das Schwimmverhalten von *S. putrefaciens* CN-32 zu untersuchen, wurden Plasmide in verschiedene Hintergrundstämme eingebracht, die entweder die Gensequenz einer Phosphodiesterase aus *E. coli,* PdeH (vormals YhjH), oder einer Diguanylatzyklase aus *V. cholera*, DgcA (VCA0956), tragen. Die Überproduktion von PdeH führt zu einem vermehrten Abbau von c-di-GMP und resultiert in einer geringeren intrazellulären Konzentration. Die Überproduktion von DgcA hingegen führt zu einer gesteigerten Synthese von c-di-GMP und somit zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration. Eine ektopische Überproduktion dieser beiden Proteine wurde bereits erfolgreich in *S. oneidensis* MR-1 verwendet um den intrazellulären c-di-GMP-Spiegel artifiziell zu senken oder zu steigern [216].

Auf Weichagarplatten zeigt sich für Δ*flagP*Δ*motL* im Vergleich zur Leervektorkontrolle ein um 30 % größerer Ausbreitungsradius, wenn das Plasmid pBTOK*pdeH* exprimiert wird und somit der intrazelluläre c-di-GMP-Spiegel herabgesetzt ist. Umgekehrt zeigt sich für Δ*flagP*Δ*motL* im Vergleich zur Leervektorkontrolle ein um 20 % verminderter Ausbreitungsradius auf Weichagarplatten, wenn das Plasmid pBTOK*dgcA* exprimiert und der intrazelluläre c-di-GMP-Spiegel erhöht ist (Abbildung 15).

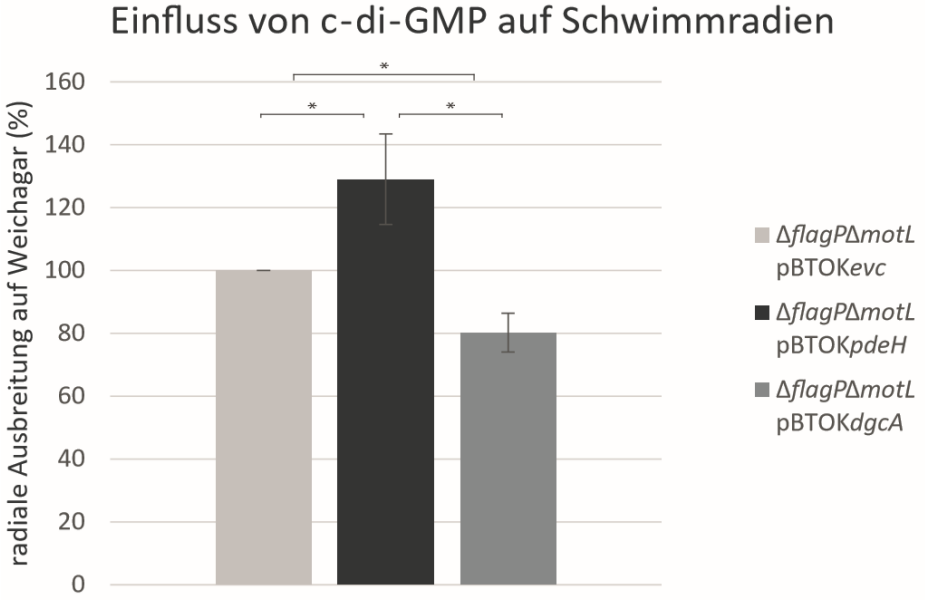

Abbildung 15: Radiale Ausbreitung auf Weichagar bei artifiziell modifizierten intrazellulären c-di-GMP-Spiegeln. Die Überproduktion von PdeH in Δ*flagP*Δ*motL* (schwarz) führt zu einem reduzierten intrazellulären c-di-GMP-Spiegel und resultiert in einem etwa 30 % größeren Ausbreitungsradius in Bezug auf die Leervektorkontrolle (*evc*, hellgrau). Die Überproduktion von DgcA (dunkelgrau) hingegen führt zu einem erhöhten intrazellulären c-di-GMP-Spiegel und zeigt einen um circa 20 % geringeren Ausbreitungsradius als die Leervektorkontrolle. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Ein repräsentatives Ergebnis dieser Experimente ist im Appendix in Abbildung 29 zu sehen. Zur statististischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede ($p \leq 0{,}05$) sind durch Sternchen (*) dargestellt.

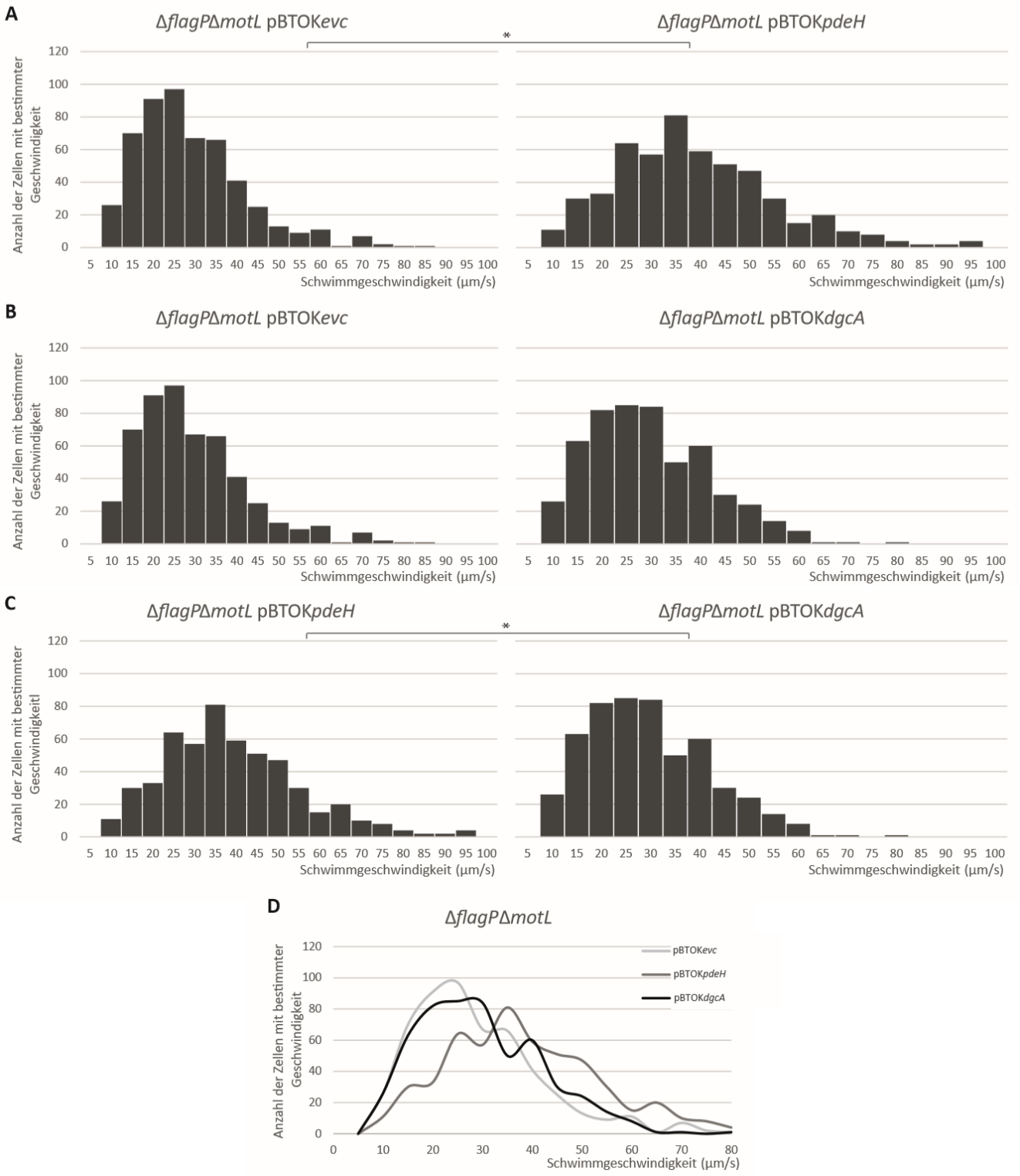

Abbildung 16: Schwimmgeschwindigkeiten bei artifiziell modifizierten intrazellulären c-di-GMP-Spiegeln. Dargestellt in Form von **A-C)** Histogrammen und **D)** vereinfacht als Kurven. Die Überproduktion von PdeH in Δ*flagP*Δ*motL* führt im Vergleich zur Überproduktion von DgcA und der Leervektorkontrolle zu einer Erhöhung der Schwimmgeschwindigkeiten, was in einer größeren Anzahl an Zellen mit einer höheren Schwimmgeschwindigkeit und einer geringeren Anzahl an Zellen mit einer geringeren Schwimmgeschwindigkeit resultiert. Die Schwimmgeschwindigkeiten wurden für jeweils 529 Zellen bestimmt (n=529). Zur statistischen Auswertung wurde ein Mann-Whitney-Wilcoxon-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede sind durch Sternchen (*) dargestellt.

Die Schwimmgeschwindigkeiten einzelner planktonischer Zellen von Δ*flagP*Δ*motL* zeigen im Vergleich zur Leervektorkontrolle ebenfalls eine Erhöhung der Anzahl an Zellen mit hoher Schwimmgeschwindigkeit, wenn der intrazelluläre c-di-GMP-Spiegel durch pBTOK*pdeH* herabgesetzt ist. Die Erhöhung des intrazellulären c-di-GMP-Spiegels durch pBTOK*dgcA* führt jedoch nicht zu einer signifikanten Veränderung der Schwimmgeschwindigkeiten im Vergleich zur Leervektorkontrolle (Abbildung 16).

2.1.4 Einfluss des c-di-GMP-Spiegels auf den Effekt von MotL

Um zeitgleich den Effekt einer Überproduktion von MotL bzw. der c-di-GMP insensitiven Variante MotLAAx und einem artifiziell modifizierten intrazellulären c-di-GMP-Spiegel zu untersuchen, wurden die Plasmide pBTOK*sfgfpmotL_pdeH* und pBTOK*sfgfpmotL_dgcA* generiert und in Δ*flagP*Δ*motL* eingebracht. Diese Plasmide ermöglichen eine gleichzeitige Überproduktion von sfGFPMotL und der Diguanylatzyklase DgcA beziehungsweise der Phosphodiesterase PdeH, sodass der Effekt einer MotL Überproduktion unter artifiziell erhöhten beziehungsweise erniedrigten intrazellulären c-di-GMP-Spiegeln untersucht werden kann.

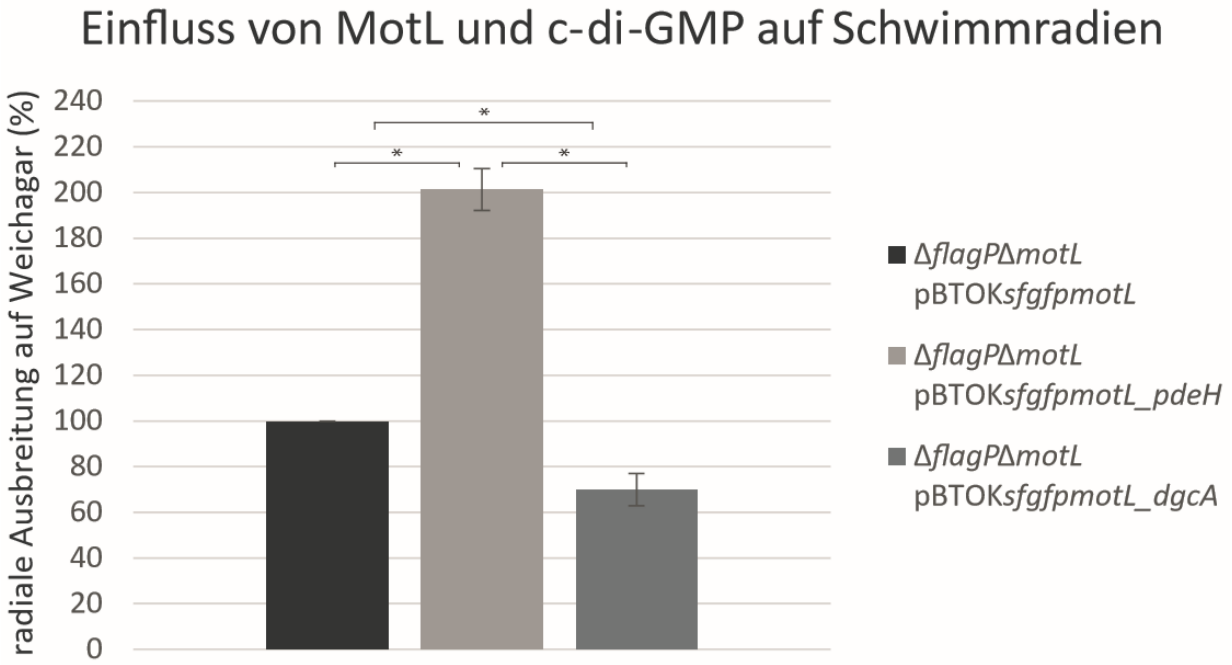

Abbildung 17: Radiale Ausbreitung auf Softagar bei artifiziell modifizierten intrazellulären c-di-GMP-Spiegeln und gleichzeitiger Überproduktion von MotL. Die kotranslationale Überproduktion von PdeH und sfGFPMotL in Δ*flagP*Δ*motL* (hellgrau) führt zu einem fast 100 % größeren Ausbreitungsradius in Bezug auf die Überproduktion von sfGFPMotL alleine (schwarz). Die kotranslationale Überproduktion von DgcA und sfGFPMotL (dunkelgrau) resultiert hingegen in einem um etwa 30 % geringeren Ausbreitungsradius als in der Leervektorkontrolle. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Ein repräsentatives Ergebnis dieser Experimente ist im Appendix in Abbildung 30 zu sehen. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede ($p \leq 0{,}05$) sind durch Sternchen (*) veranschaulicht.

Die Überproduktion von sfGFPMotL bei einem gleichzeitig artifiziell erniedrigten intrazellulären c-di-GMP-Spiegel führt zu einer Vergrößerung des Ausbreitungsradius um 100 % im Vergleich zur Überproduktion von sfGFPMotL (Abbildung 17). Damit ist der Ausbreitungsradius hier um 70 % höher, als wenn PdeH alleine überproduziert wird. Dies bestätigt den bereits in 2.1.2 Einfluss von MotL auf die Motilität vermuteten positiven Effekt von MotL auf die Funktion der lateralen

Flagellen wenn kein c-di-GMP gebunden ist. Die gleichzeitige Überproduktion von sfGFPMotL unter einem erhöhten intrazellulären c-di-GMP-Spiegel führt zu einer Verringerung des Ausbreitungsradius von 30 % im Vergleich zur Überproduktion von sfGFPMotL und ist somit um weitere 10 % geringer als bei der Überproduktion von DgcA alleine (Abbildung 17).

Neben der Ausbreitungseffizienz auf semisoliden Oberflächen wurden auch für die kotranslationalen Überproduktionen von sfGFPMotL und PdeH bzw. DgcA in Δ*flagP*Δ*motL* die Schwimmgeschwindigkeiten einzelner planktonischer Zellen bestimmt (Abbildung 18). Diese Schwimmgeschwindigkeiten zeigen ebenfalls einen starken Effekt der kotranslationalen Überproduktion von PdeH und sfGFPMotL. Hierbei kommt es zu einer starken Häufung von Zellen mit sehr hohen Schwimmgeschwindigkeiten und wenigen Zellen mit geringen Schwimmgeschwindigkeiten im Vergleich zur alleinigen Überproduktion von sfGFPMotL, und einem noch deutlicheren Effekt im Vergleich zur kotranslationalen Überproduktion von DgcA und sfGFPMotL (Abbildung 18). Bei der kotranslationalen Überproduktion von DgcA und sfGFPMotL zeigen sich hingegen nicht vermehrt Zellen mit geringen Schwimmgeschwindigkeiten und nur wenige Zellen mit hohen Schwimmgeschwindigkeiten im Vergleich zur Überproduktion von sfGFPMotL alleine. Stattdessen zeigen sich nach der alleinigen Überproduktion von sfGFPMotL signifikant mehr Zellen mit geringeren Schwimmgeschwindigkeiten im Vergleich zur kotranslationalen Überproduktion von DgcA und sfGFPMotL (Abbildung 18).

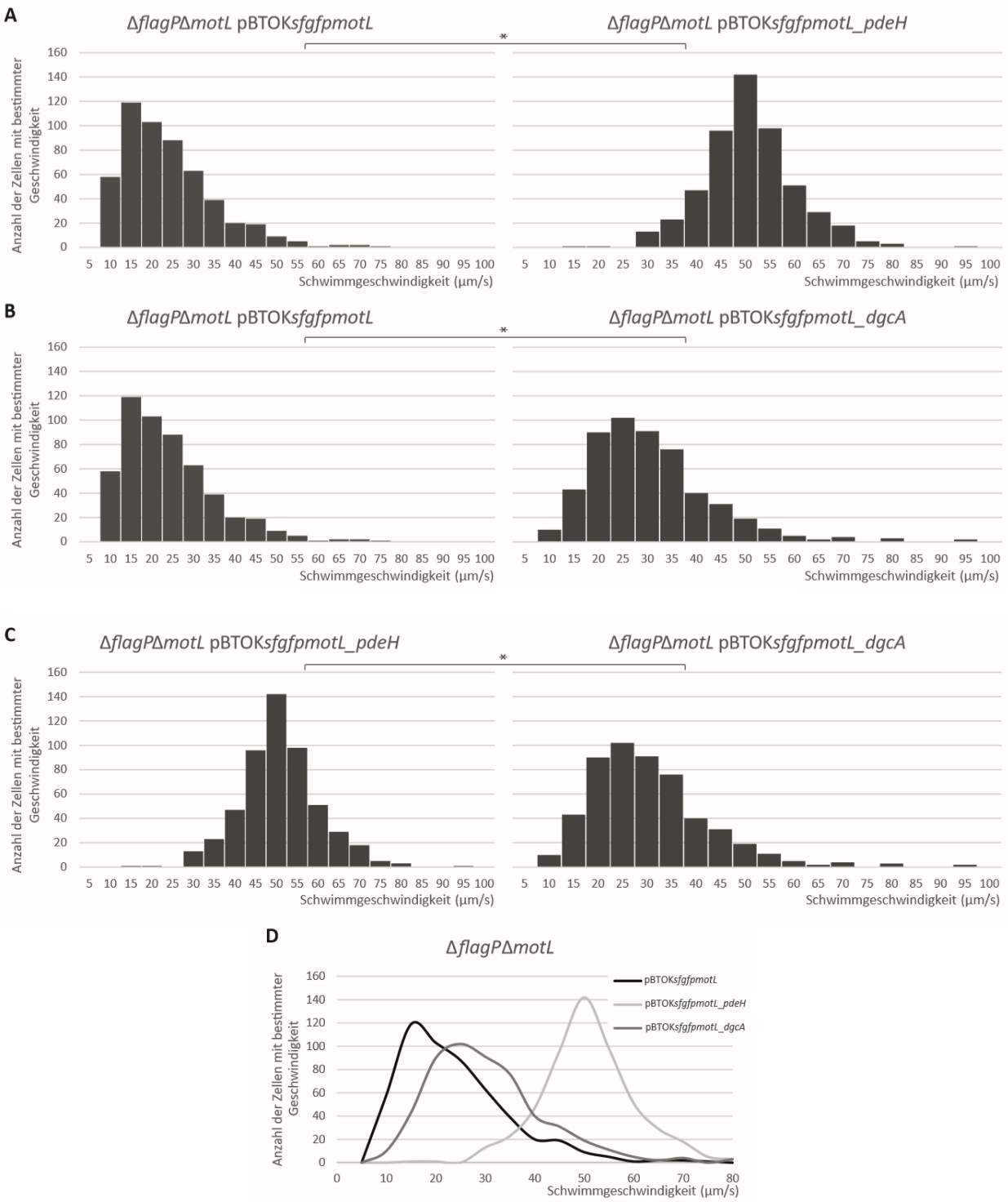

Abbildung 18: Schwimmgeschwindigkeiten bei artifiziell modifizierten intrazellulären c-di-GMP-Spiegeln und gleichzeitiger Überproduktion von MotL. Dargestellt in Form von **A-C)** Histogrammen und **D)** vereinfacht als Kurven. Die kotranslationale Überproduktion von PdeH und sfGFPMotL in Δ*flagP*Δ*motL* führt im Vergleich zur alleinigen Überproduktion von sfGFPMotL zu einer starken Erhöhung der Schwimmgeschwindigkeiten, was in einer höheren Anzahl an Zellen mit einer hohen Geschwindigkeit und weniger Zellen mit einer geringeren Geschwindigkeit resultiert. Umgekehrt führt die kotranslationale Überproduktion von DgcA und sfGFPMotL im Vergleich zur alleinigen Überproduktion von sfGFPMotL nicht zu einer Anhäufung von Zellen mit einer geringeren Schwimmgeschwindigkeit und sehr wenigen Zellen mit einer hohen Geschwindigkeit, sondern die alleinigen Überproduktion von sfGFPMotL zeigt hier eine signifikant höhere Anzahl an Zellen mit einer geringeren Schwimmgeschwindigkeit. Die Schwimmgeschwindigkeiten wurden für jeweils 529 Zellen bestimmt (n=529). Zur statistischen Auswertung wurde ein Mann-Whitney-Wilcoxon-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede sind durch Sternchen (*) dargestellt.

2.1.5 Lokalisation von MotL in der Zelle

Neben der funktionalen Charakterisierung von MotL und dem Einfluss auf das Schwimmverhalten sollte auch die intrazelluläre Lokalisation von MotL untersucht werden. Hierzu wurden zunächst die bereits erwähnten sfGFP-markierten Varianten von MotL und MotLAAx genutzt. Sowohl die Expression von pBTOK*sfgfpmotL* als auch pBTOK*sfgfpmotLAAx* in Δ*motL* resultierte trotz Induktion in einer heterogenen Population in Bezug auf das Lokalisationsverhalten von MotL bzw. MotLAAx. In manchen Zellen wurde kein sfGFP-markiertes Protein exprimiert, in vielen Zellen wurde sfGFPMotL bzw. sfGFPMotLAAx exprimiert und lokalisierte zytoplasmatisch und in einigen Zellen konnte man deutliche Fluoreszenz-Foci ausmachen, die lateral oder subpolar lokalisierten. Um zu überprüfen, ob es sich bei diesen Foci um inaktive Proteinaggregate (*inclusion bodies)* oder eine mögliche Lokalisation an den lateralen Flagellen handeln könnte, wurde das Experiment im Hintergrundstamm Δ*clusterII* wiederholt. In diesem Stamm sind die Gene des lateralen Flagellenclusters (*clusterII*) komplett deletiert, und es kommt zu keiner Ausbildung von Teilen der lateralen Flagelle. In Abbildung 19 sind Übersichtsaufnahmen dieses Experiments zu sehen.

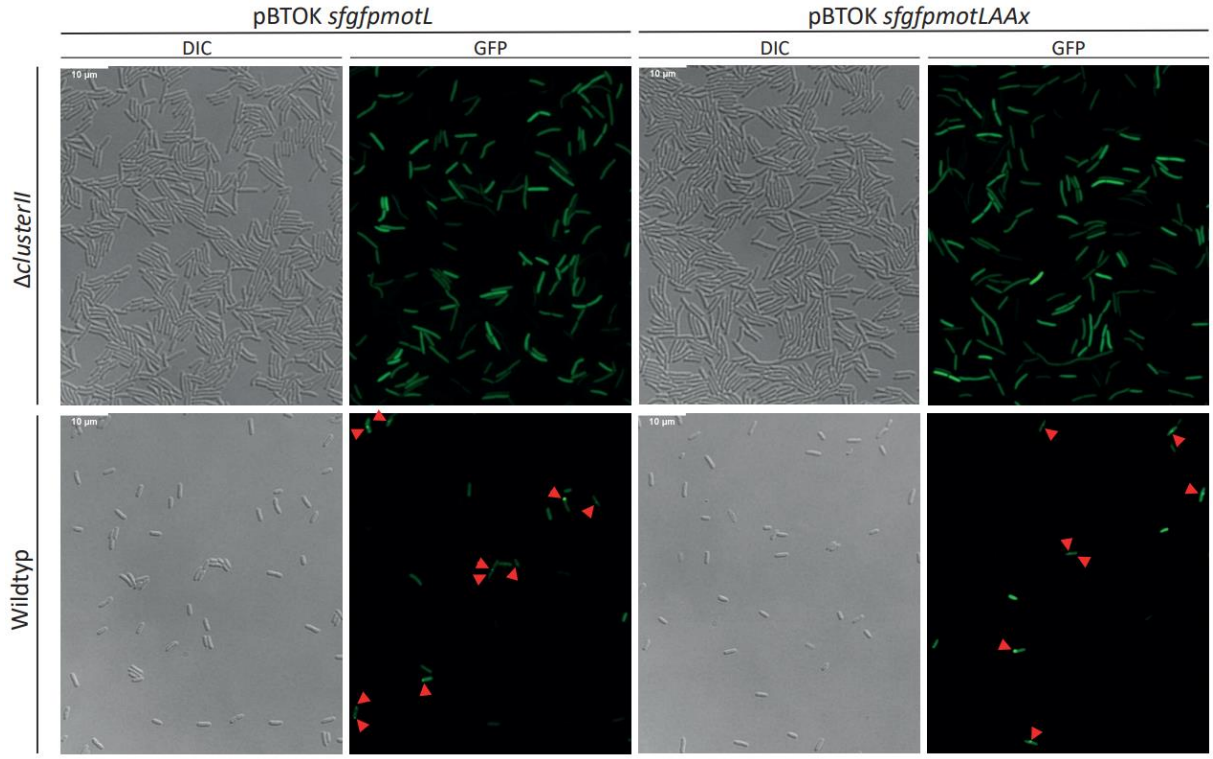

Abbildung 19: Übersichtsaufnahme zur intrazellulären Lokalisation von sfGFPMotL bzw. sfGFPMotLAAx. In der oberen Reihe sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Überproduktion von sfGFPMotL (links) und sfGFPMotLAAx (rechts) in Δ*clusterII* dargestellt. In beiden Fällen resultiert die Überproduktion in einer zytoplasmatischen Lokalisation der sfGFP-markierten Proteine aber nicht in Foci. In der unteren Reihe ist die Überproduktion im Wildtyp dargestellt. Hier lassen sich für sfGFPMotL (links) und sfGFPMotLAAx (rechts) trotz der geringeren Zellzahl neben der zytoplasmatischen Lokalisation auch deutliche subpolare und/oder laterale Foci erkennen, die durch Pfeile hervorgehoben werden. Der Maßstabsbalken stellt 10 µm dar.

In der unteren Reihe ist das Ergebnis der Überproduktion von sfGFPMotL (links) bzw. sfGFPMotLAAx (rechts) nach Induktion von pBTOK*sfgfpmotL* bzw. pBTOK*sfgfpmotLAAx* im Wildtyp abgebildet. Es lassen sich sowohl für sfGFPMotL (links) als auch für sfGFPMotLAAx (rechts) Zellen mit zytoplasmatischem sfGFP-Fluoreszenzsignal erkennen als auch mit Pfeilen gekennzeichnete laterale und subpolare Foci. In der oberen Reihe ist das Ergebnis der

Überproduktion von sfGFPMotL (links) bzw. sfGFPMotLAAx (rechts) nach Induktion von pBTOK*sfgfpmotL* bzw. pBTOK*sfgfpmotLAAx* in Δ*clusterII* dargestellt. Hier lassen sich trotz der deutlich höheren Zellzahl weder für sfGFPMotL noch für sfGFPMotLAAx Foci erkennen. Stattdessen lassen sich nur verschiedene Fluoreszenzintensitäten für die zytoplasmatische Lokalisation ausmachen.

Da für die ektopische Überproduktion von sfGFPMotL und sfGFPMotLAAx eine laterale und/oder subpolare intrazelluläre Lokalisation gezeigt werden konnte, wurde auch der Stamm Δ*flagP*Δ*motL KI sfgfpmotL,* der bereits zur Komplementation genutzt wurde und eine chromosomal integrierte sfGFP-markierte Variante von MotL codiert, mikroskopisch untersucht. Hierbei ließen sich zunächst keine Foci feststellen, weshalb zusätzlich die Plasmide pBTOK*evc,* pBTOK*pdeH* und pBTOK*dgcA* in diesen Stamm eingebracht wurden, um den intrazellulären c-di-GMP-Spiegel artifiziell zu erhöhen oder herabzusetzen. In Δ*flagP*Δ*motL KI sfgfpmotL* pBTOK*dgcA* zeigten sich nach Induktion, also bei einem hohen intrazellulären c-di-GMP-Spiegel, deutlich subpolare und laterale Foci (Abbildung 20). In den Stämmen Δ*flagP*Δ*motL KI sfgfpmotL* pBTOK*evc* und Δ*flagP*Δ*motL KI sfgfpmotL* pBTOK*pdeH,* also bei "normalen" und erniedrigten intrazellulären c-di-GMP-Spiegeln, ließ sich hingegen nur zytoplasmatisches Fluoreszenzsignal erkennen. Allerdings war die Intensität der Fluoreszenzsignale in Δ*flagP*Δ*motL KI sfgfpmotL* pBTOK*pdeH* durchschnittlich um 80 % höher als die in Δ*flagP*Δ*motL KI sfgfpmotL* pBTOK*evc* (Data not shown).

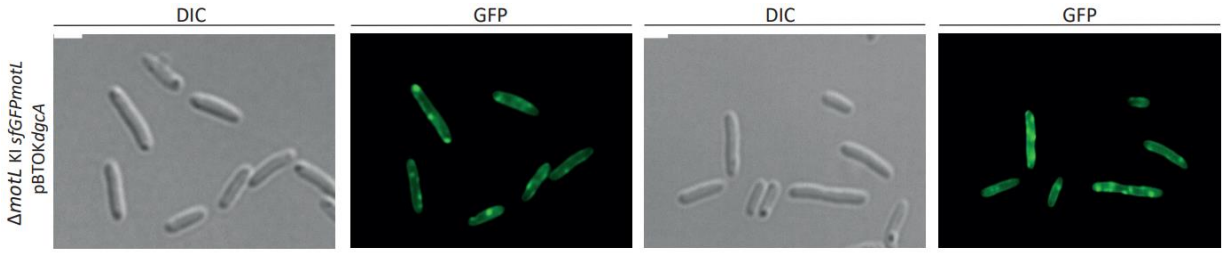

Abbildung 20: Intrazelluläre Lokalisation von sfGFPMotL bei erhöhtem c-di-GMP-Spiegel. In Δ*flagP*Δ*motL KI sfgfpmotL* pBTOK*dgcA* sind nach Induktion, also bei einem artifiziell erhöhten intrazellulären c-di-GMP-Spiegel deutlich subpolare und laterale Foci zu erkennen. Der Maßstabsbalken stellt 2 µm dar.

2.1.6 Einfluss von MotL auf die Bildung der lateralen Flagelle

Der größere radiale Ausbreitungsradius von Δ*flagP*Δ*motL* auf semisoliden Oberflächen im Vergleich zu Δ*flagP* könnte neben einem direkten negativen Einfluss von MotL auf die Funktion der lateralen Flagelle auch auf eine verminderte Ausbildung dieser bei Anwesenheit von MotL zurückzuführen sein. Um sicherzustellen, dass es sich bei dem durch MotL bedingten Einfluss auf die radiale Ausbreitung auf Weichagar um einen Effekt auf die Funktion und nicht die Ausbildung der lateralen Flagellen handelt, wurde die Anzahl an Zellen mit lateralen Flagellen in planktonischer Kultur zum Zeitpunkt des exponentiellen Wachstums für den Wildtyp und Δ*motL* prozentual bestimmt (Abbildung 21). Hierzu wurden spezielle Stämme genutzt, in deren lateralem Hakenprotein ($FlgE_2$) ein exponiertes Threonin (T) an der Position 242 durch ein Cystein (C) ausgetauscht wurde. Dieses exponierte Cystein ermöglicht es, den Haken der Flagelle mit einem fluoreszenzmarkierten Maleimidfarbstoff zu färben und so in mikroskopischen Aufnahmen sichtbar zu machen [104,188].

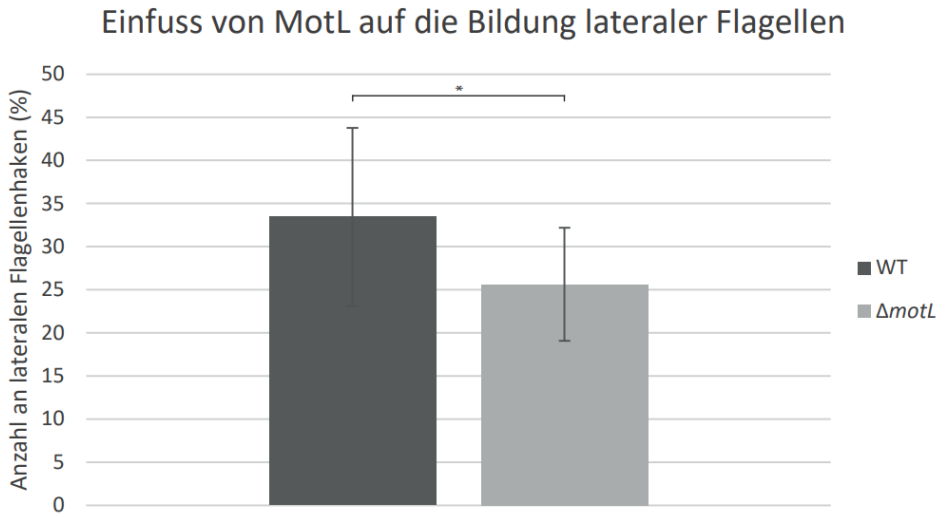

Abbildung 21: Anzahl an Zellen mit ausgebildeten lateralen Flagellenhaken im Wildtyp und in Δ*motL*. Die Deletion von *motL* (hellgrau) resultiert im Vergleich zum Wildtyp (dunkelgrau) in einer um 7 % geringeren Anzahl an Zellen mit ausgebildeten lateralen Flagellen. Gezählt wurden mit Maleimid fluoreszenzgefärbte laterale Haken in planktonischen Kulturen in LB-Medium, die sich im exponentiellen Wachstum befanden. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede ($p \leq 0{,}05$) sind durch Sternchen (*) veranschaulicht.

Der prozentuale Anteil an Zellen im Wildtyp, die zum Zeitpunkt der Messung eine oder mehrere laterale Flagellen ausgebildet hatten, beträgt 33 %. Für Δ*motL* hingegen beträgt der Anteil nur 26 % und liegt somit sogar um 7 % unter dem des Wildtyps. Somit hat die Deletion von MotL einen negativen und keinen positiven Effekt auf die Ausbildung der lateralen Flagellen in *S. putrefaciens* CN-32.

2.1.7 Potentielle Interaktionspartner von MotL

Da die c-di-GMP-gebundene Form von MotL nachweislich einen negativen Effekt auf die Funktion der lateralen Flagellen ausübt (siehe 2.1.2 Einfluss von MotL auf die Motilität und 2.1.4 Einfluss der c-di-GMP-Konzentration auf den Effekt von MotL), muss es zu einer direkten oder indirekten Interaktion mit der Flagelle kommen. Die meisten regulatorischen Proteine, die die Flagellenaktivität kontrollieren, binden direkt am Motor. So bindet das Chemotaxisprotein CheY-P aus *E. coli* an das Rotorprotein FliM [28], die Kupplung EpsE aus *B. subtilis* an das Rotorprotein FliG [23], die Kupplung FlgZ aus *P. aeruginosa* an das Statorprotein MotC [11,120]und die Rücklaufbremse YcgR aus *E. coli* vermutlich über FliG, FliM und MotA sowohl am Stator als auch am Rotor [25,59,78,149] (siehe auch Kapitel 1.1.4 Regulation des Flagellenmotors, 1.2.3.1 YcgR und 1.2.3.2 FlgZ). In diesem Kapitel werden mögliche Interaktionen von MotL mit den Proteinen des Rotors und des Stators überprüft und mögliche Interaktionspartner durch mikroskopische oder proteinbiochemische Methoden untersucht.

2.1.7.1 Mikroskopische Untersuchungen

Da für die ektopische Überproduktion von sfGFPMotL und sfGFPMotLAAx eine laterale und subpolare intrazelluläre Lokalisation gezeigt werden konnte, wurde versucht sich diese bei der Suche nach möglichen Interaktionspartner zunutze zu machen und über eine Kolokalisation einen ersten Hinweis auf eine mögliche Interaktion zu finden. Hierzu wurden die Plasmide pBTOK*sfgfpmotL* oder

pBTOK*sfgfpmotLAAx* in die Stämme Δ*fliM₂ KI fliM₂mcherry* und Δ*motB KI mcherrymotB* eingebracht. In Δ*fliM₂ KI fliM₂mcherry* wurde chromosomal eine funktionale mCherry-markierte Variante des C-Ring Proteins $FliM_2$ integriert, wodurch die Position der lateralen Flagellen in den zu untersuchenden Zellen determiniert werden kann. In Δ*motB KI mcherrymotB* wurde chromosomal eine funktionale mCherry-markierte Variante des Statorproteins MotB integriert, wodurch die Position der Statoren der lateralen Flagellen, welche nicht statisch an die laterale Flagelle gekoppelt sind, sondern durch die Membran diffundieren können [148], in den zu untersuchenden Zellen determiniert werden kann. In Abbildung 22 sind exemplarische Aufnahmen dieser Experimente zu sehen.

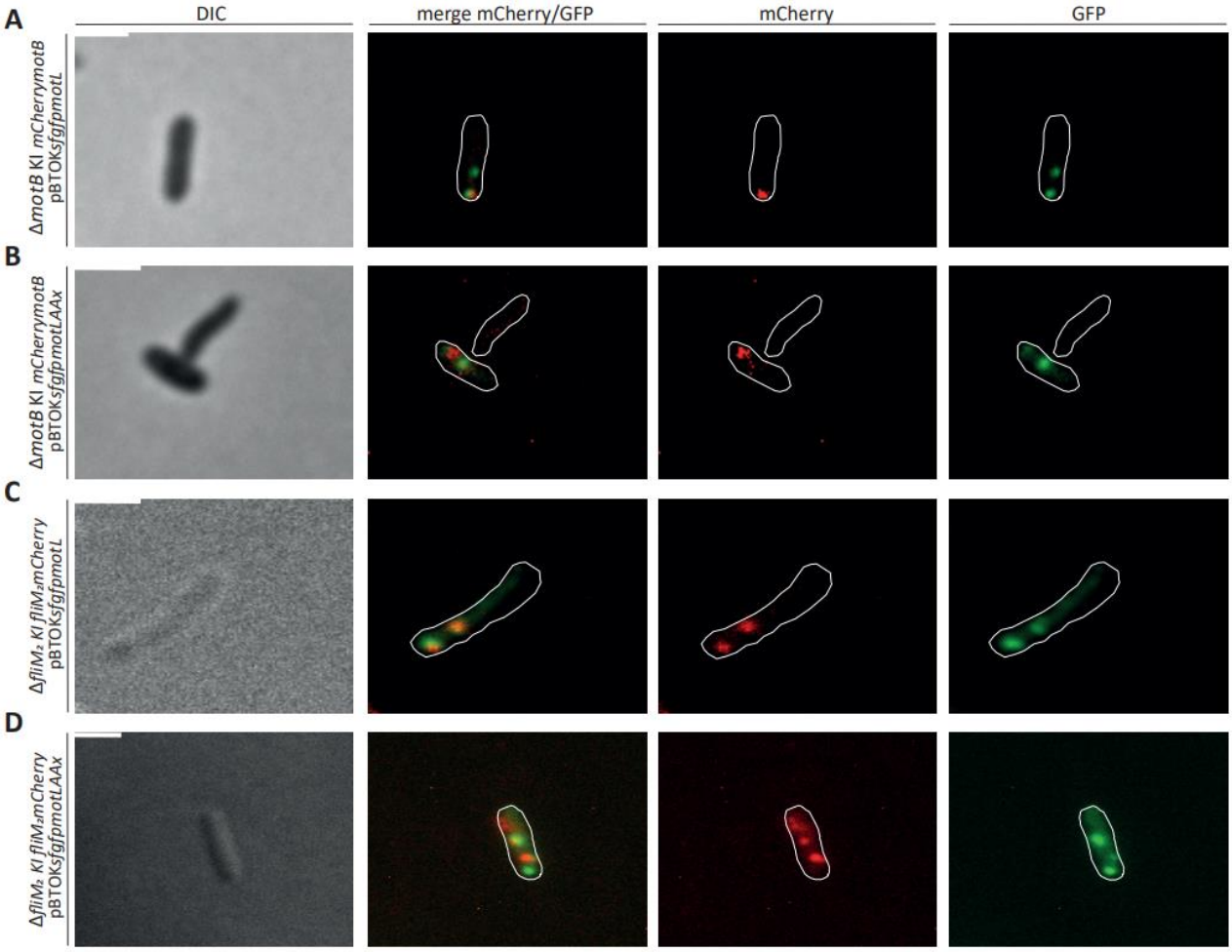

Abbildung 22: Kolokalisation von sfGFPMotL und sfGFPMotLAAX mit mCherryMotB und $FliM_2$mCherry. In Δ*motB KI mcherrymotB* pBTOK*sfgfpmotL* (**A**) und in Δ*motB KI mcherrymotB* pBTOK*sfgfpmotLAAx* (**B**) zeigen sich Fluoreszenz-Foci für das mit mCherry-markierte Statorprotein MotB (rot) und sfGFPMotL beziehungsweise sfGFPMotLAAx (grün) die teilweise kolokalisieren. In den Stämmen Δ*fliM₂ KI fliM2mcherry* pBTOK*sfgfpmotL* (**C**) und Δ*fliM₂ KI fliM₂mcherry* pBTOK*sfgfpmotLAAx* (**D**) zeigen sich ebenfalls Fluoreszenz-Foci für das mit mCherry-markierte C-Ring Protein $FliM_2$ der lateralen Flagelle (rot) und sfGFPMotL beziehungsweise sfGFPMotLAAx (grün) die teilweise kolokalisieren. Der Maßstabsbalken stellt 2 µm dar.

In der oberen Reihe (**A**) sind die intrazellulären Lokalisationen von mCherryMotB und sfGFPMotL dargestellt. Es lassen sich ein polar lokalisierter Focus für mCherryMotB im mCherry-Kanal erkennen und zwei Foci für sfGFPMotL, die polar und lateral liegen, im GFP-Kanal. Legt man die beiden Kanäle nun übereinander (*merge* mCherry/GFP), so lässt sich eine Überlagerung der beiden Signale an der polaren Stelle erkennen. In der zweiten Reihe (**B**) lassen sich für mCherryMotB ein

Focus in subpolarer Position und zwei Foci mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität für sfGFPMotLAAx in subpolarer und lateraler Position erkennen. Überlagert man diese beiden Bilder, so lässt sich auch für sfGFPMotLAAx und mCherryMotB anhand der subpolar lokalisierten Foci eine Kolokalisation erkennen. In der dritten Reihe (**C**) sind die intrazellulären Lokalisationen von $FliM_2$mCherry und sfGFPMotL zu sehen. Hier sind zwei lateral und subpolar positionierte Foci für $FliM_2$mCherry im mCherry-Kanal und zwei Foci für sfGFPMotL im GFP-Kanal zu erkennen. In der Überlagerung zeigt sich, dass die $FliM_2$mCherry und die sfGFPMotL Foci kolokalisieren. Die unterste Reihe (**D**) zeigt die intrazelluläre Lokalisation von $FliM_2$mCherry und die sfGFPMotLAAx. Es sind drei laterale Foci für $FliM_2$mCherry zu sehen. Für sfGFPMotLAAx sind ein Focus in subpolarer und zwei weitere Foci mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität in lateraler Position auszumachen. Die Überlagerung der Bilder zeigt eine Kolokalisation für die beiden eher mittig liegenden lateral positionierten Foci. Es zeigten sich also mikroskopisch Kolokalisationen für sfGFPMotL und sfGFPMotLAAx mit mCherryMotB und $FliM_2$mCherry allerdings waren auch immer wieder Foci zu finden, die ohne Kolokalisation auftraten.

Wenn das laterale Flagellencluster komplett deletiert ist (Δ*clusterII*), bilden sich keine sfGFPMotL oder sfGFPMotLAAx Foci mehr sondern die Proteine liegen ausschließlich homogen im Zytoplasma verteilt vor. Sollte also ein zur Lokalisation notwendiger Interaktionspartner von sfGFPMotL bzw. sfGFPMotLAAx fehlen, so würde man auch hier erwarten, dass es zu keinen Fluoreszenzfoci mehr kommt. Abbildung 23 zeigt das Ergebnis der mikroskopischen Untersuchung der Deletionsstämme Δ*fliM*$_2$ *KI fliM*$_2$*mcherry,* Δ*fliG*$_2$*,* Δ*fliM*$_2$*,* Δ*fliN*$_2$ *und* Δ*motB*Δ*motA* mit den Plasmiden pBTOK*sfgfpmotL* oder pBTOK*sfgfpmotLAAx*. In Δ*fliM*$_2$ *KI fliM*$_2$*mcherry* pBTOK*sfgfpmotL* liegen durchschnittlich etwa in 28 % der Zellen sfGFP-Foci vor und in Δ*fliM*$_2$ *KI fliM*$_2$*mcherry* pBTOK*sfgfpmotLAAx* kommt es mit 27 % in etwas weniger Zellen zur Lokalisation. Diese Werte gelten als "Normalwerte" für dieses Experiment, da hier die lateralen Flagellen vollständig und funktional ausgebildet werden. In Δ*fliG*$_2$ zeigt sich eine deutliche Reduktion an Foci für sfGFPMotL auf 8 % und für sfGFPMotLAAx auf 10 %. Die Deletion von *fliM*$_2$ führt zu einer Reduktion an Zellen mit sfGFPMotL-Foci auf 18 % und 16 % mit sfGFPMotLAAx-Foci. Die Deletion von *fliN*$_2$ zeigt unter den getesteten Deletionen den höchsten prozentualen Anteil an Zellen mit Fluoreszenzfoci von 22 % für sfGFPMotL und 21 % für sfGFPMotLAAx. Die Deletion der Statoren führt zu einer deutlichen Abnahme an Zellen in denen sich sfGFP-Foci finden lassen auf 13 % in Δ*motB*Δ*motA* pBTOK*sfgfpmotL* und 15 % in Δ*motB*Δ*motA* pBTOK*sfgfpmotLAAx*. Somit scheinen das Rotorprotein $FliG_2$ und die Statorproteine MotAB für die Lokalisation von MotL und MotLAAx nötigt zu sein.

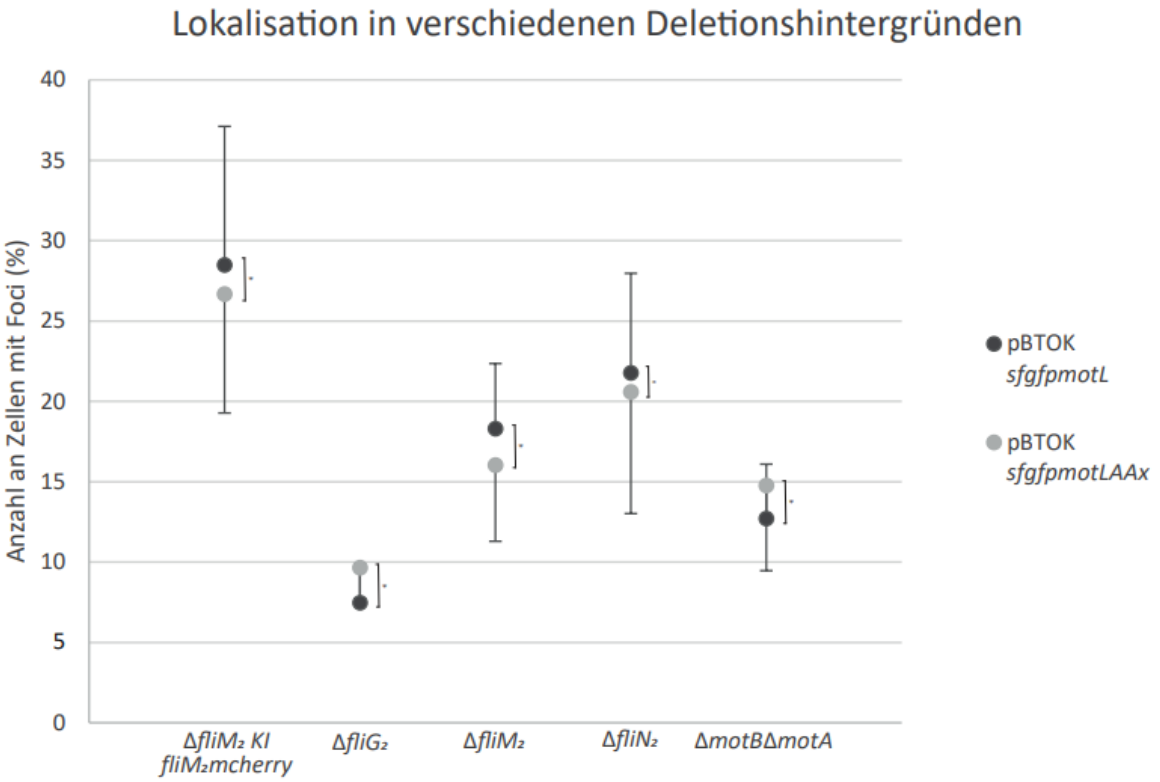

Abbildung 23: Lokalisation von sfGFPMotL und sfGFPMotLAAx in verschiedenen Deletionshintergründen. Die Überproduktion von sfGFPMotL bzw sfGFPMotLAAx führt zu lateralen und subpolaren intrazellulären Lokalisationen, deren prozentuale Häufigkeit in den Hintergrundstämmen Δ*fliM₂ KI fliM₂mcherry,* Δ*fliG₂,* Δ*fliM₂,* Δ*fliN₂ und* Δ*motB*Δ*motA* variieren. Δ*fliM₂ KI fliM₂mcherry* dient hierbei als Kontrolle und repräsentiert die Anzahl an Zellen mit sfGFP-Foci bei vollständig und funktional ausgebildeten lateralen Flagellen. Es wurden pro Stamm mindestens 414 Zellen (n≥414) auf ihre Hakenbildung untersucht. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede ($p \leq 0{,}05$) sind durch Sternchen (*) veranschaulicht.

2.1.7.2 BACTH (*Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid* System)

Eine weitere Möglichkeit zur Identifikation möglicher Interaktionspartner von MotL bzw. MotLAAx ist das *Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid* (BACTH)-System. Hierbei werden Fragmente der Adenylatzyklase aus *Bordtella pertussis* (T18 und T25) an mögliche zu untersuchende Interaktionspartner fusioniert. Die beiden Fragmente T18 und T25 sind, wenn sie sich in ausreichender räumlicher Nähe zueinander befinden, dazu in der Lage, eine funktionale Adenylatzyklase zu bilden. Dadurch wird die β-Galaktosidase-Aktivität der Zellen gesteigert und es kommt durch eine Umsetzung des Substrats X-Gal zur Bildung eines blauen Farbstoffs. Anhand der Blaufärbung der Kolonie lässt sich auf eine Interaktion der beiden an die Fragmente T18 und T25 fusionierten Proteine schließen. Sollten die beiden Fragmente nicht in ausreichend enge räumliche Nähe gebracht werden, so bildet sich kein aktives Enzym und die Kolonien bleiben farblos [87–89]. Als Positivkontrolle wurde hierbei jeweils eine Hälfte eines Leucin-*zippers* an das T18- und an das T25-Fragment fusioniert. Die beiden Fragmente T18 und T25 können jeweils an den C-Terminus oder an den N-Terminus der zu untersuchenden Proteine fusioniert werden. Getestet wurden so jeweils MotL und MotLAAx gegen sich selbst, die Rotorproteine des polaren Flagellensystems $FliG_1$, $FliM_1$, $FliN_1$, die Rotorproteine des lateralen Flagellensystems $FliG_2$, $FliM_2$, $FliN_2$ und das laterale Statorprotein MotB. Abbildung 24 zeigt die wichtigsten Resultate.

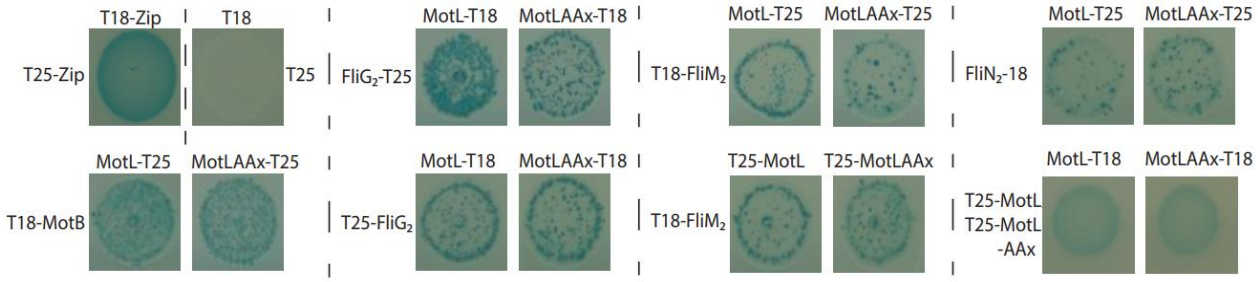

Abbildung 24: BACTH-*Assays* von MotL und MotLAAx gegen sich selbst und verschiedene Flagellenproteine. Im BACTH-*Assay* zeigte sich (erkennbar durch Blaufärbung der Kolonien) eine Interaktion von MotL und MotLAAx mit den C-Ring Bestandteilen $FliG_2$, $FliM_2$, $FliN_2$ und dem Statorprotein MotB des lateralen Flagellensystems. Als Negativkontrolle dienten zwei Leervektoren (T18 und T25) und als Positivkontrolle je eine Hälfte eines Leucin-*zippers* gekoppelt an das T18 bzw. T25 Fragment.

Sowohl MotL als auch MotLAAx interagieren mit sich selbst, wobei MotL nur mit sich selbst interagiert, wenn sich das T18-Fragment an seinem C-Terminus und das T25-Fragment an seinem N-Terminus befinden. MotLAAx hingegen interagiert zusätzlich noch mit sich selbst, wenn sich das T18-Fragment an seinem N-Terminus und das T25-Fragment an seinem C-Terminus befinden, was nahe legt, dass es durch die Bindung von c-di-GMP zu einer Konformationsänderung in MotL kommt. Weder MotL noch MotLAAx zeigen eine Interaktion mit Bestandteilen der polaren Flagelle, also $FliG_1$, $FliM_1$, $FliN_1$ (nicht gezeigt). Eine Interaktion mit den Bestandteilen der lateralen Flagelle konnte für beide Varianten von MotL bestätigt werden. Demnach binden sowohl MotL als auch MotLAAx an den N-terminus MotB unabhängig davon, ob sie selbst C-terminal oder N-terminal an die Fragmente T18 oder T25 fusioniert wurden. Für $FliG_2$, $FliM_2$ und $FliN_2$ lässt sich sowohl für den N-Terminus als auch den C-Terminus eine Interaktion mit dem N-Terminus und dem C-Terminus von MotL und MotLAAx ausmachen.

3 DISKUSSION

Shewanella putrefaciens CN-32 weist zwei distinkte Flagellensysteme auf. Ein einzelnes polares durch Natriumionen angetriebenes Flagellum, dessen Gene in einen Gencluster (*cluster I*) zusammen mit den Genen für das Chemotaxissystem codiert sind, bestimmt die Schwimmgeschwindigkeit der Zellen in planktonischer Kultur und ermöglicht die gerichtete Bewegung entlang von Gradienten mittels Chemotaxis. Das zweite Flagellensystem besteht aus bis zu fünf stochastisch angeordneten zusätzlichen lateralen Flagellen, welche der Zelle eine höhere Richtungsbeibehaltung ermöglichen, sodass diese sich in der gleichen Zeit weiter ausbreiten können, als nur polar flagellierte Zellen [33]. Eine Besonderheit des dualen Flagellensystems von *S. putrefaciens* CN-32 ist, dass die zusätzlichen lateralen Flagellen bereits während des exponentiellen Wachstums in planktonischer Kultur unter nährstoffreichen Bedingungen exprimiert werden [33]. Andere Organismen mit einem dualen Flagellensystem, wie zum Beispiel *V. parahaemolyticus,* induzieren die Expression der lateralen Flagellengene erst nach dem Kontakt mit einer Oberfläche oder in viskosem Medium, wenn die einzelne polare Flagelle nicht mehr genug Drehmoment liefert. Sie nutzen also ihre polare Flagelle zum Schwimmen in flüssigen Medien und ihr zusätzliches laterales Flagellensystem hauptsächlich zum Schwärmen über Oberflächen [122]. Ein solches Schwärmverhalten über Oberflächen konnte bei *S. putrefaciens* CN-32 bislang nicht beobachtet werden. Die Expression des lateralen Flagellensystems ist nährstoffabhängig. Dies beruht vermutlich auf der Aktivität der Phosphodiesterase PdeB, welche ebenfalls nur in Komplexmedium aktiv zu sein scheint. In der Deletionsmutante Δ*pdeB* ist die Expression des lateralen Flagellensystems stark herunterreguliert, was dem beobachteten Phänotyp von *S. putrefaciens* CN-32 Zellen, die in Minimalmedium angezogen wurden, gleicht. Ein erhöhter intrazellulärer c-di-GMP-Spiegel löst allerdings nicht nur auf transkriptionaler Ebene Regulationsmechanismen aus, sondern auch auf posttranslationaler Ebene, da auch die Flagellen, die bereits gebildet wurden, durch den erhöhten c-di-GMP-Spiegel in ihrer Funktion eingeschränkt werden [173]. Bei den Effektoren, die an solchen c-di-GMP-abhängigen posttranslationalen Regulationsmechanismen beteiligt sind, handelt es sich häufig um sogenannte PilZ-Domänenproteine (siehe Kapitel 1.2.3 PilZ-Domänenproteine und Kapitel 1.1.4 Regulation des Flagellenmotors). In *S. putrefaciens* CN-32 sind fünf Proteine als PilZ-Domänenproteine annotiert (SputCN32_1553, SputCN32_2212, SputCN32_2813, SputCN32_2815 und SputCN32_3446). Das Gen, das für das PilZ-Domänenprotein SputCN32_3446, im Folgenden als MotL bezeichnet, codiert, liegt im Gencluster des lateralen Flagellensystems direkt *downstream* der Gene, die für die Statoreinheiten MotA (SputCN32_3448) und MotB (SputCN32_3447) codieren. Auf das Gen für MotL folgt in dem Gencluster lediglich ein weiteres Gen (SputCN32_3445), welches für ein konserviertes hypothetisches Membranprotein codiert, bevor ein gegenläufiges, flagellenunabhängiges Gencluster beginnt. Im Folgenden wird der Einfluss von MotL auf das Schwimmverhalten von *S. putrefaciens* CN-32 näher erläutert und ein möglicher Regulationsmechanismus für den negativen Effekt, den dieses Protein auf die Funktionalität der lateralen Flagelle zeigt, beschrieben.

3.1 Einfluss von MotL auf die Motilität in *S. putrefaciens* CN-32

PilZ-Domänenproteine, die einen Einfluss auf die Funktion der flagellenvermittelten Motilität besitzen, üben diesen meist auf zwei unterschiedliche Weisen aus. Entweder agieren sie als eine Art Kupplung und entkoppeln den Rotor komplett vom Stator, wodurch der Energietransfer zwischen ihnen aufgehoben und die Generierung eines Drehmoments und somit die Rotation der Flagelle

vollständig unterbunden wird [205]. Oder sie funktionieren als eine Art sterische Bremse, wobei sie den Energiefluss zwischen Rotor und Stator nur partiell unterbinden, sodass es zu einem geringeren Drehmoment kommt und somit die Schwimmgeschwindigkeit verringert wird. Dabei sinkt die Rotationsgeschwindigkeit der Flagelle mit zunehmender Anzahl an Effektorproteinen die zwischen dem Rotor und dem Stator binden [205]. Beispiele für molekulare Kupplungen sind EpsE [23] und MotI [39,204] aus *B. subtilis*. Beide Proteine entkoppeln den Rotor komplett vom Stator und führen so zu einem Rotationsstopp der Flagelle. Allerdings binden sie an unterschiedlichen Stellen innerhalb des Motors. EpsE bindet direkt an das Rotorprotein FliG, wodurch dieses eine Konformationsänderung durchläuft, die die Interaktionsfläche zwischen FliG und der Statoruntereinheit verändert und so den Energietransfer zwischen diesen verhindert [23]. MotI hingegen bindet direkt an die Statoruntereinheit MotA und verhindert so die Interaktion zwischen Stator und Rotor. Für MotI konnte allerdings bisher nur dann ein Phänotyp gezeigt werden, wenn der intrazelluläre c-di-GMP-Spiegel artifiziell erhöht und MotI zeitgleich überproduziert wurde [39,204]. Eine weitere molekulare Kupplung FlgZ [11] aus *P. aeruginosa* bindet ebenfalls an die Statoruntereinheit und entkoppelt diese dadurch vom Rotor. Die Besonderheit hierbei liegt darin, dass *P. aeruginosa* zwei verschiedene Statorsets besitzt, die zur selben Zeit gemeinsam in den Motor eingebaut werden können. Das Statorset MotAB wird zum Schwimmen in flüssigen Medien genutzt und das Statorset MotCD wird zum Schwärmen über Oberflächen verwendet [55,219]. FlgZ interagiert spezifisch mit der Statoruntereinheit MotC, wodurch es nur die Schwärmfähigkeit und nicht die Schwimmfähigkeit reguliert [11].

Eine ähnliche Spezifität bei der Bindung an eine bestimmte Motorkomponente zeigt das PilZ-Domänenprotein MotL aus *S. putrefaciens* CN-32 ebenfalls. MotL hat nur einen Effekt auf die durch die lateralen Flagellen vermittelte Schwimmfähigkeit und hat keinen Einfluss auf die Funktion der polaren Flagelle. Eine Deletion von *motL* führt zu einem größeren Ausbreitungsradius auf Weichagar, wenn die Zellen lediglich das laterale Flagellensystem zur Fortbewegung nutzen können, zeigt aber keinen Phänotyp in Zellen die nur das polare Flagellensystem nutzen. Somit zeigt MotL einen spezifischen negativen Einfluss auf die Funktion des lateralen Flagellensystems. Im Gegensatz zur molekularen Kupplung MotI zeigt sich also für MotL bereits ein Phänotyp durch die Deletion von *motL*. Dieser negative Effekt wird allerdings nach einer Überproduktion von MotL durch eine starke Inhibierung der radialen Ausbreitung auf Weichagar von Zellen, die beide Flagellensysteme exprimieren, und eine noch stärkere Verringerung der Ausbreitung für Zellen, die nur das laterale Flagellensystem nutzen, noch deutlicher. Eine Überproduktion von MotL hat keinen Einfluss auf die Funktion der polaren Flagelle. Dieser Effekt könnte sowohl durch eine Kupplung als auch durch eine sterische Bremse hervorgerufen werden.

Die am besten charakterisierte flagellare Bremse ist YcgR aus *E. coli*. YcgR besitzt eine N-terminale YcgR-N-Domäne und eine C-terminale PilZ-Domäne und bindet als Dimer an den Rotor der Flagelle [59,63,78,149]. Durch die Bindung von c-di-GMP an YcgR unterläuft dieses einer Konformationsänderung, welche zu einer Neuorientierung der beiden Domänen im Molekül und somit zum Übergang von einer inaktiven in eine aktive Form führt. Aktives YcgR bindet über die C-terminale PilZ-Domäne an das Statorprotein MotA und zeitgleich über die N-terminale YcgR-N-Domäne an den Rotor, wobei es die Interaktionsfläche zwischen MotA und FliG überspannt und dadurch den Energietransfer zwischen Stator und Rotor herabsetzt und die Schwimmgeschwindigkeit verringert [78]. Eine weitere Folge der Bindung von aktivem YcgR an den Motor, ist eine Blockade der Bindestelle für das Chemotaxisprotein CheY. Dadurch wird die Rotation der bidirektionalen Flagelle von *E. coli* in einer dauerhaften Rotation im

Gegenuhrzeigersinn gehalten, dies führt zu einem ausschließlichen Vorwärtsschwimmen der Zellen, weshalb YcgR auch als Rücklaufbremse bezeichnet wird [59,149]. Da die lateralen Flagellen von *S. putrefaciens* CN-32 nicht mit dem Chemotaxissystem interagieren und stets im Gegenuhrzeigersinn rotieren [33], ist eine Rolle von MotL als Rücklaufbremse auszuschließen. Allerdings zeigt die Überproduktion von MotL einen signifikanten negativen Einfluss auf die Schwimmgeschwindigkeiten von Zellen, die nur die laterale Flagelle zum Schwimmen nutzen. Die Überproduktion von MotL führt zu einem starken Anstieg von Zellen mit einer geringeren Schwimmgeschwindigkeit im Vergleich zu Zellen, die kein MotL exprimieren. Auch ist dieser negative Effekt davon abhängig, ob MotL c-di-GMP gebunden hat oder nicht. Zum einen, da die Überexpression einer c-di-GMP-insensitiven Variante von MotL, MotLAAx, keinen signifikanten Unterschied in den Schwimmgeschwindigkeiten im Vergleich zur Deletionsmutante von *motL* zeigt. Und zum anderen zeigen die gleichzeitige Überproduktion von MotL und ein artifiziell erzeugter hoher c-di-GMP-Spiegel eine noch deutlichere Akkumulation von Zellen mit geringen Schwimmgeschwindigkeiten als die Überproduktion von MotL alleine.

Interessanterweise zeigt die gleichzeitige Überproduktion von MotL bei einem artifiziell erzeugten niedrigen c-di-GMP-Spiegel eine vermehrte Anzahl an Zellen mit einer höheren Schwimmgeschwindigkeit im Vergleich zur Deletionsmutante von *motL* bei einem artifiziell erzeugten niedrigen c-di-GMP-Spiegel. Auch die c-di-GMP-insensitive Variante MotLAAx zeigt diesen Effekt. Die Überproduktion von MotLAAx führt bei einem artifiziell erzeugten hohen c-di-GMP-Spiegel sogar zur Akkumulation von Zellen mit hohen Schwimmgeschwindigkeiten, im Vergleich zur Deletionsmutante von *motL* unter denselben Bedingungen. Dies deutet darauf hin, dass MotL im nicht-c-di-GMP-gebundenen Zustand einen positiven Effekt auf die Rotationseffizienz der lateralen Flagellen ausübt. Ein solcher positiver Effekt ist zum Beispiel bereits für die Rotationsstabilisatoren FliL und HN-S bekannt. FliL beeinflusst die Flagellenaktivität in allen untersuchten Spezies positiv. Die Deletion von *fliL* in *E. coli* führt zu einer geringeren Ausbreitungsfähigkeit in Weichagar und zu einer herabgesetzten Rotationseffizienz im Vergleich zum Wildtyp [136,146,163,239]. In *C. crescentus* hingegen resultiert die Deletion von *fliL* sogar in Flagellen, die nicht mehr rotieren [81]. FliL lokalisiert zwischen den Statorkomplexen und dem Basalkörper [136] und scheint die Antriebskraft der Flagelle durch direkte Interaktion mit dem Stator zu erhöhen, indem es eine Inhibierung des Protonenflusses verhindert [146,205]. Das DNA-Bindeprotein HN-S interagiert direkt mit dem Rotorprotein FliG und wirkt als Rotationsstabilisator [21,116]. In *E. coli* wirkt HN-S antagonistisch zur sterischen Motorbremse YcgR und verringert durch die Stabilisierung der Rotation die Effektivität von YcgR [101]. MotL übernimmt also in *S. putrefaciens* CN-32 die Funktionen der beiden Proteine HN-S und YcgR aus *E. coli* für die Regulation der lateralen Flagellen zeitgleich. In seiner c-di-GMP-ungebundenen Form übernimmt MotL die Funktion eines Rotationsstabilisators und in seiner c-di-GMP-gebundenen Form die Rolle einer sterischen Bremse, die die Rotationseffizienz herabsetzt.

Der signifikante Unterschied in der radialen Ausbreitung auf Weichagar und in den Schwimmgeschwindigkeiten in planktonischer Kultur zwischen der Deletionsmutante von *motL* und der Leervektorkontrolle unter artifiziell veränderten c-di-GMP-Spiegeln lässt sich teilweise durch den fehlenden positiven Effekts als Rotationsstabilisator erklären. So zeigen unter niedrigem c-di-GMP-Spiegel mehr Zellen eine höhere Schwimmgeschwindigkeit, wenn sfGFPMotL oder sfGFPMotLAAx zeitgleich überproduziert werden im Vergleich zur Deletionsmutante von *motL*. Unter hohen c-di-GMP-Spiegeln hingegen lässt sich kein signifikanter Unterschied in den Schwimmgeschwindigkeiten zwischen der Deletionsmutante von *motL* und der Überproduktion von

MotL erkennen. Dies deutet auf die Beteiligung weiterer c-di-GMP-abhängiger Effektoren mit Beteiligung an der Regulation der lateralen Flagellenfunktion hin.

3.2 Potentielle Interaktionspartner von MotL

Da MotL sowohl einen rotationsstabilisierenden Effekt in seiner c-di-GMP-ungebundenen Form als auch einen negativen Effekt auf die Rotationseffizienz in seiner c-di-GMP-gebundenen Form aufweist, muss es in einer direkten oder indirekten Form zur Interaktion mit dem Flagellenmotor kommen. Die Überproduktion von sfGFP-markierten Varianten von MotL und MotLAAx zeigte für beide Varianten eine subpolare und/oder laterale intrazelluläre Lokalisation. Diese Lokalisation ist allerdings davon abhängig, dass das laterale Flagellensystem vorhanden ist. In einer Deletionsmutante, in der das *clusterII,* welches für das laterale Flagellensystem codiert, fehlt, kommt es zu keiner Lokalisation von sfGFPMotL oder sfGFPMotLAAx. Folglich ist die Lokalisation von sfGFPMotL und sfGFPMotLAAx direkt vom lateralen Flagellenmotor abhängig. Weitere Lokalisationsstudien mittels sfGFPMotL und sfGFPMotLAAx zeigten sowohl eine Kolokalisation mit dem Rotor über eine mCherry-markierte Variante von $FliM_2$ als auch mit dem Stator über eine mCherry-markierte Variante von MotB. In diesen Studien zeigten sich allerdings auch immer Foci für sfGFPMotL beziehungsweise sfGFPMotLAAx, die keine Kolokalisation zeigten. Es wäre möglich, dass diese Foci sich an dem jeweils nicht-markierten Teil eines Flagellenmotors befinden. In *E. coli* befindet sich in der Zytoplasmamembran ein Reservoir von inaktiven, frei diffundierenden Statorkomplexen, die in den Motor eingebaut werden können ohne dabei die Rotation zu behindern und auch FliM-Proteine aus dem C-Ring unterlaufen einen solchen Austausch [50,62,107,148]. Dies lässt vermuten, dass auch der Motor der lateralen Flagelle von *S. putrefaciens* CN-32 nicht statisch, sondern dynamisch ist und es zu einem stetigen Austausch von Proteinen kommt. Die Kolokalisationsstudien weisen also darauf hin, dass MotL sowohl mit Teilen des Rotors als auch mit Teilen des Stators interagieren kann. Eine weitere mögliche Erklärung wäre die Notwendigkeit eines weiteren Proteins, das an der Interaktion mit dem Flagellenmotor beteiligt ist. Ein potentielles Protein, das diese Funktion übernehmen könnte, wäre SputCN32_3445. Dabei handelt es sich um ein kleines hypothetisches Transmembranprotein, dessen Gen direkt *downstream* von *motL* im lateralen Flagellencluster lokalisiert ist. Da dieses Protein in allen Shewanellen vorkommt, die auch *motL* besitzen, könnte es für die Regulation der Flagellenfunktion durch MotL durchaus eine konservierte Funktion besitzen, die allerdings in dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht näher untersucht werden konnte. Neben einer Kolokalisation mit Teilen des Flagellenmotors wurde auch das Lokalisationsverhalten von sfGFPMotL und sfGFPMotLAAx in Abwesenheit bestimmter Proteine des Rotors oder des Stators untersucht. Interessanterweise zeigte sich dabei stets ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der Lokalisationsereignisse zwischen sfGFPMotL und sfGFPMotLAAx, obwohl beide die gleichen Tendenzen aufwiesen. Das Fehlen des Rotorproteins $FliN_2$ zeigte dabei die geringste Veränderung im Lokalisationsverhalten im Vergleich zum Wildtyp. Die Deletion von *fliM*$_2$ führte hingegen schon zu einer deutlich geringeren Lokalisation, aber das Fehlen von $FliG_2$ und den Statorproteinen MotAB zeigte den stärksten Effekt. Dies legt nahe, dass sowohl sfGFPMotL als auch sfGFPMotLAAx hauptsächlich mit den Proteinen $FliG_2$ und MotAB interagieren.

Neben Lokalisationsstudien durch fluoreszenzmarkierte Proteine wurde auch das BACTH-System zur Identifikation möglicher Interaktionspartner von MotL genutzt. Hierbei werden Fragmente einer Adenylatzyklase (T18 und T25) an die zu untersuchenden Proteine fusioniert, die bei einer

Interaktion der Proteine ein funktionales Enzym bilden. Die Enzymaktivität zeigt sich durch die Umsetzung des Substrates in einen blauen Farbstoff. Diese Studien unterstützen die bereits durch die Lokalisationsstudien erhaltenen Ergebnisse. Es konnten weder für MotL noch für MotLAAx Interaktionen mit Bestandteilen des polaren Flagellensystems nachgewiesen werden. Es zeigte sich hier ebenfalls eine potenzielle Interaktion mit allen getesteten Bestandteilen des lateralen Flagellensystems ($FliG_2$, $FliM_2$, $FliN_2$ und MotB). Auch hier sind die Interaktionen zwischen MotL und MotLAAx mit dem Rotorprotein $FliG_2$ und der Statoruntereinheit MotB am stärksten, weshalb diese vermutlich die Hauptinteraktionspartner darstellen. Dies entspricht den Ergebnissen von Interaktionsstudien die zur Rücklaufbremse YcgR angefertigt wurden. Hier konnte eine Interaktion mit dem Statorprotein MotA [25,78] und den Rotorproteinen FliG [59,78,149] und FliM [149] nachgewiesen werden. Für YcgR ergibt sich dadurch folgender Regulationsmechanismus: YcgR bindet in seiner aktiven c-di-GMP-gebundenen Form mit seiner C-terminalen PilZ-Domäne an den Stator und zeitgleich mit seiner N-terminalen YcgR-N-Domäne an den Rotor, wobei die Interaktionsfläche zwischen MotA und FliG überspannt und schließlich der Energietransfer zwischen Rotor und Stator verringert wird [25,59,78,149]. Eine ähnliche Interaktion zwischen Rotor, Stator und MotL wäre denkbar, wobei MotL nur über seine PilZ-Domäne an den Motor binden kann, da es keine N-terminale YcgR-N-Domäne aufweist.

Interessanterweise interagieren sowohl MotL als auch MotLAAx mit sich selbst, wobei es in der c-di-GMP-insensitiven Variante MotLAAx im Gegensatz zur nativen Variante von MotL zu einer weiteren Interaktion kommt. Dass diese Struktur nur im c-di-GMP-ungebundenen Zustand entsteht, deutet darauf hin, dass MotL, genau wie FlgZ [100] und YcgR [15], durch die Bindung von c-di-GMP eine Konformationsänderung durchläuft. In FlgZ führt die Bindung von c-di-GMP dazu, dass die molekulare Kupplung von ihrer inaktiven Form als Dimer in ihre aktive Form als Monomer übergeht [100]. Da MotL in seiner c-di-GMP-gebundenen und auch in seiner c-di-GMP-ungebundenen Form mit sich selbst interagiert, liegt es vermutlich sowohl in seiner aktiven als auch in seiner inaktiven Form als Dimer vor. Dies ist bereits von der Rücklaufbremse YcgR aus *E. coli* und *S. enterica* bekannt. Hier führt die Bindung von c-di-GMP zu einer Konformationsänderung, wodurch die N-terminale YcgR-N-Domäne und die C-terminale PilZ-Domäne in größere räumliche Nähe gelangen [15,78,101,178]. Diese Konformationsänderung bedingt den negativen Effekt von YcgR auf die Rotationseffizienz der Flagelle, da durch die zeitgleiche Bindung beider Domänen an den Rotor und den Stator, der Energiefluss zwischen Rotor und Stator inhibiert wird [25,59,78,149]. MotL ist im Gegensatz zu FlgZ und YcgR, ein kanonisches PilZ-Domänenprotein und besteht als solches nur aus der PilZ-Domäne, wodurch eine Bindung einer speziellen N-Terminalen Domäne an den Rotor nicht für den Effekt von MotL verantwortlich sein kann. Ein weiteres kanonisches PilZ-Domänenprotein, welches einen Einfluss auf die Motilität zeigt, ist MapZ aus *P. aeruginosa* [231]. MapZ interagiert in seiner aktiven c-di-GMP-gebundenen Form direkt mit der Methyltransferase CheR1, wodurch die Signaltransduktionskette des Chemotaxissystems inhibiert und die Anzahl der Richtungswechsel des Flagellenmotors deutlich gesenkt wird. Durch die Bindung von c-di-GMP unterläuft MapZ eine Konformationsänderung, wodurch die beiden C-terminalen α-Helicen [233], die sich durch eine hohe Anzahl an geladenen Aminosäuren auszeichnen [63], sich so anordnen, dass sie an CheR1 binden und dessen enzymatische Aktivität inhibieren können [233]. Da das laterale Flagellensystem von *S. putrefaciens* CN-32 nicht mit dem Chemotaxissystem interagiert [33] und MotL keinen Einfluss auf das polare Flagellensystem, welches mit dem Chemotaxissystem interagiert, besitzt, kann derselbe Mechanismus nicht für den Effekt von MotL verantwortlich sein. Es ist allerdings naheliegend, dass die Bindung von c-di-GMP an MotL ebenfalls zu einer Neuorientierung

der α-Helicen im C-Terminus führt, wodurch die Interaktion mit einem weiteren Motorprotein ermöglicht wird und somit der Energietransfer zwischen Stator und Rotor inhibiert werden kann.

3.3 Hypothetischer Regulationsmechanismus für MotL

Die Deletion von *motL* hat keinen positiven Einfluss auf die Bildung der lateralen Flagellen in *S. putrefaciens* CN-32. Somit können der negative Effekt einer Überexpression von MotL und der erhöhte Ausbreitungsradius in Weichagar nach Deletion von *motL* auf einen posttranslationalen Regulationsmechanismus zurückgeführt werden. Anhand der durchgeführten Lokalisations- und Interaktionsstudien konnte eine Bindung von MotL an den Flagellenmotor der lateralen Flagellen von *S. putrefaciens* CN-32 gezeigt werden. Die Interaktion beruht dabei hauptsächlich auf dem Rotorprotein $FliG_2$ und dem Statorprotein MotB und ist spezifisch für das laterale Flagellensystem. Die Lokalisation von MotL am Motor der lateralen Flagelle findet nach Überproduktion unabhängig von einer c-di-GMP-Bindung statt. Eine Bindung von c-di-GMP ist allerdings für den negativen Effekt von MotL auf die Rotationseffizienz des Flagellenmotors notwendig. Vermutlich wird der negative Effekt erst durch eine Konformationsänderung und eine damit einhergehende strukturelle Veränderung ermöglicht. Abbildung 25 zeigt den postulierten hypothetischen Regulationsmechanismus von MotL.

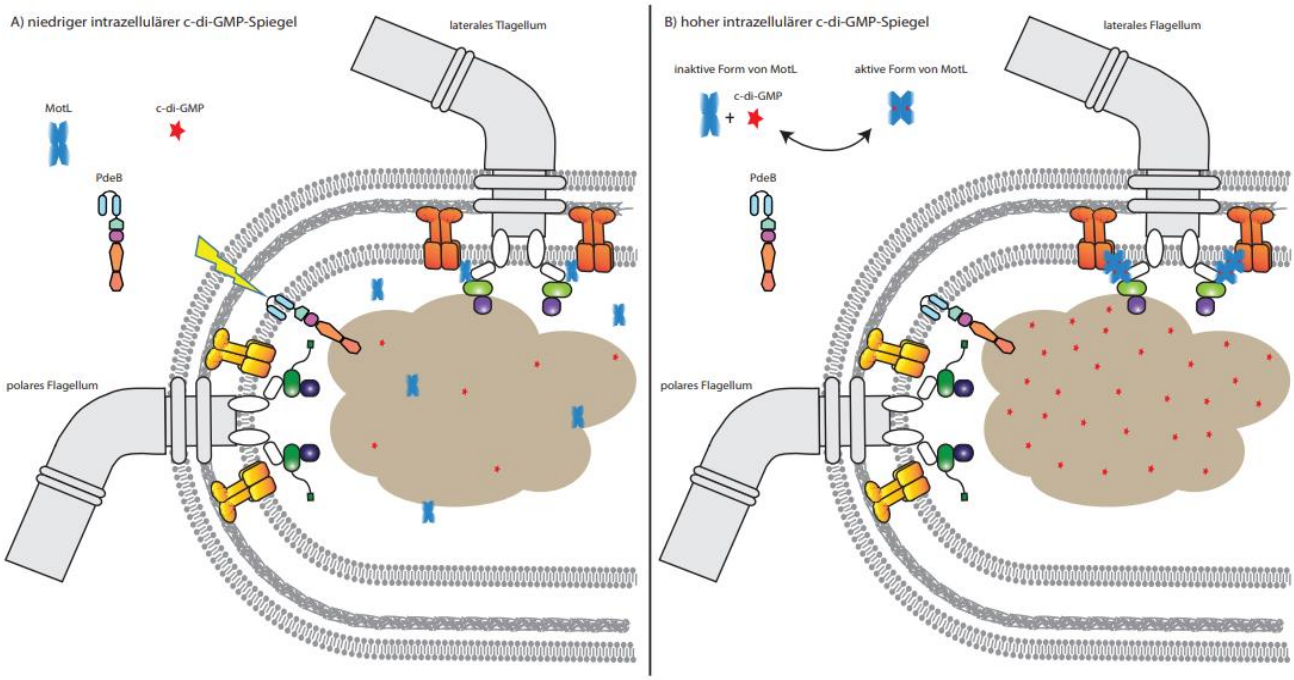

Abbildung 25: Regulationsmechanismus von MotL. Schematische Darstellung der c-di-GMP abhängigen Regulation der Rotationseffizienz einer lateralen Flagelle in *S. putrefaciens* CN-32. C-di-GMP (rot) und die Wolke um die Phosphodiesterase PdeB sollen den lokalen c-di-GMP-Gradienten verdeutlichen **A**) Der Blitz stellt ein Umweltsignal dar, das die Aktivität von PdeB reguliert und zu einem niedrigen intrazellulären c-di-GMP-Spiegel führt. Unter diesen Bedingungen kann MotL (blau) bereits über eine direkte Interaktion mit Bestandteilen des Rotors und des Stators an den Motor der lateralen Flagelle binden, beeinflusst dessen Funktion allerdings nicht negativ. **B**) Ist PdeB inaktiv, so steigt der intrazelluläre c-di-GMP-Spiegel an und MotL bindet c-di-GMP. In seiner aktiven c-di-GMP-gebundenen Form bindet MotL vermehrt an den lateralen Flagellenmotor und entkoppelt dadurch die Statoren von den Rotoren. Dies führt zu einer verminderten Rotationseffizienz und einer geringeren Drehmomenterzeugung. Je mehr Rotoren durch die Interaktion mit MotL-c-di-GMP von den Statoren entkoppelt werden, desto geringer werden die Schwimmgeschwindigkeit und der Ausbreitungsradius, die durch diese Flagelle bedingt werden.

In seiner c-di-GMP-freien, also in der inaktiven, Form ist MotL bereits dazu in der Lage mit den Rotorproteinen $FliG_2$ und $FliM_2$ aber auch mit dem Statorprotein MotB zu interagieren. Vermutlich überspannt das Dimer oder sogar ein größeres Multimer die Interaktionsfläche zwischen Rotor und Stator, ohne die Motorfunktion negativ zu beeinflussen. Im Gegenteil konnte für die Überproduktion von MotL bei einem artifiziell niedrigen c-di-GMP-Spiegel sogar eine Steigerung der Rotationseffizienz und somit ein positiver Effekt gezeigt werden. Dieser wird vermutlich durch eine Stabilisierung der Interaktion zwischen dem Rotorprotein $FliG_2$ und dem Statorprotein MotB erzeugt. In *S. putrefaciens* CN-32 wird der intrazelluläre c-di-GMP-Spiegel maßgeblich über die Aktivität der polar lokalisierten Phosphodiesterase PdeB reguliert. Die Aktivität von PdeB wird durch Umweltsignale gesteuert. Solange PdeB aktiv ist, ist der intrazelluläre c-di-GMP-Spiegel recht gering aber ohne diese Aktivität steigt er deutlich an [173]. Durch den Anstieg des intrazellulären c-di-GMP-Spiegels kommt es zur Bindung von c-di-GMP an MotL. Diese Bindung löst vermutlich eine starke Konformationsänderung und den Übergang von der inaktiven zur aktiven Form aus. Durch diese Konformationsänderung wird die Interaktion zwischen dem Rotorprotein $FliG_2$ und dem Statorprotein MotB plötzlich nicht mehr stabilisiert sondern die beiden Proteine werden voneinander entkoppelt und so der Energietransfer zwischen ihnen verhindert. Der Flagellenmotor besteht aus mehreren Ringen, die übereinander angeordnet sind und jeder dieser Ringe besteht aus mehreren Untereinheiten [18]. So besteht der Statorring aus *E. coli* zum Beispiel aus durchschnittlich 11 Statorkomplexen [166]. Auch der Statorring in *S. putrefaciens* CN-32 bildet sich aus mehreren Statorkomplexen. Dies hat zur Folge, dass die Inhibierung einer Statoruntereinheit durch c-di-GMP-gebundenes MotL nicht zu einem Rotationsstopp führt sondern in einer stufenweisen Abnahme der Rotationsgeschwindigkeit resultiert. Ein Rotationsstopp wird erst dann erreicht, wenn alle Statoruntereinheiten vom Rotor entkoppelt wurden. Interessanterweise zeigen sich in Zellen, in denen *sfgfpmotL* chromosomal integriert wurde, nur unter artifiziell erhöhten c-di-GMP-Spiegeln laterale und subpolare sfGFPMotL-Foci. Dies legt die Vermutung nahe, dass MotL unter nativen Bedingungen in seiner c-di-GMP-ungebundenen Form größtenteils frei im Zytoplasma diffundiert und erst ein Anstieg des intrazellulären c-di-GMP-Spiegels zu einer vermehrten Lokalisation am lateralen Flagellenmotor führt, wo es als sterische Bremse agiert und die Rotationseffizienz der Flagelle herabsetzt.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Chemikalien und Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Materialien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von den Firmen Bioline (Luckenwald), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sarstedt (Nümbrecht), Thermo Fisher Scientific (Langenselbold) und Sigma-Aldrich (Steinheim) geordert.

4.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2 aufgelistet. Alle Stämme wurden als Gefrierkulturen mit 10 % (v/v) DMSO bei -80°C gelagert. Die verwendeten und konstruierten Plasmide sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 2: Bakterienstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Stamm	Genotyp	Referenz
Escherichia coli		
DH5α λpir	Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U196 recA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1/λpir	[125] W. Metcalf, University of Illinois
WM3064	hrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZΔM15 RP4–1360Δ(araBAD)567 ΔdapA1341::[erm pir(wt)]	[125] W. Metcalf, University of Illinois
BTH101	F-, cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1 (Strr), hsdR2, mcrA1, mcrB1	[88] Euromedex, Frankreich
BL21star (DE3)	fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5	Invitrogen™, Thermo Fischer Scientific
***Shewanella putrefaciens* CN-32**		
WT	Wildtyp	[61]
Δ*clusterII*	Deletion des lateralen Flagellenclusters (ΔSputcn32_3444-ΔSputcn32_3486)	[32]
Δ*flagP*	Deletion der polaren Flagelline (Δ*flaAB*$_1$) (ΔSputcn32_2585-ΔSputcn32_2586)	[33]
Δ*flagL*	Deletion der lateralen Flagelline (Δ*flaAB*$_2$) (ΔSputcn32_3455-ΔSputcn32_3456)	[33]

Δ*flagP*Δ*flagL*	Deletion der polaren und lateralen Flagelline (Δ*flaAB1*Δ*flaAB2*)	unpubliziert
Δ*motL*	Deletion der sterischen Bremse MotL (Δ Sputcn32_3446)	diese Arbeit
Δ*flagP*Δ*motL*	Deletion der polaren Flagelline (Δ*flaAB1*) und Δ*motL*	diese Arbeit
Δ*flagL*Δ*motL*	Deletion der lateralen Flagelline (Δ*flaAB2*) und Δ*motL*	diese Arbeit
Δ*flagP*Δ*flagL*Δ*motL*	Deletion der polaren und lateralen Flagelline (Δ*flaAB1*Δ*flaAB2*) und Δ*motL*	diese Arbeit
Δ*flagP*Δ*motL* KI *sfgfpmotL*	Insertion von GFP-markiertem MotL zur Komplementation in Δ*flagP*Δ*motL*	diese Arbeit
Δ*fliM2* KI *fliM2mcherry*	Insertion von mCherry-markiertem $FliM_2$	[32]
Δ*motB* KI *mcherrymotB*	Insertion von mCherry-markiertem MotB	[32]
Δ*fliG2*	Deletion des lateralen Rotorproteins $FliG_2$ (Sputcn32_3475)	diese Arbeit
Δ*fliM2*	Deletion des lateralen Rotorproteins $FliM_2$ (Sputcn32_3479)	unpubliziert
Δ*fliN2*	Deletion des lateralen Rotorproteins $FliN_2$ (Sputcn32_3480)	unpubliziert
Δ*motBA*	Deletion der lateralen Statorproteine MotB und MotA (Sputcn32_3447- Sputcn32_3448)	[32]
$flgE_2^{T242C}$	Insertion des lateralen Hakenproteins $FlgE_2$ mit substituiertem Threonin zu Cystein an Position 242	[188]

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp	Referenz
pNPTS138-R6KT	Ori-R6K, *sacB*, Km^r, Suizidplasmid für die Erstellung der in-frame-Deletionen	[106]
pBTOK	Plasmid zur ektopischen Überproduktion von Proteinen, Anhydrotetracyclin induzierbarer Promotor, Km^r	[172]
pET21-*sfgfp*	Schnell faltendes (*super folder*) grün fluoreszierendes Protein (Gfp)	[151]

put18	Ori-ColE1, Amp^r, Plasmid zur C-terminalen Fusion des T18-Fragments an das Zielgen	[87–89] Euromedex
put18C	Ori-ColE1, Amp^r, Plasmid zur N-terminalen Fusion des T18-Fragments an das Zielgen	[87–89] Euromedex
pKT25	Ori-p15a, Amp^r, Plasmid zur N-terminalen Fusion des T25-Fragments an das Zielgen	[87–89] Euromedex
pKNT25	Ori-p15a, Amp^r, Plasmid zur C-terminalen Fusion des T25-Fragments an das Zielgen	[87–89] Euromedex
pet24c	Plasmid zur ektopischen Überproduktion von Proteinen, Laktose induzierbarer Promotor, Km^r	EMD Biosciences

Konstrukte für Deletionen

pNPTS_KO_SputCN32_3446	MotL (SputCN32-3446) Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	diese Arbeit
pNPTS_KO_SputCN32_3475	$FliG_2$ (SputCN32-3475) Deletionsfragment in pNPTS138-R6KT	diese Arbeit

Konstrukte für Insertionen

pNPTS_KI_*sfgfpmotL*	sfGfp markiertes MotL in pNPTS138-R6KT zur Komplementation der Deletion und Überprüfung der Markierung auf Funktionalität	diese Arbeit

Konstrukte zur Überproduktionen

pBTOK_ *sfgfpmotL*	sfGfp markiertes MotL in pBTOK zur induzierbaren Überproduktion	diese Arbeit
pBTOK_*sfgfpmotLAAx*	sfGfp-markierte, c-di-GMP-insensitive Variante von MotL in pBTOK zur induzierbaren Überproduktion	diese Arbeit
pBTOK_*pdeH*	Enzymatisch aktiver Teil der Phophodiesterase PdeH aus *E. coli* in pBTOK zur induzierbaren Überproduktion	diese Arbeit
pBTOK_*dgcA*	Enzymatisch aktiver Teil der Diguanylatzyklase DgcA aus *V. cholera* zur induzierbaren Überproduktion	diese Arbeit
pBTOK_*sfgfpmotL_pdeH*	Konstrukt zur zeitgleichen induzierbaren Überproduktion von sfGFPMotL und PdeH	diese Arbeit

pBTOK_*sfgfpmotL_dgcA*	Konstrukt zur zeitgleichen induzierbaren Überproduktion von sfGFPMotL und DgcA	diese Arbeit
pBTOK_*sfgfpmotLAAx_pdeH*	Konstrukt zur zeitgleichen induzierbaren Überproduktion von sfGFPMotLAAx und PdeH	diese Arbeit
pBTOK_*sfgfpmotLAAx_dgcA*	Konstrukt zur zeitgleichen induzierbaren Überproduktion von sfGFPMotLAAx und DgcA	diese Arbeit
pet24c_*wsp*R^{R242A}	Konstrukt zur induzierbaren Überproduktion der Diguanylatzyklase $WspR^{R242A}$ aus *P. aeruginosa*	diese Arbeit

Konstrukte für BACTH

pUT18_*motL*	C-terminale Fusion des T18-Fragments an MotL	diese Arbeit
pUT18C_*motL*	N-terminale Fusion des T18-Fragments an MotL	diese Arbeit
pKT25_ *motL*	N-terminale Fusion des T25-Fragments an MotL	diese Arbeit
pKNT25_ *motL*	C-terminale Fusion des T25-Fragments an MotL	diese Arbeit
pUT18_ *motLAAx*	C-terminale Fusion des T18-Fragments an MotLAAx	diese Arbeit
pUT18C_ *motLAAx*	N-terminale Fusion des T18-Fragments an MotLAAx	diese Arbeit
pKT25_ *motLAAx*	N-terminale Fusion des T25-Fragments an MotLAAx	diese Arbeit
pKNT25_ *motLAAx*	C-terminale Fusion des T25-Fragments an MotLAAx	diese Arbeit
pUT18_*fliM*$_2$	C-terminale Fusion des T18-Fragments an $FliM_2$	diese Arbeit
pUT18_*fliM*$_2$	N-terminale Fusion des T18-Fragments an $FliM_2$	diese Arbeit
pKT25_*fliM*$_2$	N-terminale Fusion des T25-Fragments an $FliM_2$	diese Arbeit
pKNT25_*fliM*$_2$	C-terminale Fusion des T25-Fragments an $FliM_2$	diese Arbeit
pUT18_*fliN*$_2$	C-terminale Fusion des T18-Fragments an $FliN_2$	diese Arbeit
pUT18C_*fliN*$_2$	N-terminale Fusion des T18-Fragments an $FliN_2$	diese Arbeit
pKT25_*fliN*$_2$	N-terminale Fusion des T25-Fragments an $FliN_2$	diese Arbeit
pKNT25_*fliN*$_2$	C-terminale Fusion des T25-Fragments an $FliN_2$	diese Arbeit
pUT18_*fliG*$_2$	C-terminale Fusion des T18-Fragments an $FliG_2$	diese Arbeit

pUT18C_ *fliG₂*	N-terminale Fusion des T18-Fragments an $FliG_2$	diese Arbeit
pKT25_ *fliG₂*	N-terminale Fusion des T25-Fragments an $FliG_2$	diese Arbeit
pKNT25_ *fliG₂*	C-terminale Fusion des T25-Fragments an $FliG_2$	diese Arbeit
pUT18C_*motB*	N-terminale Fusion des T18-Fragments an MotB	diese Arbeit
pKT25_*motB*	N-terminale Fusion des T25-Fragments an MotB	diese Arbeit

4.1.2 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (mittlerweile Merck) bezogen. Tabelle 4 enthält eine vollständige Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5´-3´)
Deletion von *motL*	
NheI_Sputcn32_3446_fw	GTA GCT AGC CAG GGT ATC CGT ATT TTG ATC C
OL_SputCN32_3446_KO_rv	TGC CCT ATA TCT CTT CAT ACA TAT TCA TAG TCA TAC C
OL_SputCN32_3446_KO _fw	GTA TGA AGA GAT ATA GGG CAT GCA ATG GCT GC
PspOMI_Sputcn32_3446_rv	TCC GGG CCC GTA TCA ACC GTG GTA CTC TGC
Check_3446_KO_fw	TGG TGC TAA GCG AAG TAG AAG C
Check_3446_KO_rev	CTG TTT TAG CAA GGC AAT TGA ATC G
Deletion von *fliG₂*	
EcoRV_FliG_up_fw	CAA GCT TCT CTG CAG GAT GCG GAT TTT ATC CTC AGC CAG
OL_FliG_up_rv	GGA TAA TTA CGTC GTT GTC TAA TGG AAA ACA AGC
OL_FliG_down_fw	AGA CAA CGA CGTA ATT ATC CAT CTT AAT TTC GAT TGA G
EcoRV_FliG_down_rv	GAA TTC GTG GAT CCA GAT GTC TCA GTA CTC ATC AAT AGC G
Check_fliG2 KO_fw	ATC TGC AAT CAG ATT CCA GCC G
Check_fliG2 KO_rev	GAA CCA GGA TCA CCT TTA ACG G
Insertion von *sfgfpmotL*	
EcoRV_3446_up_fw	CAA GCT TCT CTG CAG GAT GGC GGA GAA TAT CAC TGT CAC
OL_3446_up_rv	CTT TGC TCA T AGT CAT ACC TAA CAA ATG AGT ACA AG
OL_up_sfGFP_fw	AGG TAT GAC T ATG AGC AAA GGA GAA GAA CTT TTC
OL_down_3446_rv	ATT GCA TGC C TTA TAT TTT GGC TCG TAA TTT AAT TGC G
OL_3446_down_fw	CAA AAT ATA A GGC ATG CAA TGG CTG CAT CTT
EcoRV_3446_down_rv	GAA TTC GTG GAT CCA GAT CAT CAT GCA ACA CAC TCG TGG
Check_3446_KO_fw	TGG TGC TAA GCG AAG TAG AAG C
Check_3446_KO_rev	CTG TTT TAG CAA GGC AAT TGA ATC G

Überproduktion von sfGFPMotL	
XbaI-nC_sf_GFP_fw	AAT GAA TAG TTC GAC AAA AAT AGG AGG CTT AGT CCA T ATG AGC AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT G
OL__sfGFP_Sputcn32_3446_rv	CAT ACA TAT T CGA GCC GGA TCC TTT GTA GAG CTC ATC
OL_sfGFP_Sputcn32_3446_fw	CATC ATC CGG CTC G AAT ATG TAT GAA GAG TTT GTA CAT TC
PspOMI-nC_Sputcn32_3446_rev	GGA GTC CAA GCT CAG CTA ATG TTA TAT TTT GGC TCG TAA TTT AAT TGC GTC
Überproduktion von sfGFPMotLAAx	
XbaI-nC_sf_GFP_fw	AAT GAA TAG TTC GAC AAA AAT AGG AGG CTT AGT CCA T ATG AGC AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT G
OL__sfGFP_Sputcn32_3446_rv	CAT ACA TAT T CGA GCC GGA TCC TTT GTA GAG CTC ATC C
OL_sfGFP_Sputcn32_3446_fwt	ATC CGG CTC G AAT ATG TAT GAA GAG TTT GTA CAT TC
erste Bindestelle nach Anfang rv OL zu zweite	CGT TGA TAA ATT AAC CGT TAA GCC ATC ACA GGC AAA CGC TAA TGG CAC TCT TTT ATC ATG TCG TAG GCT GAG TGC CTG ATG AGT TGC CCG ATT
zweite Bindestelle nach Ende fw OL zu erste	TTA ACG GTT AAT TTA TCA ACG ACT CGT TGG TTT ATC CTC ACG CCA CTC GGT ACC GCG AAC ATA AAA GCA ATT GCA ATT GGC
PspOMI-nC_Sputcn32_3446_rev	GGA GTC CAA GCT CAG CTA ATG TTA TAT TTT GGC TCG TAA TTT AAT TGC GTC
Überproduktion von sfGFPMotL(AAx)_PdeH	
XbaI-nC_sf_GFP_fw	AAT GAA TAG TTC GAC AAA AAT AGG AGG CTT AGT CCA T ATG AGC AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT G
3446_rv_OL_RBS2	TAA GCC TCC TTG CTA GCC TTA TAT TTT GGC TCG TAA TTT AAT TGC GTC
OL_3446_PdeH_fw	AAG GCT AGC A AGG AGG CTT AGT CCA T ATG ATA AGG CAG GTT ATC CAG CG
PspOMI_PdeH_rev	GGA GTC CAA GCT CAG CTA ATG TTA TAG CGC CAG AAC CGC CG
Überproduktion von sfGFPMotL(AAx)_DgcA	
XbaI-nC_sf_GFP_fw	AAT GAA TAG TTC GAC AAA AAT AGG AGG CTT AGT CCA T ATG AGC AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT G
3446_rv_OL_RBS2	TAA GCC TCC T TG CTA GCC TTA TAT TTT GGC TCG TAA TTT AAT TGC GTC
OL_3446_VdcA_fw	AAG GCT AGC A AGG AGG CTT AGT CCA T GTG ATG ACA ACT GAA GAT TTC AAA AAA TC
PspOMI_VdcA_rev	GGA GTC CAA GCT CAG CTA ATG TTA GAG CGG CAT GAC TCG ATT G
Überproduktion von WspR	
NdeI his WspR fw	TTA ACT TTA AGA AGG AGA TAT ACA ATG CAC AAC CCT CAT GAG AGC AAG ACC
OL R242A rv	CCG AGG AGC CAC TGC AGC CCT CGC CGA TGG
OL R242A fw	CCA TCG GCG AGG GCT GCA GTG GCT CCT CGG
XhoI WspR rv	GTG GTG GTG GTG GTG GTG C TCA ATG GTG ATG GTG ATG GTG GCC CGC CGG GGC TGG CGG CAC
BACTH MotL	
FlgZ fwPrimerREV	CTG CAG GTC GAC TCT AGA GAT GAA TAT GTA TGA AGA GTT TGT ACA TTC T
FlgZ rvPrimerREV	GAG CTC GGT ACC CGG GGT ATT TTG GCT CGT AAT TTA ATT GCG TC

FlgZ fwPrimerpKT	CAG GGT CGA CTC TAG AGA TGA ATA TGT ATG AAG AGT TTG TAC ATT CT
FlgZ rvPrimerpKT	TTA GTT ACT TAG GTA CCC GGG GTA TTT TGG CTC GTA ATT TAA TTG CGT C
BACTH $FliG_2$	
LZ062 B2H_3475_fwREV	CTG CAG GTC GAC TCT AGA GAT GGA TAA TTA CGC CCA AGC AGC
LZ063 B2H_3475_rvREV	GAG CTC GGT ACC CGG GGG ACA ACG ACC TGC TCT TCA AAT A
LZ064 B2H_3475_fwpKT	CAG GGT CGA CTC TAG AGA TGG ATA ATT ACG CCC AAG CAG C
LZ065 B2H_3475_rvpKT	TTA GTT ACT TAG GTA CCC GGG GGA CAA CGA CCT GCT CTT CAA ATA
BACTH $FliM_2$	
LZ066 B2H_3479_fwREV	CTG CAG GTC GAC TCT AGA GAT GAA GAT AAC CGC AAA AGC TCG
LZ067 B2H_3479_rvREV	GAG CTC GGT ACC CGG GGG CCA ATG TCG TTC TCC TCA TAC
LZ068 B2H_3479_fwpKT	CAG GGT CGA CTC TAG AGA TGA AGA TAA CCG CAA AAG CTC G
LZ069 B2H_3479_rvpKT	TTA GTT ACT TAG GTA CCC GGG GGC CAA TGT CGT TCT CCT CAT AC
BACTH $FliN_2$	
LZ070 B2H_3480_fwREV	CTG CAG GTC GAC TCT AGA GAT GAG GAG AAC GAC ATT GGC TG
LZ071 B2H_3480_rvREV	GAG CTC GGT ACC CGG GGT TCG TTA ATT GTC CCA TCC AGC G
LZ072 B2H_3480_fwpKT	CAG GGT CGA CTC TAG AGA TGA GGA GAA CGA CAT TGG CTG
LZ073 B2H_3480_rvpKT	TTA GTT ACT TAG GTA CCC GGG GTT CGT TAA TTG TCC CAT CCA GCG
BACTH MotB	
LZ058 B2H_3447_fwREV	CTG CAG GTC GAC TCT AGA GAT GCT CCA TAA AAA TGA GCC GAT TAT T
LZ059 B2H_3447_rvREV	GAG CTC GGT ACC CGG GGA TGC GCG ATA GTC TGT CGT TTT ATA
LZ060 B2H_3447_fwpKT	CAG GGT CGA CTC TAG AGA TGC TCC ATA AAA ATG AGC CGA TTA TT
LZ061 B2H_3447_rvpKT	TTA GTT ACT TAG GTA CCC GGG GAT GCG CGA TAG TCT GTC GTT TTA TA
BACTH check	
pKT25-for	CAC TGA CGG CGG ATA TCG ACA TGT T
pKT25-rev	CCG CCG GAC ATC AGC GCC ATT C
pUT18-for	CCA GGC TTT ACA CTT TAT GCT TCC
pUT18-rev	GAC GCG CCT CGG TGC CCA CTG C
pKNT25-for	CCC AGG CTT TAC ACT TTA TGC TTC C
pKNT25-rev	GTT TTT TTC CTT CGC CAC GGC CTT G
pUT18C-for	CGG CGT GCC GAG CGG ACG TTC G
pUT18C-rev	TCA GCG GGT GTT GGC GGG TGT C

4.1.3 Nährmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien sind in Tabelle 5 augelistet.

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Lysogeny Broth (LB)	Trypton	10 g/l
pH 7	Hefeextrakt	5 g/l
	Natriumchlorid	10 g/l
LB-Agar	Agar-Agar	15 g/l
	LB Medium	25 g/l
Weich-Agar	Select Agar	2,5 g/l
	LB Medium	25 g/l

4.1.4 Antibiotika und Medienzusätze

Die in dieser Arbeit eingesetzten Medienzusätze und Antibiotika sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Antibiotika und Medienzusätze

Zusatz	Stammkonzentration	Endkonzentration	Lösungsmittel
Ampicillin-Natriumsalz	100 mg/ml	100 µg/ml	ddH_2O
Kanamycinsulfat	50 mg/ml	50 µg/ml	ddH_2O
Anhydrotetracyclin	2 mg/ml	100ng/ml	ddH_2O
Diaminopimelinsäure (DAP)	60 mM	300 µM	ddH_2O
Laktose	20 % (w/v)	1,25 %	ddH_2O
Saccharose	80 % (w/v)	12 %	ddH_2O
X-GAL	80 mg/ml	80 µg/ml	ddH_2O
IPTG	100 mM	0,1 mM	ddH_2O

4.1.5 Enzyme

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 7 aufgelisteten Enzyme der jeweiligen Hersteller verwendet.

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Taq-Polymerase	Wird selbst hergestellt
Phusion-DNA Polymerase	Thermo Scientific
T5 Exonuklease	Invitrogen
T4 DNA Ligase	Biozym Scientific
Taq DNA Ligase	Invitrogen
EcoRV fast digest	Thermo Scientific
XbaI fast digest	Thermo Scientific
Bsp120I (PspOMI) fast digest	Thermo Scientific
DNase	Invitrogen
Thermosensitive alkalische Phosphatase	Thermo Scientific

4.1.6 Kits

Für diese Arbeit wurden die in Tabelle 8 aufgelisteten kommerziell erhältlichen Kits verwendet.

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Kits

Bezeichnung und Hersteller	Verwendung
E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-Tek)	Isolierung von Plasmiden
E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (Omega Bio-Tek)	Isolation von DNA aus einem Agarosegel
E.Z.N.A. DNA Probe Purification Kit (Omega Bio-Tek)	Aufreinigung von PCR Produkten
E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit (Omega Bio-Tek)	Isolierung chromosomaler DNA

4.1.7 Puffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer für die Arbeiten mit Nukleinsäuren und Proteinen sind in den Tabellen 9 und 10 aufgelistet.

Tabelle 9: Pufferlösungen für die Arbeit mit Nukleinsäuren

Bezeichnung	Zusammensetzung	
10x TBE-Puffer	Tris-Borat	1 M
pH 8,3	EDTA	20 mM
5x DNA-Ladepuffer	10x TBE-Puffer	1 ml
	Bromphenolblau	1 ml
	Glycerol	5 ml
	ddH_2O	3 ml

Tabelle 10: Pufferlösungen für die Arbeit mit Proteinen

Bezeichnung	Zusammensetzung	
2x SDS-Ladepuffer	Bromphenolblau	0,02 % (w/v)
pH 6,8	β-Mercaptoethanol	10 % (w/v)
	Glycerol	20 % (w/v)
	SDS	4 % (w/v)
	Tris-HCl	0,125 M
4x Trenngelpuffer	SDS	0,4 % (w/v)
pH 8,8	Tris-HCl	1,5 M
4x Sammelgelpuffer	SDS	0,4 % (w/v)
pH 6,8	Tris-HCl	0,5 M
10x SDS-Laufpuffer	Tris	0,25 M
pH 8,3	Glycin	1,92 M
10x Western Transfer Puffer	Tris	0,25 M
	Glycin	1,92 M
1x Western Transfer Puffer	10x Western Transfer Puffer	100 ml
	Methanol	100 ml
	ddH_2O	800 ml

10x PBS	NaCl	1,37 M
pH 7,4	KCl	27 mM
	Na_2HPO_4	66 mM
	KH_2PO_4	18 mM
1x PBST	10x PBS	100 ml
	TWEEN 20	1 ml
	ddH_2O	899 ml
Blocklösung	PBST	100 ml
	Milchpulver	5 % (w/v)
Detektionslösung	Tris-HCl	0,1 M
pH 9,5	NaCl	0,1 M
Lysepuffer	Tris-HCl	10 mM
pH 7,5	NaCl	150 mM
	EDTA	0,5 mM
	3-(*N*,*N*-Dimethylmyristylammonio)-propanesulfonat	1 %
Waschpuffer	Tris-HCl	10 mM
pH 7,5	NaCl	150 mM
	EDTA	0,5 mM
Glycin-Elutionspuffer	Glycin	200 mM
pH 2,5		
c-di-GMP-Synthesepufferkomponenten	Tris-HCl (pH 7,6)	1 M
	NaCl	1 M
	$MgCl_2$	1 M
c-di-GMP-Bindepuffer	Tris-HCl (pH 7,6)	20 mM
pH 7,8	NaCl	50 mM
	$MgCl_2$	10 mM
Puffer A	HEPES	20 mM
pH 8,0	NaCl	200 mM
	KCl	20 mM
	$MgCl_2$	20 mM
	Immidazol	40 mM

Puffer B	HEPES	20 mM
pH 8,0	NaCl	200 mM
	KCl	20 mM
	$MgCl_2$	20 mM
	Immidazol	500 mM

4.1.8 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Agarose Gel Photokammer	Intas Photo Imager	Intas science imaging
Fluoreszenzmikroskop	Leica DM1600 B	Leica
Heizblock	Eppendorf® Thermomixer Compact	Merck
Immunoblot Fotokammer	Fusion SL4	Peqlab
NanoDrop	NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Peqlab
PCR-Thermocycler	Mastercycler nexus gradient	Eppendorf AG
	Biometra TPersonal	Biometra
Photometer	WPA CO8000	Biochrom
	Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences
Scanner	Epson Perfection V700 Photo	Epson
SDS-Page Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Medical Diagnostics GmbH
Tischzentrifuge	Heraeus FRESCO 21	Themofisher Scientific
Western Blot Apparatur	TE77 ECL Semi-Dry Transfer Unit	Amersham Bioscience
Phosphoimager and Screens	personal molecular imager FX	Bio-Rad Medical Diagnostics GmbH
Sonifier	Sono Puls	Bandelin
peristaltische Pumpe	Masterflex C/L	Cole Parmer
magnetic beads rack	magnetic separation rack	NEB Biolabs
vertikal Schüttler	programmable Rotator-Mixer	PEQLAB

4.2 Methoden

4.2.1 Kultivierung von Bakterienstämmen

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 2 aufgeführt. *S. putrefaciens* CN-32 wurde standardmäßig aerob in LB-Medium bei 30°C und *E. coli* bei 37°C kultiviert. Zur Kultivierung des Stammes *E. coli* WM3064 wurde das Medium mit 300 µM DAP versetzt. Kulturen von *S. putrefaciens* CN-32 die zur Mikroskopie genutzt wurden, wurden bei Raumtemperatur angezogen. Die Langzeitlagerung der Stämme erfolgt in Cryo.S Gefäßen als Gefrierkultur in 10 % DMSO (v/v) bei -80°C.

4.2.2 Konstruktion rekombinanter Bakterienstämme

Präparationen von genomischer DNA, Plasmiden und PCR-Produkten wurden anhand der Herstelleranweisungen mit den in Tabelle 8 aufgelisteten Kits durchgeführt.

4.2.2.1 *Gibson Assembly*

Zur Konstruktion von Plasmiden wurde das *Gibson Assembly* [64], eine Variante der isothermalen DNA-Amplifikation genutzt. Hierzu wurden zunächst mittels PCR DNA-Inserts erzeugt, die an einem Ende 10 bp Überhänge mit zueinander homologen Bereichen aufweisen und am jeweils anderen Ende homologe Bereiche zu dem linearisierten Plasmid aufweisen. Anschließend wurden die erzeugten DNA-Fragmente in äquimolaren Mengen, mit dem zuvor linearisierten Plasmid in den *Gibson Assembly*-Ansatz gegeben und bei 50°C für eine Stunde inkubiert. Enthalten in dem *Gibson Assembly*-Ansatz ist eine 5'-Exonuklease, eine DNA-Polymerase und eine DNA-Ligase. Im ersten Schritt verdaut die 5'-Exonuklease die 5' Enden der doppelsträngigen DNA, sodass die nun zueinander komplementären 3'-Enden hybridisieren können. Die DNA-Polymerase schließt die durch die 5'-Exonuklease entstandenen Lücken auf und die DNA-Ligase verbindet die Enden miteinander. Anschließend können die so hergestellten Plasmide mittels Transformation in kompetente Zellen eingeführt werden.

4.2.2.2 Transformation

Zur Transformation von Plasmid-DNA mittels Hitzeschock wurden 20-100 ng des isolierten Plasmids oder der gesamte Ansatz eines *Gibson Assemblys* mit 50 µl chemisch kompetenten *E. coli* DH5α λpir Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden. Bei diesem Schritt kann die Plasmid-DNA von den Zellen aufgenommen werden. Dann wurde der Ansatz für eine Minute auf Eis gestellt. Die anschließende Regeneration erfolgte nach Zugabe von 750 µl LB-Medium schüttelnd für 60 min bei 37°C. Nach erfolgter Regeneration wurden je 100 µl des Ansatzes direkt und der pelletierte Rest des Ansatzes nach erneutem Resuspendieren auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.2.3 Konjugation

Mittels konjugativer Paarung auf LB-Agar wurden das Suizidplasmid pNPTS oder das Überproduktionsplasmid pBTOK in *S. putrefaciens* CN-32 eingebracht. Als Donorstamm wurde in dieser Arbeit der Stamm *E. coli* WM3064 verwendet, welcher auxotroph für DAP ist. DAP ist ein wichtiger Baustein des Peptidoglykans, weshalb die Zugabe von DAP für die Zellen essentiell zur Bildung der Zellwand ist. Mittels Transformation wird in einem vorherigen Schritt das gewünschte Plasmid in den *E. coli* Stamm gebracht. Als Rezipient wurde jeweils der gewünschte Shewanella Zielstamm verwendet. Zur Konjugation wurde je 1 ml einer Kultur der entsprechenden Stämme geerntet und 2-mal mit LB_{DAP}-Medium gewaschen. Anschließend wurden Donor- und Rezipientenstamm in 200 µl LB_{DAP}-Medium vereinigt und in 5-6 Tropfen auf LB_{DAP}-Agarplatten gegeben. Die Konjugationsplatten wurden für mindestens 6 Stunden bei 30°C inkubiert. Während dieser Inkubationszeit bindet die Donorzelle mithilfe des Sexpilus an die Empfängerzelle und es bildet sich eine Zytoplasmabrücke, über welche das Plasmid in die Empfängerzellen transferiert werden kann. Nach der Inkubation wurden die Konjugationsplatten mit 2 ml LB-Medium abgeschwemmt und anschließend dreimal gewaschen. Final wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen und in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung auf LB_{Kan}-Agarplatten ausplattiert und bei 30°C über Nacht inkubiert, wodurch auf die Bakterien mit integriertem Plasmid selektiert wurde.

4.2.2.4 Herstellung von *in-frame*-Deletionsmutanten

Hierzu wurden in einer ersten PCR stromaufwärts und stromabwärtsgelegene Gensequenzen (jeweils ca. 500 bp) des zu deletierenden Gens amplifiziert, mittels *Gibson Assembly* fusioniert und als Insert in das Suizidplasmid pNPTS138-R6KT eingefügt. Dieses kann nur in Zellen amplifiziert werden, welche die Pir Proteine exprimieren. Das Plasmid trägt neben einer Kanamycinresistenz das Gen *sacB*. Das Gen *sacB* codiert für das Enzym Levansucrase, welches in Anwesenheit von Saccharose für die Zelle toxisches Levan synthetisiert. Der resultierende Vektor wurde mittels Transformation in *E. coli* DH5α λ pir eingebracht und nach erfolgter Plasmidpräparation in einer zweiten Transformation in den Konjugationstamm *E. coli* WM3064. Mittels Konjugation erfolgte die Einschleusung des Suizidvektors in *S. putrefaciens* CN-32. Shewanella Spezies exprimieren keine Pir Proteine, weshalb das eingeführte Plasmid nicht amplifiziert werden kann. Aufgrund der homologen Bereiche zu der chromosomalen DNA kommt es zu einer ersten homologen Rekombination und somit zur ortsspezifischen Insertion des gesamten Plasmids in die chromosomale DNA. Die Selektion der Bakterien mit chromosomal integriertem Plasmid erfolgt durch Wachstum auf LB_{Kan}-Agarplatten. Im nächsten Schritt wurden Kanamycin-resistente und Saccharose-sensitive Einzelkolonien ohne Selektionsdruck für etwa zehn Replikationszyklen in LB-Medium inkubiert. Dieser Schritt ermöglicht die zweite homologe Rekombination, da der Selektionsdruck nicht mehr vorhanden ist. Die Selektion auf Bakterien, die das Plasmid verloren haben erfolgt durch das Wachstum auf LB_{Suc}- und LB_{Kan}-Agarplatten. Im letzten Schritt wurden Saccharose-resistente aber Kanamycin-sensitive Stämme mittels Kolonie-PCR auf die Deletion des gewünschten Genabschnitts untersucht.

4.2.2.5 Herstellung von *in-frame*-Insertionen

Hierzu wurde ebenfalls eine Konjugation analog zur *in-frame*-Deletion durchgeführt, wobei eine Kopie des zuvor deletierten Gens fusioniert an ein Fluoreszenzprotein (sfGFP) in seinen genetischen Kontext im Genom reintegriert wird (*knock-in*).

4.2.3 Mikroskopie

Zur Mikroskopie wurden die entsprechenden Stämme in Übernachtkulturen bei Raumtemperatur angezogen. Am nächsten Morgen wurden die Kulturen in frischem Medium auf eine OD_{600} von 0,02 eingestellt und gegebenenfalls mit 100 ng/ml AHT induziert. Für Lokalisationsstudien wurden jeweils 3 µl der Kultur auf 1 %ige Agaroseplättchen aufgetropft und so immobilisiert. Es wurden mindestens 250 Zellen pro Ansatz ausgezählt. Zur Bestimmung der Schwimmgeschwindigkeit wurden Videos einer Flüssigkultur bei einer OD_{600} von ca. 0,15- 0,2 mit einer Belichtungszeit von 50 ms und mindestens 120 Bildern aufgenommen. Dazu wurden Objektträger genutzt, auf denen vier Silikontropfen aufgebracht wurden, worauf im Anschluss ein Deckgläschen (60 × 24 mm) aufgelegt und gleichmäßig angedrückt wurde. Diese wurden mindestens einen Tag vor der Mikroskopie vorbereitet, sodass das Silikon bei Raumtemperatur komplett trocknen konnte. Die Zellen wurden unter Verwendung des 100x/1.4 Objektivs mikroskopiert. Die nachfolgende Auswertung und Bildbearbeitung erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ [185].

4.2.4 Maleimidfärbung

Zur Visualisierung von Flagellenhaken wurden diese mittels Alexa Fluor 488-maleimide (Molecular Probes, Life Technologies) angefärbt. Hierzu wurden 500 µl der zu untersuchenden Kultur bei einer OD_{600} von 0,5 geerntet und für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet sehr vorsichtig unter Verwendung einer geschnittenen Spitze in 50 µl PBS-Alexa (2.5 µL Alexa Fluor 488 maleimide (1mg/ml in DMSO) per 500 µL PBS) resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrigugation für 5 min bei 3000 rpm wurden die Zellen einmal mit 500 µl PBS gewaschen und in 500 µl PBS aufgenommen (vorsichtig pipettieren). Schließlich wurden 3 µl der Zellsuspension auf Agarosepads mikroskopiert.

4.2.5 Motilitäts-Assays

Zur Untersuchung der Schwimmfähigkeit auf semisoliden Oberflächen wurden 4 µl einer Kultur des zu untersuchenden Stamms von *S. putrefaciens* CN-32 mit einer OD_{600} von etwa 0,4 auf LB-Weichagarplatten (gegebenenfalls versetzt mit Antibiotika und AHT) aufgetropft. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei Raumtemperatur wurde die radiale Ausbreitung gemessen und darüber der Motilitätsgrad bestimmt.

4.2.6 Überproduktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine

<u>$WspR^{R242A}$</u>

Zur Überproduktion der Diguanylatzyklase WspR aus *P. aeruginosa*, die durch den Aminosäureaustausch von Arginin (R) an Position 242 zu Alanin (A) nicht mehr durch ihr Produkt (c-di-GMP) gehemmt wird und dementsprechend dauerhaft aktiv ist [180], wurde der entsprechende Genabschnitt mit einem 6xHis-tag fusioniert in das Überexpressionsplasmid pet24c eingebracht und anschließend in *E. coli* BL21star überproduziert. Die Anzucht erfolgte schüttelnd in LB_{KAN} bei 37°C. Nach dem Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600} von 0,3) wurde zur Induktion der Proteinüberproduktion Laktose in einer finalen Konzentration von 1,25 % zugesetzt. Nach der Induktion erfolgte weiteres Wachstum bis zu einer OD_{600} von 0,8 und anschließend wurden die Zellen bei 5.000 × g für 20 min bei 4°C geerntet. Für die Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins wurden die Zellen in 30 ml Puffer A mit 1 mM AEBSF resuspendiert. Der

Zellaufschluss erfolgte durch Sonifikation (3 x 1 min, 7 x 10 %) und die Fraktion durch Zentrifugation bei 20.000 × g für 25 min bei 4°C. Das zuvor filtrierte Zelllysat wurde anschließend mittels einer peristaltischen Pumpe mit einer Durchflussrate von 1 ml/min über eine mit Puffer A äquilibrierte HisTrapHP 1 ml Säule (GE Healthcare) gegeben. Nach mehrmaligem waschen der Säule (15 ml Puffer A) wurde das Fusionsprotein mit Puffer B eluiert und in Fraktionen von je 1,5 ml bei einer Durchflussrate von 1 ml/min aufgefangen, wobei sich der Großteil des Proteins für gewöhnlich in der zweiten Fraktion befindet. Zur Überprüfung der Aufreinigung auf das Vorhandensein des Fusionsproteins, wurden Teile der Proben mit 2-fachem Protein-Ladepuffer versetzt und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt.

sfGFPMotL bzw. sfGFPMotLAAx

Zur Überproduktion der sfGFP-markierten Varianten von MotL und sfGFP als Negativkontrolle wurden die Stämme von *S. putrefaciens* CN-32 mit dem Überproduktionsplasmid pBTOK genutzt, die bereits für die Motilitätsassays verwendet wurden. Die Anzucht erfolgte schüttelnd in LB_{KAN}-Medium mit AHT (100 ng/ml) bei Raumtemperatur. Nach dem Erreichen einer OD_{600} von 0,8 wurden die Zellen bei 8.000 × g für 15 min bei 4°C geerntet. Zur Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine wurden die Zellen in 2 ml Lysepuffer mit Lysozym (100 µg/ml) und 1 µl DNase (207,5 U/µl) resuspendiert und mehrere Minuten inkubiert, bis das Lysat schließlich klar wurde. Die Fraktionierung fand anschließend durch Zentrifugation bei 20.000 × g für 10 min bei 4°C statt. Der Überstand wurde dann zu den entsprechend der Anweisung des Herstellers (Chromotek) äqulibrierten GFP-Trap®_MA beads gegeben und über Nacht auf einem vertikal Schüttler bei 4°C inkubiert und anschließend nach Herstelleranweisung gewaschen und mit Glycin-Elutionspuffer eluiert. Zur Überprüfung der Aufreinigung wurden auch hier Teile der Proben mit 2-fachem Protein-Ladepuffer versetzt und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und per *Western Blot*-Analyse auf die Proteinstabilität überprüft. Die Kurzzeit-Lagerung der aufgereinigten Proteine fand bei 4°C unter Zugabe von 1 mM AEBSF statt.

4.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist eine Methode zur Trennung von Stoffgemischen entsprechend ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld. Proteine lassen sich hierbei unabhängig von ihrer Eigenladung oder Faltung auftrennen, da sie durch die Zugabe des anionischen Detergenz SDS denaturiert werden und eine negative Ladung proportional zu ihrer Masse erhalten, welche ihre Eigenladung überdeckt. Durch die Inkubation der Proben für 5 min bei 95°C in 2-fachem Protein-Ladepuffer, welcher β-Mercaptoethanol enthält, welches die Ausbildung von Disulfidbrücken unterbindet, kommt es zu einer vollständigen Denaturierung. Das vertikal orientierte Gel weist eine Zweiteilung in das Sammelgel, welches einen sauren pH und eine niedrige Polyacrylamidkonzentration (5 %) besitzt, wodurch sich die Proben in einer feinen Bande ansammeln und das Trenngel, welches einen basischen pH und eine höhere Polyacylamidkonzentration (12,5 %) aufweist, wodurch die Proteine ihres Molekulargewichts entsprechend aufgetrennt werden, auf. Als Größenmarker wurde in dieser Arbeit der Protein Marker VI prestained (AppliChem) verwendet. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Polyacrylamidgel für eine *Western Blot*-Analyse weiterverwendet oder direkt mit Coomassie-Blau gefärbt.

4.2.8 *Western Blot*-Analyse

Um Proteine spezifisch nachzuweisen und die Stabilität von Fusionsproteinen zu überprüfen, eignet sich die Analyse mittels Western Blot. Dieser besteht aus zwei wesentlichen Teilen, dem Elektroblot und dem Immunoblot. Im ersten Schritt werden mittels einer SDS-PAGE aufgetrennte Proteine mit einem Semi-Dry-Electroblotter in einem elektrischen Feld auf eine PVDF-Membran übertragen. Nach erfolgreicher Übertragung wurde die PVDF-Membran bei Raumtemperatur für 45 min schwenkend in Blocklösung inkubiert, um die verbleibenden Proteinbindestellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C schwenkend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST, um den nicht gebundenen primären Antikörper zu entfernen, wurde die Membran für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist an eine Alkalische Phosphatase gekoppelten und bindet an den primär gebundenen Antikörper, wodurch es zu einer Signalverstärkung kommt. Zur Detektion wird CDP-Star (Roche) als Substrat der alkalischen Phosphatase genutzt. Nach Abspaltung des Phosphates emittiert die dephosphorylierte Form Licht einer Wellenlänge von 466 nm. Dieses Signal wurde mit Hilfe der Immunoblot Fotokammer detektiert. Zum Nachweis der sfGFP-Fusionsproteine wurde als Primärantikörper der *Anti-GFP from mouse IgG1κ (11814460001)* von Sigma-Aldrich in einer Verdünnung von 1:5000 und als Sekundärantikörper der *Anti-Mouse IgG (whole molecule) A3562 Alkaline Phosphatase coupled* von Sigma-Aldrich in einer Verdünnung von 1:5000 verwendet. Zum Nachweis von 6xHisWspR^{R242A} wurde der direkt an die Peroxidase HRP (*horse radish peroxidase*) gekoppelte Primärantikörper *Anti-His A7058* von Sigma-Aldrich in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet. Hier wurden zur Detektion die Substratlösungen *Western Lightning*™ *Chemiluminescence Reagent Plus* (PerkinElmer™) nach Herstellerangaben verwendet.

4.2.9 C-di-GMP Bindungsassay

Synthese von radioaktiv-markiertem c-di-GMP

Zunächst wurde mittels der aufgereinigten Diguanylatzyklase WspR^{R242A} [180] radioaktiv-markiertes [α^{32}-P]-GTP (Hartmann Analytik) zu [α^{32}-P]-c-di-GMP umgesetzt [200]. Hierzu wurde ein 50 µl Ansatz aus 2,05 µl NaCl (1 M), 1,2 µl Tris (1 M, pH 7,6), 0,25 µl $MgCl_2$ (1 M), 10 µl [α^{32}-P]-GTP und 36,5 µl WspR^{R242A} über Nacht bei 30°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1 µl thermosensitiver alkalischer Phosphatase für 30 min mit anschließendem aufkochen der Probe bei 100°C für 10 min abgestoppt. Die ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugation bei 13.000 × g für 15 min von der [α^{32}-P]-c-di-GMP-Lösung getrennt.

Ligandenbindungsassay

Zum Nachweis einer Bindung von c-di-GMP durch sfGFPMotL, aber nicht durch sfGFP und sfGFPMotLAAx, wurde ein membrangebundener Ligandenbindungstest durchgeführt [201]. Hierzu wurden je 1,5 µM des zu testenden aufgereinigten Proteins zusammen mit 2 µl [α^{32}-P]-c-di-GMP oder [α^{32}-P]-GTP in einem 50 µl Ansatz mit c-di-GMP-Bindepuffer für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden in Triplikaten je 10 µl des Ansatzes auf eine Nitrozellulosemembran aufgetropft. Nach dreimaligem Waschen mit c-di-GMP-Bindepuffer und komplettem Trocknen der Membran wurde diese auf einen Phophoimagerscreen aufgelegt und nach 1-24 h eingescannt. Die Analyse erfolgte mittels der Quantity One-1D software von Bio-Rad [162].

4.2.10 *Bacterial Adenylat Cyclase Two-Hybrid* (BACTH)-System

Dieses System eignet sich zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in vivo. Es basiert auf der Adenylatzyklase von *B. pertussis*, welche in zwei Fragmente, T18 und T25, aufgeteilt wurde. Durch räumliche Nähe der beiden Fragmente, T18 und T25, kommt es zur Ausbildung einer katalytisch aktiven Adenylatzyklase und somit zur Synthese von zyklischem Adenosinmonophosphat [87–89]. Für diese Untersuchungen wird der Bakterienstamm *E. coli* BTH101 verwendet, da dieser keine funktionale Adenylatzyklase besitzt. Es werden Plasmide verwendet, welche das T18-Fragment und eine Ampicillinresistenz (pUT18/pUT18C) oder das T25-Fragment und eine Kanamycinresistenz (pKNT25/pKT25) tragen. Die zu untersuchenden Proteine werden an die jeweiligen Fragmente T18 bzw. T25 fusioniert, sodass es zu einer N-terminalen oder C-terminalen Fusion kommt [87–89]. Für jedes zu untersuchende Protein wurden jeweils alle vier Plasmide erstellt. Je zwei dieser Plasmide, eines mit dem Gen für Protein X und dem T25-Fragment und eines mit dem Gen für Protein Y und dem T18-Fragment, wurden in den Zielstamm *E. coli* BTH101 kotransformiert. Dies wurde in allen erwägenswerten Kombinationen durchgeführt. Das Wachstum und die Selektion erfolgten nach der Regeneration über Nacht schüttelnd in $LB_{Amp,Kann}$-Medium bei 30°C. Es wurden je 3 µl der Kulturen auf $LB_{Amp,Kann,IPTG,X\text{-}Gal}$-Agarplatten aufgetropft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Als Negativkontrolle dienten die Leervektoren pKT25 und pUT18C, als Positivkontrolle zwei Hälften eines Leucinzippers (pKT25-zip und pUT18C-zip). Bei Interaktion zweier Proteine kommt es durch die Ausbildung einer funktionalen Adenylatzyklase zur Aktivierung der β-Galaktosidase und somit zu einem Umsatz des Substrats (X-Gal) zu einem blauen Farbstoff und einer Blaufärbung der Kolonie [87–89].

4.2.11 Bestimmung der Topologie des Membranproteins ZomB

Die in silico Analyse mittels TMHMM [102] sagt für ZomB eine N-terminale Transmembranregion (Aminosäuren 4-23) vorher und der restliche Teil des Proteins sollte sich im Zytoplasma befinden. Um diese Topologie-Vorhersage zu überprüfen wurden verschiedene Ansätze verfolgt:

<u>SCAM-Assay</u>

Das SCAM-Assay funktioniert ohne die Fusion an ein Enzym und ermöglicht es so ein Membranprotein möglichst in seiner nativen Faltung zu erhalten. Hierbei werden wie auch bei der Maleimidfärbung (4.2.4) frei zugängliche Cysteine genutzt, die mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs angefärbt und anschließend detektiert werden können [139]. Hierzu wurden drei *S. putrefaciens* CN 32 Stämme (a-c) erstellt, in denen ZomB mit einem N-terminalen 6xHis-*tag* fusioniert wurde und a) kein Cystein mehr ($ZomB^{C60S}$), b) ein N-terminales Cystein $ZomB^{C60S\ und\ T2C}$ oder c) ein C-terminales Cystein ($ZomB^{T120C}$) in ZomB vorhanden war. Diese Stämme wurden üN schüttelnd bei Raumtemperatur in 10 ml LB angezogen und am nächsten Tag wurden mit diesen Vorkulturen je 200 ml frisches LB-Medium auf eine OD_{600} von 0,02 angeimpft und die Kulturen schüttelnd bei 30°C bis zu einer finalen OD_{600} von 0,6 inkubiert. Die Zellernte erfolgte anschließend bei 8.000 × g für 15 min bei 4°C und die Pellets wurden in je 10 ml Puffer A resuspendiert und in jeweils drei Aliquots a 3 ml aufgeteilt, sodass je drei Aliquots des Stammes a, drei Aliquots des Stammes b und drei Aliquots des Stammes c, vorhanden waren. Diese drei Aliquots wurden so behandelt, dass in Aliquot 1 periplasmatische Cysteine (P), in Aliquot 2 zytoplasmatische Proteine (C) und in Aliquot 3 sowohl periplasmatische als auch zytoplasmatische Proteine (P+C) markiert wurden. Zu Aliquot 1 wurden je 40 µm Alexa Fluor 488-maleimide (Molecular Probes, Life Technologies) hinzugegeben und die Reaktion wird nach 15 min Inkubation bei RT durch Zugabe von 1 mM β-Mercaptoethanol

abgestoppt. Aliquot 2 wird mit 2 mM MTSET für 15 min bei RT inkubiert. Die Aliquots 1 und 2 wurden anschließend zwei mal mit Puffer A gewaschen. Dann wurden alle drei Aliquots pelletiert und in 2 ml PufferA mit 5 mM EDTA, 20 % Sucrose und Lysozym (100 µg/ml) resuspendiert. Nach 15 min Inkubation bei RT wurden 18 ml kaltes ddH_2O und in die Aliquots 2 und 3 je 40 µm Alexa Fluor 488-maleimide (Molecular Probes, Life Technologies) hinzugegeben. Anschließend wurden alle drei Aliquots auf Eis sonifiziert (3 x 10 s mit je 10 s Pause dazwischen) und für weitere 15 min bei RT inkubiert, bevor die Reaktionen in den Aliquots 2 und 3 mit je 1 mM β-Mercaptoethanol abgestoppt wurden. Nach Zentrifugation bei 15.000 × g für 15 min bei 4°C wurden die Überstände überführt und erneut bei 100.000 × g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets üN bei 4°C auf einem vertikalen Schüttler in je 1 ml Puffer A mit 1 % SB3-14 (w/v) solubilisiert. Am nächsten Tag wurden die Aliquots bei 16.000 × g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand auf eine HisTrapHP 1 ml Säule (GE Healthcare) gegeben und ZomB, wie $WspR^{R242A}$ (siehe Kapitel 4.2.6 Überproduktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine) aufgereinigt, nur dass der Waschpuffer 0,05 % SB3-14 und der Elutionspuffer 1 % SDS zum solubilisieren/stabilisieren des Membranproteins beinhalten sollten. Die Eluate wurden danach mit SDS-Probenpuffer versetzt und in zwei 15 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Ein Gel wurde danach zunächst auf einem UV-Tisch auf das Fluoreszenzsignal von Alexa Fluor 488-maleimide untersucht und anschließend mit Coomassie-Blue eingefärbt. Das zweite Gel wurde für einen *Western Blot* genutzt und das 6xHis-*tag* mit dem direkt HRP-gekoppelten Primärantikörper *Anti-His A7058* von Sigma-Aldrich in einer Verdünnung von 1:2000 detektiert. Als Positivkontrolle für die Färbung der Cysteine wurde ein Stamm verwendet, der im Flagellenhaken ein Cystein besitzt (siehe Kapitel 4.2.4 Maleimidfärbung).

Hierbei konnte ZomB weder nach der Coomassie-Färbung noch im Western Blot detektiert werden, weshalb die jeweiligen ZomB-Konstrukte a) kein Cystein mehr ($ZomB^{C60S}$), b) ein N-terminales Cystein $ZomB^{C60S\ und\ T2C}$ und c) ein C-terminales Cystein ($ZomB^{T120C}$) über das Plasmid pBBR*araC* in *S. putrefaciens* CN-32 überproduziert wurden. Allerdings konnte auch nach einer Überproduktion kein aufgereinigtes ZomB nachgewiesen werden, weshalb weitere Methoden zur Bestimmung der Topologie von ZomB über Fusionen an verschiedene Enzyme durchgeführt wurden.

β-Lactamase-Fusions-Assay

Zunächst wurde die β-Lactamase in *S. putrefaciens* CN-32 (SputCN32_3157) deletiert um einen Ampicillin-sensitiven Stamm zu erzeugen. In diesem Stamm wurden dann mittels pBBR*araC* N-terminale oder C-terminale Fusionen von ZomB bzw. $ZomB_{40}$ (nur die ersten 40 Aminosäuren von ZomB) an eine aktive β-Lactamase produziert. Diese Stämme wurden üN in LB_{Gent}-Medium angezogen und am nächsten Tag auf $LB_{Gent,\ Amp}$-Agarplatten mit 1 % Arabinose aufgetropft und für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Da die β-Lactamase nur im Periplasma aktiv ist, können auf diesen Platten nur die Stämme anwachsen, in denen die β-Lactamase ins Periplasma gelangte und somit lassen sich über das Wachstum Rückschlüsse auf die Topologie des Fusionsproteins ziehen [30]. Als Positivkontrolle wurde der Ampicillin-resistente Wildtyp von *S. putrefaciens* CN-32 verwendet und als Negativkontrolle diente der Ampicillin-sensitive Stamm ΔSputCN32_3157. Ein repräsentatives Ergebnis dieser Experimente ist im Appendix in Abbildung 32 zu sehen.

PhoA/LacZα-Fusions-Assay

Dieses System nutz die Fusion zweier Enzyme an das zu untersuchende Transmembranprotein. Zum einen eine Phosphatase (PhoA), die nur im Periplasma aktiv ist und zum anderen eine β-Galaktosidase (LacZ), die nur im Zytoplasma aktiv ist. Die Aktivität des jeweiligen Enzyms lässt sich auf Indikatorplatten mit X-Phos (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat) und Red-Gal (6-Chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) nachweisen. Die Aktivität der Phosphatase zeigt sich auf diesen Indikatorplatten durch eine Blaufärbung der Kolonien und die Aktivität der β-Galaktosidase durch eine Rotfärbung der Kolonien [90]. Beide Enzyme wurden mittels des Plasmids pKTOP an den C-Terminus von ZomB bzw. verkürzte Varianten von ZomB ($ZomB_{1-45}$ und $ZomB_{1-100}$) fusioniert und somit zeitgleich in *E. coli* DH5α exprimiert. Als Positivkontrolle für die Phosphataseaktivität wurde eine Fusion an den C-Terminus von NapE, einem Transmembranprotein, welches Teil des Nitratreduktase-Komplexes in *S. putrefaciens* CN-32 ist, genutzt. Als Positivkontrolle für die β-Galaktosidaseaktivität wurde der Leervektor pKTOP verwendet. Und als Negativkontrolle wurde der Leervektor pBTOK verwendet. Die Indikatorplatten (LB_{Kan}-Agarplatten mit 80 µg/ml X-Phos (Sigma Aldrich) und 100 µg/ml Red-Gal (Sigma Aldrich) und 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)) wurden mit den zu testenden Stämmen für 18 h bei 37°C inkubiert. Ein repräsentatives Ergebnis dieser Experimente ist im Appendix in Abbildung 33 zu sehen.

5 LITERATUR

1. Aguilar C, Vlamakis H, Losick R et al (2007) Thinking about Bacillus subtilis as a multicellular organism. Curr Opin Microbiol 10(6): 638–643
2. Alm R A, Bodero A J, Free P D et al (1996) Identification of a novel gene, pilZ, essential for type 4 fimbrial biogenesis in Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol 178(1): 46–53
3. Altegoer F, Schuhmacher J, Pausch P et al (2014) From molecular evolution to biobricks and synthetic modules. Biotechnol Genet Eng Rev 30(1-2): 49–64
4. Altmann D, Stief P, Amann R et al (2003) In situ distribution and activity of nitrifying bacteria in freshwater sediment. Environ Microbiol 5(9): 798–803
5. Amikam D, Galperin M Y (2006) PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. Bioinformatics 22(1): 3–6
6. Armitage J P, Macnab R M (1987) Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of Rhodobacter sphaeroides. J Bacteriol 169(2): 514–518
7. Arora S K, Ritchings B W, Almira E C et al (1997) A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in Pseudomonas aeruginosa in a cascade manner. J Bacteriol 179(17): 5574–5581
8. Atsumi T, Maekawa Y, Yamada T et al (1996) Effect of viscosity on swimming by the lateral and polar flagella of Vibrio alginolyticus. J Bacteriol 178(16): 5024–5026
9. Ausmees N, Mayer R, Weinhouse H et al (2001) Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. FEMS Microbiol Lett 204(1): 163–167
10. Bai F, Branch R W, Nicolau D V et al (2010) Conformational spread as a mechanism for cooperativity in the bacterial flagellar switch. Science 327(5966): 685–689
11. Baker A E, Diepold A, Kuchma S L et al (2016) PilZ Domain Protein FlgZ Mediates Cyclic Di-GMP-Dependent Swarming Motility Control in Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol 198(13): 1837–1846
12. Baker A E, O'Toole G A (2017) Bacteria, Rev Your Engines: Stator Dynamics Regulate Flagellar Motility. J Bacteriol 199(12)
13. Barak R, Eisenbach M (1992) Fumarate or a fumarate metabolite restores switching ability to rotating flagella of bacterial envelopes. J Bacteriol 174(2): 643–645
14. Barak R, Giebel I, Eisenbach M (1996) The specificity of fumarate as a switching factor of the bacterial flagellar motor. Mol Microbiol 19(1): 139–144
15. Benach J, Swaminathan S S, Tamayo R et al (2007) The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. EMBO J 26(24): 5153–5166
16. Berg H C, Brown D A (1972) Chemotaxis in Escherichia coli analysed by three-dimensional tracking. Nature 239(5374): 500–504
17. Berg H C, Anderson R A (1973) Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. Nature 245(5425): 380–382
18. Berg H C (2003) The rotary motor of bacterial flagella. Annu Rev Biochem 72: 19–54
19. Berg H C (2012) E. coli in motion. Springer, [Place of publication not identified]
20. Berman H M (2008) The Protein Data Bank: a historical perspective. Acta Crystallogr, A, Found Crystallogr 64(Pt 1): 88–95

21. Bertin P, Terao E, Lee E H et al (1994) The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in Escherichia coli. J Bacteriol 176(17): 5537–5540

22. Blair D F (2003) Flagellar movement driven by proton translocation. FEBS Lett 545(1): 86–95

23. Blair K M, Turner L, Winkelman J T et al (2008) A molecular clutch disables flagella in the Bacillus subtilis biofilm. Science 320(5883): 1636–1638

24. Blom J, Kreis J, Spänig S et al (2016) EDGAR 2.0: an enhanced software platform for comparative gene content analyses. Nucleic Acids Res 44(W1): W22-8

25. Boehm A, Kaiser M, Li H et al (2010) Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. Cell 141(1): 107–116

26. Bowman J P, McCammon S A, Nichols D S et al (1997) Shewanella gelidimarina sp. nov. and Shewanella frigidimarina sp. nov., novel Antarctic species with the ability to produce eicosapentaenoic acid (20:5 omega 3) and grow anaerobically by dissimilatory Fe(III) reduction. Int J Syst Bacteriol 47(4): 1040–1047

27. Bozal N, Montes M J, Tudela E et al (2002) Shewanella frigidimarina and Shewanella livingstonensis sp. nov. isolated from Antarctic coastal areas. Int J Syst Evol Microbiol 52(Pt 1): 195–205

28. Bren A, Eisenbach M (1998) The N terminus of the flagellar switch protein, FliM, is the binding domain for the chemotactic response regulator, CheY. J Mol Biol 278(3): 507–514

29. Brenzinger S, Pecina A, Mrusek D et al (2018) ZomB is essential for flagellar motor reversals in Shewanella putrefaciens and Vibrio parahaemolyticus. Mol Microbiol 109(5): 694–709

30. Broome-Smith J K, Tadayyon M, Zhang Y (1990) Beta-lactamase as a probe of membrane protein assembly and protein export. Mol Microbiol 4(10): 1637–1644

31. Brown M T, Delalez N J, Armitage J P (2011) Protein dynamics and mechanisms controlling the rotational behaviour of the bacterial flagellar motor. Curr Opin Microbiol 14(6): 734–740

32. Bubendorfer S, Held S, Windel N et al (2012) Specificity of motor components in the dual flagellar system of Shewanella putrefaciens CN-32. Mol Microbiol 83(2): 335–350

33. Bubendorfer S, Koltai M, Rossmann F et al (2014) Secondary bacterial flagellar system improves bacterial spreading by increasing the directional persistence of swimming. Proc Natl Acad Sci U S A 111(31): 11485–11490

34. Caccavo F, Blakemore R P, Lovley D R (1992) A Hydrogen-Oxidizing, Fe(III)-Reducing Microorganism from the Great Bay Estuary, New Hampshire. Appl Environ Microbiol 58(10): 3211–3216

35. Chang W-S, Li X, Halverson L J (2009) Influence of water limitation on endogenous oxidative stress and cell death within unsaturated Pseudomonas putida biofilms. Environ Microbiol 11(6): 1482–1492

36. Cheang Q W, Xin L, Chea R Y F et al (2019) Emerging paradigms for PilZ domain-mediated C-di-GMP signaling. Biochem Soc Trans 47(1): 381–388

37. Chen S, Beeby M, Murphy G E et al (2011) Structural diversity of bacterial flagellar motors. EMBO J 30(14): 2972–2981

38. Chen X, Berg H C (2000) Torque-Speed Relationship of the Flagellar Rotary Motor of Escherichia coli. Biophysical Journal 78(2): 1036–1041

39. Chen Y, Chai Y, Guo J-h et al (2012) Evidence for Cyclic Di-GMP-Mediated Signaling in Bacillus subtilis. J Bacteriol 194(18): 5080–5090

40. Chevance F F V, Hughes K T (2008) Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. Nat Rev Microbiol 6(6): 455–465

41. Chi K K, Yuan Z L (2016) Pilz domain with c-di-gmp of a protein from Pseudomonas aeruginosa

42. (2010) Choosing the Right Lifestyle: Regulation of Developmental Pathways by Cyclic Di-GMP. In: Wolfe A J, Visick K L (Hrsg.) The second messenger cyclic Di-GMP. ASM Press, Washington, DC, S. 99–119

43. Chou S-H, Galperin M Y (2016) Diversity of Cyclic Di-GMP-Binding Proteins and Mechanisms. J Bacteriol 198(1): 32–46

44. Christen M, Christen B, Allan M G et al (2007) DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in Caulobacter crescentus. Proc Natl Acad Sci U S A 104(10): 4112–4117

45. Christensen L D, van Gennip M, Rybtke M T et al (2013) Clearance of Pseudomonas aeruginosa foreign-body biofilm infections through reduction of the cyclic Di-GMP level in the bacteria. Infect Immun 81(8): 2705–2713

46. Cohen-Ben-Lulu G N, Francis N R, Shimoni E et al (2008) The bacterial flagellar switch complex is getting more complex. EMBO J 27(7): 1134–1144

47. Conner J G, Zamorano-Sánchez D, Park J H et al (2017) The ins and outs of cyclic di-GMP signaling in Vibrio cholerae. Curr Opin Microbiol 36: 20–29

48. D'Argenio D A, Calfee M W, Rainey P B et al (2002) Autolysis and autoaggregation in Pseudomonas aeruginosa colony morphology mutants. J Bacteriol 184(23): 6481–6489

49. D'Argenio D A, Miller S I (2004) Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. Microbiology (Reading, Engl) 150(Pt 8): 2497–2502

50. Delalez N J, Wadhams G H, Rosser G et al (2010) Signal-dependent turnover of the bacterial flagellar switch protein FliM. Proc Natl Acad Sci U S A 107(25): 11347–11351

51. Derby H A, Hammer B W (1931) Bacteriology of butter IV. Bacteriological studies on surface taint butter. Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station Research Bulletin 11(145)

52. Déziel E, Lépine F, Milot S et al (2003) rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in Pseudomonas aeruginosa. Microbiology (Reading, Engl) 149(Pt 8): 2005–2013

53. Doetsch R N, Sjoblad R D (1980) Flagellar structure and function in eubacteria. Annu Rev Microbiol 34: 69–108

54. Dorman C J (2004) H-NS. Nat Rev Microbiol 2(5): 391–400

55. Doyle T B, Hawkins A C, McCarter L L (2004) The Complex Flagellar Torque Generator of Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol 186(19): 6341–6350

56. Dubey B N, Lori C, Ozaki S et al (2016) Cyclic di-GMP mediates a histidine kinase/phosphatase switch by noncovalent domain cross-linking. Sci Adv 2(9): e1600823

57. Duerig A, Abel S, Folcher M et al (2009) Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. Genes Dev 23(1): 93–104

58. Erhardt M, Singer H M, Wee D H et al (2011) An infrequent molecular ruler controls flagellar hook length in Salmonella enterica. EMBO J 30(14): 2948–2961

59. Fang X, Gomelsky M (2010) A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility. Mol Microbiol 76(5): 1295–1305

60. Francis N R, Irikura V M, Yamaguchi S et al (1992) Localization of the Salmonella typhimurium flagellar switch protein FliG to the cytoplasmic M-ring face of the basal body. Proc Natl Acad Sci U S A 89(14): 6304–6308

61. Fredrickson J K, Zachara J M, Kennedy D W et al (1998) Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium. Geochimica et Cosmochimica Acta 62(19-20): 3239–3257

62. Fukuoka H, Inoue Y, Terasawa S et al (2010) Exchange of rotor components in functioning bacterial flagellar motor. Biochem Biophys Res Commun 394(1): 130–135

63. Galperin M Y, Chou S-H (2019) Structural conservation and diversity of PilZ-related domains. J Bacteriol

64. Gibson D G, Young L, Chuang R-Y et al (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nat Methods 6(5): 343–345

65. Gilbert P, Collier P J, Brown M R (1990) Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. Antimicrob Agents Chemother 34(10): 1865–1868

66. Girgis H S, Liu Y, Ryu W S et al (2007) A comprehensive genetic characterization of bacterial motility. PLoS Genet 3(9): 1644–1660

67. Gomelsky M, Hrsg. The core pathway: diguanylate cyclases, phosphodiesterases, and c-di-GMP-binding proteins. ASM Press, Washington, DC

68. Guttenplan S B, Shaw S, Kearns D B (2013) The cell biology of peritrichous flagella in Bacillus subtilis. Mol Microbiol 87(1): 211–229

69. Haddad A, Camacho F, Durand P et al (1995) Phylogenetic characterization of the epibiotic bacteria associated with the hydrothermal vent polychaete Alvinella pompejana. Appl Environ Microbiol 61(5): 1679–1687

70. Hall A N, Subramanian S, Oshiro R T et al (2018) SwrD (YlzI) Promotes Swarming in Bacillus subtilis by Increasing Power to Flagellar Motors. J Bacteriol 200(2)

71. Harshey R M (2003) Bacterial motility on a surface. Annu Rev Microbiol 57: 249–273

72. Hau H H, Gralnick J A (2007) Ecology and biotechnology of the genus Shewanella. Annu Rev Microbiol 61: 237–258

73. Hengge R (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. Nat Rev Microbiol 7(4): 263–273

74. Hess JF, Oosawa K, Kaplan N et al (1988) Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. Cell 53(1): 79–87

75. Hickman J W, Tifrea D F, Harwood C S (2005) A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. Proc Natl Acad Sci U S A 102(40): 14422–14427

76. Hickman J W, Harwood C S (2008) Identification of FleQ from Pseudomonas aeruginosa as a c-di-GMP-responsive transcription factor. Mol Microbiol 69(2): 376–389

77. Holt H M, Gahrn-Hansen B, Bruun B (2005) Shewanella algae and Shewanella putrefaciens. Clin Microbiol Infect 11(5): 347–352

78. Hou Y-J, Yang W-S, Hong Y et al (2020) Structural insights into the mechanism of c-di-GMP-bound YcgR regulating flagellar motility in Escherichia coli. J Biol Chem 295(3): 808–821

79. Huang B, Whitchurch C B, Mattick J S (2003) FimX, a multidomain protein connecting environmental signals to twitching motility in Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol 185(24): 7068–7076

80. Jarrell K F, McBride M J (2008) The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. Nat Rev Microbiol 6(6): 466–476

81. Jenal U, White J, Shapiro L (1994) Caulobacter flagellar function, but not assembly, requires FliL, a non-polarly localized membrane protein present in all cell types. J Mol Biol 243(2): 227–244

82. Jenal U (2004) Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age. Curr Opin Microbiol 7(2): 185–191

83. Jenal U, Malone J (2006) Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. Annu Rev Genet 40: 385–407

84. Jenal U, Reinders A, Lori C (2017) Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. Nat Rev Microbiol 15(5): 271–284

85. Jin F, Conrad J C, Gibiansky M L et al (2011) Bacteria use type-IV pili to slingshot on surfaces. Proc Natl Acad Sci U S A 108(31): 12617–12622

86. Kaiser D (2007) Bacterial swarming: a re-examination of cell-movement patterns. Curr Biol 17(14): R561-70

87. Karimova G, Ullmann A, Ladant D (2001) Protein-protein interaction between Bacillus stearothermophilus tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system. J Mol Microbiol Biotechnol 3(1): 73–82

88. Karimova G, Ullmann A, Ladant D (2002) A bacterial two-hybrid system based on Cyclic AMP signalling cascade. A Molecular Cloning Manual: 447–488

89. Karimova G, Dautin N, Ladant D (2008) Interaction Network among Escherichia coli Membrane Proteins Involved in Cell Division as Revealed by Bacterial Two-Hybrid Analysis. J Bacteriol 190(24): 8248

90. Karimova G, Robichon C, Ladant D (2009) Characterization of YmgF, a 72-residue inner membrane protein that associates with the Escherichia coli cell division machinery. J Bacteriol 191(1): 333–346

91. Karlinsey J E, Tanaka S, Bettenworth V et al (2000) Completion of the hook-basal body complex of the Salmonella typhimurium flagellum is coupled to FlgM secretion and fliC transcription. Mol Microbiol 37(5): 1220–1231

92. Kearns D B (2010) A field guide to bacterial swarming motility. Nat Rev Microbiol 8(9): 634–644

93. Khashe S, Janda J M (1998) Biochemical and Pathogenic Properties of Shewanella alga and Shewanella putrefaciens. J Clin Microbiol 36(3): 783–787

94. Kindaichi T, Ito T, Okabe S (2004) Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization. Appl Environ Microbiol 70(3): 1641–1650

95. Kirillina O, Fetherston J D, Bobrov A G et al (2004) HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in Yersinia pestis. Mol Microbiol 54(1): 75–88

96. Klausen M, Heydorn A, Ragas P et al (2003) Biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa wild type, flagella and type IV pili mutants. Mol Microbiol 48(6): 1511–1524

97. Klausen M, Aaes-Jørgensen A, Molin S et al (2003) Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in Pseudomonas aeruginosa biofilms. Mol Microbiol 50(1): 61–68

98. Koerdt A, Paulick A, Mock M et al (2009) MotX and MotY are required for flagellar rotation in Shewanella oneidensis MR-1. J Bacteriol 191(16): 5085–5093

99. Köhler T, Curty L K, Barja F et al (2000) Swarming of Pseudomonas aeruginosa is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. J Bacteriol 182(21): 5990–5996

100. Ko J, Ryu K-S, Kim H et al (2010) Structure of PP4397 reveals the molecular basis for different c-di-GMP binding modes by Pilz domain proteins. J Mol Biol 398(1): 97–110

101. Ko M, Park C (2000) Two novel flagellar components and H-NS are involved in the motor function of Escherichia coli. J Mol Biol 303(3): 371–382

102. Krogh A, Larsson B, Heijne G von et al (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J Mol Biol 305(3): 567–580

103. Kuchma S L, Delalez N J, Filkins L M et al (2015) Cyclic di-GMP-mediated repression of swarming motility by Pseudomonas aeruginosa PA14 requires the MotAB stator. J Bacteriol 197(3): 420–430

104. Kühn M J, Schmidt F K, Eckhardt B et al (2017) Bacteria exploit a polymorphic instability of the flagellar filament to escape from traps. Proc Natl Acad Sci U S A 114(24): 6340–6345

105. Larsen I, Little B, Nealson K H et al (1998) Manganite reduction by Shewanella putrefaciens MR-4. American Mineralogist 83(11): 1564–1572

106. Lassak J, Henche A-L, Binnenkade L et al (2010) ArcS, the cognate sensor kinase in an atypical Arc system of Shewanella oneidensis MR-1. Appl Environ Microbiol 76(10): 3263–3274

107. Leake M C, Chandler J H, Wadhams G H et al (2006) Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes. Nature 443(7109): 355–358

108. Lee S Y, Cho H S, Pelton J G et al (2001) Crystal structure of an activated response regulator bound to its target. Nat Struct Biol 8(1): 52–56

109. Leifson E (1960) Atlas of bacterial flagellation. Academic Press, New York

110. Li T-N, Chin K-H, Fung K-M et al (2011) A novel tetrameric PilZ domain structure from xanthomonads. PLoS ONE 6(7): e22036

111. Macnab R M (1999) The Bacterial Flagellum: Reversible Rotary Propellor and Type III Export Apparatus. J Bacteriol 181(23): 7149–7153

112. Macnab R M (2003) How bacteria assemble flagella. Annu Rev Microbiol 57: 77–100

113. Magariyama Y, Sugiyama S, Muramoto K et al (1994) Very fast flagellar rotation. Nature 371(6500): 752

114. Mah T F, O'Toole G A (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol 9(1): 34–39

115. Martínez-Granero F, Navazo A, Barahona E et al (2014) Identification of flgZ as a flagellar gene encoding a PilZ domain protein that regulates swimming motility and biofilm formation in Pseudomonas. PLoS ONE 9(2): e87608

116. Marykwas D L, Berg H C (1996) A mutational analysis of the interaction between FliG and FliM, two components of the flagellar motor of Escherichia coli. J Bacteriol 178(5): 1289–1294

117. Matsuyama B Y, Krasteva P V, Baraquet C et al (2016) Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from Pseudomonas aeruginosa. Proc Natl Acad Sci U S A 113(2): E209-18

118. Mattick J S (2002) Type IV pili and twitching motility. Annu Rev Microbiol 56: 289–314

119. McCarter L L (2001) Polar flagellar motility of the Vibrionaceae. Microbiol Mol Biol Rev 65(3): 445-62, table of contents

120. McCarter L L (2004) Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. J Mol Microbiol Biotechnol 7(1-2): 18–29

121. Merighi M, Lee V T, Hyodo M et al (2007) The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa. Mol Microbiol 65(4): 876–895

122. Merino S, Shaw J G, Tomás J M (2006) Bacterial lateral flagella. FEMS Microbiol Lett 263(2): 127–135

123. Merz A J, So M, Sheetz M P (2000) Pilus retraction powers bacterial twitching motility. Nature 407(6800): 98–102

124. Mignot T, Shaevitz J W, Hartzell P L et al (2007) Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility. Science 315(5813): 853–856

125. Miller V L, Mekalanos J J (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in Vibrio cholerae requires toxR. J Bacteriol 170(6): 2575–2583

126. Mills E, Pultz I S, Kulasekara H D et al (2011) The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. Cell Microbiol 13(8): 1122–1129

127. Minamino T, Namba K (2004) Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. J Mol Microbiol Biotechnol 7(1-2): 5–17

128. Minamino T, Imada K, Namba K (2008) Molecular motors of the bacterial flagella. Curr Opin Struct Biol 18(6): 693–701

129. Minamino T, Imada K (2015) The bacterial flagellar motor and its structural diversity. Trends Microbiol 23(5): 267–274

130. Minamino T, Terahara N, Kojima S et al (2018) Autonomous control mechanism of stator assembly in the bacterial flagellar motor in response to changes in the environment. Mol Microbiol 109(6): 723–734

131. Minasov G, Padavattan S, Shuvalova L et al (2009) Crystal structures of YkuI and its complex with second messenger cyclic Di-GMP suggest catalytic mechanism of phosphodiester bond cleavage by EAL domains. J Biol Chem 284(19): 13174–13184

132. Min M, Xu H, Chen J et al (2005) Evidence of uranium biomineralization in sandstone-hosted roll-front uranium deposits, northwestern China. Ore Geology Reviews 26(3): 198–206

133. Moens S, Vanderleyden J (1996) Functions of bacterial flagella. Crit Rev Microbiol 22(2): 67–100

134. Molin S, Tolker-Nielsen T (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. Current Opinion in Biotechnology 14(3): 255–261

135. Morimoto Y V, Minamino T (2014) Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor. Biomolecules 4(1): 217–234

136. Motaleb M A, Pitzer J E, Sultan S Z et al (2011) A novel gene inactivation system reveals altered periplasmic flagellar orientation in a Borrelia burgdorferi fliL mutant. J Bacteriol 193(13): 3324–3331

137. Nan B (2017) Bacterial Gliding Motility. Curr Biol 27(4): R154-R156

138. Nancharaiah Y V, Wattiau P, Wuertz S et al (2003) Dual labeling of Pseudomonas putida with fluorescent proteins for in situ monitoring of conjugal transfer of the TOL plasmid. Appl Environ Microbiol 69(8): 4846–4852

139. Nasie I, Steiner-Mordoch S, Schuldiner S (2013) Topology determination of untagged membrane proteins. Methods Mol Biol 1033: 121–130

140. Nealson K H, Scott J (2006) Ecophysiology of the Genus Shewanella. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (Hrsg.) The Prokaryotes. Springer-Verlag, New York, NY, S. 1133–1151

141. Nesper J, Hug I, Kato S et al (2017) Cyclic di-GMP differentially tunes a bacterial flagellar motor through a novel class of CheY-like regulators. eLife 6

142. O'Neal L, Akhter S, Alexandre G (2019) A PilZ-Containing Chemotaxis Receptor Mediates Oxygen and Wheat Root Sensing in Azospirillum brasilense. Front Microbiol 10: 312

143. O'Toole G, Kaplan H B, Kolter R (2000) Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol 54: 49–79

144. O'Toole G A, Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol 28(3): 449–461

145. Ottemann K M, Miller J F (1997) Roles for motility in bacterial-host interactions. Mol Microbiol 24(6): 1109–1117

146. Partridge J D, Nieto V, Harshey R M (2015) A new player at the flagellar motor: FliL controls both motor output and bias. MBio 6(2): e02367

147. Paulick A, Koerdt A, Lassak J et al (2009) Two different stator systems drive a single polar flagellum in Shewanella oneidensis MR-1. Mol Microbiol 71(4): 836–850

148. Paulick A, Thormann K (2012) Bakterielles Motortuning. Biospektrum 18(2): 134–137

149. Paul K, Nieto V, Carlquist W C et al (2010) The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. Mol Cell 38(1): 128–139

150. Paul K, Brunstetter D, Titen S et al (2011) A molecular mechanism of direction switching in the flagellar motor of Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A 108(41): 17171–17176

151. Pédelacq J-D, Cabantous S, Tran T et al (2006) Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. Nat Biotechnol 24(1): 79–88

152. Perry K A, Kostka J E, Luther G W et al (1993) Mediation of sulfur speciation by a black sea facultative anaerobe. Science 259(5096): 801–803

153. Pesavento C, Becker G, Sommerfeldt N et al (2008) Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in Escherichia coli. Genes Dev 22(17): 2434–2446

154. Pilizota T, Brown M T, Leake M C et al (2009) A molecular brake, not a clutch, stops the Rhodobacter sphaeroides flagellar motor. Proc Natl Acad Sci U S A 106(28): 11582–11587

155. Porter S L, Wadhams G H, Martin A C et al (2006) The CheYs of Rhodobacter sphaeroides. J Biol Chem 281(43): 32694–32704

156. Prasad K, Caplan S R, Eisenbach M (1998) Fumarate modulates bacterial flagellar rotation by lowering the free energy difference between the clockwise and counterclockwise states of the motor. J Mol Biol 280(5): 821–828

157. Pratt L A, Kolter R (1998) Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol Microbiol 30(2): 285–293

158. Prigent-Combaret C, Prensier G, Le Thi T T et al (2000) Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing Escherichia coli strains: role of flagella, curli and colanic acid. Environ Microbiol 2(4): 450–464

159. Prüss B M, Besemann C, Denton A et al (2006) A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by Escherichia coli. J Bacteriol 188(11): 3731–3739

160. Pultz I S, Christen M, Kulasekara H D et al (2012) The response threshold of Salmonella PilZ domain proteins is determined by their binding affinities for c-di-GMP. Mol Microbiol 86(6): 1424–1440

161. Qian C, Wong C C, Swarup S et al (2013) Bacterial tethering analysis reveals a "run-reverse-turn" mechanism for Pseudomonas species motility. Appl Environ Microbiol 79(15): 4734–4743

162. (28.05.2020) Quantity One 1-D Analysis Software | Life Science Research | Bio-Rad. https://www.bio-rad.com/de-de/product/quantity-one-1-d-analysis-software?ID=1de9eb3a-1eb5-4edb-82d2-68b91bf360fb. Zugriff am 28.5.2020

163. Raha M, Sockett H, Macnab R M (1994) Characterization of the fliL gene in the flagellar regulon of Escherichia coli and Salmonella typhimurium. J Bacteriol 176(8): 2308–2311

164. Ramelot T A, Yee A, Cort J R et al (2007) NMR structure and binding studies confirm that PA4608 from Pseudomonas aeruginosa is a PilZ domain and a c-di-GMP binding protein. Proteins 66(2): 266–271

165. Rather P N (2005) Swarmer cell differentiation in Proteus mirabilis. Environ Microbiol 7(8): 1065–1073

166. Reid S W, Leake M C, Chandler J H et al (2006) The maximum number of torque-generating units in the flagellar motor of Escherichia coli is at least 11. Proc Natl Acad Sci U S A 103(21): 8066–8071

167. Roelofs K G, Jones C J, Helman S R et al (2015) Systematic Identification of Cyclic-di-GMP Binding Proteins in Vibrio cholerae Reveals a Novel Class of Cyclic-di-GMP-Binding ATPases Associated with Type II Secretion Systems. PLoS Pathog 11(10): e1005232

168. Römling U, Gomelsky M, Galperin M Y (2005) C-di-GMP. Mol Microbiol 57(3): 629–639

169. Römling U, Amikam D (2006) Cyclic di-GMP as a second messenger. Curr Opin Microbiol 9(2): 218–228

170. Römling U, Galperin M Y, Gomelsky M (2013) Cyclic di-GMP. Microbiol Mol Biol Rev 77(1): 1–52

171. Römling U, Galperin M Y (2017) Discovery of the Second Messenger Cyclic di-GMP. Methods Mol Biol 1657: 1–8

172. Rossmann F, Brenzinger S, Knauer C et al (2015) The role of FlhF and HubP as polar landmark proteins in Shewanella putrefaciens CN-32. Mol Microbiol 98(4): 727–742

173. Rossmann F M, Rick T, Mrusek D et al (2019) The GGDEF Domain of the Phosphodiesterase PdeB in Shewanella putrefaciens Mediates Recruitment by the Polar Landmark Protein HubP. J Bacteriol 201(7)

174. Ross P, Aloni Y, Weinhouse C et al (1985) An unusual guanyl oligonucleotide regulates cellulose synthesis in Acetobacter xylinum. FEBS Lett 186(2): 191–196

175. Ross P, Aloni Y, Weinhouse H et al (1986) Control of cellulose synthesis Acetobacter xylinum. A unique guanyl oligonucleotide is the immediate activator of the cellulose synthase. Carbohydrate Research 149(1): 101–117

176. Ross P, Weinhouse H, Aloni Y et al (1987) Regulation of cellulose synthesis in Acetobacter xylinum by cyclic diguanylic acid. Nature 325(6101): 279–281

177. Russell M H, Bible A N, Fang X et al (2013) Integration of the second messenger c-di-GMP into the chemotactic signaling pathway. MBio 4(2): e00001-13

178. Ryjenkov D A, Simm R, Römling U et al (2006) The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. J Biol Chem 281(41): 30310–30314

179. Samatey F A, Matsunami H, Imada K et al (2004) Structure of the bacterial flagellar hook and implication for the molecular universal joint mechanism. Nature 431(7012): 1062–1068

180. Sambanthamoorthy K, Sloup R E, Parashar V et al (2012) Identification of Small Molecules That Antagonize Diguanylate Cyclase Enzymes To Inhibit Biofilm Formation. Antimicrob Agents Chemother 56(10): 5202–5211

181. Sar N, McCarter L, Simon M et al (1990) Chemotactic control of the two flagellar systems of Vibrio parahaemolyticus. J Bacteriol 172(1): 334–341

182. Satoh H, Yamakawa T, Kindaichi T et al (2006) Community structures and activities of nitrifying and denitrifying bacteria in industrial wastewater-treating biofilms. Biotechnol Bioeng 94(4): 762–772

183. Sauer K, Camper A K, Ehrlich G D et al (2002) Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J Bacteriol 184(4): 1140–1154

184. Schirmer T, Jenal U (2009) Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. Nat Rev Microbiol 7(10): 724–735

185. Schneider C A, Rasband W S, Eliceiri K W (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods 9(7): 671–675

186. Schoenhals G J, Macnab R M (1999) FliL is a membrane-associated component of the flagellar basal body of Salmonella. Microbiology (Reading, Engl) 145 (Pt 7): 1769–1775

187. Schuhmacher J S, Thormann K M, Bange G (2015) How bacteria maintain location and number of flagella? FEMS Microbiol Rev 39(6): 812–822

188. Schuhmacher J S, Rossmann F, Dempwolff F et al (2015) MinD-like ATPase FlhG effects location and number of bacterial flagella during C-ring assembly. Proc Natl Acad Sci U S A 112(10): 3092–3097

189. Serra D O, Richter A M, Klauck G et al (2013) Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. MBio 4(2): e00103-13

190. Seshasayee A S N, Fraser G M, Luscombe N M (2010) Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria. Nucleic Acids Res 38(18): 5970–5981

191. Shinoda S, Okamoto K (1977) Formation and function of Vibrio parahaemolyticus lateral flagella. J Bacteriol 129(3): 1266–1271

192. Silverman M, Simon M (1974) Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. Nature 249(452): 73–74

193. Simm R, Morr M, Kader A et al (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. Mol Microbiol 53(4): 1123–1134

194. Skerker J M, Berg H C (2001) Direct observation of extension and retraction of type IV pili. Proc Natl Acad Sci U S A 98(12): 6901–6904

195. Smith D R, Chapman M R (2010) Economical evolution: microbes reduce the synthetic cost of extracellular proteins. MBio 1(3)

196. Smith E E, Buckley D G, Wu Z et al (2006) Genetic adaptation by Pseudomonas aeruginosa to the airways of cystic fibrosis patients. Proc Natl Acad Sci U S A 103(22): 8487–8492

197. Son K, Guasto J S, Stocker R (2013) Bacteria can exploit a flagellar buckling instability to change direction. Nature Phys 9(8): 494–498

198. Sourjik V, Wingreen N S (2012) Responding to chemical gradients. Curr Opin Cell Biol 24(2): 262–268

199. Sowa Y, Berry R M (2008) Bacterial flagellar motor. Q Rev Biophys 41(2): 103–132

200. Srivastava D, Hsieh M-L, Khataokar A et al (2013) Cyclic di-GMP inhibits Vibrio cholerae motility by repressing induction of transcription and inducing extracellular polysaccharide production. Mol Microbiol 90(6): 1262–1276

201. Srivastava D, Waters C M (2015) A Filter Binding Assay to Quantify the Association of Cyclic di-GMP to Proteins. Bio Protoc 5(3)

202. Stewart P S, Costerton J W (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 358(9276): 135–138

203. Stewart P S (2003) Diffusion in biofilms. J Bacteriol 185(5): 1485–1491

204. Subramanian S, Gao X, Dann C E et al (2017) MotI (DgrA) acts as a molecular clutch on the flagellar stator protein MotA in Bacillus subtilis. Proc Natl Acad Sci U S A 114(51): 13537–13542

205. Subramanian S, Kearns D B (2019) Functional Regulators of Bacterial Flagella. Annu Rev Microbiol 73: 225–246

206. Sudarsan N, Lee E R, Weinberg Z et al (2008) Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. Science 321(5887): 411–413

207. Suzuki H, Yonekura K, Namba K (2004) Structure of the rotor of the bacterial flagellar motor revealed by electron cryomicroscopy and single-particle image analysis. J Mol Biol 337(1): 105–113

208. Takekawa N, Kwon S, Nishioka N et al (2016) HubP, a Polar Landmark Protein, Regulates Flagellar Number by Assisting in the Proper Polar Localization of FlhG in Vibrio alginolyticus. J Bacteriol 198(22): 3091–3098

209. Tal R, Wong H C, Calhoon R et al (1998) Three cdg operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in Acetobacter xylinum. J Bacteriol 180(17): 4416–4425

210. Tamayo R, Pratt J T, Camilli A (2007) Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. Annu Rev Microbiol 61: 131–148

211. Tarutina M, Ryjenkov D A, Gomelsky M (2006) An unorthodox bacteriophytochrome from Rhodobacter sphaeroides involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. J Biol Chem 281(46): 34751–34758

212. Terashima H, Kawamoto A, Morimoto Y V et al (2017) Structural differences in the bacterial flagellar motor among bacterial species. Biophys Physicobiol 14: 191–198

213. Teschler J K, Zamorano-Sánchez D, Utada A S et al (2015) Living in the matrix: assembly and control of Vibrio cholerae biofilms. Nat Rev Microbiol 13(5): 255–268

214. Thomas C, Andersson C R, Canales S R et al (2004) PsfR, a factor that stimulates psbAI expression in the cyanobacterium Synechococcus elongatus PCC 7942. Microbiology (Reading, Engl) 150(Pt 4): 1031–1040

215. Thomas D R, Francis N R, Xu C et al (2006) The three-dimensional structure of the flagellar rotor from a clockwise-locked mutant of Salmonella enterica serovar Typhimurium. J Bacteriol 188(20): 7039–7048

216. Thormann K M, Duttler S, Saville R M et al (2006) Control of formation and cellular detachment from Shewanella oneidensis MR-1 biofilms by cyclic di-GMP. J Bacteriol 188(7): 2681–2691

217. Thormann K M, Paulick A (2010) Tuning the flagellar motor. Microbiology (Reading, Engl) 156(Pt 5): 1275–1283

218. Toker A S, Macnab R M (1997) Distinct regions of bacterial flagellar switch protein FliM interact with FliG, FliN and CheY. J Mol Biol 273(3): 623–634

219. Toutain C M, Zegans M E, O'Toole G A (2005) Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol 187(2): 771–777

220. Tremblay J, Richardson A-P, Lépine F et al (2007) Self-produced extracellular stimuli modulate the Pseudomonas aeruginosa swarming motility behaviour. Environ Microbiol 9(10): 2622–2630

221. Tusk S E, Delalez N J, Berry R M (2018) Subunit Exchange in Protein Complexes. J Mol Biol 430(22): 4557–4579

222. Ueno T, Oosawa K, Aizawa S (1994) Domain structures of the MS ring component protein (FliF) of the flagellar basal body of Salmonella typhimurium. J Mol Biol 236(2): 546–555

223. Veening J-W, Smits W K, Kuipers O P (2008) Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. Annu Rev Microbiol 62: 193–210

224. Venkateswaran K, Moser D P, Dollhopf M E et al (1999) Polyphasic taxonomy of the genus Shewanella and description of Shewanella oneidensis sp. nov. Int J Syst Bacteriol 49 Pt 2: 705–724

225. Wang Y-C, Chin K-H, Tu Z-L et al (2016) Nucleotide binding by the widespread high-affinity cyclic di-GMP receptor MshEN domain. Nat Commun 7: 12481

226. Watnick P I, Fullner K J, Kolter R (1999) A Role for the Mannose-Sensitive Hemagglutinin in Biofilm Formation by Vibrio cholerae El Tor. J Bacteriol 181(11): 3606–3609

227. Watnick P I, Kolter R (1999) Steps in the development of a Vibrio cholerae El Tor biofilm. Mol Microbiol 34(3): 586–595

228. Welch M, Oosawa K, Aizawa S et al (1993) Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 90(19): 8787–8791

229. Wielinga B, Mizuba M M, Hansel C M et al (2001) Iron promoted reduction of chromate by dissimilatory iron-reducing bacteria. Environ Sci Technol 35(3): 522–527

230. Xie L, Altindal T, Chattopadhyay S et al (2011) From the Cover: Bacterial flagellum as a propeller and as a rudder for efficient chemotaxis. Proc Natl Acad Sci U S A 108(6): 2246–2251

231. Xu L, Xin L, Zeng Y et al (2016) A cyclic di-GMP-binding adaptor protein interacts with a chemotaxis methyltransferase to control flagellar motor switching. Sci Signal 9(450): ra102

232. Yamaichi Y, Bruckner R, Ringgaard S et al (2012) A multidomain hub anchors the chromosome segregation and chemotactic machinery to the bacterial pole. Genes Dev 26(20): 2348–2360

233. Yan X-F, Xin L, Yen J T et al (2018) Structural analyses unravel the molecular mechanism of cyclic di-GMP regulation of bacterial chemotaxis via a PilZ adaptor protein. J Biol Chem 293(1): 100–111

234. Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K (2001) Structure analysis of the flagellar cap-filament complex by electron cryomicroscopy and single-particle image analysis. J Struct Biol 133(2-3): 246–253

235. Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K (2003) Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. Nature 424(6949): 643–650

236. Yorimitsu T, Homma M (2001) Na(+)-driven flagellar motor of Vibrio. Biochim Biophys Acta 1505(1): 82–93

237. Zhao R, Amsler C D, Matsumura P et al (1996) FliG and FliM distribution in the Salmonella typhimurium cell and flagellar basal bodies. J Bacteriol 178(1): 258–265

238. Zhao R, Pathak N, Jaffe H et al (1996) FliN is a major structural protein of the C-ring in the Salmonella typhimurium flagellar basal body. J Mol Biol 261(2): 195–208

239. Zhu S, Kumar A, Kojima S et al (2015) FliL associates with the stator to support torque generation of the sodium-driven polar flagellar motor of Vibrio. Mol Microbiol 98(1): 101–110

6. Appendix

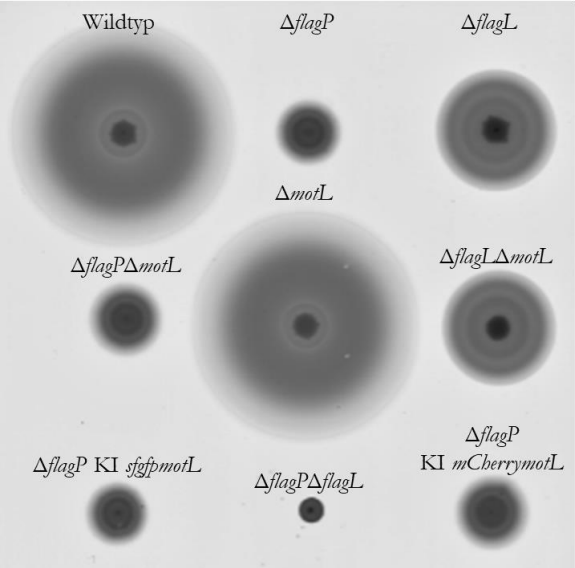

Abbildung 26: Schwimmverhalten verschiedener Deletions- und Insertionsmutanten. Jeweils 4 µl einer Kultur mit einer OD_{600} von etwa 0,4 wurden auf einer LB-Weichagarplatte mit 0,25 % Softagar für 24 h bei RT inkubiert. Die Deletion von *motL* hat keinen Einfluss auf die radiale Ausbreitung des Wildtyps und Δ*flagL*. Die Deletion von *motL* in Δ*flagP* hingegen führt durchschnittlich zu einem 10 % größeren Ausbreitungsradius im Vergleich zu dem von Δ*flagP*. Die Komplementation von Δ*flagP*Δ*motL* mit *sfgfpmotL* zeigt, dass die sfGFP-ge*tagte* Variante von MotL funktional ist und den Ausbreitungsradius wieder auf in etwa den von Δ*flagP* reduziert wohingegen die Komplementation mit *mCherrymotL* eine Beeinträchtigung der Funktion zeigt.

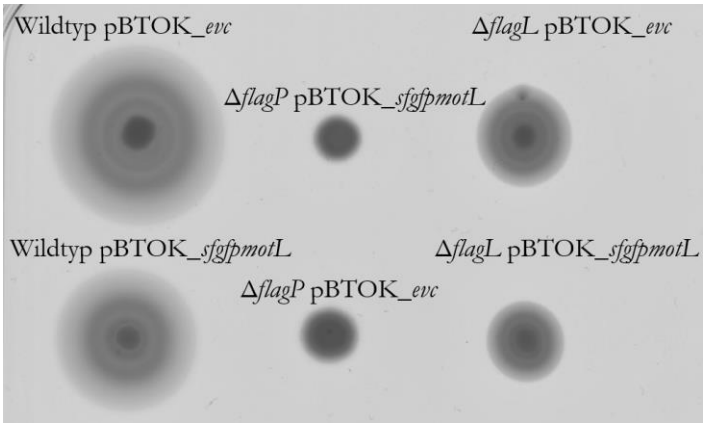

Abbildung 27: Schwimmverhalten verschiedener Stämme nach Überproduktion von sfGFPMotL. Jeweils 4 µl einer Kultur mit einer OD_{600} von etwa 0,4 wurden auf einer LB-Weichagarplatte mit 0,25 % Softagar und Kan und AHT (100 ng/ml) für 24 h bei RT inkubiert. Die Überproduktion von sfGFPMotL im Wildtyp führt zu einer Verringerung des Ausbreitungsradius von durchschnittlich 15 % im Vergleich zur Leervektorkontrolle (*evc*). Die Überproduktion von sfGFPMotL in Δ*flag*P hingegen führt zu einer durchschnittlichen Reduktion des Ausbreitungsradius um 27 % im Vergleich zur Leervektorkontrolle. In Δ*flag*L resultiert die Überproduktion von sfGFPMotL lediglich zu einer durchschnittlichen Reduktion des Ausbreitungsradius um 4 % im Vergleich zur Leervektorkontrolle.

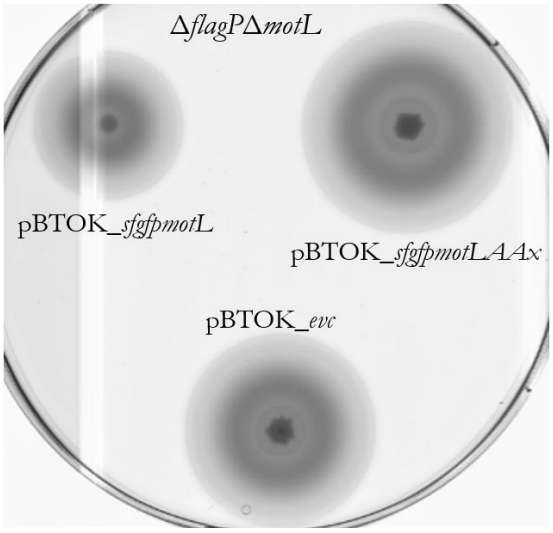

Abbildung 28: Schwimmverhalten der Überproduktionsstämme von sfGFPMotL und sfGFPMotLAAx. Jeweils 4 µl einer Kultur mit einer OD_{600} von etwa 0,4 wurden auf einer LB-Weichagarplatte mit 0,25 % Softagar und Kan und AHT (100 ng/ml) für 24 h bei RT inkubiert. Die Überproduktion von sfGFPMotL in Δ*flagP*Δ*motL* führt zu einer Verringerung des Ausbreitungsradius von durchschnittlich 35 % im Vergleich zur Leervektorkontrolle (*evc*). Die Überproduktion von sfGFPMotLAAX in Δ*flag*PΔ*motL* führt hingegen zu einer durchschnittlichen Steigerung des Ausbreitungsradius von 10 % im Vergleich zur Leervektorkontrolle.

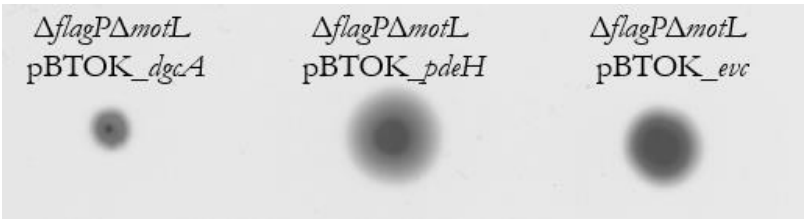

Abbildung 29: Schwimmverhalten bei artifiziell modifizierten c-di-GMP-Spiegeln. Jeweils 4 µl einer Kultur mit einer OD_{600} von etwa 0,4 wurden auf einer LB-Weichagarplatte mit 0,25 % Softagar und Kan und AHT (100 ng/ml) für 24 h bei RT inkubiert. Die Überproduktion von DgcA in Δ*flag*PΔ*motL* führt zu einem erhöhten intrazellulären c-di-GMP-Spiegel und zu einer Verringerung des Ausbreitungsradius von durchschnittlich 20 % im Vergleich zur Leervektorkontrolle (*evc*). Die Überproduktion von PdeH in Δ*flag*PΔ*motL* hingegen führt zu einer Reduktion des intrazellulären c-di-GMP-Spiegels zu einem durchschnittlichen Anstieg des Ausbreitungsradius um 30 % im Vergleich zur Leervektorkontrolle.

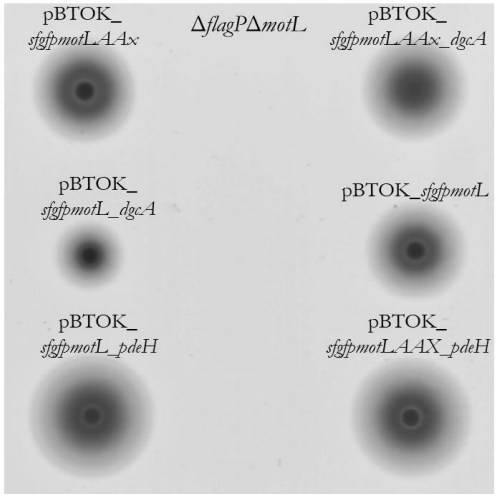

Abbildung 30: Schwimmverhalten der Überproduktionsstämme von sfGFPMotL und sfGFPMotLAAx bei artifiziell modifizierten c-di-GMP-Spiegeln. Jeweils 4 µl einer Kultur mit einer OD_{600} von etwa 0,4 wurden auf einer LB-Weichagarplatte mit 0,25 % Softagar und Kan und AHT für 24 h bei RT inkubiert. Die kotranslationale Überproduktion von PdeH und sfGFPMotL in Δ*flagP*Δ*motL* führt zu einem durchschnittlich 100 % größeren Ausbreitungsradius in Bezug auf die alleinige Überproduktion von sfGFPMotL. Die kotranslationale Überproduktion von DgcA und sfGFPMotL resultiert hingegen in einem um durchschnittlich 30 % geringeren Ausbreitungsradius als bei der Überproduktion von sfGFPMotL unter nativem c-di-GMP-Spiegel. Die kotranslationale Überproduktion von PdeH und sfGFPMotLAAx in Δ*flagP*Δ*motL* resultiert in einem um durchschnittlich 9 % größeren Ausbreitungsradius als bei der Überproduktion von sfGFPMotLAAx alleine. Die kotranslationale Überproduktion von DgcA und sfGFPMotLAAx hingegen führt zu einem etwa 18 % geringeren Ausbreitungsradius im Vergleich zur alleinigen Überproduktion von sfGFPMotLAAx.

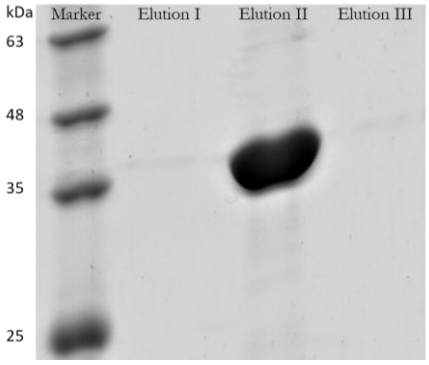

Abbildung 31: Geldokumentation zur Aufreinigung der Diguanylatzyklase WspR^{R242A}. Zur Synthese von radioaktiv markiertem c-di-GMP wurde die Diguanylatzyklase WspR^{R242A} (37 kDa) aufgereinigt, wie in Kapitel 4.2.6 Überproduktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine beschrieben. Das Protein befand sich meist in der Elutionsfraktion II.

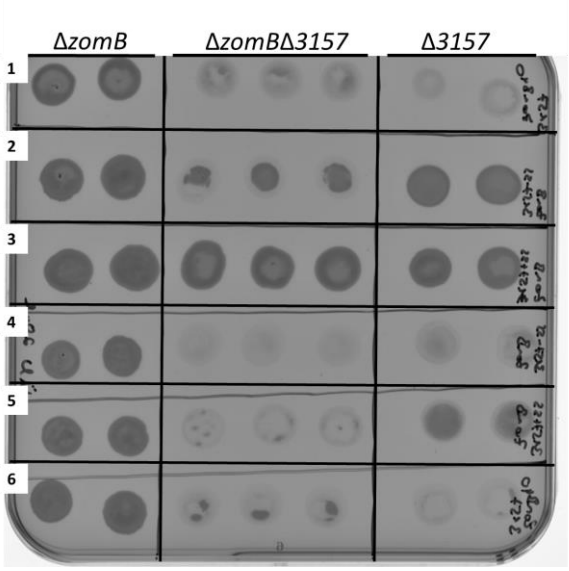

Abbildung 32: β-Lactamase-Fusions-Assay zur Bestimmung der Topologie von ZomB. In den Hintergrundstämmen Δ*zomB,* Δ*zomB*Δ3157 und Δ3157 wurden mittels pBBR*araC* jeweils die Fusionen aus 1) 3157_ZomB$_{40}$, 2) ZomB_3157 (ohne Signalsequenz der β-Lactamase), 3) ZomB_3157 (mit Signalsequenz der β-Lactamase), 4) 3157_ZomB (ohne Signalsequenz der β-Lactamase), 5) 3157_ZomB (mit Signalsequenz der β-Lactamase) und 6) ZomB$_{40}$_3157 überproduziert. Der Stamm Δ*zomB* ist Ampicillin-resistent und dient als Positivkontrolle. In den beiden Stämmen Δ*zomB*Δ3157 und Δ3157 ist die β-Lactamase deletiert und die Stämme können nur auf den LB$_{Gent, Amp}$-Agarplatten mit 1 % Arabinose wachsen, wenn die β-Lactamase ins Periplasma gelangt. Mit seiner Signalsequenz gelangt die β-Lactamase stets ins Periplasma und in diesen Stämmen lässt sich auch Wachstum feststellen. Ohne die Signalsequenz gelangt die β-Lactamase nur in den Fusionen, in denen sie sich am C-Terminus bzw. nach den ersten 40 Aminosäuren von ZomB befindet ins Perisplasma, sodass sich hier leichtes Wachstum feststellen lässt.

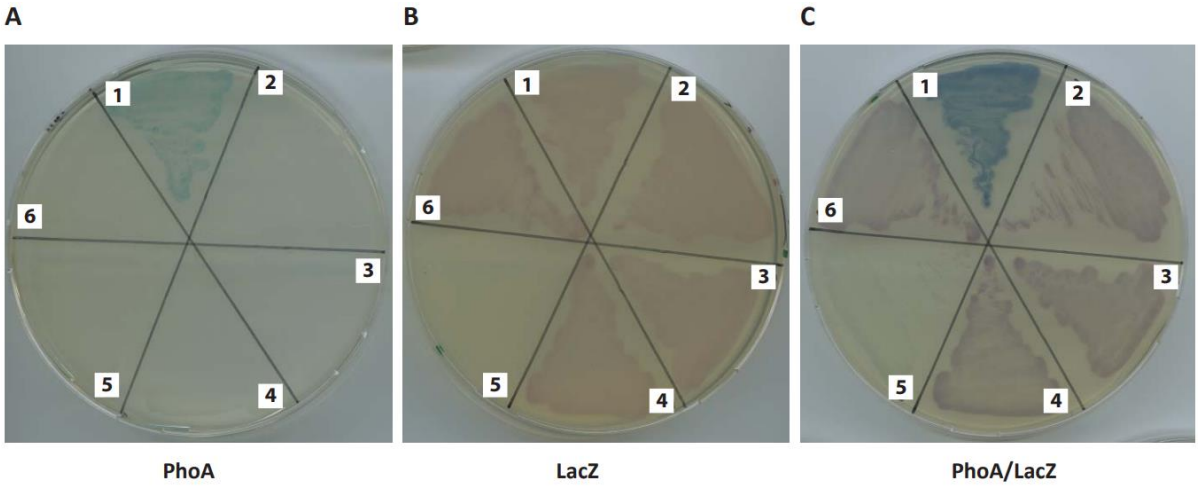

Abbildung 33: PhoA/LacZα-Fusions-Assay zur Bestimmung der Topologie von ZomB. In *E. coli* DH5α wurden mittels des Plasmids pKTOP folgende C-terminale-Fusionen der beiden Enzyme PhoA und LacZ an 1) NapE, 2) ZomB, 3) ZomB$_{1-100}$, 4) ZomB$_{1-45}$ exprimiert. 5) exprimiert den Leervektor pKTOP, welcher als Positivkontrolle für die β-Galaktosidase dient und 6) exprimiert den Leervektor pBTOK als Negativkontrolle. A) Diese Indikatorplatte enthält X-Phos, welches als Substrat durch die Phosphatase PhoA umgesetzt wird. B) Diese Indikatorplatte enthält Red-Gal, welches als Substrat durch die β-Galaktosidase LacZ umgesetzt wird und C) enthält beide Substrate. Die Aktivität der Phosphatase zeigt sich auf diesen Indikatorplatten durch eine Blaufärbung der Kolonien, welche auf eine periplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins hindeutet und die Aktivität der β-Galaktosidase zeigt sich durch eine Rotfärbung der Kolonien, welche auf eine zytoplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins hindeutet [90]. Alle Fusionsproteine zeigten eine Aktivität der β-Galaktosidase, was darauf hin deutet, dass der C-Terminus zumindest zu einem gewissen Teil im Zytoplasma vorliegt. Eine deutliche Phosphataseaktivität zeigte nur die dafür vorgesehene Positivkontrolle NapE. Die Platten wurden für 18h bei 37 °C inkubiert.

Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Kai Thormann für die Gelegenheit meine Doktorarbeit zu diesem spannenden Thema anfertigen zu können, danken. Dafür, dass er immer eine offene Tür und ein offenes Ohr für alle Fragen und Probleme hatte, für alle guten Ratschläge und Anregungen und für die Freiheit, mit der ich meine Projekte bearbeiten durfte.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich mich bei Apl. Prof. Elena Evguenieva-Hackenberg bedanken, die auch während meiner Arbeit am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie stets für anregende Diskussionen und weitere Unterstützung zur Verfügung stand.

Ein großer Dank gilt auch allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Thormann dafür, dass ihr mir jederzeit bei allen Arten von Problemen geholfen habt, ob durch Ideen, Experimente oder einen neuen Blickwinkel. Dafür, dass ihr eine so gute und einzigartige Arbeitsatmosphäre geschaffen habt, die vielen mehr oder weniger sinnvollen und lustigen Gespräche während unserer Mittagspausen und die gute Zusammenarbeit bei gemeinsamen Projekten. Danke dass ihr mich herzlich willkommen geheißen habt und mir so viele neue Methoden gezeigt und mir praktisch und theoretisch jederzeit weitergeholfen habt.

Danke Suse, für deine offene und ehrliche Art und die vielen ermutigenden und aufmunternden Worte.

Danke Flo, für deine stetige Hilfsbereitschaft und dafür, dass du mir Gießen und unter anderem auch den besten Dönerladen der Stadt gezeigt hast.

Danke Marco, für die Unterstützung bei allem was mit Mikroskopie und Statistik zu tun hatte.

Danke Max, für die Hilfe mit Illustrator, Photoshop, Benchling und allem anderen digitalen Kram.

Danke Ulrike, für alle PCR´s und Stämme und dafür, dass du das Labor stets auf Vordermann gehalten hast.

Danke an meine Bachelor- und Masterstudenten Patrick, Tabea und Lukas für ihr großes Interesse, die gute Zusammenarbeit und die praktische Unterstützung meiner Forschungsprojekte.

Danke auch an die aktuellen Doktoranden der AG Thormann Tim, John, Meike, Nicole und Vanessa.

Dabei möchte ich mich besonders bei Tim für die gemeinsame Arbeit an c-di-GMP-Thematiken und die meist entspannte und immer gute Zusammenarbeit in unserem Labor L250 bedanken.

Desweiteren möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Klug und AG Hackenberg für die nette Zusammenarbeit, die sehr unterhaltsamenen Kaffeepausen und die vielen lehrreichen Seminare bedanken. Ohne euch wüsste ich nichts über leader-Peptide, trans- oder cis-encodierte-RNA´s, das puf-Operon, den ligth-harvesting-complex aus Rhodo und vieles mehr.

Danke an Lennart, Bernhard und Bork dafür, dass sie bei wissenschaftlichen Fragen stets mit konstruktiver Kritik und guten Ideen behilflich waren und für die zahlreichen Aktivitäten auch außerhalb des Instituts.

Danke Saina und Robi für die vielen langen und trotzdem spaßigen Abende im Lab und die fern vom Lab.

Mein herzlichster Dank gilt Carina, die mir immer bei allen möglichen Anliegen, egal ob wissenschaftlich oder privat zur Seite stand. Dafür, dass sie stets meinen Frust aber nie meine Freude ausgebremst hat. Danke für die tolle gemeinsame Zeit mit dir als Teil des neuen dynamischen Duos. Ohne dich wäre es nicht dasselbe gewesen und hätte bestimmt auch nicht halb so viel Spaß gemacht.

Nicht zuletzt wegen euch allen haben mir die Jahre am Institut und in Gießen sehr viel Freude bereitet. Ich habe sehr gerne mit euch zusammen gearbeitet und auch meine Freizeit und Urlaube mit euch verbracht!

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinen Brüdern und meiner Oma, die stets an mich glaubten und mich immer bei all meinen Vorhaben unterstützt haben.

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.

Wissenschaftliche Publikationen

- Probing the contractile vacuole as Achilles' heel of the biotrophic grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. Tröster V, Setzer T, Hirth T, **Pecina A**, Kortekamp A, Nick P. Protoplasma. 2017 Sep; 254(5):1887-1901. doi: 10.1007/s00709-017-1123-y. Epub 2017 May 26

- ZomB is essential for flagellar motor reversals in *Shewanella putrefaciens* and *Vibrio parahaemolyticus*. Brenzinger S, **Pecina A**, Mrusek D, Mann P, Völse K, Wimmi S, Ruppert U, Becker A, Ringgaard S, Bange G, Thormann KM. Mol Microbiol. 2018 Sep; 109(5):694-709. doi: 10.1111/mmi.14070. Epub 2018 Aug 1

Wissenschaftliche Konferenzen

- **SPP1879 Nucleotide second messenger signaling in bacteria**

30.09-.03.10.2018	International symposium,	Berlin

- **Bacterial Networks (Bacnet17)**

09-.14.09.2017	International EMBO conference,	Sant Feliu de Guixols, Spain

- **Bacterial Locomotion and signal transduction (Blast)**

20-.25.01.2019	International conference,	New Orleans, USA

- **Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie (VAAM)**

13.-16.03.2016	Jahrestagung,	Jena
05.-08.03.2017	Joint conference with DGHM,	Würzburg
15.-18.04.2018	Jahrestagung,	Wolfsburg
17.-20.03.2019	Jahrestagung,	Mainz
08.-11.03.2020	Joint conference with DGHM,	Leipzig

- **SPP1617 Phenotypic heterogeneity and sociobiology of bacterial populations**

13.-21.04.2016	International conference I,	Düsseldorf
27.-29.03.2017	Joint conference with SPP1656,	Hohenkammer
05.-07.03.2018	Progress meeting,	Göttingen
27.-29.03.2019	International conference II,	Hohenkammer