

**Regulation der
monopolaren Flagellenassemblierung in
Shewanella putrefaciens CN-32**

**Regulation of monopolar flagellar assembly in
Shewanella putrefaciens CN-32**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie und Chemie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Meike Schwan

angefertigt am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie

Gießen, März 2022

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von 01.07.2017 bis 31.12.2021 unter der Leitung von Prof. Dr. Kai Thormann am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

1. Gutachter Prof. Dr. Kai Thormann

Justus-Liebig-Universität Gießen
Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Heinrich-Buff-Ring 26-32
35392 Gießen

2. Gutachter Prof. Dr. Marc Erhardt

Humboldt-Universität zu Berlin
Institut für Biologie - Bakterienphysiologie
Philippstraße 13 - Haus 22
10115 Berlin

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

- 1. An ATP-dependent partner switch links flagellar C-ring assembly with gene expression.**
Blagotinsek V.*, **Schwan M.***, Steinchen W., Mrusek D., Hook J.C., Rossmann F., Freibert S.A., Kratzat H., Murat G., Kressler D., Beckmann R., Beeby M., Thormann K. M., Bange G.
2020. *PNAS* 117(34): 20826-20835. Doi: 10.1073/pnas.2006470117
* diese Autoren wirkten gleichberechtigt an der Publikation mit
- 2. Constant production of FlhG ensures proper function of the flagellar counter in *Shewanella putrefaciens***
Schwan M., Khaledi A., Glatter T., Papenfort K., Häußler S., Thormann K. M.
Manuskript in Arbeit

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

- 3. A Proline-Rich Element in the Type III Secretion Protein FlhB Contributes to Flagellar Biogenesis in the Beta- and Gamma-Proteobacteria.**
Hook J. C.*, Blagotinsek V.*, Pané-Farré J., Mrusek D., Altegoer F., Dornes A., **Schwan M.**, Schier L., Thormann K. M., Bange G.
2020. *Front Microbiol* 11: 564161. Doi: 10.3389/fmicb.2020.564161
- 4. Dynamics of Bacterial Signal Recognition Particle at a Single Molecule Level.**
Mayer B., **Schwan M.**, Oviedo-Bocanegra L. M., Bange G., Thormann K. M., Graumann P. L.
2021. *Front Microbiol* 12: 663747. Doi: 10.3389/fmicb.2021.663747
- 5. The Stand-Alone PilZ-Domain Protein MotL Specifically Regulates the Activity of the Secondary Lateral Flagellar System in *Shewanella putrefaciens*.**
Pecina A., **Schwan M.**, Blagotinsek V., Rick T., Klüber P., Leonhard T., Bange G., Thormann K. M.
2021. *Front Microbiol* 12:668892. Doi: 10.3389/fmicb.2021.668892
- 6. Antibiotic Drug screening and Image Characterization Toolbox (A.D.I.C.T.): a robust imaging workflow to monitor antibiotic stress response in bacterial cells *in vivo*.**
Mayer B., **Schwan M.**, Thormann K. M., Graumann P. L.
2021. *F1000Research* [version 2; peer review: 1 approved with reservations] 10: 277. Doi: 10.12688/f1000research.51868.2

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	IV
2	Abstract	VI
3	Einleitung	7
3.1	Motilität von Bakterien	7
3.2	Bakterielle Flagelle	7
3.2.1	Assemblierung eines Flagellums	9
3.2.2	Transkriptionelle hierarchische Regulierung	10
3.3	Diversität von Flagellierungsmuster	12
3.4	Regulation der Flagellierungsmuster	13
3.4.1	Einfluss der Regulatoren FlhF und FlhG auf polar flagellierte Bakterien	13
3.4.2	Signal-Recognition-Particle ähnliche GTPase FlhF	14
3.4.3	MinD-ähnliche ATPase FlhG	15
3.4.4	FlrA – Hauptregulator für die Transkription der Flagellengene	16
3.5	Modellorganismus <i>Shewanella putrefaciens</i> CN-32	18
3.5.1	Motilität von <i>Shewanella</i>	18
3.6	Zielsetzung	20
4	Ergebnisse	21
4.1	Regulation des polaren Flagellenclusters in <i>S. putrefaciens</i>	21
4.1.1	FlrA, RpoN und FliA regulieren die Expression der Flagellengene	21
4.1.2	Einfluss der Flagellenregulatoren auf das Proteom	22
4.1.3	Flagellenregulatoren beeinflussen die <i>bpfA</i> -Operon Transkription	24
4.1.4	Nicht alle Flagellengene werden durch Flagellenregulatoren beeinflusst	25
4.1.5	σ^{70} -abhängige Promotoren sorgen für eine konstitutive Genexpression einiger Flagellenbestandteile	29
4.1.6	Ektopische Expression von <i>flrA</i> steigert Proteinmenge von σ^{70} Promotor abhängigen Flagellenbestandteilen	33
4.1.7	Induktion der Genexpression des Hauptregulators <i>flrA</i>	34
4.1.8	Rho-unabhängige Terminatoren der frühen Flagellengene	35
4.2	Regulation der monopolaren Flagellenassemblierung durch die MinD-ähnliche ATPase FlhG	38
4.2.1	FlhG lokalisiert kurze Zeit am Zellpol	38
4.2.2	<i>Landmark</i> -Protein HubP besitzt keinen Einfluss auf FlhG und Flagellierung	39
4.2.3	FlhG ist kein integrierter Bestandteil der Flagelle	41
4.2.4	C-Ring Protein FliM transportiert FlhG an den flagellierten Zellpol	41
4.2.5	ATP-abhängiges FlhG Homodimer interagiert mit Flagellenhauptregulator FlrA	42
4.2.6	FliM und FlrA teilen sich FlhG Bindestellen	44
4.2.7	FlhG hemmt die FlrA-abhängige Transkription	46
4.2.8	FlhG-Bindestelle bei FlrA beeinflusst Flagellenlokalisierung und -anzahl	47
4.2.9	Erhöhte Proteinlevel von FlhF und FlhG bei <i>S. putrefaciens flrA_{L400E}</i>	49

4.2.10	<i>S. putrefaciens</i> Mutanten können bis zu acht Flagellen ausbilden	50
4.2.11	FlhG-FlrA-Komplex lokalisiert vermutlich in der Teilungsebene	51
4.2.12	Einfluss von FlhG Mutanten auf FlhG Lokalisierung und Flagellierung	51
4.2.13	FlhG MTS-Domäne wichtig für eine monopolare Flagellierung	53
4.2.14	Delokalisierte Hyperflagellierung ist in <i>S. putrefaciens flhG_{F2A}</i> und <i>flrA_{L400E}</i> ohne Muster	54
4.3	Synchronisation von Flagellenassemblierung und Zellteilung?	56
4.3.1	MinD-ähnliche ATPase FlhG und MinD beeinflussen sich nicht gegenseitig	56
4.3.2	Identifizierung nach Aktivatoren und Repressoren der <i>flrA</i> Expression	58
4.3.3	ArcA beeinflusst nicht Flagellenassemblierung	59
5	Diskussion	61
5.1	Initiierung der Genexpression des Flagellenhauptregulators <i>flrA</i>	61
5.1.1	ArcA beeinflusst nicht die Flagellenassemblierung unter aeroben Bedingungen	61
5.1.2	Weitere Regulatoren für die Genexpression von <i>flrA</i>	62
5.2	Einfluss der Flagellenregulatoren auf das Transkriptom und Proteom	64
5.3	Transkriptionelle Regulation der Flagellenassemblierung	66
5.3.1	Weitere mögliche Faktoren zur Regulation von Flagellengenen	66
5.3.2	σ^{70} -abhängige Genexpression essenziell für die monopolare Flagellensynthese	67
5.3.3	FlrA/RpoN- und FliA-abhängige Regulation der polaren Flagellensynthese	70
5.3.4	Regulation der Anzahl an Flagellenkomponenten	71
5.4	MinD-ähnliche ATPase FlhG reguliert die Flagellenanzahl	72
5.4.1	Funktion der Interaktion von FlhG und HubP bisher nicht bekannt	72
5.4.2	ATP-abhängiger Partnerwechsel der MinD-ähnlichen ATPase FlhG	73
5.4.3	Mechanismus von FlhG zur monopolaren Flagellierung	73
5.5	Synchronisation von Flagellenassemblierung und Zellteilung	78
5.6	Fazit	80
6	Material und Methoden	81
6.1	Materialien	81
6.1.1	Chemikalien	81
6.1.2	Bakterienstämme und Plasmide	81
6.1.3	Oligonukleotide	93
6.1.4	Nährmedien	105
6.1.5	Antibiotika und Medienzusätze	106
6.1.6	Geräte	106
6.1.7	Antikörper, Enzyme, Kits und Puffer	107
6.1.8	Software	109
6.2	Methoden	110
6.2.1	Sterilisation	110
6.2.2	Kultivierung von Bakterienstämmen	110

6.2.3	Konstruktion rekombinanter Bakterienstämme	110
4.2.3.1.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	110
4.2.3.2.	Agarosegelelektrophorese.....	111
4.2.3.3.	Restriktion von DNA mittels Endonukleasen.....	111
4.2.3.4.	Klonierung mittels Gibson Assembly	111
4.2.3.5.	Transformation chemisch-kompetenter Zellen	112
4.2.3.6.	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	112
4.2.3.7.	Konjugation.....	112
4.2.3.8.	<i>In-frame</i> Deletions- und Insertionsmutanten	112
4.2.3.9.	Induzierbare chromosomale Genexpression.....	113
6.2.4	Mikroskopie.....	113
4.2.3.10.	Maleimidfärbung	113
6.2.5	Motilitätsassay	114
6.2.6	RNA-Isolierung	114
6.2.7	qRT-PCR	114
6.2.8	Transkriptionelles <i>lux</i> -Reportersystem	115
6.2.9	5'-RACE-PCR	115
6.2.10	SDS-PAGE	115
6.2.11	Western Blot	116
6.2.12	Bacterial Two-Hybrid System	116
6.2.13	DNA-Pulldown Assay	117
7	Abkürzungsverzeichnis	119
8	Literaturverzeichnis	120
9	Anhang	136
	Eidesstattliche Erklärung	162
	Lebenslauf.....	163
	Danksagung	164

1 Zusammenfassung

Die am häufigsten vorkommende Fortbewegung bei Bakterien ist die durch Flagellen vermittelte Motilität. Flagellen sind Multiproteinkomplexe, deren Grundaufbau zwischen Bakterienarten sehr konserviert ist. Diese bestehen aus den drei strukturellen Einheiten: Basalkörper, Haken und Filament. Die Positionierung, Anzahl und Zusammenbau der Flagellen erfordert eine komplexe räumliche-zeitliche Kontrolle. In vielen polar flagellierten γ -Proteobakterien liegen der Expression, Produktion und dem Aufbau des Flagellums eine vierstufige Transkriptionshierarchie zugrunde. Die transkriptionellen Hierarchien werden durch mehrere Regulatoren vermittelt. Allerdings zeigten bisherige Untersuchungen von *in silico*- und Promotoranalysen eine abweichende Regulation in *Shewanella oneidensis*.

In dieser Arbeit wurde die Regulation der Flagellengene in dem monopolar flagellierten *Shewanella putrefaciens* als allgemeiner Modellorganismus durch den RpoN (σ^{54})-abhängigen Hauptregulator FlrA und Sigmafaktor FliA (σ^{28}) auf mRNA- und Proteinlevel untersucht. Der Hauptregulator FlrA und RpoN aktivieren die Transkription der Basalkörper-Bausteine und des Flagellen-spezifischen Typ-III-Sekretionssystems. Bemerkenswert ist, dass nur wenige der früh benötigten Flagellenkomponenten auf Proteinebene reguliert sind, während die meisten auch in Abwesenheit der Hauptregulatoren in normalen Mengen vorhanden sind. Mit Hilfe von Promotoranalysen konnten σ^{70} -abhängige Promotoren identifiziert werden, die die konstitutive Expression einiger frühen Gene des Basalkörpers und der Regulatoren SRP-ähnliche GTPase FlhF, MinD-ähnliche ATPase FlhG und FliA ermöglichen. Dies deutet drauf hin, dass für den Aufbau der Flagelle nur wenige Schlüsselkomponenten auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene streng kontrolliert werden.

In vielen Bakterienarten ist die MinD-ähnliche ATPase FlhG ein zentraler Faktor für die numerische Kontrolle der Flagellen. Die Deletion von *flhG* in polar flagellierten Bakterien führt zu einer polaren Hyperflagellierung. Wir fanden heraus, dass ein konstantes Level an FlhG durch die σ^{70} -abhängigen Promotoren für die monopolare Flagellierung in *S. putrefaciens* essenziell ist. Der genaue molekulare Mechanismus von FlhG war nicht verstanden und wurde mit biochemischen Analysen und entsprechenden Mutationsstämmen in *S. putrefaciens* untersucht. FlhG teilt die gleiche Bindungsstelle für die Interaktion mit dem C-Ring-Protein FliM und dem Hauptregulator FlrA. Das FlhG-Monomer wird von FliM an den Zellpol transportiert und nur das ATP-gebundene FlhG-Dimer ist in der Lage mit FlrA zu interagieren. Die Bindung von FlhG an FlrA führt zur Hemmung der FlrA-abhängigen Genexpression und durch diese negative Rückkopplung werden keine weiteren Flagellen produziert. Die Bindung von FlrA an FlhG stimuliert die ATPase-Aktivität, das zur Hydrolyse von ATP sowie der Dissoziation des FlhG-Dimers führt und die Produktion eines polaren Flagellums starten kann. Bei Mutationen, die einen Einfluss auf das FlhG-Monomer haben, kann eine polare Hyperflagellierung beobachtet werden. Überraschenderweise ändert sich der Phänotyp zu einer über den ganzen Zellkörper verteilten Hyperflagellierung, die einer peritrichen Flagellierung ähnelt, wenn Mutationen eingebracht wurden, die eine Rolle bei dem FlhG-Dimer spielen. Die delokalisierte Hyperflagellierung kommt vermutlich durch einen bisher unbekanntem Faktor zustande, der die Flagellenassemblierung und Zellteilung synchronisieren könnte. Mögliche Faktoren wie MinD, eine Komponente des Min-Systems zur Zellteilung, zeigten allerdings keinen Einfluss auf FlhG als auch auf die Flagellenassemblierung.

Der Transport von FlhG an den Zellpol sowie die anschließende Hemmung der FlrA Transkriptionsaktivität findet wahrscheinlich kontinuierlich statt. Daher wurden ebenfalls Transkriptionsaktivatoren bzw. -repressoren für den Promotor des Hauptregulators *flrA* versucht zu identifizieren, da diese das Gleichgewicht zwischen FlrA und FlhG verändern könnten und die Produktion des Flagellums induziert. Allerdings wurden Änderungen der *flrA* Promotoraktivität durch z. B. dem Zwei-Komponenten Transkriptionsregulator ArcA ermittelt, aber diese hatten keinen Einfluss auf die Flagellenassemblierung.

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass nicht nur die zelluläre Kopienzahl von FlhG, sondern auch seine subzelluläre Lokalisierung entscheidend für seine Funktion bei der numerischen Regulation der

Flagellen ist. Dies zeigt eine weitere Ebene der regulatorischen Komplexität, die der räumlich-numerischen Regulation der Biosynthese von Flagellen zugrunde liegt und deutet darauf hin, dass der Zusammenbau der Flagellen durch die Transkription sowie Produktion der ersten Flagellenbausteine reguliert wird.

2 Abstract

The most common locomotion among bacteria is flagella-mediated motility. Flagella are multiprotein complexes whose underlying structure is highly conserved among bacterial species. They consist of the three structural units: basal body, hook and filament. The positioning, number and assembly of flagella requires complex spatiotemporal control. In many polar flagellated γ -proteobacteria, a four-class transcriptional hierarchy underlies the expression, production, and assembly of the flagellum. The transcriptional hierarchies are mediated by multiple regulators. However, previous studies of *in silico* and promoter analyses revealed divergent regulation in *Shewanella oneidensis*.

In this work, the regulation of flagellar genes in the monopolar flagellated *Shewanella putrefaciens* was investigated as a general model organism by the RpoN (σ^{54})-dependent master regulator FlrA and sigma factor FliA (σ^{28}) at the mRNA and protein levels. FlrA and RpoN activate transcription of the genes coding for the basal body building blocks and the flagella-specific type III secretion system. Remarkably, few of the early required flagellar components are regulated at the protein level, whereas most are present at normal levels in the absence of the master regulators. Promoter analysis identified σ^{70} -dependent promoters that enable constitutive expression of some early basal body genes and the regulators SRP-like GTPase FlhF, MinD-like ATPase FlhG, and FliA. This suggests that for the assembly of the flagellum, only a few key components are tightly controlled at the transcriptional level as well as at the protein level.

In many bacterial species, the MinD-like ATPase FlhG is a central factor in the numerical control of flagella. Deletion of *flhG* in polar flagellated bacteria leads to polar hyperflagellation. We found that a constant level of FlhG through the σ^{70} -dependent promoters is essential for monopolar flagellation in *S. putrefaciens*. The exact molecular mechanism of FlhG was not understood and was investigated with biochemical analyses and corresponding mutation strains in *S. putrefaciens*. FlhG shares the same binding site for interaction with the C-ring protein FliM and the master regulator FlrA. The FlhG monomer is transported to the cell pole by FliM and only the ATP-bound FlhG dimer is able to interact with FlrA. Binding of FlhG to FlrA leads to inhibition of FlrA-dependent gene expression, and this negative feedback leads to cessation of flagella production. Binding of FlrA to FlhG stimulates ATPase activity, which causes the hydrolysis of ATP as well as the dissociation of the FlhG dimer and can start the production of a polar flagellum. Polar hyperflagellation can be observed with mutations that have an effect on the FlhG monomer. Surprisingly, the phenotype changes to hyperflagellation distributed over the cell body, resembling peritrichous flagellation, when mutations that play a role in the FlhG dimer were introduced. The delocalized hyperflagellation likely results from a previously unknown factor that may synchronize flagellar assembly and cell division. However, possible factors such as MinD, a component of the Min system for cell division, showed no effect on FlhG as well as on flagellar assembly.

Transport of FlhG to the cell pole and subsequent inhibition of FlrA transcriptional activity probably occurs continuously. Therefore, attempts were made to identify transcriptional activators or repressors for the promoter of *flrA*, as they could alter the equilibrium between FlrA and FlhG and induce the production of the flagellum. However, changes in *flrA* promoter activity by, for example, the two-component transcriptional regulator ArcA were determined, but these did not affect the flagellar assembly.

The obtained results indicate that not only the cellular copy number of FlhG, but also its subcellular localization, is crucial for its function in the numerical regulation of flagella. This reveals another level of regulatory complexity underlying the spatial numerical regulation of flagellar biosynthesis and suggests that flagellar assembly is regulated by transcription as well as by production of the first flagellar building blocks.

3 Einleitung

Antonie van Leeuwenhoek entdeckte im Jahr 1683 zum ersten Mal Bakterien und beobachtete bei diesen eine Bewegung (Leewenhoek 1684). Ein Merkmal des Lebens ist die Eigenschaft der aktiven Bewegung von Organismen. Die aktive Bewegung spielt eine ausschlaggebende Rolle in der Überlebensfähigkeit von Lebewesen, da sie sich mit Nährstoffen versorgen, aber auch Toxinen und Fressfeinden entkommen müssen (Wadhwa und Berg 2021). Um bei diesen variierenden Umgebungsbedingungen überleben zu können, wird die Genexpression u. a. für die bakterielle Bewegung entsprechend der externen Stimuli reguliert (Soutourina und Bertin 2003).

3.1 Motilität von Bakterien

Bislang sind bei Prokaryoten drei übergeordnete Arten der aktiven Bewegung beschrieben, die zur Fortbewegung in Flüssigkeiten oder auf Oberflächen dienen (Wadhwa und Berg 2021). Eine häufig verbreitete Oberflächen-assoziierte Bewegung ist das *Twitching*, welches durch den Typ-IV-Pilus vermittelt wird. Durch das sequentielle verlängern, anheften und verkürzen des Typ-IV-Pilus bewegen sich viele Bakterien wie z. B. *Myxococcus xanthus* oder *Pseudomonas aeruginosa* über Oberflächen (Bradley 1980; Skerker und Berg 2001; Jin *et al.* 2011; Wadhwa und Berg 2021). *M. xanthus* ist in der Lage neben der Typ-IV-Pili vermittelten Bewegung auch eine weitere Art der Oberflächen-assoziierten Fortbewegung zu verwenden. Diese Bewegung ohne das Antreiben durch einen Pili oder einer Flagelle wird als Gleiten bezeichnet. Beim Gleiten heften sich Proteinkomplexe, welche am vorderen Zellpol sitzen, an die Substratoberfläche an und wandern dann zum hinteren Zellpol. Durch die Bewegung des Proteinkomplexes schiebt sich das Bakterium nach vorne (Spormann 1999; Wadhwa und Berg 2021). Eine weitere Fortbewegungsart ist das Schwärmen. Schwärmen bezeichnet die schnelle Bewegung in Gruppen über Oberflächen und wurde bei vielen Bakterienspezies wie *Escherichia*, *Pseudomonas* und *Vibrio* beschrieben. Diese Art der Motilität ist bei flagellierten Bakterien auf feuchten, nährstoffreichen Oberflächen zu beobachten. Die Differenzierung zu einer Schwärmerzelle führt zu einer Elongation der Zelllänge und/oder vermehrten Bildung von Flagellen (Fraser und Hughes 1999; Wadhwa und Berg 2021). Die am besten untersuchte Fortbewegungsart bei Prokaryoten ist das Schwimmen mit Hilfe eines rotierenden korkenzieher-förmigen Zellanhängsels, der bakteriellen Flagelle.

3.2 Bakterielle Flagelle

Flagellen kommen bei mehr als 80 % der bekannten Bakterienspezies vor (Soutourina und Bertin 2003) und gehört zu den komplexesten Proteinstrukturen bei Bakterien. Neben der Fortbewegung spielt der Flagellenapparat auch eine wichtige Rolle beim Wechsel des planktonischen zu einer sessilen Lebensweise, die auch als Biofilm bezeichnet wird (Pratt und Kolter 1998). Für die Wahrnehmung von Oberflächen können Flagellen auch als Mechanosensoren dienen (Belas 2014).

Der Grundaufbau von Flagellen ist zwischen Bakterienarten sehr konserviert (Terashima *et al.* 2017). Alle im Folgenden angegebenen Anzahlen an Proteineinheiten stammen von neuen Aufnahmen mittels Kryo-Elektronenmikroskopie des *Salmonella* Flagellenmotors aus den Veröffentlichungen von Johnson *et al.* (2020), Deme *et al.* (2020), Kuhlen *et al.* (2020), Johnson *et al.* (2021), Hu *et al.* (2021) und Tan *et al.* (2021). Flagellen werden von drei strukturellen Hauptkomponenten aufgebaut: dem Basalkörper, Haken und Filament (Abb. 1). Der Basalkörper mit einem maximalen Durchmesser von ca. 50 nm ist der komplexeste Teil der Flagelle (Nord und Pedaci 2020). Dieser besteht bei Gram-negativen Bakterien im Wesentlichen aus folgenden Strukturen: C (*cytoplasmic*)-Ring, MS (*membrane/ supramembrane*)-Ring, P (*peptidoglycan*)-Ring, L (*lipopolysaccharide*)-Ring sowie einem Stab (Minamino und Imada 2015). In der Zytoplasmamembran ist der MS-Ring lokalisiert, der aus 34 FliF-Proteinen mit unterschiedlichen Symmetrien zu einer Ringstruktur aufgebaut ist (Johnson *et al.* 2020). Der MS-Ring ist in

einer 1:1 Stöchiometrie mit dem zytoplasmatischen C-Ring verbunden, der sich aus FliG, FliM und FliN in einer Stöchiometrie von 1:1:3 aufbaut (Hu *et al.* 2021). Der C-Ring spielt eine wichtige Rolle bei der Erzeugung des Drehmoments sowie bei dem Wechsel der Rotation zwischen im Uhrzeigersinn und gegen den Uhrzeigersinn (Yamaguchi *et al.* 1986; Sockett *et al.* 1992; Nord und Pedaci 2020). Der Stab setzt sich aus den proximal liegenden 6 FliE-, 5 FlgB-, 6 FlgC- und 5 FlgF-Proteinen sowie dem distalen Stäbchenprotein FlgG mit 24-26 Kopien zusammen (Tan *et al.* 2021; Johnson *et al.* 2021). Die je 26 Proteine FlgH und FlgI assemblieren um den Stab und bilden die L- und P-Ringe (Karlinsky *et al.* 1997; Tan *et al.* 2021; Johnson *et al.* 2021). Diese Ringe üben elektrostatische Kräfte aus, um die Drehung des Stabes zu unterstützen (Tan *et al.* 2021). Allerdings sind die LP-Ringe nur bei Gram-negativen und nicht bei Gram-positiven Bakterien vorhanden (Kubori *et al.* 1997). Alle weiteren Flagellenproteine, die über die Zellmembran transportiert werden müssen, nutzen das Flagellenspezifische Typ-III-Sekretionssystem (fT3SS). Das fT3SS benötigt sieben Membranproteine (FliA₉, FliB₁, FliF₃₄, FliO, FliP₅, FliQ₄ und FliR₁), welche sich im Innern des Basalkörpers befinden. Der ATPase-Komplex des fT3SSs mit den zytoplasmatischen Proteinen FliI₆, FliH₁₂ und FliJ₁ sorgt für eine effiziente Sekretion der ungefalteten bzw. teilweise ungefalteten Proteine (Minamino und Macnab 1999; Chevance und Hughes 2008; Kinoshita *et al.* 2021).

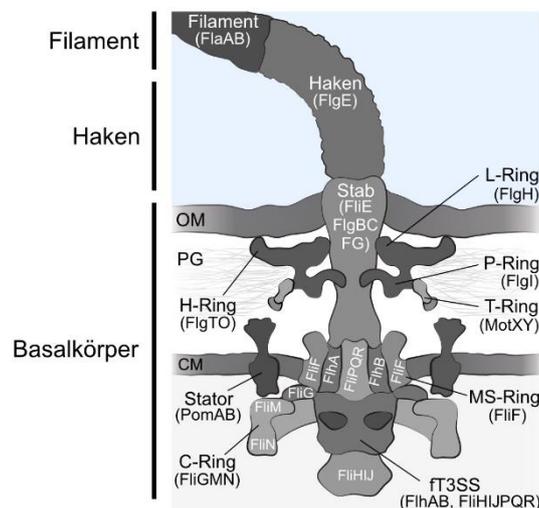


Abb. 1: Aufbau der bakteriellen Flagelle. Schematische Darstellung der Flagellenstruktur anhand einer Aufnahme mittels Kryo-Elektronentomographie von *Shewanella putrefaciens*. CM: Zellmembran; PG: Peptidoglykan; OM: äußere Membran; fT3SS: Flagellenspezifische Typ-III-Sekretionssystem. Die Abbildung ist modifiziert aus Kühn *et al.* (2018) und Pecina *et al.* (2021).

Der flexible Haken ist aus mindestens 120 Monomeren des Hakenproteins FlgE aufgebaut (Chevance und Hughes 2008). Das Filament besteht aus mindestens 20.000 Proteinen, welche als Flagelline bezeichnet werden. Einige Bakterienarten wie *Pseudomonas* besitzen nur ein Flagellin (FliC; Bouteiller *et al.* 2021), aber andere Arten wie *Vibrio* weisen 5-6 verschiedene Flagelline (FlaABCDE) in ihrem Filament auf (Echazarreta und Klose 2019). Das Filament kann mit einer Länge von 5-20 µm die Zelllänge mehrfach überschreiten (Doetsch und Sjoblad 1980; Hu *et al.* 2021). Allerdings mit einem Durchmesser von 20 nm sind die Filamente zu dünn, um mit einem Lichtmikroskop wahrgenommen werden zu können (Yonekura *et al.* 2003; Wadhwa und Berg 2021).

Das Drehmoment der Flagelle wird über einen Protonen- oder Kationengradienten durch Stator-Komplexe erzeugt, die in einer variablen Anzahl um den MS-Ring angeordnet sind. Zwei Typen an Statoren werden unterschieden: die H⁺-abhängigen aus den zwei Transmembranproteinen MotA und MotB sowie die Na⁺-abhängigen Statoren aus PomA und PomB (Manson *et al.* 1977; Wadhwa und Berg 2021; Hu *et al.* 2021). Die Stator-Komplexe PomA₅B₂ liegen inaktiv und frei diffundierend in der Membran vor und tauschen bereits aktive Statoren am Flagellenmotor aus. Die Interaktion von PomA und dem C-Ring Protein FliG induziert eine Konformationsänderung der Statoreinheit, welche ein nach innen

gerichteten Ionenfluss generiert. Die Energie des Ionenflusses wird in Rotationsenergie umgewandelt und somit das Drehmoment des Rotors erzeugt (Berg 2003; Paulick *et al.* 2015; Ito *et al.* 2021). Das Drehmoment wird vom C-Ring über den MS-Ring, Stab, Haken an das Filament weitergegeben (Berg 1995). Einige Bakterienspezies, wie *Vibrio* besitzen bei Na⁺-angetriebenen Motoren zusätzliche Flagellenkomponenten, die T- und H-Ringe, welche die LP-Ringe umgeben. Für das Durchdringen der äußeren Membran während dem Flagellenaufbau ist vermutlich der H-Ring zuständig, der aus den Proteinen FlgT und FlgO aufgebaut ist (Zhu *et al.* 2018). Der T-Ring besteht aus den Proteinen MotX und MotY (Zhu *et al.* 2017), die den Stator Komplex MotAB stabilisieren (Terashima *et al.* 2006). Der Flagellenmotor von *Vibrio alginolyticus* besitzt TH-Ringe und kann eine maximale Geschwindigkeit von 1700 Umdrehungen pro Sekunde generieren (Magariyama *et al.* 1994). Im Vergleich besitzen Flagellenmotoren von z. B. *Escherichia coli*, die keine TH-Ringe aufweisen, eine maximale Rotationsgeschwindigkeit von 270 Umdrehungen pro Sekunde (Kudo *et al.* 1990). Eine wesentlich höhere Rotationsgeschwindigkeit können Flagellenmotoren mit TH-Ringen aufbauen (Terashima *et al.* 2017).

Der Rotor und Stator im Flagellenmotor sind variabel in der Struktur als auch Stöchiometrie (Nord und Pedaci 2020). Bei einem hohen Rotationswiderstand werden mehr Statoreinheiten an den Motor rekrutiert (Lele *et al.* 2013; Nord und Pedaci 2020). Nicht nur bei den Statoren ist ein Austausch zu beobachten, sondern auch bei den C-Ring Proteinen FliM und FliN (Delalez *et al.* 2010; Nord und Pedaci 2020). Die Dynamik des FliMN-Austauschs hängt von der Drehrichtung des Motors ab (Lele *et al.* 2012; Nord und Pedaci 2020). Die genaue Anzahl von FliMN-Einheiten ist bisher unklar. Bisherige Analysen zeigen aber, dass immer mehr Kopien bei einer Rotation im Uhrzeigersinn als gegen den Uhrzeigersinn vorhanden sind (Lele *et al.* 2012; Armitage und Berry 2020). Die dritte C-Ring Komponente FliG zeigt dagegen keinen Austausch der Proteine und bildet sozusagen einen festen inneren Kern mit den wechselnden äußeren Komponenten FliMN. Der Austausch von FliM und FliN findet vermutlich in einer Stöchiometrie von 1:3 statt (Armitage und Berry 2020). Die Dissoziation der FliMN₃-Untereinheiten wird durch die Bindung der phosphorylierten Chemotaxiskomponente CheY induziert und die Rotationsrichtung des Flagellenmotors wechselt (Yuan und Berg 2013; Nord und Pedaci 2020). Das Chemotaxissystem kann Umwelteinflüsse wahrnehmen und reguliert daraufhin die Motorfunktion der Flagelle (Sourjik und Wingreen 2012).

3.2.1 Assemblierung eines Flagellums

Der erste Schritt bei dem Aufbau eines Flagellums ist die Bestimmung des Assemblierungsortes. Die Lokalisierung eines Flagellums kann entweder zufällig durch Diffusion oder mit Hilfe von *landmark* Proteinen erfolgen (Schuhmacher *et al.* 2015b). In *V. cholerae* ist eines der ersten Proteine am Assemblierungsort das MS-Ring Protein FliF, das von dem *landmark* Protein *signal recognition particle* (SRP)-ähnliche GTPase FliH an den Zellpol rekrutiert wird (Green *et al.* 2009; Pandza *et al.* 2000). Wohingegen bei dem peritrich flagellierten *E. coli* zuerst die Oligomerisierung des σ^{70} Proteins FliA eingeleitet und anschließend FliF rekrutiert wird (Li und Sourjik 2011; Morimoto *et al.* 2014). Der MS-Ring dient als Gerüst für FliG, FliM und FliN, die den C-Ring bilden und gleichzeitig wird auch das σ^{70} aufgebaut.

Die Membrankomponenten des σ^{70} sowie die der L- und P-Ringe werden mit Hilfe des Sec-Systems über die Zytoplasmamembran sekretiert (Chevance und Hughes 2008). Die zytoplasmatischen membranassoziierten Teile und der Stab bilden zusammen eine Pore, die durch die gesamte Zellhülle reicht. Sie ermöglicht die Sekretion und Zusammenbau der FlgE-Einheiten zum Haken sowie weiteren hakenassoziierten Komponenten (Cohen und Hughes 2014; Diepold und Armitage 2015). Die Länge des flexibel gebogenen Hakens wird von FliK kontrolliert (Hirano *et al.* 1994; Chevance und Hughes 2008). Nach Erreichen der Hakenlänge von ca. 55 nm ist das σ^{70} Protein FliB bei der Umschaltung der Spezifität der Sekretionskomponenten zuständig (Williams *et al.* 1996; Kutsukake *et al.* 1994).

Ebenso wird bei bestimmter Hakenlänge die Hakenkappe FlgD abgeworfen und durch die Verbindungsproteine FlgK und FlgL ersetzt. FlgKL verbinden den flexiblen Haken und die starre Filamentstruktur (Homma *et al.* 1990; Chevance und Hughes 2008). Die Flagellinmonomere binden an das Flagellinspezifische Chaperon und der Export erfolgt über das FT3SS (Auvray *et al.* 2001). Mit Hilfe des distal liegenden Filamentkappenproteins FliD wird die Polymerisation der Flagelline an der Spitze ermöglicht (Ikeda *et al.* 1985).

Einige Flagellenstrukturen wie der MS-Ring, C-Ring, Haken sowie das Filament sind zur Selbstassemblierung fähig (Macnab 2004). Allerdings muss bei so einem großen Proteinkomplex die Assemblierung, als auch die Genexpression reguliert sein, um einen sequenziellen und korrekten Aufbau zu gewährleisten. Für die Produktion von Flagellenkomponenten verbraucht *E. coli* in etwa 2 % der für die Biosynthese bereitgestellten Zellenergie (Martínez-García *et al.* 2014).

3.2.2 Transkriptionelle hierarchische Regulierung

Bei polar flagellierten Bakterien sind in etwa 60 Gene in der Produktion eines funktionalen Flagellums involviert (Bouteiller *et al.* 2021). Die Anzahl der einzelnen Flagellenproteine variiert von wenigen bis zu mehreren zehntausend Exemplaren (Morimoto und Minamino 2021). Um eine korrekte Assemblierung des Flagellums gewährleisten zu können, muss eine strenge Regulation der Transkription als auch des Zusammenbaus vorliegen. Die Regulation der Transkription ist in einer Hierarchie organisiert, dass die Flagellenkomponenten erst dann produziert werden, wenn die vorangegangene Zwischenstufe abgeschlossen ist (McCarter 2006). Die Gene, die den Aufbau und die Funktion der Flagelle gewährleisten, sind in mehreren Operons angeordnet. Die transkriptionelle hierarchische Regulation zur Flagellenassemblierung ist bei *E. coli* und *Salmonella typhimurium* am besten untersucht (McCarter 2006).

Die meisten Bakterien mit lateralen/peritrichen Flagellen wie *E. coli* und *S. typhimurium* regulieren ihre Flagellengene über eine dreistufige Hierarchie, die auf verschiedenen Promotoren und Regulatoren beruht (Bouteiller *et al.* 2021). Die Gene der Klasse I sind die Flagellenhauptregulatoren *flhDC*. Die Expression von *flhDC* ist abhängig von dem *housekeeping*-Faktor σ^{70} sowie einige weitere Transkriptionsregulatoren, die in der ca. 200 bp langen Promotorregion des *flhDC*-Operons eine Bindestelle aufweisen und auf die Transkription bei entsprechenden Umweltreizen Einfluss nehmen. FlhD₄C₂ interagiert mit dem RNA- σ^{70} -Holokomplex und aktiviert als Komplex die Expression der Klasse II Gene (Osterman *et al.* 2015). Die Klasse II Gene codieren strukturelle Komponenten des Basalkörpers, der Ringe, Haken und weitere Regulatoren. Zu den wichtigsten Regulatoren der Klasse II Gene gehören der alternative Sigmafaktor *fliA* (σ^{28}) und der Anti-Sigmafaktor *flgM*. FliA und FlgM liegen solange als inaktiver Komplex im Zytoplasma vor (Sorenson *et al.* 2004; Osterman *et al.* 2015), bis der Haken assembliert ist und der Anti-Sigmafaktor FlgM über das FT3SS exportiert werden kann. Der freie Sigmafaktor FliA aktiviert durch die Bindung der RNA-Polymerase die Expression der Klasse III Gene, die für die späten Bestandteile der Flagelle codieren. Zu diesen Komponenten gehören das Filament, die Statorproteine und Proteine des Chemotaxissystems (Osterman *et al.* 2015; Bouteiller *et al.* 2021). Bei den Klasse II Genen werden weitere Regulatoren FliZ und FliT exprimiert. FliZ aktiviert die FlhDC-abhängige Genexpression der Klasse II Gene und hemmt indirekt den FlhDC-Abbau durch die Protease ClpXP. Als negativer Feedback der FlhDC-abhängigen Transkription dient das Chaperon FliT, das mit FlhD₄C₂ interagiert und die Genexpression reprimiert (Kutsukake *et al.* 1999; Bouteiller *et al.* 2021).

Polar flagellierte Bakterien der γ -Proteobakterien wie die Spezies von *Pseudomonas* und *Vibrio* kontrollieren die Genexpression über eine vierstufige Transkriptionshierarchie (Abb. 2). Bei dieser vierstufigen Regulation wird ein weiterer Kontrollpunkt der Assemblierung nach der Montage des Stabes eingebaut (Dasgupta *et al.* 2003; McCarter 2006). Die Regulatoren der nachfolgenden Transkriptionsstufe werden meist in der vorhergehenden Klasse exprimiert. In der Klasse I werden die RpoN (σ^{54})-

abhängigen Hauptregulatoren FleQ in *Pseudomonas* und sein Homolog *flagellar regulatory protein A* (FlrA) in *Vibrio* produziert. FleQ/FlrA aktivieren die Transkription von den ersten Komponenten des Basalkörpers und weitere Regulatoren (*fleSR/flrBC* und *fliA*). Die Zwei-Komponentensysteme FleSR in *Pseudomonas* und FlrBC in *Vibrio* sind für die Genexpression der Klasse III Gene essenziell. Die zytoplasmatische Sensor kinase FleS/FlrB registriert intrazelluläre Signale, induziert die eigene Phosphorylierung und überträgt das Phosphat an den Response-Regulator FleR/FlrC. Anschließend aktiviert der RpoN-abhängige phosphorylierte Response-Regulator FleR/FlrC die Expression der Klasse III Gene, die für den Basalkörper, Haken und Nebenflagellin codieren. In *V. cholerae* wurde ein FlrA- und RpoN-unabhängiges Membranprotein FlrD identifiziert, das vermutlich mit dem FlrBC-Komplex interagiert, um die Transkription der Gene von den Klassen III und IV zu aktivieren (Moisi *et al.* 2009). Nach Assemblierung des Hakens kann der Anti-Sigmafaktor FlgM sekretiert werden und der Sigmafaktor FliA (σ^{28}) liegt frei im Zytoplasma vor. FliA ist für die Transkription der späten Flagellengene der Klasse IV zuständig. Zu diesen späten Genen gehören die Motorkomponenten und Flagelline (Soutourina und Bertin 2003; Dasgupta *et al.* 2003; Bouteiller *et al.* 2021).

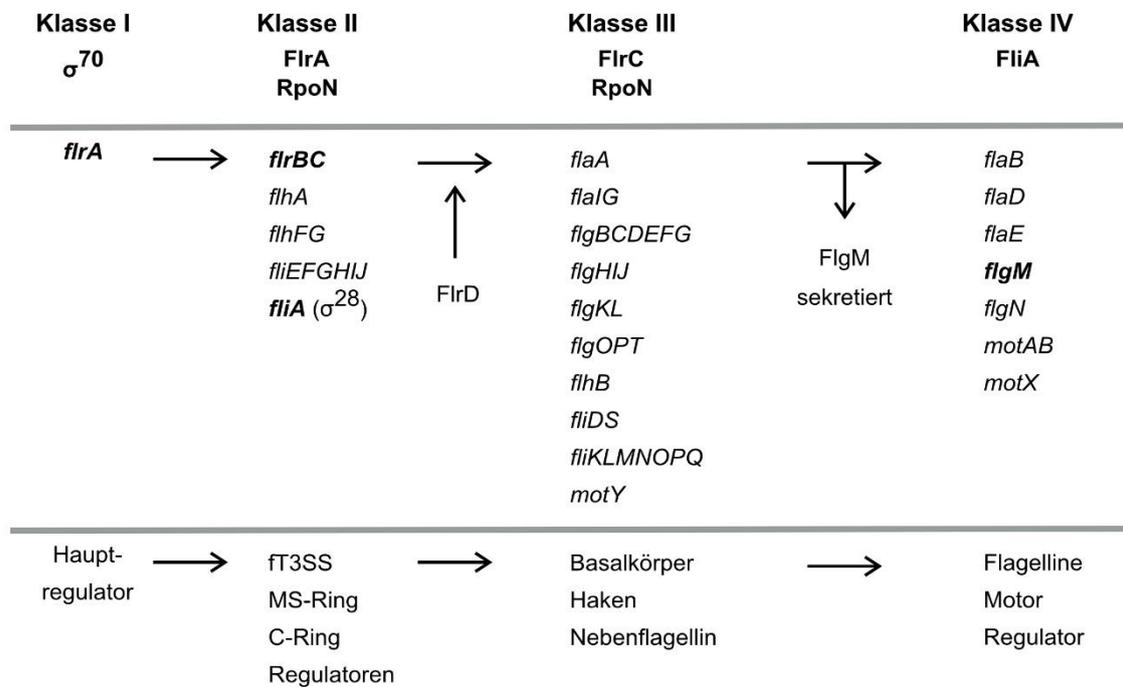


Abb. 2: Vierstufige transkriptionelle Hierarchie der Flagellenassemblierung bei *Vibrio cholerae*. Übersicht der hierarchischen Regulation für die Flagellenassemblierung. Oben sind die entsprechenden Sigma- und Transkriptionsfaktoren für die jeweilige Klasse gekennzeichnet. In der Mitte sind die regulierten Gene und unten die produzierten Flagellenstrukturen aufgelistet. Die Regulatoren FlrA, FlrBC, FliA und FlgM sind fett markiert. Beschreibung der Regulation siehe Text. Die Abbildung ist modifiziert aus McCarter (2006), Moisi *et al.* (2009) und Echazarreta und Klose (2019).

Die transkriptionelle Regulation der Flagellenassemblierung des polar flagellierten *Caulobacter crescentus* unterscheidet sich von den bisher beschriebenen Regulationen. Die Expression der frühen Flagellengene ist abhängig von der Phosphorylierung des Zellzyklusregulators CtrA und somit eng mit der Steuerung des Zellzyklus verbunden. Die transkriptionelle Hierarchie ist bei *C. crescentus* in vier Klassen aufgebaut. CtrA aktiviert die σ^{73} -abhängige Transkription der Klasse II Gene, die für frühe Komponenten des Basalkörpers wie dem MS-Ring sowie fT3SS und weitere Regulatoren (*rpoN*, *flbD*) codieren. Der Regulator FlbD und RpoN (σ^{54}) aktivieren die Transkription der nächsten Flagellengene, die für weitere Bestandteile des Basalkörpers als auch für die Hakenstruktur codieren. Nach Assemblierung des Basalkörpers und Hakens werden von FlbD und RpoN die drei Flagellin-Untereinheiten der Klasse IV exprimiert (Wu und Newton 1997; Soutourina und Bertin 2003).

3.3 Diversität von Flagellierungsmuster

Der Flagellenaufbau ist sehr konserviert, aber das Erscheinungsbild der Flagellen hinsichtlich ihrer genauen Position sowie definierter Anzahl ist charakteristisch für jede Bakterienspezies (Schuhmacher *et al.* 2015b). Im Jahr 2005 waren schon über 30.000 Bakterienarten beschrieben, die in Reinkultur gehalten sowie deren Physiologie untersucht wurden (Dykhuizen 2005). Allerdings sind im Gegensatz zu so vielen Bakterien nur wenige Flagellierungsmuster bekannt. Die Lokalisation von Flagellen kann sich auf den Zellpol bzw. die Zellpole begrenzen oder über die laterale Seite des Zellkörpers verteilen (Abb. 3; Schuhmacher *et al.* 2015b). Die Anzahl der Flagellen variiert von eins bei *V. cholerae*, über 25 bei *Bacillus subtilis* bis hin zu sehr vielen bei schwärmenden Zellen (Shinoda und Okamoto 1977; Schuhmacher *et al.* 2015b). Eine Übersicht der bekannten Flagellierungsmuster und entsprechende Beispiele an Bakterien ist in Abb. 3 dargestellt. Eines der am häufigsten vorkommenden Muster ist die monotriche Flagellierung, bei den Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Shewanella oneidensis*, *Caulobacter crescentus*, aber auch *Vibrio cholerae*, die eine polare Flagelle zählen. Viele polare Flagellen zeigen *Pseudomonas putida* und *Helicobacter pylori* bei einer lophotrichen Flagellierung. *Campylobacter jejuni* weist je eine Flagelle an beiden Zellpolen auf. Laterale Flagellierungsmuster bei den die Geißeln über den ganzen Zellkörper verteilt sind, besitzen z. B. *E. coli* und *Bacillus subtilis* (Schuhmacher *et al.* 2015b). *Rhodobacter sphaeroides* weist eine medial angeordnete Flagelle auf (Armitage und Macnab 1987; Schuhmacher *et al.* 2015b).

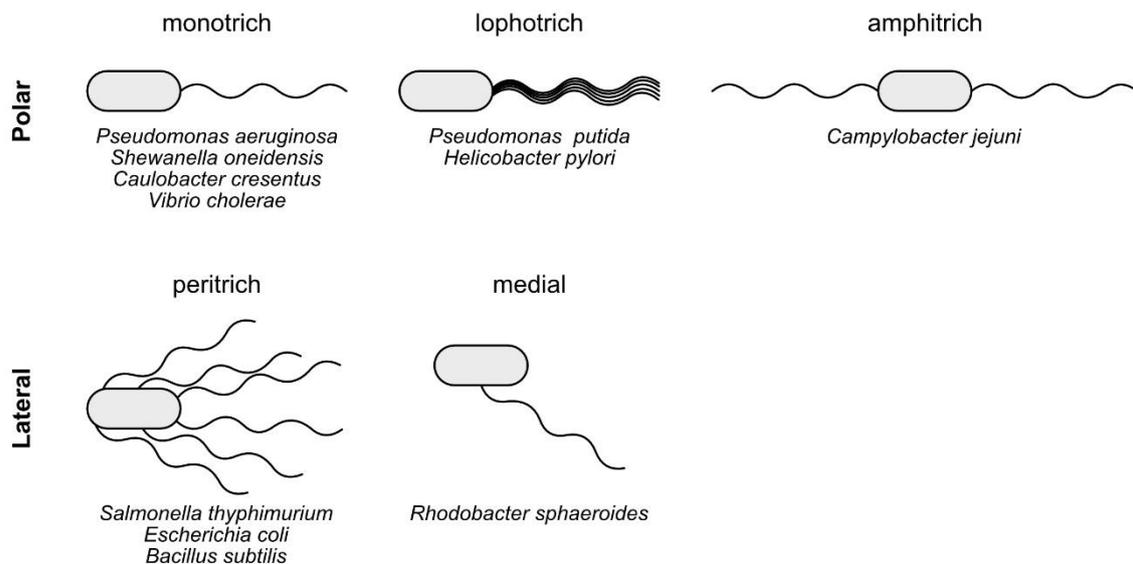


Abb. 3: Bakterienspezies unterscheiden sich in ihren Flagellenmustern. Die polare und laterale Position als auch die Anzahl von einer bis sehr viele Flagellen variiert bei Bakterien. Die polaren Flagellierungen monotrich, lophotrich, amphitrich als auch die lateralen peritrich sowie medial sind mit bekannten Vertretern schematisch dargestellt.

Einige Bakterienspezies, wie *Vibrio*, *Aeromonas*, *Rhodospirillum* besitzen zwei unabhängige Gencluster, die jeweils für ein polares oder laterales Flagellensystem codieren. Die Ausbildung von polaren oder lateralen Flagellen sind eine Anpassung an die entsprechenden Umweltbedingungen (McCarter 2004; Schuhmacher *et al.* 2015b). Polare Flagellensysteme ermöglichen ein besonders schnelles Schwimmen. Dagegen unterstützen laterale Flagellen das Schwimmen in viskosen Umgebungen als auch das Oberflächen-assoziierte Schwärmen (McCarter 2001; McCarter 2004).

3.4 Regulation der Flagellierungsmuster

Die Gram-negativen Bakterien *E. coli* und *S. typhimurium* sind peritrich flagelliert und besitzen fünf bis sechs Flagellen (Leifson 1960). Die Anzahl an Flagellen sind bei einigen Bakterien abhängig von den Umgebungsbedingungen und Zellzyklus, da nach Oberflächenkontakt eine erhöhte Anzahl an Flagellen zum Schwärmen produziert werden (Schuhmacher *et al.* 2015b; Harshey und Matsuyama 1994). Diese Oberflächen-assoziierte Produktion von Flagellen wird allerdings nicht bei *Salmonella* beobachtet (Partridge und Harshey 2013; Schuhmacher *et al.* 2015b). Die Positionierung der Flagellen kann über *landmark*-Proteine gesteuert werden. Bei *E. coli* und *S. typhimurium* wurden bisher keine *landmark*-Proteine identifiziert (Schuhmacher *et al.* 2015b). Allerdings sind bei einigen peritrich flagellierten Bakterien *landmark*-Proteine bekannt. Das gram-positive Bakterium *B. subtilis* besitzt ca. 25 Flagellen, die um den Zellkörper verteilt sind, aber an den Zellpolen nicht vorhanden sind. Die Anordnung der Flagellen ist nicht zufällig, sondern ist in einem gitterartigen Muster angeordnet. Die Positionen sowie Anzahl der Basalkörper werden durch die *signal-recognition-particle* (SRP)-ähnliche GTPase FlhF sowie MinD-ähnliche ATPase FlhG reguliert (Guttenplan *et al.* 2013). Die Deletion von *flhF* in *B. subtilis* führt zu einer vermehrten Flagellenbildung an den Zellpolen (Guttenplan *et al.* 2013; Mukherjee und Kearns 2014). Dagegen ist bei einer Deletion von *flhG* eine Reduzierung an verteilten Basalkörpern zu beobachten, die aber an den Positionen viele Flagellen, also sozusagen Flagellenbüschel, ausbilden (Guttenplan *et al.* 2013; Schuhmacher *et al.* 2015b). Aber auch bei vielen polar flagellierten Bakterien spielen die zwei Regulatoren FlhF und FlhG eine wichtige Rolle bei der Lokalisation und Anzahl von Flagellen (Schuhmacher *et al.* 2015b).

Das ϵ -Proteobakterium *H. pylori* besitzt zwei bis sechs Flagellen an einem Zellpol. Die Deletion von *ylxH* (*flhG* Homolog) führt zum Verlust der Flagellen (van Amsterdam und van der Ende 2004). Dagegen wurde FlhF mit dem FT3SS-Protein FlhA als funktionelle Äquivalente zu Hauptregulatoren in *H. pylori* charakterisiert und zeigt bei deren Deletion eine Reduktion der Expression von Flagellengenen (Niehus *et al.* 2004; Schuhmacher *et al.* 2015b).

Das α -Proteobakterium *C. crescentus* ist ein gut untersuchter Modellorganismus für die Regulation des Zellzyklus, da es eine einzigartige Lebensweise mit einer gestielten Zelle und einer polar flagellierten Tochterzelle aufweist. Einige polare *landmark*-Proteine sind in *C. crescentus* identifiziert, die auch bei der Flagellenassemblierung involviert sind. Eines dieser Proteine ist das Transmembranprotein TipN, das die Position der Flagelle durch die Markierung des neuen Zellpols signalisiert (Lam *et al.* 2006; Schuhmacher *et al.* 2015b). TipN rekrutiert ein weiteres Transmembranprotein TipF, das zyklisches dimeres Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) binden kann, zum Zellpol. C-di-GMP ist ein wichtiger *second messenger*, der viele molekulare Prozesse in der Zelle wie Biofilmbildung, Motilität, Zellsignalisierung und Differenzierung reguliert (Hengge 2009; Soutourina und Bertin 2003; Echazarreta und Klose 2019). In *C. crescentus* variiert der c-di-GMP-Level während dem Zellzyklus und steigt in der Zellteilung beim Übergang zur S-Phase an. Die Bindung von c-di-GMP an TipF führt zur Stabilisierung und ermöglicht die polare Lokalisierung, an dem bereits TipN vorhanden ist. TipF rekrutiert frühe Komponenten des Basalkörpers an den Zellpol (Davis *et al.* 2013; Schuhmacher *et al.* 2015b). Dieses Tip-System von *C. crescentus* zeigt eine räumliche und zeitliche Kontrolle der Flagellenassemblierung zum Zellzyklus (Schuhmacher *et al.* 2015b).

3.4.1 Einfluss der Regulatoren FlhF und FlhG auf polar flagellierte Bakterien

Die Regulatoren FlhF und FlhG sind für einige Bakterienspezies essenziell, um die Flagellierung hinsichtlich der Lokalisation sowie Anzahl der Flagellen korrekt aufzubauen (Schuhmacher *et al.* 2015b). Die bei vielen Bakterienspezies konservierten Flagellenregulatoren *flhFG* werden immer als eine Transkriptionseinheit codiert (Bange *et al.* 2011; Schuhmacher *et al.* 2015b). Das amphitriche Flagellierungsmuster von *C. jejuni* ist abhängig von FlhF und FlhG. Eine Deletion von *flhF* führt meist

zur Abwesenheit der Flagellen oder zur Delokalisation (Balaban *et al.* 2009). FlhG reguliert die Anzahl der Flagellen, allerdings spielt hierbei die ATPase-Domäne von FlhG wie bei den meisten anderen Bakterienspezies keine Rolle (Gulbranson *et al.* 2016). *C. jejuni* fehlt das Min-System, das bei der Zellteilung bzw. Positionierung des FtsZ-Rings, eine wichtige Rolle spielt (siehe Kapitel 3.4.3). Diese Funktion kann bei *C. jejuni* FlhG übernehmen. FlhG unterdrückt die Einleitung der Zellteilung durch FtsZ und verhindert die Zellteilung an den Zellpolen zusammen mit Komponenten des Motors und C-Rings (Balaban und Hendrixson 2011). Somit übernimmt FlhG eine wichtige Funktion in der Regulation der Flagellenanzahl sowie bei der Zellteilung in *C. jejuni*.

In γ -Proteobakterien wie *Pseudomonas*, *Vibrio* und *Shewanella* findet die Assemblierung der Flagelle immer am alten Zellpol statt (Arroyo-Pérez und Ringgaard 2021). Bei diesen monopolar flagellierten Bakterien sind die Regulatoren FlhF und FlhG an der räumlichen und zeitlichen Regulation der Flagellenassemblierung beteiligt. Die Deletion von *flhG* führt zu einer Hyperflagellierung (Schuhmacher *et al.* 2015b; Schuhmacher *et al.* 2015a; Kusumoto *et al.* 2006; Dasgupta *et al.* 2000). Dagegen resultiert die Deletion von *flhF* bei Spezies von *Pseudomonas* zu einer Delokalisation der Flagelle (Pandza *et al.* 2000; Arroyo-Pérez und Ringgaard 2021). Bei *C. jejuni*, *S. putrefaciens* und *Vibrio* sp. sind die meisten Zellen nicht flagelliert oder bilden eine delokalisierte Flagelle in der Abwesenheit von FlhF aus (Arroyo-Pérez und Ringgaard 2021; Rossmann *et al.* 2015; Balaban *et al.* 2009; Correa *et al.* 2005). Bei *V. alginolyticus* und *P. putida* generiert eine Überproduktion von FlhF eine Hyperflagellierung, sowie bei vermehrter Produktion von FlhG sind die Zellen nicht mehr in der Lage eine Flagelle zu assemblieren (Kojima *et al.* 2020; Pandza *et al.* 2000; Kusumoto *et al.* 2008). Die meisten Zellen von *V. alginolyticus* sind ebenfalls nicht in der Lage ein Flagellum zu assemblieren oder wenige Zellen produzieren viele laterale Flagellen, wenn beide Regulatoren FlhFG abwesend sind (Kusumoto *et al.* 2008; Kojima *et al.* 2020).

FlhG fungiert als negativer Regulator, der die Flagellenanzahl steuert. Dagegen dient FlhF als positiver Regulator der Flagellensynthese und kontrolliert die Positionierung der Flagelle (Schuhmacher *et al.* 2015b; Kojima *et al.* 2020). Einige Bakterienspezies besitzen die gleichen Faktoren, die das Flagellierungsmuster regulieren, aber das resultierende Muster ist variabel. Die genauen molekularen Mechanismen für die FlhFG-abhängigen Flagellierungsmuster sind bisher noch nicht bekannt (Schuhmacher *et al.* 2015b).

3.4.2 Signal-Recognition-Particle ähnliche GTPase FlhF

FlhF ist eine SRP-ähnliche GTPase und zeigt eine Ähnlichkeit zum Signalsequenzprotein Ffh und dem SRP-Rezeptor FtsY (Schuhmacher *et al.* 2015b). Ffh und FtsY haben eine wichtige Funktion bei der cotranslationalen Insertion von Membranproteinen (Przemyslaw Grudnik *et al.* 2009; Schuhmacher *et al.* 2015b). Die SRP-ähnlichen GTPasen besitzen eine konservierte NG-Domäne (Abb. 4). Die C-terminale G-Domäne besitzt eine GTPase-Aktivität und die N-Domäne ist eine regulatorische Domäne (Bange *et al.* 2007; Bange *et al.* 2011). Die ungefaltete und hauptsächlich basische N-terminale B-Domäne von FlhF zeigt bei Bakterienspezies die größte Varianz in Größe sowie Konservierung und ist vermutlich für die spezifische Funktion bei den unterschiedlichen Bakterienspezies verantwortlich (Bange *et al.* 2007; Kusumoto *et al.* 2006; Schuhmacher *et al.* 2015b). FlhF kann als Monomer oder als GTP-gebundener Homodimer vorliegen. Die GTPase-Aktivität von FlhF kann durch die MinD-ähnliche ATPase FlhG stimuliert werden. Die Hydrolyse des gebundenen GTPs führt zur Dissoziation des FlhF-Dimers (Bange *et al.* 2007; Bange *et al.* 2011; Schuhmacher *et al.* 2015b).

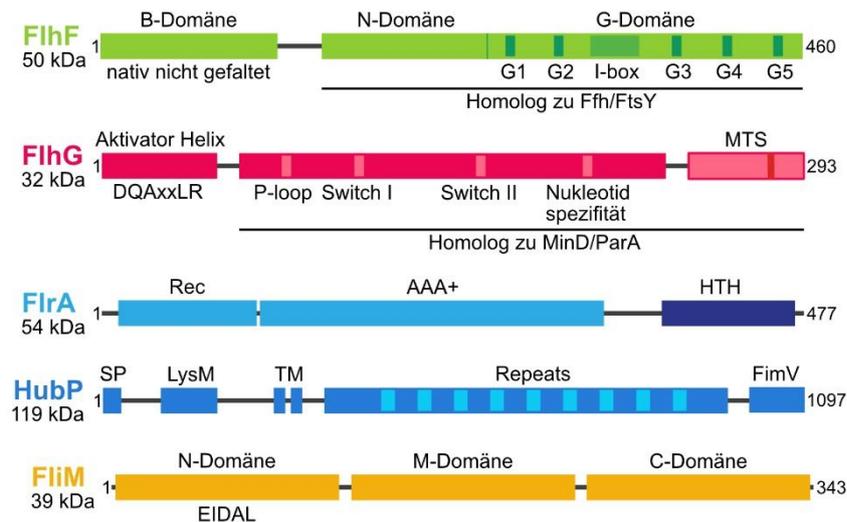


Abb. 4: Übersicht der Domänen von einigen regulatorischen Proteinen. Übersicht der Proteine SRP-ähnliche GTPase FlhF, MinD-ähnliche ATPase FlhG, Flagellenhauptregulator FlrA, *landmark* Protein HubP und das C-Ring Protein FliM. Die entsprechenden Molekulargewichte sowie die Aminosäurelängen der Proteine sind von *Shewanella putrefaciens* angegeben.

3.4.3 MinD-ähnliche ATPase FlhG

Die MinD-ähnliche ATPase FlhG ist in vielen Bakterien für die monopolare (Schuhmacher *et al.* 2015a), lophotriche (van Amsterdam und van der Ende 2004), amphitriche (Balaban und Hendrixson 2011) und peritriche Flagellierung essenziell. FlhG spielt bei der Flagellierung vor allem bei der Anzahl an Flagellen eine wichtige Rolle (Schuhmacher *et al.* 2015b; Guttenplan *et al.* 2013). Neben FlhG in *Vibrio*- und *Shewanella*-Spezies sind noch weitere Namen wie FleN in *Pseudomonas* und YlxH in *B. subtilis* sowie *H. pylori* bekannt (Schuhmacher *et al.* 2015b).

FlhG ist ein Homolog der MinD/ParA-ähnlichen ATPase und besitzt konservierte Regionen (Abb. 4), die an der Bindung von ATP und Magnesium, sowie an der ATP-Hydrolyse beteiligt sind (Schuhmacher *et al.* 2015a; Schwan *et al.* 2020). Dieser konservierte Bereich ist auch für die ATP-abhängige Dimerisierung von FlhG verantwortlich (Abb. 5). Das ATP-gebundene FlhG-Homodimer kann über die C-terminale amphipathische Helix, die auch *membrane-targeting sequence* (MTS) bezeichnet wird, an Lipide bzw. der Zellmembran binden. Die Hydrolyse von ATP lässt FlhG in die Monomere dissoziieren (Schuhmacher *et al.* 2015a).

Für die MinD-ähnliche ATPase FlhG sind bisher einige Interaktionspartner beschrieben. Der N-Terminus von FlhG, der als Aktivator Helix bezeichnet wird (Abb. 4), kann mit FlhF (siehe Kapitel 3.4.2) interagieren. Die Aktivator-Helix mit dem konservierten DQAxLR-Motiv von FlhG stimuliert die GTPase-Aktivität von FlhF, die zur Dissoziation des FlhF-Homodimers führt (Bange *et al.* 2011). Allerdings ist bisher unbekannt zu welchem Zeitpunkt FlhG und FlhF interagieren (Schuhmacher *et al.* 2015b). Ein weiterer Interaktionspartner von FlhG ist das C-Ring Protein FliM (Schuhmacher *et al.* 2015a), das drei Domänen aufweist (Abb. 4). Die C-Domäne von FliM zeigt eine starke Homologie zu dem C-Ring Protein FliN. Für die Interaktion mit dem C-Ring Protein FliG ist die M-Domäne verantwortlich (Lam *et al.* 2013). Das konservierte N-terminale EIDAL-Motiv von FliM ist für die Interaktion mit FlhG essenziell. *In vitro*-Analysen koordiniert FlhG von *Geobacillus thermodenitrificans* vermutlich die Bindung von FliM an FliG in einer ATP- und Lipid-abhängigen Weise (Schuhmacher *et al.* 2015a). In *P. aeruginosa* bindet FleN, das FlhG Homolog, an den Flagellenhauptregulator FleQ (siehe Kapitel 3.4.4), das zu einer reduzierten FleQ-abhängigen Promotoraktivität führt (Dasgupta und Ramphal 2001).

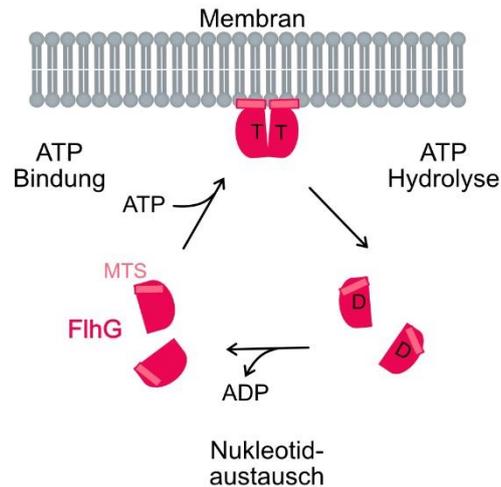


Abb. 5: Modell des ATPase-Mechanismus von FlhG. Die MinD-ähnliche ATPase FlhG kann als Monomer und ATP (T)-gebundener Homodimer vorliegen. Das FlhG-Dimer kann über die *membrane-targeting sequence* (MTS)-Domäne an die Zellmembran binden. Durch die ATP-Hydrolyse dissoziiert FlhG und das ADP (D) kann ausgetauscht werden. Die Abbildung ist modifiziert aus Schuhmacher *et al.* (2015a).

In *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *S. putrefaciens* ist das polare *landmark* Protein HubP für die Rekrutierung von FlhG an den Zellpol verantwortlich (Rossmann *et al.* 2015; Yamaichi *et al.* 2012). Eine direkte Interaktion von FlhG zu HubP wurde in *V. cholerae* gezeigt (Yamaichi *et al.* 2012). HubP spielt nicht nur eine Rolle bei der polaren Rekrutierung von FlhG, sondern in *V. cholerae* auch von ParA (Chromosomensegregation) und ParC (Chemotaxisapparat; Yamaichi *et al.* 2012). In *P. aeruginosa* ist die FimV-Domäne für die polare Lokalisation des Typ-IV Pili sowie eine Adenylatzyklase zur Regulation für die Oberflächen-assoziierte Bewegung *Twitching* verantwortlich (Altinoglu *et al.* 2019). HubP besitzt ein N-terminales Signalpeptid, eine Peptidoglykan-bindende LysM-Domäne, zwei Transmembrandomänen, eine zytoplasmatische Region mit *Repeats*, die aus vielen sauren Aminosäuren bestehen, und einer C-terminalen FimV-Domäne (Abb. 4).

FlhG ist ein strukturelles Homolog von der GTPase MinD (Schuhmacher *et al.* 2015a). MinD ist ein Teil des Min-Systems, das bei der Zellteilung von stäbchenförmigen Bakterien in zwei gleich große Tochterzellen eine wichtige Rolle spielt. Das Min-System in *E. coli* besteht aus den drei Proteinen MinCDE. Durch das oszillierende Min-System von Zellpol zu Zellpol wird die Positionierung des Tubulin-Homologs FtsZ in der Teilungsebene gesteuert (Ramm *et al.* 2019). Der FtsZ-Ring ist an der Koordinierung der Zellteilungsmaschinerie involviert. MinD ist eine ATPase der ParA-Familie und kann über eine MTS-Domäne als ATP-gebundenes Dimer an die Zytoplasmamembran binden. Das Effektorprotein MinC bindet als Dimer an das Membran-gebundene MinD. Das ATPase aktivierende Protein MinE verdrängt MinC und interagiert mit MinD. MinE stimuliert die ATPase-Aktivität von MinD und die ATP-Hydrolyse führt zur Monomerisierung sowie Ablösung von der Membran. Die Oszillation wird durch MinD und MinE angetrieben, aber MinC ist für die korrekte Positionierung des FtsZ-Rings verantwortlich (Ramm *et al.* 2019; Lackner *et al.* 2003; Hu *et al.* 2002). MinC inhibiert die Assemblierung von FtsZ (Hu *et al.* 1999; Ramm *et al.* 2019). Durch die Oszillation entsteht ein MinC Proteingradient mit maximaler Konzentration an den Zellpolen. Die minimale MinC-Konzentration in der Zellmitte ermöglicht dort die Assemblierung des FtsZ-Rings (Ramm *et al.* 2019; Meinhardt und Boer 2001).

3.4.4 FlrA – Hauptregulator für die Transkription der Flagellengene

Einer der wichtigsten Schritte zur Regulation der Genexpression ist die Initiation der Transkription. Die Transkription kann u. a. durch Sigmafaktoren, die eine Untereinheit der RNA-Polymerase bilden, beeinflusst werden. Der Sigmafaktor RpoN (σ^{54}) ist weit verbreitet und ist an der Genexpression von

vielen physiologischen Prozessen beteiligt. Das Holoenzym aus RNA-Polymerase und RpoN erkennt die -12 und -24 Elemente des Promotors und binden in einem inaktiven Zustand. Dieser wird auch als geschlossener Zustand bezeichnet, bei dem die DNA als Doppelstrang vorliegt. Für die Aktivierung ist ein Aktivator oder Enhancer-Bindeprotein (EBP) nötig. Die EBPs setzen sich zu aktiven Hexameren zusammen, die Adenosintriphosphat (ATP) hydrolysieren und mit dem Holoenzym interagieren. Dies führt zu einigen Konformationsänderungen wie der Bildung der Transkriptionsblase und die Initiierung der Transkription kann erfolgen (Mejía-Almonte *et al.* 2020; Chanchal *et al.* 2021).

Die polar flagellierten γ -Proteobakterien *P. aeruginosa* und *V. cholerae* besitzen den Flagellenhauptregulator FleQ bzw. das Homolog FlrA. FlrA fungiert als EBP und gehört zur NtrC-Familie der σ^{54} -assoziierten Transkriptionsfaktoren. FlrA ist an der Regulation der Transkription von Genen, die am Flagellenaufbau, als auch an der Biofilmbildung beteiligt (Prouty *et al.* 2001; Hickman und Harwood 2008; Soutourina und Bertin 2003). Die Funktion, Aktivität sowie das DNA-Bindemotiv von FlrA wurde hauptsächlich bei FleQ in *P. aeruginosa* untersucht. In *P. aeruginosa* spielt FleQ eine wichtige Rolle bei der Vermittlung zwischen planktonischer und biofilmbasierter Lebensweise (Baraquet und Harwood 2016; Chanchal *et al.* 2021).

Der Hauptregulator FlrA besteht aus drei Domänen, der N-terminalen Empfänger (Rec)-, AAA-ähnlichen ATPase- und C-terminalen Helix-Turn-Helix (HTH)-Domäne (Abb. 4). Die HTH-Domäne ermöglicht FlrA/FleQ die Bindung an die DNA, um die Transkription aktivieren zu können (Dasgupta und Ramphal 2001). Die Rec-Domäne ist an der Vermittlung der Dimerisierung beteiligt. Andere EBPs aktivieren die Assemblierung zu einem aktiven Hexamer über die Phosphorylierung der Rec-Domäne. Allerdings weisen FlrA/FleQ nicht diese konservierten Asparaginsäurereste zur Phosphorylierung auf (Su *et al.* 2015). Die AAA+ ATPase-ähnliche Domäne dient der ATP-Hydrolyse und ist an der Interaktion zur Hexamerisierung beteiligt (Matsuyama *et al.* 2016). Zudem ist die ATPase-Domäne die Bindestelle von c-di-GMP (Su *et al.* 2015). Die Bindung von c-di-GMP an die ATPase-Domäne stört die FlrA-Bindung an die Promotoren der Klasse II Flagellengene und die Aktivierung der Genexpression kann nicht erfolgen. Hohe c-di-GMP Level fördern den biofilmbasierten Lebensstil (Srivastava *et al.* 2013; Echazarreta und Klose 2019). Nicht nur c-di-GMP zeigt einen Einfluss auf FlrA, sondern auch die MinD-ähnliche ATPase FleN/FlhG. In *P. aeruginosa* ist die ATPase-Aktivität von FleQ/FlrA in der Anwesenheit von c-di-GMP und/oder FleN/FlhG inhibiert (Baraquet und Harwood 2013). FleN/FlhG ist ein direkter Interaktionspartner von FleQ/FlrA. Diese Interaktion verhindert nicht die Bindung von FleQ an die entsprechenden Promotoren, aber die FleQ-abhängige Expression ist reprimiert (Dasgupta und Ramphal 2001).

Die Regulation des Hauptregulators erfolgt nicht nur über direkte Interaktion mit diesem, sondern auch andere Mechanismen können einen Einfluss nehmen. Die Regulation der Genexpression des Flagellenhauptregulators ist in dem peritrich flagellierten *E. coli* bisher am besten untersucht. Die Regulatoren *flhDC* besitzen einen σ^{70} -abhängigen Promotor, der für eine konstitutive Expression der Gene sorgt (Keseler *et al.* 2011; Osterman *et al.* 2015). Zu einer Aktivierung der Expression von *flhDC* führt die Bindung von u.a. Proteine des Quorum-Sensing-Systems (QseB und QseC; Sperandio *et al.* 2002) und der Komplex aus Katabolismus Rezeptorprotein CRP und cAMP (Crombrugge *et al.* 1984; Osterman *et al.* 2015). Zudem sind einige Repressoren für die *flhDC* Transkription bekannt. Hierzu gehören u. a. der Aktivator von den Anheftungspili Fimbrien (MatA; Lehti *et al.* 2012) und weitere verschiedenste DNA-bindende Proteine wie OmpR (Shin und Park 1995), HdfR (Lee und Park 2013) und DksA/ppGpp (Lemke *et al.* 2009; Osterman *et al.* 2015). Aber nicht nur Transkriptionsregulatoren beeinflussen die *flhDC* Expression, sondern auch eine große Anzahl an kleinen RNAs. Die kleinen nicht-codierenden RNAs ArcZ, OmrAB und OxyS reprimieren die *flhDC* Transkription (Thomason *et al.* 2012; Osterman *et al.* 2015). Neben der Regulation der Transkription, kann auch die Stabilität der Transkripte beeinflusst werden. Das RNA-bindende Protein CsrA verhindert den mRNA-Abbau durch die Bindung des Transkripts und dadurch wird die Expression des *flhDC*-Operons verstärkt (Yakhnin *et al.* 2013;

Osterman *et al.* 2015). Ein weiterer regulatorischer Effekt ist die Proteinstabilität. Die Hitzeschockproteine DnaKJ und GrpE beeinflussen die FlhD₄C₂-Aktivität positiv (Shi *et al.* 1992; Osterman *et al.* 2015). Als letzten Schritt der Regulation kann der Abbau des FlhD₄C₂-Komplexes durch die Protease ClpXP erfolgen (Kitagawa *et al.* 2011).

3.5 Modellorganismus *Shewanella putrefaciens* CN-32

Die gram-negativen Bakterien der Gattung *Shewanella* sind 2-3 µm lange und 0,4-0,7 µm breite Stäbchen (Venkateswaran *et al.* 1999) und gehören zur Klasse der γ-Proteobakterien. *Shewanella* ist ein Modellorganismus für Bioremediation, Metallreduktion und energieerzeugende Biokatalyse. Sie zeichnen sich durch eine große respiratorische Vielfalt aus und sind in der Lage in Abwesenheit von Sauerstoff ein breites Spektrum an organischen und anorganischen terminalen Elektronenakzeptoren zu nutzen (Hau und Gralnick 2007). Zu diesen Komponenten zählen auch toxische Elemente und unlösliche Metalle wie z. B. Eisen, Mangan, Schwefel, Chrom und sogar Plutonium und Uran (Tiedje 2002; Hau und Gralnick 2007; Fredrickson *et al.* 1998; Fredrickson *et al.* 2000; Neilson und Saffarini 1994). Diese Fähigkeiten bieten *Shewanella* die Möglichkeit in unterschiedlichsten Lebensräumen überleben zu können. Die in Meer- und Süßwasser hauptsächlich vorkommenden Bakterien spielen als lebensmittelverderbender Organismus, Symbiont, Epibiont als auch opportunistischer Pathogen eine Rolle (Hau und Gralnick 2007; Holt *et al.* 2005; Haddad *et al.* 1995). In den letzten Jahren wurden die leicht zu kultivierenden und genomisch zu veränderten Bakterien *S. oneidensis* sowie *S. putrefaciens* ebenfalls als Modellorganismen für die Untersuchung der Motilität verwendet (Paulick *et al.* 2015; Bubendorfer *et al.* 2012; Schuhmacher *et al.* 2015a; Kühn *et al.* 2017). Der in dieser Arbeit verwendete Modellorganismus *S. putrefaciens* CN-32 wurde ursprünglich bei Bohrungen aus anaeroben Schiefer-Sandstein-Sedimenten in einer Tiefe von 250 m in der Morrison-Formation im Nordwesten New Mexikos isoliert (Fredrickson *et al.* 1998).

3.5.1 Motilität von *Shewanella*

Shewanella sp. besitzen ein durch Natriumionen angetriebenes polares Flagellum (Abb. 6 A; Venkateswaran *et al.* 1999; Paulick *et al.* 2009). Außerdem besitzt *S. putrefaciens* ein zweites distinktes Flagellensystem, das für die Ausbildung von protonengetriebenen lateralen Flagellen dient (Bubendorfer *et al.* 2012; Paulick *et al.* 2009). Unter bestimmten Bedingungen kann *S. putrefaciens* bis zu fünf laterale Flagellen ausbilden, die die Schwimmfähigkeit in viskosen Medien oder auf Oberflächen verbessern (Bubendorfer *et al.* 2014). Die polaren und lateralen Flagellenkomponenten weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf. Dennoch unterscheiden sich die beiden Flagellensysteme (Bubendorfer *et al.* 2012). Die lateralen Flagellenmotoren interagieren nicht mit der phosphorylierten Chemotaxis-komponente CheY, um auf entsprechende Umwelteinflüsse zu reagieren und die Änderung der Drehrichtung der Flagelle auszuüben. Ebenso sind im lateralen Gencluster die für das monopolare Flagellierungsmuster essenziellen Regulatoren *flhFG* nicht codiert. Außerdem interagiert FlhG auch nur mit dem polaren und nicht lateralem C-Ring Protein FliM. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Regulation des polaren Flagellums und daher wurden bei einigen Experimenten die lateralen Flagelline deletiert. Die Deletion der Flagelline führt zum Verlust der lateralen Filamente, aber die allgemeine Regulation und Funktion des polaren Flagellensystems ist nicht beeinflusst (Bubendorfer *et al.* 2012).

Das polare Flagellengencluster von *S. putrefaciens* CN-32 (Abb. 6 B) codiert insgesamt 57 Gene (Sputcn32_2556 bis Sputcn32_2605), die bei allen *Shewanella* Spezies vorhanden sind. Dieses Gencluster enthält die meisten Struktureinheiten, Regulations- und Assemblierungskomponenten der polaren Flagelle, sowie Teile des Chemotaxissystems. Einige Komponenten des Motors PomAB

(Sputcn32_1278/1279) und MotXY (Sputcn32_0748/1601) sind nicht Teil des polaren Flagellenclusters, sondern sind an anderen Stellen des Chromosoms lokalisiert (Bubendorfer *et al.* 2012).

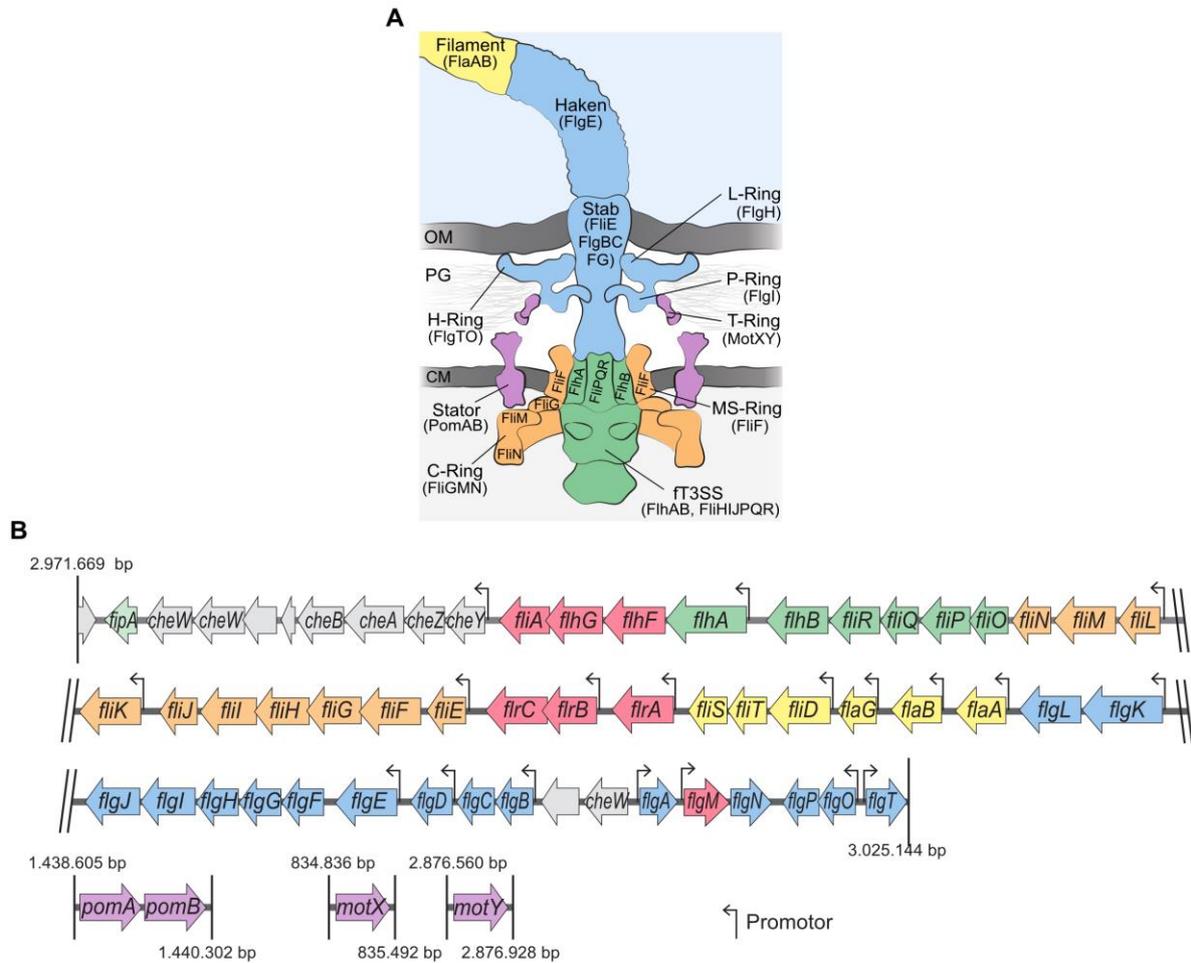


Abb. 6: Polares Flagellum von *S. putrefaciens*. **A** Schematische Darstellung eines Flagellums anhand von Aufnahmen mittels Kryo-Elektronentomographie. Die Abbildung ist modifiziert aus Kühn *et al.* (2018) und Pecina *et al.* (2021). **B** Übersicht des polaren Flagellengclusters von *S. putrefaciens*. Die farbliche Markierung der Gene entspricht den Farben der Bestandteile im Flagellenschema. Die Promotoren sind mit Pfeilen markiert und wurden aus *S. oneidensis* übernommen (Wu *et al.* 2011a). Die Abbildung ist modifiziert aus Bubendorfer *et al.* (2012).

Die transkriptionelle Regulation zur Assemblierung eines polaren Flagellums ist bisher nicht in *S. putrefaciens* analysiert. Bei einer weiteren Spezies innerhalb der gleichen Gattung *S. oneidensis* sind bereits Promotoraktivitäten für verschiedene Flagellenregulatoren untersucht. Für *S. oneidensis* ist wie bei dem am nächsten verwandten Bakterium *Vibrio* (Abb. 2) eine vierstufige transkriptionelle hierarchische Regulation beschrieben (Wu *et al.* 2011a; Shi *et al.* 2014). Der RpoN-abhängige Hauptregulator FlrA aktiviert auch hier die Klasse II Gene, zu denen wie bei *Vibrio* frühe Komponenten des FT3SS, MS-Ring, C-Ring und weitere Regulatoren wie das Zwei-Komponentensystem *flrBC* und *fliA* gehören. Dagegen aktiviert das Zwei-Komponentensystem FlrBC in *S. oneidensis* nicht wie in *V. cholerae* die Flagellengene der Klasse III. In *V. cholerae* ist FlrBC essenziell für die Produktion einer Flagelle und bei *S. oneidensis* wird die Motilität bei Deletion von *flrBC* nicht beeinflusst. Vermutlich bindet der Response-Regulator FlrC an die DNA und führt zu einer Aktivierung bzw. Repression der Genexpression. Fast alle Gene der Klasse III werden wahrscheinlich durch FlrBC reprimiert und nur das Nebenflagellin *flaA* wird durch FlrC aktiviert (Shi *et al.* 2014). Nach der Assemblierung des Hakens wird der Anti-Sigmafaktor FlgM exportiert und FliA aktiviert die späten Flagellengene wie Komponenten des Motors und Filaments. Einige Flagellenbestandteile FlgA, FlrD, MotAB, FlaG und FliDTS sind unabhängig von den Regulatoren FlrA/RpoN und FliA (Shi *et al.* 2014).

Auch in *S. putrefaciens* wie bei anderen monopolar flagellierten Bakterien ist die MinD-ähnliche ATPase FlhG für die Anzahl der Flagellen verantwortlich (Schuhmacher *et al.* 2015a). Bei der Rekrutierung von FlhG an den flagellierten Zellpol ist vermutlich das *landmark* Protein HubP beteiligt (Rossmann *et al.* 2015). Ebenso kann FlhG mit dem C-Ring Protein FliM interagieren und ermöglicht die polare Lokalisierung von FliM (Schuhmacher *et al.* 2015a). FlhG kann die GTPase-Aktivität von FlhF in *S. putrefaciens* stimulieren (Rossmann *et al.* 2015). Jedoch ist der molekulare Mechanismus in Bakterien, die ein FlhFG reguliertes Flagellierungsmuster aufweisen, bisher nicht verstanden.

3.6 Zielsetzung

Flagellen benötigen eine komplexe räumliche und zeitliche Kontrolle, um deren Positionierung, Anzahl und Zusammenbau zu regulieren. Die monopolare Flagellierung ist mit etwa 90 % der beweglichen Bakterien in Meeren eines der am häufigsten vorkommenden Muster (Leifson 1960). Allerdings ist bis heute noch nicht die genaue Regulation zur Assemblierung eines polaren Flagellums in Bakterien geklärt. In dieser Arbeit wurde der molekulare Mechanismus hinsichtlich der numerischen Kontrolle der Flagellen in *S. putrefaciens* CN-32 als allgemeinen Modellorganismus untersucht.

Für die Assemblierung eines Flagellums muss eine strenge transkriptionelle Regulation stattfinden. Bekannte Flagellenregulatoren wurden auf ihren Einfluss auf die Motilität von *S. putrefaciens* untersucht und neben dem Transkriptom auch zum ersten Mal bei einem monopolar flagellierten Bakterium das Proteom der entsprechenden Deletionsmutanten analysiert. Neben den regulierten Flagellenproteinen wurden auch nicht zur Flagelle gehörende Proteine identifiziert und mit Western Blot Analysen verifiziert, die durch die untersuchten Regulatoren eine veränderte Produktion aufweisen. Einige Flagellenbestandteile werden nicht durch die Regulatoren in ihrer Expression verändert. Diese Gene wurden auf bisher unbekannte Promotoren sowie deren Rolle bei der Flagellenassemblierung untersucht.

In vielen Bakterien spielt die MinD-ähnliche ATPase FlhG eine zentrale Rolle bei der numerischen Kontrolle der Flagellen. Bei der polaren Lokalisation von FlhG ist das *landmark* Protein HubP wahrscheinlich beteiligt (Rossmann *et al.* 2015). Ebenso wurde in den Dissertationen von Florian Rossmann und Devid Mrusek sowie in der Veröffentlichung von Schuhmacher *et al.* (2015a) gezeigt, dass FlhG mit dem C-Ring Protein FliM interagiert und so an den Pol transportiert wird. Zudem wurde eine Interaktion von FlhG und FlrA in *S. putrefaciens* nachgewiesen. Die Interaktionen von FlhG und deren Interaktionspartner wurden mit biochemischen Methoden von der AG Bange (Marburg) analysiert. Diese Kenntnisse zur Interaktion wurden genutzt, um mit *in vivo*-Analysen die Anzahl und Position der Flagellen sowie Lokalisation von FlhG zu untersuchen. Darüber hinaus wurde die Auswirkung der FlhG und FlrA Interaktion auf die transkriptionelle Regulation analysiert. Mit entsprechenden Substitutionsmutanten von FlhG als auch der Interaktionspartner wurde ein besseres Verständnis des FlhG-Mechanismus hinsichtlich der Lokalisation und Abfolge von Ereignissen untersucht, die die numerische Kontrolle der Flagellierung erzielt.

Neben der Anzahl an Flagellen muss auch die Initiierung der Transkription von Flagellengenen reguliert sein. In *C. jejuni* übernimmt FlhG die Funktion des für die Zellteilung wichtige Min-System und synchronisiert somit die Zellteilung und Assemblierung der Flagellen (Balaban und Hendrixson 2011). Die gegenseitige Beeinflussung des Min-Systems und FlhG bzw. der Flagellierung wurde mit entsprechenden Deletionsstämmen und Fluoreszenzfusionen hinsichtlich der Motilität und Zellteilung in *S. putrefaciens* analysiert. Jedoch müsste die Produktion eines Flagellums initiiert werden. Dies kann durch einen DNA-bindenden Aktivator oder Repressor an der Promotorregion des Hauptregulators *flrA* stattfinden, der einen Einfluss auf die Transkription nimmt. Dieser Promotorbereich wurde *in vitro* auf DNA-Protein-Interaktionen untersucht und mit entsprechenden Deletionsmutanten auf den Einfluss der Motilität und Flagellierung verifiziert.

4 Ergebnisse

Viele Bakterien besitzen zur Fortbewegung Flagellen, mit deren Hilfe sie sich auf Oberflächen und durch Flüssigkeiten bewegen können. Die Anzahl und Lokalisierung der Flagellen unterscheiden sich bei verschiedenen Spezies und die korrekte Ausbildung des Flagellierungsmusters ist essenziell für deren Motilität. Eine der am häufigsten vorkommende Flagellierung ist die monopolare Begeißelung. Flagellen stellen eine der komplexesten Strukturen in Bakterien dar. Die Assemblierung, sowie Anzahl und Lokalisierung der Flagellen unterliegt einer komplexen Regulation. Die Regulation der korrekten Flagellierung findet sowohl auf transkriptioneller Ebene statt, als auch durch Proteine, wie der SRP-ähnlichen GTPase FlhF und MinD-ähnlichen ATPase FlhG (Schuhmacher *et al.* 2015b).

4.1 Regulation des polaren Flagellenclusters in *S. putrefaciens*

4.1.1 FlrA, RpoN und FliA regulieren die Expression der Flagellengene

Polar flagellierte Bakterien wie *V. cholerae* und *S. oneidensis* organisieren die Transkription der Flagellenkomponenten in vier Stufen. Der RpoN-abhängige Hauptregulator FlrA aktiviert die Transkription der Klasse-II-Gene. Die Klasse-II-Gene codieren für Komponenten des Basalkörpers, flagellaren Typ-III-Sekretionssystems (f₃SS), sowie das Zwei-Komponentensystem FlrBC, alternativer Sigmafaktor FliA (σ^{28}) und die Regulatoren FlhF sowie FlhG für die Flagellenlokalisierung und -anzahl (Prouty *et al.* 2001; McCarter 2001; Shi *et al.* 2014). In *S. oneidensis* werden die FlrA-abhängigen Klasse-III-Gene, die für weitere Komponenten des Basalkörpers, f₃SS, Haken sowie das Nebenflagellin codieren, ebenfalls von dem RpoN-abhängigen Transkriptionsregulator FlrC reguliert (Shi *et al.* 2014). Nach der Assemblierung des Hakens wird der Anti-Sigmafaktor FlgM exportiert und der alternative Sigmafaktor FliA kann die Transkription der späten Flagellenkomponenten, wie dem Filament und Motorproteine aktivieren (Osterman *et al.* 2015).

Frühere Studien von Kühn *et al.* (2018) wiesen darauf hin, dass der Verlust des Zweikomponentensystems FlrBC keine Auswirkung auf die Flagellensynthese in *S. putrefaciens* unter den verwendeten Anzuchtbedingungen hat. Um dies zu bestätigen und die Regulation der monopolaren Flagellierung weiter untersuchen zu können, wurde überprüft, ob die Regulatoren FlrA, FlrC und FliA eine Rolle bei der Transkription der Flagellenkomponenten in *S. putrefaciens* spielen. Hierzu erfolgte eine chromosomale Deletion der Regulatoren *flrA*, *rpoN*, *flrBC* und *fliA* in *S. putrefaciens*. Die Deletionsstämme wurden im Vergleich zum WT mit Hilfe von Weichagarplatten und ihrem Ausbreitungsradius auf das Schwimmverhalten analysiert (Abb. 7 A, B). Zusätzlich erfolgte ein Western Blot zur Untersuchung der Produktion von Flagellinen in der exponentiellen Phase (Abb. 7 C). In der Abwesenheit des Hauptregulators *flrA* sind die Zellen nicht in der Lage zu schwimmen. Im Western Blot wird deutlich, dass die beiden Flagelline FlaA und FlaB nicht produziert werden. Ebenso sind die Flagelline in *S. putrefaciens* $\Delta rpoN$ nicht mittels Western Blot nachweisbar und entsprechen einem *S. putrefaciens* $\Delta flrA$ Phänotyp. In der Abwesenheit des Sigmafaktors RpoN (σ^{54}) kann keine FlrA-abhängige Transkription stattfinden, da FlrA abhängig von RpoN ist (Osterman *et al.* 2015). Der Deletionsstamm des alternativen Sigmafaktors *fliA* zeigt im Vergleich zum WT noch eine geringe Motilität von 33,7%. Trotz der Abwesenheit von *fliA* kann das Nebenflagellin FlaA, aber nicht das Hauptflagellin FlaB produziert werden (Abb. 7 C). *S. putrefaciens* ist in der Lage zu schwimmen, auch wenn das Filament nur aus einem kurzen Stück des Nebenflagellins FlaA besteht (Kühn *et al.* 2018).

Die Deletion des Zwei-Komponentensystems *flrBC* in *S. putrefaciens* weist im Vergleich zum WT kein verändertes Schwimmverhalten (99,5%) auf. Ebenfalls ist keine Veränderung der Flagellinproduktion im Western Blot zu beobachten. Auch bei *S. oneidensis* besitzt die Deletion der Gene *flrBC* keinen Einfluss auf die Flagellenregulation (Shi *et al.* 2014). Allerdings führt die ektopische Produktion des Transkriptionsregulator FlrC des Zwei-Komponentensystems zu einer peritrichen Hyperflagellierung

(Shi *et al.* 2014). Diese über den Zellkörper verteilte Hyperflagellierung durch eine ektopischen Expression von *fliC* mit Hilfe des Plasmids pBTOK FlrC wurde in *S. putrefaciens* nicht beobachtet. Eine Produktion von FlrC führte bei den meisten Zellen zu einer nicht flagellierten Zelle oder eine polare Hyperflagellierung wurde beobachtet (Daten nicht gezeigt).

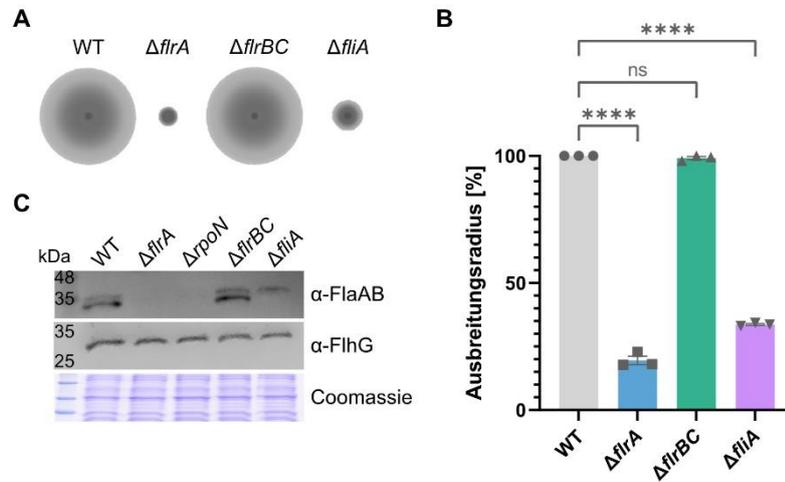


Abb. 7: Einfluss von Regulatoren auf die Motilität von *S. putrefaciens*. **A** Das Schwimmverhalten der Deletionsstämme des Flagellenhauptregulators (*fliA*), Zwei-Komponentensystems (*fliBC*) und Sigmafaktor σ^{28} (*fliA*) wurden im Vergleich zu *S. putrefaciens* WT mit Hilfe von LB-Weichagarplatten untersucht. **B** Quantifizierung des Schwimmverhaltens durch die prozentualen Ausbreitungsradien der untersuchten Deletionsstämme aus A im Vergleich zum WT. Die Experimente wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt. Die Sternchen zeigen an, dass die Unterschiede zum WT signifikant sind (einfaktorielle ANOVA). Die *p*-Werte sind $<0,0001$ für $\Delta flrA$ sowie $\Delta fliA$ und 0,8986 für $\Delta flrBC$ (ns: nicht signifikant). **C** Western Blot Analyse zur Regulation der Flagelline (α -FlaAB) und der MinD-ähnlichen ATPase FlhG (α -FlhG) bei den Deletionsstämmen aus A und des Sigmafaktors σ^{54} (*rpoN*) im Vergleich zum WT. Die untere Abbildung zeigt das Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgel als Ladekontrolle. Das Zwei-Komponentensystem FlrBC weist keinen Einfluss auf die Motilität. Die vollständigen Blots sind im Anhang in Abb. S 1 A gezeigt.

Neben dem Vorhandensein der Flagelline FlaA und FlaB wurde auch die Proteinmenge der MinD-ähnlichen ATPase FlhG in den Deletionsstämmen der Regulatoren *fliA*, *rpoN*, *fliBC* und *fliA* untersucht. Die MinD-ähnliche ATPase FlhG dient als Faktor, welcher die Anzahl der Flagellen reguliert (Schuhmacher *et al.* 2015a) und zeigt eine FlrA-abhängige Transkription in *S. oneidensis* (Gao *et al.* 2018). Die FlhG-Level der untersuchten Deletionsstämmen zeigen keine Veränderung der Proteinmengen (Abb. 7 C). Im Vergleich von *S. putrefaciens* zu bisher beschriebenen monotrich flagellierten Bakterien zeigt sich, dass nicht alle Flagellenproteine wie z. B. FlhG von den Regulatoren FlrA, FlrBC oder FliA reguliert werden. Da von den untersuchten Deletionsstämmen für die Aktivierung der flagellaren Genexpression nur die Sigmafaktoren FlrA, RpoN und FliA eine Rolle spielen, wurden weitere Experimente zur Flagellenregulation nur mit diesen drei Regulatoren durchgeführt.

4.1.2 Einfluss der Flagellenregulatoren auf das Proteom

Bisher wurde der Einfluss von Flagellenregulatoren bei monopolar flagellierten Bakterien nur auf das Transkriptom, aber nicht auf das Proteom untersucht (Syed *et al.* 2009; Niehus *et al.* 2004; Dasgupta *et al.* 2003; Fitzgerald *et al.* 2014). Daher wurden die Deletionsstämme $\Delta flrA$, $\Delta rpoN$ und $\Delta fliA$ im Vergleich zum WT auf ihr Transkriptom und Proteom in der exponentiellen Wachstumsphase in Triplikate analysiert (Abb. 8, Abb. 10). Die Proben zur Analyse der mRNA-Levels wurden von Florian Rossmann vorbereitet und die RNA-Sequenzierung erfolgte durch Ariane Khaledi (AG Susanne Häußler, HZI Braunschweig). Das Proteom der untersuchten Stämme wurde mit Hilfe von Massenspektrometrie (MS) durch die „Core Facility Mass Spectrometry and Proteomics“ von Timo Glatter (MPI Marburg) analysiert. Zur vereinfachten Darstellung der Transkript- und Proteomanalysen wurden die Werte logarithmiert. Somit besitzt ein Gen oder Protein ein Log_2 -Verhältnis von 1 bzw. -1, wenn diese

2-fach höher bzw. niedriger abundant sind. Die Genregulation wurde als signifikant angenommen, wenn der p -Wert kleiner als 0,05 ist (Abb. 8). Bei insgesamt 4098 analysierten Transkripten sind bei *S. putrefaciens* $\Delta flrA$ im Vergleich zum WT 50 Gene höher und 54 Gene niedriger abundant. Die größte Änderung ist bei dem Deletionsstamm $\Delta rpoN$ im Vergleich zum WT mit 263 höherer und 285 niedrigerer Transkriptmenge zu beobachten. Bei der Deletionsmutante des alternativen Sigmafaktors *fliA* sind die mRNA-Mengen von 102 Genen stärker und 80 Genen niedriger abundant (Abb. 8 A, Tab. S 1).

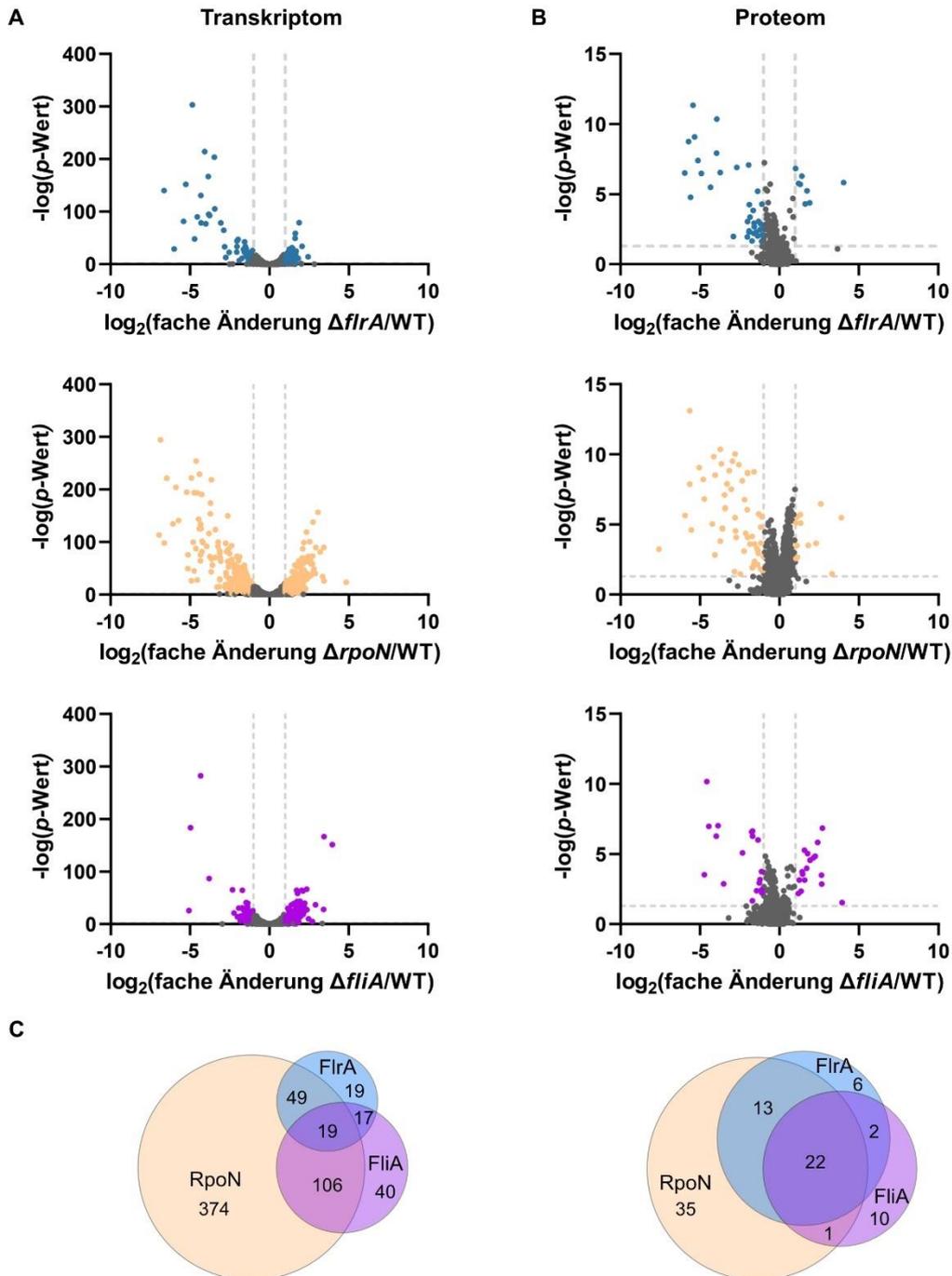


Abb. 8: Regulation des Transkriptoms und Proteoms durch FlrA, RpoN und FliA in *S. putrefaciens*. **A, B** Die Volcano-Plots zeigen die Verteilung aller Gene (**A**) oder Proteine (**B**) hinsichtlich ihrer veränderten Abundanz (\log_2 -fache Änderung) und ihrer Signifikanz ($-\log p$ -Wert). Die farblich gekennzeichneten Datenpunkte sowie gestrichelten Linien zeigen die signifikant veränderten mRNA- bzw. Proteinmengen an. Als Signifiant wurde eine \log_2 -fache Änderung von -1 bzw. 1 sowie ein p -Wert von 0,05 angenommen. Das veränderte Transkriptom und Proteom wurde bei den Deletionsstämmen $\Delta flrA$ (oben, blau), $\Delta rpoN$ (mitte, gelb), $\Delta fliA$ (unten, lila) im Vergleich zum *S. putrefaciens* WT analysiert. **C** Absolute Anzahl der Gene (links) und Proteine (rechts), die in ihrer Abundanz signifikant verändert sind, beim Vergleich von *S. putrefaciens* und der Deletionsstämmen $\Delta flrA$ (FlrA), $\Delta rpoN$ (RpoN) und $\Delta fliA$ (FliA).

Die Analyse des Proteoms mittels MS detektierte nur 2205 Proteine von *S. putrefaciens*. Bei der MS wurden die Änderungen der Proteinmenge als signifikant angenommen, wenn ebenfalls der p -Wert kleiner als 0,05 ist (Abb. 8 B; Tab. S 2). Im Vergleich zur RNA-Sequenzierung sind deutlich weniger Proteine durch die untersuchten Transkriptionsfaktoren reguliert (Abb. 8 C). Die Deletionsmutante $\Delta flrA$ zeigt nur bei 8 Proteinen eine höhere und bei 35 eine niedrigere Abundanz (Abb. 8 B). Bei der Deletionsmutante $\Delta fliA$ sind 17 Proteine stärker und 18 niedriger abundant. Der größte Unterschied zur RNA-Sequenzierung weist die Deletionsmutante $\Delta rpoN$ mit nur einer höheren bzw. niedrigeren Abundanz von 12 und 59 Proteinen auf. Einige Kandidaten sind nur auf mRNA- oder Proteinlevel in der Abundanz verändert und wurden nicht weiter untersucht.

4.1.3 Flagellenregulatoren beeinflussen die *bpfA*-Operon Transkription

Die Transkriptionsfaktoren FlrA, RpoN und FliA zeigen eine Änderung auf Transkript- als auch Proteinlevel bei sieben Genen, die nicht für Flagellenbestandteile codieren (Abb. 9 A). Diese sieben Gene Sputcn32_3591 bis Sputcn32_3597 codieren für das *bpfA*-Operon (Wu *et al.* 2013). Der *biofilm promoting factor A* (BpfA) ist ein wichtiges Zelloberflächenprotein für die Anheftung an Oberflächen sowie Biofilmbildung (Theunissen *et al.* 2010; Cheng *et al.* 2017). Neben dem repetitiven Adhäsins BpfA sind in dem Operon ebenso Komponenten für das entsprechende Typ-I-Sekretionssystem (TISS) wie z. B. AggA (Sputcn32_3594) und AggC (Sputcn32_3592) codiert (Wu *et al.* 2013). Cheng *et al.* (2017) zeigten bereits, dass in *S. putrefaciens* die Transkription des *bpfA*-Operons über den Flagellenhauptregulator FlrA reguliert wird.

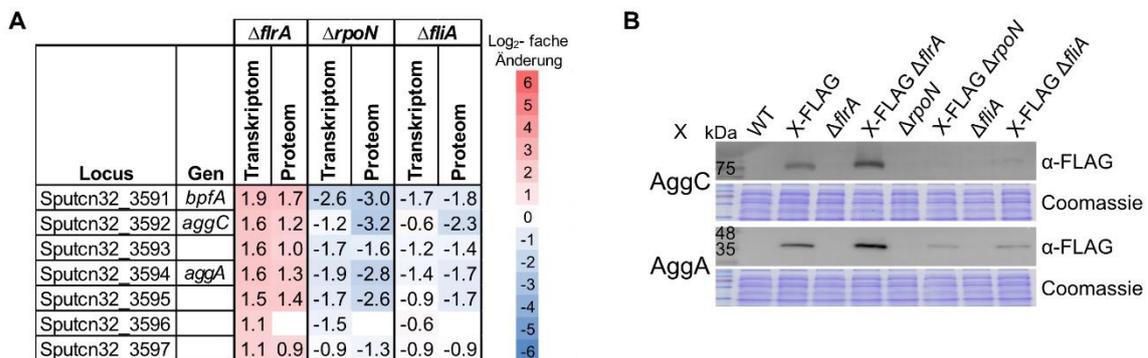


Abb. 9: Die Transkription des *bpfA*-Operons wird von FlrA gehemmt und FliA aktiviert. **A** Analyse der Deletionsstämmen *flrA*, *rpoN* und *fliA* mittels RNA-Sequenzierung (Transkriptom) und Massenspektrometrie (Proteom). Angegeben sind die Log₂-fachen Änderungen der mRNA- bzw. Proteinmenge der Deletionsstämmen im Vergleich zu *S. putrefaciens* WT. Die Werte wurden aus unabhängigen Triplikaten ermittelt. **B** Western Blot Analysen von Komponenten des *bpfA*-Operons AggC-FLAG und AggA-FLAG in *S. putrefaciens* Deletionsstämmen $\Delta flrA$, $\Delta rpoN$ oder $\Delta fliA$. Als Ladekontrolle dient das Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgel. Die vollständigen Blots sind im Anhang Abb. S 1 B gezeigt.

S. putrefaciens $\Delta flrA$ zeigt auf Transkript- und Proteomlevel eine erhöhte Menge an mRNAs bzw. Proteine des *bpfA*-Operons (Abb. 9 A). Bereits Cheng *et al.* (2017) konnten zeigen, dass der flagellare Hauptregulator FlrA die Transkription des *bpfA*-Operons hemmt. Allerdings ist bei den Deletionsstämmen $\Delta rpoN$ und $\Delta fliA$ eine Reduzierung der Transkript- als auch Proteinmengen bei den Bestandteilen des *bpfA*-Operons zu beobachten. Um diese gegenläufige Regulation zu verifizieren, wurde bei *S. putrefaciens* in den entsprechenden Hintergrundstämmen *aggA* und *aggC* chromosomal mit einem 3xFLAG fusioniert und mit einem Western Blot analysiert (Abb. 9 B). Hierbei bestätigt sich die höhere Abundanz von AggAC in der Abwesenheit von *flrA*. Im Gegensatz dazu sind die Proteinmengen von AggAC bei Deletion von *rpoN* und *fliA* verringert. Cheng *et al.* (2017) beschrieben die Bindung von FlrA an den Promotorbereich des *bpfA*-Operons, die die σ^{70} -abhängige Transkription reprimiert. Weitere Bindemotive für Transkriptionsfaktoren sind bisher nicht bekannt. Daher wurden gezielte Analysen für RpoN- und FliA-Bindemotive in dem Promotorbereich des *bpfA*-Operons mittels

der webbasierten Software *Pattern Locator* (Mrázek und Xie 2006) durchgeführt. Allerdings konnten keine Bindemotive für RpoN als auch FliA vorhergesagt werden und es wurden keine weiteren Analysen des *bpfA*-Operons durchgeführt.

4.1.4 Nicht alle Flagellengene werden durch Flagellenregulatoren beeinflusst

Die Transkriptionsregulatoren FlrA, RpoN und FliA zeigen neben einer Regulation des *bpfA*-Operons auch die der Flagellengene. Bei den regulierten Flagellenkomponenten zeigen alle FlrA-abhängigen Genexpressionen auch durch RpoN eine Änderung der mRNA- sowie Proteinmenge. Dies bestätigt, dass der Flagellenhauptregulator FlrA, wie bereits in anderen Organismen beschrieben, auch in *S. putrefaciens* RpoN-abhängig ist. FliA-abhängige Genexpressionen weisen auch in den $\Delta flrA$ und $\Delta rpoN$ Stämmen niedrige Transkript- und Proteinlevel auf. Da bei den Deletionen von *flrA* und *rpoN* keine Flagellengene transkribiert werden, kann keine Flagellenassemblierung stattfinden und somit kein Haken aufgebaut werden. Über den fertig assemblierten Haken wird der Anti-Sigmafaktor FlgM exportiert und der freie Sigmafaktor FliA kann die Genexpression der späten Flagellengene aktivieren (Osterman *et al.* 2015). Die Deletionsmutante $\Delta fliA$ führt zu einer Reduktion der Transkriptmenge von wenigen Bestandteilen des polaren Flagellensystems sowie zu einer Zunahme der mRNA-Level von Genen des lateralen Flagellensystems (Daten nicht gezeigt). Bubendorfer *et al.* (2012) haben diese Kreuzregulation des polaren und lateralen Flagellensystems in *S. putrefaciens* bereits beschrieben.

Zur Verifizierung der RNA-Sequenzierung wurde eine quantitative Real-Time-PCR durchgeführt (Abb. 10 B). *S. putrefaciens* WT und die Stämme $\Delta flrA$, $\Delta rpoN$ und $\Delta fliA$ wurden auf ihre mRNA-Menge der frühen Flagellenkomponenten *fliF* und *fliM* untersucht. Das für den MS-Ring codierende *fliF* zeigt eine starke Reduktion von \log_2 -3,4 bzw. -5,0 der mRNA, wenn die Sigmafaktoren *flrA* oder *rpoN* deletiert wurden. Der späte Flagellenregulator FliA besitzt keinen Einfluss auf die Genexpression von *fliF*. Dagegen zeigt der C-Ring Bestandteil *fliM* keine Änderung der mRNA-Menge bei den Deletionsstämmen der untersuchten Regulatoren im Vergleich zum WT. Dass die Genexpression von *fliF*, aber nicht von *fliM* FlrA- und RpoN-abhängig ist, wurde auch bei den Transkriptom- und Proteomanalysen beobachtet (Abb. 10 A).

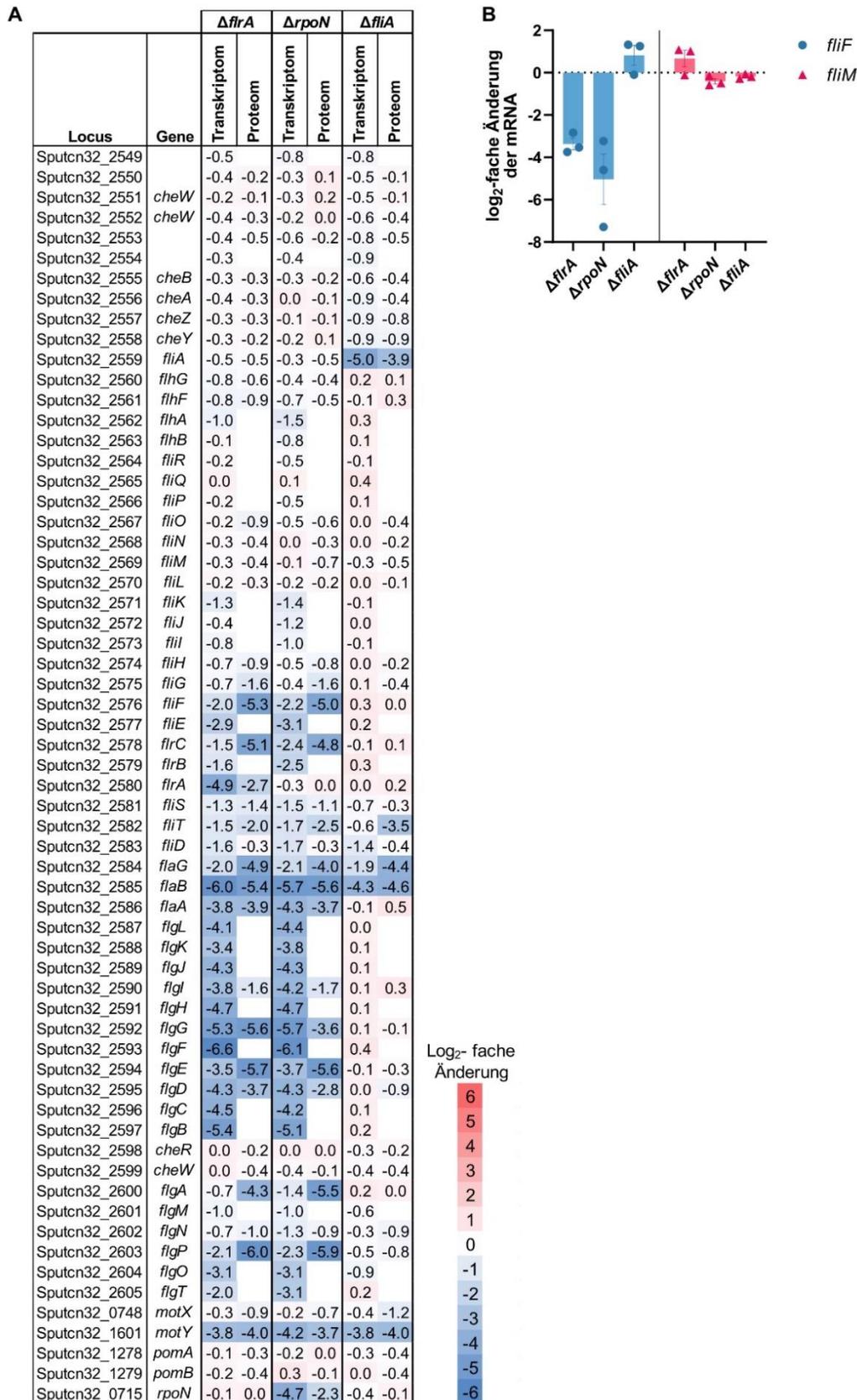


Abb. 10: Regulation der polaren Flagellenkomponenten von *S. putrefaciens*. **A** Analyse der Deletionsstämme *flrA*, *rpoN* und *fliA* mittels RNA-Sequenzierung (Transkriptom) und Massenspektrometrie (Proteom). Angegeben sind die Log₂-fachen Änderungen der mRNA- bzw. Proteinmenge der Deletionsstämme im Vergleich zum *S. putrefaciens* WT. Die Log₂-Werte wurden aus unabhängigen Triplikaten ermittelt. **B** Quantitative Real-Time PCR zur Verifizierung der RNA-Sequenzierung. mRNA-Menge der Flagellengene *fliF* und *fliM* der Deletionsstämme aus A im Vergleich zum WT. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus technischen Duplikaten und biologischen Triplikaten.

Für einige Proteine sind keine Daten der MS-Analyse vorhanden. Bei diesen Proteinen handelt es sich meist um Membranproteine. Es ist nach wie vor schwierig Membranproteine zu untersuchen, da diese in der Lipiddoppelschicht eingelagert sind und bei der Probenvorbereitung für die MS nur schwer aus der Membran gelöst werden. Zur Verifizierung der MS-Daten sowie weitere Analyse der Regulation aller frühen Flagellenbestandteile wurden einige Flagellenproteine (FliE, FliF, FliG, FliH, FliI, FliJ, FliK, FliL, FliM, FliN, FliP, FliQ, FlhA, FlhB, FlhF, FlhG, FliA, FlrB, FlrC, FlgK, FlgM und MotY) mit einem chromosomalen C- oder N-terminalen 3xFLAG fusioniert und mit Hilfe eines Western Blots analysiert (Abb. 11 A). Die Proteine FliO und MotX konnten nicht mit einem FLAG-Anhang im Western Blot detektiert werden. Zum Nachweis von FliO wurde das Protein C-terminal mit sfGFP fusioniert und für MotX war bereits eine geeignete N-terminale mCherry-Fusion etabliert.

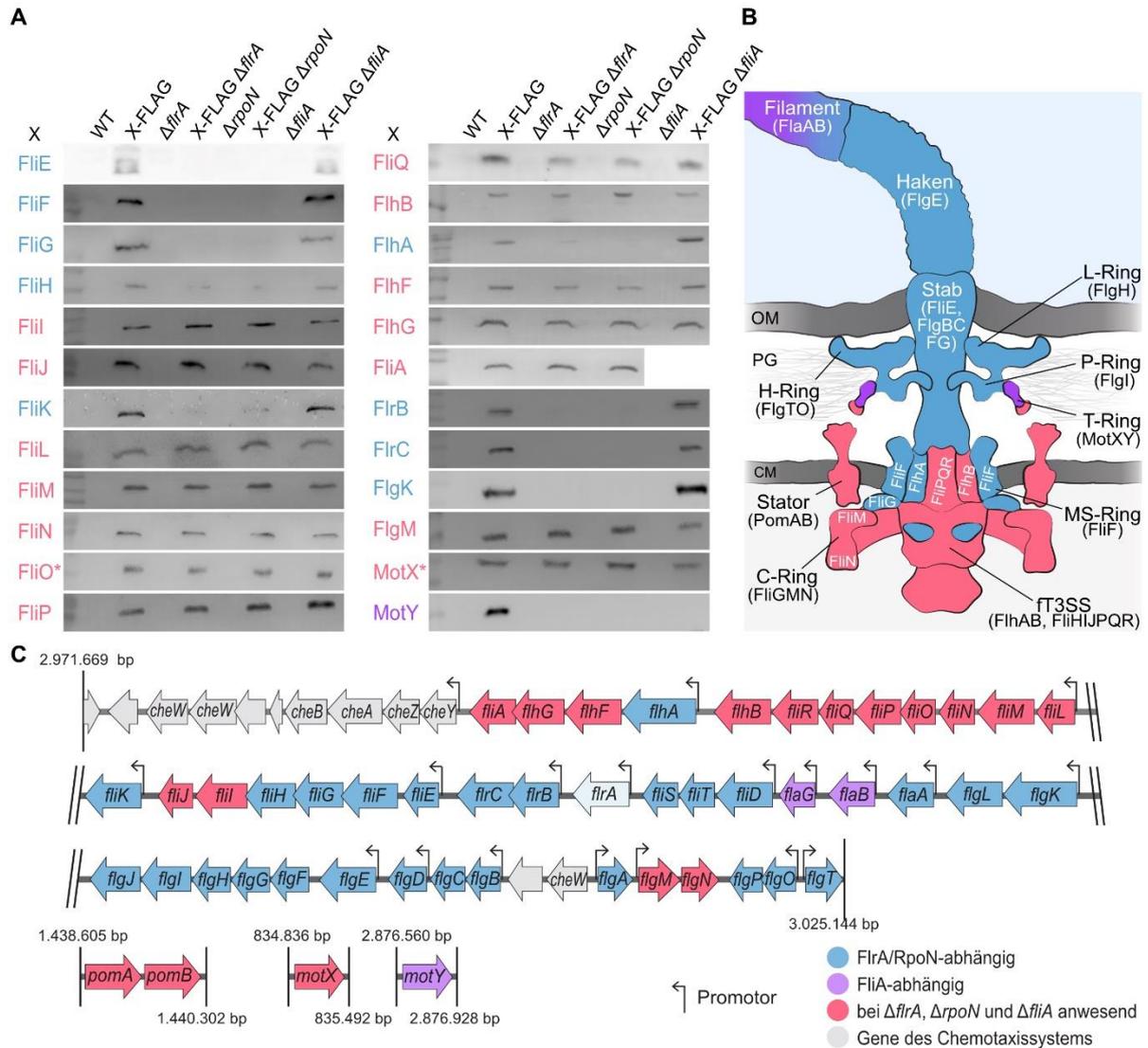


Abb. 11: Einige Flagellenkomponenten sind in der Abwesenheit von Flagellenregulatoren vorhanden. Rot markierte Flagellenkomponenten sind auch in den Deletionsmutanten der Regulatoren *flrA*, *rpoN* und *fliA* präsent. Blau markierte Komponenten sind FlrA- sowie RpoN-abhängig und violett markierte Bestandteile sind FliA-abhängig. **A** Western Blot Analysen einiger Flagellenkomponenten in Deletionsstämmen des flagellaren Hauptregulator *flrA* oder der Sigmafaktoren *rpoN* bzw. *fliA*. Die entsprechenden Proteine wurden chromosomal mit 3xFLAG, sfGFP (FliO) oder mCherry (MotX) fusioniert. Die vollständigen Blots sowie als Ladekontrolle dienenden Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgele sind im Anhang Abb. S 2 und Abb. S 3 gezeigt. **B** Schematische Darstellung der Flagelle (modifiziert nach Pecina *et al.* (2021)). OM, äußere Membran; PG, Peptidoglykan, CM, Zellmembran. **C** Polares Flagellengencluster und abseitsliegende Flagellengene. Die Pfeile repräsentieren die aus *S. oneidensis* bekannten FlrA/RpoN- bzw. FliA-abhängigen Promotoren (Wu *et al.* 2011a). Die Zahlen zeigen die Basenposition im Chromosom.

Die meisten Fusionsproteine wurden stabil produziert und unterstützen die Flagellen-vermittelte Motilität (Abb. S 4). Die mit FLAG fusionierten Proteine FliE, FliK, FliN, FliQ und FlgK sind nicht mehr in der Lage zu schwimmen. Auch die Proteine FliG- und FliP-FLAG zeigten einen negativen Einfluss auf den Ausbreitungsradius. Allerdings ermöglichten die stabilen Produktionen der Flagellenproteine Unterschiede in der Anwesenheit festzustellen. Die Ergebnisse der Western Blots bestätigten die Daten der MS.

Bei den untersuchten Omik-Datensätzen (Abb. 10 A) sowie den Western Blots (Abb. 11 A) ist zu beobachten, dass die Basalkörperbestandteile FliEFG und das σ^{32} -Protein FlhA der frühen Flagellenbestandteile von den Transkriptionsfaktoren FlrA- und RpoN-abhängig sind. Die Omik-Datensätze der weiteren Flagellenbestandteilen wie das Kontrollprotein zur Hakenlänge FliK, das Zwei-Komponentensystem FlrBC sowie weitere Bestandteile des Basalkörpers, Haken und Filament (FliDTS, FlaA, FlgBCDEFGHIJKLOPT) zeigen eine Abhängigkeit von FlrA und RpoN. Die späten Flagellenkomponenten, zu denen die Filamentbestandteile FlaBG sowie die Motorkomponente (MotY) gehören, sind FliA-abhängig. Allerdings sind bei einigen Flagellenbestandteilen weder Änderung der Transkript- noch Proteinmengen durch die untersuchten Flagellenregulatoren zu beobachten. Die zum Basalkörper gehörenden Komponenten FliJLMNOPQR-FlhB, Stator (PomAB), Motorbestandteil (MotX), Anti-Sigmafaktor FlgM, Chaperon FlgN sowie die Flagellenregulatoren FlhFG und FliA werden nicht durch die untersuchten Transkriptionsfaktoren reguliert. In der schematischen Abbildung der Flagelle (Abb. 11 B) wird deutlich, dass die nicht FlrA/RpoN- und FliA-abhängigen Bestandteilen zu den in der frühen Assemblierung wichtigen Flagellenkomponenten gehören.

Die Proteine FliF, FlhA und FliG, welche vermutlich Schlüsselkomponenten für die Assemblierung sein können, wurden weiter untersucht. Dabei wurde analysiert, ob in der Anwesenheit dieser Proteine sowie den nicht regulierten Proteinen eine Initiierung der Flagellenassemblierung stattfinden kann. Dafür wurden die Gene *fliEFG* mit einer anschließenden Ribosomen-Bindestelle (RBS) und *flhA* mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang über die EcoRI Schnittstelle in den Expressionsvektor pBBR1-MCS2 integriert. Mit Hilfe dieses Konstruktes erfolgte eine konstitutive ektopische Expression von *fliEFG* und *flhA*-FLAG in einem *S. putrefaciens* Stamm, bei dem der Hauptregulator *flrA* deletiert wurde. Zudem wurde das C-Ring Protein FliM mit sfGFP fusioniert, um eine mögliche Assemblierung der frühen Komponenten des Basalkörpers in der Abwesenheit von FlrA detektieren zu können. Allerdings wurde keine Lokalisierung von FliM-sfGFP bei Produktion der Schlüsselkomponenten FliEFG-FlhA beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die erfolgreiche Produktion der Komponenten wurde über den 3xFLAG-Anhang bei FlhA mittels Western Blot nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Somit reichen die ektopisch produzierten Flagellenkomponenten FliEFG sowie FlhA und die bei $\Delta flrA$ anwesenden Proteine für eine Initiierung der Flagellenassemblierung nicht aus.

Die Aktivierung der Genexpression einiger Flagellenbestandteile erfolgt nicht über die Transkriptionsfaktoren FlrA/RpoN und FliA. Bei der Betrachtung des polaren Flagellengenclusters (Abb. 11 C) wird deutlich, dass die Operons von *flhA*, *fliE* und *fliK* nicht zur Regulation durch die untersuchten Transkriptionsfaktoren passen. Alle drei Operons zeigen eine FlrA- und RpoN-abhängige Transkription des ersten bzw. der ersten Gene und danach weisen die folgenden Gene keine Änderung bei der Transkript- als auch Proteinmenge auf.

4.1.5 σ^{70} -abhängige Promotoren sorgen für eine konstitutive Genexpression einiger Flagellenbestandteile

Die beobachtete Regulation einiger Flagellenoperons ist nicht erklärbar mit den bisher bekannten Promotoren. Diese veränderte Regulation innerhalb eines Operons könnte durch weitere Promotoren erklärt werden. Die Operonstrukturen (Abb. 11 C) wurden von *S. oneidensis* übernommen (Wu *et al.* 2011a). *S. oneidensis* und *S. putrefaciens* sind nahe verwandte Organismen aus dem Genus *Shewanella* und die Flagellengenorganisation ist stark konserviert (Wu *et al.* 2011a). Zur Identifizierung weiterer Promotoren wurden *in silico*-Analysen nach dem RpoN-Bindemotiv mit Hilfe der webbasierten Software *Pattern Locator* (Mrázek und Xie 2006) bei den *fliEKL*- und *flhA*-Operons durchgeführt. Die konservierte Sequenz des RpoN-Bindemotivs (TGGCA N₆ TTGCTT) wurde bereits für *S. oneidensis* beschrieben (Shao *et al.* 2014). Die Promotoren der frühen Flagellengene *fliE*, *fliK* und *flhA* wurden mittels *in silico*-Analysen auch in *S. putrefaciens* bestätigt (Abb. 12). Allerdings wurden keine weiteren Promotoren in dem Clusterbereich der frühen Flagellengene von *fliE* bis *fliA* vorhergesagt, die die Regulation von nur einzelner Gene erklären könnte. Zudem erfolgte auch eine *in silico*-Analyse nach dem FlrA-Bindemotiv (GTCAAT N₂ ATTGAC), die von dem FleQ Homolog aus *P. aeruginosa* bekannt ist (Baraquet und Harwood 2016). Allerdings wurden keine FlrA-Bindestellen mit Hilfe der webbasierten Software *Pattern Locator* (Mrázek und Xie 2006) bei möglichen Promotorbereichen vorhergesagt und es wurde nur mit den RpoN-Bindestellen weitergearbeitet.

```

fliE-82 GGT TTT AAA CTT GGC CAT TAT TTT GCA TAT TCC TCA TTA TCG ATA TTT TG
fliK-116 AAC TTT CAT GTT GGC ATT TTA TTT GCT TGA TTT CAT ACA CAA CAT TGC TG
flhA-64 AAG TGT CCT CTT GGC GCG ATT TTT GCT TTT CCG CTT TTA TAC GTC AAA GT

RpoN-Bindemotiv TT GGC ANN NNN NTT GCT TNN NNN NNN NNA

```

Abb. 12: Vorhersage von RpoN-Bindemotive. *In silico*-Analyse der *fliEK*- und *flhA*-Operons mittels der webbasierten Software *Pattern Locator*. Die -24 und -12 Region sowie der vermutliche Transkriptionsstart wurden fett markiert. Die tiefgestellte Zahl zeigt die Basenpaare vom Anfang der Sequenz bis zum Translationsstart an.

Um das Vorhandensein von weiteren Promotoren mit weniger konservierten Bindemotiven zu überprüfen, wurde ein transkriptionelles *lux*-Reportersystem verwendet. Hierfür erfolgte zuerst die Erstellung des Kanamycin-resistenten Reporterplasmids pBBR1-MCS2-TT-RBS-*lux*. Die Insertion von zwei Terminatoren (TT) gewährleistet den Abbruch einer vorhandenen Transkription. Nach diesen Terminatoren können über die Schnittstellen XbaI und BamHI die zu untersuchenden DNA-Fragmente kloniert werden. Anschließend folgt zur Sicherstellung der Translation eine Ribosomen-Bindestelle (RBS) und die Reportergene *luxCDABE* aus *Photobacterium luminescens*. Mit diesem Konstrukt kann in *S. putrefaciens* ohne weitere Substratzugabe bzw. Lichtanregung eine Promotoraktivität über das emittieren von Licht bei 490 nm mit Hilfe eines Plattenlesegeräts (Tecan) detektiert werden (Meighen 1993; Craney *et al.* 2007). Zur Analyse auf Promotoraktivitäten wurden 400 bp Fragmente, welche *upstream* der entsprechenden Translationsstarts liegen, in das Reporterkonstrukt inseriert. Anschließend wurden die Reporterkonstrukte in *S. putrefaciens* konjugiert und in biologischen und technischen Triplikaten auf ihre Promotoraktivität untersucht (Abb. 13).

Die Promotorbereiche der Gene *fliAEFGKL* sowie *flhAFG* des untersuchten Flagellenclusters zeigen im Vergleich zur Negativkontrolle (EVC) eine Luciferase-Aktivität (Abb. 13, Tab. S 3, Tab. S 4). Die Gene *fliE*, *fliK* und *flhA* mit der Vorhersage eines RpoN-Bindemotivs (Abb. 12) weisen nur eine Promotoraktivität in der Anwesenheit von FlrA auf. Dies bestätigt die FlrA- bzw. RpoN-abhängige Genexpression. Die weiteren Promotoren der Gene *fliF*, *fliG*, *fliL*, *flhF*, *flhG* und *fliA* besitzen keine Abhängigkeit des Hauptregulators FlrA sowie des Zwei-Komponentensystems FlrBC. Das *fliE*-Operon zeigt eine Veränderung der FlrA-abhängigen Regulation der einzelnen Gene bei *fliI* und *fliH* (Abb. 11). Allerdings weisen die Reporterkonstrukte der Promotoren von *fliH* sowie *fliI* keine Promotoraktivitäten auf (Tab. S 3). Zur Identifizierung der Lokalisierung der Promotoren wurden Trunkierungen mit unterschiedlichen Fragmentlängen der Promotorbereiche untersucht (Tab. S 3, Tab. S 4). Die

Messungen der Luciferase-Aktivität der trunkierten Promotorbereiche erfolgten alle in *S. putrefaciens* WT. Die Vorhersage des RpoN-Bindemotivs von *fliE* sowie *flhA* (Abb. 12), die ca. 80 bzw. 60 bp vor dem Translationsstart liegen, wurden mit Hilfe von Trunkierungen des Promoters bestätigt.

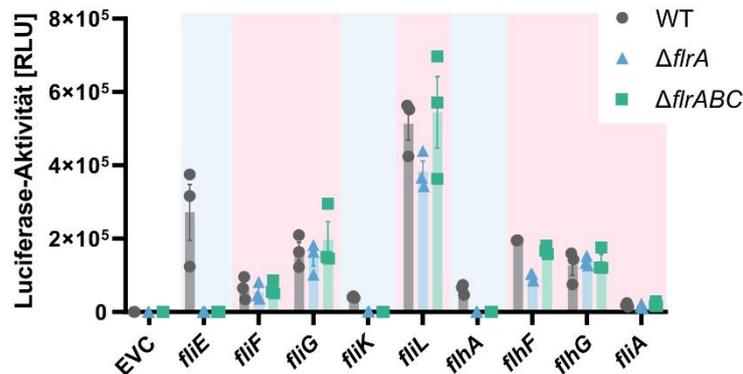


Abb. 13: Einige Promotoren der frühen Flagellenbestandteile sind nicht Abhängig von FlrABC. Untersuchung der transkriptionellen Aktivität von Promotoren mittels Luciferase Reportersystem. Die 400 bzw. 500 bp Fragmente *upstream* des Translationsstarts wurden an die Reportergene *luxCDABE* aus *Photothabdus luminescence* auf dem Plasmid pBBR1-MCS2-TT-RBS-lux fusioniert. Diese Reporterplasmide mit den zu untersuchenden Promotorbereichen wurden in *S. putrefaciens* WT, Deletion des Hauptregulators *fliA* ($\Delta flrA$) sowie Deletion von *fliA* und dem Zwei-Komponentensystem *fliBC* ($\Delta flrABC$) analysiert. Die blau hinterlegten Promotoren sind FlrA-abhängig und die rot hinterlegten sind aktiv in der Abwesenheit von FlrABC. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus biologischen und technischen Triplikaten. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tab. S 3 und Tab. S 4 aufgelistet.

Zur Ermittlung der Transkriptionsstarts von den identifizierten Promotoren erfolgten 5'-RACE-PCRs (Abb. 14 A). Hierfür wurden die Luciferase-Reporterstämme verwendet, die das entsprechende Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT-RBS-*lux* mit dem zu analysierenden Promotorbereich besitzen. Somit konnten bei allen zu untersuchenden Stämmen die gleichen spezifischen Oligonukleotide gegen das *lux*-Operon verwendet werden, um das 5'-Ende der transkribierten mRNA zu identifizieren. Die Transkriptionsstarts konnten bei der Analyse der Sequenzierungen teilweise nicht auf eine Base bestimmt werden und daher wurden bei einigen 5'-Enden zwei Basen als mögliches Transkriptionsstart angegeben. Die Reporterstämme wurden bei allen Promotoren mit dem Deletionshintergrund $\Delta flrA$, sowie bei den Promotoren *fliK* (P_{fliK}) und *flhF* (P_{flhF}) im Wildtyphintergrund durchgeführt. Der Transkriptionsstart des Gens *fliF* liegt laut der 5'-RACE-PCR 160 bp *upstream* des Translationsstarts. Dies bestätigen auch die Trunkierungen des Luciferase-Reportersystems, die eine Promotoraktivität bei *fliF* zwischen 100 und 200 bp *upstream* des Translationsstarts zeigen (Tab. S 3). Auch für die Gene *fliG*, *fliK* und *fliL* konnten die Transkriptionsstarts bei ca. 86, 77 bzw. 91 bp *upstream* des Translationsstarts ermittelt und mit Hilfe des Luciferase-Reportersystems bestätigt werden. Bei den Genen zur Regulation des Flagellenmusters *flhF* und *flhG* wurden je zwei Transkriptionsstarts identifiziert (Abb. 14 A, E).

Mit Hilfe der Transkriptionsstarts können Bindemotive von Transkriptionsfaktoren in den Promotorbereichen identifiziert werden. Für *S. oneidensis* sind einige Sequenzen von Bindemotive der Transkriptionsfaktoren beschrieben (Abb. 14 B-D; Shao *et al.* 2014). Die konservierte Sequenz TGGCA N₆ TTGCTT zur RpoN-Bindung (Abb. 14 B) wurde bei den Genen *fliK*, *fliA* und bei dem Transkriptionsstart 255 bp *upstream* von *flhF* identifiziert. Bei allen anderen identifizierten Promotorbereichen wurde keine stark konservierte Sequenz gefunden (Abb. 14 A). Der *housekeeping* Transkriptionsfaktor σ^{70} bindet in *E. coli* eine konservierte Sequenz (TTGACA N₁₆₋₁₈ TATAAT; Hawley und McClure 1983). Allerdings ist das Bindemotiv des σ^{70} -Faktors in *S. oneidensis* (Abb. 14 D) nicht stark konserviert (Shao *et al.* 2014). Es wurden die Promotorbereiche mit weiteren Bindemotive von Transkriptionsfaktoren u. a. dem stark konservierten Motiv von FliA (TAAAG N₁₂ TGCCCGATA; Abb. 14 C) verglichen (Shao *et al.* 2014), aber keine Übereinstimmung mit den neu identifizierten Promotoren der frühen Flagellengene gefunden. Daher handelt es sich vermutlich bei den Promotoren der Gene

fliF, *fliG*, *fliL*, *flhF* und *flhG* um die sehr gering konservierten σ^{70} -abhängigen *housekeeping* Promotoren. Die neu entdeckten *housekeeping* Promotoren liegen bis auf den *P_{fliL}* alle im offenen Leserahmen des *upstream* liegenden Gens (Abb. 14 E).

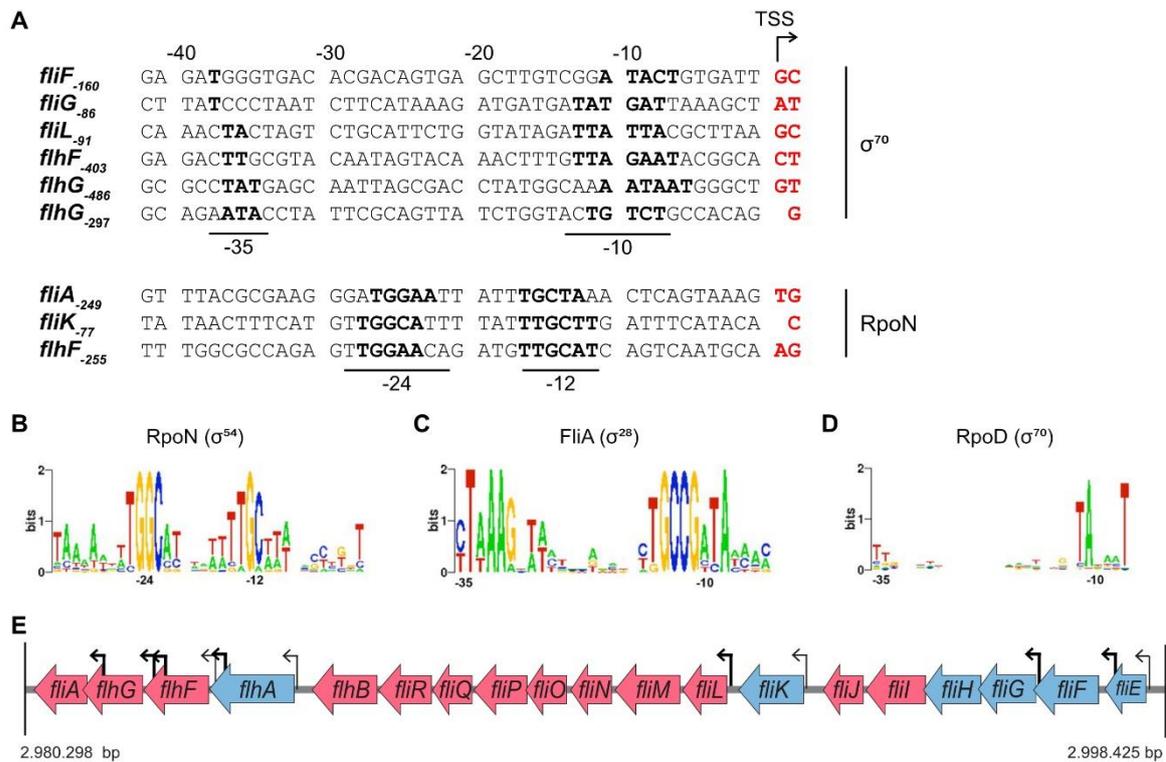


Abb. 14: Nachweis von σ^{70} -abhängige Promotoren. **A** Identifizierung von Transkriptionsstarts (TSS) mittels 5' RACE-PCR. Rot markierte Basen sowie der gebogene Pfeil zeigen den TSS. In der vom TSS *upstream* liegenden DNA-Sequenz wurden die Bindemotive der Transkriptionsfaktoren von σ^{70} (-10 und -35 Region) und RpoN (-12 und -24 Region) fett hervorgehoben. Die Zahlen bei den Genen zeigen die Basenpaare für den Abstand des TSS bis zum Translationsstart an. **B-D** Bindemotive der Transkriptionsfaktoren RpoN (B), FliA (C) und σ^{70} (D) von *S. oneidensis* (aus Shao *et al.* 2014). **E** Schematische Übersicht der Promotorpositionen. Dünne Pfeile stellen RpoN-abhängige Promotoren und dicke Pfeile σ^{70} -abhängige Promotoren dar.

Die für die Regulation des Flagellierungsmuster wichtige Gene *flhF* und *flhG* besitzen je zwei Promotoren (Abb. 14 A, E). Der für die Flagellenlokalisierung wichtige Faktor *flhF* wird durch einen FlrA-abhängigen Promotor (255 bp *upstream* des Translationsstarts) sowie σ^{70} -abhängigen Promotor (403 bp *upstream* des Translationsstarts) transkribiert. Dagegen wird der Regulator für die Anzahl der Flagellen *flhG* von zwei σ^{70} -abhängigen Promotoren, welche 297 sowie 486 bp *upstream* des Translationsstarts liegen, codiert. Um den Einfluss der σ^{70} -abhängigen Promotoren bei der Flagellenassemblierung zu untersuchen, wurden die *housekeeping* Promotoren der Regulatoren *flhF* sowie *flhG* weiter analysiert. Eine Veränderung der Proteinmenge von FlhF und FlhG beeinflusst das monopolare Flagellierungsmuster (Schuhmacher *et al.* 2015b). Die Deletion von *flhF* bei *S. putrefaciens* führt zur Abwesenheit bzw. Delokalisierung der polaren Flagelle (Rossmann *et al.* 2015). Dagegen führt eine *flhG* Deletion zur polaren Hyperflagellierung (Schuhmacher *et al.* 2015a). Zuerst sollten die σ^{70} -abhängigen Promotoren in ihrer Aktivität stillgelegt werden. Eine Deletion dieser Promotorbereiche ist nicht möglich, da die Promotoren im offenen Leserahmen der Gene *flhA* bzw. *flhF* lokalisiert sind (Abb. 14 E, Abb. 15 A). Daher kann nur die Nuklein-, aber nicht die Aminosäuresequenz substituiert werden. Für eine stille Mutation wurde die *codon usage* in den Sequenzen der σ^{70} -Bindemotive geändert. Zur Überprüfung der Promotoraktivität wurden je die nativen bzw. substituierten Sequenzen in das Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT-RBS-*lux* integriert. Anschließend wurden diese Reporterplasmide in *S. putrefaciens* WT konjugiert und in der exponentiellen Phase die Luciferase-Aktivität mittels Plattenlesegerät (Tecan) detektiert (Abb. 15 A). Der σ^{70} -abhängige *P_{flhF}* (P1) zeigt durch die Substitution im Bindemotiv (NPM, *no promoter motif*) von σ^{70} keine Luciferase-Aktivität mehr. Ebenso der 486 bp

upstream des Translationsstarts lokalisierte P_{flhG} (P2) weist keine Promotoraktivität in der NPM Variante auf. Beim zweiten σ^{70} -abhängigen P_{flhG} NPM (P3), der 297 bp *upstream* des Translationsstarts liegt, ist nur eine Reduktion der Promotoraktivität von ca. 72 % zu beobachten. Die Promotoraktivität von P3 wurde nochmals versucht mit einer anderen *codon usage* des Bindemotivs zu verringern, aber diese Änderung zeigte keine stärker reduzierte Luciferase-Aktivität im Vergleich zu der vorherigen NPM Variante (Daten nicht gezeigt). Die zwei substituierten P_{flhG} (P2+3) zeigen in Kombination die gleiche Luciferase-Aktivität wie P3 alleine. Schlussfolgernd konnten die *housekeeping* Promotoren durch stille Mutationen stillgelegt bzw. in ihrer Aktivität verringert werden.

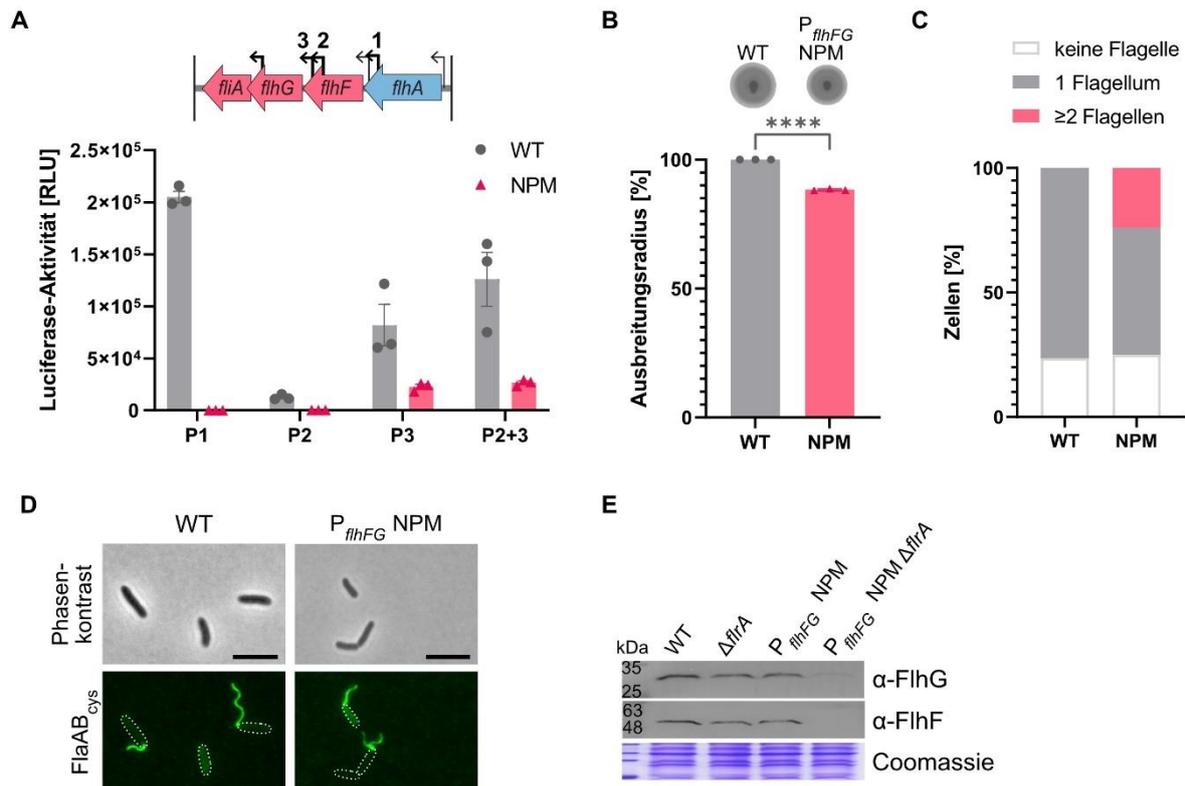


Abb. 15: Basale Expression der Flagellierungsregulatoren *flhF* und *flhG* ist wichtig für die monopolare Flagellierung. **A** Oben ist zur Übersicht das *flhA*-Operon mit der Regulation der Genexpression (blau: FlrA/RpoN-abhängig, rot: bei $\Delta flrA$, $\Delta rpoN$, $\Delta flhA$ anwesend) sowie alle Promotoren (dünnere Pfeil: FlrA/RpoN-abhängiger Promotor, dicker Pfeil: σ^{70} -abhängiger Promotor) dargestellt. Unten sind die Messungen der Promotoraktivitäten mittels des Luciferase Reportersystems. Die *codon usage* der Sequenzen der σ^{70} -abhängigen Promotoren von *flhF* (P1) und *flhG* (P2, P3, P2+3) wurden substituiert (NPM, *no promoter motif*), um eine möglichst geringe Promotoraktivität zu erhalten und mit der nativen Promotorsequenz (WT) verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus biologischen und technischen Triplikaten. **B** Oben sind die Ausbreitungen des *S. putrefaciens* WT und der chromosomalen Mutante NPM (P_{flhFG} NPM), welche eine möglichst geringe Promotoraktivität aller drei σ^{70} -Promotoren von *flhFG* zeigen, auf Schwimmplatten abgebildet. Unten ist der prozentuale Ausbreitungsradius von diesen beiden Stämmen quantifiziert. Der prozentuale Ausbreitungsradius von P_{flhFG} NPM wurde auf den WT normalisiert. Die Sternchen zeigen an, dass der Unterschied zum WT mit einem *p*-Wert von $<0,0001$ signifikant ist (Zweistichproben-t-Test). Das Experiment wurde in biologischen Triplikaten durchgeführt. **C** Quantifizierung der Anzahl an Flagellen pro Zelle. Die Flagelline wurden über einen Cysteinaustausch mittels dem Fluoreszenzfarbstoff Maleimide-CF488 markiert und mikroskopiert. Die Quantifizierung erfolgte mit je 400 Zellen in biologischen Triplikaten. **D** Darstellung der Flagellenfärbung des NPM Stammes im Vergleich zum WT. Die Skalen entsprechen 5 μm. **E** Western Blot zur Überprüfung der Proteinmengen von FlhF und FlhG bei Deletion des Hauptregulators *flrA* ($\Delta flrA$), geringe σ^{70} Promotoraktivität der Gene *flhFG* (P_{flhFG} NPM), sowie die Kombination P_{flhFG} NPM $\Delta flrA$. Als Ladekontrolle dient das Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgel. Die vollständigen Blots sind im Anhang Abb. S 1 C gezeigt.

Um den direkten Einfluss der *housekeeping* Promotoren auf das Schwimmverhalten und die Flagellierung zu untersuchen, wurden die zuvor mittels Luciferase-Aktivität analysierten stillen Mutationen in den σ^{70} -Bindemotiven chromosomal in *S. putrefaciens* (P_{flhFG} NPM) eingefügt. Dieser Stamm wurde im Vergleich mit dem *S. putrefaciens* WT auf Weichagarplatten aufgetropft und nach

Inkubation über Nacht bei RT das Schwimmverhalten ausgewertet. Der Stamm P_{flhFG} NPM zeigt im Vergleich zum WT eine Reduktion von 12 % des Ausbreitungsradius (Abb. 15 B). Um die Ursache für die reduzierte Schwimmfähigkeit zu identifizieren, wurde eine Flagellenfärbung durchgeführt. Hierzu wurde das Filament mittels einem Cysteinaustausch der polaren Flagelline FlaA_{T174C} und FlaB_{T166C} (Kühn *et al.* 2017) mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff Maleimide CF488 gefärbt und mikroskopiert (Abb. 15 C, D). Der WT als auch P_{flhFG} NPM besitzen zu 24 bzw. 25 % der Zellen keine Flagellen. Eine monopolare Flagellierung zeigen beim WT 76 % der Zellen und die Mutante P_{flhFG} NPM dagegen nur bei 51 %. Die restlichen 25 % der P_{flhFG} NPM Mutante weisen mindestens zwei Flagellen pro Zelle auf. Demnach sind die *housekeeping* Promotoren wichtig für ein korrektes Flagellierungsmuster. Die Proteinmengen von FlhF und FlhG sind in der Abwesenheit von *flrA* nicht verändert (Abb. 11). Im Folgenden wurden die FlhFG Proteinmengen bei den stillgelegten σ^{70} Promotoren von *flhFG* untersucht. Hierfür erfolgte ein Western Blot mit Zellen von *S. putrefaciens* WT, Deletion des Hauptregulators *flrA* ($\Delta flrA$), P_{flhFG} NPM, sowie die Kombination aus P_{flhFG} NPM und $\Delta flrA$ (Abb. 15 E). Der Nachweis der FlhF und FlhG Proteinmengen wurde mit Direktantikörpern durchgeführt. Es ist kein Unterschied bei den Proteinmengen von FlhF und FlhG beim WT, $\Delta flrA$ sowie P_{flhFG} NPM zu beobachten. Erst wenn bei *S. putrefaciens* der Hauptregulator *flrA* deletiert und die stillen Mutationen zur Reduktion der Promotoraktivitäten bei P_{flhFG} eingefügt wurden, ist eine Verringerung der Proteinmenge von FlhF sowie FlhG nachzuweisen.

4.1.6 Ektopische Expression von *flrA* steigert Proteinmenge von σ^{70} Promotor abhängigen Flagellenbestandteilen

Der Flagellenhauptregulator FlrA beeinflusst nicht die Regulation aller Flagellenkomponenten (Abb. 11), sondern einige Gene werden von einem σ^{70} -abhängigen Promotor transkribiert. Um den Einfluss von FlrA auf die Flagellierung zu beobachten, erfolgte eine Flagellenfärbung bei *S. putrefaciens* $\Delta flrA$ und ektopischen Transkription von *flrA* (pBTOK FlrA; Abb. 16 A). *S. putrefaciens* $\Delta flrA$ ist nicht in der Lage eine Flagelle zu assemblieren. Dagegen kommt es zur polaren Hyperflagellierung bei einer Überproduktion von FlrA (Schwan *et al.* 2020). Die Flagellenbestandteile, welche eine FlrA-abhängige Regulation zeigen (Abb. 11) werden vermutlich durch pBTOK FlrA vermehrt transkribiert. Im nächsten Schritt wurde der Proteingehalt der Flagellenkomponenten untersucht, die trotz Deletion von *flrA* exprimiert wurden. Daher wurden die FlrA-abhängigen Komponenten FlhA sowie FliH und die nicht FlrA-abhängigen Komponenten FliI sowie FliM mit je einem chromosomalen 3xFLAG fusioniert und in die entsprechenden *S. putrefaciens* Stämmen konjugiert. Anschließend erfolgte die Detektion der Proteinmengen von FlhA, FliH, FliI und FliM mit Hilfe eines Western Blots (Abb. S 1 D) und die Proteinlevel im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen wurden quantifiziert (Abb. 16 B).

Die relativen Proteinlevel von FlhA-FLAG sowie FliH-FLAG zeigen deutlich die Abwesenheit bzw. nur geringe Menge an Proteinen bei $\Delta flrA$ im Vergleich zum WT. Im Vergleich der Leervektorkontrolle (pBTOK EVC) und *S. putrefaciens* pBTOK FlrA weisen FlhA und FliH einen signifikanten Proteinanstieg um das 3,2- bzw. 2,2-fache auf (Abb. 16 B). Das zum ft3SS gehörende *fliI* liegt direkt *downstream* im gleichen Operon wie *fliH* (Abb. 5.3). Trotzdem zeigt FliI-FLAG keine Reduktion der Proteinmenge in der Deletionsmutante $\Delta flrA$ im Vergleich zum WT. Auch das C-Ring Protein FliM-FLAG weist keine Änderung bei der Abwesenheit von *flrA* auf. Allerdings steigen die Proteinmengen von FliI-FLAG und FliM-FLAG signifikant um das 3,4- bzw. 2,2-fache bei einer ektopischen Expression von *flrA* an. Somit sind die Proteinkomponenten, welche in der Abwesenheit von *flrA* keine veränderten Transkript- als auch Proteinlevel aufweisen, trotzdem von FlrA-abhängig, da FlrA die Proteinlevel steigern kann.

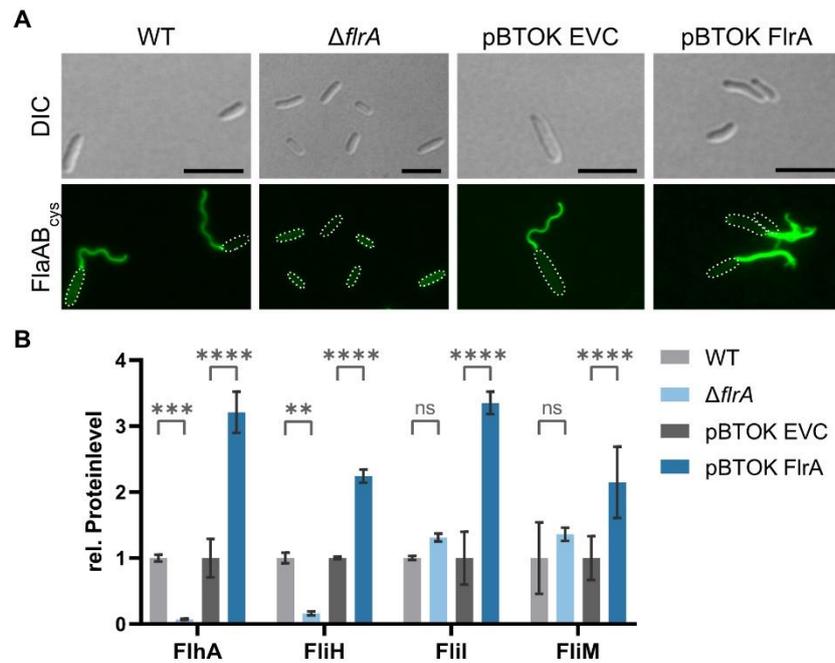


Abb. 16: Ektopische Produktion von FlrA steigert Proteinmenge der σ^{70} Promotor-abhängigen Flagellenbestandteilen. **A** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der mit Alexa Fluor 488 Maleimide gefärbten Filamente FlaAB_{cys}. *S. putrefaciens* $\Delta flrA$ assembliert keine Flagellen und pBTOK FlrA führt zu einer polaren Hyperflagellierung (Schwan *et al.* 2020). Die Skalen entsprechen 5 μ m. **B** Quantifizierung der relativen Proteinlevel anhand von Western Blots bei FlhA-FLAG, FliH-FLAG, FliI-FLAG sowie FliM-FLAG. Die Deletion von *flrA* ($\Delta flrA$) und ektopische Produktion von FlrA (pBTOK FlrA) wurden relativ zu den Kontrollen *S. putrefaciens* WT sowie Leervektor (pBTOK EVC) berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von je technischen Duplikaten und biologischen Triplikaten. Die Sternchen zeigen an, dass die Unterschiede zur Kontrolle signifikant sind (zweifaktorielle ANOVA; *p*-Werte: **** <0,0001; *** <0,001; ** <0,01; ns nicht signifikant > 0,05). Die Western Blots sind im Anhang abgebildet (Abb. S 1 D).

4.1.7 Induktion der Genexpression des Hauptregulators *flrA*

Um die hierarchische Flagellenregulation weiter zu untersuchen, wurde der Hauptregulator *flrA* induziert und einige Flagellenproteine sowie die Schwimffähigkeit der Bakterien über die Zeit analysiert. Für die induzierbare chromosomale Genexpression wurde das zur Verwertung von L-Arabinose *araBDAX*-Operon verwendet. In den Deletionsstamm *S. putrefaciens* $\Delta araAD$, welcher nicht in der Lage ist L-Arabinose abzubauen, wurde *downstream* von *araB* der Hauptregulator *flrA* mit einem FLAG-Anhang (*flrA*-FLAG) integriert. Zudem wurde das native chromosomale *flrA* deletiert. Zur Überprüfung der Proteinmengen mittels Western Blot wurde das frühe Flagellengen *flhA* sowie ein späteres Gen *flgL* mit einem chromosomalen 3xFLAG fusioniert. Dieser Stamm wurde von einer Übernachtskultur mit einer OD₆₀₀ 0,02 inokuliert, bis zu einer OD₆₀₀ 0,5 bei 30 °C kultiviert und anschließend mit 2 % L-Arabinose induziert. Nach Zugabe von L-Arabinose wurden Proben zum Zeitpunkt 0 min und alle 20 min entnommen zur Bestimmung der OD₆₀₀, Western Blot Analyse sowie Lichtmikroskopie. Die OD₆₀₀-Messung diente für die Western Blot Probennahme und der Bestimmung der Generationen. Die Ermittlung der Generationen erfolgte über die Verdoppelung der OD₆₀₀-Messwerte. Beim Immunoblot wurden die Proteinmenge des induzierten FlrA-FLAG sowie die Flagellenbestandteile FlhA-FLAG und FlgL-FLAG mittels einem α -FLAG-Antikörper ermittelt. Mit dem Direktantikörper α -FlaAB wurden die polaren Flagelline detektiert. Bei der Lichtmikroskopie wurde beurteilt, ob die Bakterien in der Lage sind zu schwimmen (Abb. 17).

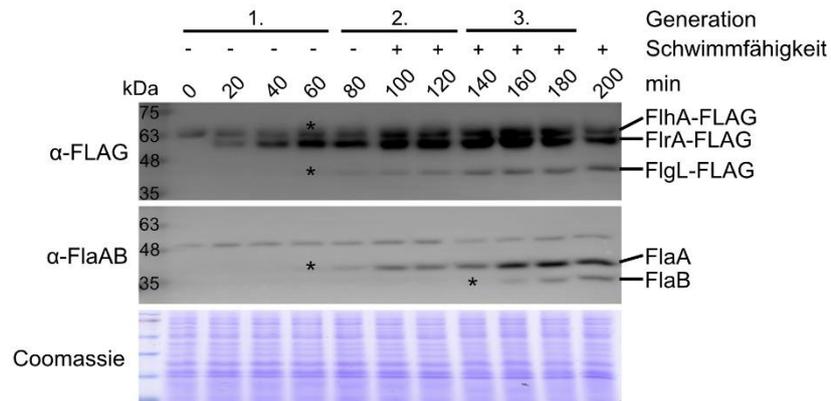


Abb. 17: Nach Induktion des Hauptregulators *flrA* benötigt *S. putrefaciens* eineinhalb Generationszyklen bis zur Fähigkeit zum Schwimmen. Zur Untersuchung der hierarchischen Regulation der Flagellenbestandteile wurde *S. putrefaciens* mit einer Deletion des chromosomalen *flrA* sowie *araAD*, Integration von *flrA-FLAG* in das Arabinose-Operon und chromosomale FLAG-Anhänge an die Flagellengene *flhA* und *flgL* verwendet. Die Induktion des Hauptregulators *flrA* erfolgte mit 2 % L-Arabinose bei einer OD_{600} von 0,5. Alle 20 min wurden Proben zur Western Blot Analyse sowie zur Lichtmikroskopie entnommen. Mittels Western Blot Analysen wurden das induzierte FlrA, sowie die flagellaren Proteine FlhA und FlgL mit α -FLAG-Antikörper sowie die Flagelline FlaAB mit einem Direktantikörper detektiert. Die Sterne markieren die Zeitpunkte des Nachweises bzw. ansteigen der Proteinlevel. Als Ladekontrolle dient das Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgel. Die Schwimmfähigkeit wurde Lichtmikroskopisch ermittelt. Unbewegliche (-) sowie motile Bakterien (+) wurden über dem Western Blot gekennzeichnet. Die Generationen wurden über die Verdoppelung der OD_{600} -Werte ermittelt.

Mit dem chromosomale L-Arabinose Genexpressionssystem wurde erfolgreich der Hauptregulator FlrA-FLAG induziert. Allerdings wurde trotz Induktion mit 2 % L-Arabinose das native FlrA Proteinlevel nicht erreicht (Daten nicht gezeigt). Bereits nach 20 min Induktion kann der Hauptregulator FlrA-FLAG mittels Western Blot nachgewiesen werden. Das zum FT3SS zugehörige Protein FlhA ist auch schon in der Abwesenheit von FlrA zu detektieren, aber nach 60 min Induktion zeigt sich eine Erhöhung des FlhA-FLAG Proteinlevels. Ebenso wurden nach 60 min das zum Haken assoziierten Protein FlgL-FLAG sowie das Nebenflagellin FlaA beobachtet. Der Nachweis des Hauptflagellins FlaB erfolgte nach 140 min Induktion. Bei der Überprüfung der Schwimmfähigkeit mittels Lichtmikroskopie wurde nach ca. 100 min bei einigen Bakterien ein Schwimmen beobachtet. Die Induktionszeit von 100 min entspricht in etwa eineinhalb Generationszyklen bis die Bakterien eine funktionale Flagelle produziert haben.

4.1.8 Rho-unabhängigen Terminatoren der frühen Flagellengene

Eine klassische Operonstruktur besitzt neben dem Promotor und der Gene auch einen Terminator, welcher die Transkription beendet. Die transkriptionellen Terminatoren werden in zwei Klassen unterteilt. Die Rho-abhängigen Terminatoren, welche über Proteinfaktoren beeinflusst werden, sowie die über RNA-Strukturen wirkenden Rho-unabhängigen Terminatoren. Die Rho-unabhängigen Terminatoren stoppen die Transkription über haarnadelförmige Sekundärstrukturen der mRNA. Diese Haarnadelstrukturen besitzen eine 8-10 bp langen, GC-reichen Nukleotidsequenz, gefolgt von einem Abschnitt aus Uracils am 3' Ende des RNA-Transkripts. In der DNA-Sequenz entspricht das einem umgekehrten Palindrom und anschließender Thymin-reichen Sequenz (Farnham und Platt 1981; Naville *et al.* 2011). Diese Nukleinsäuresequenzen können mittels *in silico*-Analysen vorhergesagt werden.

Auf solche Rho-unabhängigen Transkriptionsterminatoren wurde die Nukleinsäuresequenz in dem Bereich der frühen Flagellengene von *fliE* bis *fliA* untersucht. Mit Hilfe der webbasierte Software ARNold wurden sieben Rho-unabhängige Terminatoren mit einer freien Energie von mindestens 5 kcal/mol als Konfidenzwert vorhergesagt (Abb. 18 A). Die blau markierten Bereiche sind die palindromischen GC-

reichen Nukleotidsequenzen, welche durch komplementäre Basenpaarung den Stamm der Haarnadelschleife bilden. Die Rot markierten Sequenzen stellen die Schleife des Rho-unabhängigen Terminators dar. In dem untersuchten Sequenzbereich von *fliE* bis *fliA* wurden in den folgenden sechs Genen Haarnadelschleifen für das mRNA-Transkript vorhergesagt: *fliH*, *fliI*, *fliL*, *fliO*, *fliR* und *fliA*. Bei *fliR* wurden zwei Rho-unabhängige Terminatoren direkt nebeneinander prognostiziert. Alle vorhergesagten Terminatoren liegen nicht am Ende eines Operons, sondern meist zentral in einem translatierenden Bereich (Abb. 18 B). Daher wurden im Folgenden analysiert, ob die vorhergesagten Terminatoren auch die Eigenschaft zum Transkriptionsabbruch besitzen. Hierfür wurden mittels einer einfachen homologen Rekombination zur Sicherstellung der Translation eine Ribosomen-Bindestelle gefolgt von den Reportergenen *luxCDABE* aus *Photobacterium luminescens* *up-* und *downstream* der jeweiligen vorhergesagten Terminatoren inseriert. Die untersuchten Rho-unabhängigen Terminatoren zeigen alle eine Reduktion der Luciferase-Aktivität *downstream* der Haarnadelschleife (Abb. 18 C). Durch den Terminator im Gen *fliA* ist der geringste Einfluss auf die Transkription mit einer Verringerung um 25 % zu beobachten. Die weiteren Terminatoren in den Genen *fliH* (-38 %), *fliI* (-60 %), *fliL* (-54 %), *fliO* (-47 %) und *fliR* (-44 %) zeigen einen etwas größeren Effekt bei der Reduzierung der Luciferase-Aktivität.

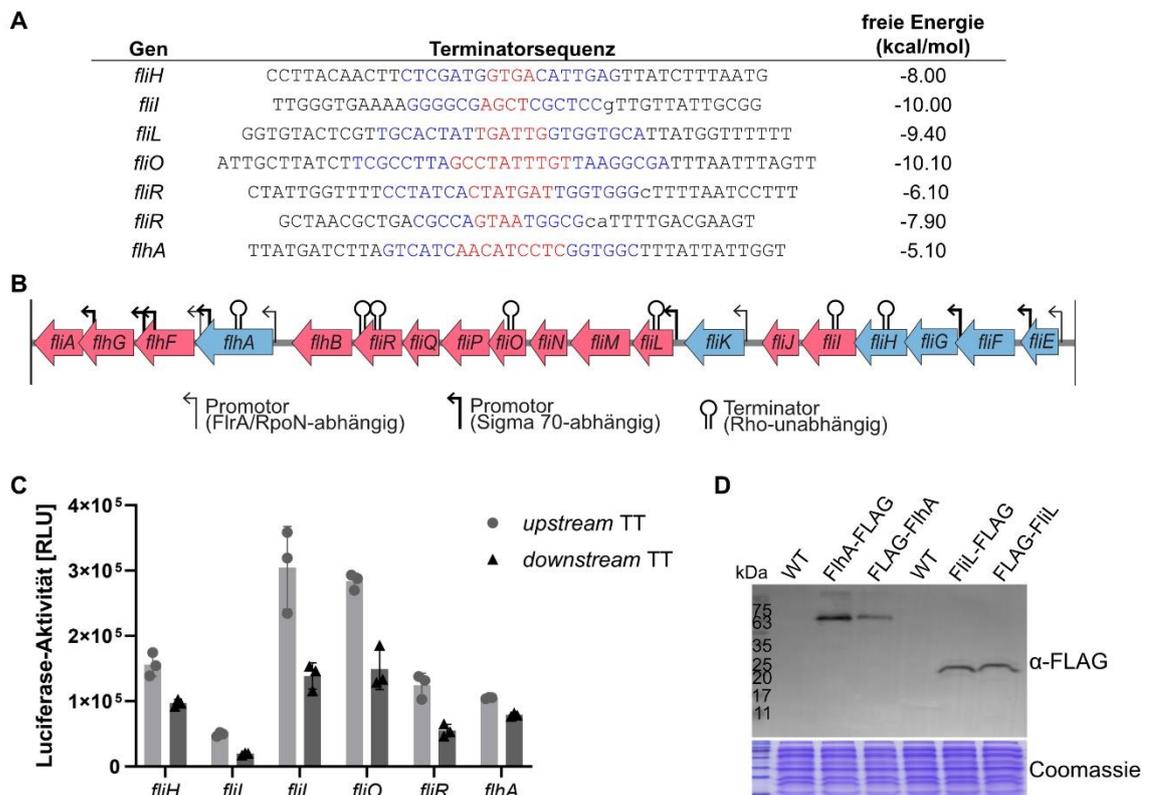


Abb. 18: Rho-unabhängige Transkriptionsterminatoren der frühen Flagellengene. **A** Vorhersage der Rho-unabhängigen Terminatoren mit dem webbasierten Tool ARNold (Neville *et al.* 2011). Abgebildet sind die prognostizierten Terminatorsequenzen, welche in Rot die Sequenz der Schleife sowie in Blau des Stammes darstellen. Als Konfidenzwert dient die freie Energie der Haarnadelschleife. **B** Übersicht der frühen Flagellengene mit Lokalisierung der vorhergesagten Rho-unabhängigen Terminatoren. Alle Terminatoren liegen im offenen Leserahmen. **C** Bestimmung der Auswirkung von den Terminatoren auf die Transkription mittels des Luciferase-Reportersystems. Die Reportergene *luxCDABE* aus *Photobacterium luminescens* wurden *up-* und *downstream* der jeweiligen vorhergesagten Rho-unabhängigen Terminatoren (TT) mittels einfacher homologer Rekombination integriert. Die Luciferase-Aktivität wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus biologischen und technischen Triplikaten. **D** Immunoblot Analyse zum Einfluss der Terminatoren auf die Proteine FliA und FliL. Mittels C- und N-terminalen 3xFLAG-Fusionen wurde das Vorhandensein von trunkierten Proteinen untersucht. Als Ladekontrolle dient das Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgel.

Die vorhergesagten Rho-unabhängigen Terminatoren besitzen alle einen negativen Einfluss auf die Transkription, aber die *downstream* liegende Expression findet weiterhin mit einer geringeren Aktivität statt. Ein Abbruch der Transkription führt zu verkürzten mRNA Transkripten. Im Weiteren wurde untersucht, ob mittels Western Blot solche trunkierten Proteinvarianten nachgewiesen werden können (Abb. 18 D). Hierfür wurden die Proteine FliL sowie FlhA mit einem 3xFLAG C- und N-terminal fusioniert, um mögliche Veränderungen in den Proteingrößen detektieren zu können. Falls der Terminator Einfluss auf FlhA nehmen würde, sollte zum $\approx 55,5$ kDa großen Protein FLAG-FlhA bei der N-terminalen Fusion ein zusätzliches Signal bei $\approx 25,9$ kDa nachgewiesen werden können. Bei FliL sollte neben $\approx 21,7$ kDa auch ein $\approx 14,9$ kDa FLAG Signal bei der N-terminalen 3xFLAG-Fusion zu beobachten sein. Bei beiden Proteinen FlhA sowie FliL wurden bei der Immunoblot Analyse keine weiteren Signale detektiert, die auf Trunkierungen der Proteine hinweisen.

Da am Ende der bisher bekannten Operons keine Rho-unabhängigen Terminatoren identifiziert wurden, könnten dort Rho-abhängige Transkriptionsterminatoren lokalisiert sein. Daher erfolgte auch für die Rho-abhängigen Terminatoren eine *in silico*-Analyse mit Hilfe der Software RhoTermPredict (Di Salvo *et al.* 2019). Jedoch wurden für den Genomabschnitt von *flrA* bis *fliA* mit 22 Genen insgesamt 94 Terminatoren auf dem Plus- und Minus-Strang vorhergesagt (Daten nicht gezeigt). Diese vorhergesagten Rho-abhängigen Terminatoren wurden nicht weiter untersucht.

4.2 Regulation der monopolen Flagellenassemblierung durch die MinD-ähnliche ATPase FlhG

Die im folgenden Kapitel zum Teil gezeigten Ergebnisse wurden bereits in Schwan *et al.* (2020) veröffentlicht. Die MinD-ähnliche ATPase FlhG als auch die Homologe FleN, YlxH und MinD2 begrenzen in polar flagellierten Bakterien die Anzahl der Flagellen. Die Deletion von *flhG* bzw. die Homologe führen zur polaren Hyperflagellierung in *Pseudomonas aeruginosa* (Dasgupta *et al.* 2000), *Vibrio cholerae* (Correa *et al.* 2005), *V. alginolyticus* (Kusumoto *et al.* 2006) als auch *S. putrefaciens* (Schuhmacher *et al.* 2015a; Schwan *et al.* 2020). *S. putrefaciens* codiert *flhG* im polaren Flagellencluster und zeigt auch keinen Einfluss auf das laterale Flagellensystem (Schuhmacher *et al.* 2015a). Daher wurde der Fokus aller folgenden Experimente auf das polare Flagellensystem gelegt und die lateralen Flagelline *flaAB_{lat}* in *S. putrefaciens* deletiert, um den regulatorischen Einfluss des lateralen Flagellensystems auszuschließen.

4.2.1 FlhG lokalisiert kurze Zeit am Zellpol

Die C-terminale *membrane targeting sequence* (MTS)-Domäne der MinD-ähnlichen ATPase FlhG kann mit Lipiden interagieren (Schuhmacher *et al.* 2015a). In *V. parahaemolyticus* zeigt FlhG bei 18 % der Zellen eine Lokalisierung am flagellierten Zellpol (Arroyo-Pérez und Ringgaard 2021), aber auch in *S. putrefaciens* ist neben einer diffusen zytoplasmatischen auch eine polare Lokalisierung zu beobachten (Rossmann *et al.* 2015). Zur besseren Sichtbarkeit der Lokalisierung von FlhG in *S. putrefaciens* erfolgte in Kooperation mit Benjamin Mayer (AG Graumann, Marburg) Aufnahmen mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Abb. 19). Hierfür wurde FlhG mit dem *superfolder* grün fluoreszierenden Protein (sfGFP) fusioniert und die Funktionalität über das Schwimmverhalten bestätigt. *S. putrefaciens flhG-GFP* besitzt auf Weichagarplatten einen Ausbreitungsradius von 97 % im Vergleich zum WT (Abb. 19 B).

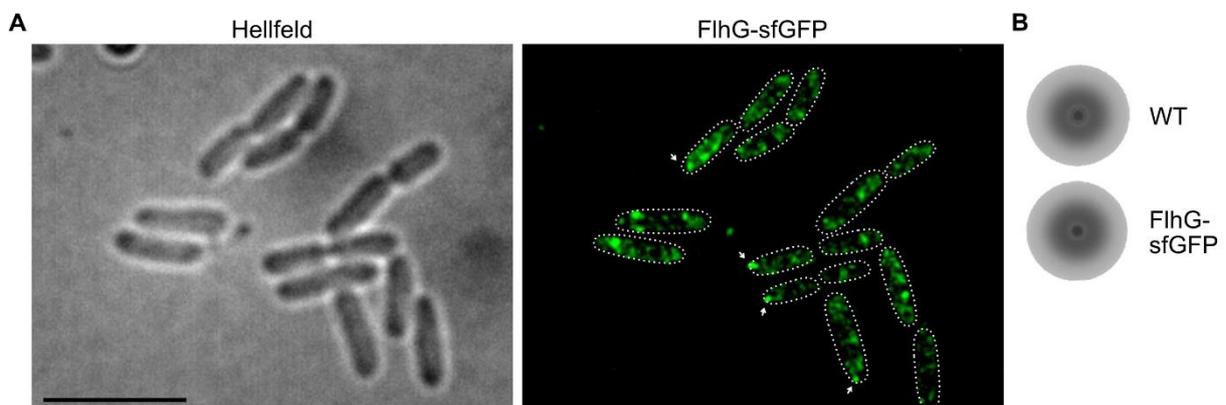


Abb. 19: FlhG verweilt nur kurz an flagellierten Pol. **A** FlhG-sfGFP Lokalisierung in *S. putrefaciens* mit dem konfokalen Mikroskop ELYRA PS.1 (Zeiss). Die Aufnahme erfolgten in Kooperation mit Benjamin Meyer (AG Graumann). MinD-ähnliche ATPase FlhG lokalisiert im Zytoplasma als auch bei wenigen Zellen am Zellpol (weißer Pfeil). Die Skala entspricht 5 μ m. **B** Ausbreitungsradien von *S. putrefaciens flhG-1xGS-sfGFP* (FlhG-sfGFP) im Vergleich zum WT auf Weichagarplatten. Die C-terminale GFP-Fusion von FlhG ist aktiv und besitzt keinen Schwimmphänotyp.

Die konfokalen Fluoreszenzaufnahmen von FlhG-sfGFP zeigen bei einigen Zellen eine polare Lokalisierung. Aber FlhG-sfGFP zeigt auch einige Spots an unterschiedlichen Positionen sowie diffuse Lokalisierungen im Zytoplasma. FlhG scheint nur kurz bzw. in bestimmten Zellteilungsphasen am Zellpol zu lokalisieren. Für die polare Lokalisierung scheinen das *landmark*-Protein HubP sowie das flagellare C-Ring Protein FliM eine Rolle zu spielen (Rossmann *et al.* 2015; Schuhmacher *et al.* 2015a).

4.2.2 Landmark-Protein HubP besitzt keinen Einfluss auf FlhG und Flagellierung

Die räumliche und zeitliche Regulierung der Zellpolarität ist bei vielen Bakterien entscheidend für grundlegende zelluläre Prozesse, wie z. B. Chromosomensegregation und Zellteilung, aber auch die Motilität (Treuner-Lange und Søgaard-Andersen 2014). In *S. putrefaciens* existiert das *landmark*-Protein HubP, welches eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Bestandteilen an den Zellpol spielt. HubP ist bei der Chromosomensegregation, Chemotaxis System sowie Motilität beteiligt. HubP besitzt bei der Motilität von *S. putrefaciens* Einfluss auf das Typ-IV Pili vermittelte *twitching* als auch die richtige Funktion der polaren Flagelle. Eine Deletion von *hubP* in *S. putrefaciens* führt zu einer reduzierten Schwimgeschwindigkeit, Delokalisierung der MinD-ähnlichen ATPase FlhG und Reduzierung der Anzahl an Zellen mit einer polaren Flagelle (Rossmann *et al.* 2015). Das *landmark*-Protein HubP besteht aus einer N-terminalen Signalsequenz, LysM-Domäne, welche Peptidoglykan bindet, sowie Transmembrandomänen und einem zytoplasmatischen Teil. Der zytoplasmatische Bereich besitzt eine C-terminale FimV-Domäne und neun saure wiederholende Aminosäuresequenzen, die im Folgenden Repeats genannt werden (Rossmann *et al.* 2015).

In weiteren Analysen sollte die Rolle von HubP auf die Lokalisierung von FlhG untersucht werden. Dafür wurde *S. putrefaciens flhG-sfGFP flaAB_{cys} ΔflaAB_{at}* verwendet, da so die Lokalisierung von FlhG sowie eine Flagellenfärbung mit einem Stamm analysiert werden kann. *S. putrefaciens* mit den Deletionen von *hubP* bzw. den Domänen *hubP_{Repeats 1-9}* oder *hubP_{FimV}* wurden bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,3 mikroskopiert, um die Lokalisierung von FlhG-sfGFP zu analysieren (Abb. 20 A, B). Anschließend bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 erfolgte eine Flagellenfärbung von diesen Stämmen (Abb. 20 A). Die Flagellenfärbung zeigt keine Änderung der Flagellierung von *S. putrefaciens ΔhubP*, *ΔhubP_{Repeats 1-9}* sowie *ΔhubP_{FimV}* im Vergleich zum WT. Bei allen Stämmen besitzen ca. 70 % der Zellen eine monopolare Flagelle und die restlichen ca. 30 % sind nicht flagelliert (Abb. 20 B). Auch die Mikroskopie von FlhG-sfGFP zeigt keine starke Änderung von *S. putrefaciens ΔhubP*, *ΔhubP_{Repeats 1-9}* sowie *ΔhubP_{FimV}* im Vergleich zum WT. Die MinD-ähnliche ATPase FlhG weist bei diesen untersuchten *S. putrefaciens* Stämmen trotz Deletion von *hubP* sowie den Domänen *hubP_{Repeats 1-9}* und *hubP_{FimV}* eine polare Lokalisierung auf. Die Anzahl an polaren Lokalisierungen in den Deletionsmutanten ist zwar etwas geringer als im WT, aber nicht signifikant reduziert (Abb. 20 B). Die deutliche verringerte Ausbreitung auf Weichagarplatten von *S. putrefaciens ΔhubP* wurde wie auch bei Rossmann *et al.* (2015) beobachtet (Abb. 20 D). Die Repeat-Domäne von HubP zeigt mit einer Reduktion von 25 % einen deutlicheren Schwimmphenotyp als die FimV-Domäne mit einem um 11 % verringerten Ausbreitungsradius. Mit den neu erstellten Stämmen *S. putrefaciens ΔhubP*, *ΔhubP_{Repeats 1-9}* und *ΔhubP_{FimV}* konnte der Einfluss des *landmark*-Proteins HubP auf die FlhG Lokalisierung nicht bestätigt werden und wurde nicht weiter untersucht.

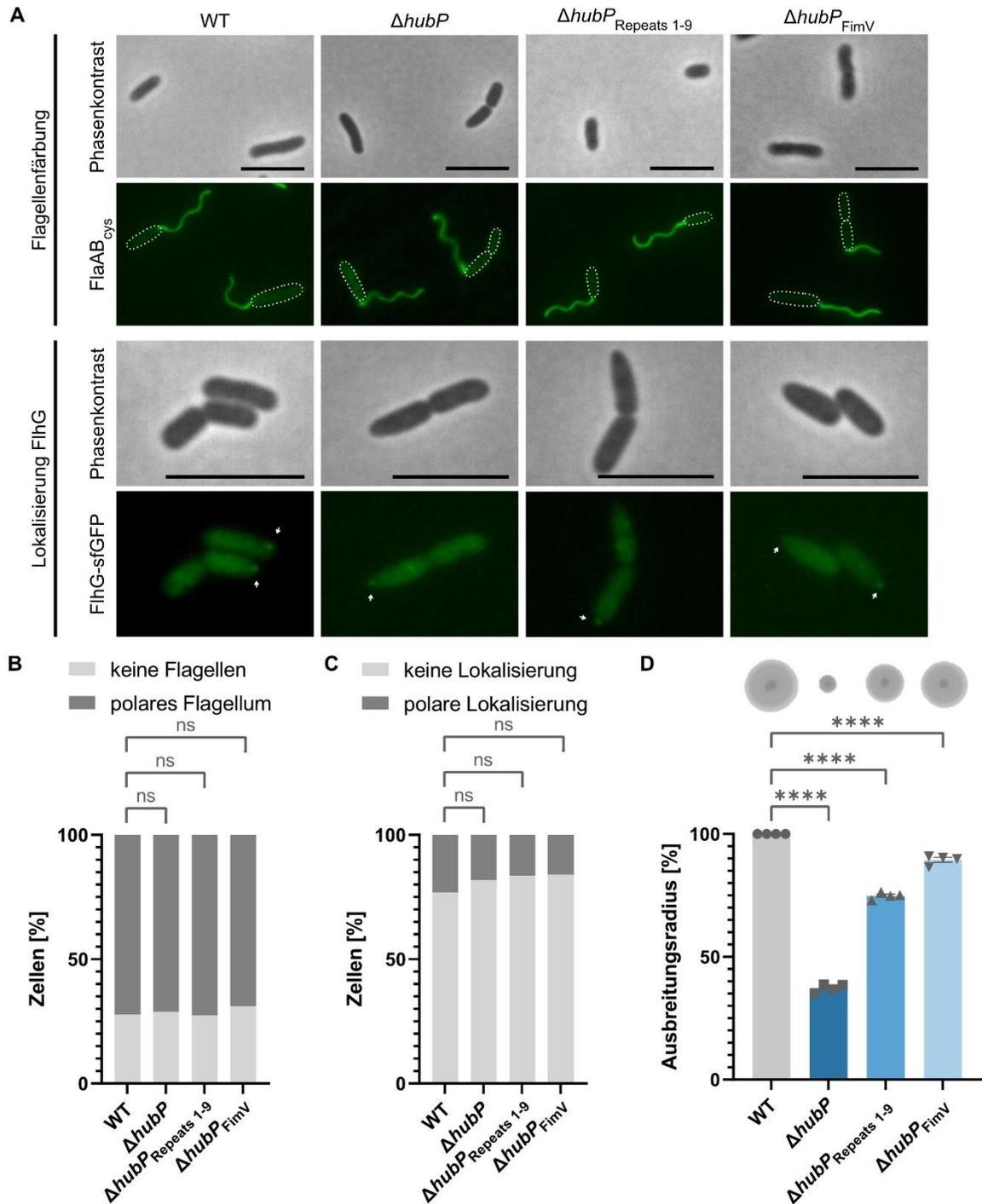


Abb. 20: HubP zeigt keinen Einfluss auf Flagellierung sowie FlhG Lokalisierung. **A** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der mit CF 488 Maleimide gefärbten Filamente FlaAB_{cys} (oben) und die Lokalisierung von FlhG-sfGFP (unten) sowie die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen. Alle Stämme besitzen folgenden Hintergrund *S. putrefaciens flaAB_{cys} flhG-sfGFP ΔflaAB_{lat}*. *S. putrefaciens ΔhubP* sowie die Deletionen der Domänen *hubP_{Repeats 1-9}* und *hubP_{FimV}* besitzen wie der WT eine monopolare Flagellierung. Der Maßstab entspricht 5 μm. **B** Quantifizierung der Flagellenfärbung. In biologischen Triplikaten wurden pro *S. putrefaciens* Stamm 400 Zellen ausgezählt. **C** Quantifizierung der FlhG Lokalisierung. In biologischen Triplikaten wurden pro *S. putrefaciens* Stamm 400 Zellen ausgezählt. FlhG kann in allen untersuchten Stämmen am Zellpol lokalisieren. **D** Oben sind die Ausbreitungsradien der in A und B analysierten *S. putrefaciens* Stämmen auf Weichagarplatten dargestellt. Unten ist der prozentuale Ausbreitungsradius von diesen Stämmen quantifiziert. Die Deletionsmutanten wurden auf den WT normalisiert. Das Experiment wurde in vier biologischen Replikaten durchgeführt. Die Sternchen zeigen an, dass die Unterschiede zur Kontrolle signifikant sind (ANOVA; *p*-Werte: **** < 0,0001; ns nicht signifikant > 0,05).

4.2.3 FlhG ist kein integrierter Bestandteil der Flagelle

In der Studie von Schuhmacher *et al.* (2015a) wurde gezeigt, dass FlhG mit dem N-terminalen EIDAL-Motiv des C-Ring Proteins FliM interagiert. Welchen Einfluss FlhG auf die polare Flagellenassemblierung vor allem auf den C-Ring besitzt, wurde mittels Kryo-Elektronentomographie ermittelt. Die Kryo-Elektronentomographie wurde von Florian Rossmann (AG Beeby, Imperial College London) durchgeführt. Es wurden die Stämme *S. putrefaciens* WT und der polar hyperflagellierte Stamm $\Delta flhG$ verwendet (Abb. 21).

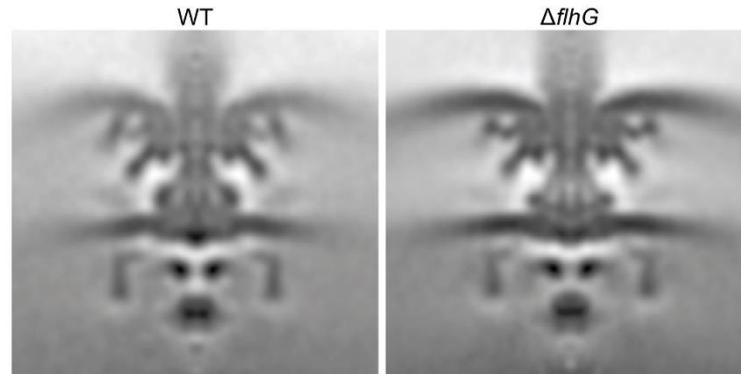


Abb. 21: MinD-ähnliche ATPase FlhG ist kein integrierter Bestandteil der Flagelle. Kryo-Elektronentomographie Aufnahmen des polaren Flagellenmotors von *S. putrefaciens* WT (links) und $\Delta flhG$ (rechts). Aufnahmen wurden von Florian Rossmann (AG Beeby) zur Verfügung gestellt (Schwan *et al.* 2020).

Im Vergleich der Kryo-Elektronentomographie von *S. putrefaciens* WT und $\Delta flhG$ ist kein Unterschied in der C-Ring- sowie Flagellenstruktur zu beobachten (Abb. 21). Daher kann ausgeschlossen werden, dass FlhG ein integrierter Bestandteil oder für die Assemblierung der Flagelle essenziell ist (Schwan *et al.* 2020).

4.2.4 C-Ring Protein FliM transportiert FlhG an den flagellierten Zellpol

Die Rolle der Interaktion von FlhG und dem C-Ring Bestandteil FliM wurde nicht mit Hilfe der Kryo-Elektronentomographie geklärt. Daher wurden das Filament sowie der Haken mit Fluoreszenzfärbungen und die Lokalisierung von FlhG-sfGFP in verschiedenen *S. putrefaciens* Stämmen untersucht, die die Interaktion von FlhG und FliM verhindern. Zum einem wurde das N-terminale EIDAL-Motiv von FliM (FliM Δ EIDAL) deletiert sowie bei FlhG eine Punktmutation K175E (FlhG_{K175E}) eingebracht (Abb. 22). Schuhmacher *et al.* (2015a) konnten bereits zeigen, dass FliM trotz Deletion des EIDAL-Motivs am flagellierten Zellpol lokalisiert.

Die MinD-ähnliche ATPase FlhG zeigt bei *S. putrefaciens* keine polare Lokalisierung, wenn die Interaktion zwischen FlhG und FliM durch die Mutationen FliM Δ EIDAL und FlhG_{K175E} verhindert wird. Zudem ist eine polare Hyperflagellierung in diesen Mutanten wie bei einer *flhG* Deletion zu beobachten (Abb. 22). Da die Interaktion von FlhG mit dem C-Ring Protein FliM zur polaren Lokalisierung nötig ist wird vermutet, dass FlhG mit FliM zum wachsenden C-Ring der Flagelle transportiert wird (Schwan *et al.* 2020).

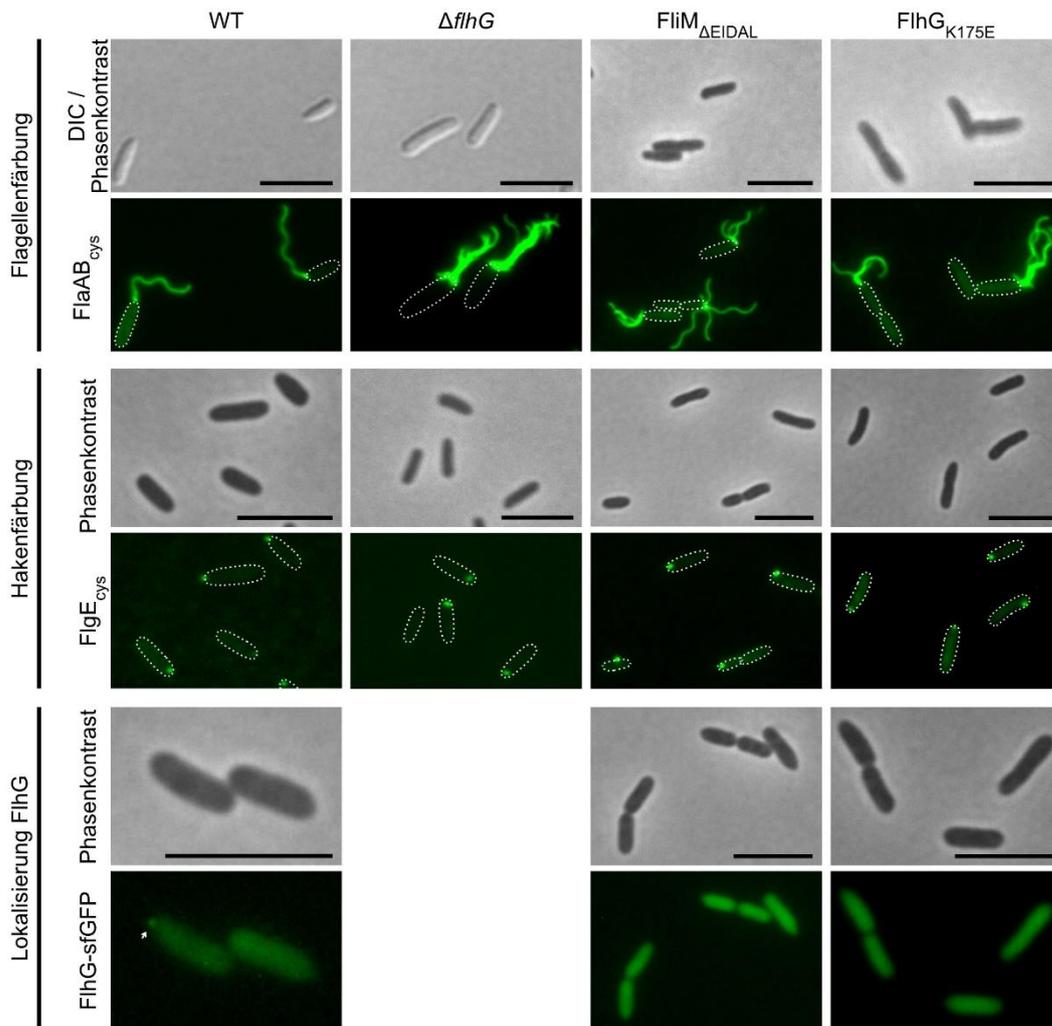


Abb. 22: Interaktion des C-Ring Proteins FliM und MinD-ähnlichen ATPase FlhG ist wichtig für die FlhG Lokalisierung sowie monopolare Flagellierung. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der mit Alexa Fluor 488 Maleimide gefärbten Filamente FlaAB_{cys} (oben; Schwan *et al.* 2020) und Haken FlgE_{cys} (mitte), die Lokalisierung von FlhG-sfGFP (unten) sowie die entsprechenden DIC- bzw. Phasenkontrastaufnahmen. Die Mutanten $FliM_{\Delta EIDAL}$ und $FliH_{K175E}$, welche die Interaktion von FlhG und FliM verhindern, zeigen wie bei der Deletion von *flhG* ($\Delta flhG$) eine polare Hyperflagellierung und FlhG lokalisiert nicht am Zellpol. Die Skalen entsprechen 5 μm .

4.2.5 ATP-abhängiges FlhG Homodimer interagiert mit Flagellenhauptregulator FlrA

Um den Mechanismus der MinD-ähnlichen ATPase FlhG bei der Regulierung der Anzahl an monopolaren Flagellen zu identifizieren, sollten weitere Interaktionspartner von FlhG ermittelt werden. In *P. aeruginosa* interagiert das FlhG Homolog FleN mit dem flagellaren Hauptregulator FleQ (Dasgupta und Ramphal 2001). FleQ reguliert in *P. aeruginosa* u. a. die Flagellengenexpression und Produktion der Exopolysaccharide (Arora *et al.* 1997). Mögliche Interaktionspartner von FlhG aus *S. putrefaciens* wurden mit Hilfe eines *Yeast-Two-Hybrid* Assays von Devid Mrusek (AG Bange, Marburg) untersucht (Daten nicht gezeigt). Hierbei wurde neben der Interaktion von FlhG mit dem C-Ring Protein FliM (Schuhmacher *et al.* 2015a) und der Signalerkennungspartikel (SRP)-ähnlichen GTPase FlhF (Bange *et al.* 2011) eine Interaktion mit dem Flagellenhauptregulator FlrA (Homolog von FleQ) beobachtet (Schwan *et al.* 2020).

S. putrefaciens besitzt neben dem polaren Flagellensystem auch ein unabhängiges zweites Flagellensystem, welches für die Assemblierung von lateralen Flagellen zuständig ist. Beide Flagellengenercluster codieren den Hauptregulator *flrA* (Bubendorfer *et al.* 2012). Ein Alignment des polaren Hauptregulators

(FlrA_{pol}) sowie laterale Flagellenregulator (FlrA_{lat}) zeigt bei BLAST eine Aminosäuresequenzähnlichkeit von 48,4 % (Abb. S 5). Zur Untersuchung ob die Interaktion von FlhG ausschließlich mit FlrA_{pol} oder auch mit FlrA_{lat} stattfindet, wurden *Bacterial-Two-Hybrid* Assays durchgeführt (Abb. 23 A). Hierbei werden Fragmente der Adenylatzyklase (T18 und T25) aus *Bordetella pertussis* an die möglichen Interaktionspartner fusioniert. Bei Interaktion der zu testenden Proteine gelangen die T18 und T25 Fragmente in räumliche Nähe und bilden eine funktionale Adenylatzyklase. Die daraus resultierende erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität führt zur Umsetzung des Substrats X-Gal und zur Blaufärbung der Kolonien. Dagegen bleiben die Kolonien weiß, wenn die zu untersuchenden Proteine nicht miteinander interagieren und dadurch keine funktionale Adenylatzyklase aus den T18 und T25 Fragmenten bilden. Bei der Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion mittels *Bacterial-Two-Hybrid* Assay wurde nur eine Blaufärbung bei Kolonien mit den zu untersuchenden Proteinen FlhG und FlrA_{pol} aber nicht FlrA_{lat} beobachtet (Abb. 23 A). Daher wird im Folgenden Teil die Interaktion des polaren Hauptregulators FlrA und der MinD-ähnlichen ATPase FlhG genauer analysiert.

FlrA besteht aus folgenden drei Domänen: Receiver (Rec), AAA+-ähnliche ATPase (AAA+) und der DNA-bindenden Helix-Turn-Helix (HTH)-Domäne (Abb. 23 B). Zum Nachweis welche FlrA Domäne mit FlhG interagiert wurde von Vitan Blagotinsek (AG Bange, Marburg) *in vitro* Pulldown-Assays durchgeführt. Hierfür wurden die FlrA-Domänen Rec, AAA+-HTH oder HTH mit Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert. Die an GSH-Beads gebundenen Fusionsproteine wurden in der Anwesenheit von ATP mit FlhG inkubiert, anschließend gewaschen und mit Glutathion eluiert. Die Analyse der Eluate erfolgte über Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgele. FlhG interagiert mit den untersuchten FlrA Fragmenten AAA+-HTH und HTH (Abb. 23 C). Zur besseren Identifikation des Bindereichs der FlrA HTH-Domäne an FlhG wurden von der AG Bange *in silico*-Analysen durchgeführt (Abb. 23 B). Die *in silico*-Analysen zeigten, dass vermutlich am N-Terminus der HTH-Domäne eine kurze α -Helix und ungeordnete Schlaufe vorhanden sind. Diese kurze α -Helix und ungeordnete Schlaufe wurden zusammen Linker benannt. Das Alignment der Aminosäuresequenz von FlrA_{pol} und FlrA_{lat} zeigen eine nicht konservierte Sequenz in diesem Linkerbereich (Abb. S1). Die GST-Pulldowns von FlhG und der FlrA HTH-Domäne enthielten genau diesen Linkerbereich. Um die Funktion dieses Bereiches genauer zu untersuchen, wurden mit N-terminalen Trunkierungen von 16 (Δ N16) bzw. 36 Aminosäuren (Δ N36) der FlrA HTH-Domäne und FlhG weitere Pulldowns von Vitan Blagotinsek (AG Bange, Marburg) durchgeführt (Abb. 23 D).

Der Pulldown-Assay zeigt in der Anwesenheit von ATP eine Interaktion von FlhG mit der trunkierten GST-HTH Δ N16 Variante sowie die als Kontrolle dienende komplette HTH-Domäne. Jedoch ist bei der kürzeren GST-HTH Δ N36 Trunkierung keine Interaktion zu FlhG zu beobachten (Abb. 23 D). Dies bestätigt, dass FlhG mit der N-terminalen ungeordneten Schlaufe zwischen der AAA+ und HTH-Domäne von FlrA (Abb. 23 B, roter Bereich) interagiert. Zudem findet die Interaktion von FlhG mit FlrA nur in der Anwesenheit von ATP statt (Daten nicht gezeigt; Schwan *et al.* 2020).

Die MinD-ähnliche ATPase FlhG ist in der Lage ATP zu hydrolysieren (Schuhmacher *et al.* 2015a). Um den Einfluss der FlrA Interaktion auf die ATP-Hydrolyse von FlhG zu untersuchen, führte Wieland Steinchen (Serviceabteilung Massenspektrometrie und Elementanalytik) ATP-Hydrolyse Assays durch (Abb. 23 E). Hierfür wurde die ATPase Aktivität von FlhG alleine sowie in der Anwesenheit der FlrA HTH-Domäne bei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen untersucht. Für die Bestimmung der ATPase-Aktivität wurde die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) ermittelt. Die ATPase-Aktivität von FlhG alleine ist mit einer K_m von $0,45 \pm 0,34$ mM ATP und V_{max} von $0,08 \pm 0,02$ μ M ATP-Hydrolyse pro Minute pro μ M FlhG gering. In der Anwesenheit der FlrA HTH-Domäne steigt V_{max} um das Fünffache auf $0,48 \pm 0,04$ μ M ATP-Hydrolyse pro Minute pro μ M FlhG und einer unveränderten K_m ($0,36 \pm 0,12$ mM ATP). Dies deutet darauf hin, dass die Stimulierung der FlhG ATPase-Aktivität durch die Interaktion mit FlrA zum Wechsel vom FlhG-Homodimer zum Monomer führt (Schwan *et al.* 2020).

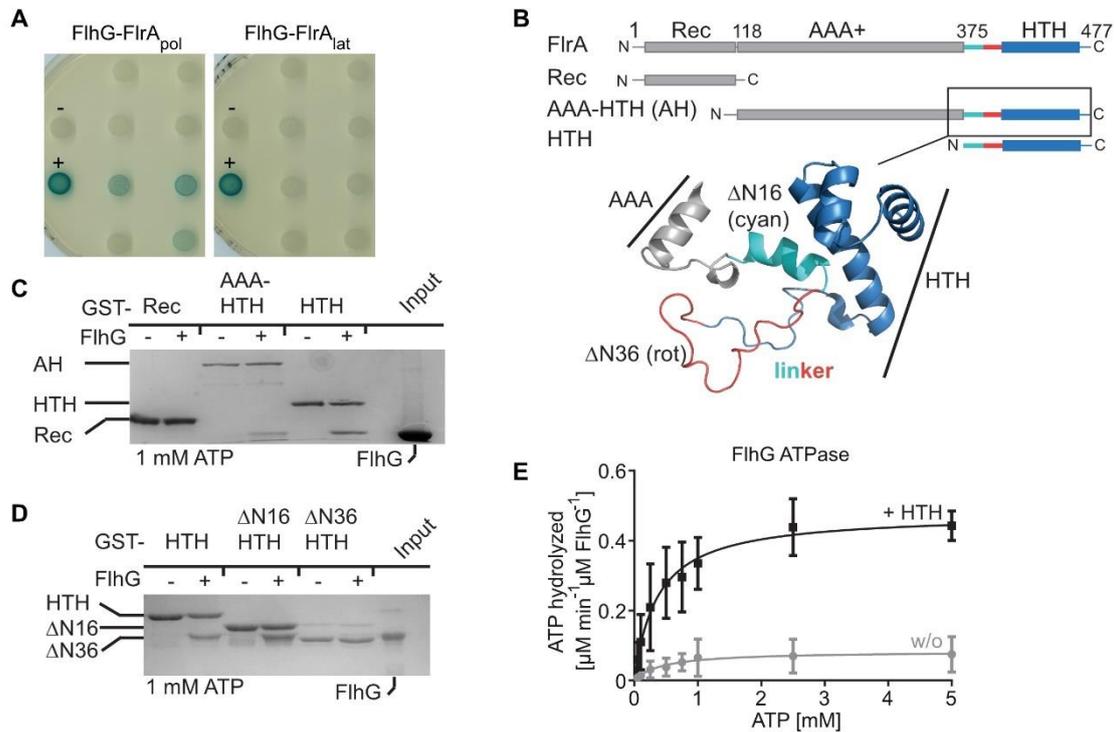


Abb. 23: Der polare Flagellenhauptregulator FliA interagiert mit der MinD-ähnlichen ATPase FliG.
A *Bacterial-Two-Hybrid* System zur Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion von FliG mit FliA des polaren (FliA_{pol}) bzw. lateralen (FliA_{lat}) Flagellensystems. Als Positivkontrolle (+) dienen Fusionen von miteinander interagierenden Leucin-Zipper an die T18 und T25 Fragmente der Adenylatzyklase, welche eine Blaufärbung der Kolonie verursacht. Für die Negativkontrolle (-) wurden die Leervektoren mit den T18- und T25-Fragment verwendet. **B** Oben: Übersicht der drei FliA-Domänen: Receiver (Rec), AAA+-ähnliche ATPase (AAA+) und Helix-Turn-Helix (HTH)-Domäne. Unten: Strukturelle Details der FliA Linkerregion und HTH-Domäne. **C** Pull-down-Assay zur Analyse der Proteininteraktion zwischen FliG und truncierten FliA-Domänen in der Anwesenheit von 1 mM ATP. FliG interagiert mit der HTH-Domäne von FliA in der Anwesenheit von ATP. **D** Pull-down-Assay zwischen FliG und der FliA HTH-Domäne in der Anwesenheit von 1 mM ATP. FliG interagiert mit der FliA HTH-Domäne bei Deletion von 16 Aminosäuren am N-Terminus (ΔN16), aber nicht bei einer Deletion von 36 Aminosäuren am N-Terminus (ΔN36). **E** ATP-Hydrolyse Assay von FliG in der Ab- bzw. Anwesenheit der FliA HTH-Domäne mit einer Reihe von verschiedener ATP Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung von technischen Triplikaten. **B-E** Die Experimente und Zusammenstellung der Abbildungen wurden von Vitan Blagotinsek (AG Bange) und Wieland Steinchen (Serviceabteilung Massenspektrometrie und Elementanalytik) durchgeführt und zur Verfügung gestellt (Schwan *et al.* 2020).

4.2.6 FliM und FliA teilen sich die gleichen FliG-Bindestellen

Die MinD-ähnliche ATPase FliG interagiert u. a. mit dem C-Ring Protein FliM und Flagellenhauptregulator FliA. Die Bindestellen von FliM (EIDAL-Motiv; Schuhmacher *et al.* 2015a) und FliA (ungeordnete Schlaufe der HTH-Domäne; Schwan *et al.* 2020) zur FliG Interaktion sind bekannt. Mit Hilfe der Wasserstoff-Deuterium-Austausch (HDX)-Massenspektrometrie (MS) wurde von Wieland Steinchen (Serviceabteilung Massenspektrometrie und Elementanalytik, SYNMIKRO, Marburg) die zur Interaktion mit FliA (Abb. 24 A) und FliM (Abb. 24 B) wichtigen Aminosäureresten von FliG analysiert (Schwan *et al.* 2020). Bei HDX-MS wird das zu untersuchende Protein (FliG) einmal mit und ohne Interaktionspartner (FliA/FliM) in deuterierten Lösungen inkubiert. Dadurch findet bei Peptidbindungsamiden ein Austausch mit schwerem Wasserstoff (Deuterium) statt und diese veränderte Peptidmasse kann nach einem Pepsinverdau von FliG mit Hilfe von MS ermittelt werden. Durch Deuterium veränderte Peptidmassen bei der Probe mit Interaktionspartner im Vergleich zur Kontrolle ohne Interaktionspartner deuten auf eine Bindungsfläche oder Konformationsänderung hin. Die HDX-MS Analysen der Interaktionen von FliG mit FliM sowie FliA zeigen beide u. a. in den Helices α_6 und α_7 eine Reduzierung von HDX (Abb. 24 A, B). Diese HDX-Reduktion lässt vermuten, dass es bei den Helices α_6 und α_7 von FliG um die Bindungsfläche von FliM sowie FliA handelt (Schwan *et al.* 2020).

Vitan Blagotinsek und Devid Mrusek (AG Bange, Marburg) identifizierten in der Bindungsstelle Aminosäurereste (K175, K205 und F213), die für die Interaktion mit FliM und/oder FlrA wichtig sein könnten (Abb. 24 C). Diese Bindestellen wurden mittels Pull-down-Assay ebenfalls von Vitan Blagotinsek und Devid Mrusek (AG Bange) verifiziert. Die Aminosäuren K175E, K205E und F213S von FlhG wurden substituiert und die Interaktion mit FlrA GST-HTH (Abb. 24 D) sowie GST-FliMN (Abb. 24 E) untersucht. Keiner dieser FlhG Mutanten kann mit der FlrA HTH-Domäne oder mit FliM interagieren. Dies zeigt, dass FlhG die gleiche Bindestelle mit FlrA und FliM teilt (Schwan *et al.* 2020).

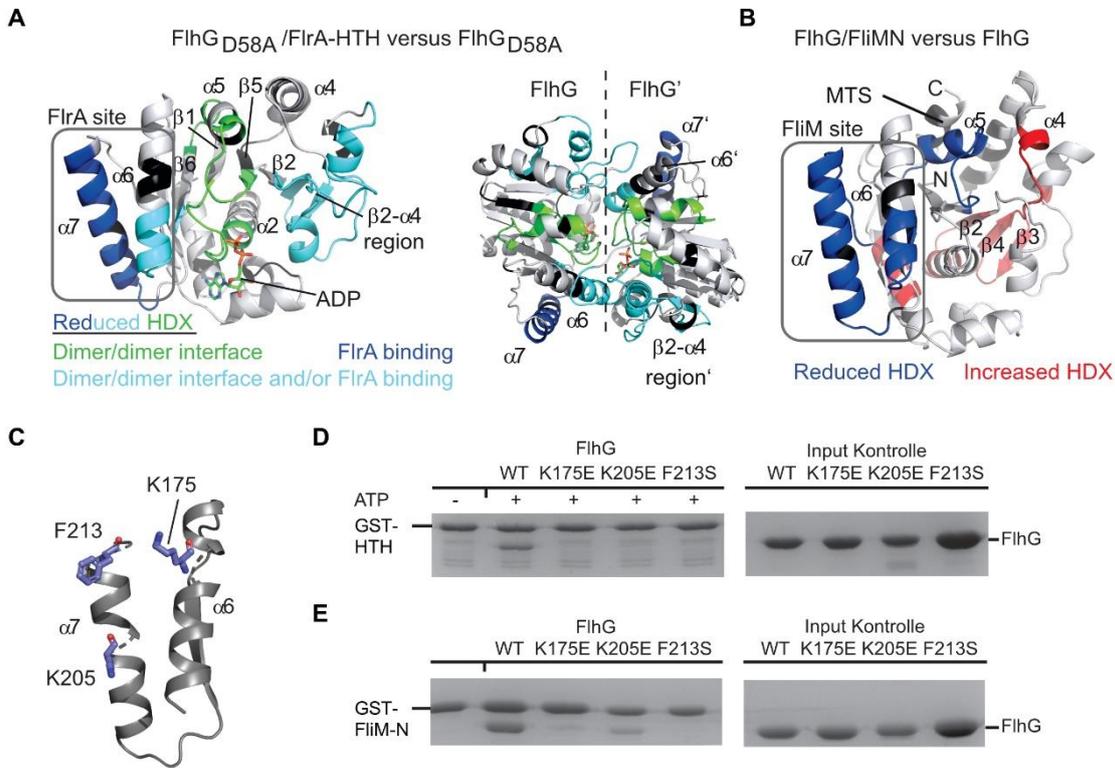


Abb. 24: C-Ring Protein FliM und flagellarer Hauptregulator FlrA teilen gleiche Bindestelle der MinD-ähnlichen ATPase FlhG. **A** Identifizierung der Interaktionsstelle von FlhG_{D58A} (FlhG liegt als ATP-gebundenes Homodimer vor) und der HTH-Domäne von FlrA mittels HDX (Links). Das FlhG-Dimer ist als FlhG-FlhG' dargestellt (rechts). **B** Identifizierung der Interaktionsstelle von FlhG und FliMN mittels HDX. **A, B** Die Daten und Abbildungen wurden von Wieland Steinchen (Serviceabteilung Massenspektrometrie und Elementanalytik) durchgeführt und zur Verfügung gestellt (Schwan *et al.* 2020). **C** Die Aminosäuren K175, K205 und F213 sind wichtig für die Interaktion von FlhG mit FliM und FlrA. **D** Pull-down-Assay zur Analyse der Proteininteraktion von FlhG und FlrA (GST-HTH) in der Anwesenheit von 1 mM ATP. **E** Pull-down-Assay zur Analyse der Proteininteraktion von FlhG und FliM (GST-FliMN) in der Abwesenheit von ATP. **C-E** FlhG Mutanten (K175E, K205E und F213S) verhindern eine Interaktion mit FlrA und FliM. Die Experimente und Zusammenstellung der Abbildungen wurden von Devid Mrusek (AG Bange) durchgeführt und zur Verfügung gestellt (Schwan *et al.* 2020).

FliM und FlrA teilen sich die gleichen Bindestellen an FlhG. Um den Unterschied dieser Interaktionen zu quantifizieren, wurden die Bindungsaffinitäten von FlhG-FliM und FlhG-FlrA mittels mikroskaligen Thermophorese (MST) von Sven Freibert (AG Lill, Marburg) untersucht (Schwan *et al.* 2020). Die Dissoziationskonstanten (K_D) der Interaktion von FlhG und FliM ($3,1 \pm 0,3 \mu\text{M}$) sowie von FlhG und FlrA-HTH ($1,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$) sind sehr ähnlich (Schwan *et al.* 2020). Neben den identischen Bindestellen von FliM und FlrA an FlhG sind auch die Bindungsaffinitäten beider Interaktionen sehr ähnlich. Der einzige Unterschied beider Interaktionen ist, dass bei den Analysen von FlrA nur in der Anwesenheit von ATP eine Bindung mit FlhG nachzuweisen war. Die Interaktion von FlhG und FliM dagegen ist unabhängig von ATP (Daten nicht gezeigt; Schwan *et al.* 2020).

4.2.7 FlhG hemmt die FlrA-abhängige Transkription

FlrA aktiviert die Genexpression einiger Flagellenbestandteile, wie z. B. den MS-Ring *fliF* (Abb. 10, Abb. 11). Ob die Interaktion von FlrA mit FlhG einen Einfluss auf die FlrA-abhängige Genexpression besitzt, wurde mit einer quantitativen Real-Time-PCR untersucht (Abb. 25 A). Hierbei erfolgte die Quantifizierung der mRNA-Menge des FlrA-abhängigen Gens *fliF*. Als Kontrolle diente die mRNA-Menge von *firA*, da der Hauptregulator nicht seine eigene Expression reguliert (Wu *et al.* 2011a). Die Transkriptlevel wurden in *S. putrefaciens* $\Delta flhG$, Überproduktion von FlhG (pBTOK FlhG), sowie in der *firA*_{L400E} Mutante, welche nicht mehr mit FlhG interagieren kann, gegen die entsprechenden Kontrollen *S. putrefaciens* WT bzw. Leervektorkontrolle (pBTOK EVC) analysiert.

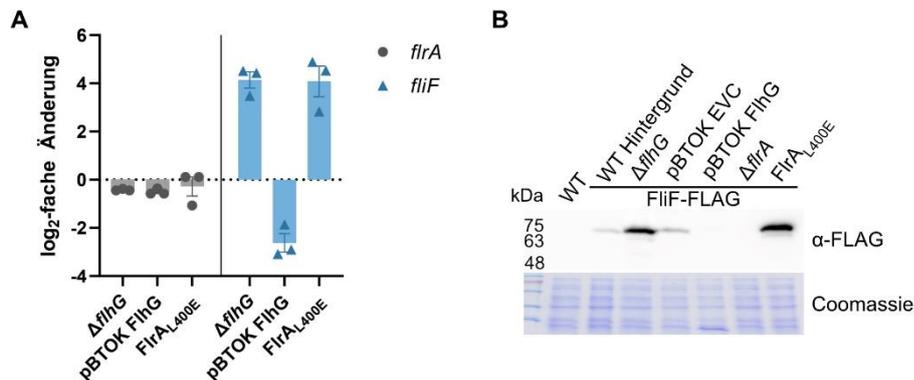


Abb. 25: FlhG-FlrA Interaktion beeinflusst negativ die FlrA-abhängige Genexpression. **A** Quantitative Real-Time PCR zeigt die Transkriptmengen von *fliF* (FlrA-abhängig) und als Kontrolle *firA* in verschiedene *S. putrefaciens* FlhG und FlrA Mutanten. Die mRNA-Level der Deletionsmutante $\Delta flhG$ und FlrA Mutante (*firA*_{L400E}), die nicht mehr mit FlhG interagieren kann, wurden mit *S. putrefaciens* WT verglichen. Bei der ektopischen Transkription von *flhG* (pBTOK FlhG) wurde die Veränderung der Transkriptmenge entsprechend mit *S. putrefaciens* Leervektor (pBTOK EVC) berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus biologischen und technischen Triplikaten (Schwan *et al.* 2020). **B** Western Blot Analyse der Proteinmenge von FliF-FLAG in *S. putrefaciens* $\Delta flhG$, pBTOK FlhG, $\Delta flrA$, *firA*_{L400E} und die entsprechenden Kontrollen. Als Ladekontrolle dient das Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgel. Transkript- als auch Proteinlevel des FlrA-abhängigen *fliF* zeigen in der Abwesenheit von *flhG* sowie bei *firA*_{L400E} einen starken Anstieg, sowie bei pBTOK FlhG eine Reduzierung der mRNA- bzw. Proteinmenge (Schwan *et al.* 2020).

Die zur Kontrolle analysierte mRNA-Menge des Hauptregulators *firA* zeigt keine Veränderung in den untersuchten Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 25 A). Die FlrA-abhängige Transkriptmenge von *fliF* ist im Vergleich zum WT bei $\Delta flhG$ erhöht und bei der ektopischen Expression von *flhG* verringert. Wenn die Interaktion von FlrA und FlhG bei der Mutante *firA*_{L400E} verhindert ist, kann wie bei $\Delta flhG$ eine Steigerung der *fliF* mRNA-Menge detektiert werden. Zum Bestätigen der veränderten Transkriptlevel erfolgte die Bestimmung der Proteinlevel von FliF mittels Western Blot (Abb. 25 B). Hierfür wurde chromosomal ein 3xFLAG C-terminal an *fliF* fusioniert und in diversen Hintergrundstämmen mit verschiedenen FlhG und FlrA Mengen analysiert. *S. putrefaciens* $\Delta flhG$ sowie *firA*_{L400E} zeigen im Vergleich zum WT Hintergrund eine fünffach erhöhte Menge an FliF-FLAG bei der Quantifizierung des Western Blots. Dagegen sind bei pBTOK FlhG als auch $\Delta flrA$ keine Mengen an FliF-FLAG zu detektieren. Diese Beobachtungen stimmen mit den veränderten Transkriptmengen überein. Die Interaktion von FlhG und FlrA besitzt einen negativen Einfluss auf die FlrA-abhängige Genexpression.

4.2.8 FlhG-Bindestelle bei FlrA beeinflusst Flagellenlokalisierung und -anzahl

Die Mutante FlhG_{K175E}, welche u. a. nicht mehr mit dem Hauptregulator FlrA interagieren kann, zeigt eine polare Hyperflagellierung (Abb. 22). Jedoch kann FlhG_{K175E} neben FlrA auch keine Interaktion mit dem C-Ring Protein FlhM aufweisen (Abb. 24 D, E). Um den Flagellierungsphänotyp bei *S. putrefaciens* bei Verhinderung der FlhG-FlrA Interaktion zu verifizieren, wurde die FlhG-Bindestelle bei FlrA deletiert. Mittels Pull-down-Assays konnte Vitan Blagotinsek (AG Bange) die Interaktionsstelle auf den Linkerbereich der FlrA HTH-Domäne (Aminosäuren 389 bis 409) eingrenzen (Abb. 23 B-D). Dieser Bereich von 20 Aminosäuren (FlrA_{Δ389-409}) wurde in einem *S. putrefaciens* Stamm deletiert, der durch Cysteinaustausche bei den Flagellinen FlaAB eine Flagellenfärbung ermöglicht (Abb. 26 A).

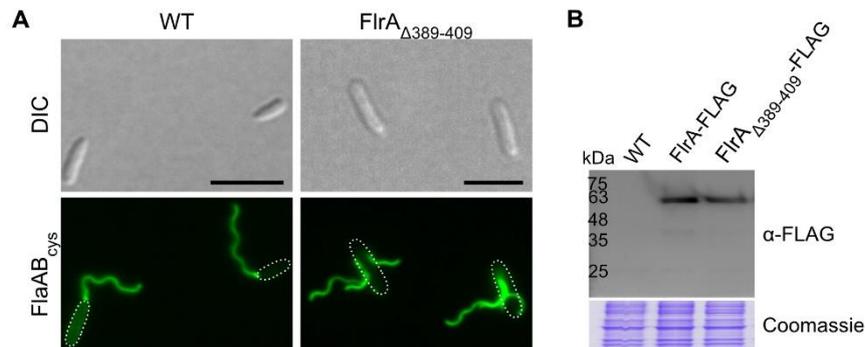


Abb. 26: Deletion der FlhG Interaktionsstelle bei FlrA beeinflusst Flagellierungsmuster. **A** Flagellenfärbung mit Hilfe eines Cysteinaustausches der Flagelline (FlaAB_{cys}) und dem grün fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 488 Maleimide. Die Deletion der FlhG-Interaktionsstelle bei FlrA (FlrA_{Δ389-409}) führt bei *S. putrefaciens* zu einer Hyperflagellierung bei der die Flagellen über den gesamten Zellkörper verteilt sind. Die Skala entspricht 5 μ m (Schwan *et al.* 2020). **B** Western Blot Analyse der Proteinlevel von FlrA und FlrA_{Δ389-409} mit je einem C-terminalen FLAG-Anhang. Als Ladekontrolle dient das Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgel. Die FlrA-Mutante zeigt im Vergleich zum nativen FlrA keine veränderte Proteinmenge (Schwan *et al.* 2020).

S. putrefaciens WT weist eine monopolare Flagelle auf und die Mutante FlhG_{K175E} eine polare Hyperflagellierung. Die Flagellenfärbung von *S. putrefaciens* flrA_{Δ389-409} zeigt ein anderes Flagellierungsmuster. Die Mutante besitzt viele Flagellen, die nicht polar lokalisieren, sondern um den ganzen Zellkörper verteilt sind (Abb. 26 A; Schwan *et al.* 2020). Eine veränderte FlrA-Menge kann Einfluss auf die Flagellierung nehmen. Die Deletionsmutante Δ flrA ist nicht mehr in der Lage eine Flagelle aufzubauen und die ektopische Expression von flrA zeigt eine polare Hyperflagellierung (Abb. 16 A). Daher wurde untersucht, ob eine veränderte FlrA-Proteinmenge bei der FlrA_{Δ389-409} Mutante vorliegt. Hierfür erfolgte eine C-terminale FLAG Fusion von FlrA bzw. FlrA_{Δ389-409} und eine anschließende Analyse mittels Western Blot (Abb. 26 B). Im Vergleich der FlrA-Mutante zur nativen FlrA-Menge ist kein Unterschied im Proteinlevel zu beobachten.

Der deletierte Bereich FlrA_{Δ389-409} liegt direkt neben der HTH-Domäne. Die HTH-Domäne interagiert mit der DNA und FlrA kann dadurch die Transkription aktivieren. Um auszuschließen, dass die Deletion des Linkerbereiches einen Einfluss z. B. durch veränderte Proteinfaltung auf die Aktivität von FlrA besitzt, wurde dieser Linkerbereich weiter untersucht. Mögliche Aminosäuren (E393, R397, D398, L400 und E408), die eine Rolle bei der Interaktion von FlrA und FlhG spielen können, wurden von der AG Bange identifiziert. Daraufhin erfolgte ein chromosomaler Austausch von flrA zu den Substitutionsmutanten E393R, R397E, D398R, L400E und E408R. Die Flagellierungsphänotypen wurden mittels Flagellenfärbungen analysiert (Abb. 27).

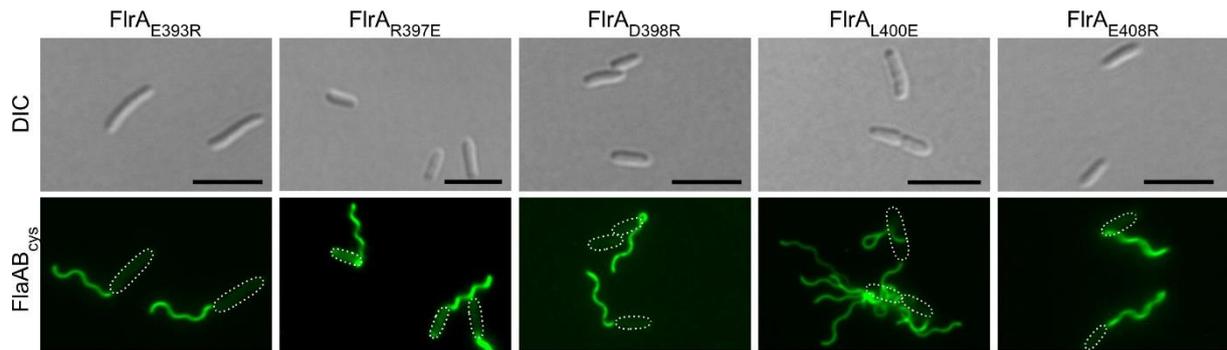


Abb. 27: Aminosäure L400 von FliA ist für Interaktion mit FliG essenziell. Flagellenfärbung mit Hilfe eines Cysteinausstausches der Flagelline (FlaAB_{cys}) und dem grün fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 488 Maleimide. Nur Aminosäure L400 von FliA zeigt eine delokalisierte Hyperflagellierung bei den untersuchten Aminosäureresten, welche für die Interaktion mit FliG wichtig sein könnten. Die Skala entspricht 5 μm (Schwan *et al.* 2020).

Die Flagellenfärbungen zeigen eine WT ähnliche monopolare Flagellierung bei den FliA-Mutanten mit folgenden Substitutionen E393R, R397E, D398R und E408R. Diese scheinen keine Rolle bei der Interaktion von FliA und FliG zu spielen. Nur die Mutante FliA_{L400E} weist wie FliA Δ ₃₈₉₋₄₀₉ eine delokalisierte Hyperflagellierung auf (Abb. 27). Die Aminosäure L400 ist essenziell für die FliA-FliG Interaktion.

Bei der quantitativen Real-Time-PCR (Abb. 25 A) wurde die Hemmung der FliA-abhängigen Genexpression durch die Interaktion von FliG mit FliA beobachtet. Dies kann auch über die Flagellierungsphänotypen gezeigt werden. Die Deletion von *fliG* (Abb. 22) als auch die Überproduktion von FliA (Abb. 16 A) weisen eine polare Hyperflagellierung auf. Dagegen zeigt *S. putrefaciens* bei Deletion von *fliA* (Abb. 16 A) sowie bei ektopischer Expression von *fliG* (pBTOK FliG) keine bzw. nur sehr wenige flagellierte Zellen (Abb. 28). Die Eigenschaft der variablen Flagellierungsphänotypen wurde im Folgenden genutzt, um den Einfluss von FliG auf die FliA-abhängige Genexpression zu verifizieren. Die *S. putrefaciens* FliA_{L400E} Mutante kann nicht mehr mit FliG interagieren und sollte auch bei einem hohen FliG-Level weiterhin eine delokalisierte Hyperflagellierung besitzen. Daher wurde in die Mutante FliA_{L400E} das Plasmid pBTOK FliG zur ektopischen Expression von *fliG* konjugiert (Abb. 28).

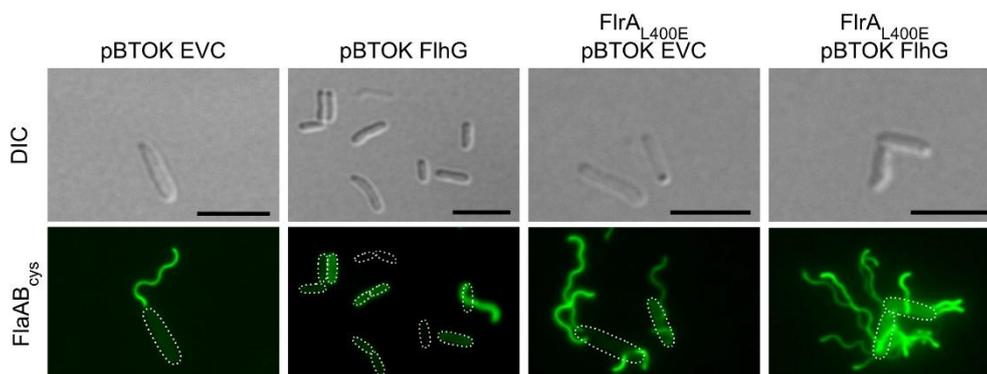


Abb. 28: Ektopische Produktion von FliG besitzt keinen Einfluss auf Flagellierung bei FliA_{L400E} Mutante. Flagellenfärbung mit Hilfe eines Cysteinausstausches der Flagelline (FlaAB_{cys}) und dem grün fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 488 Maleimide. Bei ektopischer Expression von *fliG* (pBOTK FliG) ist *S. putrefaciens* nicht mehr in der Lage eine Flagelle zu bilden. Allerdings in der FliA_{L400E} Mutante zeigt pBTOK FliG keine Änderung der Flagellierung im Vergleich zur Leervektorkontrolle (pBTOK EVC). Die Skalen entsprechen 5 μm (Schwan *et al.* 2020).

Die Leervektorkontrolle pBTOK EVC als auch pBTOK FliG in *S. putrefaciens* FliA_{L400E} weisen beide eine delokalisierte Hyperflagellierung auf. Die FliA_{L400E}-Mutante, welche keine Interaktion von FliA und FliG besitzt, hat auch durch ein hohes Level an FliG keine veränderte Flagellierung. Dies bestätigt auch nochmals die Bindestelle von FliG an FliA, da sonst eine nicht flagellierte Zelle wie bei einer

Überproduktion von FlhG im WT Hintergrund beobachtet worden sein müsste. Zudem führt die Interaktion von FlrA und FlhG zu einer Inhibition der FlrA-abhängigen Transkription (Schwan *et al.* 2020).

4.2.9 Erhöhte Proteinlevel von FlhF und FlhG bei *S. putrefaciens* *flrA*_{L400E}

Die MinD-ähnliche ATPase FlhG ist ein wichtiger Faktor für die Regulation der Flagellenanzahl (Abb. 22; Schuhmacher *et al.* 2015a). Für die Lokalisierung der Flagelle in *S. putrefaciens* ist die SRP-GTPase FlhF verantwortlich (Rossmann *et al.* 2015). Die *FlrA*_{L400E} Mutante besitzt viele Flagellen die um den Zellkörper lokalisiert sind und somit eine Kombination aus Deletionsphänotypen von *flhG* und *flhF*. Daher wurden im nächsten Schritt in *S. putrefaciens* beide wichtige Regulationsfaktoren *flhF* und *flhG* ($\Delta flhFG$) deletiert und die Flagellierung überprüft (Abb. 29A).

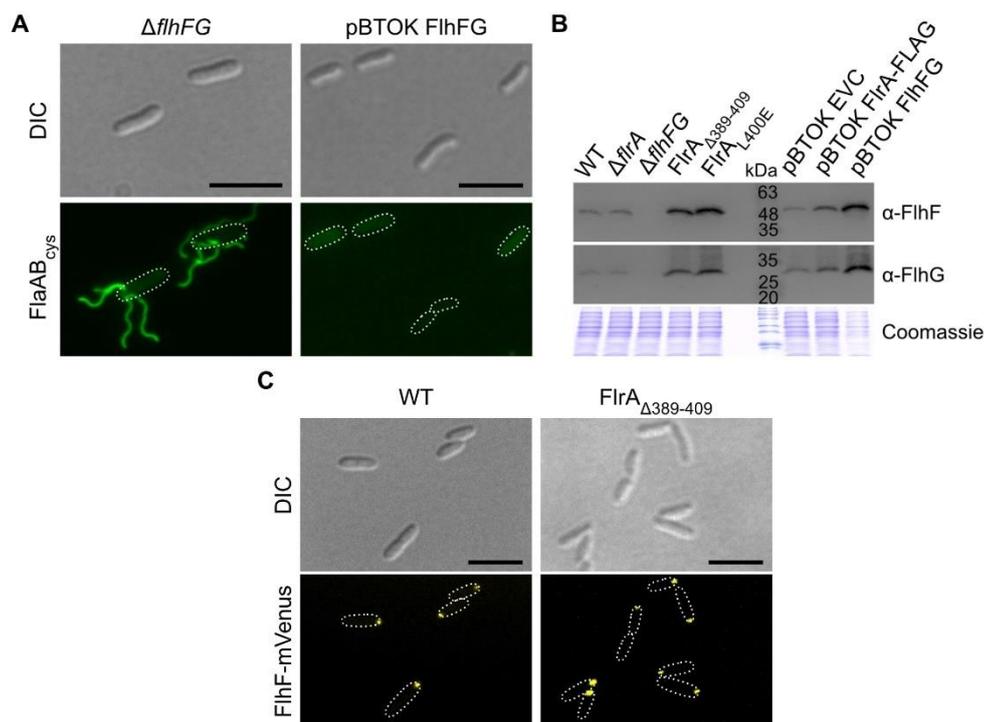


Abb. 29: Einfluss von FlhF und FlhG auf die Flagellierung von *S. putrefaciens*. **A** Flagellenfärbung mit Hilfe eines Cysteinausstausches der Flagelline (FlaAB_{cys}) und dem grün fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 488 Maleimide. Eine Deletion der SRP-GTPase *flhF* und MinD-ähnlichen ATPase *flhG* ($\Delta flhFG$) zeigt eine delokalisierte Hyperflagellierung. *S. putrefaciens* Stamm mit ektopischer Expression von *flhFG* (pBTOK FlhFG) sind nicht in der Lage Flagellen auszubilden. Die Skala entspricht 5 μ m (Schwan *et al.* 2020). **B** Western Blot Analyse der Proteinmengen von FlhF und FlhG in *S. putrefaciens* Stämmen mit Deletion ($\Delta flrA$, $\Delta flhFG$) bzw. ektopischer Expression (pBTOK FlrA-FLAG, pBTOK FlhFG) des Hauptregulators *flrA* sowie *flhF* und *flhG*. Ebenso wurden die Proteinmengen von FlhF und FlhG bei den Mutanten *flrA* $\Delta_{389-409}$ und *flrA*_{L400E} untersucht. Als Ladekontrolle dient das Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgel. FlrA $\Delta_{389-409}$ und FlrA_{L400E} zeigen auch im Vergleich mit der ektopischen Produktion von FlrA eine erhöhte FlhF- und FlhG-Menge (Schwan *et al.* 2020). **C** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von FlhF-mVenus in *S. putrefaciens* WT und *flrA* $\Delta_{389-409}$. FlhF zeigt auch eine polare Lokalisierung bei dem Stamm mit der delokalisierten Hyperflagellierung. Die Skalen entsprechen 5 μ m.

S. putrefaciens $\Delta flhFG$ besitzt viele Flagellen, die um den ganzen Zellkörper verteilt sind (Abb. 29 A). Dieser peritriche Flagellierungsphänotyp ist identisch mit der *FlrA*_{L400E}-Mutante, die ebenfalls eine delokalisierte Hyperflagellierung aufweist (Abb. 27). Um zu überprüfen, ob die Flagellierung der *FlrA*_{L400E}-Mutante auf eine nicht vorhandene Genexpression von *flhFG* zurückzuführen ist, wurden die Proteinmengen von FlhF und FlhG bei verschiedenen Mutanten mittels Western Blot analysiert (Abb. 29 B). Die Proteinmengen von FlhFG sind bei *S. putrefaciens* $\Delta flrA$ im Vergleich zum WT wie auch in Abb. 11 nicht verändert. Allerdings sind bei den Mutanten *S. putrefaciens* *flrA*_{L400E} und *flrA* $\Delta_{389-409}$ die Proteinlevel von FlhFG dreifach erhöht. Ebenfalls ist die FlhFG-Menge bei einer ektopischen Expression

von *fliA* (pBTOK FlrA-FLAG) im Vergleich zur Leervektorkontrolle (pBTOK EVC) erhöht. Allerdings führt eine ektopische Transkription von *fliHFG* (pBTOK FlhFG) bei *S. putrefaciens* zu einer nicht flagellierten Zelle (Abb. 29 A). Dies ist auch bei einer ektopischen Produktion von nur FlhG zu beobachten (Abb. 28), da FlhG die FlrA-abhängige Genexpression negativ beeinflusst (Schwan *et al.* 2020). Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob FlhF eine Rolle bei der delokalisierten Hyperflagellierung spielt. Hierfür wurde FlhF mit dem gelb fluoreszierenden Fluorophor mVenus fusioniert und in *S. putrefaciens flrA Δ 389-409* konjugiert (Abb. 29 C). Bei der polaren FlhF-mVenus Lokalisierung ist kein Unterschied von *S. putrefaciens flrA Δ 389-409* im Vergleich zum WT zu beobachten. Somit spielt FlhF keine Rolle bei dem Phänotyp der delokalisierten Hyperflagellierung.

4.2.10 *S. putrefaciens* Mutanten können bis zu acht Flagellen ausbilden

Die *S. putrefaciens* Mutanten FlrA Δ 389-409, FlrA Δ L400E und Δ fliHFG besitzen alle eine delokalisierte Hyperflagellierung. Zur besseren Betrachtung der Lokalisierung sowie Flagellenanzahl wurde das Hakenprotein FlgE mit dem fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 488 über einen Cysteinaustausch markiert (Abb. 30 A).

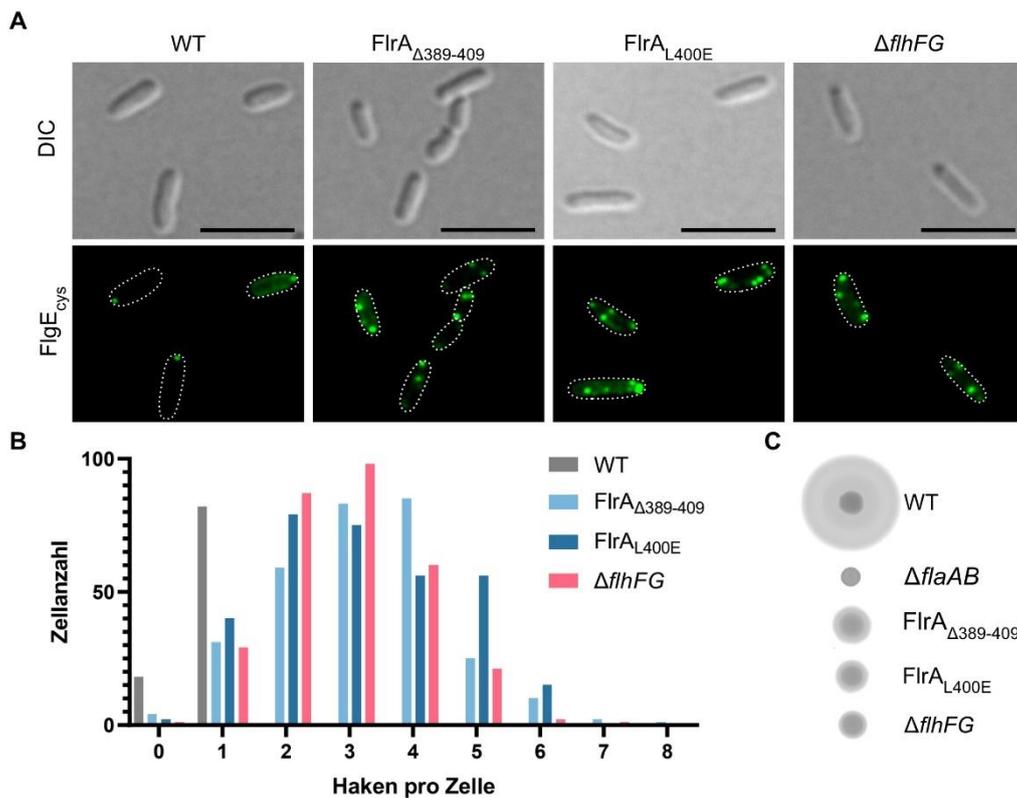


Abb. 30: Delokalisierte Hyperflagellierung beeinflusst das Schwimmverhalten. **A** Hakenfärbung mit Hilfe eines Cysteinaustausches bei dem Hakenproteins (FlgE_{cys}) und dem grün fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 488 Maleimide. Alle untersuchten Mutanten FlrA Δ 389-409, FlrA Δ L400E und Δ fliHFG zeigen eine delokalisierte Hyperflagellierung. Die Skala entspricht 5 μ m (Schwan *et al.* 2020). **B** Quantifizierung der Anzahl an Haken pro Zelle bei *S. putrefaciens* WT (n=100) und den Mutanten (n=300) FlrA Δ 389-409, FlrA Δ L400E und Δ fliHFG. Die Mutanten weisen bis zu 8 Haken pro Zelle auf (Schwan *et al.* 2020). **C** Ausbreitungsradien der *S. putrefaciens* Stämme von A sowie als Negativkontrolle eine Deletion der Flagelline (Δ fliAB) auf Weichagarplatten. *S. putrefaciens* ist nicht in der Lage effizient mit einer peritrichen Flagellierung auf Weichagarplatten zu schwimmen.

S. putrefaciens WT weist nur einen polaren Haken auf. Alle drei Mutanten FlrA Δ 389-409, FlrA Δ L400E und Δ fliHFG zeigen über den Zellkörper verteilte Haken (Abb. 30 A). Die meisten Zellen der Mutanten besitzen 2 bis 4 Haken pro Zelle, aber die Anzahl kann bis auf acht Haken pro Zelle steigen (Abb. 30 B;

Schwan *et al.* 2020). Welchen Einfluss diese delokalisierte Hyperflagellierung auf das Schwimmverhalten hat, wurde mit Hilfe von Weichagarplatten untersucht (Abb. 30 C). Alle drei Mutanten FlrA Δ 389-409, FlrA Δ L400E und Δ flhFG zeigen im Vergleich zum WT eine geringe Ausbreitung auf Weichagarplatten. Aber die Stämme sind noch in der Lage zu schwimmen im Vergleich zur Negativkontrolle, bei der die Flagelline (Δ flaAB) deletiert wurden.

4.2.11 FlhG-FlrA-Komplex lokalisiert vermutlich in der Teilungsebene

Zur besseren Untersuchung der Lokalisierung von Proteinen wurde in Kooperation mit Benjamin Mayer (AG Graumann, Marburg) eine mikroskopische Einzelpartikelverfolgung (*single molecule tracking*) in Echtzeit für *S. putrefaciens* durchgeführt. Hierfür erfolgte die Fusion der MinD-ähnlichen ATPase FlhG und dem Flagellenhauptregulator FlrA mit einem gelb fluoreszierenden Protein mVenus. Die Proteine FlhG-mVenus und FlrA-mVenus wurden in der exponentiellen Phase in Echtzeit mikroskopisch verfolgt. Die Auswertung erfolgte von Benjamin Mayer (AG Graumann) mit der Software SMTracker (Rösch *et al.* 2018). Zur Visualisierung der FlhG-mVenus und FlrA-mVenus Lokalisierungen wurde eine Heatmap erstellt (Abb. 31).

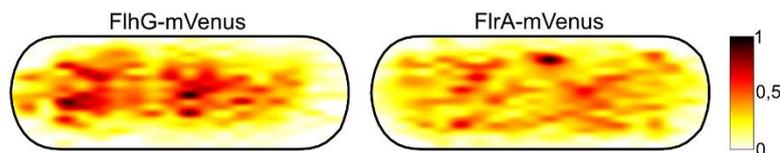


Abb. 31: FlhG-FlrA Komplex verweilt vermutlich in Teilungsebene. Mikroskopische Einzelpartikelverfolgung von *S. putrefaciens flhG-mVenus* und *S. putrefaciens flrA-mVenus* in der exponentiellen Phase. Eine hohe Anzahl an Lokalisierungen sind in Dunkelrot (1) und keine bzw. eine geringe Wahrscheinlichkeit an Proteinaufhalten sind in weiß/gelb (0) dargestellt. Die Auswertung erfolgte mit der Software SMTracker (Rösch *et al.* 2018). Die Daten wurden von Benjamin Mayer (AG Graumann, Marburg) zur Verfügung gestellt.

Die Einzelpartikelverfolgung von FlhG-mVenus zeigt eine Lokalisierung in der Mitte der Zelle, welche der Teilungsebene entspricht, ein weiteres Cluster befindet sich Richtung Zellpol. Am Zellpol direkt lokalisiert FlhG-mVenus nur wenig. Dagegen zeigt FlrA-mVenus eine fast gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung und direkt an den Polen sind kaum Lokalisierungen von FlrA zu beobachten. Eine starke Lokalisierung von FlrA-mVenus ist wie bei FlhG-mVenus in der Zellteilungsebene sichtbar. Da die Lokalisierung von FlhG und FlrA nicht zusammen, sondern einzeln in je einem Stamm analysiert wurden, kann die Lokalisierung des FlhG-FlrA-Komplexes nicht bestimmt werden.

4.2.12 Einfluss von FlhG Mutanten auf FlhG Lokalisierung und Flagellierung

Die MinD-ähnliche ATPase FlhG scheint neben dem negativen Einfluss auf die FlrA-abhängige Genexpression noch andere Funktionen zu besitzen. Mit einigen *S. putrefaciens* Stämmen sollten weitere FlhG-Mutanten hinsichtlich der Flagellierung durch Filament- und Hakenfärbung sowie FlhG Lokalisierung untersucht werden. Ein weiterer Interaktionspartner von FlhG ist die SRP-GTPase FlhF (Bange *et al.* 2011). Die ersten 20 N-terminalen Aminosäuren von FlhG (FlhG Δ N20) sind für die Interaktion mit FlhF verantwortlich. Diese Interaktion führt zur Stimulation der FlhF GTPase-Aktivität (Rossmann *et al.* 2015). Die Verhinderung der Interaktion von FlhG und FlhF bei dem Stamm *S. putrefaciens flhG* Δ N20 führt zu einer polaren Hyperflagellierung, wie bei einer *flhG* Deletion (Rossmann *et al.* 2015). Zum Überprüfen, ob FlhG Δ N20 überhaupt noch eine polare Lokalisierung aufweist, wurde die FlhG Variante C-terminal mit sfGFP fusioniert (Abb. 32). FlhG Δ N20-sfGFP zeigt im Vergleich zum nativen FlhG-sfGFP (\approx 20 %) eine etwas stärkere polare Lokalisierung von 36 % (Abb. S 7). In diesem N-terminalen Bereich ist die 5. Aminosäure (FlhG $_{Q5}$), welche für Glutamin codiert, für die Stimulation der FlhF GTPase-Aktivität verantwortlich (Bange *et al.* 2011). Auch diese FlhG $_{Q5A}$ -sfGFP Mutante weist mit 48 % eine

stärkere polare Lokalisierung als der WT. Ebenso ist bei der FlhG_{Q5A} Variante eine polare Hyperflagellierung zu beobachten (Abb. 32, Abb. S 6).

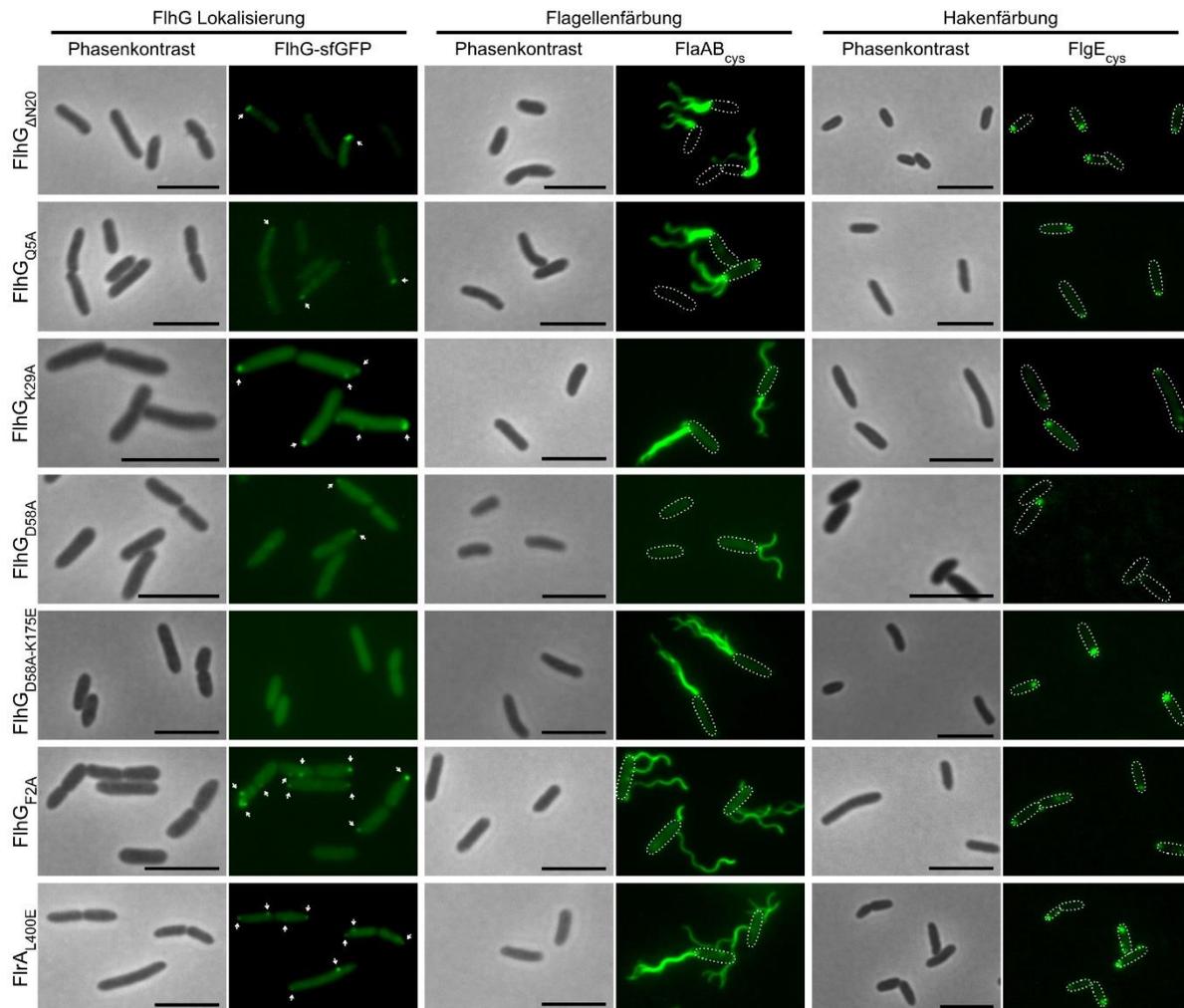


Abb. 32: FlhG Mutanten beeinflussen die Flagellenanzahl und -lokalisierung. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der mit CF 488 Maleimide gefärbten Filamenten FlaAB_{cys} (mitte) und Haken FlgE_{cys} (rechts), die Lokalisierung der FlhG-sfGFP Mutanten (links) sowie die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen. Die Quantifizierung der Fluoreszenzaufnahmen bezüglich der Anzahl und / oder Lokalisierung von FlhG-sfGFP, Flagellen und Haken sind im Anhang (Abb. S 6, Abb. S 7) zusammengestellt. Die Skalen entsprechen 5 µm.

FlhG kann sowohl als Monomer, als auch als ATP-gebundenes Homodimer vorliegen (Schuhmacher *et al.* 2015a). Die Mutante FlhG_{K29A} ist nicht mehr in der Lage ein Dimer zu bilden sowie ATP zu hydrolysieren (Schuhmacher *et al.* 2015a). *S. putrefaciens flhG_{K29A}-sfGFP* zeigt neben polar lokalisierten auch über den Zellkörper verteilte FlhG Fluoreszenzspots (Abb. 32). Bei 22 % der Zellen existieren zwei oder mehr FlhG Lokalisierungen (Abb. S 7). Dagegen kann die Mutante FlhG_{D58A} ein ATP-gebundenes Homodimer bilden, aber keine ATP-Hydrolyse durchführen (Schwan *et al.* 2020). Diese FlhG_{D58A}-sfGFP Variante zeigt hinsichtlich der Lokalisierung keinen Unterschied zum nativen FlhG-sfGFP. Allerdings sind die meisten *S. putrefaciens flhG_{D58A}* Zellen nicht mehr in der Lage eine Flagelle zu assemblieren. Nur 11 % der Zellen besitzen ein polares Flagellum und bei ca. 4 % der Zellen wurden mindestens zwei polare Flagellen beobachtet (Abb. S 6).

Die physiologische Funktion der C-terminalen *membrane targeting sequence* (MTS)-Domäne der MinD-ähnlichen ATPase FlhG wurde ebenfalls analysiert. In Schuhmacher *et al.* (2015a) wurde bereits für *S. putrefaciens* beschrieben, dass die konservierten Phenylalanine 275 und 276 (F2) der MTS von FlhG für die Membranassoziation verantwortlich sind. Zur weiteren Untersuchung der MTS-Domäne erfolgte

auch hier die Fusion von FlhG_{F2A} mit sfGFP zur Bestimmung der Lokalisierung sowie Flagellen- und Hakenfärbung (Abb. 32, Abb. S 6, Abb. S 7). Bei Verhinderung der Lipidinteraktion von FlhG sind bei 50 % der Zellen mindestens zwei FlhG_{F2A}-sfGFP Spots zu erkennen, die auch über den ganzen Zellkörper verteilt sind. Auch die Haken- und Flagellenfärbungen zeigen viele Flagellen bzw. Haken, die über den ganzen Zellkörper lokalisiert sind.

4.2.13 FlhG MTS-Domäne wichtig für eine monopolare Flagellierung

Mutationen in der MTS-Domäne der MinD-ähnlichen ATPase FlhG führen bei dem monopolar flagellierten *S. putrefaciens* zu einer peritrichen Flagellierung. Um diesen Phänotyp weiter zu untersuchen, wurden Doppel- und Dreifachmutanten generiert und diese auf die FlhG Lokalisierung, sowie Flagellenanzahl als auch Flagellenlokalisierung mikroskopisch analysiert (Abb. 33, Abb. S 6, Abb. S 7). Zuerst wurden die Doppelmutanten *S. putrefaciens flhG_{F2A-K175E}* sowie *S. putrefaciens flhG_{F2A flhM Δ EIDAL}*, welche neben der MTS-Mutation keine Interaktion von FlhG und dem C-Ring Protein FliM besitzen. Beide Stämme zeigen in der FlhG Positionierung unterschiedliche Lokalisierungen auf. Bei der Doppelmutante FlhG_{F2A-K175E} kann keine polare FlhG-Lokalisierung beobachtet werden. Zudem zeigen die Zellen hauptsächlich eine polare Hyperflagellierung. Jedoch weist *S. putrefaciens flhG_{F2A flhM Δ EIDAL}* eine polare, aber auch zufällige lokalisierte FlhG_{F2A}-sfGFP Lokalisierung auf. Bei ca. 30 % dieser Zellen ist auch eine delokalisierte Hyperflagellierung zu beobachten. Somit ähnelt die FlhG_{F2A-K175E}-Mutante den *S. putrefaciens* Stämmen, die keinen FlhG Transport durch FliM an den Zellpol besitzen (Abb. 22) und *S. putrefaciens flhG_{F2A flhM Δ EIDAL}* zeigt mehr Ähnlichkeit mit *S. putrefaciens flhG_{F2A}*.

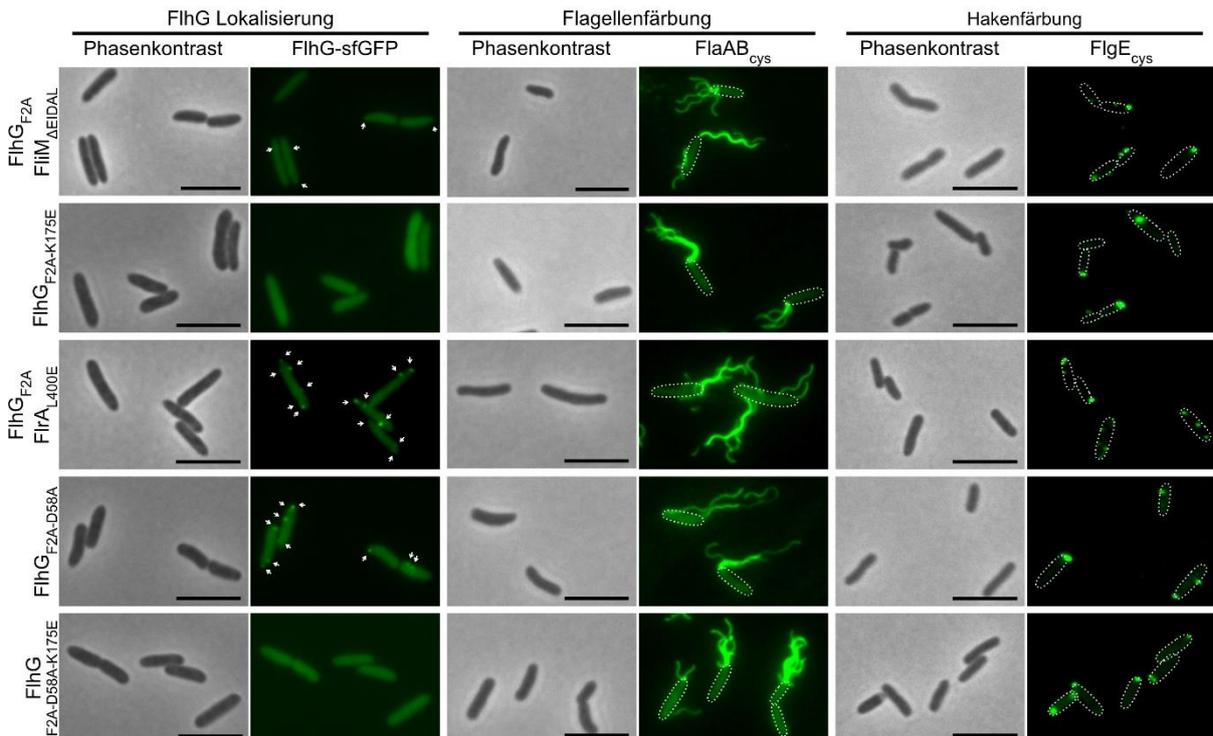


Abb. 33: Einfluss MTS-Domäne von FlhG auf die Flagellenassemblierung. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der mit CF 488 Maleimide gefärbten Filamenten FlaAB_{cys} (mitte) und Haken FlgE_{cys} (rechts), die Lokalisierung der FlhG-sfGFP Mutanten (links) sowie die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen. Die Quantifizierung der Fluoreszenzaufnahmen bezüglich der Anzahl und / oder Lokalisierung von FlhG-sfGFP, Flagellen und Haken sind im Anhang (Abb. S 6, Abb. S 7) zusammengestellt. Die Skalen entsprechen 5 μ m.

Die FlhG_{F2A-D58A} Variante kann keine ATP-Hydrolyse durchführen und auch nicht mehr mit Lipiden interagieren. Diese FlhG Mutationen weisen in etwa den gleichen Phänotyp wie FlhG_{F2A} auf. Ca. 35 % der

Zellen mit FlhG_{F2A-D58A}-sfGFP zeigen delokalisierte und zum Teil mehrere FlhG Lokalisierungen (Abb. S 7). Auch die Flagellierung ist bei diesem Stamm delokalisiert und über den ganzen Zellkörper verteilt. Allerdings ist bei der Dreifachmutante FlhG_{F2A-D58A-K175E} wieder ein ähnlicher Phänotyp wie bei FlhG_{K175E} zu beobachten. Diese FlhG Dreifachmutante lokalisiert nur diffus im Zytoplasma und besitzt eine polare Hyperflagellierung. Die Doppelmutation von FlhG_{F2A} sowie die Substitution des Hauptregulators FlrA (FlrA_{L400E}), der nicht mehr mit FlhG interagieren kann, weist eine delokalisierte Hyperflagellierung sowie mehrere und über den Zellkörper verteilte Lokalisierungen von FlhG_{F2A}-sfGFP auf. Diese Analysen zur Flagellierung zeigt, dass je nach Mutationen unterschiedliche Phänotypen von nicht flagelliert, über lophotrich bis zur peritrichen Flagellierung vorkommen können. Wenn FlhG den Zellpol nicht erreicht, aber auch keine Interaktion von FlhG und FlhF stattfinden kann, ist eine polare Hyperflagellierung zu beobachten. Erst wenn FlhG keine Homodimere bildet, mit der Zellmembran oder mit dem Hauptregulator FlrA interagiert, kommt es bei *S. putrefaciens* zu einer delokalisierten Hyperflagellierung.

4.2.14 Delokalisierte Hyperflagellierung ist in *S. putrefaciens* flhG_{F2A} und flrA_{L400E} ohne Muster

Der monopolar flagellierte *S. putrefaciens* kann bei entsprechenden Mutationen eine peritriche Flagellierung erhalten. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Lokalisierung der Flagellen geordnet oder doch zufällig stattfindet. Zum Erkennen, ob ein Muster der Flagellenplatzierung ersichtlich ist, wurde eine mehrfarbige Hakenfärbung bei *S. putrefaciens* flhG_{F2A} sowie *S. putrefaciens* flrA_{L400E} durchgeführt (Abb. 34). Hierzu erfolgte die Fluoreszenzfärbung von FlgE_{cys} zuerst mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff CF488 Maleimide. Anschließend wurden die Zellen in LB Medium aufgenommen und für weitere 20 min bei 30°C kultiviert. Daraufhin erfolgte eine zweite Hakenfärbung mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 568 Maleimide, um alle neu assemblierten Flagellen bzw. Haken zu identifizieren (Abb. 34).

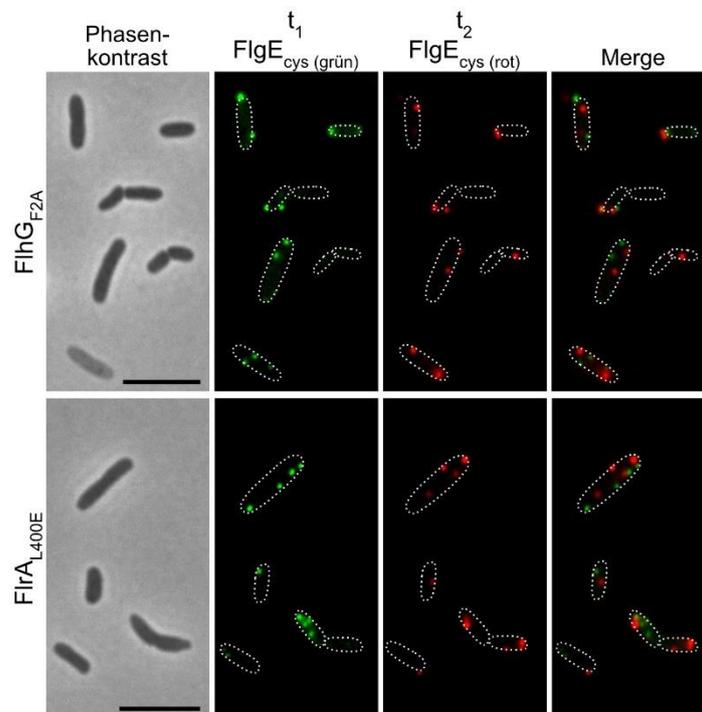


Abb. 34: Delokalisierte Hyperflagellierung ist eine zufällige Anordnung der Flagellen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der zuerst mit dem Grün fluoreszierenden Farbstoff (CF 488 Maleimide) und nach weiterem Wachstum mit Rot fluoreszierendem Farbstoff (Alexa Fluor 568 Maleimide) gefärbten Haken FlgE_{cys} bei *S. putrefaciens* flhG_{F2A} sowie *S. putrefaciens* flrA_{L400E}. Die Skalen entsprechen 5 µm.

Die peritrichen *S. putrefaciens* Mutanten zeigen bei den polar lokalisierten Haken grüne und rote Fluoreszenzspots. Auch alle weiteren Haken, die über den Zellkörper verteilt sind zeigen sowohl rote als auch grüne Fluoreszenzspots. Einige Zellen besitzen auch nur an lateralen Stellen Flagellen. Es lässt sich kein Muster für die Lokalisierung der Flagellen erkennen, z. B. immer zuerst ein grüner Fluoreszenzspot am Zellpol und weitere grüne/rote Spots, die über den Zellkörper verteilt sind. Daher muss angenommen werden, dass die Lokalisierung der Flagellen in diesen Mutanten zufällig erfolgt.

4.3 Synchronisation von Flagellenassemblierung und Zellteilung?

In Bakterien ist die Flagelle eines der komplexesten Systeme und die Assemblierung der über 30 Proteine muss koordiniert werden. Die Koordination muss einmal während der Assemblierung erfolgen, dass der Flagellenaufbau auch korrekt stattfinden kann, aber auch der Zeitpunkt zum Start der Genexpression muss abgestimmt sein. Bei *S. putrefaciens* dauert der Aufbau einer funktionalen Flagelle eineinhalb Generationen (Abb. 17). Im folgenden Kapitel wurde versucht eine Verbindung der Flagellenassemblierung sowie der Zellteilung zu identifizieren.

4.3.1 MinD-ähnliche ATPase FlhG und MinD beeinflussen sich nicht gegenseitig

Der für die Flagellenanzahl wichtige Faktor FlhG ist ein strukturelles Homolog der ATPase MinD (Schuhmacher *et al.* 2015a). MinD ist ein Teil des Min-Systems, das die Zellteilung durch die korrekte Positionierung des Z-Rings reguliert. Die MinCDE Proteine bilden einen oszillierenden Zyklus, der von Zellpol zu Zellpol wandert. Die C-terminale MTS-Domäne von MinD interagiert als ATP-gebundenes Homodimer mit der Zellmembran und rekrutiert MinC. Das Effektorprotein MinC inhibiert die Polymerisation von FtsZ. Somit findet die Assemblierung des FtsZ-Rings nicht an den Zellpolen sondern in der Zellmitte statt und die Teilung des Bakteriums kann in zwei gleich große Tochterzellen erfolgen (Lutkenhaus 2007; Ramm *et al.* 2019; Schwan *et al.* 2020).

Das ϵ -Proteobakterium *Campylobacter jejuni* besitzt kein Min-System, aber FlhG spielt eine Rolle bei der Kontrolle des Flagellierungsmusters sowie Regulation der Zellteilung (Balaban und Hendrixson 2011; Schwan *et al.* 2020). Ob in *S. putrefaciens* das Min-System und/oder FlhG einen gemeinsamen Einfluss auf die Flagellenassemblierung bzw. Zellteilung haben wurde im Folgenden untersucht. Zuerst erfolgte die Deletion von *minD* in *S. putrefaciens* WT sowie $\Delta flhG$. Die Deletionsmutante $\Delta minD$ sowie die Doppeldeletionsmutante $\Delta minD \Delta flhG$ zeigten keine starke Beeinträchtigung auf das Zellwachstum (Bachelorthesis Dorian Fischer). Die Zellmorphologie wurde mittels Lichtmikroskopie betrachtet (Abb. 35 A). Wenige *S. putrefaciens* Zellen besitzen nicht mehr in der Zellmitte ihre Teilungsebene. Daher kommt es zur Bildung von Minizellen, aber die überwiegende Anzahl an Zellen zeigen keine veränderte Position der Teilungsebene und es entstehen meist zwei gleich große Tochterzellen. Das Schwimmverhalten der Deletionsmutanten wurde mit Hilfe von Weichagarplatten überprüft (Abb. 35 B). Die Ausbreitungsradien zeigen keine Veränderungen von $\Delta minD$ zum WT. *S. putrefaciens* $\Delta flhG$ und $\Delta minD \Delta flhG$ sind nicht mehr in Lage auf semisoliden Oberflächen zu schwimmen. Außerdem wurde die Lokalisierung von FlhG-sfGFP in der Abwesenheit von *minD* mikroskopisch ermittelt (Abb. 35 C). Die MinD-ähnliche ATPase FlhG kann in *S. putrefaciens* $\Delta minD$ weiterhin am Zellpol lokalisieren. Auch bei einer Flagellenfärbung ist bei Deletion von *minD* eine monopolare Flagellierung wie beim WT (Abb. 14) zu beobachten. In der Abwesenheit von *minD* und *flhG* kommt es wie bei der Deletion von *flhG* (Abb. 22) zu einer polaren Hyperflagellierung. Die Flagellenassemblierung ist in Abwesenheit von *minD* nicht beeinträchtigt.

Um den Einfluss von FlhG auf das oszillierende Min-System zu überprüfen, wurde MinD N-terminal mit sfGFP fusioniert. Die funktionale sfGFP-MinD Fusion wurde in *S. putrefaciens* WT sowie $\Delta flhG$ über eine Zeitspanne mikroskopiert (Abb. 35 E). Beide *S. putrefaciens* Stämme benötigen ca. 65 s bis sfGFP-MinD wieder am Ausgangspunkt lokalisiert. Die Oszillation von MinD ist in An- und Abwesenheit von *flhG* unverändert.

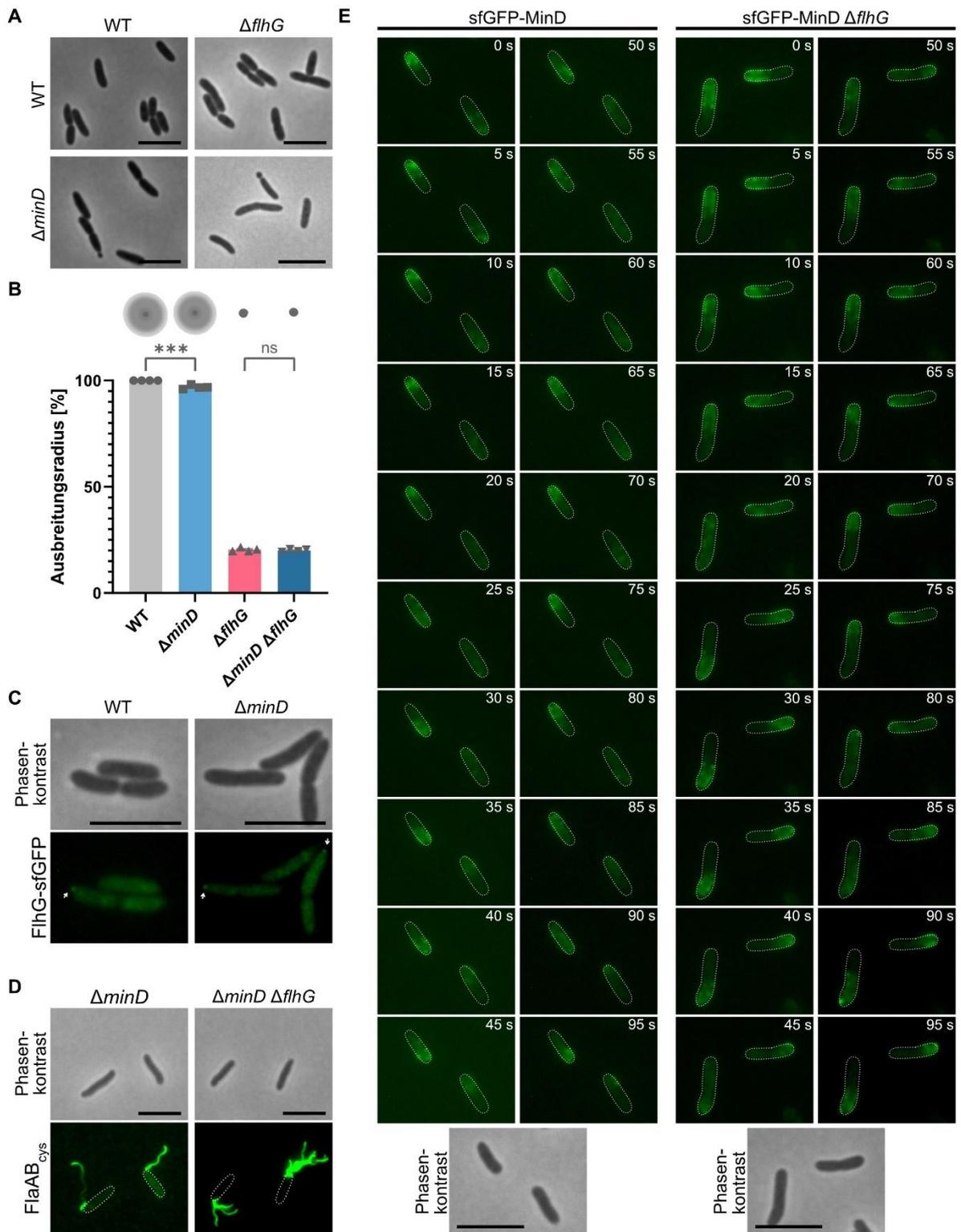


Abb. 35: MinD und FlhG beeinflussen sich nicht gegenseitig. **A** Phasenkontrastaufnahmen zur Bestimmung der Zellmorphologie von *S. putrefaciens* WT sowie den Einfach- und Doppeldeletionsmutanten *minD* und *flhG*. **B** Oben sind die Ausbreitungsradien der in **A** analysierten *S. putrefaciens* Stämmen auf Weichagarplatten gezeigt. Unten sind die prozentualen Ausbreitungsradien der auf den WT normalisierten Deletionsmutanten dargestellt. Das Experiment wurde in vier biologischen Replikaten durchgeführt. Die Sternchen zeigen an, dass der Unterschied zur Kontrolle signifikant ist (ANOVA; *p*-Werte:*** <0,001; ns nicht signifikant >0,05). **C** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Lokalisierung von FlhG-sfGFP sowie die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen. **D** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit CF 488 Maleimide gefärbten Filamenten FlaAB_{cys} sowie die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen. **E** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *S. putrefaciens* sfGFP-*minD* und *S. putrefaciens* sfGFP-*minD* $\Delta flhG$ sowie die Phasenkontrastaufnahmen. Die Aufnahmen von sfGFP-MinD wurden über einen Zeitraum von 1 min 35 s (95 s) durchgeführt und alle 5 s ein Bild aufgenommen. Die Skalen entsprechen 5 μ m.

4.3.2 Identifizierung von Aktivatoren und Repressoren der *flrA* Expression

Eine weitere Möglichkeit zur Synchronisation der Flagellenassemblierung und Zellteilung ist das aktivieren oder reprimieren der Genexpression des Flagellenhauptregulators *flrA*. Durch Interaktion von FlrA und FlhG kommt es zur Hemmung der FlrA-abhängigen Genexpression. Um eine neue Flagelle aufzubauen, muss die Konzentration an FlrA sozusagen über den Schwellenwert der inaktivierten FlrA-FlhG-Komplexe steigen. Um eine höhere Konzentration an FlrA zu erhalten, könnte ein Aktivator die Genexpression von *flrA* induzieren. Aktivatoren und Repressoren binden an die DNA und verändern die Genexpression.

Bei *in silico*-Analysen mit der webbasierten Software *NovoPro Repeats Finder* des *flrA* Promotorbereichs wurde 160 und 190 bp *upstream* des Startcodons eine sich wiederholende Nukleotidsequenz TGGCATAAA (Repeats) identifiziert. An diese Repeats könnte ein DNA-bindendes Protein, welches als Aktivator oder Repressor fungiert, binden. Um solche Aktivatoren oder vielleicht auch Repressoren für die *flrA* Transkription zu identifizieren, wurde mit dem Promotorbereich von *flrA* ein DNA-Pulldown Assay durchgeführt. Hierfür wurde der Promotorbereich von *flrA* 246 bp *upstream* des Translationsstarts verwendet. Das Ende des Promotorbereichs wurde von einem *upstream* liegenden Rho-unabhängigen Terminator festgelegt. Bei dem DNA-Pulldown wurde der *flrA* Promotorbereich über eine PCR mit dem *forward* oder *reverse* Primer biotinyliert. Es wurden beide DNA-Enden biotinyliert, um auszuschließen, dass ein Protein durch sterische Hinderung nicht binden kann. Als DNA-Negativkontrolle wurde der Promotorbereich des Flagellengens *flhA* (240 bp) verwendet. Die biotinylierte DNA wurde an Streptavidin-Kugeln gebunden und anschließend mit Zelllysat von *S. putrefaciens* inkubiert. Mit steigender NaCl Konzentration wurden die gebundenen Proteine eluiert und mittels einem kolloidalen Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel ausgewertet (Abb. 36).

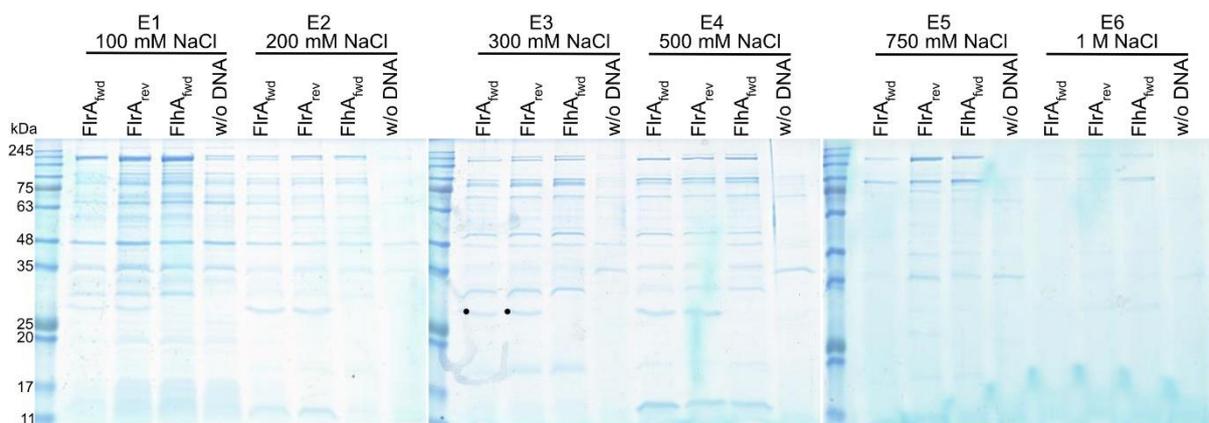


Abb. 36: Identifizierung eines möglichen Aktivators bzw. Repressors der *flrA* Expression. Die kolloidalen Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen zeigen die sechs Eluate (E) mit aufsteigender NaCl-Konzentration des DNA-Pulldown Assay. Als DNA-Fragmente diente der 246 bp Promotorbereich von *flrA* sowie als Negativkontrolle der 200 bp Promotorbereich von *flhA*. Die Biotinylierung erfolgte mit Hilfe einer PCR über die *forward* (fwd) bzw. *reverse* (rev) Oligonukleotide. Als weitere Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne DNA (w/o DNA) mitgeführt. Die mit einem schwarzen Punkt markierten Proteinsignale wurden mittels MS-Analyse als der Zwei-Komponenten Transkriptionsregulator ArcA (Sputcn32_0678) identifiziert.

Die DNA-Pulldown Negativkontrolle ohne DNA zeigt einige eluierte Proteine, die unspezifisch an die Streptavidin-Kugeln binden. Die eluierten Proteine der Promotorbereiche von *flhA* sowie den an beiden Enden biotinylierten Promotorbereich von *flrA* sind im Vergleich fast identisch. Nur bei den ersten vier Elutionsschritten der *flrA* Promotorbereiche ist im Vergleich zu den Kontrollen bei ca. 27 kDa ein zusätzliches Protein vorhanden. Weitere mögliche DNA-bindende Proteine des *flrA* Promotors wurden nicht auf diese Weise detektiert. Zur Identifizierung des unbekanntes Proteins wurden die zwei Signale bei ca. 27 kDa der Elution 3 mit 300 mM NaCl der *flrA* Promotorbereiche mit der *forward* sowie *reverse* Oligonukleotid-Biotinylierung zur MS geschickt. Die MS erfolgte bei der AG Proteinanalytik von Prof. Dr.

Günter Lochnit (Biochemisches Institut, JLU). Beide Proben wurden als der 27,2 kDa große Zwei-Komponenten Transkriptionsregulator ArcA (Sputcn32_0678) identifiziert.

4.3.3 ArcA beeinflusst nicht Flagellenassemblierung

ArcA ist der Transkriptionsregulator des Zwei-Komponentensystems Anoxische Redoxkontrolle (Arc). Dieses Zwei-Komponentensystem ist in *S. oneidensis* beschrieben und besteht neben dem Antwortregulator ArcA, aus der Sensor kinase ArcS und dem Phosphotransferprotein HptA. Es spielt eine Rolle an der Regulation des Übergangs von aeroben zu anaeroben Bedingungen und in der Bildung sowie Dynamik von Biofilmen (Gralnick *et al.* 2005; Thormann *et al.* 2005; Lassak *et al.* 2010). Das 15 bp lange Bindemotiv des Transkriptionsregulators ArcA ist in *S. oneidensis* konserviert (Gao *et al.* 2008). Das ArcA-Bindemotiv (GTTAATTAAATGTTA; Abb. 37 B) wurde in dem Promotorbereich von *fliA* mit Hilfe der webbasierten Software *Pattern Locator* vorhergesagt (Abb. 37 A).

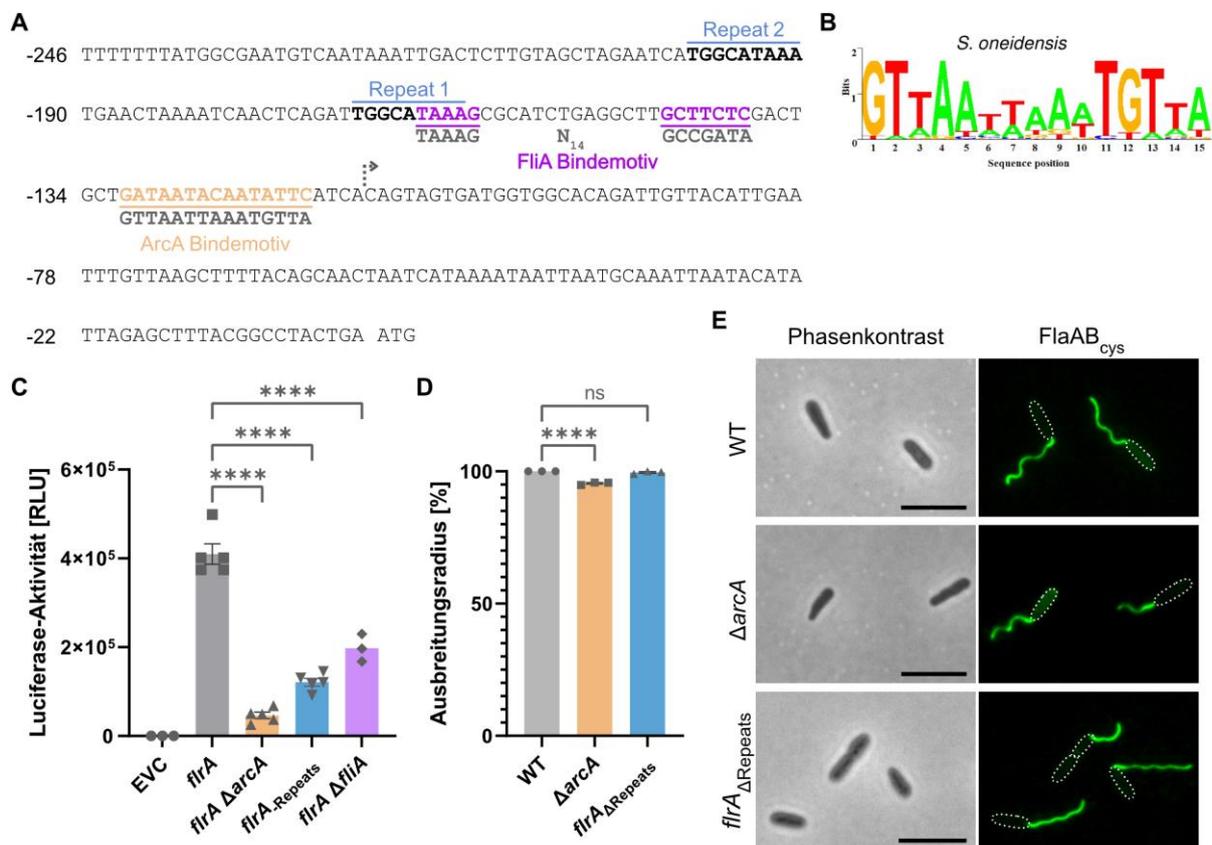


Abb. 37: Einfluss der ArcA und FliA Bindestelle sowie der sich wiederholenden Nukleotidsequenz im *fliA* Promotorbereich auf die Motilität. **A** Der *fliA* Promotorbereich ist vom Startcodon (ATG) bis zum *upstream* liegenden Rho-unabhängigen Terminator dargestellt. Die Vorhersage der Repeats (TGGCATAA) erfolgte mit der webbasierten Software *NovoPro Repeats Finder*. Das ArcA-Bindemotiv (GTTAATTAAATGTTA) wurde mit der webbasierten Software *Pattern Locator* identifiziert. Das Bindemotiv des alternativen Sigmafaktors FliA (TAAAG N₁₄ GCCGATA) wurde in *S. oneidensis* vorhergesagt (Song *et al.* 2007). Der gestrichelte graue Pfeil zeigt die Position des TSS bei *P. aeruginosa* an (Dasgupta *et al.* 2002). **B** Bindemotiv des Transkriptionsfaktors ArcA in *S. oneidensis* (aus Gao *et al.* 2008). **C** Messungen der Promotoraktivitäten von *fliA* sowie der Leervektorkontrolle (EVC) mittels des Luciferase Reportersystems. Die Luciferase-Aktivität der 246 bp Promotorsequenz (*fliA*) sowie der trunkierte Bereich ohne die Repeatsequenzen (*fliA*ΔRepeats) wurden in *S. putrefaciens* WT untersucht. Die Messung der *fliA* Promotoraktivität erfolgte auch in den Deletionsstämmen Δ*arcA* sowie Δ*fliA*. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei bzw. fünf biologischen Replikaten. **D** Prozentuale Ausbreitungsradien von *S. putrefaciens* Δ*arcA* und *fliA*ΔRepeats normalisiert auf den WT. Das Experiment wurde in technischen Duplikaten und biologischen Triplikaten durchgeführt. **E** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit CF 488 Maleimide gefärbten Filamenten FlaAB_{cys} sowie die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen. Die Skalen entsprechen 5 μm.

Den Einfluss von ArcA auf die Promotoraktivität von *flrA* wurde mittels dem transkriptionellen *luxCDABE*-Reportersystem untersucht. Der Promotorbereich von *flrA* wurde wie zuvor beim DNA-Pulldown Assay als der 246 bp Sequenzbereich *upstream* des Translationsstarts angesehen. Dieser Promotorbereich wurde in das Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT-RBS-*lux* inseriert. Die Messung der Luciferase-Aktivität des *flrA* Promotors erfolgte im *S. putrefaciens* WT sowie Δ *arcA* in der exponentiellen Phase bei OD₆₀₀ von 0,5 mit Hilfe des Plattenlesegeräts Tecan (Abb. 37 C). Im Vergleich zur Kontrolle ist eine signifikante Reduzierung der *flrA* Promotoraktivität bei *S. putrefaciens* Δ *arcA* auf 11 % zu beobachten. Welche Auswirkung diese stark verringerte *flrA* Promotoraktivität auf die Flagellenassemblierung hat, wurde mit der Schwimmfähigkeit sowie Flagellenfärbung bei *S. putrefaciens* Δ *arcA* untersucht (Abb. 37 D, E). Der Ausbreitungsradius von *S. putrefaciens* Δ *arcA* ist im Vergleich zum WT um 5 % verringert. Allerdings ist die Flagellierung unverändert monopolar und auch die Anzahl an flagellierten Zellen scheint gegenüber dem WT nicht verändert zu sein. Unter den analysierten Bedingungen besitzt ArcA wohl keinen Einfluss auf die Flagellenassemblierung in *S. putrefaciens*.

ArcA besitzt ein Bindemotiv (Abb. 37 B), welches nicht der zuvor entdeckten Repeatsequenz entspricht. Ein bisher unbekanntes Protein, das nicht mit Hilfe des DNA-Pulldowns identifiziert wurde (Abb. 36), könnte dort seine Bindestelle haben. Die Auswirkung dieser Repeats auf die *flrA* Promotoraktivität sowie Flagellenassemblierung wurde im Folgenden untersucht. Die Promotoraktivität wurde mit dem bereits verwendeten transkriptionellen *lux*-Reportersystem detektiert. Hierfür erfolgte die Insertion des 246 bp langen Promotorbereich von *flrA* bzw. ein trunkierter Bereich von 160 bp, welcher nur den *flrA* Promotorbereich vom Startcodon bis zu den Repeats umfasst (*flrA* Δ Repeats), in das Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT-RBS-*lux*. Die Messung der Luciferase-Aktivität zeigt, dass das Fehlen der Repeatsequenz oder dieses Promotorbereichs mit u. a. der -35-Region der FliA-Bindestelle im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikanten Reduktion um ca. 70 % führt (Abb. 37 C). Zum Überprüfen welchen Einfluss diese Repeatsequenz auf die Flagellenassemblierung hat, wurde dieser Sequenzbereich in *S. putrefaciens* (*flrA* Δ Repeats) deletiert. Der Ausbreitungsradius von *flrA* Δ Repeats zeigt keine Veränderung im Vergleich zum WT (Abb. 37 D). Auch bei der Flagellenfärbung ist eine WT-ähnliche monopolare Flagellierung zu beobachten (Abb. 37 E). Die Repeatsequenz des *flrA* Promotorbereichs scheint unter den getesteten Bedingungen keine Auswirkung auf die Flagellenassemblierung zu haben.

Song *et al.* (2007) haben in *S. oneidensis* für *flrA* einen FliA-abhängigen Promotor vorhergesagt. Die Bindestelle von FliA ist sehr stark konserviert (Abb. 14 C). Jedoch ist im *flrA* Promotor nur die -35-Region, aber nicht die -10-Region der möglichen FliA Bindestelle konserviert (Abb. 37 A). Um den Einfluss von FliA auf die Genexpression von *flrA* zu untersuchen, wurde mit Hilfe des Luciferase-Reportersystems in der Deletionsmutante Δ *fliA* die Promotoraktivität analysiert (Abb. 37 C). Die Promotoraktivität von *flrA* ist in der Abwesenheit von *fliA* um 52 % reduziert. Allerdings ist der mRNA- sowie Proteinlevel von FlrA nicht verändert bei der Deletionsmutante Δ *fliA* im Vergleich zu *S. putrefaciens* WT (Abb. 10 A).

5 Diskussion

Flagellen sind eine der komplexesten Strukturen in Prokaryoten. Deren Assemblierung benötigt eine räumliche und zeitliche Kontrolle, um die Positionierung, Anzahl und den Zusammenbau zu regulieren (Schuhmacher *et al.* 2015b). Diese Regulation kann durch verschiedenste Mechanismen erfolgen.

5.1 Initiierung der Genexpression des Flagellenhauptregulators *fliA*

Bei der Assemblierung eines Flagellums ist der erste Schritt die Initiierung der Genexpression des Hauptregulators *fliA* (Abb. 38 B). In *P. aeruginosa* ist die Transkription von *fleQ* (*fliA* Homolog) von dem Housekeepingfaktor σ^{70} abhängig (Dasgupta *et al.* 2003). Allerdings kann eine konstitutive Expression von *fliA* nicht die Produktion von nur einem Flagellum erklären, da nur zu einem spezifischen Zeitpunkt die Transkription der Flagellengene stattfinden muss, um die Komponenten zu synthetisieren. Die Produktion eines schwimmfähigen Flagellums dauert ca. 1,5 Generationen (Abb. 17) und die Genexpression muss entsprechend aktiviert werden.

5.1.1 ArcA beeinflusst nicht die Flagellenassemblierung unter aeroben Bedingungen

Die Aktivierung oder Repression der Genexpression kann durch DNA-bindende Proteine reguliert werden. Solche Aktivatoren bzw. Repressoren in dem *fliA* Promotorbereich sollten mit Hilfe des DNA-Pulldowns (Abb. 36) identifiziert werden. Hierbei wurde nur der Antwortregulator ArcA des Zwei-Komponentensystems Arc nachgewiesen. Arc spielt eine Rolle in der Regulation des Übergangs von aeroben zu anaeroben Bedingungen in *S. oneidensis* und in weiteren γ -Proteobakterien (Gralnick *et al.* 2005; Lassak *et al.* 2010; Xie *et al.* 2021). Der Transkriptionsregulator ArcA besitzt eine N-terminale Empfänger (Rec)-Domäne und C-terminale DNA-bindende HTH-Domäne (Iuchi und Lin 1988). Während einer Signalübertragung wird die Rec-Domäne von ArcA von der Histidinkinase ArcS phosphoryliert. Diese Phosphorylierung aktiviert ArcA als Transkriptionsregulator und ermöglicht die Bindung an Promotorregionen von Zielgenen sowie die Regulation der Transkriptionsaktivität (Jeon *et al.* 2001; Gralnick *et al.* 2005; Lassak *et al.* 2010).

Unter aeroben Wachstumsbedingungen ist eine signifikant reduzierte Schwimmfähigkeit um 5 % (Abb. 37 D) zu beobachten, aber vermutlich ist dieser Phänotyp durch ein verringertes Wachstum ausgelöst. In *S. oneidensis* wurde bereits beschrieben, dass das Arc-System entscheidend für das aerobe Wachstum und an der Regulation von ≈ 209 Operons beteiligt ist (Lassak *et al.* 2010; Xie *et al.* 2021; Gao *et al.* 2008). Der Transkriptionsregulator ArcA scheint einen positiven Einfluss auf die Transkription des ribosomalen Proteins S1 zu nehmen (Xie *et al.* 2021). Das ribosomale Protein S1 ist ein Teil der kleinen Untereinheit und spielt eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Translation (Boni *et al.* 1991). In der Abwesenheit von ArcA kommt es zu einer reduzierten Produktion von Ribosomen in *S. oneidensis*. Die daraus resultierende verringerte Translationseffizienz ist wahrscheinlich die Hauptursache für den Wachstumsphänotyp (Xie *et al.* 2021). Einen Einfluss von ArcA auf die monopolare Flagellierung in *S. putrefaciens* wurde unter aeroben Bedingungen nicht beobachtet (Abb. 37 E). Allerdings bei der Deletionsmutante $\Delta arcA$ wurde eine stark reduzierte Promotoraktivität von *fliA* verzeichnet (Abb. 37 C). Zudem wurde das von Gao *et al.* (2008) beschriebene ArcA-Bindemotiv 117 bp *upstream* des Translationsstarts von *fliA* in *S. putrefaciens* vorhergesagt (Abb. 37 A). Auch wurde diese Nukleinsäuresequenz für das mögliche ArcA-Bindemotiv in *S. oneidensis* an der gleichen Position identifiziert (Daten nicht gezeigt). Gao *et al.* (2008) analysierte mit Hilfe von Microarrays die Veränderungen der Transkriptlevel von *S. oneidensis* $\Delta arcA$ im Vergleich zum WT unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Unter allen untersuchten Wachstumsbedingungen wurden keine signifikanten Änderungen der mRNA-Menge von *fliA* oder weiteren Flagellenkomponenten beobachtet. Nur am Typ-IV-Pilus beteiligte Komponenten wie die ATPase *pilU* (SO_3350) und das Pilin *pilE* (SO_3524) zeigen

eine höhere Abundanz der Transkriptmengen in der An- bzw. Abwesenheit von Sauerstoff bei der Deletionsmutante $\Delta arcA$. Auch die Sensorkinase ArcS des Zwei-Komponentensystems Arc zeigt bei einer Deletion in *S. oneidensis* unter aeroben Bedingungen keine veränderte Abundanz der mRNA-Mengen von Komponenten der Flagelle (Lassak *et al.* 2010). Unter den bisher untersuchten Bedingungen scheint das Arc-System bzw. ArcA keinen Einfluss auf die Regulation von *flrA* bzw. den weiteren Flagellengenen in *S. putrefaciens* zu haben. *S. typhimurium* $\Delta arcA$ Deletionsmutanten sind unter anaeroben Bedingungen nicht motil und besitzen keine Flagellen (Evans *et al.* 2011). Dagegen wird unter aeroben Bedingungen in *V. cholerae* die Motilität von ArcA unterdrückt. Li *et al.* (2022) identifizierten, dass in *V. cholerae* bei Abwesenheit von ArcA direkt die *flrA* Expression verstärkt und ein ca. 175 % größerer Ausbreitungsradius auf semisoliden Oberflächen im Vergleich zum WT zu beobachten ist.

Das ArcA-Bindemotiv wurde 4 bp *upstream* des Transkriptionsstarts von *flrA* in *S. putrefaciens* vorhergesagt und überlappt mit der -10-Region der σ^{70} -Bindestelle (Abb. 37). Um die DNA-Bindung von ArcA an der vorhergesagten Position des *flrA* Promotors zu verifizieren, müsste ein *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) mit entsprechenden trunkierten Promotorbereichen durchgeführt werden. Der Transkriptionsregulator ArcA bindet nur in seiner phosphorylierten Form an Promotoren (Gao *et al.* 2008). Daher könnten Mutationen erstellt werden, die die Phosphorylierung der Rec-Domäne von ArcA beeinflussen. Diesen Einfluss auf die Flagellierung durch phosphoryliertes bzw. dephosphoryliertes ArcA kann mit Hilfe von Schwimmpetten und Flagellenfärbung überprüft werden. Eventuell könnte phosphoryliertes ArcA unter bestimmten Umweltbedingungen als Repressor an den *flrA* Promotor binden und somit den Flagellenaufbau verhindern. Dies könnte wertvolle Energie sparen, die bei Umwelteinflüssen eventuell an anderer Stelle benötigt wird. Bei Nährstoffmangel werfen γ -Proteobakterien wie *Shewanella* ihr Filament und Haken des polaren Flagellums ab, um die kostspielige Fortbewegung zu stoppen und Energie zu sparen (Ferreira *et al.* 2019). Die molekularen Details dieses Mechanismus sind bisher nicht geklärt, aber sehr wahrscheinlich werden auch hier Repressoren die Genexpression des Hauptregulators *flrA* unterdrücken. Um diese Theorie der flagellaren ArcA-Regulation bei Umweltreizen zu verifizieren, könnte die Flagellierung der Deletionsmutante $\Delta arcA$ bei verschiedensten Stress- und Umweltbedingungen analysiert werden.

5.1.2 Weitere Regulatoren für die Genexpression von *flrA*

Die Genexpression des Flagellenhauptregulators wird durch viele Faktoren beeinflusst (Soutourina und Bertin 2003; Khan *et al.* 2020). Eine Veränderung der Genexpression kann z. B. durch Transkriptionsfaktoren erfolgen, die spezifische DNA-Bindestellen erkennen. Diese Proteine binden über Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Aminosäureresten und DNA-Basen an die Zielnukleotidsequenz. Proteine können mit verschiedenen Mechanismen wie der HTH-, Zink-Finger-, Leucin-Zipper- und β -Faltblatt-Domänen an spezifische Nukleotidsequenzen binden (Harrison 1991; Al-Zyoud *et al.* 2016).

Bei *in silico*-Analysen wurde eine sich wiederholende 9 bp lange Nukleotidsequenz (Repeats) 160 und 190 bp *upstream* des Translationsstarts von *flrA* identifiziert. Diese Repeatsequenz (TGGCATAA) wurde noch weitere 118-mal im *S. putrefaciens* Genom gefunden, aber nicht in so einem kurzen Abstand hintereinander (Daten nicht gezeigt). Zwischen den beiden direkten Repeats liegt eine 21 bp-Sequenz und somit liegen die Repeats genau 30 bp auseinander (Abb. 37). Eine Windung der DNA-Helix beträgt 10 bp (Levitt 1978) und so müssten die Repeats auf einer Seite der DNA-Helix-Oberfläche exponiert sein. Dies wäre eine mögliche Bindungsstelle von DNA-bindenden Proteinen, die z. B. als Homodimere agieren. Ein Transkriptionsfaktor, der mit einer Brücke von 29 bp zwischen zwei direkten Repeats mit seiner HTH-Domäne als Dimer bindet, ist z. B. GabR in *B. subtilis*. GabR ist an der

Regulation der Biosynthese von Glutamat beteiligt und einen Einfluss auf die Motilität wurde bisher nicht beschrieben (Al-Zyoud *et al.* 2016).

Bisher bekannte DNA-Bindemotive von Proteinen wurden mit der Repeatsequenz verglichen und keine Übereinstimmung für einen möglichen Kandidaten zur Regulation der *flrA* Expression gefunden (Li *et al.* 2002; Leuze *et al.* 2012). Bei Untersuchungen der *flrA* Promotoraktivität in Abwesenheit dieses Sequenzbereiches mit den Repeats wurde eine Reduzierung der Promotoraktivität um 70 % verzeichnet (Abb. 37 C). Dieses unbekannte Protein oder ein anderes Protein, das in diesem Promotorbereich 161 bis 246 bp *upstream* des Translationsstarts bindet, scheint ein Aktivator der Genexpression zu sein. Allerdings ist nur eine Auswirkung auf die Promotoraktivität, aber nicht auf das Schwimmverhalten (Abb. 37 D) und der Flagellierung (Abb. 37 E) zu beobachten. Jedoch wurden die Untersuchungen nur unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Es könnte sein, dass die Regulatoren nur unter bestimmten Umweltbedingungen z. B. veränderte Sauerstoff- oder Nährstoffverfügbarkeit an den Promotorbereich binden.

Viele äußere Faktoren wie die Temperatur, Osmolarität und pH-Wert können auf die Transkription des Flagellenregulators Einfluss nehmen (Soutourina und Bertin 2003; Khan *et al.* 2020). In pathogenen Bakterien wie die monopolar flagellierten Bakterien *V. cholerae* und *P. aeruginosa* werden oft Gene der Motilität und Virulenzfaktoren von einem Regulationssystem gesteuert (Soutourina und Bertin 2003). Dies können z. B. die beiden Komponenten ToxR (Gardel und Mekalanos 1996) und SirA (Goodier und Ahmer 2001) aus je einem Zwei-Komponentensystem sein. Allerdings werden Homologe dieser Zwei-Komponentensysteme nicht in *S. putrefaciens* codiert. In *E. coli* bindet der Komplex aus dem *second messenger* zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und katabolisches Rezeptorprotein (CRP) an den *flhDC* Promotorbereich und aktiviert die Biosynthese der Flagellen. Deletionen der Adenylatzyklasen, die cAMP synthetisieren, oder des CRPs führen zu nicht motilen Zellen (Soutourina und Bertin 2003; Yokota und Gots 1970). In *P. aeruginosa* wurde ein CRP Homolog (Vfr) identifiziert, das auch am *fleQ* (*flrA*) Promotorbereich bindet, aber zu einer Inhibierung der Genexpression führt (Dasgupta *et al.* 2002). Dagegen ist in *S. putrefaciens* bei der Deletion als auch ektopischer Expression verschiedener Adenylatzyklasen (*cyaA*, *cyaB*, *cyaC*, *ygiF*) als auch von CRPs (Sputcn32_1951, Sputcn32_0652) kein starker Einfluss auf das Schwimmverhalten auf semisoliden Oberflächen zu beobachten (Bachelorthesis Svenja Thöneböhn).

Ein weiterer Regulator für die Flagellenassemblierung ist das DNA-bindende und Nukleoid-assoziierte Protein H-NS (Soutourina und Bertin 2003). In *E. coli* wird bei der Deletion von *hns* die Expression von etwa 5 % der Gene verändert und viele dienen der Anpassung an diverse Umweltbedingungen (Hommais *et al.* 2001; Jian *et al.* 2016). Bei dem polar flagellierten Bakterium *V. cholerae* als auch bei peritrich flagellierten Enterobakterien besitzen H-NS als auch deren Homologe eine positive Kontrolle auf die Flagellensynthese (Soutourina und Bertin 2003; Jian *et al.* 2016). Bei *Shewanella piezotolerans* reprimiert H-NS vor allem das laterale Flagellensystem und besitzt kaum Einfluss auf das polare Flagellum. Allerdings zeigen die Microarray-Analysen keine signifikante Veränderung der *flrA* Expression beider Flagellensysteme (Jian *et al.* 2016). Daher bindet vermutlich H-NS nicht direkt an den *flrA* Promotor, sondern reguliert über einen anderen bzw. indirekten Mechanismus die Flagellensynthese in *Shewanella*.

In *S. oneidensis* wurde eine FliA-Bindestelle für den *flrA* Promotor vorhergesagt (Song *et al.* 2007) und diese wurde auch in *S. putrefaciens* identifiziert (Abb. 37 A). In der Abwesenheit von FliA ist eine um die Hälfte reduzierte Promotoraktivität zu verzeichnen (Abb. 37 C). Auch wenn FliA keinen Einfluss auf das Transkript- bzw. Proteinlevel von FlrA besitzt (Abb. 10), könnte es als Aktivator unter bestimmten Umweltbedingungen für die Flagellensynthese fungieren. Die Bindung von FliA an den Promotor müsste mit Hilfe von EMSAs verifiziert werden. Zudem sollte die Funktion von FliA als Aktivator der *flrA* Expression mit einem induzierbaren System überprüft werden. Hierzu könnte das chromosomale

Arabinose-Operon (Kapitel 6.2.3) verwendet werden, um gezielt die Expression von *fliA* zu induzieren und zeitgleich die *fliA* Promotoraktivität mit Hilfe des Luciferase-Reportersystems oder auf Proteinlevel mittels Western Blot zu analysieren.

Viele regulatorische Proteine der Motilität, die die Expression des Flagellenhauptregulators steuern, sind in den peritrich flagellierten Bakterien *E. coli* und *S. typhimurium* beschrieben. Einige Homologe dieser Regulatoren sind zwar in weiteren Bakterien identifiziert, aber deren Rolle bei der Fortbewegung muss noch untersucht werden. Zudem existieren nicht bei allen Bakterien die Homologe dieser Regulatoren und so übernehmen vermutlich andere Proteine deren Funktionen (Soutourina und Bertin 2003). Monopolar flagellierte Bakterien wie *Shewanella* passen ihre Regulation zur Flagellensynthese auch nach den äußeren Umweltbedingungen an. Vermutlich werden auch einige dieser Regulatoren an den Promotorbereich von *fliA* binden und die Genexpression entsprechend verändern. Daher ist es überraschend, dass bei dem DNA-Pulldown (Abb. 36) nur ArcA als möglicher Regulator identifiziert werden konnte. Vielleicht waren für weitere Regulatoren u. a. die verwendeten Puffer- und Kulturbedingungen oder die exponentielle Wachstumsphase von *S. putrefaciens* nicht optimal, um eine Interaktion mit dem Promotorbereich zu ermöglichen. Aber nicht nur Proteine können eine regulatorische Funktion auf die Genexpression nehmen, sondern z. B. auch kleine nicht-codierende RNAs. In *E. coli* zeigen 10 von 99 untersuchten sRNAs eine signifikante Änderung des Schwimmphänotyps (Bak *et al.* 2015). Bisher wurde der Einfluss von sRNAs in monopolar flagellierten Bakterien nicht untersucht, aber diese werden vermutlich auch dort eine regulatorische Funktion innehaben.

Allerdings scheint die Initiierung der Transkription von *fliA* nicht allein essenziell für die Assemblierung von Flagellen zu sein. Kim *et al.* (2020) untersuchten in *E. coli* die Promotoraktivität des Hauptregulators *flhDC* auf Einzelzellebene. Hierbei wurde beobachtet, dass die Expression von *flhDC* von einem konstitutiven Promotor mit einer gleichmäßigen Expression und nur kleinen zufälligen Schwankungen um den Mittelwert abhängig ist. Dagegen zeigen Promotoren der Flagellengene aus Klasse II und III eine stochastische pulsierende Aktivität, die nur in entsprechenden zeitlichen Abständen aktiv sind (Kim *et al.* 2020). Bei dem peritrich flagellierten Bakterium *E. coli* müssen 5-10 Flagellen pro Zellkörper produziert werden (Pratt und Kolter 1998). Dagegen besitzt *S. putrefaciens* nur ein polares Flagellum und die Expression der Flagellengene muss entsprechend unterschiedlich reguliert werden. Kim *et al.* (2020) nehmen an, dass in *E. coli* die Aktivierung der *flhDC*-abhängigen Genexpression nicht auf eine Aktivierung der Expression von *flhDC*, sondern auf einen Wechsel zwischen aktiven und inaktiven Zustand von FlhD₄C₂ zurückzuführen ist. Diese konstitutive Expression könnte auch bei *fliA* in *S. putrefaciens* vorzufinden sein und erst auf Proteinebene durch den Wechsel von einem inaktiven zum aktiven Zustand von FlrA wird die Flagellenproduktion initiiert. Für die Inaktivierung von FlrA ist die MinD-ähnliche ATPase FlhG verantwortlich (Abb. 25). Allerdings ist bisher nicht im Detail verstanden, wie das Gleichgewicht des konstitutiv produzierten FlrA und FlhG zur Aktivierung der FlrA-abhängigen Genexpression führt (siehe Kapitel 5.4.3)

5.2 Einfluss der Flagellenregulatoren auf das Transkriptom und Proteom

Für die Flagellenproduktion sind die Regulatoren FlrA, RpoN und FliA essenziell (Wu *et al.* 2011a; Gao *et al.* 2018). Deren Einfluss auf das Transkriptom und Proteom wurde in *S. putrefaciens* untersucht. FlrA, RpoN und FliA nehmen auf Transkript- als auch Proteomebene neben der Regulation der Motilität auch Einfluss auf das *bpfA*-Operon (Abb. 9). Der Hauptregulator FlrA reprimiert und RpoN sowie FliA aktivieren die Transkription des *bpfA*-Operons. Cheng *et al.* (2017) haben bereits für *S. putrefaciens* die Regulation der Transkription des *bpfA*-Operons durch FlrA sowie den c-di-GMP-Level beschrieben. Der *second messenger* c-di-GMP verhindert die Bindung von FlrA an den *bpfA*-Promotor (Cheng *et al.* 2017). In *S. putrefaciens* ist für die c-di-GMP-Synthese unter aeroben Bedingungen hauptsächlich die

Diguanylatzyklase DosD zuständig (Wu *et al.* 2013). Dagegen ist die Phosphodiesterase PdeB für den Abbau von c-di-GMP hauptverantwortlich (Rossmann *et al.* 2019). Durch die Regulation des c-di-GMP-Levels nehmen DosD sowie PdeB Einfluss auf die Transkription des *bpfA*-Operons (Wu *et al.* 2013; Rick *et al.* 2021). Hohe c-di-GMP-Level fördern den biofilmbasierten Lebensstil (Srivastava *et al.* 2013; Echazarreta und Klose 2019). Die Aktivierung der *bpfA*-Expression in der Abwesenheit von RpoN und FliA wurde bisher noch nicht beschrieben. Bei *in silico*-Analysen konnten keine Bindemotive von RpoN und FliA bei dem Promotorbereich des *bpfA*-Operons vorhergesagt werden. Eventuell könnte durch die Deletion von *rpoN* und *fliA* indirekt der c-di-GMP-Level verringert worden sein. Dieser niedrige c-di-GMP-Level führt zur Bindung von FlrA an den *bpfA*-Promotor und reprimiert die Genexpression. Dies müsste zu einer reduzierten Biofilmbildung führen. Der Einfluss von RpoN und FliA auf die Genexpression des *bpfA*-Operons sollte mit Luciferase-Reporterassays sowie mit Analysen zur Biofilmbildung verifiziert werden.

Neben der Regulation der Flagellengene sowie des *bpfA*-Operons, werden auch wenige weitere Gene bzw. Operons von FlrA, RpoN und/oder FliA in *S. putrefaciens* beeinflusst (Tab. S 1, Tab. S 2). FlrA zeigt eine Aktivierung des Prozesses der Biosynthese von Kohlenhydraten (Sputcn32_2625-2630). Dagegen reprimiert FlrA die Genexpression von Bestandteilen des Hämin-Imports sowie ABC-Transporters (Sputcn32_0960/0969) und eines Phosphat-Bindeproteins (Sputcn32_1298). Allerdings weisen alle dieser Gene bzw. Proteine nur auf Transkript- oder Proteinebene eine signifikante Regulation auf. Daher kann eine direkte Regulation von FlrA auf die Transkription und anschließender Translation nicht eindeutig bestätigt werden und sollte mit weiteren Analysen wie z. B. Western Blots verifiziert werden. Der regulatorische Einfluss auf das Proteom des RpoN-abhängigen Transkriptionsaktivators FlrA wurde bisher nur bei dem phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* untersucht (Bae *et al.* 2018). *X. oryzae* pv. *oryzae* ist ein monopolar flagelliertes γ -Proteobakterium. Es werden wesentlich mehr Proteine durch FleQ (FlrA Homolog) in *X. oryzae* pv. *oryzae* (246 Proteine) als in *S. putrefaciens* (43 Proteine) in ihrer Abundanz verändert. Allerdings wurde bei diesem Proteomdatensatz von *X. oryzae* pv. *oryzae* nur ein Flagellenprotein von FleQ signifikant verändert und die Homologe des BpfA-Adhäsins sowie Komponenten des TISSs wurden nicht identifiziert. Nach Bae *et al.* (2018) spielt FleQ in *X. oryzae* pv. *oryzae* eine Rolle bei der Flagellen-vermittelten Motilität und bei anderen Mechanismen wie *Twitching*, Exopolysaccharid- sowie Siderophorproduktion, Biofilmbildung und der Symptomentwicklung. FlrA reguliert neben den Flagellengenen auch Mechanismen, die bei der Virulenz eine wichtige Funktion übernehmen. Da Bakterien sich in ihrem Lebensstil unterscheiden, ist auch die FlrA-abhängige Regulation neben der Motilität in Bakterien entsprechend angepasst.

Neben dem Hauptregulator FlrA sind die Sigmafaktoren RpoN und FliA für die Flagellensynthese essenziell. Der alternative Sigmafaktor RpoN ist an der Regulation von ca. 20 % der Gene in *P. aeruginosa* beteiligt (Damron *et al.* 2012). In *S. putrefaciens* zeigt RpoN eine Änderung der Abundanz von 543 mRNAs im Transkriptom (Tab. S 1), aber nur bei 71 Proteinen wurde eine veränderte Proteinmenge detektiert (Tab. S 2; Abb. 8 C). Neben der Beteiligung an der Regulation der Motilität wurde eine RpoN-abhängige Aktivierung der Genexpression von Operons für Komponenten der Elektronentransportkette der Atmung (Sputcn32_0335-0348), Sulfat-Assimilation (Sputcn32_3062-3064) und Biosynthese von Mo-Molybdopterin-Kofaktoren (Sputcn32_3879-3882) beobachtet. Somit scheint RpoN in *S. putrefaciens* eine Rolle bei der Motilität sowie Metabolismus zu spielen. Transkriptom-Analysen in *Shewanella baltica* zeigen, dass RpoN ein zentraler Regulator für das Überleben und das Verderbnispotential von Fischen ist. Die Expression von insgesamt 143 Genen, die Funktionen in der Flagellenassemblierung, Stressantwort, Stickstoff- und Aminosäuremetabolismus sowie Quorum sensing innehaben, werden durch RpoN in *S. baltica* beeinflusst. Somit spielt RpoN in *S. baltica* bei physiologischen Prozessen wie Biofilmbildung, Motilität, Stress- und Antibiotikaresistenz eine wichtige Rolle (Feng *et al.* 2021). RpoN scheint in *S. baltica* im Vergleich zu *S. putrefaciens* eine größere Funktion in der Virulenz zu übernehmen.

Der Sigmafaktor FliA beeinflusst die Abundanz von nur 35 Proteinen in *S. putrefaciens* (Abb. 8, Tab. S 2). Neben der Regulation der Motilität und des *bpfA*-Operons scheint es sonst nur die Genexpression eines Operons für den Import sowie Verwertung von Häm (Sputcn32_0960/0967) zu aktivieren. Um den Einfluss von FliA auf den Häm-Metabolismus zu verifizieren, müssten weitere Analysen wie Western Blots durchgeführt werden. In *S. putrefaciens* scheint FliA hauptsächlich nur die Motilität zu regulieren. In *S. oneidensis* wurden 169 FliA-abhängige Gene vorhergesagt, aber diese wurden nicht validiert (Wu *et al.* 2011a). Für den Sigmafaktor FliA sind bisher keine Analysen des Proteoms bei weiteren Prokaryoten beschrieben.

Die Transkriptmenge kann auch durch RNA-bindende Proteine wie CsrA reguliert werden. In *V. cholerae* bindet CsrA direkt die mRNA der Regulatoren *rpoN* und *flrC*. Eine Bindung von CsrA an das Transkript führt in *E. coli* zum Schutz des mRNA-Abbaus und dadurch zur verstärkten Expression dieses Operons (Yakhnin *et al.* 2013; Liu *et al.* 2021). Bei dem monopolar flagellierten *V. cholera* führt dies zur positiven Regulation der Motilität (Butz *et al.* 2021). Allerdings besitzt CsrA in *V. alginolyticus* nur einen aktivierenden regulatorischen Einfluss auf das laterale Flagellensystem, das zum Schwärmen dient, und nicht auf das polare System (Liu *et al.* 2021). In *S. putrefaciens* wird dieser Translationsregulator CsrA (Sputcn32_2743) codiert, aber die Funktion ist bisher nicht beschrieben.

5.3 Transkriptionelle Regulation der Flagellenassemblierung

S. putrefaciens besitzt ein polares und laterales Flagellensystem. Bubendorfer *et al.* (2012) zeigte, dass sich die beiden Flagellensysteme gegenseitig reprimieren. Bei der Analyse des Proteoms ist zu sehen, dass die polaren Regulatoren FlrA sowie RpoN aktivierend und FliA reprimierend auf einige laterale Flagellenkomponenten (FliFGILPDS, FlgED und FlaAB) wirken (Tab. S 2). Allerdings sind in der Abwesenheit der polaren Regulatoren die lateralen Flagellenregulatoren FlrA_{lat} und FliA_{lat} nicht in der Abundanz verändert. Somit nehmen die polaren Regulatoren nicht direkt auf die Genexpression der lateralen Flagellenregulatoren Einfluss. Der Regulationsmechanismus der polaren Regulatoren auf das laterale Flagellensystem ist bisher nicht geklärt, aber eventuell können die Transkriptionsfaktoren direkt an die entsprechenden Promotoren der lateralen Komponenten binden und die Genexpression verändern. Allerdings müsste dies mit weiteren Analysen z. B. die Promotoraktivitäten mit Hilfe des Luciferase-Reportersystems untersucht werden.

5.3.1 Weitere mögliche Faktoren zur Regulation von Flagellengenen

Bei der polaren Flagellensynthese in *S. putrefaciens* sind nur die Regulatoren FlrA, RpoN und FliA beteiligt. Das Zwei-Komponentensystem FlrBC zeigt in der Abwesenheit keine Veränderungen gegenüber des WT bei Promotoraktivitätsuntersuchungen (Abb. 13), Proteinabundanzen (Abb. 7 C) sowie Schwimmverhalten (Abb. 7 A, B). Somit ist FlrBC nicht essenziell für die Assemblierung des Flagellums in *S. putrefaciens*. Dies wurde auch schon von Kühn *et al.* (2018) beobachtet. Welche Rolle das FlrA-abhängige FlrBC in *S. putrefaciens* spielt ist bisher nicht verstanden. In vielen anderen polar flagellierten Bakterien stellt FlrBC bzw. deren Homologe ein Kontrollpunkt der Assemblierung des fT3SS, MS-Ring und Rotor dar. Erst wenn der Aufbau dieser frühen Flagellenbestandteile erfolgte, wird das Zwei-Komponentensystem aktiviert und die Genexpression der Klasse III Gene (Stab, Haken) findet statt (Abb. 2; Burnham *et al.* 2020; Soutourina und Bertin 2003). Klose und Mekalanos (1998) beschrieben in *V. cholerae*, dass der Response-Regulator FlrC vermutlich an der Zellteilung beteiligt ist, da bei *flrC* Mutanten eine veränderte Morphologie festgestellt wurde.

Nicht nur FlrBC aktiviert die Klasse III Gene bei der Flagellensynthese in *V. cholerae*, sondern auch das Transmembranprotein FlrD (Abb. 2). FlrD ist in vielen γ -Proteobakterien konserviert und besitzt eine HAMP-Domäne, die oft zur Signalweitergabe durch integrale Proteine vom Peri- zum Zytoplasma dient

(Moisi *et al.* 2009; Aravind und Ponting 1999). Moisi *et al.* (2009) stellten die Hypothese auf, dass FlrD nach der Assemblierung des MS-Ring/C-Ring/FT3SS-Komplexes für die Aktivierung von FlrB durch Phosphorylierung zuständig sein könnte. Eine direkte Interaktion von FlrD und FlrBC wurde nicht untersucht. Ein weiteres Protein, das in dieser Aktivierung eine Rolle spielen könnte, ist die SRP-ähnliche GTPase FlhF (Moisi *et al.* 2009). In *S. putrefaciens* konnte eine Interaktion von FlhF und dem FlrD Homolog Sputcn32_2550 nachgewiesen werden. Allerdings ist Sputcn32_2550 für die polare Lokalisation von FlhF verantwortlich (unveröffentlicht, John Hook). In vielen Bakterien wie *Pseudomonas* und *Vibrio* fungiert FlhF als positiver Regulator der Klasse III Gene bei der Flagellenassemblierung (Li *et al.* 2020; Schuhmacher *et al.* 2015b). FlhF besitzt keine typische DNA-Bindedomäne (Abb. 4), jedoch wurde bei dem amphitrich flagellierten Bakterium *C. jejuni* eine direkte Bindung von FlhF an den *flgI* Promotor (P-Ring Komponente), sowie an die Promotoren der Flagellenregulatoren *fliA*, *rpoD* (σ^{70}) und *flgS* (Homolog zu FlrB) mit Hilfe von EMSA und Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)-qPCR nachgewiesen (Li *et al.* 2020). Eine *in silico*-Analyse nach möglichen FlhF-Bindestellen in dem Genombereich des polaren Flagellengencusters in *S. putrefaciens* identifizierte sieben Bindestellen (Abb. S 8). Allerdings liegen die vorhergesagten FlhF-Bindestellen *downstream* der Transkriptionsstarts von den Genen *fliA* (-249 bp) sowie *fliA* (-112 bp). Für die Gene *fliM* und *fliH* wurden in *S. putrefaciens* keine Promotoren identifiziert. Alle späten Komponenten der Flagellenassemblierung wie *flaG*, *flaA* und *flgL* wurden nicht auf Promotoren analysiert. Jedoch besitzen FlhF als auch die MinD-ähnliche ATPase FlhG in *C. jejuni* eine etwas andere regulatorische Funktion als im monotrich flagellierten *S. putrefaciens* (siehe Kapitel 3.4.1). Ob ein direkter Einfluss von FlhF an der Regulation der Genexpression bei dem monotrich flagellierten *S. putrefaciens* vorliegt, müssten z. B. entsprechende Reporterassays oder zur Verifizierung der FlhF-Bindung EMSAs durchgeführt werden. Weitere Untersuchungen können Hinweise liefern, ob FlhF oder bisher unbekannte Proteine bei der Aktivierung der Genexpression von Bestandteilen des späten Basalkörpers eine Rolle spielen.

5.3.2 σ^{70} -abhängige Genexpression essenziell für die monopolare Flagellensynthese

Der Housekeepingfaktor σ^{70} ermöglicht eine konstitutive Genexpression. Neben der wahrscheinlich konservierten σ^{70} -abhängigen Transkription des Hauptregulators *fliA* zeigten Promotoranalysen einiger frühen Flagellenkomponenten sowie Regulatoren ebenfalls einen σ^{70} -abhängigen Promotor (Abb. 38 A, B). Die identifizierten Promotormotive von *fliFGL* und *fliHFG* besitzen keine konservierten Bindemotive von bisher bekannten Transkriptionsfaktoren (Abb. 14). Bei über 70 % der potentiellen TSS existiert ein σ^{70} -Bindemotiv. Jedoch ist die Konservierung der σ^{70} -Bindestelle nur sehr gering in *S. oneidensis* (Shao *et al.* 2014). Bis auf den Promotor von *fliL* befinden sich alle identifizierten σ^{70} -Promotoren innerhalb des *upstream* liegenden Gens (Abb. 38 E). Solche Promotoren, die innerhalb eines codierenden Bereichs liegen, kommen bei ca. 12 % der TSS in *S. oneidensis* vor und weisen meist ein σ^{70} -Bindemotiv auf (Shao *et al.* 2014). Ebenfalls wurde für *fliH*, das für die Flagellenlokalisation eine wichtige Rolle spielt, ein weiterer Promotor (P_{fliH}) innerhalb des codierenden Bereichs von *fliA* identifiziert, der RpoN abhängig ist (Abb. 14). Diese RpoN- und σ^{70} -abhängigen P_{fliH} wurden auch in *P. putida* identifiziert (Navarrete *et al.* 2019; Kim *et al.* 1995). Bei den Analysen der Promotoraktivitäten mit Hilfe des Luciferase-Reportersystems zeigt der σ^{70} -abhängige P_{fliH} eine stärkere Aktivität im Vergleich zu den FlrA- und RpoN-abhängigen P_{fliH} und P_{fliA} (Abb. 13). Diese Beobachtung wurde ebenfalls in *P. putida* beschrieben (Navarrete *et al.* 2019). Der σ^{70} -abhängige P_{fliH} scheint hauptsächlich für die Transkription von *fliH*, *fliG* und *fliA* verantwortlich zu sein (Navarrete *et al.* 2019). Allerdings zeigten sich bei Western Blot Analysen keine veränderten Proteinmengen von FlhFG, wenn in *S. putrefaciens* die σ^{70} -abhängigen P_{fliHFG} (P_{fliHFG} NPM) stillgelegt oder der Hauptregulator *fliA* deletiert wurde. Daher scheinen die σ^{70} - und FlrA-abhängigen Expression von *fliHFG* auf Proteinlevel keinen unterschiedlich starken Einfluss zu haben.

Bei einer ektopischen Produktion des Hauptregulators FlrA ist bei *S. putrefaciens* eine polare Hyperflagellierung zu beobachten (Abb. 16 A). Bei einer Hyperflagellierung werden auch von den σ^{70} -abhängigen Flagellengenen mehr Komponenten benötigt. Dies ist bei der ektopischen Produktion von FlrA zu beobachten, da die Analyse der konstant produzierten Proteine FliM sowie FlhFG mit Hilfe von Western Blots, eine signifikant erhöhte Produktion dieser Proteine zeigt (Abb. 16 B, Abb. 29 B). Dies wird vermutlich durch die *upstream* liegenden FlrA-abhängigen Promotoren ermöglicht. Das konstant transkribierte Operon *fliLMNOPQR-flhB* wird wahrscheinlich auch von dem FlrA-abhängigen P_{fliK} exprimiert. Dies könnte mit Hilfe einer cDNA-Synthese und anschließender PCR nach Gupta (1999) zur Untersuchung der Transkriptlängen analysiert werden.

Der Promotor des Sigmafaktors *fliA* zeigt keine FlrA-abhängige Aktivität (Abb. 13), aber bei der Identifizierung des TSSs mittels 5'RACE-PCR wurde eine RpoN-Bindestelle identifiziert (Abb. 14). Daher könnte *fliA* einen σ^{70} - und einen RpoN-abhängigen Promotor an dem gleichen TSS besitzen. Verschiedene Sigmafaktoren können die Transkription überlappender Promotoren eines TSSs initiieren (Mejía-Almonte *et al.* 2020; Reichenbach *et al.* 2009). Auch die σ^{70} -Bestandteile FliI und FliJ sind in der Abwesenheit der Flagellenregulatoren auf mRNA- und Proteinlevel anwesend (Abb. 10, Abb. 11). Jedoch wurden bei den Genen *fliHI* keine Promotoren identifiziert (Tab. S 3), die im Gegensatz zum restlichen *upstream* liegenden Operon eine FlrA/RpoN-unabhängige Expression ermöglichen. Eventuell befinden sich weitere σ^{70} -abhängige Promotoren mehr als die bisher untersuchten 600 bp *upstream* des TSSs und wurden somit nicht bei den Analysen detektiert.

Die identifizierten Promotoren von *fliFGLA* und *flhFG* sind aktiv in der Abwesenheit der Flagellenregulatoren (Abb. 13) und ermöglichen die kontinuierliche Produktion einiger Proteine des Basalkörpers (FliLMN), σ^{70} -TSSs (FliJOPQR, FlhB), Stators (PomAB), Motors (MotX) und der Regulatoren (FlhFG, FliA, FlgM). Diese σ^{70} -abhängigen Flagellenkomponenten gehören zusammen mit FlrA in die Klasse I der transkriptionellen Hierarchie (Abb. 38 A, B). Auch bei dem lophotrich flagellierten *P. putida* wurde beobachtet, dass neben dem Hauptregulator FleQ der ATPase-Komplex des σ^{70} -TSS *fliHIJ* nicht von den Flagellenregulatoren reguliert sind und zur Klasse I gehören (Leal-Morales *et al.* 2021). Ebenso bei dem monopolar flagellierten *Vibrio campbellii* gehören neben dem Hauptregulator *flrA* weitere Komponenten (*flgA*, *fliEFGHIJ*, *flrABC*) zu den konstitutiv exprimierten Bestandteilen (Petersen *et al.* 2021). Die Autoren Petersen *et al.* (2021) stellten die Hypothese auf, dass ein bisher unbekannter Regulator die Expression dieser Klasse I Gene in *V. campbellii* kontrolliert. Die konstitutive Expression dieser Flagellenprodukte würde Ressourcen verschwenden und so zu einem Wettbewerbsnachteil führen, obwohl die Zellen das Schwimmen aktuell nicht benötigen.

Für das monopolar flagellierte Bakterium *P. aeruginosa* ist eine strikte vierstufige transkriptionelle Hierarchie beschrieben, bei der alle Flagellengene von FleQ, RpoN, FleR und FliA reguliert werden (Dasgupta *et al.* 2003). Allerdings wenn die Änderungen der Abundanzen der mRNA-Menge betrachtet werden, zeigt sich, dass das Operon *fliLMNOPQR-flhB* sowie *fleN-fliA* nur sehr gering von den Regulatoren beeinflusst sind. Dasgupta *et al.* (2003) untersuchten nur das Transkriptom und nicht das Proteom. Daher könnten auf Proteinlevel diese Flagellenkomponenten wie bei *S. putrefaciens* konstitutiv produziert sein.

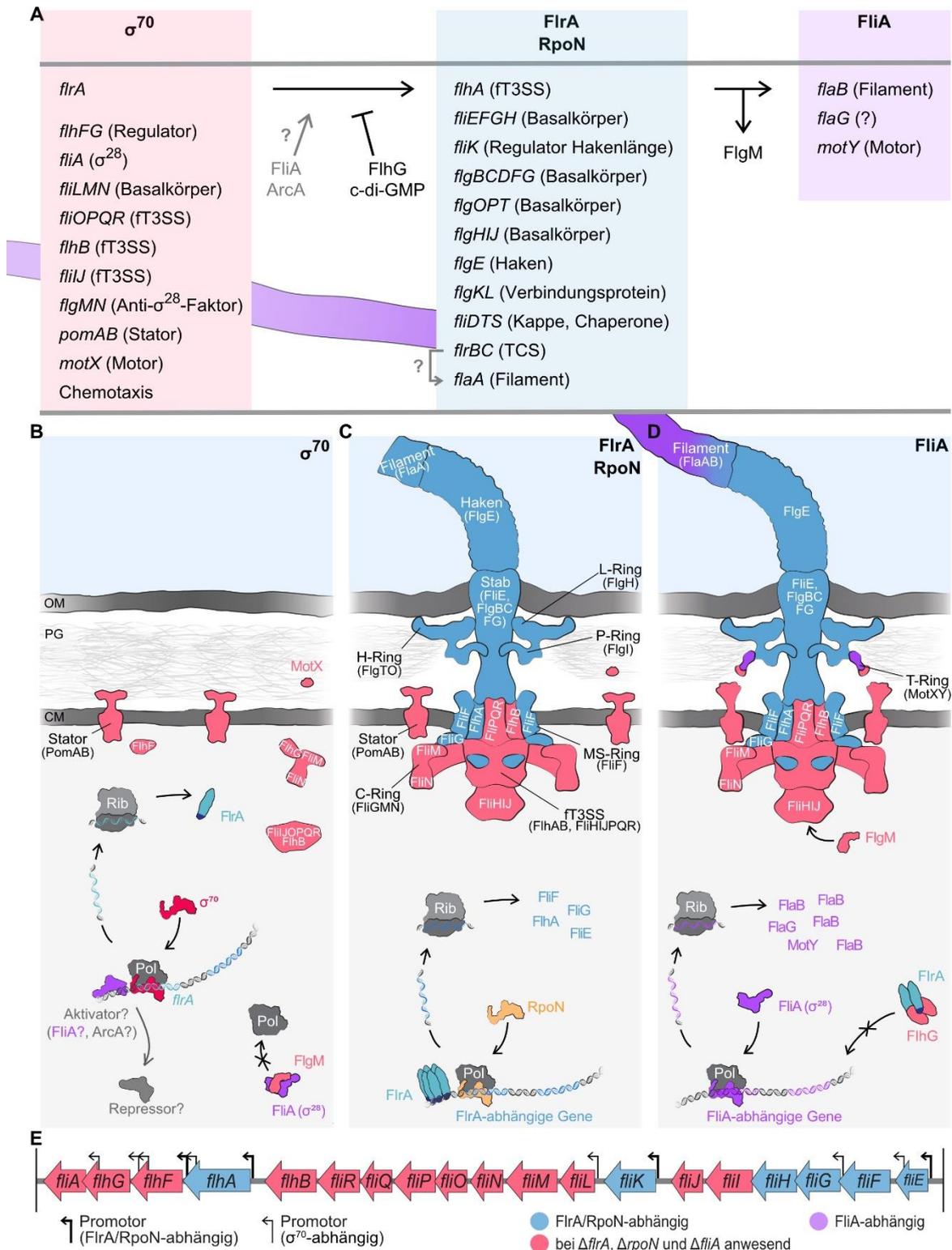


Abb. 38: Übersicht der transkriptionellen Regulation der polaren Flagellensynthese in *S. putrefaciens*. **A** Transkriptionelle hierarchische Regulation. **B-D** Schematische Übersicht der Flagellenassemblierung. Die Abbildungen wurden verändert nach Kühn *et al.* (2018). **E** Teil des polaren Flagellenclusters mit identifizierten Promotoren. **A-D** Der Hauptregulator *fliA* sowie weitere Flagellenregulatoren (*flhFG*, *fliA*, *flgM*) und Bestandteile des Basalkörpers sind σ^{70} abhängig (A, B). Aktivatoren wie FliA oder ArcA induzieren vermutlich die Expression von *fliA*. Dagegen unterdrücken die Bindung von FliG bzw. c-di-GMP an FliA die Transkriptionsaktivität. FliA/RpoN aktivieren die Expression weiterer Gene (A, C). Zu diesen gehören Bestandteile des Basalkörpers, Haken und erste Komponente für das Filament. Nach Assemblierung des Hakens wird der Anti-Sigmafaktor FlgM exportiert und FliA kann die Genexpression der späten Flagellengene aktivieren (A, D). Hierzu gehören das Hauptflagellin *flaB* als auch das Motorprotein *motY*. Rot markierte Flagellenkomponenten sind von dem Housekeepingfaktor σ^{70} abhängig. Die Genexpression von blau markierten Komponenten werden von FliA sowie RpoN und violett markierte Bestandteile von FliA aktiviert.

Die konstant produzierten Flagellenproteine sind bei monopolar flagellierten Bakterien essenziell, da die Struktur und Stöchiometrie des Rotors und Stators im aktiven Flagellenmotor variabel sind (siehe Kapitel 3.2; Nord und Pedaci 2020). Durch die Bindung der phosphorylierten Chemotaxiskomponente CheY wird der Wechsel der Rotationsrichtung induziert und die C-Ring Proteine FliM und FliN dissoziieren (Nord und Pedaci 2020; Yuan und Berg 2013). Die Anzahl an FliMN-Untereinheiten hängt von der Drehrichtung des Motors ab (Lele *et al.* 2012; Nord und Pedaci 2020). Neben der variablen C-Ring-Struktur ist auch die Anzahl der Statoreinheiten (PomA₅B₂) von dem Rotationswiderstand abhängig (Nord und Pedaci 2020; Lele *et al.* 2013). Zudem werden die Statoreinheiten durchschnittlich alle 30 s ausgetauscht (Leake *et al.* 2006). Auch die σ^{70} -ATPase FliI wird mehrmals pro Minute am Basalkörper ausgewechselt. Der FliH₂FliI-Komplex fungiert als Shuttle der Substrate wie den Flagellinen zum σ^{70} für den Export (Bai *et al.* 2014; Kinoshita *et al.* 2021). Aber das σ^{70} exportiert nicht nur Flagellenkomponente sondern auch Proteine, die bei der Bakterien-Wirts-Interaktion eine Rolle spielen (Young *et al.* 1999; Young und Young 2002). Diese Prozesse benötigen eine konstitutive Produktion der Flagellenkomponente, da sie ständig bei der aktiven Flagelle ausgetauscht werden.

Neben den Flagellenkomponenten werden auch der Regulator FliA für die späten Flagellenkomponente sowie der korrespondierende Anti-Sigmafaktor FlgM konstitutiv produziert (Abb. 11). Dies ermöglicht die Aktivierung der FliA-abhängigen Genexpression nach der Assemblierung des Hakens und den Export von FlgM (Abb. 38 D). Durch die konstante Präsenz von FliA könnte auch eine Aktivierung der Genexpression des Hauptregulators *flrA* erfolgen (siehe Kapitel 5.1.2). Ebenfalls sind weitere regulatorische Proteine FliF und FliG abhängig von σ^{70} (Abb. 38). Diese σ^{70} -abhängigen Promotoren von *flhFG* wurden über Substitutionen der Bindemotive in ihrer Aktivität stillgelegt bzw. verringert. Durch die fehlende bzw. reduzierte konstitutive Expression von *flhFG* ist bei 25 % der Zellen eine Hyperflagellierung zu beobachten (Abb. 15 C, D). Für eine monopolare Flagellierung ist die konstante Produktion der MinD-ähnlichen ATPase FliG essenziell und im Kapitel 5.4.3 wird auf den zugrunde liegenden Mechanismus eingegangen. Die Produktion einiger Flagellenkomponente und -regulatoren durch den Housekeeping-Sigmafaktor stellt sicher, dass zum einen der Flagellierungsphänotyp als auch vermutlich die Funktionalität der Flagelle sichergestellt ist.

5.3.3 FlrA/RpoN- und FliA-abhängige Regulation der polaren Flagellensynthese

Nach der Initiierung der Genexpression des Hauptregulators *flrA* (siehe Kapitel 5.1) werden die FlrA-abhängigen Gene aktiviert (Abb. 38 A, C). FlrA fungiert als Enhancer-Bindeprotein zur Aktivierung des Holoenzym aus RNA-Polymerase und RpoN (siehe Kapitel 3.4.4). Diese Initiierung der FlrA-abhängigen Expression führt zur Produktion von Komponenten des Basalkörpers (*fliEFGH, flgBCDFGHIJOPT*), Haken (*flgEKL*) und Filament (*flaA, flhDTS*). In *S. putrefaciens* scheinen diese Proteine zeitgleich produziert zu werden (Abb. 17) und nicht wie bei anderen monopolar flagellierten Bakterien wie *V. cholerae*, die eine weitere Regulationsebene aufzuweisen. Durch die Produktion von FliF, FliH und FliG sollte mit den konstitutiv exprimierten Flagellenkomponenten die Assemblierung des Basalkörpers automatisch erfolgen. Allerdings konnte bei der ektopischen Produktion dieser FlrA-abhängigen Schlüsselkomponenten keine Lokalisation des C-Ring-Proteins FliM-sfGFP beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies deutet daraufhin, dass für die frühe Flagellenassemblierung noch eine bzw. mehrere zusätzliche Komponenten benötigt werden. Wenn der Haken seine entsprechende Länge erreicht hat, ändert das σ^{70} seine Spezifität und exportiert den Anti-Sigmafaktor FlgM (Soutourina und Bertin 2003). Durch den Export von FlgM wird der alternative Sigmafaktor FliA frei und kann die Genexpression der Komponente des Filaments (FlaB) und Motors (MotY) aktivieren (Abb. 38 A, D). Die Produktion des Hauptfilaments und Motorbestandteil findet im Vergleich zu den FlrA-abhängigen Komponenten erst ein Generationszyklus später statt (Abb. 17). Diese späten Flagellengene sind wahrscheinlich die einzigen Bestandteile, die von der hierarchischen Aktivierung der Transkription durch die fertige Assemblierung eines Teils der Flagelle reguliert sind.

Im Vergleich zur Assemblierung der Flagelle ist die Synthese des homologen Typ III Sekretionssystems (T3SS), das zur Injektion von Effektorproteinen in eukaryotische Wirtszellen dient, nicht von einer hierarchischen Transkription abhängig. Unter anderem nach Wirtskontakt wird die Genexpression der Injektionskomponenten gleichzeitig aktiviert. Alle T3SS-Bestandteile sind so zur gleichen Zeit vorhanden und die Assemblierung erfolgt weitestgehend anhand von den Affinitäten und der Kinetik der Protein-Protein-Wechselwirkungen (Diepold und Wagner 2014; Diepold und Armitage 2015; Diepold *et al.* 2010). Solch eine automatische aufeinanderfolgende Assemblierung des Basalkörpers könnte auch ohne weitere strikte hierarchische Regulation der Genexpression bei der Flagellensynthese erfolgen. Die selbstständige Assemblierung einzelner Flagellenkomponente wie der MS-Ring wurde schon *in vitro* nachgewiesen (Terashima *et al.* 2020; Apel und Surette 2008). Daher scheint eine strikte Regulation mit mehreren Zwischenschritten nicht nötig, da die Assemblierung der Komponenten anhand der Protein-Protein-Wechselwirkungen erfolgreich stattfinden kann.

5.3.4 Regulation der Anzahl an Flagellenkomponenten

Ein klassisches Operon besteht neben dem Promotor und den Strukturgenen auch aus einem Terminator, der für den Abbruch der Transkription zuständig ist. Da für das polare Flagellengencluster weitere Promotoren identifiziert wurden (Abb. 14, Abb. 38 E), erfolgte auch eine Analyse auf Terminatoren. Die *in silico*-Analysen als auch Verifizierungen mit Hilfe von Reporterassays zeigten sieben Rho-unabhängige Transkriptionsterminatoren in dem Genombereich der Flagellengene von *fliE* bis *fliA* (Abb. 18). Allerdings befinden sich diese Rho-unabhängigen Terminatoren innerhalb des translatierenden Bereichs und nicht am Ende eines Operons. Durch den frühzeitigen Abbruch der Transkription könnte dies zu trunkierten Proteinen führen. Jedoch wurden solche trunkierten FliH- und FliL-Fragmente nicht mit Hilfe von Western Blots nachgewiesen (Abb. 18 D). Die identifizierten Rho-unabhängigen Terminatoren, die meist zentral innerhalb eines Gens liegen, haben keinen Einfluss auf die Proteingrößen und die Funktionen sind nicht bekannt. Die Flagelle ist eines der komplexesten Strukturen in Prokaryoten. Für den Aufbau werden von einigen Komponenten nur sehr wenige Proteine benötigt, aber von anderen Bestandteilen mehrere Tausend. Auch Flagellenbestandteile, die in einem Operon codiert sind, werden in unterschiedlichen Mengen benötigt. Die identifizierten Terminatoren führen nicht zu einem vollständigen Abbruch der Expression, sondern reduzieren nur die Transkriptmengen. Am Anfang eines Operons sind die Gene der Flagellenkomponenten codiert, die in größeren Mengen z. B. ≈ 34 Proteine von FliM benötigt werden, und am Ende des Operons befinden sich die Gene der Bestandteile, die z. B. wie FliH nur als eine Kopie in der Flagelle integriert werden (Kuhlen *et al.* 2020; Hu *et al.* 2021). Daher könnten die Rho-unabhängigen Terminatoren die Transkriptmenge und daraus folgend auch die Proteinmenge regulieren. Diese Abnahme der Transkriptmenge kann auch bei den Transkriptomdaten von *P. aeruginosa* beobachtet werden. Die \log_2 -fache Änderung der mRNA-Level bei den Deletionsstämmen $\Delta fliQ$ (Homolog von *fliA*) und $\Delta rpoN$ nimmt innerhalb des Operons *fliEFGHIJ* im Vergleich zum WT ab (Dasgupta *et al.* 2003). Die Reduzierung der Transkriptmenge der einzelnen Gene innerhalb des Operons könnte auch durch Terminatoren verursacht worden sein. Diese Art der Regulation zur Anzahl an Flagellenkomponenten scheint daher nicht nur in *S. putrefaciens* vorzukommen.

Die Regulation der Proteinmenge kann auch durch den Abbau von Proteinen durch Proteasen beeinflusst werden. In *Vibrio vulnificus* spielt die Protease DegQ eine Rolle bei den Stabilitäten der Flagellinuntereinheiten. Die post-translationale Regulation der Flagelline bestimmt die unterschiedlichen zellulären Mengen der vier Untereinheiten. Dies ermöglicht den korrekten Export der Flagelline für den hierarchischen Aufbau des Filaments (Jung *et al.* 2021). In *S. putrefaciens* wird ebenfalls die Protease *degQ* (Sputcn32_0742) codiert. Allerdings besitzt der Deletionsstamm $\Delta degQ$ keinen Einfluss auf die Motilität bei Untersuchungen der Schwimmfähigkeit auf semisoliden Oberflächen

(Daten nicht gezeigt). Vielleicht besitzt eine andere Protease solch eine regulatorische Funktion in *S. putrefaciens*.

5.4 MinD-ähnliche ATPase FlhG reguliert die Flagellenanzahl

Bakterien müssen die Produktion der frühen Flagellenkomponente nach kurzer Zeit wieder stoppen, um nur ein Flagellum zu assemblieren. Als Regulator der Flagellenanzahl kommt die MinD-ähnliche ATPase FlhG bei unterschiedlichen Flagellierungsmustern vor (siehe Kapitel 3.4). Eine Deletion von *flhG* führt zu einer erhöhten Flagellenanzahl und einer dadurch verringerten Motilität (Schuhmacher *et al.* 2015a; Schuhmacher *et al.* 2015b; Dasgupta *et al.* 2000; Correa *et al.* 2005; Gulbranson *et al.* 2016; Guttenplan *et al.* 2013). Bisher bekannte Interaktionspartner von FlhG sind das C-Ring Protein FlhM, *landmark*-Protein HubP, die SRP-ähnliche GTPase FlhF und der Flagellenhauptregulator FlhA (Schuhmacher *et al.* 2015a; Kusumoto *et al.* 2008; Bange *et al.* 2011; Yamaichi *et al.* 2012; Rossmann *et al.* 2015; Dasgupta und Ramphal 2001; Schwan *et al.* 2020). Die genaue Funktion von FlhG in der Kontrolle der Flagellenbildung ist bisher weitestgehend nicht verstanden.

5.4.1 Funktion der Interaktion von FlhG und HubP bisher nicht bekannt

Eine Beteiligung des *landmark*-Proteins HubP an der Rekrutierung von FlhG zum flagellierten Zellpol wurde in *S. putrefaciens* wie auch in verschiedenen *Vibrio* Spezies beschrieben (Rossmann *et al.* 2015; Yamaichi *et al.* 2012). Allerdings wurde diese HubP-abhängige polare Lokalisierung von FlhG nicht in den erstellten *S. putrefaciens* Stämmen beobachtet (Abb. 20 A, C). Eine veränderte FlhG-Menge oder Lokalisierung resultiert nicht mehr in einem monopolen Flagellierungsmuster (siehe Kapitel 5.4.3). Daher bestätigt die monopole Flagellierung bei allen HubP-Mutanten (Abb. 20 A, B), dass HubP keinen Einfluss auf die Lokalisierung von FlhG in *S. putrefaciens* besitzt. Bei den FlhG-sfGFP Mikroskopie-Aufnahmen von Rossmann *et al.* (2015) ist eine viel stärkere polare FlhG-Lokalisierung im WT-Hintergrund zu beobachten, als bei den neu erstellten *S. putrefaciens* Stämmen. Eventuell akkumulierte FlhG am Zellpol durch eine Mutation in diesem Stamm und die im Vergleich sehr schwache polare Lokalisierung im $\Delta hubP$ Deletionshintergrund wurde nicht mehr wahrgenommen.

Auch wenn HubP nicht für die polare Lokalisierung von FlhG verantwortlich ist, interagiert die C-terminale FimV-Domäne von HubP direkt mit FlhG in Bacterial-Two-Hybrid Assays (Bachelorthesis Lisa Fauerbach). Welche Funktion die Interaktion von HubP und FlhG besitzt, ist bisher nicht bekannt. Allerdings zeigt wie schon beschrieben der Deletionsstamm $\Delta hubP$ eine stark reduzierte Schwimmfähigkeit auf semisoliden Oberflächen (Abb. 20 D; Rossmann *et al.* 2015). Auch die Mutanten $\Delta hubP_{Repeats1-9}$ und $\Delta hubP_{FimV}$ sind negativ in ihrer Motilität beeinflusst. Rossmann *et al.* (2015) beobachteten eine reduzierte durchschnittliche Schwimgeschwindigkeit ($\Delta hubP$: 30 $\mu\text{m/s}$; WT: 53 $\mu\text{m/s}$) in Flüssigkulturen. Dieser Phänotyp ist bisher nicht bei HubP in *V. cholerae* bekannt. Dies scheint auch nicht durch die fehlende polare Rekrutierung des Chemotaxissystems, das dadurch eine eingeschränkte Fähigkeit zur Richtungsänderung des Motors besitzt, erklärt werden zu können (Yamaichi *et al.* 2012; Rossmann *et al.* 2015). HubP bzw. das Homolog FimV in *P. aeruginosa* scheint auch bei Twitching, der Typ IV-Pili vermittelten Fortbewegung, eine wichtige Rolle zu spielen (Semmler *et al.* 2000; Rossmann *et al.* 2015). Allerdings welche genaue Rolle HubP und die entsprechenden Domänen bei der Motilität in *S. putrefaciens* spielt ist bisher nicht verstanden. Vermutlich scheint HubP im Vergleich zu anderen Bakterienpezien andere bzw. weitere Funktionen in *S. putrefaciens* zu besitzen und mit weiteren Proteinen, die an der Motilität beteiligt sind, zu interagieren.

5.4.2 ATP-abhängiger Partnerwechsel der MinD-ähnlichen ATPase FlhG

Die Interaktion von FlhG mit dem N-terminalen EIDAL-Motiv des C-Ring Proteins FliM wurde bereits von Schuhmacher *et al.* (2015a) beschrieben (Abb. 39 A). An diese N-terminale Domäne von FliM bindet auch die phosphorylierte Chemotaxiskomponente CheY bei dem fertig assemblierten und aktiven Flagellum, um den Wechsel der Rotationsrichtung für eine Richtungsänderung herbeizuführen (Bren und Eisenbach 1998; Welch *et al.* 1993).

In *P. aeruginosa* interagiert der transkriptionelle Flagellenregulator FleQ (FlrA Homolog) mit dem FlhG Homolog FleN (Dasgupta und Ramphal 2001). Weitere Interaktionsstudien von FlhG mit FliM und FlrA von *S. putrefaciens* wurden in Kooperation mit Devid Mrusek und Vitan Blagotinsek (AG Bange, Marburg) durchgeführt. Bei HDX-MS-Experimenten und Pulldown-Assays wurde der Linkerbereich zwischen der AAA+ ATPase- und DNA bindende HTH-Domäne von FlrA als Interaktionsstelle mit FlhG identifiziert (Abb. 23; Abb. 39 F; Schwan *et al.* 2020). Der Flagellierungsphänotyp zeigte, dass in diesem Linkerbereich die Aminosäure Leucin an Position 400 von FlrA essenziell für die Interaktion mit FlhG ist (Abb. 27). Alignments der Aminosäuresequenz des polaren und lateralen FlrAs zeigen, dass der C-terminale Linkerbereich die geringste Sequenzähnlichkeit im Vergleich zu den restlichen Domänen aufweist (Abb. S 5). Auch ein Alignment der Flagellenregulatoren von weiteren Bakterien mit polaren Flagellensystemen wie *P. aeruginosa* und *V. cholerae* zeigen eine geringe Sequenzhomologie der N-terminalen Region und des Linkerbereichs (Soutourina und Bertin 2003). Obwohl der Linkerbereich variabel ist, schein FlhG auch in diesen polar flagellierten Bakterien mit FlrA zu interagieren und nimmt somit auf den Flagellierungsphänotyp Einfluss.

Die Analysen der AG Bange identifizierten, dass FliM und FlrA überlappende Bindestellen an den Helices $\alpha 6$ und $\alpha 7$ von FlhG besitzen (Abb. 24; Schwan *et al.* 2020). Auch die Bindungsaffinitäten zwischen FlhG-FliM und FlhG-FlrA sind ähnlich im niedrigen mikromolaren Bereich (Schwan *et al.* 2020). Nur die Abhängigkeit von ATP unterscheidet die Interaktion von FliM/FlrA und FlhG. FlhG kann als Monomer oder ATP-gebundener Homodimer vorliegen (Abb. 5; Schuhmacher *et al.* 2015a). Die Interaktion von FliM mit FlhG ist Nukleotid-unabhängig und FlhG kann als Monomer vorliegen (Abb. 39 A; Schuhmacher *et al.* 2015a). Dagegen findet nur in Anwesenheit von ATP die Interaktion zwischen FlrA und dem ATP-gebundenen Homodimer FlhG statt (Abb. 23; Abb. 39 F; Schwan *et al.* 2020). Somit bestimmt der monomere bzw. dimere Zustand von FlhG den möglichen Interaktionspartner.

5.4.3 Mechanismus von FlhG zur monopolen Flagellierung

Schuhmacher *et al.* (2015a) zeigten bereits, dass die Interaktion von FlhG mit dem C-Ring Protein FliM essenziell für die monopole Flagellierung ist. Eine polare Hyperflagellierung bei *flhG* Deletion und den entsprechenden Mutanten (FliM $_{\Delta EIDAL}$, FlhG $_{K175E}$), die die Interaktion von FlhG und FliM verhindern, wurden mittels fluoreszierender Flagellen- und Hakenfärbung nochmals bestätigt (Abb. 22; Abb. S 6). Diese Interaktion ist für das Erreichen von FlhG an den flagellaren Zellpol wichtig (Abb. 39 B), da FlhG ohne diese Interaktion keine polare Lokalisierung in *S. putrefaciens* aufweist (Abb. 22, Abb. S 7; Schwan *et al.* 2020). Dies spricht dafür, dass FlhG passiv mit FliMN an den flagellierten Zellpol transportiert wird und nicht als Marker für den Zellpol fungiert (Schwan *et al.* 2020). Der Mechanismus für den Einbau von FliM zur Assemblierung des C-Rings am Zellpol ist bisher nicht bekannt. Schuhmacher *et al.* (2015a) lieferten Hinweise, dass FlhG die Interaktion von FliMN mit dem C-Ring Protein FliG fördert. Allerdings zeigten die Kryo-Elektronenaufnahmen der Basalkörper von *S. putrefaciens* WT und $\Delta flhG$ keine strukturellen Unterschiede (Abb. 21). Daher besitzt FlhG keinen Einfluss auf die Assemblierung des C-Rings und ist auch kein integrierter Bestandteil der Flagelle. Der Einbau von FliMN in den C-Ring führt vermutlich zu einer Konformationsänderung und gleichzeitig zur Freisetzung von FlhG (Schwan *et al.* 2020). Weitere Mechanismen von FlhG direkt am Zellpol sind bisher nicht identifiziert. In *B. subtilis* verweilt FlhG für ca. 30 s an einer Flagelle (Schuhmacher *et al.* 2015a). Es ist weiterhin aus *B. subtilis*

bekannt, dass FlhG mit der SRP-ähnlichen GTPase FlhF interagiert und dies die GTPase-Aktivität von FlhF stimuliert (Kusumoto *et al.* 2008; Bange *et al.* 2011). Die Hydrolyse von GTP führt zur Dissoziation des FlhF-Homodimers (Bange *et al.* 2011; Schuhmacher *et al.* 2015b). Die Interaktion von FlhG und FlhF ist GTP aber nicht ATP abhängig und somit bindet FlhG als Monomer den GTP gebundenen FlhF-Homodimer (Abb. 39 C; Bange *et al.* 2011). FlhG Mutanten (FlhG Δ N20, FlhG $_{Q5A}$), die für die Interaktion oder Stimulierung der GTPase-Aktivität von FlhF verantwortlich sind, akkumulieren FlhG am Zellpol und besitzen eine polare Hyperflagellierung (Abb. 32, Abb. 39 C).

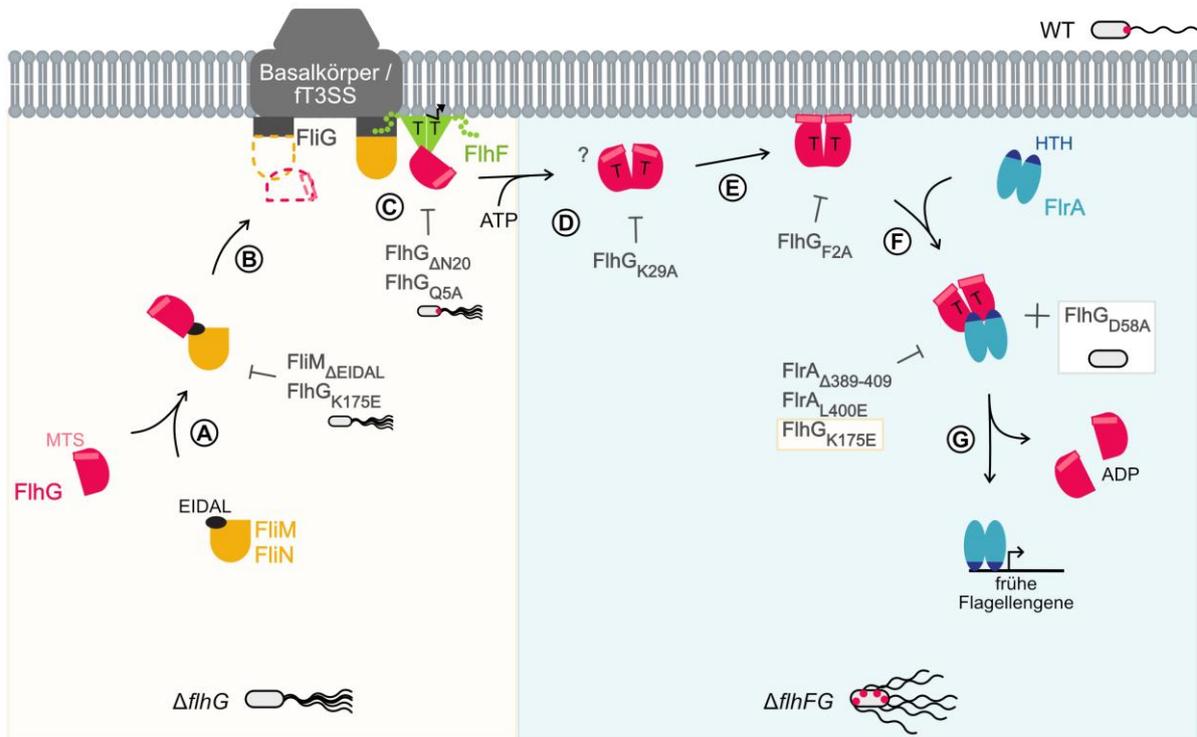


Abb. 39: ATP-abhängiger Partnerwechsel von FlhG zwischen FliM und FlrA ist für die monopolare Flagellierung essenziell. A MinD-ähnliche ATPase FlhG (rot) interagiert als Monomer mit dem EIDAL-Motiv (schwarz) des C-Ring Proteins FliM (orange). B FliMN transportiert FlhG passiv an den Zellpol. C FlhG interagiert mit der SRP-ähnlichen GTPase FlhF (grün), das zu einer Stimulierung der GTPase-Aktivität (Pfeil) von FlhF führt. Das FlhF-Dimer hydrolysiert das gebundene GTP und dissoziiert in seine Monomere. D Anschließend wechselt FlhG vermutlich vom Monomer zum ATP-gebundenen Homodimer. E Das FlhG-Dimer interagiert mit seiner *membrane targeting sequence* (MTS) an Lipide der Zellmembran. F Der Flagellenhauptregulator FlrA (türkis) interagiert mit der Linkerregion der Helix-Turn-Helix (HTH)-Domäne (blau) mit dem ATP-gebundenen FlhG-Dimer. Der FlhG-FlrA-Komplex inhibiert die FlrA-abhängige Genexpression. G FlrA stimuliert die ATPase-Aktivität von FlhG, das zur Hydrolyse von ATP und der Dissoziation des FlhG-Homodimers führt. Das freie FlrA kann die Transkription der Flagellengene aktivieren. In grau sind alle Mutationen aufgelistet, die den entsprechenden Schritt des FlhG-Mechanismus verhindert. Die Deletion von *flhG* (Δ *flhG*), Hemmung der FlhG-FliM- und FlhG-FlhF-Interaktionen führen zu einer polaren Hyperflagellierung (gelber Hintergrund). Alle weiteren FlhG-Mutanten, die bei dem ATP-gebundenen FlhG-Homodimer durchgeführt wurden, bildeten eine delokalisierte Hyperflagellierung aus (blauer Hintergrund). In den schematischen Übersichten der Flagellierung ist in Rot die Lokalisation von FlhG-sfGFP markiert. Weitere Erklärungen siehe Text.

Die genauen Mechanismen von FlhG am flagellierten Zellpol sind bisher nicht verstanden. Daher ist nicht bekannt, ob nach dem passiven Transport von FlhG an den Zellpol und der wahrscheinlichen Interaktion von FlhG und FlhF noch weitere Interaktionspartner oder Mechanismen am Zellpol vorhanden sind. Auch der Auslöser des ATP-abhängigen Wechsels vom Monomer zum Homodimer von FlhG ist nicht bekannt (Abb. 39 D). Eventuell könnte die Interaktion mit FlhF zu einer Konformationsänderung von FlhG führen oder generell die ATP-Bindung fördern. Daraufhin wird vermutlich die Änderung des Zustands von FlhG zum ATP gebundenen Dimer induziert. Die zur FlhF Interaktion defizienten Stämmen FlhG Δ N20 und FlhG $_{Q5A}$ zeigen eine Akkumulation von FlhG am Zellpol,

das auf eine Hemmung des Übergangs zum FlhG-Dimer deuten kann (Abb. 32). Somit kann keine Interaktion von FlhG mit FlrA erfolgen und die Transkription der Flagellengene inhibiert werden.

Den Einfluss auf die Flagellierung durch die Verhinderung der Dimerisierung von FlhG wurde bereits von Schuhmacher *et al.* (2015a) untersucht. Die Autoren identifizierten eine Hyperflagellierung. Allerdings erfolgte die Flagellenfärbung der Mutanten nach Heimbrook *et al.* (1989) mit Ryu-Färbelösungen. Hierbei ist im Vergleich zu in dieser Arbeit verwendeten Flagellenfärbung mit Fluoreszenzfarbstoff die Sichtbarkeit sowie die Lokalisierung der Flagellen durch den geringen Kontrast schwerer zu ermitteln. Wenn FlhG nicht mehr in der Lage ist einen ATP gebundenen Homodimer zu bilden (FlhG_{K29A}), entsteht eine Hyperflagellierung bei der die vielen Flagellen über den gesamten Zellkörper verteilt sind (Abb. 32, Abb. 39 D). Diese delokalisierte Hyperflagellierung ist auch bei der FlhG_{F2A} Mutante zu beobachten, die nicht mehr mit der Zellmembran interagieren kann (Abb. 32, Abb. 39 E). Die Bindung an die Zellmembran der *membrane targeting sequence* (MTS) von FlhG findet nur in Anwesenheit von ATP statt. Die Dimerisierung von FlhG führt zu einer Konformationsänderung. Die MTS (Helix $\alpha 10$) liegt nun nicht mehr in der hydrophoben Furche, die von den Helices $\alpha 4$ und $\alpha 5$ gebildet wird, und assoziiert mit den Lipiden (Schuhmacher *et al.* 2015a; Zhou und Lutkenhaus 2003). Die Bindung an Lipiden stimuliert die ATPase-Aktivität von FlhG. Die Hydrolyse von ATP führt zur Dissoziation des Dimers als auch zur Ablösung von der Zellmembran (Schuhmacher *et al.* 2015a). Allerdings findet die Interaktion zwischen dem Flagellenregulator FlrA und FlhG nur im ATP gebundenen Homodimer statt (Abb. 23; Abb. 39 F). Zudem zeigen mikroskopische Untersuchungen zur Lokalisierung von FlhG und FlrA mittels *single molecule tracking* bei beiden Proteinen eine hohe Wahrscheinlichkeit zum zytosolischen Aufenthalt in der Teilungsebene (Abb. 31). Dies lässt vermuten, dass der FlhG-FlrA-Komplex in der Zellmitte verweilt. Es ist bisher nicht bekannt wo die Interaktion zwischen FlhG und FlrA stattfindet. Zum einen könnte die Interaktion im Zytoplasma stattfinden, aber nach der Dissoziation von FlhG in seine Monomere müssten sich zuerst wieder ATP-gebundene FlhG-Dimere bilden. Was diese Änderung des Zustandes von FlhG auslösen könnte ist nicht bekannt. Eine andere Möglichkeit ist, dass FlrA direkt am Zellpol mit dem membrangebundenen FlhG-Dimer interagiert. In *P. aeruginosa* wurde gezeigt, dass die Interaktion mit FlrA zu einer Konformationsänderung von FlhG führt (Chanchal *et al.* 2021). Diese Konformationsänderung könnte eine Dissoziation von der Zellmembran induzieren. Das FlhG Homolog in *P. aeruginosa* zeigt bei Strukturanalysen vor allem an der MTS am C-Terminus von FleN als Monomer, Dimer und FlrA/FleQ-gebundene Form strukturelle Änderungen auf. Im FleN-Dimer weist die MTS eine ungeordnete Struktur. Dagegen entstehen durch die Bindung mit FleQ zwei helikale Windungen ($\alpha 12$ und $\alpha 13$), die auch für die Interaktion mit FleQ wichtig sind (Chanchal *et al.* 2021). Zum Identifizieren des Lokalisierungsort der FlhG-FlrA Interaktion, könnte ein Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen durchgeführt werden. Durch die Fusion mit je einem Fluorophor CFP und YFP sollten die Lokalisierungen der FlhG-FlrA Komplexe am Zellpol und/oder im Zytoplasma an der Teilungsebene nachgewiesen werden können.

FlhG ist eine MinD-ähnliche ATPase (Schuhmacher *et al.* 2015a). MinD weist wie FlhG auch einen ATP-abhängigen Wechsel zwischen Monomer und Dimer auf (siehe Kapitel 3.4.3). Die Dissoziation des MinD-Homodimers als auch die Ablösung von der Membran wird durch die Stimulation der ATP-Hydrolyse durch MinE induziert (Hu *et al.* 2002; Ramm *et al.* 2019). Ein MinE-Dimer bindet nur an eine Untereinheit des ATP-gebundenen MinD-Dimers und verursacht eine Konformationsänderung von MinD. Daraufhin wird die ATPase-Aktivität in beiden MinD-Untereinheiten stimuliert. Die Hydrolyse von ATP induziert die Dissoziation in MinD-Monomere und die Ablösung von der Membran (Ramm *et al.* 2019; Park *et al.* 2012; Hu und Lutkenhaus 2001). Neben den für die Oszillation wichtigen Proteinen MinDE besitzt das Min-System noch das Effektorprotein MinC, das die Assemblierung des FtsZ-Rings inhibiert. MinE und MinC interagieren an überlappenden Bindestellen des MinD-Dimers. Beide Proteine binden Aminosäurereste der Helix 7 von MinD (Ramm *et al.* 2019; Wu *et al.* 2011b). Die

Proteinstrukturen von MinD und der MinD-ähnlichen ATPase FlhG sind sehr ähnlich (Schuhmacher *et al.* 2015a). Das C-Ring Protein FliM und der Hauptregulator FlrA binden an die Helices α_6 und α_7 von FlhG (Schwan *et al.* 2020). Auch wenn FlhG und MinD ähnliche Bindestellen für Interaktionspartner besitzen, scheint der Mechanismus von der Rekrutierung zum Zellpol bis zur Ablösung von der Membran unterschiedlich zu sein.

Die Interaktion mit dem Regulator FlrA und FlhG ist ATP-abhängig. Die Bindung des FlhG-Dimers an FlrA führt zur Unterdrückung der Flagellenassemblierung durch die Hemmung der FlrA-abhängigen Genexpression. Dies wird durch die Analyse der Transkript- als auch Proteinmenge der FlrA-abhängigen MS-Ring Komponente FliF deutlich (Abb. 25). Die Deletion von *flhG* und die FlrA_{L400E} Mutante, welche nicht mehr mit FlhG interagieren kann, zeigen einen starken Anstieg der mRNA- und Proteinmenge von FliF. Dagegen führt die ektopische Produktion von FlhG zur stark reduzierten Expression und Produktion von FliF, da kein freies FlrA die Transkription der Flagellengene aktivieren kann (Schwan *et al.* 2020). Allerdings kann der FlrA-FlhG-Komplex weiterhin in *S. putrefaciens* und deren Homologe in *P. aeruginosa* an die FlrA-abhängigen Promotoren binden (Mrusek 2018; Navarrete *et al.* 2019; Dasgupta und Ramphal 2001). Den negativen Effekt von FlhG auf die FlrA-abhängige Transkription wurde bereits auch in *P. aeruginosa* beschrieben (Baraquet und Harwood 2013; Chanchal *et al.* 2017; Dasgupta und Ramphal 2001). Jedoch waren die Bindungsstellen der Interaktionen als auch der Mechanismus der Inaktivierung von FlrA/FleQ zu dem Zeitpunkt unserer Veröffentlichung Schwan *et al.* (2020) nicht bekannt.

Der RpoN-abhängige Aktivator FlrA/FleQ kann von inaktiven EBP-Dimeren zu ringförmigen aktiven Hexameren bzw. umgekehrt wechseln (Matsuyama *et al.* 2016; Gao und Stock 2010; Carlo *et al.* 2006; Bush und Dixon 2012). Dieser EBP-Hexamer bindet typischerweise >100 Nukleotide *upstream* des TSSs eines Promotors und interagiert dann durch die Bildung einer DNA-Schleife mit dem Holoenzym. Durch ATP-Hydrolyse katalysiert das EBP die Bildung der Transkriptionsblase und somit die Initiierung der Transkription (Baraquet *et al.* 2012; Mejía-Almonte *et al.* 2020). Nach der Veröffentlichung von Schwan *et al.* (2020) charakterisierten Chanchal *et al.* (2021) mit hochauflösenden Kristallstrukturen den Mechanismus der Inhibierung der FlrA/FleQ-abhängigen Genexpression durch FlhG/FleN in *P. aeruginosa*. Hierbei erfolgte die Identifizierung der Domänen und Aminosäureresten, die an der Interaktion von FleQ und FleN beteiligt sind. In *P. aeruginosa* und *S. putrefaciens* sind die für die Interaktion wichtigen Aminosäuren von FleN/FlhG im C-terminalen Bereich (Abb. S 9 B). Die Aminosäuren K175, K205 und F213 von FlhG, welche für die Interaktion mit FlrA in *S. putrefaciens* essenziell sind (Abb. 24 E), sind in *P. aeruginosa* nicht direkt an der Interaktion beteiligt. In *P. aeruginosa* ist in FleQ die AAA+ ATPase-Domäne wichtig für die Interaktion mit FleN (Chanchal *et al.* 2021). Dagegen ist in *S. putrefaciens* die Linkerregion zwischen der AAA+ ATPase- und der HTH-Domäne von FlrA an der FlhG-Bindung beteiligt (Abb. 23; Abb. S 9 A; Schwan *et al.* 2020). Allerdings wurde diese Linkerregion von FleQ in *P. aeruginosa* nicht bei den Messungen der Bindungsaffinitäten mit FleN berücksichtigt. Chanchal *et al.* (2021) zeigten, dass die Bindestellen zwischen FlrA/FleQ und FlhG/FleN innerhalb der monopolar flagellierten Bakterien anhand von Sequenzvergleichen konserviert sind. Diese Aminosäuresequenzen sind auch in *S. putrefaciens* konserviert, aber die Pulldown-Assays zeigten keine Beteiligung der AAA+ ATPase-Domäne von FlrA an der Interaktion mit FlhG (Abb. 23 C).

Die stark konservierte AAA+ ATPase-Domäne besitzt zwei an der Oberfläche exponierte Schlaufen L1 und L2. RpoN-abhängige Aktivatoren besitzen in der L1-Schleife das GAFTGA-Motiv, das eine wichtige Rolle bei der Wechselwirkung zwischen EBP und RpoN während der ATP-Hydrolyse spielt (Zhang *et al.* 2002). Somit sind bei EBPs die Schlaufen L1 und L2 entscheidend für die direkte Interaktion mit RpoN und dem Promotor. Diese Interaktion ist essenziell für die Trennung des DNA-Doppelstrangs und dient zur Initiierung der Transkription (Zhang *et al.* 2002; Chanchal *et al.* 2021). Durch die Bindung von FleN an FleQ finden Konformationsänderungen statt. Zum einen wird durch die Interaktion die L1-Schleife von FleQ in einer Konformation gehalten, die eine Wechselwirkung mit RpoN und der RNA-

Polymerase nicht fördert. Zum anderen wird das aktive Zentrum von FleQ allosterisch moduliert, indem es von einer aktiven zu einer inaktiven Konfiguration wechselt und zeitgleich das ATP freisetzt. Somit verhindert die Bindung von FleN an FleQ die Interaktion mit RpoN als auch die Hydrolyse von ATP, das die Bildung der Transkriptionsblase inhibiert und daher die Transkription nicht initiiert werden kann (Chanchal *et al.* 2021). Allerdings unterscheidet sich der Einfluss von FlhG/FleN auf die ATPase-Aktivität von FlrA/FleQ in *S. putrefaciens* und *P. aeruginosa*. FleQ/FlrA besitzt eine deutlich höhere intrinsische ATPase-Aktivität als FleN/FlhG. Die Hydrolyse von ATP durch FleQ wird über die Protein-Protein-Interaktion mit FleN in *P. aeruginosa* reguliert. In der Anwesenheit von FleN ist FleQ nicht mehr in der Lage ATP zu hydrolysieren (Chanchal *et al.* 2017). Dagegen zeigt die ATPase-Aktivität von FlrA aus *S. putrefaciens* keine signifikante Veränderung in der Anwesenheit von FlhG (Blagotinsek 2021). Dieser Unterschied auf den Einfluss der ATPase-Aktivität von FlrA/FleQ in *S. putrefaciens* und *P. aeruginosa* könnte auf die verschiedenen Bindestellen von FlrA/FleQ bei der Interaktion mit FlhG/FleN zurückzuführen sein. Um diese Unterschiede besser verstehen zu können, sollten weitere Analysen von FlrA und FlhG stattfinden. Hierfür können Kristallstrukturanalysen von FlhG als Monomer, Dimer und in FlrA-gebundener Form durchgeführt werden, um die Unterschiede des Mechanismus von FlhG auf die Inhibierung der FlrA-abhängigen Transkription zwischen *Pseudomonas* und *Shewanella* verstehen zu können.

Die reversible Dimerisierung von FlhG ermöglicht die transkriptionelle Regulation der FlrA-abhängigen Expression von Flagellengenen. Diese feine Abstimmung der Transkription dient der Verhinderung der Bildung vieler Flagellen und stellt sicher, dass nur ein polares Flagellum produziert wird. Diese Regulation wird auch bei der Betrachtung der Flagellierung sichtbar. Eine ektopische Produktion von FlrA führt zu einer polaren Hyperflagellierung, die einem *flhG* Deletionsphänotyp entspricht (Abb. 16 A). Dagegen sind Zellen nicht mehr in der Lage ein Flagellum zu assemblieren, wenn FlhG vermehrt produziert wird und somit kein freies FlrA mehr vorliegt (Abb. 28). Auch die FlhG_{D58A} Mutante, die kein ATP hydrolysieren kann und somit kontinuierlich mit FlrA interagiert, kann überwiegend keine Flagelle produzieren (Abb. 32; Abb. S 6). Bei Störung der Interaktion von FlhG und FlrA über die FlhG_{K175E} Mutante, die auch nicht mehr mit dem C-Ring Protein FliM interagieren kann, ist eine polare Hyperflagellierung zu beobachten. Allerdings unterscheidet sich dieser Phänotyp bei Zerstörung der FlhG-Bindungsstelle an FlrA. Hier ist bei FlrA_{Δ389-409} und FlrA_{L400E} eine delokalisierte Hyperflagellierung, wie bei einer peritrichen Flagellierung, festzustellen (Abb. 26, Abb. 27). Die Doppel- und Dreifachmutanten FlhG_{D58A-K175E}, FlhG_{F2A-K175E} und FlhG_{F2A-D58A-K175E}, die alle keine Interaktion mit FliM sowie FlrA durch die Substitution K175E aufweisen, können nicht mehr am Zellpol lokalisieren und dies resultiert in einer polaren Hyperflagellierung (Abb. 32, Abb. 33). Dies bestätigt nochmals, dass FlhG von FliM an den Zellpol transportiert werden muss (Abb. 39).

Nicht nur die ATPase-Aktivität von FlrA kann beeinflusst werden, sondern auch die von FlhG. Diese wird bei dem ATP-gebundenen FlhG-Dimer von der HTH-Domäne von FlrA stimuliert (Abb. 23 E, Schwan *et al.* 2020). Die Stimulation der ATPase-Aktivität führt zur Hydrolyse von ATP und daraufhin zur Dissoziation von FlhG. Die FlhG-Monomere sind nun wieder frei und können den Zyklus von vorne beginnen. Jedoch ist unklar, ob dies kontinuierlich geschieht oder doch noch ein weiterer Faktor die Dissoziation des FlhG-FlrA-Komplexes initiiert. Zum Verifizieren, dass dieser FlhG-Zyklus kontinuierlich stattfindet, könnte zum Nachweis der Protein-Protein-Interaktionen von FlhG-FliM und FlhG-FlrA je FRET-Analysen in Kombination mit *single molecule tracking* zur Lokalisierung durchgeführt werden. Mit dieser Kombination müsste ermittelt werden können, ob der FlhG-Zyklus in allen Zellteilungsphasen aufrechterhalten bleibt. Für die Regulation der monopolen Flagellierung ist es wichtig, dass die Proteinmengen von FlrA und FlhG sich im Gleichgewicht befinden. Eine veränderte Proteinmenge durch Deletion oder ektopische Produktion von *flrA* oder *flhG* ist direkt im Phänotyp der Flagellierung sichtbar. Florian Rossmann stellte mit Hilfe von Western Blots fest, dass ein deutlicher Proteinüberschuss von FlhG gegenüber FlrA und FliM in den Zellen existiert. Die dreifache Menge an FlhG wurde im Vergleich

zu FlrA und FliM beobachtet (Daten nicht veröffentlicht). Die vorhandenen Mikroskopiedaten des *single molecule trackings* von FlhG in Kooperation mit der AG Graumann (Marburg) können weiterhin genutzt werden, um die Anzahl der FlhG-Proteine pro Zelle zu kalkulieren. Die Verhältnisse an Proteinmengen und weitere Daten bezüglich Bindungsaffinitäten und Flagellierungsphänotypen können dazu dienen, um mit Hilfe von mathematischen Modellen (AG Frey, München) den Mechanismus zur monopolen Flagellenassemblierung aufzuklären. Dieses Modell könnte auch weitere Hinweise liefern, an welchen Stellen des Mechanismus beteiligte Komponenten fehlen, oder wie robust das Regulationsnetzwerk ist.

Überraschenderweise besitzen die *S. putrefaciens* Mutanten FlhG_{K29A}, FlhG_{F2A} und FlrA_{L400E} und die Doppelmutanten FlhG_{F2A-D58A} und FlhG_{F2A}-FlrA_{L400E} alle eine Hyperflagellierung bei der die Flagellen über den gesamten Zellkörper verteilt sind (Abb. 32, Abb. 33). Diese peritriche Flagellierung wurde bisher in *S. putrefaciens* nicht beobachtet. Dagegen beschreiben Chanchal *et al.* (2021) bei Verhinderung der FleQ-FleN-Interaktion in *P. aeruginosa* eine polare Hyperflagellierung, aber es wurde nicht die Lokalisierung der Flagellen mit Hilfe von Färbung der Haken mit einem Fluoreszenzfarbstoff ermittelt. Bei der Betrachtung von Flagellen ist es oft schwierig zu ermitteln, welchen Ursprungsort diese besitzen. *S. oneidensis* zeigt eine delokalisierte Hyperflagellierung bei der Deletion von *flhFG* (Gao *et al.* 2015) und dies wurde auch in *S. putrefaciens* beobachtet (Abb. 29 A; Schwan *et al.* 2020). Die SRP-ähnliche GTPase FlhF ist an der Regulation der Lokalisierung des Flagellums involviert (Rossmann *et al.* 2015). Daher wurde zuerst eine weitere Regulation auf der Ebene von FlrA, an der auch FlhF beteiligt ist, vermutet. Dies hat sich jedoch nicht bestätigt, da FlhF trotz der delokalisierten Flagellierung weiterhin eine polare Lokalisierung zeigt und somit wohl keinen Einfluss auf die Delokalisierung besitzt (Abb. 29 C). Auch ist eine erhöhte Proteinproduktion von u. a. FlhF und FlhG bei den peritrich flagellierten Stämmen wie *S. putrefaciens flrA_{L400E}* zu beobachten (Abb. 29 B). Dies ist jedoch nicht die Ursache für den Flagellierungsphänotyp, da eine ektopische Produktion von FlhFG zu nicht flagellierten Zellen führt (Abb. 29 A). Die vermehrte Produktion von FlhG führt zur Hemmung der FlrA-abhängigen Genexpression. Bei einer ektopischen Produktion von nur FlhF in *S. putrefaciens* ist eine polare Hyperflagellierung zu beobachten (Rossmann *et al.* 2015). Die hohen Proteinmengen an FlhFG sowie die Hemmung der FlrA-abhängigen Genexpression bei der FlrA_{L400E} Mutante lassen somit nicht die delokalisierte Hyperflagellierung erklären. Die höheren Proteinlevel von FlhFG entstehen durch die vermehrte Transkription von *flhFG*, da FlrA nicht von FlhG inhibiert wird. Dies ist auch bei der ektopischen Produktion von FlrA bei FliI und FliM zu sehen, die auch in der Abwesenheit von FlrA produziert werden (Abb. 16 B). Bei den verschiedenen *S. putrefaciens* Mutanten, die eine delokalisierte Hyperflagellierung zeigen, sind meist zwei bis vier aber auch bis zu acht Haken pro Zelle zufällig über den Zellkörper verteilt (Abb. 30, Abb. 34). Eine Gemeinsamkeit dieser Mutanten ist, dass die Mutationen alle eine Rolle bei dem ATP-gebundenen FlhG-Dimer spielen (Abb. 39). Das FlhG-Dimer könnte einen weiteren bisher unbekannt Interaktionspartner besitzen, der eventuell die Flagellenassemblierung und Zellteilung synchronisiert (siehe Kapitel 5.5). Durch den nicht vorhandenen negativen Effekt von FlhG auf die FlrA-abhängige Genexpression werden viele Flagellen produziert und die fehlende Synchronisation der Zellteilung könnte eventuell zu der Delokalisierung der Flagellen führen.

5.5 Synchronisation von Flagellenassemblierung und Zellteilung

S. putrefaciens benötigt von der Initiierung der Genexpression von *flrA* bis zu einer schwimmfähigen Zelle ca. 1,5 Generationen (Abb. 17). Daher sollte eine feine Abstimmung existieren, die die Flagellenassemblierung und Zellteilung zueinander anpassen. Die ursprüngliche Überlegung, dass die Produktion eines Flagellums mit der Initiierung der Genexpression des Hauptregulators *flrA* startet (siehe Kapitel 5.1), ist eventuell nicht ganz korrekt. Kim *et al.* (2020) stellten die Hypothese auf, dass der Hauptregulator FlhD_{4C₂} nur zwischen einem aktiven und inaktiven Zustand wechselt. Die Inaktivierung von FlrA erfolgt durch die Bindung der MinD-ähnlichen ATPase FlhG in *S. putrefaciens* und auch in weiteren monopolar flagellierten Bakterien (Schwan *et al.* 2020; Dasgupta und Ramphal

2001). Vor allem FlhG Mutationen, die einen Einfluss auf das ATP-gebundene Dimer nehmen, besitzen einen peritrichen Flagellierungsphänotyp (Abb. 39). Die SRP-ähnliche GTPase FlhF spielt eine Rolle in der Lokalisierung der Flagelle in *S. putrefaciens*. Allerdings ist FlhF weiterhin am Pol lokalisiert (Abb. 29) und ist somit nicht an der Delokalisierung der Flagelle beteiligt. Daher könnte ein bisher unbekannter Faktor zu einem spezifischen Zellteilungszeitpunkt vorhanden sein, der mit dem FlhG-Dimer interagiert und sozusagen als Antagonist wirkt. Daraufhin kann FlhG nicht an FlrA binden und zu keiner weiteren Hemmung der Flagellensynthese führen. Dieser Zellzyklus abhängige Faktor würde somit die FlrA-abhängige Genexpression indirekt initiieren und die Flagellensynthese starten. Allerdings muss es nicht direkt eine Komponente des Zellteilungssystems sein, sondern kann auch eine Rolle bei der Zellgröße bzw. Zytoskelett spielen oder als Verbindungsprotein zwischen den komplexen Systemen fungieren. Um diesen Interaktionspartner zu identifizieren, könnte ein Pulldown-Assay mit gereinigtem FlhG als Dimer (FlhG_{D58A}) gegen das Zelllysate von *S. putrefaciens* durchgeführt werden.

C. crescentus besitzt einen in α -Proteobakterien konservierten Regulator MadA, der die Zellteilung und Flagellenassemblierung verbindet. Der Zellzyklusregulator CtrA reguliert direkt die *madA* Transkription. MadA bindet am Basalkörper an das σ^{70} -Protein FlhA und dient als Kontrollpunkt des Assemblierungsstatus der frühen Flagellenbestandteile. Anschließend aktiviert MadA die Expression der FlhD-abhängigen Klasse III Flagellengene, um die Produktion des Flagellums fertigstellen zu können. Zudem beeinflusst MadA die Transkription der späten Zellteilungskomponenten, die die Abundanz des Hauptzellteilungsproteins FtsZ beeinträchtigt. Durch diese Verbindung von Flagellenassemblierung und Zellteilung über MadA sind die beiden komplexen Mechanismen miteinander synchronisiert (Siwach *et al.* 2021; Popp und Erhardt 2021).

FlhG ist ein strukturelles Homolog der ATPase MinD (Schuhmacher *et al.* 2015a). In *C. jejuni* übernimmt FlhG neben der Flagellenregulation auch die Funktion des Min-Systems. Bei den Untersuchungen des Einflusses des Min-Systems auf FlhG und umgekehrt sind keine Änderungen der Flagellensynthese und Zellteilung in *S. putrefaciens* zu beobachten (Abb. 35). Allerdings ist im Vergleich zu *E. coli* (40 s; Raskin und Boer 1999) der Oszillationszyklus von sfGFP-MinD (65 s; Abb. 35) langsamer. Der zeitliche Unterschied könnte durch verschiedene Temperaturen bei Wachstum und Mikroskopie zustande kommen, da die MinD-Oszillation temperaturabhängig ist (Touhami *et al.* 2006). Auch wenn MinD nicht direkt eine Funktion in der Flagellensynthese hat, können weitere Zellteilungskomponenten in der Synchronisation involviert sein. MinD interagiert neben den Min-Proteinen MinCE auch direkt mit FtsZ in *E. coli*. Dabei inhibiert FtsZ die ATPase-Aktivität von MinD (Taviti und Beuria 2017). Eventuell könnte FtsZ ein möglicher Interaktionspartner von FlhG sein, der die Synchronisation zwischen Zellteilung und Flagellenassemblierung übernimmt. Dieser Einfluss kann bei der Abwesenheit von MinD nicht identifiziert werden, da die Zellen von *S. putrefaciens* weiterhin in der Lage sind den FtsZ-Ring meist mittig in der Zelle zu positionieren (Bachelorthesis Dorian Fischer). Der direkte Einfluss auf die Flagellierung könnte mit einer *ftsZ* Depletionsmutante untersucht werden.

In *E. coli* inhibiert das Signalmolekül Guanosin-Tetraphosphat (ppGpp) die Transkription des Hauptregulators *flhDC* der Flagelle (Lemke *et al.* 2009). ppGpp ist ein Schlüsselfaktor zur Koordination der Zellgröße und Wachstum (Büke *et al.* 2021). Daher könnte auch ppGpp eventuell eine Rolle in der Synchronisation der Zellteilung und Flagellenassemblierung spielen. Bei *S. putrefaciens* Stämmen mit dem Expressionsplasmid pBTOK sind elongierte Zellen zu beobachten. Diese Elongation ist unabhängig in der Leervektorkontrolle und bei einer ektopischen Produktion zu beobachten. Allerdings zeigen diese keine Änderung des Phänotyps hinsichtlich einer Hyperflagellierung. Somit kann ppGpp als direkter Regulator zur Produktion von nur einem polaren Flagellum ausgeschlossen werden. Jedoch einen negativen Einfluss könnte ppGpp auf die Transkription von Flagellengenen besitzen, da die elongierten Zellen mit dem Plasmid pBTOK einen geringeren Anteil an flagellierten Zellen aufweisen. Weitere Untersuchungen auf die Transkription und Flagellierung müssen klären, ob der beobachtete Effekt wirklich auf die Zellgröße sowie ppGpp und nicht der Einfluss von Antibiotika oder dem Induktor

zurückzuführen ist. Hierfür sollten unterschiedliche Konzentrationen an ppGpp analysiert werden. Diese kann durch die Produktion des ppGpp Syntheseenzym RelA aus *E. coli* bzw. Hydrolyseenzym Mesh1 aus *Drosophila melanogaster* variiert werden (Büke *et al.* 2021).

Bactofiline sind Filamentproteine, die ein wichtiger Bestandteil des bakteriellen Zytoskeletts sind und vielfältige Funktionen übernehmen (Kühn *et al.* 2010; Koch *et al.* 2011; Lin *et al.* 2017; Deng *et al.* 2019). In *M. xanthus* spielen Bactofiline eine Rolle bei der Chromosomenaufteilung (Lin *et al.* 2017), Erhaltung der Zellform (Koch *et al.* 2011) und der Typ-IV-Pili vermittelten Motilität (Bulyha *et al.* 2013; Lin *et al.* 2017). Dagegen sind in *B. subtilis* die Bactofiline essenziell für die Assemblierung der Haken- und Filamentstruktur der Flagellen (El Andari *et al.* 2015). Die Bactofiline zeigen eine artspezifische zelluläre Verteilung (Koch *et al.* 2011). In *S. oneidensis* lokalisiert das Bactofilin (SO_1662) an der Position der Zellteilung (Kühn *et al.* 2010). Die Deletion des einzigen Bactofilins (Sputcn32_1382) in *S. putrefaciens* führt zu keiner Beeinträchtigung der Motilität auf semisoliden Oberflächen (Daten nicht gezeigt). Somit kann Bactofilin als möglicher Faktor zur Synchronisation der Flagellenassemblierung und Zellteilung in *Shewanella* ausgeschlossen werden.

In *Vibrio* Spezies führt eine Deletion von *flhFG* zu einer nicht flagellierten Zelle (Kusumoto *et al.* 2008). Bei zusätzlicher Abwesenheit von dem DnaJ-ähnlichen Protein SifA ist eine peritriche Flagellierung zu beobachten. SifA inhibiert die Bildung von lateralen Flagellen, um die Assemblierung des monopolen Flagellums zu fördern. Allerdings ist das Transmembranprotein SifA spezifisch für *Vibrio* Spezies und existiert nicht in *Shewanella* (Kojima *et al.* 2020; Kitaoka *et al.* 2013; Shi *et al.* 2014; Inaba *et al.* 2017).

5.6 Fazit

Die Ergebnisse dieser Thesis tragen dazu bei, das komplexe Regulationsnetzwerk der Flagellenassemblierung bei monopolar flagellierten Bakterien besser zu verstehen. In *S. putrefaciens* sind nur der Hauptregulator FlrA mit dem Sigmafaktor RpoN und der alternative Sigmafaktor FliA an der transkriptionellen Regulation der Flagellengene beteiligt. Die ursprünglich beschriebene transkriptionelle Regulation einiger früher Flagellenkomponente sowie -regulatoren ist nicht so strikt reguliert wie angenommen. Die konstitutive Expression mit Hilfe von σ^{70} -abhängigen Promotoren dieser Gene ist essenziell für die Assemblierung und Funktionalität des monopolen Flagellums. Die MinD-ähnliche ATPase FlhG ist eines dieser kontinuierlich produzierten Bestandteile und dient zur Bestimmung der Flagellenanzahl. FlhG wird passiv von dem ebenfalls konstitutiv produzierten C-Ring Protein FliM zum flagellierten Zellpol transportiert. Diese polare Lokalisierung von FlhG ist essenziell für die Fähigkeit der Regulation der Flagellenanzahl. Jedoch ist bisher nicht genau verstanden, welche weiteren Funktionen FlhG direkt am Pol besitzt. Durch die polare Lokalisierung kann FlhG den Wechsel vom Monomer zum ATP-gebundenen FlhG-Dimer durchführen. Das FlhG-Dimer interagiert mit dem Hauptregulator FlrA und inhibiert die Transkription der frühen Flagellengene. Dieser FlhG-Zyklus findet vermutlich kontinuierlich statt. Die C-Ring Untereinheiten FliMN werden während der Flagellenrotation ausgetauscht und somit wird wahrscheinlich auch FlhG konstant an den Zellpol transportiert. Die durchgehende Möglichkeit von FlhG mit FlrA zu interagieren ist für die Produktion von nur einem Flagellum essenziell. Dieser negative Mechanismus zeigt, wie eine makromolekulare Maschine die Produktion ihrer eigenen Komponenten reguliert.

6 Material und Methoden

6.1 Materialien

6.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von den Firmen Roth (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim) und Merck (Darmstadt) bezogen.

6.1.2 Bakterienstämme und Plasmide

Die Tab. 1 fasst die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme zusammen.

Tab. 1: Bakterienstämme

Stamm	Relevanter Genotyp oder Beschreibung	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α λ pir	ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 hsdR17 deoR thi-l supE44 gyrA96 relA1</i> / λ pir	Miller und Mekalanos 1988
WM3064	<i>thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ</i> Δ M15 RP4-1360 Δ (<i>araBAD</i>) 567 Δ <i>dapA</i> 1341::[<i>erm pir</i> (wt)]	W. Metcalf, University of Illinois, Urbana-Champaign
BTH101	F-, <i>cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1 (Str)</i> , <i>hsdR2, mcrA1, mcrB1</i>	Euromedex, Frankreich
<i>Shewanella putrefaciens</i>		
S271	Wildtyp	Fredrickson <i>et al.</i> 1998
S3139	Δ <i>fliA</i> ; Δ Sputcn32_2580; <i>in frame</i> Deletion von <i>fliA</i>	Kühn <i>et al.</i> 2018
S3142	Δ <i>rpoN</i> ; Δ Sputcn32_0715; <i>in frame</i> Deletion von <i>rpoN</i>	Kühn <i>et al.</i> 2018
S2673	Δ <i>fliA</i> ; Δ Sputcn32_2559; <i>in frame</i> Deletion von <i>fliA</i>	Kühn <i>et al.</i> 2018
S5119	<i>fliE</i> -FLAG, Sputcn32_2577; Insertion von <i>fliE</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	diese Arbeit
S5120	<i>fliE</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2577, Sputcn32_2580; Insertion von <i>fliE</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S5121	<i>fliE</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2577, Sputcn32_0715; Insertion von <i>fliE</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S5122	<i>fliE</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2577, Sputcn32_2559; Insertion von <i>fliE</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S4295	<i>fliF</i> -FLAG, Sputcn32_2576; Insertion von <i>fliF</i> mit einem N-terminalen 3xFLAG-Anhang	Schwan <i>et al.</i> 2020
S4296	<i>fliF</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2576, Sputcn32_2580; Insertion von <i>fliF</i> mit einem N-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S3139) Hintergrund	Schwan <i>et al.</i> 2020
S5234	<i>fliF</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2576, Sputcn32_0715; Insertion von <i>fliF</i> mit einem N-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S5235	<i>fliF</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2576, Sputcn32_2559; Insertion von <i>fliF</i> mit einem N-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S4681	<i>fliG</i> -FLAG, Sputcn32_2575; Insertion von <i>fliG</i> mit einem N-terminalen 3xFLAG-Anhang	Florian Rossmann
S4682	<i>fliG</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2575, Sputcn32_2580; Insertion von <i>fliG</i> mit einem N-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S3139) Hintergrund	Florian Rossmann
S5282	<i>fliG</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2575, Sputcn32_0715; Insertion von <i>fliG</i> mit einem N-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S5283	<i>fliG</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2575, Sputcn32_2559; Insertion von <i>fliG</i> mit einem N-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S7191	<i>fliH</i> -FLAG, Sputcn32_2574; Insertion von <i>fliH</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	diese Arbeit

Stamm	Relevanter Genotyp oder Beschreibung	Referenz
S7193	<i>fliH</i> -FLAG Δ <i>fliR</i> , Sputcn32_2574, Sputcn32_2580; Insertion von <i>fliH</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliR</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S7231	<i>fliH</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2574, Sputcn32_0715; Insertion von <i>fliH</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S7192	<i>fliH</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2574, Sputcn32_2559; Insertion von <i>fliH</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S6126	<i>fliI</i> -FLAG, Sputcn32_2573; Insertion von <i>fliI</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	diese Arbeit
S6171	<i>fliI</i> -FLAG Δ <i>fliR</i> , Sputcn32_2573, Sputcn32_2580; Insertion von <i>fliI</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliR</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S6176	<i>fliI</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2573, Sputcn32_0715; Insertion von <i>fliI</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S6170	<i>fliI</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2573, Sputcn32_2559; Insertion von <i>fliI</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-tag in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S6125	<i>fliJ</i> -FLAG, Sputcn32_2572; Insertion von <i>fliJ</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	diese Arbeit
S6169	<i>fliJ</i> -FLAG Δ <i>fliR</i> , Sputcn32_2572, Sputcn32_2580; Insertion von <i>fliJ</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliR</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S6175	<i>fliJ</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2572, Sputcn32_0715; Insertion von <i>fliJ</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S6168	<i>fliJ</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2572, Sputcn32_2559; Insertion von <i>fliJ</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S5186	<i>fliK</i> -FLAG, Sputcn32_2571; Insertion von <i>fliK</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	diese Arbeit
S5187	<i>fliK</i> -FLAG Δ <i>fliR</i> , Sputcn32_2571, Sputcn32_2580; Insertion von <i>fliK</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliR</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S5188	<i>fliK</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2571, Sputcn32_0715; Insertion von <i>fliK</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S5189	<i>fliK</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2571, Sputcn32_2559; Insertion von <i>fliK</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S5123	<i>fliL</i> -FLAG, Sputcn32_2570; Insertion von <i>fliL</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	diese Arbeit
S5124	<i>fliL</i> -FLAG Δ <i>fliR</i> , Sputcn32_2570, Sputcn32_2580; Insertion von <i>fliL</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliR</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S5125	<i>fliL</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2570, Sputcn32_0715; Insertion von <i>fliL</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S5126	<i>fliL</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2570, Sputcn32_2559; Insertion von <i>fliL</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S4166	<i>fliM</i> -FLAG, Sputcn32_2569; Insertion von <i>fliM</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	Florian Rossmann
S7145	<i>fliM</i> -FLAG Δ <i>fliR</i> , Sputcn32_2569, Sputcn32_2580; Insertion von <i>fliM</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliR</i> (S3139) Hintergrund	Florian Rossmann
S7146	<i>fliM</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2569, Sputcn32_0715; Insertion von <i>fliM</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S7147	<i>fliM</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2569, Sputcn32_2559; Insertion von <i>fliM</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S5114	<i>fliN</i> -FLAG, Sputcn32_2568; Insertion von <i>fliN</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	diese Arbeit
S5115	<i>fliN</i> -FLAG Δ <i>fliR</i> , Sputcn32_2568, Sputcn32_2580; Insertion von <i>fliN</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliR</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S5116	<i>fliN</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2568, Sputcn32_0715; Insertion von <i>fliN</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S5117	<i>fliN</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2568, Sputcn32_2559; Insertion von <i>fliN</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S5278	<i>fliO</i> -GFP, Sputcn32_2567; Insertion von <i>fliO</i> mit einem C-terminalen sfGFP-Anhang	diese Arbeit
S5279	<i>fliO</i> -GFP Δ <i>fliR</i> , Sputcn32_2567, Sputcn32_2580; Insertion von <i>fliO</i> mit einem C-terminalen sfGFP-Anhang in Δ <i>fliR</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S5280	<i>fliO</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2567, Sputcn32_0715; Insertion von <i>fliO</i> mit einem C-terminalen sfGFP-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S5281	<i>fliO</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2567, Sputcn32_2559; Insertion von <i>fliO</i> mit einem C-terminalen sfGFP-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit

Stamm	Relevanter Genotyp oder Beschreibung	Referenz
S5190	<i>fliP</i> -FLAG, Sputcn32_2566; Insertion of <i>fliP</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	diese Arbeit
S5191	<i>fliP</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2566, Sputcn32_2580; Insertion of <i>fliP</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S5192	<i>fliP</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2566, Sputcn32_0715; Insertion of <i>fliP</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S5193	<i>fliP</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2566, Sputcn32_2559; Insertion of <i>fliP</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S6124	<i>fliQ</i> -FLAG, Sputcn32_2565; Insertion von <i>fliQ</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	diese Arbeit
S6178	<i>fliQ</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2565, Sputcn32_2580; Insertion von <i>fliQ</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S6174	<i>fliQ</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2565, Sputcn32_0715; Insertion von <i>fliQ</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S6167	<i>fliQ</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2565, Sputcn32_2559; Insertion von <i>fliQ</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S4623	<i>flhB</i> -FLAG, Sputcn32_2563; Insertion von <i>flhB</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	diese Arbeit
S4625	<i>flhB</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2563, Sputcn32_2580; Insertion von <i>flhB</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S5248	<i>flhB</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2563, Sputcn32_0715; Insertion von <i>flhB</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S5249	<i>flhB</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2563, Sputcn32_2559; Insertion von <i>flhB</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S4298	<i>flhA</i> -FLAG, Sputcn32_2562; Insertion von <i>flhA</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	diese Arbeit
S4299	<i>flhA</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2562, Sputcn32_2580; Insertion von <i>flhA</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S5232	<i>flhA</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2562, Sputcn32_0715; Insertion von <i>flhA</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S5233	<i>flhA</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2562, Sputcn32_2559; Insertion von <i>flhA</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S5197	<i>flhF</i> -FLAG, Sputcn32_2561; Insertion von <i>flhF</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	diese Arbeit
S5198	<i>flhF</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2561, Sputcn32_2580; Insertion von <i>flhF</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S5199	<i>flhF</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2561, Sputcn32_0715; Insertion von <i>flhF</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S5200	<i>flhF</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2561, Sputcn32_2559; Insertion von <i>flhF</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S5570	<i>flhG</i> -FLAG, Sputcn32_2560; Insertion von <i>flhG</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-tag	Schwan <i>et al.</i> 2020
S5571	<i>flhG</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2560, Sputcn32_2580; Insertion von <i>flhG</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-tag in Δ <i>fliA</i> (S3139) Hintergrund	Schwan <i>et al.</i> 2020
S5572	<i>flhG</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2560, Sputcn32_0715; Insertion von <i>flhG</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-tag in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	Schwan <i>et al.</i> 2020
S5573	<i>flhG</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2560, Sputcn32_2559; Insertion von <i>flhG</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-tag in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	Schwan <i>et al.</i> 2020
S4622	<i>fliA</i> -FLAG, Sputcn32_2559; Insertion von <i>fliA</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	Florian Rossmann
S4624	<i>fliA</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2559, Sputcn32_2580; Insertion von <i>fliA</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S3139) Hintergrund	Florian Rossmann
S5178	<i>fliA</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2559, Sputcn32_0715; Insertion von <i>fliA</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S6127	<i>fliB</i> -FLAG, Sputcn32_2579; Insertion von <i>fliB</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	diese Arbeit
S6173	<i>fliB</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2579, Sputcn32_2580; Insertion von <i>fliB</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S6179	<i>fliB</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2579, Sputcn32_0715; Insertion von <i>fliB</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S6172	<i>fliB</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2579, Sputcn32_2559; Insertion von <i>fliB</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit

Stamm	Relevanter Genotyp oder Beschreibung	Referenz
S5182	<i>flrC</i> -FLAG, Sputcn32_2578; Insertion von <i>flrC</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	diese Arbeit
S5183	<i>flrC</i> -FLAG Δ <i>flrA</i> , Sputcn32_2578, Sputcn32_2580; Insertion von <i>flrC</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>flrA</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S5184	<i>flrC</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2578, Sputcn32_0715; Insertion von <i>flrC</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S5185	<i>flrC</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2578, Sputcn32_2559; Insertion von <i>flrC</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S5417	<i>flgK</i> -FLAG, Sputcn32_2588; Insertion von <i>flgK</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	diese Arbeit
S5418	<i>flgK</i> -FLAG Δ <i>flrA</i> , Sputcn32_2588, Sputcn32_2580; Insertion von <i>flgK</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>flrA</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S5419	<i>flgK</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2588, Sputcn32_0715; Insertion von <i>flgK</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S5420	<i>flgK</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2588, Sputcn32_2559; Insertion von <i>flgK</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S4710	<i>flgM</i> -FLAG, Sputcn32_2601; Insertion von <i>flgM</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	Florian Rossmann
S4711	<i>flgM</i> -FLAG Δ <i>flrA</i> , Sputcn32_2601, Sputcn32_2580; Insertion von <i>flgM</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>flrA</i> (S3139) Hintergrund	Florian Rossmann
S5195	<i>flgM</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_2601, Sputcn32_0715; Insertion von <i>flgM</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S5196	<i>flgM</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_2601, Sputcn32_2559; Insertion von <i>flgM</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S2150	<i>motX</i> -mCherry, Sputcn32_0748; Insertion von <i>motX</i> mit einem C-terminalen mCherry-Anhang	Bubendorfer et al. 2012
S5973	<i>motX</i> -mCherry Δ <i>flrA</i> , Sputcn32_0748, Sputcn32_2580; Insertion von <i>motX</i> mit einem C-terminalen mCherry-Anhang in Δ <i>flrA</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S5974	<i>motX</i> -mCherry Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_0748, Sputcn32_0715; Insertion von <i>motX</i> mit einem C-terminalen mCherry-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S5975	<i>motX</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_0748, Sputcn32_2559; Insertion von <i>motX</i> mit einem C-terminalen mCherry-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S5228	<i>motY</i> -FLAG, Sputcn32_1601; Insertion von <i>motY</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	diese Arbeit
S5229	<i>motY</i> -FLAG Δ <i>flrA</i> , Sputcn32_1601, Sputcn32_2580; Insertion von <i>motY</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>flrA</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S5230	<i>motY</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_1601, Sputcn32_0715; Insertion von <i>motY</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S5231	<i>motY</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_1601, Sputcn32_2559; Insertion von <i>motY</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S7703	<i>lapB</i> -FLAG, Sputcn32_3592; Insertion von <i>lapB</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	Vanessa Kreiling
S7630	<i>lapB</i> -FLAG Δ <i>flrA</i> , Sputcn32_3592, Sputcn32_2580; Insertion von <i>lapB</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>flrA</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S7631	<i>lapB</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_3592, Sputcn32_0715; Insertion von <i>lapB</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S7632	<i>lapB</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_3592, Sputcn32_2559; Insertion von <i>lapB</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S7699	<i>aggA</i> -FLAG, Sputcn32_3594; Insertion von <i>aggA</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang	Vanessa Kreiling
S7633	<i>aggA</i> -FLAG Δ <i>flrA</i> , Sputcn32_3594, Sputcn32_2580; Insertion von <i>aggA</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>flrA</i> (S3139) Hintergrund	diese Arbeit
S7634	<i>aggA</i> -FLAG Δ <i>rpoN</i> , Sputcn32_3594, Sputcn32_0715; Insertion von <i>aggA</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>rpoN</i> (S3142) Hintergrund	diese Arbeit
S7635	<i>aggA</i> -FLAG Δ <i>fliA</i> , Sputcn32_3594, Sputcn32_2559; Insertion von <i>aggA</i> mit einem C-terminalen 3xFLAG-Anhang in Δ <i>fliA</i> (S2673) Hintergrund	diese Arbeit
S3174	Δ <i>flrBC</i> ; Δ Sputcn32_2579 Δ Sputcn32_2578; in frame Deletion von <i>flrB</i> und <i>flrC</i>	Kühn et al. 2018
S5250	Δ <i>flrABC</i> ; Δ Sputcn32_2580 Δ Sputcn32_2579 Δ Sputcn32_2578; in frame Deletion von <i>flrA</i> , <i>flrB</i> und <i>flrC</i>	diese Arbeit

Stamm	Relevanter Genotyp oder Beschreibung	Referenz
S4401	<i>flaAB₁cys ΔflaAB₂</i> ; Sputcn32_2586-T174C Sputcn32_2585-T166C ΔSputcn32_3456 ΔSputcn32_3455; Insertion von Cystein-markiertes <i>flaA₁</i> Gen in Δ <i>flaA₁</i> und Cystein-markiertes <i>flaB₁</i> Gen in Δ <i>flaB₁</i> und Deletion der lateralen Flagellengene <i>flaA₂</i> und <i>flaB₂</i>	Kühn <i>et al.</i> 2017
S7761	Δ <i>flhAF flaAB₁-cys ΔflaAB₂</i> ; Sputcn32_2562 Sputcn32_2561; Deletion von <i>flhA</i> und <i>flhF</i> in <i>flaAB₁ cys ΔflaAB₂</i> (S4401) Hintergrund	diese Arbeit
S7796	<i>PflhFG</i> NPM; Sputcn32_2561 Sputcn32_2560; Insertion von substituierten Sigma 70 Promotorregionen von <i>flhF</i> und <i>flhG</i> in Δ <i>flhAF flaAB₁-cys ΔflaAB₂</i> (S7761) Hintergrund	diese Arbeit
S7842	<i>PflhFG</i> NPM Δ <i>flrA</i> ; Sputcn32_2561 Sputcn32_2560 Sputcn32_2580; <i>in frame</i> Deletion von <i>flrA</i> in <i>PflhFG</i> NPM (S7796) Hintergrund	diese Arbeit
S7236	Ara ind. <i>flrA-FLAG ΔaraAD flhA-FLAG flgL-FLAG</i> ; Sputcn32_2580 ΔSputcn32_2067 ΔSputcn32_2066 Sputcn32_2062 Sputcn32_2587; <i>in frame</i> Deletion von <i>araAD</i> , Insertion von <i>flrA-FLAG</i> in Arabinose-Operon nach <i>araB</i> , Insertion von <i>flhA</i> und <i>flgL</i> mit je einem C-terminalen FLAG-Anhang	diese Arbeit
S7824	Terminator <i>flhA</i> AS181 Lux, Sputcn32_2562; <i>in frame</i> Insertion von <i>luxCDABE</i> aus <i>Phototribadus luminescence</i> mit einfacher homologer Rekombination <i>upstream</i> des <i>flhA</i> Terminators, Kan ^r	diese Arbeit
S7825	Terminator <i>flhA</i> AS279 Lux, Sputcn32_2562; <i>in frame</i> Insertion von <i>luxCDABE</i> aus <i>Phototribadus luminescence</i> mit einfacher homologer Rekombination <i>downstream</i> des <i>flhA</i> Terminators, Kan ^r	diese Arbeit
S7826	Terminator <i>fliH</i> AS54 Lux, Sputcn32_2574; <i>in frame</i> Insertion von <i>luxCDABE</i> aus <i>Phototribadus luminescence</i> mit einfacher homologer Rekombination <i>upstream</i> des <i>fliH</i> Terminators, Kan ^r	diese Arbeit
S7827	Terminator <i>flhA</i> AS202 Lux, Sputcn32_2574; <i>in frame</i> Insertion von <i>luxCDABE</i> aus <i>Phototribadus luminescence</i> mit einfacher homologer Rekombination <i>downstream</i> des <i>fliH</i> Terminators, Kan ^r	diese Arbeit
S7828	Terminator <i>fliI</i> AS2184 Lux, Sputcn32_2573; <i>in frame</i> Insertion von <i>luxCDABE</i> aus <i>Phototribadus luminescence</i> mit einfacher homologer Rekombination <i>upstream</i> des <i>fliI</i> Terminators, Kan ^r	diese Arbeit
S7829	Terminator <i>fliI</i> AS297 Lux, Sputcn32_2573; <i>in frame</i> Insertion von <i>luxCDABE</i> aus <i>Phototribadus luminescence</i> mit einfacher homologer Rekombination <i>downstream</i> des <i>fliI</i> Terminators, Kan ^r	diese Arbeit
S7830	Terminator <i>fliL</i> AS6 Lux, Sputcn32_2570; <i>in frame</i> Insertion von <i>luxCDABE</i> aus <i>Phototribadus luminescence</i> mit einfacher homologer Rekombination <i>upstream</i> des <i>fliI</i> Terminators, Kan ^r	diese Arbeit
S7831	Terminator <i>fliL</i> AS86 Lux, Sputcn32_2570; <i>in frame</i> Insertion von <i>luxCDABE</i> aus <i>Phototribadus luminescence</i> mit einfacher homologer Rekombination <i>downstream</i> des <i>fliI</i> Terminators, Kan ^r	diese Arbeit
S7832	Terminator <i>fliO</i> AS21 Lux, Sputcn32_2567; <i>in frame</i> Insertion von <i>luxCDABE</i> aus <i>Phototribadus luminescence</i> mit einfacher homologer Rekombination <i>upstream</i> des <i>fliO</i> Terminators, Kan ^r	diese Arbeit
S7833	Terminator <i>fliO</i> AS110 Lux, Sputcn32_2567; <i>in frame</i> Insertion von <i>luxCDABE</i> aus <i>Phototribadus luminescence</i> mit einfacher homologer Rekombination <i>downstream</i> des <i>fliO</i> Terminators, Kan ^r	diese Arbeit
S7834	Terminator <i>fliR</i> AS169 Lux, Sputcn32_2564; <i>in frame</i> Insertion von <i>luxCDABE</i> aus <i>Phototribadus luminescence</i> mit einfacher homologer Rekombination <i>upstream</i> des <i>fliR</i> Terminators, Kan ^r	diese Arbeit
S7835	Terminator <i>fliR</i> AS252 Lux, Sputcn32_2564; <i>in frame</i> Insertion von <i>luxCDABE</i> aus <i>Phototribadus luminescence</i> mit einfacher homologer Rekombination <i>downstream</i> des <i>fliORTerminators</i> , Kan ^r	diese Arbeit
S7878	<i>FLAG-flhA</i> , Sputcn32_2562; Insertion von <i>flhA</i> mit einem N-terminalen 3xFLAG-Anhang	diese Arbeit
S7879	<i>FLAG-fliL</i> , Sputcn32_2570; Insertion von <i>fliL</i> mit einem N-terminalen 3xFLAG- Anhang	diese Arbeit
S4028	<i>flhG-sfGFP</i> , Sputcn32_2560; Insertion von <i>flhG</i> mit dem Linker GS und einem C-terminalen sfGFP-Anhang	Rossmann <i>et al.</i> 2015
S7995	<i>flhG-sfGFP flaAB₁-cys ΔflaAB₂</i> , Sputcn32_2560; Insertion von <i>flhG</i> mit dem Linker GS und einem C-terminalen sfGFP-Anhang in <i>flaAB₁ cys ΔflaAB₂</i> (S4401) Hintergrund	diese Arbeit
S8007	Δ <i>hubP flhG-sfGFP flaAB₁-cys ΔflaAB₂</i> , Sputcn32_2442 Sputcn32_2560; <i>in</i> <i>frame</i> Deletion von <i>hubP</i> in <i>flhG-sfGFP flaAB₁ cys ΔflaAB₂</i> (S7995) Hintergrund	diese Arbeit

Stamm	Relevanter Genotyp oder Beschreibung	Referenz
S8005	$\Delta hubP_{Repeats\ 1-9} flhG$ -sfGFP <i>flaAB1</i> -cys $\Delta flaAB2$, Sputcn32_2442-AS468-968 Sputcn32_2560; <i>in frame</i> Deletion von $hubP_{Repeats\ 1-9}$ in <i>flhG</i> -sfGFP <i>flaAB1</i> cys $\Delta flaAB2$ (S7995) Hintergrund	diese Arbeit
S8006	$\Delta hubP_{FimV} flhG$ -sfGFP <i>flaAB1</i> -cys $\Delta flaAB2$, Δ Sputcn32_2442-AS969-1097 Sputcn32_2560; <i>in frame</i> Deletion von $hubP_{FimV}$ in <i>flhG</i> -sfGFP <i>flaAB1</i> cys $\Delta flaAB2$ (S7995) Hintergrund	diese Arbeit
S3133	$\Delta flhG$, Δ Sputcn32_2560, markerless deletion of <i>flhG</i>	Schuhmacher et al. 2015a
S4964	$\Delta flhG$ in S4401, Δ Sputcn32_2560, <i>in frame</i> Deletion von <i>flhG</i> in <i>flaAB1</i> cys $\Delta flaAB2$ (S4401) Hintergrund	Schwan et al. 2020
S5910	<i>flgE1</i> -T183C Δ cluster II; Sputcn32_2594-T183C Δ Sputcn32_3444 - Sputcn32_3485; Insertion von Cystein-markiertes <i>flgE1</i> Gen in $\Delta flgE1$ und <i>in frame</i> Deletion vom lateralen Flagellengencluster	Schwan et al. 2020
S6939	$\Delta flhG$ in S5910, Δ Sputcn32_2560, <i>in frame</i> Deletion von <i>flhG</i> in <i>flgE1</i> cys Δ cluster II (S5910) Hintergrund	Schwan et al. 2020
S7818	FliM $_{\Delta EIDAL}$ in S7995, Sputcn32_2569- Δ N2-28; <i>in frame</i> Deletion der N-terminalen AS2-28 von FliM in <i>flhG</i> -sfGFP <i>flaAB1</i> -cys $\Delta flaAB2$ Hintergrund	diese Arbeit
S7905	FliM $_{\Delta EIDAL}$ in S5910, Sputcn32_2569- Δ N2-28; <i>in frame</i> Deletion der N-terminalen AS2-28 von FliM in <i>flgE1</i> -T183C Δ cluster II (S5910) Hintergrund	diese Arbeit
S5984	FliG $_{K175E}$ in S4964, Sputcn32_2560-K175E; <i>in frame</i> Insertion von <i>flhG</i> -K175E in $\Delta flhG$ <i>flaAB1</i> -cys $\Delta flaAB2$ Hintergrund	diese Arbeit
S7877	FliG $_{K175E}$ in S6939, Sputcn32_2560-K175E; <i>in frame</i> Insertion von <i>flhG</i> -K175E-GS-sfGFP in $\Delta flhG$ <i>flgE1</i> -T183C Δ cluster II (S5910) Hintergrund	diese Arbeit
S3783	pBTOK EVC, stabile Integration von Überproduktionsvektor pBTOK als Leervektor Kontrolle	Kühn et al. 2017
S5917	pBTOK <i>flhG</i> , pBTOK-Sputcn32_2560; stabile Integration von Überproduktionsvektor pBTOK zur Produktion des Proteins FliG	Schwan et al. 2020
S6000	$\Delta flrA$ in S4401; Δ Sputcn32_2580; <i>in frame</i> Deletion von <i>flrA</i> in <i>flaAB1</i> Cys $\Delta flaAB2$ (S4401) Hintergrund	Schwan et al. 2020
S6021	<i>flrA</i> - Δ 389-409 in S6000; Δ Sputcn32_2580-389-409; Insertion von <i>flrA</i> - Δ 389-409 in <i>flaAB1</i> Cys $\Delta flrA$ $\Delta flaAB2$ (S6000) Hintergrund	Schwan et al. 2020
S4175	<i>flrA1</i> -FLAG; Sputcn32_2580; Insertion von <i>flrA</i> mit einem C-terminalen FLAG-Anhang	Schwan et al. 2020
S6149	<i>flrA</i> - Δ 389-409-FLAG; Sputcn32_2580- Δ 389-409; Insertion von <i>flrA</i> - Δ 389-409 mit einem C-terminalen FLAG-Anhang	Schwan et al. 2020
S6570	<i>flrA</i> -L400E in strain S6000; Sputcn32_2580-L400E; Insertion von <i>flrA</i> -L400E in <i>flaAB1</i> Cys $\Delta flrA$ $\Delta flaAB2$ (S6000) Hintergrund	Schwan et al. 2020
S6564	<i>flrA</i> -E393R in strain S6000; Sputcn32_2580-E393R; Insertion von <i>flrA</i> -E393R in <i>flaAB1</i> Cys $\Delta flrA$ $\Delta flaAB2$ (S6000) Hintergrund	Schwan et al. 2020
S6566	<i>flrA</i> -R397E in strain S6000; Sputcn32_2580-R397E; Insertion von <i>flrA</i> -R397E in <i>flaAB1</i> Cys $\Delta flrA$ $\Delta flaAB2$ (S6000) Hintergrund	Schwan et al. 2020
S6568	<i>flrA</i> -D398 in strain S6000; Sputcn32_2580-D398R; Insertion von <i>flrA</i> -D398R in <i>flaAB1</i> Cys $\Delta flrA$ $\Delta flaAB2$ (S6000) Hintergrund	Schwan et al. 2020
S6572	<i>flrA</i> -E408R in strain S6000; Sputcn32_2580-E408R; Insertion von <i>flrA</i> -E408R in <i>flaAB1</i> Cys $\Delta flrA$ $\Delta flaAB2$ (S6000) Hintergrund	Schwan et al. 2020
S6054	$\Delta flhFG$ in S4401; Δ Sputcn32_2561 Δ Sputcn32_2560; <i>in frame</i> Deletion von <i>flhFG</i> in <i>flaAB1</i> Cys $\Delta flaAB2$ (S4401) Hintergrund	Schwan et al. 2020
S5180	<i>flhF</i> -mVenus; Sputcn32_2561, Insertion von <i>flhF</i> mit einem C-terminalen mVenus-Anhang	John Hook
S5675	<i>flhF</i> -mVenus $\Delta flrA$; Sputcn32_2561 Sputcn32_2580, Insertion von <i>flhF</i> mit einem C-terminalen mVenus-Anhang und <i>in frame</i> Deletion von <i>flrA</i>	John Hook
S6052	<i>flhF</i> -mVenus <i>flrA</i> -L400E; Sputcn32_2561, Insertion von <i>flrA</i> -L400E in <i>flhF</i> -mVenus $\Delta flrA$ Hintergrund	diese Arbeit
S6180	$\Delta flrA1$ in S5910; Δ Sputcn32_2580; <i>in frame</i> Deletion von <i>flrA</i> in <i>flgE1</i> Cys $\Delta flaAB2$ (S5910) Hintergrund	Schwan et al. 2020

Stamm	Relevanter Genotyp oder Beschreibung	Referenz
S6188	<i>flrA</i> ₁ -Δ389-409 in S6180; ΔSputcn32_2580-Δ389-409; Insertion von <i>flrA</i> -Δ389-409 in <i>flgE</i> ₁ Cys Δ <i>flaAB</i> ₂ Δ <i>flrA</i> (S6180) Hintergrund	Schwan <i>et al.</i> 2020
S6216	Δ <i>flhFG</i> in S5910; ΔSputcn32_2561 ΔSputcn32_2560; <i>in frame</i> Deletion von <i>flhFG</i> in <i>flgE</i> ₁ Cys Δ <i>flaAB</i> ₂ (S5910) Hintergrund	Schwan <i>et al.</i> 2020
S6571	<i>flrA</i> ₁ -L400E in S6180; Sputcn32_2580-L400E; Insertion von <i>flrA</i> -L400E in <i>flgE</i> ₁ Cys Δ <i>flrA</i> ₁ Δ <i>flaAB</i> ₂ (S6180) Hintergrund	Schwan <i>et al.</i> 2020
S5181	<i>flhG</i> -mVenus; Sputcn32_2560; Insertion von <i>flhG</i> mit einer C-terminalen mVenus Fusion	John Hook
S7995	FlhG-sfGFP in S4964, Sputcn32_2560; Insertion von <i>flhG</i> -GS-sfGFP in Δ <i>flhG flaAB1</i> -cys Δ <i>flaAB2</i> Hintergrund	diese Arbeit
S7936	FlhG _{ΔN20} -sfGFP in S4964, Sputcn32_2560-ΔN20; Insertion von <i>flhG</i> -ΔN20-GS-sfGFP in Δ <i>flhG flaAB1</i> -cys Δ <i>flaAB2</i> Hintergrund	diese Arbeit
S7997	FlhG _{ΔN20} in S6939, Sputcn32_2560-ΔN20; <i>in frame</i> Insertion von <i>flhG</i> -ΔN20 in Δ <i>flhG flgE1</i> -T183C Δcluster II (S5910) Hintergrund	diese Arbeit
S7897	FlhG _{Q5A} -sfGFP in S4964, Sputcn32_2560-Q5A; Insertion von <i>flhG</i> -Q5A-GS-sfGFP in Δ <i>flhG flaAB1</i> -cys Δ <i>flaAB2</i> Hintergrund	diese Arbeit
S6997	FlhG _{Q5A} in S6939, Sputcn32_2560-Q5A; <i>in frame</i> Insertion von <i>flhG</i> -Q5A in Δ <i>flhG flgE1</i> -T183C Δcluster II (S5910) Hintergrund	diese Arbeit
S7489	FlhG _{K29A} in S4964, Sputcn32_2560-K29A; Insertion von <i>flhG</i> -K29A-GS-sfGFP in Δ <i>flhG flaAB1</i> -cys Δ <i>flaAB2</i> Hintergrund	diese Arbeit
S7875	FlhG _{K29A} -sfGFP in S6939, Sputcn32_2560-K29A; <i>in frame</i> Insertion von <i>flhG</i> -K29A-GS-sfGFP in Δ <i>flhG flgE1</i> -T183C Δcluster II (S5910) Hintergrund	diese Arbeit
S7490	FlhG _{D58A} in S4964, Sputcn32_2560-D58A; Insertion von <i>flhG</i> -D58A in Δ <i>flhG flaAB1</i> -cys Δ <i>flaAB2</i> Hintergrund	diese Arbeit
S7876	FlhG _{D58A} -sfGFP in S6939, Sputcn32_2560-D58A; <i>in frame</i> Insertion von <i>flhG</i> -D58A-GS-sfGFP in Δ <i>flhG flgE1</i> -T183C Δcluster II (S5910) Hintergrund	diese Arbeit
S7493	FlhG _{D58A-K175E} -sfGFP in S4964, Sputcn32_2560-D58A-K175E-GS-sfGFP; Insertion von <i>flhG</i> -D58A-K175E in Δ <i>flhG flaAB1</i> -cys Δ <i>flaAB2</i> Hintergrund	diese Arbeit
S7904	FlhG _{D58A-K175E} in S6939, Sputcn32_2560-D58A-K175E; <i>in frame</i> Insertion von <i>flhG</i> -D58A-K175E in Δ <i>flhG flgE1</i> -T183C Δcluster II (S5910) Hintergrund	diese Arbeit
S7819	FlhG _{F2A} -sfGFP in S4964, Sputcn32_2560-F2A; Insertion von <i>flhG</i> -F2A-GS-sfGFP in Δ <i>flhG flaAB1</i> -cys Δ <i>flaAB2</i> Hintergrund	diese Arbeit
S6955	FlhG _{F2A} in S6939, Sputcn32_2560-F2A; <i>in frame</i> Insertion von <i>flhG</i> -F2A in Δ <i>flhG flgE1</i> -T183C Δcluster II (S5910) Hintergrund	diese Arbeit
S6928	FlhG _{F2A-K175E} in S4964, Sputcn32_2560-F2A-K175E; Insertion von <i>flhG</i> -F2A-K175E in Δ <i>flhG flaAB1</i> -cys Δ <i>flaAB2</i> Hintergrund	diese Arbeit
S6956	FlhG _{F2A-K175E} -sfGFP in S6939, Sputcn32_2560-F2A-K175E; <i>in frame</i> Insertion von <i>flhG</i> -F2A-K175E-GS-sfGFP in Δ <i>flhG flgE1</i> -T183C Δcluster II (S5910) Hintergrund	diese Arbeit
S6951	FlhG _{F2A-D58A} -sfGFP in S4964, Sputcn32_2560-F2A-D58A; Insertion von <i>flhG</i> -F2A-D58A-GS-sfGFP in Δ <i>flhG flaAB1</i> -cys Δ <i>flaAB2</i> Hintergrund	diese Arbeit
S6960	FlhG _{F2A-D58A} in S6939, Sputcn32_2560-F2A-D58A; <i>in frame</i> Insertion von <i>flhG</i> -F2A-D58A in Δ <i>flhG flgE1</i> -T183C Δcluster II (S5910) Hintergrund	diese Arbeit
S6929	FlhG _{F2A-D58A-K175E} in S4964, Sputcn32_2560-F2A-D58A-K175E; Insertion von <i>flhG</i> -F2A-D58A-K175E in Δ <i>flhG flaAB1</i> -cys Δ <i>flaAB2</i> Hintergrund	diese Arbeit
S6957	FlhG _{F2A-D58A-K175E} -sfGFP in S6939, Sputcn32_2560-F2A-D58A-K175E; <i>in frame</i> Insertion von <i>flhG</i> -F2A-D58A-K175E-GS-sfGFP in Δ <i>flhG flgE1</i> -T183C Δcluster II (S5910) Hintergrund	diese Arbeit
S7741	Δ <i>minD</i> ; ΔSputcn32_1764; <i>in frame</i> Deletion von <i>minD</i>	diese Arbeit
S7742	Δ <i>minD</i> in S3133; ΔSputcn32_1764; <i>in frame</i> Deletion von <i>minD</i> in Δ <i>flhG</i> (S3133) Hintergrund	diese Arbeit
S7743	<i>flhG</i> -sfGFP Δ <i>minD</i> ; Sputcn32_2560 ΔSputcn32_1764; <i>in frame</i> Deletion von <i>minD</i> in <i>flhG</i> -sfGFP (S4028) Hintergrund	diese Arbeit
S7794	Δ <i>minD</i> in S4401; ΔSputcn32_1764; <i>in frame</i> Deletion von <i>minD</i> in <i>flaAB1</i> -cys Δ <i>flaAB2</i> Hintergrund	diese Arbeit

Stamm	Relevanter Genotyp oder Beschreibung	Referenz
S7608	sfGFP- <i>minD</i> ; Sputcn32_1764; Insertion von <i>minD</i> mit N-terminaler sfGFP Fusion	diese Arbeit
S7607	sfGFP- <i>minD</i> Δ <i>flhG</i> ; Sputcn32_1764 Sputcn32_2560; <i>in frame</i> Deletion von <i>flhG</i> in sfGFP- <i>minD</i> (S7608) Hintergrund	diese Arbeit
S7482	Δ <i>arcA</i> in S4401; Δ Sputcn32_0678; <i>in frame</i> Deletion von <i>arcA</i> in <i>flaAB1-cys</i> Δ <i>flaAB2</i> Hintergrund	diese Arbeit
S8101	Δ <i>flrA</i> Repeats in S4401; Δ Sputcn32_2580; <i>in frame</i> Deletion der Repeatsequenzen (166 bis 214 bp <i>upstream</i> des Translationsstarts) im <i>flrA</i> Promotorbereich in <i>flaAB1-cys</i> Δ <i>flaAB2</i> Hintergrund	diese Arbeit

Die Übersicht der verwendeten Plasmide sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2: Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz
Plasmide		
pNPTS138-R6KT	Suizidplasmid für <i>in-frame</i> Deletionen und Insertionen: <i>mobRP4+</i> , <i>ori-R6K</i> , <i>sacB</i> , beta-galactosidase fragment alpha, Kan ^r	Lassak <i>et al.</i> 2010
pBBR1-MCS2	Expressionsvektor: <i>oriV</i> pBBR1, pBBR1 Rep, beta-galactosidase fragment alpha, Kan ^r	Kovach <i>et al.</i> 1995
pBTOK	Überproduktionsplasmid induzierbar mit Anhydrotetrazyklin: pBBR1-MCS2 Hintregrund (pBBR origin, Kan ^r); TetR, Promotor und <i>multiple cloning site</i> von pASK-IBA3plus und <i>E. coli</i> <i>rrnB1</i> T1 und lambda phage T0 Terminator	Rossmann <i>et al.</i> 2015
pUT18	Ori-ColE1, Amp ^r , Plasmid zur C-terminalen Fusion des T18-Fragments an das Zielgen	Euromedex
pUT18C	Ori-ColE1, Amp ^r , Plasmid zur N-terminalen Fusion des T18-Fragments an das Zielgen	Euromedex
pKT25	Ori-p15a, Amp ^r , Plasmid zur N-terminalen Fusion des T25-Fragments an das Zielgen	Euromedex
pKNT25	Ori-p15a, Amp ^r , Plasmid zur C-terminalen Fusion des T25-Fragments an das Zielgen	Euromedex
Konstrukte für <i>in-frame</i> Deletionen		
pNPTS138-R6KT- <i>flrA</i> -KO	Δ <i>flrA</i> (Sputcn32_2580)	Kühn <i>et al.</i> 2018
pNPTS138-R6KT- <i>flrABC</i> -KO	Δ <i>flrABC</i> (Sputcn32_2578 - Sputcn32_2580)	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flhAF</i> -KO	Δ <i>flhAF</i> (Sputcn32_2560, Sputcn32_2561)	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flag-clusterII</i> -KO	Δ <i>flagL</i> (Sputcn32_3444 - Sputcn32_3485)	Bubendorfer <i>et al.</i> 2014
pNPTS138-R6KT- <i>flaA1</i> -KO-ext	Δ <i>flaA1</i> (Sputcn32_2586)	Kühn <i>et al.</i> 2017
pNPTS138-R6KT- <i>flaB1</i> -KO-ext	Δ <i>flaB1</i> (Sputcn32_2585)	Kühn <i>et al.</i> 2017
pNPTS138-R6KT- <i>flgE1</i> -KO	Δ <i>flgE1</i> (Sputcn32_2594)	Rossmann <i>et al.</i> 2019
pNPTS138-R6KT- <i>flrA1</i> -KO	Δ <i>flrA1</i> (Sputcn32_2580)	Kühn <i>et al.</i> , 2018
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -KO	Δ <i>flhG</i> (Sputcn32_2560)	Schuhmacher <i>et al.</i> 2015a
pNPTS138-R6KT- <i>flhFG</i> -KO	Δ <i>flhFG</i> (Sputcn32_2561, Sputcn32_2560)	Florian Rossmann
pNPTS138-R6KT- <i>hubP</i> -KO	Δ <i>hubP</i> (Sputcn32_2442)	Rossmann <i>et al.</i> 2015
pNPTS138-R6KT- <i>minD</i> -KO	Δ <i>minD</i> (Sputcn32_1764)	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>arcA</i> -KO	Δ <i>arcA</i> (Sputcn32_0678)	diese Arbeit

Name	Beschreibung	Referenz
Konstrukte für <i>in-frame</i> Insertionen mit 3x-FLAG Anhängen		
pNPTS138-R6KT- <i>fliE</i> -FLAG	<i>fliE</i> -FLAG (Sputcn32_2577)	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>fliF</i> -FLAG	FLAG- <i>fliF</i> (Sputcn32_2576)	Schwan <i>et al.</i> 2020
pNPTS138-R6KT- <i>fliG</i> -FLAG	<i>fliG</i> -FLAG (Sputcn32_2575)	Florian Rossmann
pNPTS138-R6KT- <i>fliH</i> -FLAG	<i>fliH</i> -FLAG (Sputcn32_2574)	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>fliI</i> -FLAG	<i>fliI</i> -FLAG (Sputcn32_2573)	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>fliJ</i> -FLAG	<i>fliJ</i> -FLAG (Sputcn32_2572)	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>fliK</i> -FLAG	<i>fliK</i> -FLAG (Sputcn32_2571)	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>fliL</i> -FLAG	<i>fliL</i> -FLAG (Sputcn32_2570)	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>fliM</i> -FLAG	<i>fliM</i> -FLAG (Sputcn32_2569)	Florian Rossmann
pNPTS138-R6KT- <i>fliN</i> -FLAG	<i>fliN</i> -FLAG (Sputcn32_2568)	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>fliP</i> -FLAG	<i>fliP</i> -FLAG (Sputcn32_2566)	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>fliQ</i> -FLAG	<i>fliQ</i> -FLAG (Sputcn32_2565)	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flhB</i> -FLAG	<i>flhB</i> -FLAG (Sputcn32_2563)	Florian Rossmann
pNPTS138-R6KT- <i>flhA</i> -FLAG	<i>flhA</i> -FLAG (Sputcn32_2562)	Florian Rossmann
pNPTS138-R6KT-FLAG- <i>flhA</i>	FLAG- <i>flhA</i> (Sputcn32_2562)	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flhF</i> -FLAG	<i>flhF</i> -FLAG (Sputcn32_2561)	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -FLAG	<i>flhG</i> -FLAG (Sputcn32_2560)	Blagotinsek
pNPTS138-R6KT- <i>fliA</i> -FLAG	<i>fliA</i> -FLAG (Sputcn32_2559)	Florian Rossmann
pNPTS138-R6KT- <i>fliR</i> -FLAG	<i>fliR</i> -FLAG (Sputcn32_2578)	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flgK</i> -FLAG	<i>flgK</i> -FLAG (Sputcn32_2588)	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flgM</i> -FLAG	<i>flgM</i> -FLAG (Sputcn32_2601)	Florian Rossmann
pNPTS138-R6KT- <i>motY</i> -FLAG	<i>motY</i> -FLAG (Sputcn32_1601)	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>lapB</i> -FLAG	<i>lapB</i> -FLAG (Sputcn32_3592)	Vanessa Kreiling
pNPTS138-R6KT- <i>aggA</i> -FLAG	<i>aggA</i> -FLAG (Sputcn32_3594)	Vanessa Kreiling
pNPTS138-R6KT- <i>fliA</i> - Δ 389-409-FLAG	<i>fliA</i> - Δ 389-409-FLAG (Sputcn32_2580), Deletion von Aminosäuren 389-409, C-terminaler FLAG-Anhang	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>fliA</i> -FLAG	<i>fliA</i> -FLAG (Sputcn32_2580), C-terminale 3xFLAG Fusion	diese Arbeit
Konstrukte für <i>in-frame</i> Insertionen mit Fluoreszenzproteinfusionen		
pNPTS138-R6KT- <i>fliO</i> -GFP	<i>fliO</i> -GS-sfGFP (Sputcn32_2567)	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>motX</i> -mCherry	<i>motX</i> -mCherry (Sputcn32_0748)	Bubendorfer <i>et al.</i> 2012
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -sfGFP	<i>flhG</i> -GS-sfGFP (Sputcn32_2560)	Rossmann <i>et al.</i> 2015
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> - Δ N20-sfGFP	<i>flhG</i> - Δ N20-GS-sfGFP, Deletion der ersten 20 Aminosäuren am N-Terminus	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -Q5A-sfGFP	<i>flhG</i> -Q5A-GS-sfGFP; Glutamin 5 substituiert mit einem Alanin	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -K29A-sfGFP	<i>flhG</i> -K29A-GS-sfGFP; Lysin 29 substituiert mit einem Alanin	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -D58A-sfGFP	<i>flhG</i> -D58A-GS-sfGFP; Asparaginsäure 58 substituiert mit einem Alanin	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -K175E-sfGFP	<i>flhG</i> -K175E-GS-sfGFP; Lysin 175 substituiert mit einer Glutaminsäure	Schwan <i>et al.</i> 2020
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -D58A-K175E-sfGFP	<i>flhG</i> -D58A-K175E-GS-sfGFP; Asparaginsäure 58 substituiert mit einem Alanin und Lysin 175 substituiert mit einer Glutaminsäure	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -F2A-sfGFP	<i>flhG</i> -F275A-F276A-GS-sfGFP; Phenylalanine 275 und 276 substituiert mit je einem Alanin	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -F2A-K175E-sfGFP	<i>flhG</i> -F275A-F276A-K175E-GS-sfGFP; Phenylalanine 275 und 276 substituiert mit je einem Alanin und Lysin 175 substituiert mit einer Glutaminsäure	diese Arbeit

Name	Beschreibung	Referenz
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -F2A-D58A-sfGFP	<i>flhG</i> -F275A-F276A-D58A-GS-sfGFP; Phenylalanine 275 und 276 substituiert mit je einem Alanin und Asparaginsäure 58 substituiert mit einem Alanin	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -F2A-D58A-K175E-sfGFP	<i>flhG</i> -F275A-F276A-D58A-K175E-GS-sfGFP; Phenylalanine 275 und 276 substituiert mit je einem Alanin und Asparaginsäure 58 substituiert mit einem Alanin	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT-sfGFP- <i>minD</i>	sfGFP-GS- <i>minD</i> (Sputcn32_1764)	diese Arbeit
Konstrukte für <i>in-frame</i> Insertionen		
pNPTS138-R6KT- <i>flaA</i> ₁ -T174C	<i>flaA</i> ₁ -T174C (Sputcn32_2586), Threonin 174 substituiert mit einem Cystein	Kühn <i>et al.</i> 2017
pNPTS138-R6KT- <i>flaB</i> ₁ -T166C	<i>flaB</i> ₁ -T166C (Sputcn32_2585), Threonin 166 substituiert mit einem Cystein	Kühn <i>et al.</i> 2017
pNPTS138-R6KT- <i>flgE</i> ₁ -T183C	<i>flgE</i> ₁ -T183C (Sputcn32_2594), Threonin 183 substituiert mit einem Cystein	Rossmann <i>et al.</i> 2019
pNPTS138-R6KT- <i>PflhFG</i> NPM	substituierte Sigma 70 Promotorregionen von <i>flhF</i> and <i>flhG</i>	diese Arbeit
pNPTS Terminator AS181 <i>flhA</i> Lux_single	<i>luxCDABE</i> aus <i>Photothabdus luminescence</i> für einfache homologe Rekombination bei <i>flhA</i> AS181	diese Arbeit
pNPTS Terminator AS279 <i>flhA</i> Lux_single	<i>luxCDABE</i> aus <i>Photothabdus luminescence</i> für einfache homologe Rekombination bei <i>flhA</i> AS279	diese Arbeit
pNPTS Terminator AS54 <i>fliH</i> Lux_single	<i>luxCDABE</i> aus <i>Photothabdus luminescence</i> für einfache homologe Rekombination bei <i>fliH</i> AS54	diese Arbeit
pNPTS Terminator AS202 <i>fliH</i> Lux_single	<i>luxCDABE</i> aus <i>Photothabdus luminescence</i> für einfache homologe Rekombination bei <i>fliH</i> AS202	diese Arbeit
pNPTS Terminator AS184 <i>fliI</i> Lux_single	<i>luxCDABE</i> aus <i>Photothabdus luminescence</i> für einfache homologe Rekombination bei <i>fliI</i> AS184	diese Arbeit
pNPTS Terminator AS297 <i>fliI</i> Lux_single	<i>luxCDABE</i> aus <i>Photothabdus luminescence</i> für einfache homologe Rekombination bei <i>fliI</i> AS297	diese Arbeit
pNPTS Terminator AS6 <i>fliL</i> Lux_single	<i>luxCDABE</i> aus <i>Photothabdus luminescence</i> für einfache homologe Rekombination bei <i>fliL</i> AS6	diese Arbeit
pNPTS Terminator AS86 <i>fliL</i> Lux_single	<i>luxCDABE</i> aus <i>Photothabdus luminescence</i> für einfache homologe Rekombination bei <i>fliL</i> AS86	diese Arbeit
pNPTS Terminator AS21 <i>fliO</i> Lux_single	<i>luxCDABE</i> aus <i>Photothabdus luminescence</i> für einfache homologe Rekombination bei <i>fliO</i> AS21	diese Arbeit
pNPTS Terminator AS110 <i>fliO</i> Lux_single	<i>luxCDABE</i> aus <i>Photothabdus luminescence</i> für einfache homologe Rekombination bei <i>fliO</i> AS110	diese Arbeit
pNPTS Terminator AS169 <i>fliR</i> Lux_single	<i>luxCDABE</i> aus <i>Photothabdus luminescence</i> für einfache homologe Rekombination bei <i>fliR</i> AS169	diese Arbeit
pNPTS Terminator AS252 <i>fliR</i> Lux_single	<i>luxCDABE</i> aus <i>Photothabdus luminescence</i> für einfache homologe Rekombination bei <i>fliR</i> AS252	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>fliR</i> -Δ389-409	<i>fliR</i> -Δ389-409 (Sputcn32_2580), Deletion von Aminosäuren 389 bis 409	Schwan <i>et al.</i> 2020
pNPTS138-R6KT- <i>fliR</i> -E393R	<i>fliR</i> -E393R (Sputcn32_2580), Glutaminsäure 393 substituiert mit Arginin	Schwan <i>et al.</i> 2020
pNPTS138-R6KT- <i>fliR</i> -R197E	<i>fliR</i> -R197E (Sputcn32_2580), Arginin 197 substituiert mit Glutaminsäure	Schwan <i>et al.</i> 2020
pNPTS138-R6KT- <i>fliR</i> -D398R	<i>fliR</i> -D398R (Sputcn32_2580), Asparaginsäure 398 substituiert mit Arginin	Schwan <i>et al.</i> 2020
pNPTS138-R6KT- <i>fliR</i> -L400E	<i>fliR</i> -L400E (Sputcn32_2580), Leucin 400 substituiert mit Glutaminsäure	Schwan <i>et al.</i> 2020
pNPTS138-R6KT- <i>fliR</i> -E408R	<i>fliR</i> -E408R (Sputcn32_2580), Glutaminsäure 408 substituiert mit Glutaminsäure	Schwan <i>et al.</i> 2020
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -ΔN20	<i>flhG</i> -ΔN20, Deletion der ersten 20 Aminosäuren am N-Terminus	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -Q5A	<i>flhG</i> -Q5A; Glutamin 5 substituiert mit einem Alanin	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -K29A	<i>flhG</i> -K29A; Lysin 29 substituiert mit einem Alanin	Schuhmacher <i>et al.</i> 2015a
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -D58A	<i>flhG</i> -D58A; Asparaginsäure 58 substituiert mit einem Alanin	diese Arbeit

Name	Beschreibung	Referenz
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -K175E	<i>flhG</i> -K175E; Lysin 175 substituiert mit einer Glutaminsäure	Schwan <i>et al.</i> 2020
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -D58A-K175E	<i>flhG</i> -D58A-K175E; Asparaginsäure 58 substituiert mit einem Alanin und Lysin 175 substituiert mit einer Glutaminsäure	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -F2A	<i>flhG</i> -F275A-F276A; Phenylalanine 275 und 276 substituiert mit je einem Alanin	Schuhmacher <i>et al.</i> 2015a
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -F2A-K175E	<i>flhG</i> -F275A-F276A-K175E; Phenylalanine 275 und 276 substituiert mit je einem Alanin und Lysin 175 substituiert mit einer Glutaminsäure	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -F2A-D58A	<i>flhG</i> -F275A-F276A-D58A; Phenylalanine 275 und 276 substituiert mit je einem Alanin und Asparaginsäure 58 substituiert mit einem Alanin	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> -F2A-D58A-K175E	<i>flhG</i> -F275A-F276A-D58A-K175E; Phenylalanine 275 und 276 substituiert mit je einem Alanin und Asparaginsäure 58 substituiert mit einem Alanin	diese Arbeit
pNPTS138-R6KT- <i>flrA</i> -Repeats KO	Δ <i>flrA</i> -Repeatssequenz im Promotor, 166 bis 2114 bp <i>upstream</i> des Translationsstarts (Sputcn32_2580)	diese Arbeit
Konstrukte für Überproduktionen		
pBTOK <i>flhG</i>	RBS- <i>flhG</i> - (Sputcn32_2560), Ribosomenbindestelle AGG AGG, Überproduktion von FlhG	diese Arbeit
pBTOK <i>flrA</i> -FLAG	RBS- <i>flrA</i> -FLAG (Sputcn32_2580), Ribosomenbindestelle AGG AGG, Überproduktion von FlrA-FLAG, C-terminale 3x-FLAG Fusion	diese Arbeit
pBTOK <i>flhFG</i>	RBS- <i>flhFG</i> - (Sputcn32_2561, Sputcn32_2560), Ribosomenbindestelle AGG AGG, Überproduktion von FlhF und FlhG	diese Arbeit
Konstrukte für transkriptionelle Fusionen mit <i>luxCDABE</i>		
pBBR1-MCS5-TT-RBS-lux	Transkriptionelle Terminorkassette, Ribosomenbindestelle (AGG AGG) und <i>luxCDABE</i> Operon von <i>Photobacterium luminescens</i> , Gen ^f	Gödeke <i>et al.</i> 2011
pBBR1-MCS2-TT-RBS-lux	Transkriptionelle Terminorkassette, Ribosomenbindestelle (AGG AGG) und <i>luxCDABE</i> Operon von <i>Photobacterium luminescens</i> , Km ^f	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>fliE</i> 400-RBS-lux	Promotor <i>fliE</i> 400 bp, 400 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>fliF</i> 400-RBS-lux	Promotor <i>fliF</i> 400 bp, 400 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>fliG</i> 400-RBS-lux	Promotor <i>fliG</i> 400 bp, 400 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>fliH</i> 400-RBS-lux	Promotor <i>fliH</i> 400 bp, 400 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>fliI</i> 400-RBS-lux	Promotor <i>fliI</i> 400 bp, 400 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>fliK</i> 400-RBS-lux	Promotor <i>fliK</i> 400 bp, 400 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>fliL</i> 400-RBS-lux	Promotor <i>fliL</i> 400 bp, 400 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>flhA</i> 400-RBS-lux	Promotor <i>flhA</i> 400 bp, 400 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>flhF</i> 400-RBS-lux	Promotor <i>flhF</i> 400 bp, 400 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>flhG</i> 400-RBS-lux	Promotor <i>flhG</i> 400 bp, 400 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>fliA</i> 400-RBS-lux	Promotor <i>fliA</i> 400 bp, 400 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>fliE</i> 86-RBS-lux	Promotor <i>fliE</i> 86 bp, 86 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>fliF</i> 100-RBS-lux	Promotor <i>fliF</i> 100 bp, 100 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit

Name	Beschreibung	Referenz
pBBR1-MCS2-TT-P <i>fliF</i> 200-RBS-lux	Promotor <i>fliF</i> 200 bp, 200 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>fliG</i> 100-RBS-lux	Promotor <i>fliG</i> 100 bp, 100 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>fliI</i> 600-RBS-lux	Promotor <i>fliI</i> 600 bp, 600 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>fliK</i> 116-RBS-lux	Promotor <i>fliK</i> 116 bp, 116 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>fliL</i> 100-RBS-lux	Promotor <i>fliL</i> 100 bp, 100 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>fliL</i> 200-RBS-lux	Promotor <i>fliL</i> 200 bp, 200 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>flhA</i> 80-RBS-lux	Promotor <i>flhA</i> 80 bp, 80 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>flhF</i> 100-RBS-lux	Promotor <i>flhF</i> 100 bp, 100 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>flhF</i> 200-RBS-lux	Promotor <i>flhF</i> 200 bp, 200 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>flhF</i> 300-RBS-lux	Promotor <i>flhF</i> 300 bp, 300 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>flhF</i> 550-RBS-lux	Promotor <i>flhF</i> 550 bp, 550 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>flhF</i> 284-550-RBS-lux	Promotor <i>flhF</i> -284 to -550 bp, Fragment von 284 bis 550 bp <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>flhG</i> 100-RBS-lux	Promotor <i>flhG</i> 100 bp, 100 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>flhG</i> 200-RBS-lux	Promotor <i>flhG</i> 200 bp, 200 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>flhG</i> 300-RBS-lux	Promotor <i>flhG</i> 300 bp, 300 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>flhG</i> 550-RBS-lux	Promotor <i>flhG</i> 550 bp, 550 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>flhG</i> 100-400-RBS-lux	Promotor <i>flhG</i> -100 to -400 bp, Fragment 100 bis 400 bp <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>flhG</i> 400-550-RBS-lux	Promotor <i>flhG</i> -400 to -550 bp, Fragment 400 bis 550 bp <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>fliA</i> 100-RBS-lux	Promotor <i>fliA</i> 100 bp, 100 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>fliA</i> 200-RBS-lux	Promotor <i>fliA</i> 200 bp, 200 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>fliA</i> 300-RBS-lux	Promotor <i>fliA</i> 300 bp, 300 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>flhF</i> 284-550_NPM_-RBS-lux	P1: Promotor <i>flhF</i> -284 bis -550 bp mit veränderter codon usage (no promoter motif = NPM), Fragment 284 bis 550 bp <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>flhG</i> 400-550_NPM-RBS-lux	P2: Promotor <i>flhG</i> -400 bis -550 bp mit veränderter codon usage (no promoter motif = NPM), Fragment 400 bis 550 bp <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>flhG</i> 100-400_NPM_RBS-lux	P3: Promotor <i>flhG</i> -100 bis -400 bp mit veränderter codon usage (no promoter motif = NPM), Fragment 100 bis 400 bp <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
pBBR1-MCS2-TT-P <i>flhG</i> 550_NPM-RBS-lux	P2+3: Promotor <i>flhG</i> 550 bp mit veränderter codon usage (no promoter motif = NPM), 550 bp Fragment <i>upstream</i> vom Translationsstart	diese Arbeit
Konstrukte für Bacterial-Two-Hybrid Assay		
pUT18-FlrA _{pol}	Sputcn32_2580; C-terminale Fusion des T18-Fragments an FlrA _{pol}	diese Arbeit
pUT18C-FlrA _{pol}	Sputcn32_2580; N-terminale Fusion des T18-Fragments an FlrA _{pol}	diese Arbeit

Name	Beschreibung	Referenz
pKT25-FlrA _{pol}	Sputcn32_2580; C-terminale Fusion des T25-Fragments an FlrA _{pol}	diese Arbeit
pKNT25-FlrA _{pol}	Sputcn32_2580; N-terminale Fusion des T25-Fragments an FlrA _{pol}	diese Arbeit
pUT18-FlrA _{lat}	Sputcn32_3478; C-terminale Fusion des T18-Fragments an FlrA _{lat}	diese Arbeit
pUT18C-FlrA _{lat}	Sputcn32_3478; N-terminale Fusion des T18-Fragments an FlrA _{lat}	diese Arbeit
pKT25-FlrA _{lat}	Sputcn32_3478; C-terminale Fusion des T25-Fragments an FlrA _{lat}	diese Arbeit
pKNT25-FlrA _{lat}	Sputcn32_3478; N-terminale Fusion des T25-Fragments an FlrA _{lat}	diese Arbeit
pUT18-FlhG	Sputcn32_2560; C-terminale Fusion des T18-Fragments an FlhG	Florian Rossmann
pUT18C-FlhG	Sputcn32_2560; N-terminale Fusion des T18-Fragments an FlhG	Florian Rossmann
pKT25-FlhG	Sputcn32_2560; C-terminale Fusion des T25-Fragments an FlhG	Florian Rossmann
pKNT25-FlhG	Sputcn32_2560; N-terminale Fusion des T25-Fragments an FlhG	Florian Rossmann

6.1.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma Aldrich (Steinheim) bzw. Merck (Darmstadt) synthetisiert und sind in Tab. 3 aufgelistet.

Tab. 3: Oligonukleotide

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'	Beschreibung
JH213	EcoRV-flrABC1-KO-fwd	GCC AAG CTT CTC TGC AGG AT CGC ACT TGT ACC GTC GCT TC	
JH214	OL-flrABC1-KO-rev	GAA TGA TGC GCT CGT ATG CGA GAT ATG GGG	Deletionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>flrABC</i> -KO
JH215	OL-flrABC1-KO-fwd	CAT ACG AGC GCA TCA TTC AGT AGG CCG TAA AG	
JH216	EcoRV-flrABC1-KO-rev	GCG AAT TCG TGG ATC CAG AT GCG ATC GGT ATT ATT ACG GGT T	
FR138	Check-flrBC1-KO-fwd	GCA GAT TGC CAA CGC AAG GAT C	Checkprimer für <i>flrABC</i>
JH217	Check-flrABC1-KO-rev	GCT ATC CCT GCC GAT AAG CAT A	
MS597	EcoRV PflhA fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATA AGC CTG AAG TTA AAG GAC GCG	Deletionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>flhAF</i> - KO
MS715	OL FlhAF KO rev	TGC ACA GGC AGC CGC TTT AAC ATC CAT TCA C	
MS716	OL FlhAF KO fwd	AAA GCG GCT GCC TGT GCA TTT GAG TAG AGT T	
MS717	EcoRV-FlhAF rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATT AGG CTC GTC ACA TAC AAC GAC	
MS601	Check FlhA fwd	GAC ACA GAA GGT AAG CCT GAA G	Checkprimer für <i>flhAF</i>
JH153	Check-FlhF-FLAG-rev	GCA CGG ATT AAT CCA GCA TGC T	

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'	Beschreibung
JH 110	EcoRV-fliE1 KO-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG AT GCT AAG CAT GCA AAG GCT CTC A	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>fliE</i> - FLAG
JH133	OL FliE1 FLAG rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC AAC AGG CAT ACT CAT TAT TTC TTT ATA AGC TTC G	
JH134	OL FliE1 FLAG fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AA TAG GCC CGA GAA TAA CCC AAT CAG C	
JH 113	EcoRV-fliE1 KO-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG AT GTA TTG ATA ACC ACG GTT GCG C	
JH 114	Check-fliE1-KO-fwd	CGT GTA TTG GCG ACC TCA AAT C	Checkprimer für <i>fliE</i>
JH 115	Check-fliE1-KO-rev	CTA ATT CGA GTT CTC TAC GCG C	
MS613	EcoRV-FliH1 FLAG-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATT TAA TGA CCT TAG CGA TGG CGC	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>fliH</i> - FLAG
MS614	OL-FliH1 FLAG-rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC CTC AGC AGC TGG TGT TGA CGG	
MS615	OL-FliH1 FLAG-fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAT GAA TGC AAA ACC GTC AAC ACC AGC TGC	
MS616	EcoRV-FliH1 FLAG-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATC TGA CCT TTA CCA ACG GTC AAC	
MS617	Check-FliH1 FLAG-fwd	TAG TAC CAC GGG TCA TCA TAC C	Checkprimer für <i>fliH</i>
MS331	Check_Flag C-term	GAT CAT GAT GGC GAT TAT AAA GAT C	
MS318	EcoRV-FliI1 FLAG-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATC CTG TGA AAC GTC AAC GCG TAT	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>fliI</i> - FLAG
MS319	OL-FliI1 FLAG-rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC TTT ACA CTG TGC AGC GAG TTG AGC	
MS320	OL-FliI1 FLAG-fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAT AAT CGA GGC CAT GAT GGC GAA TG	
MS321	EcoRV-FliI1 FLAG-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATG ATT TAC GAA AGC GCG TAT CCG	
MS322	Check-FliI1 FLAG-fwd	ACA GGC TAT TTA TGT CGG CGG T	Checkprimer für <i>fliI</i>
MS253	Check-gyrA FLAG-rev	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG	
MS313	EcoRV-FliJ1 FLAG-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATC CTT CTT AAG GCA AAC CAT GCG	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>fliJ</i> - FLAG
MS314	OL-FliJ1 FLAG-rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC TTT ATG TCG GCG GTA AAA CTG TTG	
MS315	OL-FliJ1 FLAG-fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAT AGC CTG TAT TTG CGC CGA TAC	
MS316	EcoRV-FliJ1 FLAG-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATC GCA GGT GAC GGA TCA ACT AAT	
MS317	Check-FliJ1 FLAG-fwd	GTC GGG TAA GTT AGT GGC ATC A	Checkprimer für <i>fliJ</i>
MS253	Check-gyrA FLAG-rev	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG	
JH84	EcoRV-fliK KO-fwd	GCC AAG CTT CTC TGC AGG AT GAT GGC GAA TGC AGA TCC CTT A	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>fliK</i> - FLAG
JH135	OL FliK1 FLAG rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC AGC GTA ATA ATC TAT ACC AGA ATG CAG AC	
JH136	OL FliK1 FLAG fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AA TAA GCA GGT AAC CTA TAG GAT TAA ATA GCA TTG	
JH87	EcoRV-fliK KO-rev	GCG AAT TCG TGG ATC CAG AT CCT TAA CCT CTT TAA GGT ACT GAA ATT ACG	
JH11	fliI1-fliJ1 fw	GCG ATG AAT GCC TTC TTA AGG C	Checkprimer für <i>fliK</i>
JH88	Check-fliK KO-rev	TCA AGA TCA TCA TCG TCA TCG ACG	

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'	Beschreibung
MS1	EcoRV-fliL1 KO-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATA GAT GCA GGA GAT GAT CCA ACG	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>fliL</i> - FLAG
MS13	OL FliL1 FLAG rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC TTG CAT CAC AAA ACC GGT GAA TAG C	
MS14	OL FliL1 FLAG fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAT AAC CCG TAA TTT CAG TAC CTT AAA GAG G	
MS4	EcoRV-fliL1 KO-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATC GAA TTC GAC ATC CAT GAC TGG	
MS5	Check-fliL1-KO-fwd	CAT CTT GGC TAG CAG CAT CAA G	Checkprimer für <i>fliL</i>
MS6	Check-fliL1-KO-rev	GGC GAA AGT AAC GGT TCT GGA A	
MS15	EcoRV-FliN1 C-term-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATC CAG TCA TGG ATG TCG AAT TCG	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>fliN</i> - FLAG
MS16	OL FliN1 FLAG rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC TTT AAG CTT TTT AAT TCG CTC AG	
MS17	OL FliN1 FLAG fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAT AAT AGA TGC ACA TGA GTT GGT ATA TG	
MS18	EcoRV FliN1 C-term rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATG AAT ACT CTG TCG AAC CAT CGG	
MS19	Check-fliN1-FLAG-fwd	GGC AAG TTG AGA TGG TTC TGA C	Checkprimer für <i>fliN</i>
MS20	Check-fliN1-FLAG-rev	TGA ACT CCA ATT AGT GAC GCG C	
MS48	EcoRV-fliO1 KO-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATT TAG TGA CGC GCA AAG GCA AAG	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>fliO</i> - GFP
MS54	OL-FliO1 GFP-rev	GAA AAG TTC TTC TCC TTT GCT GCT GCC TTG TTT TAA TTT CGC CTG ACG	
FR393	OL_-m_gfp_fw	AGC AAA GGA GAA GAA CTT TTC	
FR412	OL_gfp_rev	G GAT CCT TTG TAG AGC TCA TCC	
MS55	OL-FliO1 GFP-fwd	GGA TGA GCT CTA CAA AGG ATC CTA AGG CGA AAT TAA AAC AAT GAC AAA G	
MS51	EcoRV-fliO1 KO-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATG GTG CCT CTT CTG GCG AAT TAA	
MS52	Check-fliO1-KO-fwd	GTC AAT GGG ACA CTT ATT GCC C	Checkprimer für <i>fliO</i>
MS53	Check-fliO1-KO-rev	GCT TGC TGT AGC GTC AGT TGT T	
MS7	EcoRV-fliP1 KO-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATC CAT GGC GAA GTG GTT GTA GTA	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>fliP</i> - FLAG
MS21	OL FliP1 FLAG rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC ACC AAA ACT ATT GGC TAA GGT GCC	
MS22	OL FliP1 FLAG fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAT AAT CGT ACT AGG AAT TGT TAT GAC TCC	
MS10	EcoRV-fliP1 KO-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATC CCC ATC GCA ACG CCA ATA ATA	
MS11	Check-fliP1-KO-fwd	GAA GTG GCA GCT TGA AAC ACT G	Checkprimer für <i>fliP</i>
MS12	Check-fliP1-KO-rev	GAA CCA TCT CAA CTT GCC ACT G	
MS308	EcoRV-FliQ1 FLAG-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATT TAA TTC GCC AGA AGA GGC ACC	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>fliQ</i> - GFP
MS309	OL-FliQ1 FLAG-rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC ACC TAT CAC TTG GGG AAT ACG G	
MS310	OL-FliQ1 FLAG-fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAT AAG GCT ATG GAG CTG TTG CTC	
MS311	EcoRV-FliQ1 FLAG-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATG ATC GCC GAA ATT GAC ATG GTC	
MS312	Check-FliQ1 FLAG-fwd	ATA TTC AAC TGT GGT GCG GCA C	Checkprimer für <i>fliQ</i>
MS253	Check-gyrA FLAG-rev	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG	

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'	Beschreibung
JH148	EcoRV FliH C-term fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG AT GCA AGA AAT GGT TGG ACA GCC T	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>flhF</i> - FLAG
JH149	OL FliH FLAG rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC CTC AAA TGC ACA GGC CAT ATT ATC TG	
JH150	OL FliH FLAG fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AA TAA AGT TAT GAC CCT GGA TCA AGC AAG	
JH151	EcoRV FliH C-term rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG AT GCC ACA TCT AAA AAT CGG TCG G	
JH152	Check-FliH-FLAG-fwd	GCA TCA GTC AAT GCA AGC AAC C	Checkprimer für <i>flhF</i>
JH153	Check-FliH-FLAG-rev	GCA CGG ATT AAT CCA GCA TGC T	
MS29	EcoRV FliG C-term fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATG CCT ATG AGC AAT TAG CGA CCT	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> - FLAG
MS30	OL FliG FLAG rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC TTC ACT CGT TTT TTC CTC TTG	
MS31	OL FliG FLAG fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAT AAG TGA ATA AAG CCG CAG CGT ATA C	
MS32	EcoRV FliG C-term rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATG GAA TGA AAC TGA GTC TCA GCG	
MS33	Check-FliG-FLAG-fwd	GCA GTC TGG CGA GTA AAT GAT G	Checkprimer für <i>flhG</i>
MS34	Check-FliG-FLAG-rev	GAA CGT TTA GTC CAA CGA CCA G	
JH116	EcoRV- <i>fliC1</i> KO-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG AT GGC GAG TTA GTT TCC CTG AAT G	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>fliC</i> - FLAG
MS35	OL <i>fliC1</i> FLAG rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC ACT GGG TAA TTG AAT CCC CAT A	
MS36	OL <i>fliC1</i> FLAG fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAT AAC TTC AGT AAA AAT GCA TGT TAG C	
JH119	EcoRV- <i>fliC1</i> KO-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG AT CTT GTA CCG TCG CTT CAA ATG C	
JH120	Check- <i>fliC1</i> -KO-fwd	GCG GCC TTG TTA TAT GCC TCT A	Checkprimer für <i>fliC</i>
JH4	<i>fliE1-fliF1</i> rev	ACA AAA ACG GCT AGG GCT AAG C	
JH137	EcoRV FlgK1 C-term fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG AT CGA GAA GAG TTT TTG GCG ACC T	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>flgK</i> - FLAG
JH138	OL FlgK1 FLAG rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC ACG CAC TGA AGT TAA TAG GGT G	
JH139	OL FlgK1 FLAG fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AA TAG GAG ATT TAA TCA TGC GAC TAT C	
JH140	EcoRV FlgK1 C-term rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG AT CAT AAA TGC ACT ATC GCC AGG G	
JH141	Check-FlgK1-FLAG-fwd	GCA AAC TCA GTG AGC TCG ATC A	Checkprimer für <i>flgK</i>
JH142	Check-FlgK1-FLAG-rev	GAT CTT TAT AAT CGC CAT CAT GAT C	
JH127	EcoRV- <i>motY</i> KO-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG AT GGG CCA CAA TAA TAC AGC GAT G	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>motY</i> - FLAG
MS44	OL- <i>motY</i> FLAG-rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC CAT TGG TTT ACT TAT CCT GAT CAC G	
MS45	OL- <i>motY</i> FLAG-fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAT AGT CAG CAA GAC ATT TTG TAT GGG G	
JH130	EcoRV- <i>motY</i> KO-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG AT GCG ACT AGC AAA CCT TGC TTT G	
JH131	Check- <i>motY</i> -KO-fwd	GCG TGT TTG CTT CAA GAT GAC G	Checkprimer für <i>motY</i>
JH132	Check- <i>motY</i> -KO-rev	CGC TGA GTG GGC TTC TTT ATT G	

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'	Beschreibung
MS717	EcoRV-FlhAF rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATT AGG CTC GTC ACA TAC AAC GAC	
MS724	OL PflhG-297 NBS fwd	CAT CCG CAG CTA CCT GGT GCT CAG CGC CAC AGG ACA GCG CCG AGT GT	
MS725	OL PflhG-297 NBS rev	ACC AGG TAG CTG CGG ATG GGG ATC CGG CTA TTT GCA GTT AAA TTA TCA AG	
MS707	OL PflhG-484 NBS rev	CGA GCA GCT GGC GAC CTA CGG CAA GAT CAT GGG CTG TCC GGT TAA GCA AGC	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- PflhFG NPM
MS708	OL PflhG-484 NBS fwd	CGT AGG TCG CCA GCT GCT CGT AGG CGC CAA TGC GAT AAT GAT C	
MS709	OL PflhF-400 NBS_rev	CAT CGT GCA GAC TTT GCT GGA GTA CGG CAC TAA GAG CAA TGA TAC	
MS710	OL PflhF-400 NBS_fwd	CCA GCA AAG TCT GCA CGA TGG TAC GTA GGT CTC TGA CAG AAA CGC CTT C	
MS597	EcoRV PflhA fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATA AGC CTG AAG TTA AAG GAC GCG	
MS601	Check FlhA fwd	GAC ACA GAA GGT AAG CCT GAA G	Checkprimer für <i>flhAF</i>
JH153	Check-FlhF-FLAG_rev	GCA CGG ATT AAT CCA GCA TGC T	
MS541	SacI_Term_fwd	AGG GCG AAT TGG AGC TC	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT-RBS- Lux
MS542	KpnI_Lux_rev	AAC AAA AGC TGG GTA CC	
MS480	XbaI-FliE-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TGT CTG AGC CAG AAG GGT TAG GT	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PflIE400-RBS-lux
MS481	BamHI-FliE-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GGC TGA GCT CCC AGT CGT CGA ATT	
MS526	BamHI-FliF-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TCG TCT TTC GGT ATC TCA CCG AA	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PflIF400-RBS-lux
MS527	XhoI-FliF-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTT CTG TGC TCA CGA TTC GTA CC	
MS528	BamHI-FliG-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TCC TTT TAT GGA TCA ACT GAT GGA AG	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PflIG400-RBS-lux
MS529	XhoI-FliG-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTG TCT TGT AAC CAG TTT TTC ACG AC	
MS589	BamHI-FliH 400-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TGC GAA AAT GGG TGG CTT AAA AGC	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PflIH400-RBS-lux
MS590	XhoI-FliH 400-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GCG CCA CCA CCG CCG CCT AAC ATA	
MS534	BamHI-FliI-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TCC CAT CCT GAA CAA ATA CTT TC	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PflI400-RBS-lux
MS535	XhoI-FliI-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GCT TGA TCT CCA TTC GTT TGG AG	
MS494	XbaI-FliK-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TCA GCA AGG TCA AGC GAT TAG C	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PflIK400-RBS-lux
MS495	BamHI-FliK-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GAT CAG CTC CCA AAC CAC CCC AGT T	
MS496	XbaI-FliL-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TAT TCG TCT TGA TCC ACC TGA GC	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PflIL400-RBS-lux
MS497	BamHI-FliL-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTC ACT GTG CTC TTC AAT TTA GAC	
MS492	XbaI-FliA-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TGT GAT TGT CGT CAA TCC TGA GC	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PflIA400-RBS-lux
MS493	BamHI-FliA-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTC ACT ATT ACC TAA ACT TTG ACG TAT	
MS520	BamHI-FliH-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TAG AGC AAT GAT ACA GAA GTG TTG ACC	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PflHF400-RBS-lux
MS521	XhoI-FliH-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTT ATG CGT CCT CTA CTG GCC GA	
MS522	BamHI-FliG-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TGC TGG TAT GGG GCA ACG AGA TA	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PflHG400-RBS-lux
MS523	XhoI-FliG-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GAA CTC TAC TCA AAT GCA CAG GC	
MS524	BamHI-FliA-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TGT TGT ATG TGA CGA GCC TAC CT	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PflIA400-RBS-lux
MS525	XhoI-FliA-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTC GTT TTT TCC TCT TGA AAA TCT G	

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'	Beschreibung
MS554	XbaI-FliE 86-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TGG CTG GTT TTA AAC TTG GCC AT	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PfliE86-RBS-lux
MS481	BamHI-FliE-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GGC TGA GCT CCC AGT CGT CGA ATT	
MS582	XbaI-FliF 100-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TGT GCG TAA TAA ACT TGT CGA AGC	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PfliF100-RBS-lux
MS527	XhoI-FliF-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTT CTG TGC TCA CGA TTC GTA CC	
MS588	XbaI-FliF 200-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TCT TGG CAA CGC GAT TAG AGA TG	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PfliF200-RBS-lux
MS527	XhoI-FliF-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTT CTG TGC TCA CGA TTC GTA CC	
MS583	XbaI-FliG 100-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TCA GTT ATG CCG ATG ATG GCT CA	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PfliG100-RBS-lux
MS529	XhoI-FliG-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTG TCT TGT AAC CAG TTT TTC ACG AC	
MS726	BamHI-FliI600-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TGA ACA AGG CTT AGA AAC GGG TC	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PfliI600-RBS-lux
MS535	XhoI-FliI-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GCT TGA TCT CCA TTC GTT TGG AG	
MS555	XbaI-FliK 116-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TAA CTT TCA TGT TGG CAT TTT ATT TGC	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PfliK116-RBS-lux
MS495	BamHI-FliK-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GAT CAG CTC CCA AAC CAC CCC AGT T	
MS584	XbaI-FliL 100-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TCG CTT AAG CAG GTA ACC TAT AGG	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PfliL100-RBS-lux
MS497	BamHI-FliL-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTC ACT GTG CTC TTC AAT TTA GAC	
MS705	XbaI-FliL200-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TGA AAG TAA CGG TTC TGG AAG CAC	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PfliL200-RBS-lux
MS497	BamHI-FliL-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTC ACT GTG CTC TTC AAT TTA GAC	
MS550	XbaI-FliH 80-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TCA CTC TTC AAA TTT TAA GTG TCC TC	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PfliH80-RBS-lux
MS493	BamHI-FliH-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTC ACT ATT ACC TAA ACT TTG ACG TAT	
MS551	XbaI-FliH 100-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TCA TAC TAT TCC TAA TCT CAG AGT G	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PfliH100-RBS-lux
MS521	XhoI-FliH-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTT ATG CGT CCT CTA CTG GCC GA	
MS585	XbaI-FliH 200-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TAT TGG CTG ATG CGG CTC AAA AG	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PfliH200-RBS-lux
MS521	XhoI-FliH-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTT ATG CGT CCT CTA CTG GCC GA	
MS642	XbaI-FliH 300-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TCT TTG GCG CCA GAG TTG GAA CA	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PfliH300-RBS-lux
MS521	XhoI-FliH-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTT ATG CGT CCT CTA CTG GCC GA	
MS698	BamHI-FliH550-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TGC TTG CTA AGC ATT CTC CTA AGC	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PfliH550-RBS-lux
MS521	XhoI-FliH-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTT ATG CGT CCT CTA CTG GCC GA	
MS698	BamHI-FliH550-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TGC TTG CTA AGC ATT CTC CTA AGC	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PfliH284-550-RBS-lux
MS696	XhoI-FliH-284-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GAC TCT GGC GCC AAA GTA ATG AC	
MS552	XbaI-FliH 100-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TAT GTT AGC GCA GCA GGC GCT TG	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PfliH100-RBS-lux
MS523	XhoI-FliH-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GAA CTC TAC TCA AAT GCA CAG GC	
MS586	XbaI-FliH 200-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TCG CTG AGT GTG TTG ATC CAA AG	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- PfliH200-RBS-lux
MS523	XhoI-FliH-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GAA CTC TAC TCA AAT GCA CAG GC	

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'	Beschreibung
MS662	XbaI-FlhG 300-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TAC AGG ACA GCG CCG AGT GTT G	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- <i>PflhG300-RBS-lux</i>
MS523	XhoI-FlhG-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GAA CTC TAC TCA AAT GCA CAG GC	
MS687	BamHI-FlhG550-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TCC ACA GAT CAT TAT CGC ATT GGC	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- <i>PflhG550-RBS-lux</i>
MS523	XhoI-FlhG-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GAA CTC TAC TCA AAT GCA CAG GC	
MS522	BamHI-FlhG-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TGC TGG TAT GGG GCA ACG AGA TA	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- <i>PflhG100-400-RBS-lux</i>
MS706	XhoI-FlhG-100-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GCA AGC GCC TGC TGC GCT AAC AT	
MS687	BamHI-FlhG550-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TCC ACA GAT CAT TAT CGC ATT GGC	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- <i>PflhG400-550-RBS-lux</i>
MS697	XhoI-FlhG-400-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTA TCT CGT TGC CCC ATA CCA GC	
MS553	XbaI-FliA 100-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TAA TCA TGA GTT GGC CTG TAC CG	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- <i>PfliA100-RBS-lux</i>
MS525	XhoI-FliA-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTC GTT TTT TCC TCT TGA AAA TCT G	
MS587	XbaI-FliA 200-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TGC ACT TGA GCT CGT TGC AAC	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- <i>PfliA200-RBS-lux</i>
MS525	XhoI-FliA-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTC GTT TTT TCC TCT TGA AAA TCT G	
MS643	XbaI-FliA 300-fwd	CCT ATT CCG AAG TTC CTA TTC TGT AGT TTA CGC GAA GGG ATG GA	Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT- <i>PfliA300-RBS-lux</i>
MS525	XhoI-FliA-rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GTC GTT TTT TCC TCT TGA AAA TCT G	
MS269	EcoRV-flrA-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG AT GTT TGA ACA TGG ATG AAG GCG G	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>flrA1</i> - Δ389-409
MS270	OL FlrA 389-409KO rev	AAT TTC AAC TAC GCA GTA TTC GGG CAC ATC A	
MS271	OL FlrA 389-409KO fwd	TAC TGC GTA GTT GAA ATT CCT GAA ACA CGT TTT CC	
MS272	EcoRV-flrA-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATG GGC TTG CTA AGT TAG AGG CAT	
MS273	Check FlrA 389-409KO fwd	ATC TTG ACG GCC TTT TGC CAT C	
MS274	Check FlrA 389-409KO rev	ATA TCG CCA TAT TGA TGT GCC CG	
MS269	EcoRV-flrA-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATG TTT GAA CAT GGA TGA AGG CGG	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>flrA1</i> - Δ389-409
MS396	OL FlrA L400E-rev	CGA AAA AAT GGA CGC CTC GGC ATC ACG CTC	
MS397	OL FlrA L400E-fwd	GAG CGT GAT GCC GAG GCG TCC ATT TTT TCG GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATG GGC TTG CTA AGT TAG AGG CAT	
MS272	EcoRV-flrA-rev	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATG TTT GAA CAT GGA TGA AGG CGG	
FR458	OL FlrA1 FLAG C rv	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCT GCC TTC TTT TGT CAT TCC GTA TTT CCG C	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>flrA1</i> - Δ389-409-FLAG
FR459	OL FlrA1 FLAG C fw	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAT AGT CTT TTG CAT TTT TAG TTA TAT TAT TGA TTT TA	
MS272	EcoRV-flrA-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATG GGC TTG CTA AGT TAG AGG CAT	
MS229	XbaI-FlhG_fwd	AAT GAA TAG TTC GAC AAA AAT AGG AGG GCA AAT ATG ACC CTG GAT CAA GCA AGT G	Überproduktionsplasmid pBTOK- <i>flhG</i>
MS230	XbaI-FlhG_rev	GGA GTC CAA GCT CAG CTA ATG TTA TTC ACT CGT TTT TTC CTC TTG	
MS467	XbaI-FlhFG fwd	AAT GAA TAG TTC GAC AAA AAT AGG AGG GCA AAT GTG AAG ATT AAA CGA TTT TTT GCC	Überproduktionsplasmid pBTOK- <i>flhFG</i>
MS468	PSPOMi-FlhFG-rev	GGA GTC CAA GCT CAG CTA ATG TTA GGC TTT ATT CAC TCG TTT TTT CCT C	

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'	Beschreibung
MS328	XbaI-FlrA-Flag fwd	AAT GAA TAG TTC GAC AAA AAT AGG AGG GCA AAT ATG ATG CAA ACA GAT CAA CGA ATT TTA C	Überproduktionsplasmid pBTOK- <i>flrA</i> ₁ -FLAG
MS329	PSPOmi-FlrA-Flag-rev	GGA GTC CAA GCT CAG CTA ATG CTA TTT ATC ATC ATC ATC TTT ATA ATC	
MS29	EcoRV FlhG C-term fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATG CCT ATG AGC AAT TAG CGA CCT	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> - K175E
MS254	OL-flhG K175E rev	CAC GGC TGA GAA TTT CAA TTA ACG C	
MS255	OL-flhG K175E fwd	GCG TTA ATT GAA ATT CTC AGC CGT G	
MS32	EcoRV FlhG C-term rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATG GAA TGA AAC TGA GTC TCA GCG	
MS33	Check-FlhG-FLAG-fwd	GCA GTC TGG CGA GTA AAT GAT G	Checkprimer für <i>flhG</i>
MS256	Check-FlhG K175E-rev	GGT CAG ATA ATA TGG CCT GTG C	
MS303	EcoRV-FliR1 FLAG-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATT TCT GGA CAA CAA ACC CCT GTC	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>fliR</i> - FLAG
MS304	OL-FliR1 FLAG-rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC TAT CAA GCC ATC GGC TTG ACA TTG	
MS305	OL-FliR1 FLAG-fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAT AAG GTT ATA GGA ACT CAG TAT GGC	
MS306	EcoRV-FliR1 FLAG-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATA GCC GAA AAA GCA ACT ACG GAG	
MS307	Check-FliR1 FLAG-fwd	AAC GCG TCC TTT AAC TTC AGG C	Checkprimer für <i>fliR</i>
MS253	Check- <i>gyrA</i> FLAG-rev	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG	
MS308	EcoRV-FliQ1 FLAG-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATT TAA TTC GCC AGA AGA GGC ACC	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>fliQ</i> - FLAG
MS309	OL-FliQ1 FLAG-rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC ACC TAT CAC TTG GGG AAT ACG G	
MS310	OL-FliQ1 FLAG-fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAT AAG GCT ATG GAG CTG TTG CTC	
MS311	EcoRV-FliQ1 FLAG-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATG ATC GCC GAA ATT GAC ATG GTC	
MS312	Check-FliQ1 FLAG-fwd	ATA TTC AAC TGT GGT GCG GCA C	Checkprimer für <i>fliQ</i>
MS253	Check- <i>gyrA</i> FLAG-rev	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG	
MS313	EcoRV-FliJ1 FLAG-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATC CTT CTT AAG GCA AAC CAT GCG	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>fliJ</i> - FLAG
MS314	OL-FliJ1 FLAG-rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC TTT ATG TCG GCG GTA AAA CTG TTG	
MS315	OL-FliJ1 FLAG-fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAT AGC CTG TAT TTG CGC CGA TAC	
MS316	EcoRV-FliJ1 FLAG-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATC GCA GGT GAC GGA TCA ACT AAT	
MS317	Check-FliJ1 FLAG-fwd	GTC GGG TAA GTT AGT GGC ATC A	Checkprimer für <i>fliJ</i>
MS253	Check- <i>gyrA</i> FLAG-rev	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG	
MS318	EcoRV-FliI1 FLAG-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATC CTG TGA AAC GTC AAC GCG TAT	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>fliI</i> - FLAG
MS319	OL-FliI1 FLAG-rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC TTT ACA CTG TGC AGC GAG TTG AGC	
MS320	OL-FliI1 FLAG-fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAT AAT CGA GGC CAT GAT GGC GAA TG	
MS321	EcoRV-FliI1 FLAG-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATG ATT TAC GAA AGC GCG TAT CGG	
MS322	Check-FliI1 FLAG-fwd	ACA GGC TAT TTA TGT CGG CGG T	Checkprimer für <i>fliI</i>
MS253	Check- <i>gyrA</i> FLAG-rev	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG	

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'	Beschreibung
MS323	EcoRV-FlrB1 FLAG-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATG ATG GCA AAA GGC CGT CAA GAT	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>flrB</i> - FLAG
MS324	OL-FlrB1 FLAG-rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC GAC ATA GGG TTT CTC CAA AGG C	
MS325	OL-FlrB1 FLAG-fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAT GAA GCC AAG TTA CTC TTA GTT G	
MS326	EcoRV-FlrB1 FLAG-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATA TGG CAA CAA AGG CTT GTT CGG	
MS327	Check-FlrB1 FLAG-fwd	CTT ACC AGG GCA TGC TTG GTA A	Checkprimer für <i>flrB</i>
MS253	Check-gyrA FLAG-rev	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG	
MS269	EcoRV-flrA-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATG TTT GAA CAT GGA TGA AGG CGG	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>flrA</i> - E393R
MS389	OL FlrA E393R-rev	CAC GCT CCT GTT GTC GTT CAC TCA TTT CTA CGC	
MS390	OL FlrA E393R-fwd	GCG TAG AAA TGA GTG AAC GAC AAC AGG AGC GTG	
MS272	EcoRV-flrA-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATG GGC TTG CTA AGT TAG AGG CAT	
MS273	Check FlrA 389-409KO fwd	ATC TTG ACG GCC TTT TGC CAT C	Checkprimer für <i>flrA</i>
MS274	Check FlrA 389-409KO rev	TAT CGC CAT ATT GAT GTG CCC G	
MS269	EcoRV-flrA-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATG TTT GAA CAT GGA TGA AGG CGG	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>flrA</i> - R397E
MS392	OL FlrA R397E-rev	GGA CGC TAA GGC ATC CTC CTC CTG TTG TTC	
MS393	OL FlrA R397E-fwd	GAA CAA CAG GAG GAG GAT GCC TTA GCG TCC GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATG GGC TTG CTA AGT TAG AGG CAT	
MS272	EcoRV-flrA-rev	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATG TTT GAA CAT GGA TGA AGG CGG	
MS269	EcoRV-flrA-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATG TTT GAA CAT GGA TGA AGG CGG	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>flrA</i> - D398R
MS394	OL FlrA D398R-rev	GGA CGC TAA GGC ACG ACG CTC CTG TTG TTC	
MS395	OL FlrA D398R-fwd	GAA CAA CAG GAG CGT CGT GCC TTA GCG TCC GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATG GGC TTG CTA AGT TAG AGG CAT	
MS272	EcoRV-flrA-rev	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATG TTT GAA CAT GGA TGA AGG CGG	
MS269	EcoRV-flrA-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATG TTT GAA CAT GGA TGA AGG CGG	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>flrA</i> - L400E
MS396	OL FlrA L400E-rev	CGA AAA AAT GGA CGC CTC GGC ATC ACG CTC	
MS397	OL FlrA L400E-fwd	GAG CGT GAT GCC GAG GCG TCC ATT TTT TCG GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATG GGC TTG CTA AGT TAG AGG CAT	
MS272	EcoRV-flrA-rev	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATG TTT GAA CAT GGA TGA AGG CGG	
MS269	EcoRV-flrA-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATG TTT GAA CAT GGA TGA AGG CGG	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>flrA</i> - E408R
MS398	OL FlrA E408R-rev	AGG AAT TTC AAC GGG TCG TTC ACT CGA AAA	
MS399	OL FlrA E408R-fwd	TTT TCG AGT GAA CGA CCC GTT GAA ATT CCT GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATG GGC TTG CTA AGT TAG AGG CAT	
MS272	EcoRV-flrA-rev	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATG TTT GAA CAT GGA TGA AGG CGG	
MS29	EcoRV FlhG C-term fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATG CCT ATG AGC AAT TAG CGA CCT	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> - D58A-K175E
JH377	OL FlhG D58A rev	TGG CTA AGC CAA GGG CTG CGT C	
JH378	OL FlhG D58A fwd	AGT GCT TGA CGC AGC CCT TGG C	
MS254	OL-flhG K175E rev	CAC GGC TGA GAA TTT CAA TTA ACG C	
MS255	OL-flhG K175E fwd	GCG TTA ATT GAA ATT CTC AGC CGT G	
MS32	EcoRV FlhG C-term rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATG GAA TGA AAC TGA GTC TCA GCG	
JH211	FlhF-Ven Seq_Primer	GCT GAG TTA GTA CGA GCA CTA C	Checkprimer für <i>flhG</i>
MS33	Check-FlhG-FLAG-fwd	GCA GTC TGG CGA GTA AAT GAT G	

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'	Beschreibung
MS613	EcoRV-FliH1 FLAG-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATT TAA TGA CCT TAG CGA TGG CGC	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>fliH</i> - FLAG
MS614	OL-FliH1 FLAG-rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC CTC AGC AGC TGG TGT TGA CGG	
MS615	OL-FliH1 FLAG-fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAT GAA TGC AAA ACC GTC AAC ACC AGC TGC	
MS616	EcoRV-FliH1 FLAG-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATC TGA CCT TTA CCA ACG GTC AAC	
MS617	Check-FliH1 FLAG-fwd	TAG TAC CAC GGG TCA TCA TAC C	Checkprimer für <i>fliH</i>
MS331	Check_Flag C-term	GAT CAT GAT GGC GAT TAT AAA GAT C	
MS668	EcoRV-ArcA KO-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATC ATG GTA AAT ATC GCC CTT AGC	Deletionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>arcA</i> - KO
MS669	OL ArcA KO rev	AGA TTA GTC CGG ATT TTG CAT GTT ATT TAC CTA A	
MS670	OL ArcA KO fwd	CAA AAT CCG GAC TAA TCT TCG ACT TAC CGT TTA	
MS671	EcoRV-ArcA KO-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATT TTA CGG AGT CTG CCC TTT GTC	
MS672	Check ArcA KO fwd	TAT TTC AAC TGG ATA ACC GCG G	Checkprimer für <i>arcA</i>
MS673	Check ArcA KO rev	TTT GAA GCA GGA TTA TGG GCG G	
MS29	EcoRV FliH C-term fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATG CCT ATG AGC AAT TAG CGA CCT	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>flhG</i> - GS-sfGFP
MS681	OL FliH rev	CAC TTG CTT GAT CCA GGG TCA T	
MS682	OL FliH GFP fwd	ATG ACC CTG GAT CAA GCA AGT G	
MS685	OL FliH GFP rev	GAA AAG TTC TTC TCC TTT GCT GCT GCC TTC ACT CGT TTT TTC CTC TTG A	
FR393	OL_-m_gfp_fw	AGC AAA GGA GAA GAA CTT TTC	
FR412	OL_gfp_rv	G GAT CCT TTG TAG AGC TCA TCC	
MS686	OL GFP fwd	GGA TGA GCT CTA CAA AGG ATC CTA AGA TTT TCA AGA GGA AAA AAC GA	
MS32	EcoRV FliH C-term rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATG GAA TGA AAC TGA GTC TCA GCG	
MS688	EcoRV-MinD fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATA AGG AAC TAC TGC TCT CTC GTC	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- sfGFP-GS- <i>minD</i>
MS694	OL MinD GFP rev	GAA AAG TTC TTC TCC TTT GCT CAT GTT TCT CTC TAT CCT TTT TTC	
FR393	OL_-m_gfp_fw	AGC AAA GGA GAA GAA CTT TTC	
FR412	OL_gfp_rv	G GAT CCT TTG TAG AGC TCA TCC	
MS695	OL MinD GFP fwd	GGA TGA GCT CTA CAA AGG ATC CGG TAG TGC ACA AAT TAT TGT TGT CAC TTC AGG	
MS691	EcoRV-MinD rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATC TTA AGC CGG GCT ATA AAT CTG C	
MS692	check MinD fwd	TCT ACC AGA GCT TGT CGA TGT G	Checkprimer für <i>minD</i>
MS693	check MinD rev	TTT GGT GGT CAA TCT CAG TGC C	
MS688	EcoRV-MinD fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATA AGG AAC TAC TGC TCT CTC GTC	Deletionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>minD</i> - KO
MS703	OL MinD KO rev	AAA TAT CCG TTG TGC CAT GTT TCT CTC TAT CC	
MS704	OL MinD KO fwd	ATG GCA CAA CGG ATA TTT GGT AGC TAA TTA TGT C	
MS691	EcoRV-MinD rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATC TTA AGC CGG GCT ATA AAT CTG C	

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'	Beschreibung
MS597	EcoRV PflhA fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATA AGC CTG AAG TTA AAG GAC GCG	
MS757	OL FLAG-flhA rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC CAT TCA CTA TTA CCT AAA CTT TGA C	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- FLAG- <i>flhA</i>
MS758	OL FLAG-flhA fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAG ATG TTA AAG CGG CTT TAG GCC	
MS600	EcoRV PflhA rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATT TTG CTT ACC AGG CAT AGC GTC	
MS601	Check FlhA fwd	GAC ACA GAA GGT AAG CCT GAA G	Checkprimer für <i>flhA</i>
MS330	Check_Flag N-term	GAT CTT TAT AAT CGC CAT CAT GAT C	
MS1	EcoRV-fliL1 KO-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATA GAT GCA GGA GAT GAT CCA ACG	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- FLAG- <i>fliL</i>
MS759	OL FLAG-fliL rev	AAT ATC ATG ATC TTT ATA ATC GCC ATC ATG ATC TTT ATA ATC CAT TCA CTG TGC TCT TCA ATT TAG	
MS760	OL FLAG-fliL fwd	ATT ATA AAG ATC ATG ATA TTG ATT ATA AAG ATG ATG ATG ATA AAG CCA ACG AAG AAT CGT TAG AAC	
MS761	EcoRV fliL rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATA GCG CAT CAA TTT CGT CTT GGC	
MS762	Check-fliL1-fwd	CAA GGC GTT GAA ACG CCA AAT C	Checkprimer für <i>fliL</i>
MS330	Check_Flag N-term	GAT CTT TAT AAT CGC CAT CAT GAT C	
MS800	EcoRV-flrA-fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATA GTG TAG CAG TTC CGT CAG TTG	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- <i>flrA</i> - Repeats KO
MS801	flrA-repeats rev	AAT TGA CTC CAT AAA GCG CAT CTG AGG CTT G	
MS802	flrA-repeats fwd	CGC TTT ATG GAG TCA ATT TAT TGA CAT TCG CC	
MS803	EcoRV-flrA-rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATG CTT CGC CGC ATC GAA TTA TTC	
MS804	Check flrA fwd	CAT TCA GTA GGC CGT AAA GCT C	Checkprimer für <i>flrA</i>
MS805	Check flrA rev	GTA ATT TAG GAC GGG TCA AGG G	
MS727	EcoRV-Lux rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATT CAA CTA TCA AAC GCT TCG GTT AAG	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- Terminator- <i>flhA</i> -AS181 Lux_single
MS741	OL Lux fwd	GAA GTG GCT CAA GAA TAT GGG C	
MS742	OL Lux rev	GCC CAT ATT CTT GAG CCA CTT C	
MS728	Lux fwd	AGG AGG GCA AAT ATG ACT AAA AAA	
MS729	OL Lux-FlhA181 rev	AGT CAT ATT TGC CCT CCT CTA CCT CGC CTG TTC TTG ATT GAG A	
MS730	EcoRV-FlhA fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATC CTA TTC CAC CGT TCT TAC TCG	
MS727	EcoRV-Lux rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATT CAA CTA TCA AAC GCT TCG GTT AAG	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- Terminator- <i>flhA</i> -AS279 Lux_single
MS728	Lux fwd	AGG AGG GCA AAT ATG ACT AAA AAA	
MS731	OL Lux-FlhA279 rev	AGT CAT ATT TGC CCT CCT CTA CAT TTG GCC CAT ATC ACC CGA T	
MS730	EcoRV-FlhA fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATC CTA TTC CAC CGT TCT TAC TCG	
MS727	EcoRV-Lux rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG ATT CAA CTA TCA AAC GCT TCG GTT AAG	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- Terminator- <i>fliH</i> -AS54 Lux_single
MS728	Lux fwd	AGG AGG GCA AAT ATG ACT AAA AAA	
MS732	OL Lux-FliH54 rev	AGT CAT ATT TGC CCT CCT CTA CGT GAC TGG TTT GAT GTG CTT A	
MS733	EcoRV-FliH fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATA TGG AAA CTA TGC GCG AAT CCG	
MS727	EcoRV-Lux rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG AT TCA ACT ATC AAA CGC TTC GGT TAA G	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- Terminator- <i>fliH</i> -AS202 Lux_single
MS728	Lux fwd	AGG AGG GCA AAT ATG ACT AAA AAA	
MS734	OL Lux-FliH202 rev	AGT CAT ATT TGC CCT CCT CTA GAG GAT AAC GTC ATC AGG GTG C	
MS733	EcoRV-FliH fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATA TGG AAA CTA TGC GCG AAT CCG	

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'	Beschreibung
MS727	EcoRV-Lux rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG AT TCA ACT ATC AAA CGC TTC GGT TAA G	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- Terminator- <i>fliI</i> -AS184 Lux_single
MS728	Lux fwd	AGG AGG GCA AAT ATG ACT AAA AAA	
MS735	OL Lux-FliI184 rev	AGT CAT ATT TGC CCT CCT CTA GGT CAT CAT ACC CAG AAG CAC A	
MS736	EcoRV-FliI fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATT AAA GTA CCT CCT TTT CGC GCC	
MS727	EcoRV-Lux rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG AT TCA ACT ATC AAA CGC TTC GGT TAA G	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- Terminator- <i>fliI</i> -AS297 Lux_single
MS728	Lux fwd	AGG AGG GCA AAT ATG ACT AAA AAA	
MS737	OL Lux-FliI297 rev	AGT CAT ATT TGC CCT CCT CTA GAC AAG ACG GGG CAA TTT AGC A	
MS736	EcoRV-FliI fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATT AAA GTA CCT CCT TTT CGC GCC	
MS727	EcoRV-Lux rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG AT TCA ACT ATC AAA CGC TTC GGT TAA G	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- Terminator- <i>fliI</i> -AS6 Lux_single
MS728	Lux fwd	AGG AGG GCA AAT ATG ACT AAA AAA	
MS738	OL Lux-FliI6 rev	AGT CAT ATT TGC CCT CCT CTA CGA TTC TTC GTT GGC CAT TCA C	
MS739	EcoRV-FliI fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATG ATC CAA CGA TTT TCT CCG GTG	
MS727	EcoRV-Lux rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG AT TCA ACT ATC AAA CGC TTC GGT TAA G	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- Terminator- <i>fliI</i> -AS86 Lux_single
MS728	Lux fwd	AGG AGG GCA AAT ATG ACT AAA AAA	
MS740	OL Lux-FliI86 rev	AGT CAT ATT TGC CCT CCT CTA CCG ATC TGG CCC GGG TAA ATT A	
MS739	EcoRV-FliI fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATG ATC CAA CGA TTT TCT CCG GTG	
MS727	EcoRV-Lux rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG AT TCA ACT ATC AAA CGC TTC GGT TAA G	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- Terminator- <i>fliO</i> -AS21 Lux_single
MS728	Lux fwd	AGG AGG GCA AAT ATG ACT AAA AAA	
MS743	OL Lux-FliO21 rev	AGT CAT ATT TGC CCT CCT CTA AAC TAA TCC CAC GGC ATT AGC C	
MS744	EcoRV-FliO fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATT GAA CTC CAA TTA GTG ACG CGC	
MS727	EcoRV-Lux rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG AT TCA ACT ATC AAA CGC TTC GGT TAA G	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- Terminator- <i>fliO</i> -AS110 Lux_single
MS728	Lux fwd	AGG AGG GCA AAT ATG ACT AAA AAA	
MS745	OL Lux-FliO110 rev	AGT CAT ATT TGC CCT CCT CTA TTG TTG TGC ACT CAC CCC AAG T	
MS744	EcoRV-FliO fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATT GAA CTC CAA TTA GTG ACG CGC	
MS727	EcoRV-Lux rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG AT TCA ACT ATC AAA CGC TTC GGT TAA G	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- Terminator- <i>fliR</i> -AS169 Lux_single
MS728	Lux fwd	AGG AGG GCA AAT ATG ACT AAA AAA	
MS746	OL Lux-FliR169 rev	AGT CAT ATT TGC CCT CCT CTA GTA GCT TGT AAG CGT TAG CCC T	
MS747	EcoRV-FliR fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATT ATG GAG CTG TTG CTC GAT ACC	
MS727	EcoRV-Lux rev	GCC AAG CTT CTC TGC AGG AT TCA ACT ATC AAA CGC TTC GGT TAA G	Insertionsplasmid pNPTS138-R6KT- Terminator- <i>fliR</i> -AS252 Lux_single
MS728	Lux fwd	AGG AGG GCA AAT ATG ACT AAA AAA	
MS748	OL Lux-FliR252 rev	AGT CAT ATT TGC CCT CCT CTA ACA TAG CAA AAC CTG AGC TGC A	
MS747	EcoRV-FliR fwd	GCG AAT TCG TGG ATC CAG ATT ATG GAG CTG TTG CTC GAT ACC	
MS603	FliA prom bio fwd	b-CTG AGT GCG CTT TTT TTA TGG C	DNA-Pulldown: <i>fliA</i> - Fragment mit fwd
MS604	FliA prom rev	TCA GTA GGC CGT AAA GCT CTA AT	Biotinylierung
MS605	FliA prom fwd	CTG AGT GCG CTT TTT TTA TGG C	DNA-Pulldown: <i>fliA</i> - Fragment mit rev
MS606	FliA prom bio rev	b-TCA GTA GGC CGT AAA GCT CTA AT	Biotinylierung
MS607	FliA prom bio fwd	b-CAA GGG CCA TCT ATC ATA CGA C	DNA-Pulldown: <i>fliA</i> - Fragment mit fwd
MS608	FliA prom rev	TCA CTA TTA CCT AAA CTT TGA CG	Biotinylierung

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'	Beschreibung
MS510	f1rA pkT25 fwd	CAG GGT CGA CTC TAG AGA TGA TGC AAA CAG ATC AAC GAA T	Bacterial-Two-Hybrid: FlrA _{pol}
MS511	f1rA pkT25 rev	TTA GTT ACT TAG GTA CCC GGG GCT ATT CTT TTG TCA TTC CGT ATT TC	
MS512	f1rA pUT fwd	CTG CAG GTC GAC TCT AGA GAT GAT GCA AAC AGA TCA ACG AAT	
MS513	f1rA pUT rev	GAG CTC GGT ACC CGG GGC TAT TCT TTT GTC ATT CCG TAT TTC	
MS537	f1rA2 pkT25 fwd	CAG GGT CGA CTC TAG AGA GAA GCC TAA GTA TAC GGA TTG	Bacterial-Two-Hybrid: FlrA _{lat}
MS538	f1rA2 pkT25 rev	TTA GTT ACT TAG GTA CCC GGG GAG CAG CGC GGC CCG CTT GTT CTA	
MS539	f1rA2 pUT fwd	CTG CAG GTC GAC TCT AGA GAG AAG CCT AAG TAT ACG GAT TG	
MS540	f1rA2 pUT rev	GAG CTC GGT ACC CGG GGA GCA GCG CGG CCC GCT TGT TCT A	
MS609	RACE I_neu 2	TTC AAC CTG GCC GTT AAT AAT G	5' RACE-PCR
MS558	Lux II RACE	GTC GAC GGT ATC GAT AAG CTT G	
MS559	Lux III RACE	TGA TAT CGA ATT CCT GCA GCC C	
MS146	gyrA_qPCR_fw	CAG AAT CGC CTG AGC TTG TTG C	qRT-PCR: <i>gyrA</i> (Sputcn32_2070)
MS147	gyrA_qPCR_rev	GAG CAA GGT TGG GAA TTA GGC C Produktlänge: 144 bp; Effizienz: 1,99	
MS138	fliF1_qPCR_fw	TGG CGG TTG ATT TGA CAG AGC G	qRT-PCR: <i>fliF</i> (Sputcn32_2576)
MS139	fliF1_qPCR_rev	AGC ATG GAC TTT ACC GCA GTC G Produktlänge: 144 bp; Effizienz: 1,99	
MS140	fliM1_qPCR_fw	GCT CAG TAG GGG TAA ACT CAC G	qRT-PCR: <i>fliM</i> (Sputcn32_2569)
MS141	fliM1_qPCR_rev	GTC CCA ACC AGT CTG AAC ATG G Produktlänge: 160 bp; Effizienz: 1,92	
MS210	f1rA1_qPCR_fw	TAA GGC GGG CAT TTC GAT AGG G	qRT-PCR: <i>f1rA</i> (Sputcn32_2580)
MS211	f1rA1_qPCR_rv	ACG AGT GGG TGG AAC TAA GAC G Produktlänge: 148 bp; Effizienz: 2,02	

6.1.4 Nährmedien

Für die Kultivierung der verwendeten Bakterienstämme wurde autoklaviertes Lysogeny Broth (LB)-Medium (Tab. 4) verwendet. Durch die Zugabe von Agar-Agar wurde Festmedium hergestellt.

Tab. 4: Zusammensetzung der Nährmedien

Medium	Bestandteil	Konzentration
LB-Medium (Miller) pH 7	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
LB-Agar	LB-Medium	
	Agar-Agar	15 g/l
Weich-Agar	LB-Medium	
	Select Agar	2,5 g/l

6.1.5 Antibiotika und Medienzusätze

Dem Medium wurden zum Teil noch sterilfiltrierte (Porengröße 0,2 µm) Medienzusätze (Tab. 5) hinzugefügt.

Tab. 5: Verwendete Medienzusätze

Zusatz	Stammkonzentration	Endkonzentration	Lösungsmittel
Ampicillin-Natriumsalz	100 mg/ml	100 µg/ml	ddH ₂ O
Anhydrotetracyclin (AHT)	2 mg/ml	100 ng/ml	DMF
Chloramphenicol	30 mg/ml	20 µg/ml	EtOH p.a.
Diaminopimelinsäure (DAP)	60 mM	300 µM	ddH ₂ O
Kanamycinsulfat	50 mg/ml	50 µg/ml	ddH ₂ O
L(+)-Arabinose	20 % (w/v)	0,01 – 2 %	ddH ₂ O
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	1 M	1 mM	ddH ₂ O
Saccharose	80 % (w/v)	12 %	ddH ₂ O
X-Gal	80 mg/ml	80 µg/ml	DMF

6.1.6 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tab. 6 aufgelistet.

Tab. 6: Geräte

Gerät	Typ	Firma
Analysewaage	Saltec SBC 31	Scaltec
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMI6000B	Leica
Kamera	pco.edge sCMOS camera	PCO
DIC Objektiv	HCX PL APO 100x/1.4 DIC	Leica
Phasenkontrast Objektiv	HCX PL APO 100x/1.4 PH3	Leica
Geldokumentationsgerät	Intas Photo Imager	Intas science imaging
Heizblock	Mixing Block MB-102	Bioer
Schüttler	Orbi Shaker	Benchmark
Inkubator	Sure Temp 70	Benchmark
Magnetic Separation Rack	6-Tube Magnetic Separation Rack	NEB
Nano Drop	NanoDrop 1000 Spektrophotometer	Peqlab
PCR Thermozykler	Mastercycler nexus gradient	Eppendorf
Photometer	Ultrospec 2100 pro	Amersham Bioscience
Pipetten	Rainin Pipet-Lite XLS+	Mettler Toledo
qPCR-Zyklus	C1000 Thermal Cycler, CFX96 Real-Time System	Bio-Rad
Scanner	Epson Perfection V700 Photo	Epson
SDS-Page Elektrophorese-kammer	Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad
Western Blot Apparatur	TE77 ECL Semi-Dry Transfer Unit	Amersham Bioscience
Immunoblot Fotokammer	Fusion SL4	Peqlab
Spannungsgeber	Elektrophorese Power Supply EV231	Peqlab
Sonifier	Sono plus UW 70	Bandelin
Tecan	Tecan infinite M200	Tecan
Tischzentrifuge	Heraeus Pico 17 Zentrifuge	Thermo Scientific
Waage	Scaltec SBA 52	Scaltec
Zentrifuge	Sorvall RC 5C Plus	Sorvall
Zentrifuge	Universal 320	Hettich Zentrifugen

6.1.7 Antikörper, Enzyme, Kits und Puffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tab. 7 aufgelistet.

Tab. 7: Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
α-mouse-FLAG-HRP	1:1 000	Sigma Aldrich
α-rabbit-FlhG	1:1 000	Eurogentec
α-rabbit-FlhF	1:1 000	Eurogentec
α-mouse-GFP	1:5 000	Roche
α-rabbit-SO Flagellar Filament	1:500	Eurogentec
α-mouse-alkalische Phosphatase (AP)	1:5 000	Sigma Aldrich
α-rabbit-horseradish Peroxidase (HRP)	1:20 000	Thermo Fisher Scientific
α-rabbit-alkalische Phosphatase (AP)	1:20 000	Sigma Aldrich

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tab. 8 aufgelistet.

Tab. 8: Enzyme

Enzyme	Hersteller
Taq DNA-Polymerase	Selbst hergestellt bzw. Biozym
Phusion DNA-Polymerase	Selbst hergestellt bzw. Thermo Scientific
BamHI fast digest	Thermo Scientific
EcoRV fast digest	Thermo Scientific
EcoRI fast digest	Thermo Scientific
XbaI fast digest	Thermo Scientific
PspOMI (Bsp120I) fast digest	Thermo Scientific
Turbo™ DNase	Ambion / Thermo Scientific

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tab. 9 aufgelistet.

Tab. 9: Kits

Kits	Hersteller	Verwendung
E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit I	Omega Bio-Tek	Isolierung von Plasmid-DNA
E.Z.N.A. DNA Probe Purification Kit	Omega Bio-Tek	Reinigung von PCR Produkten
E.Z.N.A. Gel Extraction Kit	Omega Bio-Tek	Isolierung von DNA aus Agarosegel
E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit	Omega Bio-Tek	Isolierung von chromosomaler DNA
RNA MiniPrep	Zymo Research	Isolierung von RNA
Turbo DNA-free Kit	Thermo Fisher Scientific	Entfernung von DNA in RNA Proben
Takyon no ROX SYBR Mastermix dTTP Blue	Eurogentec	qRT-PCR
Takyon One-Step Kit Converter	Eurogentec	cDNA-Synthese für qRT-PCR
5'/3' RACE Kit, 2nd Generation	Roche	5' RACE PCR
Qiagen PCR Cloning Kit (pDrive)	Qiagen	Klonierung von PCR Produkten nach 5' RACE PCR
SuperSignalH West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific	Chemilumineszierendes Reagenz für HRP-abhängige Immunodetektion
CDP-Star® Chemiluminescent AP substrate	Roche	Chemilumineszierendes Reagenz für AP-abhängige Immunodetektion

Alle verwendeten Puffer sind in Tab. 10 aufgelistet.

Tab. 10: Puffer

Puffer	Zusammensetzung	Konzentration
2x SDS-Probenpuffer	Tris-HCl pH 6,8	0,125 M
	SDS	4 % (w/v)
	Glycerol	20 % (v/v)
	Dithiothreitol (DTT)	0,2 M
	Bromphenolblau	0,02 % (w/v)
4x Trenngelpuffer	SDS	0,4 % (w/v)
	Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
4x Sammelgelpuffer	SDS	0,4 % (w/v)
	Tris-HCl pH 6,8	0,5 M
10x SDS-PAGE Laufpuffer	Tris-HCl pH 8,3	0,25 M
	Glycin	1,92 M
	SDS	
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Blau G-250	0,1 % (w/v)
	Ethanol	40 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie-Entfärbelösung	Ethanol	25 % (v/v)
	Essigsäure	5 % (v/v)
10x Western Transfer Puffer	Tris-HCl pH 8,3	0,25 M
	Glycin	1,92 M
1x Western Transfer Puffer	10x Western Transfer Puffer	1x
	Methanol	10% (v/v)
10x PBS pH 7,4	NaCl	1,37 M
	KCl	27 nM
	Na ₂ HPO ₂	66 nM
	KH ₂ PO ₄	18 nM
1x PBS-T	10x PBS	1x
	Tween-20	0,1 % (v/v)
Blockierlösung	Milchpulver	5 % (w/v)
	PBS-T	
Detektionslösung	Tris-HCl pH 9,5	0,1 M
	NaCl	0,1 M
THES-Puffer	Tris HCl pH 7,5	50 mM
	EDTA	10 mM
	Saccharose	20 % (w/v)
	Benzamidin	10 nM
	AEBSF	3 mM
5x BS-Puffer	NaCl	140 mM
	HEPES	50 mM
	CaCl ₂	25 mM
	KCl	250 mM
2x B/W-Puffer	Glycerin	60 % (v/v)
	Tris-HCl PH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
	NaCl	2 M

Puffer	Zusammensetzung	Konzentration
BS/THES-Waschpuffer	THES-Puffer	44,3 % (v/v)
	5x BS-Puffer	20,0 % (v/v)
	H ₂ O	35,7 % (v/v)
	Tween-20	0,01 % (v/v)
TE-Puffer	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
	EDTA	1 mM
Elutionspuffer (DNA-Pulldown)	Tris-HCl pH 7,5	25 mM
	NaCl	100 mM - 1 M

6.1.8 Software

Die in dieser Arbeit verwendeten Software sind in Tab. 11 aufgelistet.

Tab. 11: Software

Programm	Hersteller/Website	Verwendung
Affinity Designer	Serif (Europe) Ltd	Vektorbasiertes Grafikprogramm
ARNold	Naville <i>et al.</i> (2011)	Vorhersage von Rho-unabhängige Terminatoren in Nukleinsäuresequenzen
BacStalk	Hartmann <i>et al.</i> (2020)	Analyse von Mikroskopiebilder
ImageJ	Schneider <i>et al.</i> (2012)	Bildbearbeitung und -analyse
Meme	Bailey <i>et al.</i> (2015)	Analyse von Bindemotiven in Nukleinsäuresequenzen
NovoPro Repeats Finder	NovoPro Bioscience Inc.	Auffinden von sich wiederholenden Sequenzen in DNA/Protein-Sequenzen
Pattern Locator	Mrázek und Xie (2006)	Auffinden lokaler Sequenzmuster in genomischen DNA-Sequenzen
BioVenn	Hulsen <i>et al.</i> (2008)	Erstellung von Venn-Diagrammen

6.2 Methoden

6.2.1 Sterilisation

Alle verwendeten Medien wurden durch autoklavieren bei 121 °C und einem Druck von zwei bar für 20 min sterilisiert. Hitzeempfindliche Substanzen wurden mit Hilfe eines Filters mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert und nachträglich dem Nährmedium hinzugefügt.

6.2.2 Kultivierung von Bakterienstämmen

Die Vorkulturen von *S. putrefaciens* CN-32 Stämmen wurden über Nacht in LB-Medium (Tab. 4) aerob bei RT und 120 rpm kultiviert. Für Experimente wurden diese Vorkulturen routinemäßig in LB-Medium mit einer OD₆₀₀ von 0,02 inokuliert und aerob bei 30 °C und 120 rpm kultiviert. *E. coli* Stämme wurden aerob in LB-Medium bei 37 °C und 120 rpm kultiviert. Um die Zelldichte der Flüssigkulturen zu bestimmen wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm photometrisch bestimmt. Als Referenz wurde das jeweilige Anzuchtmedium verwendet. Zur Lagerung der Bakterienstämme wurden Gefrierkulturen in 10 % DMSO (v/v) angefertigt und bei -80 °C gelagert.

6.2.3 Konstruktion rekombinanter Bakterienstämme

4.2.3.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) dient zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten (Mullis und Faloona 1987). Zur Klonierung wurden die DNA-Fragmente mittels Phusion DNA-Polymerase hergestellt, da die Korrekturlesefunktion Mutationen bei der Amplifizierung verringert. Zur Überprüfung von Plasmiden bzw. Bakterienstämmen wurde eine Kolonie-PCR mittels Taq DNA-Polymerase durchgeführt. In Tab. 12 sind die Reaktionsansätze der Phusion- bzw. Taq-Polymerase aufgelistet. Bei einer Kolonie-PCR wurde als Template von der entsprechenden Bakterienkolonie mit einem sterilen Zahnstocher wenig Zellmaterial in das Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde der Mastermix zum Zellmaterial pipettiert. In Tab. 13 sind die entsprechenden PCR-Programme erfasst.

Tab. 12: PCR-Reaktionsansätze

Polymerase	Zusammensetzung	Menge [µl]
Taq	10x Puffer	2,5
	dNTPS (10 mM)	0,5
	Primer fwd (50 µM)	0,3
	Primer rev (50 µM)	0,3
	Taq-Polymerase	1
	H ₂ O	ad 25
Phusion	5x HF Puffer	10
	dNTPS (10 mM)	1
	Primer fwd (50 µM)	0,6
	Primer rev (50 µM)	0,6
	Phusion-Polymerase	0,25
	H ₂ O	ad 50

Tab. 13: PCR-Programme

Polymerase	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Phusion	Denaturierung	98	1 min	
	Denaturierung	98	15 s	
	Annealing	52	15 s	5x
	Elongation	72	2000 bp/min	
	Denaturierung	98	15 s	
	Annealing	56-58	15 s	25x
	Elongation	72	2000 bp/min	
	Elongation	72	7 min	
Taq	Denaturierung	94	4 min	
	Denaturierung	94	15 s	
	Annealing	56-58	15 s	30x
	Elongation	72	1000 bp/min	
	Elongation	72	7 min	

4.2.3.2. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Länge in einem elektrischen Feld (Sambrook *et al.* 1989). Die Agarosekonzentration der Gele betrug 1 % (w/v) in 0,5x TAE Puffer. Zum Nachweis der DNA diente die Zugabe von 30 µl Ethidiumbromid pro 500 ml Agaroselösung. Die Elektrophorese wurde bei 140 V in TAE-Puffer bis zur vollständigen Trennung der Fragmente durchgeführt. Die Detektion der vorhandenen DNA erfolgte mittels einer Geldokumentationsanlage unter UV-Licht (312 nm). Als Größenstandard wurde der GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific) verwendet.

4.2.3.3. Restriktion von DNA mittels Endonukleasen

Präparative Restriktionen wurden mittels *FastDigest*-Restriktionsenzymen (Thermo Scientific) unter den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mittels einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, das gewünschte DNA-Fragment ausgeschnitten und mittels E.Z.N.A. Gel Extraktionskit (Omega Bio-Tek) isoliert.

4.2.3.4. Klonierung mittels Gibson Assembly

Die Klonierung der Plasmide wurde mittels Gibson Assembly durchgeführt. Während der Amplifizierung der gewünschten DNA-Fragmente wurden 15-20 bp überlappende Enden durch Oligonukleotide (Tab. 3). Nach der Phusion-PCR wurden die PCR-Produkte mittels E.Z.N.A. DNA Probe Purification Kit (Omega Bio-Tek) gereinigt. Die Gibson-Reaktion wurde mit 20 ng/µl linearisierter Vektor und der doppelten molaren Menge an Insert (gereinigte PCR-Produkte) für 1 h bei 50 °C durchgeführt. Anschließend wurde der komplette Reaktionsansatz in die Transformation in *E. coli* DH5α λpir eingesetzt.

4.2.3.5. Transformation chemisch-kompetenter Zellen

Zur Transformation von chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen wurde die Hitzeschock-Methode angewendet. Hierzu wurde ein Aliquot von 50 µl chemischer kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA bzw. dem kompletten Gibson Assembly Reaktionsansatz versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurde ein Hitzeschock von 42 °C und 1 min durchgeführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 700 µl LB-Medium und eine Inkubation bei 37 °C und 180 rpm für 1 h. Nach der Regeneration der Zellen wurden diese auf entsprechenden selektiven LB Agar-Platten ausplattiert und bei 37 °C ü. N. bebrütet.

4.2.3.6. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Alle in dieser Arbeit konstruierten Plasmide wurden mittels DNA-Sequenzierung nach Sanger durch die Firma Microsynth SeqLab (Göttingen) überprüft.

4.2.3.7. Konjugation

Mit Hilfe der Konjugation erfolgte die Einbringung von Plasmiden in *S. putrefaciens*. Als Donorstamm diente der Diaminopimelinsäure (DAP)-auxotrophe *E. coli* WM3064. DAP ist ein wichtiger Bestandteil des Peptidoglykans und somit ist die Zugabe von DAP essenziell für die Zellwandsynthese. Je 1 ml des gewünschten Rezipientenstamms und Donorstamms mit dem zu übertragenden Plasmid wurden zweimal mit LB_{DAP} gewaschen. Beide Stämme wurden in 200 µl LB_{DAP} resuspendiert und in 5-6 Tropfen auf LB_{DAP}-Agarplatten aufgetropft. Die Inkubation der Konjugationsplatten erfolgte für mind. 6 h bei 30 °C. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml LB_{Kan} abgeschwemmt und dreimal gewaschen. Die Zellen wurden final in 1 ml LB_{Kan} aufgenommen und je 100 µl einer 1:10 sowie 1:100 Verdünnungen auf LB_{Kan}-Agarplatten ausplattiert. Durch die Selektion und Inkubation bei 30 °C ü. N. wurden *Shewanella* Zellen mit integriertem Plasmid erzielt. Zum einen wurden die Plasmide pBTOK (ektopische Produktion), pBBR1-MCS2-TT-RBS-lux (Reporterplasmid) oder das Suizidplasmid pNPTS138-R6KT (Deletions- und Insertionsmutanten) in *S. putrefaciens* eingebracht.

4.2.3.8. In-frame Deletions- und Insertionsmutanten

Zur Erstellung von *in-frame* Deletions- und Insertionsmutanten wurde das Suizidplasmid pNPTS138-R6KT verwendet. Im ersten Schritt erfolgt mittels Phusion-PCR die Amplifizierung der gewünschten DNA-Fragmente. Für die homologe Rekombination werden je \approx 500 bp Sequenzüberhänge *up-* und *downstream* des zu deletierenden bzw. inserierenden Gens amplifiziert. Über die Restriktionsschnittstelle EcoRV in dem Suizidvektor erfolgte die Insertion mit Hilfe von Gibson Assembly. pNPTS138-R6KT trägt eine Kanamycinresistenz-Kassette und das Gen *sacB*, welches für das Enzym Levansucrase codiert. Levansucrase synthetisiert aus Saccharose das für die Zelle toxische Levan. Der Suizidvektor mit gewünschtem Insert wird mittels Konjugation in *S. putrefaciens* eingebracht. Die homologen Bereiche des Plasmids zur chromosomalen DNA ermöglichen eine Rekombination. Die erhaltenen Einzelkolonien auf LB_{Kan}-Agarplatten werden zur Selektion auf LB_{Kan}- und LB_{Suc}-Agarplatten überstrichen. Anschließend wurden Kanamycin-resistente und Saccharose-sensitive Einzelkolonien ohne Selektionsdruck für ca. 3 bis 5 h in LB-Medium bei 30 °C und 120 rpm kultiviert. Dies ermöglicht die zweite homologe Rekombination und die gewünschte Deletions- bzw. Insertionsmutante sollte generiert sein. Zur Selektion wurden 1:10 und 1:100 Verdünnungen auf LB_{Suc}-Agarplatten ausplattiert und bei 30 °C ü. N. inkubiert. Zur Kontrolle der doppelten homologen Rekombination wurden Einzelkolonien wieder auf LB_{Kan}- und LB_{Suc}-Agarplatten überstrichen. Mit Hilfe einer Kolonie-PCR

wurden die Kanamycin-sensitiven und Saccharose-resistenten Einzelkolonien auf die chromosomale Deletion bzw. Insertion des gewünschten Gens bzw. Mutation untersucht.

4.2.3.9. Induzierbare chromosomale Genexpression

Für die induzierbare chromosomale Genexpression wurde das *araBDAX*-Operon verwendet, welches Bestandteile für den Abbau des Monosaccharids L-Arabinose codiert. *S. putrefaciens* verfügt über zwei L-Arabinose Abbauwege (Rodionov *et al.* 2010). Der wichtigste Abbauweg für die L-Arabinose Verwertung hängt von der Ribulokinase AraB (Sputcn32_2068), L-Ribulose-Phosphat-Epimerase AraD (Sputcn32_2067) sowie L-Arabinose-Isomerase AraA (Sputcn32_2066) ab. Das *araBDAX*-Operon wird in der Anwesenheit von Arabinose durch den Transkriptionsfaktor AraR aktiviert (Watanabe *et al.* 2006). Susanne Brenzinger konnte zeigen, dass bei *S. putrefaciens* die Deletion von *araD* und *araA* dazu führt, dass die Mutante nicht in der Lage ist zu wachsen, wenn als einzige Kohlenstoffquelle L-Arabinose vorhanden ist (Mayer *et al.* 2021). Das Gen von Interesse wurde *downstream* von *araB* in den Δ *araDA* Deletionsstamm integriert. Als Startcodon des Gens von Interesse diente das ATG von *araD*. Mit diesem L-Arabinose induzierbaren System kann die Genexpression streng kontrolliert werden und resultiert in einer gleichmäßigen über die Population verteilten Geninduktion. Ebenso können auch essenzielle Gene mit diesem System depletiert werden (Mayer *et al.* 2021).

Nach dem Integrieren des Gens von Interesse wurde das native chromosomale Gen deletiert. Bei essenziellen Genen fand dies unter der Anwesenheit von 0,1 % L-Arabinose statt. Die durchgeführten Experimente mit dem chromosomal induzierbaren L-Arabinose System wurden mit L-Arabinose Konzentrationen von 0,1 bis 2 % durchgeführt.

6.2.4 Mikroskopie

Zur Mikroskopie wurden die entsprechenden *S. putrefaciens* Stämme bis zur exponentiellen Phase bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,3 bis 0,4 bei RT kultiviert. Zur Immobilisierung der Zellen wurden 2,5 µl der Kultur auf 1 %ige (w/v) Agaroseplättchen getropft und mit einem Deckglas der Stärke 1,5H (Carl Roth) abgedeckt. Für eine hohe Auflösung wurde ein fluoreszenzfreies Immersionsöl 518 F (Zeiss) verwendet. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem DMI6000 B Inversmikroskop (Leica) aufgenommen, das mit einer pco.edge sCMOS-Kamera (PCO), einem HC PL APO 100x/1.40 Oil PH3 Phasenkontrastobjektiv, HCX PL APO 100x/1.4 Differentialinterferenzkontrast (DIC)-Objektiv und der VisiView-Software (Visitron Systems) ausgestattet war. Die Lokalisierung von FlhG-sfGFP erfolgte mit einer Belichtungszeit von 600 ms. Zum Überprüfen der Schwimmfähigkeit der Zellen wurden Objektträger verwendet, die ein Deckglas mit vier Silikonropfen (Baysilone, VWR International) in einem Abstand von ca. 1 mm fixiert hatten. Das Silikon wurde mindestens ü. N. bei RT luftgetrocknet. Die Bilder wurden mit dem auf ImageJ basierenden Programm Fiji (Schindelin *et al.* 2012) und Affinity Designer 1.7v (Serif) weiterverarbeitet.

4.2.3.10. Maleimidfärbung

Zur Visualisierung der polaren Flagellenstrukturen Haken (FlgE_{cys}) und Filament (FlaAB_{cys}) wurde eine Fluoreszenzfärbung mittels Alexa Fluor 488-Maleimide (Molecular Probes, Life Technologies), CF488A-Maleimide (Sigma-Aldrich) oder Alexa Fluor 568-Maleimide (Molecular Probes, Life Technologies) durchgeführt. Die verwendeten Pipettenspitzen zum pipettieren bzw. resuspendieren der Zellen wurden zuvor die Spitzen abgeschnitten, um ein abscheren der Flagelle zu vermeiden. 500 µl einer exponentiell wachsenden Kultur (OD₆₀₀ 0,5-0,6) wurden für 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 50 µl 1x PBS aufgenommen und 2 µl Fluoreszenzfarbstoff (1 mg/ml in DMSO) zugefügt.

Die Inkubation erfolgte für 15 min bei RT im Dunkeln. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 2500 rpm wurden die Zellen einmal mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in 1 ml 1x PBS aufgenommen und 2,5 µl zum immobilisieren auf ein 1 %iges (w/v) Agaroseplättchen aufgetropft. Die Mikroskopie erfolgte mit einer Belichtungszeit von 50 ms und nach Kapitel 6.2.4.

6.2.5 Motilitätsassay

Die Schwimmfähigkeit von *S. putrefaciens* wurde auf semisoliden Oberflächen untersucht. Hierfür wurden 2,5 µl einer exponentiell wachsenden Kultur des entsprechenden Stammes sowie der Kontrollstämme auf LB-Weichagarplatten aufgetropft und für ca. 16 h bei RT inkubiert. Zur Auswertung des Schwimmverhaltens wurde die radiale Ausbreitung mit Hilfe von ImageJ bestimmt.

6.2.6 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA von exponentiell wachsenden Flüssigkulturen wurden mittels Direct-zol RNA MiniPrep Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend wurden die Rückstände der DNA mit Hilfe des Turbo DNA-free Kits (Thermo Fisher Scientific) entfernt. Mittels PCR wurde die RNA auf DNA-Kontaminationen überprüft. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

6.2.7 qRT-PCR

Zur Quantifizierung spezifischer mRNA-Expression wurde die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) angewandt. Hierfür wurde der Takyon no ROX SYBR Mastermix dTTP Blue (Eurogentec) und zur cDNA Synthese das Takyon One-Step Kit Converter Kit (Eurogentec) verwendet (Tab. 14). Zur Kontrolle auf DNA-Kontaminationen wurden die RNA-Proben ohne Reverse Transkriptase (Euroscript II RT/RNase Inhibitor) mitgeführt.

Tab. 14: qRT-PCR Zusammensetzung

qRT-PCR	Bestandteil	Menge
	RNA (20 ng/µl)	40 ng
	Primer <i>forward</i>	0,25 mM
	Primer <i>reverse</i>	0,25 mM
	Euroscript II RT/RNase Inhibitor	0,2 µl
	2x Takyon Mastermix	10 µl
	H ₂ O (RNase frei)	ad 20 µl

Die Amplifizierung wurde in weißen 0,2 ml Röhrchen mit niedrigem Profil und ultratransparenter Verschlusskappen (Thermo Fisher Scientific) mit dem C1000 Thermal Cycler und CFX96 Real-Time System (Bio-Rad) durchgeführt (Tab. 15).

Tab. 15: qRT-PCR Temperaturprogramm

Temperatur	Zeit	Zyklen
48 °C	10 min	1x
95 °C	3 min	
95 °C	5 s	40x
60 °C	20 s	

Der *cycle threshold* (Ct) wurde nach 40 PCR Zyklen automatisch mittels Real-Time CFX Manager 2.1 (Bio-Rad) ermittelt. Dieser Ct-Wert jedes Gens von Interesse wurde gegen den Ct-Wert des Housekeepinggens *gyrA* (Sputcn32_2070) normalisiert. Die Primereffizienzen und relative Transkriptlevel wurden nach Pfaffl (Pfaffl 2001) bestimmt.

6.2.8 Transkriptionelles *lux*-Reportersystem

Um das Vorhandensein von Promotoren zu überprüfen, wurde ein transkriptionelles Reportersystem angewendet. Zunächst wurde ein Reporterplasmid mit dem *lux*-Operon (*luxCDABE*) aus *Photobacterium luminescens* und eine transkriptionelle Terminorkassette aus dem Plasmid pBBR1-MCS5-TT-RBS-*lux* amplifiziert und in den Vektor pBBR1-MCS2 (Kovach *et al.* 1995) über die Schnittstellen KpnI und SacI kloniert (Gödeke *et al.* 2011). Hieraus resultiert das Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT-RBS-*lux*. Anschließend wurden die zu analysierenden Flagellenpromotoren über die Schnittstellen XbaI und BamHI nach der Terminorkassette und vor das *lux*-Operon in das Reporterplasmid pBBR1-MCS2-TT-RBS-*lux* inseriert. Die Reporterfusionsplasmide wurden in die entsprechenden *S. putrefaciens* Stämme konjugiert.

Zur Messung der transkriptionellen *lux*-Reporterfusionen wurden die Übernacht-Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,02 in 10 ml LB-Medium mit Kanamycin inokuliert. Die Kulturen wurden aerob bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 angezogen. Nach der Bestimmung der OD₆₀₀ mittels Photometer wurde je *well* 160 µl Zellsuspension in eine weiße 96-well-Polystyren-Rundboden-Mikrotiterplatte (Greiner Bio One) transferiert. Die Lumineszenz wurde mittels einem Plattenlesegerät Tecan Infinite M200 (Tecan) und einer Signalaufzeichnung von 1000 ms pro *well* ermittelt. Die relative Lichteinheit (RLU) wurde durch die Lumineszenz in Relation zur optischen Dichte der Kulturen ermittelt.

6.2.9 5'-RACE-PCR

Zur Bestimmung des Transkriptionsstarts wurde eine *rapid amplification of cDNA ends* (RACE)-PCR mittels 5'/3'-RACE Kit (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurde 1 µl des 5'-RACE-PCR Produkts direkt in die Ligation mittels PCR Cloning Kit (Qiagen) eingesetzt. Nach der 30-minütigen Ligation bei 16 °C in den pDrive Vektor wurde der komplette Ligationsansatz in *E. coli* DH5α λpir transformiert. Plasmide mit Insertionen wurden mittels E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-Tek) isoliert und mit dem Standardprimer pUCM13-52 sequenziert (Seqlab).

6.2.10 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mit Hilfe einer diskontinuierlichen Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli 1970). Die Proben wurden einer exponentiell wachsenden Bakterienkultur bei OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 entnommen. Hierfür wurde eine OD₆₀₀ von 10 pelletiert, in 100 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 95 °C gekocht. Anschließend wurden 10 µl der Probe bzw. 5 µl Protein Marker VI prestained (AppliChem) auf das SDS-Polyacrylamidgel (Tab. 16) aufgetragen. Die Elektrophorese zur Auftrennung der Proteine erfolgte bei 70 V. Das Polyacrylamidgel wurde mit Hilfe von Coomassie-Blau gefärbt oder weiter für eine Western Blot-Analyse verwendet.

Tab. 16: Zusammensetzung SDS-Polyacrylamidgel

	Bestandteil	Menge
Sammelgel (5 %)	Wasser	1,4 ml
	4x Sammelgelpuffer	625 µl
	30 % Acrylamid	413 µl
	10 % (w/v) Ammoniumperoxidsulfat (APS)	25 µl
	N,N,N,N-Tetramethylenethyldiamin (TEMED)	1,9 µl
Trenngel (11 %)	Wasser	1,9 ml
	4x Trenngelpuffer	1,25 ml
	30 % Acrylamid	1,8 ml
	10 % (w/v) Ammoniumperoxidsulfat (APS)	40 µl
	N,N,N,N-Tetramethylenethyldiamin (TEMED)	3 µl
Trenngel (12,5 %)	Wasser	1,6 ml
	4x Trenngelpuffer	1,25 ml
	30 % Acrylamid	2,1 ml
	10 % (w/v) Ammoniumperoxidsulfat (APS)	40 µl
	N,N,N,N-Tetramethylenethyldiamin (TEMED)	3 µl

6.2.11 Western Blot

Zum immunologischen Nachweis eines spezifischen Proteins oder der Stabilität eines Fusionsproteins wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Nach der Auftrennung der Proteine mit einer SDS-PAGE wurden diese mit Hilfe des *Semi-Dry-Blot*-Verfahren auf eine PVDF-Membran (Roth) transferiert. Hierfür wurde *Whatman*-Papier (VWR) und eine mit Methanol aktivierte PVDF-Membran in Western Transfer Puffer äquilibriert. Der Proteintransfer erfolgte bei 120 mA pro Membran für 45 min. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit Blockierlösung für 1 h bei RT oder ü. N. bei 4 °C gesättigt. Der spezifische Proteinnachweis erfolgte mit dem Erstantikörper für 1 h bei RT oder ü. N. bei 4 °C. Nach drei fünfminütigen Waschschritten mit PBS-T wurde die Membran mit dem Zweitantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte mit SuperSignalH West Pico Chemilumineszenz Substrat (Thermo Fisher Scientific) oder CDP-Star Chemilumineszenz Substrat (Roche) und wurde mit einem Fusion-SL Chemilumineszenz-Gerät (Peglab) dokumentiert. Die Quantifizierung der Western Blots erfolgte mit der Fusion Capt Advance Software (Vilber). Die Proteinmengen wurden immer gegen die entsprechende Kontrolle normalisiert.

6.2.12 Bacterial Two-Hybrid System

Zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* wurde ein Bacterial Two Hybrid Assay durchgeführt. Dieses System beruht auf zwei Fragmente, T18 und T25, der Adenylatzyklase von *Bordetella pertussis* fusioniert. Wenn diese Fragmente T18 und T25 in räumliche Nähe gelangen, kommt es zur Ausbildung der katalytisch aktiven Adenylatzyklase. Die Adenylatzyklase ist in der Lage zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) zu synthetisieren. Zur *in vivo* Untersuchung wird das Bakterium *E. coli* BTH101 verwendet, da dieses keine funktionale Adenylatzyklase besitzt. Die zu untersuchenden Proteine wurden C- oder N-terminal an die Adenylatfragmente fusioniert. Hierfür wurden einmal die pUT18 bzw. pUT18C Plasmide mit dem T18-Fragment und einer Ampicillinresistenz sowie pKT25 bzw. pKNT25 mit dem T25-Fragment und einer Kanamycinresistenz verwendet. Alle vier Plasmidkonstrukte wurden für jedes zu untersuchende Protein erstellt. In *E. coli* BTH101 erfolgte die Kotransformation von einem Plasmid mit dem Gen (Protein X) und dem T25-Fragment sowie ein

weiteres Plasmid mit dem Gen (Protein Y) und dem T18-Fragment. Die Kotransformation wurde in allen möglichen Plasmidkombinationen durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten die Leervektoren pUT18 und pKT25. Zwei Hälften eines Leucin-Zippers dienen als Positivkontrolle (pUT18C-zip und pKT25-zip). Nach der Regeneration wurden die Transformanten in LB-Medium mit Kanamycin und Ampicillin schüttelnd bei 30 °C ü. N. inkubiert. Je 3 µl der Kulturen wurden auf LB-Platten mit Kanamycin, Ampicillin, IPTG und X-Gal aufgetropft und ü. N. bei 30 °C inkubiert. Zur besseren Auswertung wurden die Platten noch ein bis zwei Tage weiter bei 4 °C aufbewahrt. Bei einer Interaktion der zu untersuchenden Proteine kommt es zur Blaufärbung der Kolonien, da die T25- und T18-Fragmente eine funktionale Adenylatzyklase ausbilden. Das synthetisierte cAMP bindet an das katabolische Rezeptorprotein (CRP) und dieser Komplex aktiviert diverse Genexpressionen. Durch die Produktion der β -Galaktosidase kommt es zum Umsatz des Substrats X-Gal und der Blaufärbung der Kolonien.

6.2.13 DNA-Pulldown Assay

Zur Identifizierung von DNA-bindenden Proteine wurde ein DNA-Pulldown nach dem Protokoll von Jutras *et al.* (2012) durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte die Herstellung des biotinylierten DNA-Fragments über eine Phusion-PCR (Tab. 12). Als Template diente chromosomale DNA von *S. putrefaciens*. Die Biotinylierung kann entweder mit dem *forward* oder *reverse* Oligonukleotid durchgeführt werden. Nach erfolgreicher PCR wurden die biotinylierten DNA-Fragmente mit Hilfe eines Agarosegels getrennt und mit dem E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (Omega Bio-Tek) isoliert. Um das Volumen der biotinylierten DNA zu reduzieren erfolgte anschließend eine Ethanol-Fällung. Bei der Ethanol-Fällung wurden je 50 µl 5 M NaCl und 1 ml 96 % EtOH zu 450 µl DNA zugegeben und invertiert. Nach der Fällung bei -20°C ü. N. wurde die DNA bei 17.000 g für 30 min und bei 4 °C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde drei Mal mit eiskaltem 70 % EtOH gewaschen. Nach dem trocknen des DNA-Präzipitats wurde dies in ein entsprechendes Volumen mit H₂O aufgenommen und bei 45 °C für ca. 10 min gelöst.

Für jeden Pulldown-Ansatz wurden je 250 ml *S. putrefaciens* WT Kultur in LB-Medium bei einer OD₆₀₀ von 0,6 geerntet. Das Bakteriensediment wurde anschließend dreimal mit Nuklease-freiem H₂O gewaschen und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert. Für den Zellaufschluss wurden die Bakterienpellets dreimal auf Eis aufgetaut und anschließend wieder bei -80 °C eingefroren. Die aufgeschlossenen Zellen wurden in ca. 1 ml BS/THES-Puffer pro 250 ml Kultur resuspendiert. Das Zelllysate wurde bei einer zu hohen Viskosität durch die genomische DNA noch 3x 30 s mit 30 % sonifiziert. Die Fraktion des Lysats erfolgte bei 10.000 g für 30 min und 4 °C.

Für jeden Pulldown-Ansatz wurden 100 µl magnetische Streptavidin-Beads (Dynabeads Streptavidin, M-280, 10 mg/ml, Thermo Fisher) mit abgeschnittener Spitze in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zum Äquilibrieren der Beads wurde dreimal mit 500 µl 2x B/W-Puffer gewaschen. In 190 µl 2x B/W-Puffer (10 µl Restvolumen, Endkonzentration 1x) wurden die Beads aufgenommen und 200 µl 200-400 ng/µl biotinylierte DNA zugegeben. Nach der rollenden Inkubation von 20 min bei RT wurde der Überstand abgenommen und nochmals die Inkubation mit 190 µl 2x B/W-Puffer und 200 µl 200-400 ng/µl biotinylierte DNA wiederholt. Anschließend wurde mit 400 µl TE-Puffer dreimal die Beads mit der biotinylierten DNA gewaschen. Zur Äquilibrierung der Beads wurde zweimal mit je 500 µl BS/THES-Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 500 µl BS/THES-Puffer und 5 µg Poly dl-dC (Poly-(2'-deoxyinosinyl-2'-deoxycytidylsäure) Natriumsalz; Sigma) zur Verringerung von unspezifischer DNA-Bindung. Nach der rollenden Inkubation von 5 min bei RT erfolgte die Zugabe von 200 µl BS/THES-Puffer, 600 µl Lysat und 40 µg Poly dl-dC. Das Lysat wurde für 30 min rollend bei RT inkubiert. Der Inkubationsschritt mit dem Lysat wurde unter den gleichen Bedingungen noch ein weiteres Mal wiederholt. Das anschließende waschen erfolgte dreimal mit je 500 µl BS/THES-Puffer und 5 µg Poly dl-dC und danach zweimal mit je 500 µl BS/THES-Puffer.

Die Elution der DNA-bindenden Proteine erfolgte mit einer aufsteigenden NaCl-Konzentration. Der erste Elutionsschritt erfolgte mit 50 µl Elutionspuffer und einer NaCl-Konzentration von 100 mM. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde der Überstand abgenommen und mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt. Die weiteren Elutionsschritte wurden mit dem Elutionspuffer und den NaCl-Konzentrationen von 200 mM, 300 mM, 500 mM, 750 mM und 1 M NaCl durchgeführt. Um zu überprüfen, ob die biotinylierte DNA nicht degradiert ist, wurde diese mit 35 µl Nuklease-freies Wasser bei 70 °C für 10 min eluiert und zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Elutionsfraktionen mit SDS-Probenpuffer wurden bei 99 °C für 5 min gekocht und komplett auf ein 11 %iges SDS-Polyacrylamidgel (1,5 mm Spacer, 10er Kamm) aufgetragen. Anschließend wurde das aufgetrennte SDS-Polyacrylamidgel mit kolloidalem Coomassie gefärbt.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Arc	Anoxische Redoxkontrolle
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
c-di-GMP	zyklisches dimeres Guanosinmonophosphat
CM	<i>cytoplasmic membrane</i> (Zellmembran)
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
DAP	Diaminopimelinsäure
DIC	Differentialinterferenzkontrast
EBP	Enhancer-Bindeprotein
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
EVC	<i>empty vector control</i> (Leervektorkontrolle)
Flr	<i>flagellar regulatory protein</i>
fT3SS	flagellares Typ-III-Sekretionssystem
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HDX	Wasserstoff-Deuterium-Austausch
HTH	Helix-Turn-Helix
LB	<i>lysogeny broth</i>
MS	Massenspektrometrie
MST	mikroskalige Thermophorese
MTS	<i>membrane targeting sequence</i>
NPM	<i>no promoter motif</i> (kein Promotormotiv)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
OM	<i>outer membrane</i> (äußere Membran)
P	Promotor
PG	Peptidoglykan
ppGpp	Guanosin-Tetraphosphat
RBS	Ribosomen-Bindestelle
Rec	<i>receiver</i> (Empfänger)
RLU	<i>relative light units</i> (relative Lichteinheiten)
rpm	<i>revolution per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
sfGFP	<i>superfolder green fluorescent protein</i> (Grün fluoreszierendes Protein)
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
TSS	Transkriptionsstart
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumenprozent)
w/v	<i>weight per volume</i> (Massenprozent)
WT	Wildtyp
Δ	Deletion

8 Literaturverzeichnis

Altinoglu, Ipek; Merrifield, Christien J.; Yamaichi, Yoshiharu (2019): Single molecule super-resolution imaging of bacterial cell pole proteins with high-throughput quantitative analysis pipeline. In: *Scientific Reports* 9 (1), S. 6680. DOI: 10.1038/s41598-019-43051-7.

Al-Zyoud, Walid A.; Hynson, Robert M. G.; Ganuelas, Lorraine A.; Coster, Adelle C. F.; Duff, Anthony P.; Baker, Matthew A. B. et al. (2016): Binding of transcription factor GabR to DNA requires recognition of DNA shape at a location distinct from its cognate binding site. In: *Nucleic Acids Res* 44 (3), S. 1411–1420. DOI: 10.1093/nar/gkv1466.

Apel, Dmitry; Surette, Michael G. (2008): Bringing order to a complex molecular machine: the assembly of the bacterial flagella. In: *Biochimica et biophysica acta* 1778 (9), S. 1851–1858. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.07.005.

Aravind, L.; Ponting, C. P. (1999): The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. In: *FEMS microbiology letters* 176 (1), S. 111–116. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13650.x.

Armitage, J. P.; Macnab, R. M. (1987): Unidirectional, intermittent rotation of the flagellum of *Rhodobacter sphaeroides*. In: *J Bacteriol* 169 (2), S. 514–518. DOI: 10.1128/jb.169.2.514-518.1987.

Armitage, Judith P.; Berry, Richard M. (2020): Assembly and Dynamics of the Bacterial Flagellum. In: *Annu. Rev. Microbiol.* 74, S. 181–200. DOI: 10.1146/annurev-micro-090816-093411.

Arora, S. K.; Ritchings, B. W.; Almira, E. C.; Lory, S.; Ramphal, R. (1997): A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. In: *J Bacteriol* 179 (17), S. 5574–5581. DOI: 10.1128/jb.179.17.5574-5581.1997.

Arroyo-Pérez, Erick Eligio; Ringgaard, Simon (2021): Interdependent Polar Localization of FlhF and FlhG and Their Importance for Flagellum Formation of *Vibrio parahaemolyticus*. In: *Front. Microbiol.* 12, S. 655239. DOI: 10.3389/fmicb.2021.655239.

Auvray, F.; Thomas, J.; Fraser, G. M.; Hughes, C. (2001): Flagellin polymerisation control by a cytosolic export chaperone. In: *Journal of Molecular Biology* 308 (2), S. 221–229. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4597.

Bae, Nahee; Park, Hye-Jee; Park, Hanbi; Kim, Minyoung; Do, Eunsoo; Han, Sang-Wook (2018): Elucidating Functions of FleQ in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by Comparative Proteomic and Phenotypic Analyses. In: *International Journal of Molecular Sciences* 19 (10). DOI: 10.3390/ijms19103038.

Bai, Fan; Morimoto, Yusuke V.; Yoshimura, Shinsuke D. J.; Hara, Noritaka; Kami-ike, Nobunori; Namba, Keiichi; Minamino, Tohru (2014): Assembly dynamics and the roles of Flil ATPase of the bacterial flagellar export apparatus. In: *Scientific Reports* 4, S. 6528. DOI: 10.1038/srep06528.

Bailey, T. L.; Elkan, C. (1994): Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. In: *Proceedings. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology 2*, S. 28–36.

Bailey, Timothy L.; Johnson, James; Grant, Charles E.; Noble, William S. (2015): The MEME Suite. In: *Nucleic Acids Res* 43 (W1), W39-49. DOI: 10.1093/nar/gkv416.

Bak, Geunu; Lee, Jungmin; Suk, Shinae; Kim, Daun; Young Lee, Ji; Kim, Kwang-Sun et al. (2015): Identification of novel sRNAs involved in biofilm formation, motility, and fimbriae formation in *Escherichia coli*. In: *Scientific Reports* 5, S. 15287. DOI: 10.1038/srep15287.

Balaban, Murat; Hendrixson, David R. (2011): Polar flagellar biosynthesis and a regulator of flagellar number influence spatial parameters of cell division in *Campylobacter jejuni*. In: *PLOS Pathogens* 7 (12), e1002420. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002420.

Balaban, Murat; Joslin, Stephanie N.; Hendrixson, David R. (2009): FlhF and its GTPase activity are required for distinct processes in flagellar gene regulation and biosynthesis in *Campylobacter jejuni*. In: *J Bacteriol* 191 (21), S. 6602–6611. DOI: 10.1128/JB.00884-09.

Bange, Gert; Kümmerer, Nico; Grudnik, Przemyslaw; Lindner, Robert; Petzold, Georg; Kressler, Dieter et al. (2011): Structural basis for the molecular evolution of SRP-GTPase activation by protein. In: *Nat Struct Mol Biol* 18 (12), S. 1376–1380. DOI: 10.1038/nsmb.2141.

- Bange, Gert; Petzold, Georg; Wild, Klemens; Parlitz, Richard O.; Sinning, Irmgard (2007): The crystal structure of the third signal-recognition particle GTPase FlhF reveals a homodimer with bound GTP. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (34), S. 13621–13625. DOI: 10.1073/pnas.0702570104.
- Baraquet, Claudine; Harwood, Caroline S. (2013): Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ. In: *PNAS* 110 (46), S. 18478–18483. DOI: 10.1073/pnas.1318972110.
- Baraquet, Claudine; Harwood, Caroline S. (2016): FleQ DNA Binding Consensus Sequence Revealed by Studies of FleQ-Dependent Regulation of Biofilm Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *J Bacteriol* 198 (1), S. 178–186. DOI: 10.1128/JB.00539-15.
- Baraquet, Claudine; Murakami, Keiji; Parsek, Matthew R.; Harwood, Caroline S. (2012): The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. In: *Nucleic Acids Res* 40 (15), S. 7207–7218. DOI: 10.1093/nar/gks384.
- Belas, Robert (2014): Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. In: *Trends in Microbiology* 22 (9), S. 517–527. DOI: 10.1016/j.tim.2014.05.002.
- Berg, H. C. (1995): Torque generation by the flagellar rotary motor. In: *Biophysical Journal* 68 (4 Suppl), 163S-166S; discussion 166S-167S.
- Berg, Howard C. (2003): The rotary motor of bacterial flagella. In: *Annu. Rev. Biochem.* 72 (1), S. 19–54. DOI: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161737.
- Blagotinsek, Vitan (2021): Einfluss von FlhG, FlhB und ihren Interaktionspartnern auf die Regulation der Flagellierung des monotrichen Bakteriums *Shewanella putrefaciens*. Dissertation.
- Boni, I. V.; Isaeva, D. M.; Musychenko, M. L.; Tzareva, N. V. (1991): Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. In: *Nucleic Acids Res* 19 (1), S. 155–162. DOI: 10.1093/nar/19.1.155.
- Bouteiller, Mathilde; Dupont, Charly; Bourigault, Yvann; Latour, Xavier; Barbey, Corinne; Konto-Ghiorgi, Yoan; Merieau, Annabelle (2021): *Pseudomonas* Flagella: Generalities and Specificities. In: *International Journal of Molecular Sciences* 22 (7), S. 3337. DOI: 10.3390/ijms22073337.
- Bradley, D. E. (1980): A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. In: *Can. J. Microbiol.* 26 (2), S. 146–154. DOI: 10.1139/m80-022.
- Bren, A.; Eisenbach, M. (1998): The N terminus of the flagellar switch protein, FlhM, is the binding domain for the chemotactic response regulator, CheY. In: *Journal of Molecular Biology* 278 (3), S. 507–514. DOI: 10.1006/jmbi.1998.1730.
- Bubendorfer, Sebastian; Held, Susanne; Windel, Natalie; Paulick, Anja; Klingl, Andreas; Thormann, Kai M. (2012): Specificity of motor components in the dual flagellar system of *Shewanella putrefaciens* CN-32. In: *Molecular Microbiology* 83 (2), S. 335–350. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07934.x.
- Bubendorfer, Sebastian; Koltai, Mihaly; Rossmann, Florian; Sourjik, Victor; Thormann, Kai M. (2014): Secondary bacterial flagellar system improves bacterial spreading by increasing the directional persistence of swimming. In: *PNAS* 111 (31), S. 11485–11490. DOI: 10.1073/pnas.1405820111.
- Büke, Ferhat; Grilli, Jacopo; Cosentino Lagomarsino, Marco; Bokinsky, Gregory; Tans, Sander J. (2021): ppGpp is a bacterial cell size regulator. In: *Current biology : CB*. DOI: 10.1016/j.cub.2021.12.033.
- Bulyha, Iryna; Lindow, Steffi; Lin, Lin; Bolte, Kathrin; Wuichet, Kristin; Kahnt, Jörg et al. (2013): Two small GTPases act in concert with the bactofilin cytoskeleton to regulate dynamic bacterial cell polarity. In: *Developmental cell* 25 (2), S. 119–131. DOI: 10.1016/j.devcel.2013.02.017.
- Burnham, Peter M.; Kolar, William P.; Hendrixson, David R. (2020): A Polar Flagellar Transcriptional Program Mediated by Diverse Two-Component Signal Transduction Systems and Basal Flagellar Proteins Is Broadly Conserved in Polar Flagellates. In: *mBio* 11 (2). DOI: 10.1128/mBio.03107-19.
- Bush, Matthew; Dixon, Ray (2012): The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of σ_{54} -dependent transcription. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 76 (3), S. 497–529. DOI: 10.1128/MMBR.00006-12.

- Butz, Heidi A.; Mey, Alexandra R.; Ciosek, Ashley L.; Crofts, Alexander A.; Davies, Bryan W.; Payne, Shelley M. (2021): Regulatory Effects of CsrA in *Vibrio cholerae*. In: *mBio* 12 (1). DOI: 10.1128/mBio.03380-20.
- Carlo, Sacha de; Chen, Baoyu; Hoover, Timothy R.; Kondrashkina, Elena; Nogales, Eva; Nixon, B. Tracy (2006): The structural basis for regulated assembly and function of the transcriptional activator NtrC. In: *Genes & development* 20 (11), S. 1485–1495. DOI: 10.1101/gad.1418306.
- Chanchal; Banerjee, Priyajit; Jain, Deepti (2017): ATP-Induced Structural Remodeling in the Antiactivator FleN Enables Formation of the Functional Dimeric Form. In: *Structure (London, England : 1993)* 25 (2), S. 243–252. DOI: 10.1016/j.str.2016.11.022.
- Chanchal; Banerjee, Priyajit; Raghav, Shikha; Goswami, Hemant N.; Jain, Deepti (2021): The antiactivator FleN uses an allosteric mechanism to regulate σ_{54} -dependent expression of flagellar genes in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Science Advances* 7 (43), eabj1792. DOI: 10.1126/sciadv.abj1792.
- Cheng, Yuan-Yuan; Wu, Chao; Wu, Jia-Yi; Jia, Hui-Ling; Wang, Ming-Yu; Wang, Huan-Yu et al. (2017): FlrA Represses Transcription of the Biofilm-Associated *bpfA* Operon in *Shewanella putrefaciens*. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 83 (4). DOI: 10.1128/AEM.02410-16.
- Chevance, Fabienne F. V.; Hughes, Kelly T. (2008): Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. In: *Nat Rev Microbiol* 6 (6), S. 455–465. DOI: 10.1038/nrmicro1887.
- Cohen, Eli J.; Hughes, Kelly T. (2014): Rod-to-hook transition for extracellular flagellum assembly is catalyzed by the L-ring-dependent rod scaffold removal. In: *J Bacteriol* 196 (13), S. 2387–2395. DOI: 10.1128/JB.01580-14.
- Correa, Nidia E.; Peng, Fen; Klose, Karl E. (2005): Roles of the regulatory proteins FlhF and FlhG in the *Vibrio cholerae* flagellar transcription hierarchy. In: *J Bacteriol* 187 (18), S. 6324–6332. DOI: 10.1128/jb.187.18.6324-6332.2005.
- Craney, Arryn; Hohenauer, Tobias; Xu, Ye; Navani, Naveen Kumar; Li, Yingfu; Nodwell, Justin (2007): A synthetic *luxCDABE* gene cluster optimized for expression in high-GC bacteria. In: *Nucleic Acids Res* 35 (6), e46. DOI: 10.1093/nar/gkm086.
- Crombrugge, B. de; Busby, S.; Buc, H. (1984): Cyclic AMP receptor protein: role in transcription activation. In: *Science* 224 (4651), S. 831–838. DOI: 10.1126/science.6372090.
- Damron, F. Heath; Owings, Joshua P.; Okkotsu, Yuta; Varga, John J.; Schurr, Jill R.; Goldberg, Joanna B. et al. (2012): Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* regulon controlled by the sensor kinase KinB and sigma factor RpoN. In: *J Bacteriol* 194 (6), S. 1317–1330. DOI: 10.1128/JB.06105-11.
- Dasgupta, N.; Arora, S. K.; Ramphal, R. (2000): *fleN*, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *J Bacteriol* 182 (2), S. 357–364. DOI: 10.1128/jb.182.2.357-364.2000.
- Dasgupta, N.; Ramphal, R. (2001): Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *J Bacteriol* 183 (22), S. 6636–6644. DOI: 10.1128/JB.183.22.6636-6644.2001.
- Dasgupta, Nandini; Ferrell, Evan P.; Kanack, Kristen J.; West, Susan E. H.; Ramphal, Reuben (2002): *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is sigma70 dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. In: *J Bacteriol* 184 (19), S. 5240–5250. DOI: 10.1128/JB.184.19.5240-5250.2002.
- Dasgupta, Nandini; Wolfgang, Matthew C.; Goodman, Andrew L.; Arora, Shiwani K.; Jyot, Jeevan; Lory, Stephen; Ramphal, Reuben (2003): A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Molecular Microbiology* 50 (3), S. 809–824. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03740.x.
- Davis, Nicole J.; Cohen, Yaniv; Sanselicio, Stefano; Fumeaux, Coralie; Ozaki, Shogo; Luciano, Jennifer et al. (2013): De- and repolarization mechanism of flagellar morphogenesis during a bacterial cell cycle. In: *Genes Dev.* 27 (18), S. 2049–2062. DOI: 10.1101/gad.222679.113.
- Delalez, Nicolas J.; Wadhams, George H.; Rosser, Gabriel; Xue, Quan; Brown, Mostyn T.; Dobbie, Ian M. et al. (2010): Signal-dependent turnover of the bacterial flagellar switch protein FliM. In: *PNAS* 107 (25), S. 11347–11351. DOI: 10.1073/pnas.1000284107.

- Deme, Justin C.; Johnson, Steven; Vickery, Owen; Aron, Amy; Monkhouse, Holly; Griffiths, Thomas et al. (2020): Structures of the stator complex that drives rotation of the bacterial flagellum. In: *Nat Microbiol* 5 (12), S. 1553–1564. DOI: 10.1038/s41564-020-0788-8.
- Deng, Xian; Gonzalez Llamazares, Andres; Wagstaff, James M.; Hale, Victoria L.; Cannone, Giuseppe; McLaughlin, Stephen H. et al. (2019): The structure of bactofilin filaments reveals their mode of membrane binding and lack of polarity. In: *Nat Microbiol* 4 (12), S. 2357–2368. DOI: 10.1038/s41564-019-0544-0.
- Di Salvo, Marco; Puccio, Simone; Peano, Clelia; Lacour, Stephan; Alifano, Pietro (2019): RhoTermPredict: an algorithm for predicting Rho-dependent transcription terminators based on *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Salmonella enterica* databases. In: *BMC bioinformatics* 20 (1), S. 117. DOI: 10.1186/s12859-019-2704-x.
- Diepold, Andreas; Amstutz, Marlise; Abel, Sören; Sorg, Isabel; Jenal, Urs; Cornelis, Guy R. (2010): Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. In: *The EMBO journal* 29 (11), S. 1928–1940. DOI: 10.1038/emboj.2010.84.
- Diepold, Andreas; Armitage, Judith P. (2015): Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome. In: *Phil. Trans. R. Soc. B* 370 (1679), S. 20150020. DOI: 10.1098/rstb.2015.0020.
- Diepold, Andreas; Wagner, Samuel (2014): Assembly of the bacterial type III secretion machinery. In: *FEMS Microbiology Reviews* 38 (4), S. 802–822. DOI: 10.1111/1574-6976.12061.
- Doetsch, R. N.; Sjoblad, R. D. (1980): Flagellar structure and function in eubacteria. In: *Annu. Rev. Microbiol.* 34 (1), S. 69–108. DOI: 10.1146/annurev.mi.34.100180.000441.
- Dykhuizen, Daniel (2005): Species Numbers in Bacteria. In: *Proceedings. California Academy of Sciences* 56 (6 Suppl 1), S. 62–71.
- Echazarreta, Mylea A.; Klose, Karl E. (2019): *Vibrio* Flagellar Synthesis. In: *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, S. 131. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00131.
- El Andari, Jihad; Altegoer, Florian; Bange, Gert; Graumann, Peter L. (2015): *Bacillus subtilis* Bactofilins Are Essential for Flagellar Hook- and Filament Assembly and Dynamically Localize into Structures of Less than 100 nm Diameter underneath the Cell Membrane. In: *PLOS ONE* 10 (10), e0141546. DOI: 10.1371/journal.pone.0141546.
- Evans, Matthew R.; Fink, Ryan C.; Vazquez-Torres, Andres; Porwollik, Steffen; Jones-Carson, Jessica; McClelland, Michael; Hassan, Hosni M. (2011): Analysis of the ArcA regulon in anaerobically grown *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium*. In: *BMC microbiology* 11, S. 58. DOI: 10.1186/1471-2180-11-58.
- Farnham, P. J.; Platt, T. (1981): Rho-independent termination: dyad symmetry in DNA causes RNA polymerase to pause during transcription *in vitro*. In: *Nucleic Acids Res* 9 (3), S. 563–577. DOI: 10.1093/nar/9.3.563.
- Feng, Lifang; Bi, Weiwei; Chen, Shuai; Zhu, Junli; Liu, Xiaoxiang (2021): Regulatory function of sigma factors RpoS/RpoN in adaptation and spoilage potential of *Shewanella baltica*. In: *Food microbiology* 97, S. 103755. DOI: 10.1016/j.fm.2021.103755.
- Ferreira, Josie L.; Gao, Forson Z.; Rossmann, Florian M.; Nans, Andrea; Brenzinger, Susanne; Hosseini, Rohola et al. (2019): γ -proteobacteria eject their polar flagella under nutrient depletion, retaining flagellar motor relic structures. In: *PLoS biology* 17 (3), e3000165. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000165.
- Fitzgerald, Devon M.; Bonocora, Richard P.; Wade, Joseph T. (2014): Comprehensive mapping of the *Escherichia coli* flagellar regulatory network. In: *PLoS Genet* 10 (10), e1004649. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004649.
- Fraser, Gillian M.; Hughes, Colin (1999): Swarming motility. In: *Current Opinion in Microbiology* 2 (6), S. 630–635. DOI: 10.1016/S1369-5274(99)00033-8.
- Fredrickson, James K.; Zachara, John M.; Kennedy, David W.; Dong, Hailang; Onstott, Tullis C.; Hinman, Nancy W.; Li, Shu Mei (1998): Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium. In: *Geochimica et Cosmochimica Acta* 62 (19-20), S. 3239–3257. DOI: 10.1016/S0016-7037(98)00243-9.

- Fredrickson, James K.; Zachara, John M.; Kennedy, David W.; Duff, Martine C.; Gorby, Yuri A.; Li, Shumei W.; Krupka, Kenneth M. (2000): Reduction of U(VI) in goethite (α -FeOOH) suspensions by a dissimilatory metal-reducing bacterium. In: *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64 (18), S. 3085–3098. DOI: 10.1016/S0016-7037(00)00397-5.
- Gao, Haichun; Wang, Xiaohu; Yang, Zamin K.; Palzkill, Timothy; Zhou, Jizhong (2008): Probing regulon of ArcA in *Shewanella oneidensis* MR-1 by integrated genomic analyses. In: *BMC Genomics* 9 (1), S. 42. DOI: 10.1186/1471-2164-9-42.
- Gao, Rong; Stock, Ann M. (2010): Molecular strategies for phosphorylation-mediated regulation of response regulator activity. In: *Current Opinion in Microbiology* 13 (2), S. 160–167. DOI: 10.1016/j.mib.2009.12.009.
- Gao, Tong; Shi, Miaomiao; Gao, Haichun (2018): Partially Reciprocal Replacement of FlrA and FlrC in Regulation of *Shewanella oneidensis* Flagellar Biosynthesis. In: *Journal of Bacteriology* 200 (7), e00796-17. DOI: 10.1128/JB.00796-17.
- Gao, Tong; Shi, Miaomiao; Ju, Lili; Gao, Haichun (2015): Investigation into FlhFG reveals distinct features of FlhF in regulating flagellum polarity in *Shewanella oneidensis*. In: *Molecular Microbiology* 98 (3), S. 571–585. DOI: 10.1111/mmi.13141.
- Gardel, C. L.; Mekalanos, J. J. (1996): Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. In: *Infection and Immunity* 64 (6), S. 2246–2255. DOI: 10.1128/iai.64.6.2246-2255.1996.
- Gödeke, Julia; Heun, Magnus; Bubendorfer, Sebastian; Paul, Kristina; Thormann, Kai M. (2011): Roles of two *Shewanella oneidensis* MR-1 extracellular endonucleases. In: *Applied and Environmental Microbiology* 77 (15), S. 5342–5351. DOI: 10.1128/AEM.00643-11.
- Goodier, R. I.; Ahmer, B. M. (2001): SirA orthologs affect both motility and virulence. In: *J Bacteriol* 183 (7), S. 2249–2258. DOI: 10.1128/JB.183.7.2249-2258.2001.
- Gralnick, Jeffrey A.; Brown, C. Titus; Newman, Dianne K. (2005): Anaerobic regulation by an atypical Arc system in *Shewanella oneidensis*. In: *Molecular Microbiology* 56 (5), S. 1347–1357. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04628.x.
- Green, Johnathan C. D.; Kahramanoglou, Christina; Rahman, Alamgir; Pender, Alexandra M. C.; Charbonnel, Nicolas; Fraser, Gillian M. (2009): Recruitment of the earliest component of the bacterial flagellum to the old cell division pole by a membrane-associated signal recognition particle family GTP-binding protein. In: *Journal of Molecular Biology* 391 (4), S. 679–690. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.05.075.
- Gulbranson, Connor J.; Ribardo, Deborah A.; Balaban, Murat; Knauer, Carina; Bange, Gert; Hendrixson, David R. (2016): FlhG employs diverse intrinsic domains and influences FlhF GTPase activity to numerically regulate polar flagellar biogenesis in *Campylobacter jejuni*. In: *Molecular Microbiology* 99 (2), S. 291–306. DOI: 10.1111/mmi.13231.
- Gupta, A. (1999): RT-PCR: characterization of long multi-gene operons and multiple transcript gene clusters in bacteria. In: *BioTechniques* 27 (5), 966-70, 972. DOI: 10.2144/99275st04.
- Guttenplan, Sarah B.; Shaw, Sidney; Kearns, Daniel B. (2013): The cell biology of peritrichous flagella in *Bacillus subtilis*. In: *Molecular Microbiology* 87 (1), S. 211–229. DOI: 10.1111/mmi.12103.
- Haddad, A.; Camacho, F.; Durand, P.; Cary, S. C. (1995): Phylogenetic characterization of the epibiotic bacteria associated with the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana*. In: *Appl Environ Microbiol* 61 (5), S. 1679–1687. DOI: 10.1128/aem.61.5.1679-1687.1995.
- Harrison, S. C. (1991): A structural taxonomy of DNA-binding domains. In: *Nature* 353 (6346), S. 715–719. DOI: 10.1038/353715a0.
- Harshey, R. M.; Matsuyama, T. (1994): Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (18), S. 8631–8635. DOI: 10.1073/pnas.91.18.8631.
- Hartmann, Raimo; van Teeseling, Muriel C. F.; Thanbichler, Martin; Drescher, Knut (2020): BacStalk: A comprehensive and interactive image analysis software tool for bacterial cell biology. In: *Molecular Microbiology* 114 (1), S. 140–150. DOI: 10.1111/mmi.14501.
- Hau, Heidi H.; Gralnick, Jeffrey A. (2007): Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. In: *Annu. Rev. Microbiol.* 61, S. 237–258. DOI: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093257.

- Hawley, D. K.; McClure, W. R. (1983): Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. In: *Nucleic Acids Res* 11 (8), S. 2237–2255. DOI: 10.1093/nar/11.8.2237.
- Heimbrook, M. E.; Wang, W. L.; Campbell, G. (1989): Staining bacterial flagella easily. In: *Journal of clinical microbiology* 27 (11), S. 2612–2615. DOI: 10.1128/JCM.27.11.2612-2615.1989.
- Hengge, Regine (2009): Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. In: *Nat Rev Microbiol* 7 (4), S. 263–273. DOI: 10.1038/nrmicro2109.
- Hickman, Jason W.; Harwood, Caroline S. (2008): Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. In: *Molecular Microbiology* 69 (2), S. 376–389. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06281.x.
- Hirano, T.; Yamaguchi, S.; Oosawa, K.; Aizawa, S. (1994): Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. In: *J Bacteriol* 176 (17), S. 5439–5449. DOI: 10.1128/jb.176.17.5439-5449.1994.
- Holt, H. M.; Gahrn-Hansen, B.; Bruun, B. (2005): *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological characteristics. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 11 (5), S. 347–352. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2005.01108.x.
- Homma, Michio; DeRosier, David J.; Macnab, Robert M. (1990): Flagellar hook and hook-associated proteins of *Salmonella typhimurium* and their relationship to other axial components of the flagellum. In: *Journal of Molecular Biology* 213 (4), S. 819–832. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80266-9.
- Hommais, F.; Krin, E.; Laurent-Winter, C.; Soutourina, O.; Malpertuy, A.; Le Caer, J. P. et al. (2001): Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. In: *Molecular Microbiology* 40 (1), S. 20–36. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02358.x.
- Hu, Haidai; Santiveri, Mònica; Wadhwa, Navish; Berg, Howard C.; Erhardt, Marc; Taylor, Nicholas M. I. (2021): Structural basis of torque generation in the bi-directional bacterial flagellar motor. In: *Trends in Biochemical Sciences*. DOI: 10.1016/j.tibs.2021.06.005.
- Hu, Z.; Mukherjee, A.; Pichoff, S.; Lutkenhaus, J. (1999): The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (26), S. 14819–14824. DOI: 10.1073/pnas.96.26.14819.
- Hu, Zonglin; Gogol, Edward P.; Lutkenhaus, Joe (2002): Dynamic assembly of MinD on phospholipid vesicles regulated by ATP and MinE. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (10), S. 6761–6766. DOI: 10.1073/pnas.102059099.
- Hu, Zonglin; Lutkenhaus, Joe (2001): Topological Regulation of Cell Division in *E. coli*. In: *Molecular Cell* 7 (6), S. 1337–1343. DOI: 10.1016/S1097-2765(01)00273-8.
- Hulsen, Tim; Vlieg, Jacob de; Alkema, Wynand (2008): BioVenn - a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. In: *BMC Genomics* 9, S. 488. DOI: 10.1186/1471-2164-9-488.
- Ikeda, Takeshi; Asakura, Sho; Kamiya, Ritsu (1985): “Cap” on the tip of *Salmonella* flagella. In: *Journal of Molecular Biology* 184 (4), S. 735–737. DOI: 10.1016/0022-2836(85)90317-1.
- Inaba, Satoshi; Nishigaki, Takehiko; Takekawa, Norihiro; Kojima, Seiji; Homma, Michio (2017): Localization and domain characterization of the SflA regulator of flagellar formation in *Vibrio alginolyticus*. In: *Genes to Cells* 22 (7), S. 619–627. DOI: 10.1111/gtc.12501.
- Ito, Kenta I.; Nakamura, Shuichi; Toyabe, Shoichi (2021): Cooperative stator assembly of bacterial flagellar motor mediated by rotation. In: *Nat Commun* 12 (1), S. 3218. DOI: 10.1038/s41467-021-23516-y.
- Iuchi, S.; Lin, E. C. (1988): *arcA* (dye), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (6), S. 1888–1892. DOI: 10.1073/pnas.85.6.1888.
- Jeon, Y.; Lee, Y. S.; Han, J. S.; Kim, J. B.; Hwang, D. S. (2001): Multimerization of phosphorylated and non-phosphorylated ArcA is necessary for the response regulator function of the Arc two-component signal transduction system. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (44), S. 40873–40879. DOI: 10.1074/jbc.M104855200.

- Jian, Huahua; Xu, Guanpeng; Gai, Yingbao; Xu, Jun; Xiao, Xiang (2016): The Histone-Like Nucleoid Structuring Protein (H-NS) Is a Negative Regulator of the Lateral Flagellar System in the Deep-Sea Bacterium *Shewanella piezotolerans* WP3. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 82 (8), S. 2388–2398. DOI: 10.1128/AEM.00297-16.
- Jin, Fan; Conrad, Jacinta C.; Gibiansky, Maxsim L.; Wong, Gerard C. L. (2011): Bacteria use type-IV pili to slingshot on surfaces. In: *PNAS* 108 (31), S. 12617–12622. DOI: 10.1073/pnas.1105073108.
- Johnson, Steven; Fong, Yu Hang; Deme, Justin C.; Furlong, Emily J.; Kuhlen, Lucas; Lea, Susan M. (2020): Symmetry mismatch in the MS-ring of the bacterial flagellar rotor explains the structural coordination of secretion and rotation. In: *Nat Microbiol* 5 (7), S. 966–975. DOI: 10.1038/s41564-020-0703-3.
- Johnson, Steven; Furlong, Emily J.; Deme, Justin C.; Nord, Ashley L.; Caesar, Joseph J. E.; Chevance, Fabienne F. V. et al. (2021): Molecular structure of the intact bacterial flagellar basal body. In: *Nat Microbiol* 6 (6), S. 712–721. DOI: 10.1038/s41564-021-00895-y.
- Jung, You-Chul; Lee, Mi-Ae; Kim, Han-Shin; Lee, Kyu-Ho (2021): Role of DegQ in differential stability of flagellin subunits in *Vibrio vulnificus*. In: *NPJ biofilms and microbiomes* 7 (1), S. 32. DOI: 10.1038/s41522-021-00206-7.
- Jutras, Brandon L.; Verma, Ashutosh; Stevenson, Brian (2012): Identification of novel DNA-binding proteins using DNA-affinity chromatography/pull down. In: *Current protocols in microbiology* Chapter 1, Unit1F.1. DOI: 10.1002/9780471729259.mc01f01s24.
- Karlinsky, J. E.; Pease, A. J.; Winkler, M. E.; Bailey, J. L.; Hughes, K. T. (1997): The *flk* gene of *Salmonella typhimurium* couples flagellar P- and L-ring assembly to flagellar morphogenesis. In: *J Bacteriol* 179 (7), S. 2389–2400. DOI: 10.1128/jb.179.7.2389-2400.1997.
- Keseler, Ingrid M.; Collado-Vides, Julio; Santos-Zavaleta, Alberto; Peralta-Gil, Martin; Gama-Castro, Socorro; Muñoz-Rascado, Luis et al. (2011): EcoCyc: a comprehensive database of *Escherichia coli* biology. In: *Nucleic Acids Res* 39 (Database issue), D583-90. DOI: 10.1093/nar/gkq1143.
- Khan, Fazlurrahman; Tabassum, Nazia; Anand, Raksha; Kim, Young-Mog (2020): Motility of *Vibrio* spp.: regulation and controlling strategies. In: *Applied microbiology and biotechnology* 104 (19), S. 8187–8208. DOI: 10.1007/s00253-020-10794-7.
- Kim, J. Mark; Garcia-Alcala, Mayra; Balleza, Enrique; Cluzel, Philippe (2020): Stochastic transcriptional pulses orchestrate flagellar biosynthesis in *Escherichia coli*. In: *Science Advances* 6 (6), eaax0947. DOI: 10.1126/sciadv.aax0947.
- Kim, Y.; Watrud, L. S.; Matin, A. (1995): A carbon starvation survival gene of *Pseudomonas putida* is regulated by sigma 54. In: *J Bacteriol* 177 (7), S. 1850–1859. DOI: 10.1128/jb.177.7.1850-1859.1995.
- Kinoshita, Miki; Namba, Keiichi; Minamino, Tohru (2021): A positive charge region of *Salmonella* Flil is required for ATPase formation and efficient flagellar protein export. In: *Commun Biol* 4 (1), S. 464. DOI: 10.1038/s42003-021-01980-y.
- Kitagawa, Ryo; Takaya, Akiko; Yamamoto, Tomoko (2011): Dual regulatory pathways of flagellar gene expression by ClpXP protease in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. In: *Microbiology* 157 (Pt 11), S. 3094–3103. DOI: 10.1099/mic.0.051151-0.
- Kitaoka, Maya; Nishigaki, Takehiko; Ihara, Kunio; Nishioka, Noriko; Kojima, Seiji; Homma, Michio (2013): A novel dnaJ family gene, sflA, encodes an inhibitor of flagellation in marine *Vibrio* species. In: *J Bacteriol* 195 (4), S. 816–822. DOI: 10.1128/JB.01850-12.
- Klose, K. E.; Mekalanos, J. J. (1998): Distinct roles of an alternative sigma factor during both free-swimming and colonizing phases of the *Vibrio cholerae* pathogenic cycle. In: *Molecular Microbiology* 28 (3), S. 501–520. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00809.x.
- Koch, Matthias K.; McHugh, Colleen A.; Hoiczky, Egbert (2011): BacM, an N-terminally processed bactofilin of *Myxococcus xanthus*, is crucial for proper cell shape. In: *Molecular Microbiology* 80 (4), S. 1031–1051. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07629.x.
- Kojima, Seiji; Terashima, Hiroyuki; Homma, Michio (2020): Regulation of the Single Polar Flagellar Biogenesis. In: *Biomolecules* 10 (4). DOI: 10.3390/biom10040533.

- Kovach, Michael E.; Elzer, Philip H.; Steven Hill, D.; Robertson, Gregory T.; Farris, Michael A.; Roop, R. Martin; Peterson, Kenneth M. (1995): Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. In: *Gene* 166 (1), S. 175–176. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00584-1.
- Kubori, T.; Okumura, M.; Kobayashi, N.; Nakamura, D.; Iwakura, M.; Aizawa, S. I. (1997): Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Bacillus subtilis*. In: *Molecular Microbiology* 24 (2), S. 399–410. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1997.3341714.x.
- Kudo, S.; Magariyama, Y.; Aizawa, S. (1990): Abrupt changes in flagellar rotation observed by laser dark-field microscopy. In: *Nature* 346 (6285), S. 677–680. DOI: 10.1038/346677a0.
- Kuhlen, Lucas; Johnson, Steven; Zeitler, Andreas; Bäurle, Sandra; Deme, Justin C.; Caesar, Joseph J. E. et al. (2020): The substrate specificity switch FlhB assembles onto the export gate to regulate type three secretion. In: *Nat Commun* 11 (1), S. 1296. DOI: 10.1038/s41467-020-15071-9.
- Kühn, Juliane; Briegel, Ariane; Mörschel, Erhard; Kahnt, Jörg; Leser, Katja; Wick, Stephanie et al. (2010): Bactofilins, a ubiquitous class of cytoskeletal proteins mediating polar localization of a cell wall synthase in *Caulobacter crescentus*. In: *The EMBO journal* 29 (2), S. 327–339. DOI: 10.1038/emboj.2009.358.
- Kühn, Marco J.; Schmidt, Felix K.; Eckhardt, Bruno; Thormann, Kai M. (2017): Bacteria exploit a polymorphic instability of the flagellar filament to escape from traps. In: *PNAS* 114 (24), S. 6340–6345. DOI: 10.1073/pnas.1701644114.
- Kühn, Marco J.; Schmidt, Felix K.; Farthing, Nicola E.; Rossmann, Florian M.; Helm, Bina; Wilson, Laurence G. et al. (2018): Spatial arrangement of several flagellins within bacterial flagella improves motility in different environments. In: *Nat Commun* 9 (1), S. 5369. DOI: 10.1038/s41467-018-07802-w.
- Kusumoto, Akiko; Kamisaka, Kenji; Yakushi, Toshiharu; Terashima, Hiroyuki; Shinohara, Akari; Homma, Michio (2006): Regulation of polar flagellar number by the flhF and flhG genes in *Vibrio alginolyticus*. In: *J Biochem* 139 (1), S. 113–121. DOI: 10.1093/jb/mvj010.
- Kusumoto, Akiko; Shinohara, Akari; Terashima, Hiroyuki; Kojima, Seiji; Yakushi, Toshiharu; Homma, Michio (2008): Collaboration of FlhF and FlhG to regulate polar-flagella number and localization in *Vibrio alginolyticus*. In: *Microbiology* 154 (Pt 5), S. 1390–1399. DOI: 10.1099/mic.0.2007/012641-0.
- Kutsukake, K.; Ikebe, T.; Yamamoto, S. (1999): Two novel regulatory genes, fliT and fliz, in the flagellar regulon of *Salmonella*. In: *Genes Genet. Syst.* 74 (6), S. 287–292. DOI: 10.1266/ggs.74.287.
- Kutsukake, K.; Minamino, T.; Yokoseki, T. (1994): Isolation and characterization of FliK-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*. In: *J Bacteriol* 176 (24), S. 7625–7629. DOI: 10.1128/jb.176.24.7625-7629.1994.
- Lackner, Laura L.; Raskin, David M.; Boer, Piet A. J. de (2003): ATP-dependent interactions between *Escherichia coli* Min proteins and the phospholipid membrane *in vitro*. In: *J Bacteriol* 185 (3), S. 735–749. DOI: 10.1128/JB.185.3.735-749.2003.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Lam, Hubert; Schofield, Whitman B.; Jacobs-Wagner, Christine (2006): A landmark protein essential for establishing and perpetuating the polarity of a bacterial cell. In: *Cell* 124 (5), S. 1011–1023. DOI: 10.1016/j.cell.2005.12.040.
- Lam, Kwok-Ho; Lam, Wendy Wai Ling; Wong, Jase Yan-Kit; Chan, Ling-Chim; Kotaka, Masayo; Ling, Thomas Kin-Wah et al. (2013): Structural basis of FliG-FliM interaction in *Helicobacter pylori*. In: *Molecular Microbiology* 88 (4), S. 798–812. DOI: 10.1111/mmi.12222.
- Lassak, Jürgen; Henche, Anna-Lena; Binnenkade, Lucas; Thormann, Kai M. (2010): ArcS, the cognate sensor kinase in an atypical Arc system of *Shewanella oneidensis* MR-1. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (10), S. 3263–3274. DOI: 10.1128/aem.00512-10.
- Leake, Mark C.; Chandler, Jennifer H.; Wadhams, George H.; Bai, Fan; Berry, Richard M.; Armitage, Judith P. (2006): Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes. In: *Nature* 443 (7109), S. 355–358. DOI: 10.1038/nature05135.
- Leal-Morales, Antonio; Pulido-Sánchez, Marta; López-Sánchez, Aroa; Govantes, Fernando (2021): Transcriptional organization and regulation of the *Pseudomonas putida* flagellar system. In: *Environ Microbiol.* DOI: 10.1111/1462-2920.15857.

- Lee, Changhan; Park, Chankyu (2013): Mutations upregulating the *flhDC* operon of *Escherichia coli* K-12. In: *J Microbiol.* 51 (1), S. 140–144. DOI: 10.1007/s12275-013-2212-z.
- Leewenhoek, Anthony (1684): An abstract of a letter from Mr. Anthony Leewenhoek at Delft, dated Sep. 17. 1683. Containing some microscopical observations, about animals in the scurf of the teeth, the substance call'd worms in the nose, the cuticula consisting of scales. In: *Phil. Trans. R. Soc.* 14 (159), S. 568–574. DOI: 10.1098/rstl.1684.0030.
- Lehti, Timo A.; Bauchart, Philippe; Dobrindt, Ulrich; Korhonen, Timo K.; Westerlund-Wikström, Benita (2012): The fimbriae activator MatA switches off motility in *Escherichia coli* by repression of the flagellar master operon *flhDC*. In: *Microbiology* 158 (Pt 6), S. 1444–1455. DOI: 10.1099/mic.0.056499-0.
- Leifson, E. (1960): Atlas of bacterial flagellation. In: *Atlas of bacterial flagellation*.
- Lele, Pushkar P.; Branch, Richard W.; Nathan, Vedhavalli S. J.; Berg, Howard C. (2012): Mechanism for adaptive remodeling of the bacterial flagellar switch. In: *PNAS* 109 (49), S. 20018–20022. DOI: 10.1073/pnas.1212327109.
- Lele, Pushkar P.; Hosu, Basarab G.; Berg, Howard C. (2013): Dynamics of mechanosensing in the bacterial flagellar motor. In: *PNAS* 110 (29), S. 11839–11844. DOI: 10.1073/pnas.1305885110.
- Lemke, Justin J.; Durfee, Tim; Gourse, Richard L. (2009): DksA and ppGpp directly regulate transcription of the *Escherichia coli* flagellar cascade. In: *Molecular Microbiology* 74 (6), S. 1368–1379. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06939.x.
- Leuze, Michael R.; Karpinets, Tatiana V.; Syed, Mustafa H.; Beliaev, Alexander S.; Uberbacher, Edward C. (2012): Binding Motifs in Bacterial Gene Promoters Modulate Transcriptional Effects of Global Regulators CRP and ArcA. In: *Gene regulation and systems biology* 6, S. 93–107. DOI: 10.4137/GRSB.S9357.
- Levitt, M. (1978): How many base-pairs per turn does DNA have in solution and in chromatin? Some theoretical calculations. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (2), S. 640–644. DOI: 10.1073/pnas.75.2.640.
- Li, Hao; Rhodius, Virgil; Gross, Carol; Siggia, Eric D. (2002): Identification of the binding sites of regulatory proteins in bacterial genomes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (18), S. 11772–11777. DOI: 10.1073/pnas.112341999.
- Li, Hui; Sourjik, Victor (2011): Assembly and stability of flagellar motor in *Escherichia coli*. In: *Molecular Microbiology* 80 (4), S. 886–899. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07557.x.
- Li, Xiaofei; Ren, Fangzhe; Cai, Guoqiang; Huang, Pingyu; Chai, Qinwen; Gundogdu, Ozan et al. (2020): Investigating the Role of FlhF Identifies Novel Interactions With Genes Involved in Flagellar Synthesis in *Campylobacter jejuni*. In: *Front. Microbiol.* 11, S. 460. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00460.
- Li, Yuehua; Yan, Junxiang; Guo, Xueqian; Wang, Xiaochen; Liu, Fenxia; Cao, Boyang (2022): The global regulators ArcA and CytR collaboratively modulate *Vibrio cholerae* motility. In: *BMC Microbiol* 22 (1), S. 22. DOI: 10.1186/s12866-022-02435-y.
- Lin, Lin; Osorio Valeriano, Manuel; Harms, Andrea; Søgaard-Andersen, Lotte; Thanbichler, Martin (2017): Bactofilin-mediated organization of the ParABS chromosome segregation system in *Myxococcus xanthus*. In: *Nat Commun* 8 (1), S. 1817. DOI: 10.1038/s41467-017-02015-z.
- Liu, Bing; Gao, Qian; Zhang, Xin; Chen, Huizhen; Zhang, Ying; Sun, Yuehong et al. (2021): CsrA Regulates Swarming Motility and Carbohydrate and Amino Acid Metabolism in *Vibrio alginolyticus*. In: *Microorganisms* 9 (11). DOI: 10.3390/microorganisms9112383.
- Lutkenhaus, Joe (2007): Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. In: *Annu. Rev. Biochem.* 76 (1), S. 539–562. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142652.
- Macnab, Robert M. (2004): Type III flagellar protein export and flagellar assembly. In: *Biochimica et biophysica acta* 1694 (1-3), S. 207–217. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2004.04.005.
- Magariyama, Y.; Sugiyama, S.; Muramoto, K.; Maekawa, Y.; Kawagishi, I.; Imae, Y.; Kudo, S. (1994): Very fast flagellar rotation. In: *Nature* 371 (6500), S. 752. DOI: 10.1038/371752b0.
- Manson, M. D.; Tedesco, P.; Berg, H. C.; Harold, F. M.; van der Drift, C. (1977): A protonmotive force drives bacterial flagella. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (7), S. 3060–3064. DOI: 10.1073/pnas.74.7.3060.

- Martínez-García, Esteban; Nikel, Pablo I.; Chavarría, Max; Lorenzo, Víctor de (2014): The metabolic cost of flagellar motion in *Pseudomonas putida* KT2440. In: *Environ Microbiol* 16 (1), S. 291–303. DOI: 10.1111/1462-2920.12309.
- Matsuyama, Bruno Y.; Krasteva, Petya V.; Baraquet, Claudine; Harwood, Caroline S.; Sondermann, Holger; Navarro, Marcos V. A. S. (2016): Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*. In: *PNAS* 113 (2), E209-18. DOI: 10.1073/pnas.1523148113.
- Mayer, Benjamin; Schwan, Meike; Oviedo-Bocanegra, Luis M.; Bange, Gert; Thormann, Kai M.; Graumann, Peter L. (2021): Dynamics of Bacterial Signal Recognition Particle at a Single Molecule Level. In: *Front. Microbiol.* 12. DOI: 10.3389/fmicb.2021.663747.
- McCarter, L. L. (2001): Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 65 (3), 445-62, table of contents. DOI: 10.1128/MMBR.65.3.445-462.2001.
- McCarter, Linda L. (2004): Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. In: *J Mol Microbiol Biotechnol* 7 (1-2), S. 18–29. DOI: 10.1159/000077866.
- McCarter, Linda L. (2006): Regulation of flagella. In: *Current Opinion in Microbiology* 9 (2), S. 180–186. DOI: 10.1016/j.mib.2006.02.001.
- Meighen, E. A. (1993): Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the *lux* genes. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7 (11), S. 1016–1022. DOI: 10.1096/fasebj.7.11.8370470.
- Meinhardt, H.; Boer, P. A. de (2001): Pattern formation in *Escherichia coli*: a model for the pole-to-pole oscillations of Min proteins and the localization of the division site. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (25), S. 14202–14207. DOI: 10.1073/pnas.251216598.
- Mejía-Almonte, Citlalli; Busby, Stephen J. W.; Wade, Joseph T.; van Helden, Jacques; Arkin, Adam P.; Stormo, Gary D. et al. (2020): Redefining fundamental concepts of transcription initiation in bacteria. In: *Nat Rev Genet* 21 (11), S. 699–714. DOI: 10.1038/s41576-020-0254-8.
- 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*. In: *Journal of Bacteriology* 170 (6), S. 2575–2583. DOI: 10.1128/jb.170.6.2575-2583.1988.
- Minamino, T.; Macnab, R. M. (1999): Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. In: *J Bacteriol* 181 (5), S. 1388–1394. DOI: 10.1128/JB.181.5.1388-1394.1999.
- Minamino, Tohru; Imada, Katsumi (2015): The bacterial flagellar motor and its structural diversity. In: *Trends in Microbiology* 23 (5), S. 267–274. DOI: 10.1016/j.tim.2014.12.011.
- Moisi, Manuel; Jenul, Christian; Butler, Susan M.; New, Aaron; Tutz, Sarah; Reidl, Joachim et al. (2009): A novel regulatory protein involved in motility of *Vibrio cholerae*. In: *J Bacteriol* 191 (22), S. 7027–7038. DOI: 10.1128/JB.00948-09.
- Morimoto, Yusuke V.; Ito, Mariko; Hiraoka, Koichi D.; Che, Yong-Suk; Bai, Fan; Kami-ike, Nobunori et al. (2014): Assembly and stoichiometry of FliF and FliA in *Salmonella* flagellar basal body. In: *Molecular Microbiology* 91 (6), S. 1214–1226. DOI: 10.1111/mmi.12529.
- Morimoto, Yusuke V.; Minamino, Tohru (2021): Architecture and Assembly of the Bacterial Flagellar Motor Complex. In: J. Robin Harris und Jon Marles-Wright (Hg.): *Macromolecular Protein Complexes III: Structure and Function*, Bd. 96. Cham: Springer International Publishing (Subcellular Biochemistry, 96), S. 297–321.
- Mrázek, Jan; Xie, Shaohua (2006): Pattern locator: a new tool for finding local sequence patterns in genomic DNA sequences. In: *Bioinformatics* 22 (24), S. 3099–3100. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl551.
- Mrusek, Devid (2018): Strukturelle und funktionelle Studien zur transkriptionellen Regulation von flagellarer Motilität und Biofilmbildung. Dissertation.
- Mukherjee, Sampriti; Kearns, Daniel B. (2014): The structure and regulation of flagella in *Bacillus subtilis*. In: *Annu. Rev. Genet.* 48 (1), S. 319–340. DOI: 10.1146/annurev-genet-120213-092406.

- Mullis, K. B.; Faloona, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: *Methods Enzymol.* 155, S. 335–350.
- Navarrete, Blanca; Leal-Morales, Antonio; Serrano-Ron, Laura; Sarrió, Marina; Jiménez-Fernández, Alicia; Jiménez-Díaz, Lorena et al. (2019): Transcriptional organization, regulation and functional analysis of *flhF* and *flhN* in *Pseudomonas putida*. In: *PLOS ONE* 14 (3), e0214166. DOI: 10.1371/journal.pone.0214166.
- Naville, Magali; Ghuillot-Gaudeffroy, Adrien; Marchais, Antonin; Gautheret, Daniel (2011): ARNold: a web tool for the prediction of Rho-independent transcription terminators. In: *RNA Biology* 8 (1), S. 11–13. DOI: 10.4161/rna.8.1.13346.
- Nealson, K. H.; Saffarini, D. (1994): Iron and manganese in anaerobic respiration: environmental significance, physiology, and regulation. In: *Annu. Rev. Microbiol.* 48 (1), S. 311–343. DOI: 10.1146/annurev.mi.48.100194.001523.
- Niehus, Eike; Gressmann, Helga; Ye, Fang; Schlapbach, Ralph; Dehio, Michaela; Dehio, Christoph et al. (2004): Genome-wide analysis of transcriptional hierarchy and feedback regulation in the flagellar system of *Helicobacter pylori*. In: *Molecular Microbiology* 52 (4), S. 947–961. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04006.x.
- Nord, A. L.; Pedaci, F. (2020): Mechanisms and Dynamics of the Bacterial Flagellar Motor. In: Guillaume Duménil und Sven van Teeffelen (Hg.): *Physical Microbiology*, Bd. 1267. Cham: Springer International Publishing (Advances in Experimental Medicine and Biology, 1267), S. 81–100.
- Osterman, I. A.; Dikhtyar, Yu Yu; Bogdanov, A. A.; Dontsova, O. A.; Sergiev, P. V. (2015): Regulation of Flagellar Gene Expression in Bacteria. In: *Biochemistry Moscow* 80 (11), S. 1447–1456. DOI: 10.1134/S000629791511005X.
- Pandza, S.; Baetens, M.; Park, C. H.; Au, T.; Keyhan, M.; Matin, A. (2000): The G-protein FlhF has a role in polar flagellar placement and general stress response induction in *Pseudomonas putida*. In: *Molecular Microbiology* 36 (2), S. 414–423. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01859.x.
- Park, Kyung-Tae; Wu, Wei; Lovell, Scott; Lutkenhaus, Joe (2012): Mechanism of the asymmetric activation of the MinD ATPase by MinE. In: *Molecular Microbiology* 85 (2), S. 271–281. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08110.x.
- Partridge, Jonathan D.; Harshey, Rasika M. (2013): More than motility: *Salmonella* flagella contribute to overriding friction and facilitating colony hydration during swarming. In: *J Bacteriol* 195 (5), S. 919–929. DOI: 10.1128/JB.02064-12.
- Paulick, Anja; Delalez, Nicolas J.; Brenzinger, Susanne; Steel, Bradley C.; Berry, Richard M.; Armitage, Judith P.; Thormann, Kai M. (2015): Dual stator dynamics in the *Shewanella oneidensis* MR-1 flagellar motor. In: *Molecular Microbiology* 96 (5), S. 993–1001. DOI: 10.1111/mmi.12984.
- Paulick, Anja; Koerdt, Andrea; Lassak, Jürgen; Huntley, Stuart; Wilms, Ina; Narberhaus, Franz; Thormann, Kai M. (2009): Two different stator systems drive a single polar flagellum in *Shewanella oneidensis* MR-1. In: *Molecular Microbiology* 71 (4), S. 836–850. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06570.x.
- Pecina, Anna; Schwan, Meike; Blagotinsek, Vitan; Rick, Tim; Klüber, Patrick; Leonhard, Tabea et al. (2021): The Stand-Alone PilZ-Domain Protein MotL Specifically Regulates the Activity of the Secondary Lateral Flagellar System in *Shewanella putrefaciens*. In: *Front. Microbiol.* 12, S. 668892. DOI: 10.3389/fmicb.2021.668892.
- Petersen, Blake D.; Liu, Michael S.; Podicheti, Ram; Yang, Albert Ying-Po; Simpson, Chelsea A.; Hemmerich, Chris et al. (2021): The Polar Flagellar Transcriptional Regulatory Network in *Vibrio campbellii* Deviates from Canonical *Vibrio* Species. In: *J Bacteriol* 203 (20), e0027621. DOI: 10.1128/JB.00276-21.
- Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic Acids Res* 29 (9), e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.
- Popp, Philipp F.; Erhardt, Marc (2021): With or without you: crosstalk between cell division and flagellum assembly. In: *Developmental cell* 56 (5), S. 573–574. DOI: 10.1016/j.devcel.2021.02.013.
- Pratt, L. A.; Kolter, R. (1998): Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. In: *Molecular Microbiology* 30 (2), S. 285–293. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.01061.x.

- Prouty, M. G.; Correa, N. E.; Klose, K. E. (2001): The novel sigma⁵⁴- and sigma²⁸-dependent flagellar gene transcription hierarchy of *Vibrio cholerae*. In: *Molecular Microbiology* 39 (6), S. 1595–1609. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02348.x.
- Przemyslaw Grudnik; Gert Bange; Irmgard Sinning (2009): Protein targeting by the signal recognition particle. In: *Biological Chemistry* (8), S. 775–782. Online verfügbar unter <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/bc.2009.102/html>.
- Ramm, Beatrice; Heermann, Tamara; Schwille, Petra (2019): The *E. coli* MinCDE system in the regulation of protein patterns and gradients. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 76 (21), S. 4245–4273. DOI: 10.1007/s00018-019-03218-x.
- Raskin, D. M.; Boer, P. A. de (1999): Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (9), S. 4971–4976. DOI: 10.1073/pnas.96.9.4971.
- Reichenbach, Birte; Göpel, Yvonne; Görke, Boris (2009): Dual control by perfectly overlapping sigma⁵⁴- and sigma⁷⁰- promoters adjusts small RNA GlmY expression to different environmental signals. In: *Molecular Microbiology* 74 (5), S. 1054–1070. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06918.x.
- Rick, Tim; Kreiling, Vanessa; Höing, Alexander; Fiedler, Svenja; Glatter, Timo; Steinchen, Wieland; Hochberg, Georg; Bähre, Heike; Seifert, Roland; Bange, Gert; Knauer, Shirley K.; Graumann, Peter L.; Thormann, Kai M. (2021): A GGDEF domain serves as a spatial on-switch for a phosphodiesterase by direct interaction with a polar landmark protein.
- Rodionov, Dmitry A.; Yang, Chen; Li, Xiaoqing; Rodionova, Irina A.; Wang, Yanbing; Obratzsova, Anna Y. et al. (2010): Genomic encyclopedia of sugar utilization pathways in the *Shewanella* genus. In: *BMC Genomics* 11 (1), S. 494. DOI: 10.1186/1471-2164-11-494.
- Rösch, Thomas C.; Oviedo-Bocanegra, Luis M.; Fritz, Georg; Graumann, Peter L. (2018): SMTracker: a tool for quantitative analysis, exploration and visualization of single-molecule tracking data reveals highly dynamic binding of *B. subtilis* global repressor AbrB throughout the genome. In: *Scientific Reports* 8 (1), S. 15747. DOI: 10.1038/s41598-018-33842-9.
- Rossmann, Florian; Brenzinger, Susanne; Knauer, Carina; Dörrich, Anja K.; Bubendorfer, Sebastian; Ruppert, Ulrike et al. (2015): The role of FlhF and HubP as polar landmark proteins in *Shewanella putrefaciens* CN-32. In: *Molecular Microbiology* 98 (4), S. 727–742. DOI: 10.1111/mmi.13152.
- Rossmann, Florian M.; Rick, Tim; Mrusek, Devid; Sprankel, Lasse; Dörrich, Anja K.; Leonhard, Tabea et al. (2019): The GGDEF Domain of the Phosphodiesterase PdeB in *Shewanella putrefaciens* Mediates Recruitment by the Polar Landmark Protein HubP. In: *J Bacteriol* 201 (7). DOI: 10.1128/jb.00534-18.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. In: *Molecular cloning: a laboratory manual* (Ed. 2).
- Schindelin, Johannes; Arganda-Carreras, Ignacio; Frise, Erwin; Kaynig, Verena; Longair, Mark; Pietzsch, Tobias et al. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. In: *Nat Methods* 9 (7), S. 676–682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
- Schneider, Caroline A.; Rasband, Wayne S.; Eliceiri, Kevin W. (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. In: *Nat Methods* 9 (7), S. 671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089.
- Schuhmacher, Jan S.; Rossmann, Florian; Dempwolff, Felix; Knauer, Carina; Altegoer, Florian; Steinchen, Wieland et al. (2015a): MinD-like ATPase FlhG effects location and number of bacterial flagella during C-ring assembly. In: *PNAS* 112 (10), S. 3092–3097. DOI: 10.1073/pnas.1419388112.
- Schuhmacher, Jan S.; Thormann, Kai M.; Bange, Gert; Albers, Sonja-Verena (2015b): How bacteria maintain location and number of flagella? In: *FEMS Microbiology Reviews* 39 (6), S. 812–822. DOI: 10.1093/femsre/fuv034.
- Schwan, Meike; Blagotinsek, Vitan; Steinchen, Wieland; Mrusek, Devid; Hook, John C.; Rossmann, Florian et al. (2020): An ATP-dependent partner switch links flagellar C-ring assembly with gene expression. In: *PNAS* 117 (34), S. 20826–20835. DOI: 10.1073/pnas.2006470117.
- Semmler, Annalese B. T.; Whitchurch, Cynthia B.; Leech, Andrew J.; Mattick, John S. (2000): Identification of a novel gene, *fimV*, involved in twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Microbiology* 146 (Pt 6), S. 1321–1332. DOI: 10.1099/00221287-146-6-1321.

- Shao, Wenjun; Price, Morgan N.; Deutschbauer, Adam M.; Romine, Margaret F.; Arkin, Adam P. (2014): Conservation of transcription start sites within genes across a bacterial genus. In: *mBio* 5 (4), e01398-14. DOI: 10.1128/mBio.01398-14.
- Shi, Miaomiao; Gao, Tong; Ju, Lili; Yao, Yanlai; Gao, Haichun (2014): Effects of FlrBC on flagellar biosynthesis of *Shewanella oneidensis*. In: *Molecular Microbiology* 93 (6), S. 1269–1283. DOI: 10.1111/mmi.12731.
- Shi, W.; Zhou, Y.; Wild, J.; Adler, J.; Gross, C. A. (1992): DnaK, DnaJ, and GrpE are required for flagellum synthesis in *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 174 (19), S. 6256–6263. DOI: 10.1128/jb.174.19.6256-6263.1992.
- Shin, S.; Park, C. (1995): Modulation of flagellar expression in *Escherichia coli* by acetyl phosphate and the osmoregulator OmpR. In: *J Bacteriol* 177 (16), S. 4696–4702. DOI: 10.1128/jb.177.16.4696-4702.1995.
- Shinoda, S.; Okamoto, K. (1977): Formation and function of *Vibrio parahaemolyticus* lateral flagella. In: *J Bacteriol* 129 (3), S. 1266–1271. DOI: 10.1128/jb.129.3.1266-1271.1977.
- Sievers, Fabian; Wilm, Andreas; Dineen, David; Gibson, Toby J.; Karplus, Kevin; Li, Weizhong et al. (2011): Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. In: *Molecular Systems Biology* 7 (1), S. 539. DOI: 10.1038/msb.2011.75.
- Siwach, Manisha; Kumar, Lokesh; Palani, Saravanan; Muraleedharan, Samada; Panis, Gaël; Fumeaux, Coralie et al. (2021): An organelle-tethering mechanism couples flagellation to cell division in bacteria. In: *Developmental cell* 56 (5), 657-670.e4. DOI: 10.1016/j.devcel.2021.01.013.
- Skerker, J. M.; Berg, H. C. (2001): Direct observation of extension and retraction of type IV pili. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (12), S. 6901–6904. DOI: 10.1073/pnas.121171698.
- Sockett, H.; Yamaguchi, S.; Kihara, M.; Irikura, V. M.; Macnab, R. M. (1992): Molecular analysis of the flagellar switch protein FlIM of *Salmonella typhimurium*. In: *J Bacteriol* 174 (3), S. 793–806. DOI: 10.1128/jb.174.3.793-806.1992.
- Song, Wenjie; Maiste, Paul J.; Naiman, Daniel Q.; Ward, Mandy J. (2007): Sigma 28 promoter prediction in members of the Gammaproteobacteria. In: *FEMS microbiology letters* 271 (2), S. 222–229. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00720.x.
- Sorenson, Margareta K.; Ray, Soumya S.; Darst, Seth A. (2004): Crystal Structure of the Flagellar σ /Anti- σ Complex σ 28/FlgM Reveals an Intact σ Factor in an Inactive Conformation. In: *Molecular Cell* 14 (1), S. 127–138. DOI: 10.1016/s1097-2765(04)00150-9.
- Sourjik, Victor; Wingreen, Ned S. (2012): Responding to chemical gradients: bacterial chemotaxis. In: *Current Opinion in Cell Biology* 24 (2), S. 262–268. DOI: 10.1016/j.ceb.2011.11.008.
- Soutourina, Olga A.; Bertin, Philippe N. (2003): Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. In: *FEMS Microbiology Reviews* 27 (4), S. 505–523. DOI: 10.1016/S0168-6445(03)00064-0.
- Sperandio, Vanessa; Torres, Alfredo G.; Kaper, James B. (2002): Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. In: *Molecular Microbiology* 43 (3), S. 809–821. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02803.x.
- Spormann, A. M. (1999): Gliding motility in bacteria: insights from studies of *Myxococcus xanthus*. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 63 (3), S. 621–641. DOI: 10.1128/MMBR.63.3.621-641.1999.
- Srivastava, Disha; Hsieh, Meng-Lun; Khataokar, Atul; Neiditch, Matthew B.; Waters, Christopher M. (2013): Cyclic di-GMP inhibits *Vibrio cholerae* motility by repressing induction of transcription and inducing extracellular polysaccharide production. In: *Molecular Microbiology* 90 (6), S. 1262–1276. DOI: 10.1111/mmi.12432.
- Su, Tiantian; Liu, Shiheng; Wang, Kang; Chi, Kaikai; Zhu, Deyu; Wei, Tiandi et al. (2015): The REC domain mediated dimerization is critical for FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* to function as a c-di-GMP receptor and flagella gene regulator. In: *Journal of Structural Biology* 192 (1), S. 1–13. DOI: 10.1016/j.jsb.2015.09.002.

- Syed, Khalid Ali; Beyhan, Sinem; Correa, Nidia; Queen, Jessica; Liu, Jirong; Peng, Fen et al. (2009): The *Vibrio cholerae* flagellar regulatory hierarchy controls expression of virulence factors. In: *J Bacteriol* 191 (21), S. 6555–6570. DOI: 10.1128/JB.00949-09.
- Tan, Jiaying; Zhang, Xing; Wang, Xiaofei; Xu, Caihuang; Chang, Shenghai; Wu, Hangjun et al. (2021): Structural basis of assembly and torque transmission of the bacterial flagellar motor. In: *Cell* 184 (10), 2665-2679.e19. DOI: 10.1016/j.cell.2021.03.057.
- Taviti, Ashoka Chary; Beuria, Tushar Kant (2017): MinD directly interacting with FtsZ at the H10 helix suggests a model for robust activation of MinC to destabilize FtsZ polymers. In: *The Biochemical journal* 474 (18), S. 3189–3205. DOI: 10.1042/BCJ20170357.
- Terashima, Hiroyuki; Fukuoka, Hajime; Yakushi, Toshiharu; Kojima, Seiji; Homma, Michio (2006): The *Vibrio* motor proteins, MotX and MotY, are associated with the basal body of Na-driven flagella and required for stator formation. In: *Molecular Microbiology* 62 (4), S. 1170–1180. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05435.x.
- Terashima, Hiroyuki; Hirano, Keiichi; Inoue, Yuna; Tokano, Takaya; Kawamoto, Akihiro; Kato, Takayuki et al. (2020): Assembly mechanism of a supramolecular MS-ring complex to initiate bacterial flagellar biogenesis in *Vibrio* species. In: *J Bacteriol*. DOI: 10.1128/JB.00236-20.
- Terashima, Hiroyuki; Kawamoto, Akihiro; Morimoto, Yusuke V.; Imada, Katsumi; Minamino, Tohru (2017): Structural differences in the bacterial flagellar motor among bacterial species. In: *Biophysics and Physicobiology* 14, S. 191–198. DOI: 10.2142/biophysico.14.0_191.
- Theunissen, Sofie; Smet, Lina de; Dansercoer, Ann; Motte, Bart; Coenye, Tom; van Beeumen, Jozef J. et al. (2010): The 285 kDa Bap/RTX hybrid cell surface protein (SO4317) of *Shewanella oneidensis* MR-1 is a key mediator of biofilm formation. In: *Research in Microbiology* 161 (2), S. 144–152. DOI: 10.1016/j.resmic.2009.12.002.
- Thomason, Maureen K.; Fontaine, Fanette; Lay, Nicholas de; Storz, Gisela (2012): A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in *Escherichia coli*. In: *Molecular Microbiology* 84 (1), S. 17–35. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.07965.x.
- Thormann, Kai M.; Saville, Renée M.; Shukla, Soni; Spormann, Alfred M. (2005): Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. In: *J Bacteriol* 187 (3), S. 1014–1021. DOI: 10.1128/JB.187.3.1014-1021.2005.
- Tiedje, James M. (2002): *Shewanella*-the environmentally versatile genome. In: *Nature biotechnology* 20 (11), S. 1093–1094. DOI: 10.1038/nbt1102-1093.
- Touhami, Ahmed; Jericho, Manfred; Rutenberg, Andrew D. (2006): Temperature dependence of MinD oscillation in *Escherichia coli*: running hot and fast. In: *J Bacteriol* 188 (21), S. 7661–7667. DOI: 10.1128/JB.00911-06.
- Treuner-Lange, Anke; Søgaard-Andersen, Lotte (2014): Regulation of cell polarity in bacteria. In: *Journal of Cell Biology* 206 (1), S. 7–17. DOI: 10.1083/jcb.201403136.
- van Amsterdam, Karin; van der Ende, Arie (2004): *Helicobacter pylori* HP1034 (ylxH) is required for motility. In: *Helicobacter* 9 (5), S. 387–395. DOI: 10.1111/j.1083-4389.2004.00268.x.
- Venkateswaran, K.; Moser, D. P.; Dollhopf, M. E.; Lies, D. P.; Saffarini, D. A.; MacGregor, B. J. et al. (1999): Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. In: *International journal of systematic bacteriology* 49 Pt 2, S. 705–724. DOI: 10.1099/00207713-49-2-705.
- Wadhwa, Navish; Berg, Howard C. (2021): Bacterial motility: machinery and mechanisms. In: *Nat Rev Microbiol*, S. 1–13. DOI: 10.1038/s41579-021-00626-4.
- Watanabe, Seiya; Shimada, Naoko; Tajima, Kunihiko; Kodaki, Tsutomu; Makino, Keisuke (2006): Identification and characterization of L-arabonate dehydratase, L-2-Keto-3-deoxyarabonate dehydratase, and L-arabinolactonase involved in an alternative pathway of L-arabinose metabolism: Novel evolutionary insight into sugar metabolism. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (44), S. 33521–33536. DOI: 10.1074/jbc.M606727200.
- Welch, M.; Oosawa, K.; Aizawa, S.; Eisenbach, M. (1993): Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (19), S. 8787–8791. DOI: 10.1073/pnas.90.19.8787.

- Williams, A. W.; Yamaguchi, S.; Togashi, F.; Aizawa, S. I.; Kawagishi, I.; Macnab, R. M. (1996): Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. In: *J Bacteriol* 178 (10), S. 2960–2970. DOI: 10.1128/jb.178.10.2960-2970.1996.
- Wu, Chao; Cheng, Yuan-Yuan; Yin, Hao; Song, Xiang-Ning; Li, Wen-Wei; Zhou, Xian-Xuan et al. (2013): Oxygen promotes biofilm formation of *Shewanella putrefaciens* CN32 through a diguanylate cyclase and an adhesin. In: *Scientific Reports* 3 (1), S. 1945. DOI: 10.1038/srep01945.
- Wu, J.; Newton, A. (1997): Regulation of the *Caulobacter* flagellar gene hierarchy; not just for motility. In: *Molecular Microbiology* 24 (2), S. 233–239. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1997.3281691.x.
- Wu, Lin; Wang, Jixuan; Tang, Peng; Chen, Haijiang; Gao, Haichun (2011a): Genetic and molecular characterization of flagellar assembly in *Shewanella oneidensis*. In: *PLOS ONE* 6 (6), e21479. DOI: 10.1371/journal.pone.0021479.
- Wu, Wei; Park, Kyung-Tae; Holyoak, Todd; Lutkenhaus, Joe (2011b): Determination of the structure of the MinD-ATP complex reveals the orientation of MinD on the membrane and the relative location of the binding sites for MinE and MinC. In: *Molecular Microbiology* 79 (6), S. 1515–1528. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07536.x.
- Xie, Peilu; Wang, Jiahao; Liang, Huihui; Gao, Haichun (2021): *Shewanella oneidensis arcA* Mutation Impairs Aerobic Growth Mainly by Compromising Translation. In: *Life (Basel, Switzerland)* 11 (9). DOI: 10.3390/life11090926.
- Yakhnin, Alexander V.; Baker, Carol S.; Vakulskas, Christopher A.; Yakhnin, Helen; Berezin, Igor; Romeo, Tony; Babitzke, Paul (2013): CsrA activates *flhDC* expression by protecting *flhDC* mRNA from RNase E-mediated cleavage. In: *Molecular Microbiology* 87 (4), S. 851–866. DOI: 10.1111/mmi.12136.
- Yamaguchi, S.; Aizawa, S.; Kihara, M.; Isomura, M.; Jones, C. J.; Macnab, R. M. (1986): Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*. In: *J Bacteriol* 168 (3), S. 1172–1179. DOI: 10.1128/jb.168.3.1172-1179.1986.
- Yamaichi, Yoshiharu; Bruckner, Raphael; Ringgaard, Simon; Möll, Andrea; Cameron, D. Ewen; Briegel, Ariane et al. (2012): A multidomain hub anchors the chromosome segregation and chemotactic machinery to the bacterial pole. In: *Genes Dev.* 26 (20), S. 2348–2360. DOI: 10.1101/gad.199869.112.
- Yokota, Takeshi; Gots, Joseph S. (1970): Requirement of adenosine 3', 5'-cyclic phosphate for flagella formation in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. In: *J Bacteriol* 103 (2), S. 513–516. DOI: 10.1128/jb.103.2.513-516.1970.
- Yonekura, Koji; Maki-Yonekura, Saori; Namba, Keiichi (2003): Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. In: *Nature* 424 (6949), S. 643–650. DOI: 10.1038/nature01830.
- Young, Briana M.; Young, Glenn M. (2002): YpIA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*. In: *J Bacteriol* 184 (5), S. 1324–1334. DOI: 10.1128/JB.184.5.1324-1334.2002.
- Young, G. M.; Schmiel, D. H.; Miller, V. L. (1999): A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (11), S. 6456–6461. DOI: 10.1073/pnas.96.11.6456.
- Yuan, Junhua; Berg, Howard C. (2013): Ultrasensitivity of an adaptive bacterial motor. In: *Journal of Molecular Biology* 425 (10), S. 1760–1764. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.02.016.
- Zhang, X.; Chaney, M.; Wigneshweraraj, Siva R.; Schumacher, J.; Bordes, P.; Cannon, W.; Buck, M. (2002): Mechanochemical ATPases and transcriptional activation. In: *Molecular Microbiology* 45 (4), S. 895–903. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.03065.x.
- Zhou, Huaijin; Lutkenhaus, Joe (2003): Membrane binding by MinD involves insertion of hydrophobic residues within the C-terminal amphipathic helix into the bilayer. In: *J Bacteriol* 185 (15), S. 4326–4335. DOI: 10.1128/JB.185.15.4326-4335.2003.
- Zhu, Shiwei; Nishikino, Tatsuro; Hu, Bo; Kojima, Seiji; Homma, Michio; Liu, Jun (2017): Molecular architecture of the sheathed polar flagellum in *Vibrio alginolyticus*. In: *PNAS* 114 (41), S. 10966–10971. DOI: 10.1073/pnas.1712489114.

Zhu, Shiwei; Nishikino, Tatsuro; Kojima, Seiji; Homma, Michio; Liu, Jun (2018): The *Vibrio* H-Ring Facilitates the Outer Membrane Penetration of the Polar Sheathed Flagellum. In: *J Bacteriol* 200 (21). DOI: 10.1128/JB.00387-18.

9 Anhang

Tab. S 1: Signifikant veränderte mRNA-Mengen in *S. putrefaciens* $\Delta flrA$, $\Delta rpoN$ und $\Delta fliA$ im Vergleich zum WT. Angegeben sind die \log_2 -fachen Veränderungen (\log_2 FC) sowie der p -Wert von der RNA-Sequenzierung.

Locus	$\Delta flrA$ vs WT		$\Delta rpoN$ vs WT		$\Delta fliA$ vs WT	
	\log_2 FC	p -Wert	\log_2 FC	p -Wert	\log_2 FC	p -Wert
Sputcn32_0012			-1,01	1,69E-04		
Sputcn32_0013			-1,06	1,18E-07		
Sputcn32_0026	1,33	4,53E-25				
Sputcn32_0027	1,17	1,82E-23				
Sputcn32_0040			1,12	1,66E-25		
Sputcn32_0041	1,25	5,33E-25				
Sputcn32_0042	1,06	7,87E-05				
Sputcn32_0055			-1,03	1,20E-06		
Sputcn32_0078			-1,33	5,68E-11		
Sputcn32_0079			-1,55	1,02E-15		
Sputcn32_0080			-1,62	1,45E-18	-1,18	1,08E-10
Sputcn32_0085	1,30	3,25E-05	-1,36	2,51E-04	1,34	2,23E-05
Sputcn32_0086	1,08	1,05E-12	-1,84	1,67E-27	1,04	7,34E-12
Sputcn32_0087			-1,18	7,65E-26		
Sputcn32_0089	1,01	9,79E-05				
Sputcn32_0090			1,08	3,18E-27		
Sputcn32_0092			-1,00	9,20E-06		
Sputcn32_0105					1,27	5,10E-10
Sputcn32_0106	1,13	7,02E-08			1,41	2,08E-11
Sputcn32_0123			1,53	1,21E-17		
Sputcn32_0132			1,26	9,08E-29		
Sputcn32_0134			-1,55	9,85E-32	-2,32	1,22E-65
Sputcn32_0141			-4,54	1,45E-28		
Sputcn32_0149			2,49	1,03E-35		
Sputcn32_0150	-1,19	1,32E-11	1,67	5,65E-22		
Sputcn32_0151			1,49	4,22E-32		
Sputcn32_0162			1,00	1,80E-10		
Sputcn32_0168			1,04	7,41E-13		
Sputcn32_0169			1,09	2,11E-03		
Sputcn32_0186			1,94	5,81E-23		
Sputcn32_0193			-1,21	9,96E-24		
Sputcn32_0195			-1,15	2,53E-09		
Sputcn32_0196			-1,69	1,44E-12		
Sputcn32_0197			-1,14	5,50E-13		
Sputcn32_0221			-1,19	1,42E-08		
Sputcn32_0222			-1,67	2,19E-14		
Sputcn32_0223			-1,17	1,61E-12		
Sputcn32_0224			-1,26	1,78E-03		
Sputcn32_0227			1,19	7,48E-21		
Sputcn32_0229			-1,20	1,25E-13		
Sputcn32_0248			1,61	3,57E-10		

Locus	$\Delta flrA$ vs WT		$\Delta rpoN$ vs WT		$\Delta fliA$ vs WT	
	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert
Sputcn32_0249			1,28	1,36E-11		
Sputcn32_0254			1,19	7,17E-07		
Sputcn32_0259			2,01	5,42E-16		
Sputcn32_0260			1,85	4,73E-10		
Sputcn32_0261			1,47	3,78E-18		
Sputcn32_0262			1,54	8,95E-13		
Sputcn32_0263			1,07	6,19E-06		
Sputcn32_0270			1,11	3,95E-14		
Sputcn32_0271			1,11	4,93E-09		
Sputcn32_0272			1,34	5,26E-06		
Sputcn32_0282			2,63	9,55E-39		
Sputcn32_0283	-1,12	1,63E-13	2,11	5,15E-46		
Sputcn32_0284	-1,36	1,31E-13	2,32	2,09E-41		
Sputcn32_0285			1,17	2,61E-16		
Sputcn32_0313	1,21	3,47E-02	1,45	1,12E-02	1,29	2,59E-02
Sputcn32_0325					1,54	3,82E-25
Sputcn32_0330					2,05	3,76E-65
Sputcn32_0331			1,46	1,93E-07		
Sputcn32_0332			1,44	1,10E-07		
Sputcn32_0333			1,08	4,62E-19		
Sputcn32_0334					-1,05	1,35E-06
Sputcn32_0335			-1,44	1,52E-15		
Sputcn32_0336			-1,79	3,80E-38		
Sputcn32_0337			-2,20	4,93E-50		
Sputcn32_0338			-2,58	1,87E-53		
Sputcn32_0339			-1,82	1,95E-30		
Sputcn32_0340			-2,01	3,05E-51		
Sputcn32_0341			-2,12	3,88E-45		
Sputcn32_0342			-2,42	2,11E-17		
Sputcn32_0345			-1,73	8,00E-26		
Sputcn32_0347			1,35	3,43E-19		
Sputcn32_0351			1,15	1,21E-03		
Sputcn32_0352			1,26	6,93E-10		
Sputcn32_0353			1,50	1,33E-08		
Sputcn32_0354			1,40	2,10E-17		
Sputcn32_0357			-1,25	1,74E-08		
Sputcn32_0364			-1,36	2,37E-04		
Sputcn32_0401	1,67	4,93E-25			2,07	1,13E-37
Sputcn32_0412			-2,04	1,41E-73		
Sputcn32_0413			1,56	1,24E-14		
Sputcn32_0414			-1,39	1,49E-23		
Sputcn32_0426			-1,59	4,53E-06		
Sputcn32_0458			1,15	5,88E-12		
Sputcn32_0463			1,11	1,64E-12		
Sputcn32_0477			-1,44	2,97E-03	-1,50	2,49E-03
Sputcn32_0509			3,36	5,41E-35	1,38	1,34E-06
Sputcn32_0524			1,24	9,38E-08		

Locus	$\Delta flrA$ vs WT		$\Delta rpoN$ vs WT		$\Delta flhA$ vs WT	
	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert
Sputcn32_0526			-1,62	4,01E-21		
Sputcn32_0527			-1,21	1,67E-06		
Sputcn32_0528			-1,59	1,12E-20		
Sputcn32_0529	1,25	1,53E-07	-1,53	1,56E-10		
Sputcn32_0536			-1,66	4,40E-05		
Sputcn32_0541			1,64	1,16E-19		
Sputcn32_0543			1,99	3,87E-41	1,51	2,52E-24
Sputcn32_0544			-1,12	3,27E-22		
Sputcn32_0553			1,60	1,16E-19	1,16	6,28E-11
Sputcn32_0587			1,64	2,44E-17		
Sputcn32_0597			1,33	1,47E-04		
Sputcn32_0599			1,74	1,86E-18		
Sputcn32_0602			1,51	1,27E-06		
Sputcn32_0603					1,18	1,77E-15
Sputcn32_0604			-3,30	4,77E-15	-1,28	1,03E-04
Sputcn32_0612			1,27	3,88E-12		
Sputcn32_0616			1,50	2,00E-15		
Sputcn32_0617			1,93	1,52E-19		
Sputcn32_0618			1,36	8,87E-08		
Sputcn32_0631			-1,47	6,60E-08		
Sputcn32_0632			-1,07	2,73E-15		
Sputcn32_0637			2,17	8,08E-100		
Sputcn32_0646			-1,14	5,18E-22		
Sputcn32_0647			-1,45	1,72E-38	-1,07	1,60E-21
Sputcn32_0648			-2,06	1,10E-18	-1,36	4,06E-09
Sputcn32_0661			1,38	7,81E-13		
Sputcn32_0662			1,95	1,19E-33	-1,21	2,19E-12
Sputcn32_0663			1,71	9,25E-09	-1,30	2,50E-05
Sputcn32_0664			1,01	9,09E-12	-1,16	2,46E-13
Sputcn32_0678			1,23	2,93E-19		
Sputcn32_0685			-1,58	2,36E-56	-1,04	9,33E-26
Sputcn32_0697			1,14	6,30E-15		
Sputcn32_0699			1,30	1,11E-15		
Sputcn32_0700			-2,35	1,74E-25	-1,28	1,51E-08
Sputcn32_0701			-2,43	7,54E-29	-1,62	1,20E-13
Sputcn32_0707			-1,47	4,00E-03		
Sputcn32_0715			-4,61	6,09E-255		
Sputcn32_0737			-1,40	7,30E-14		
Sputcn32_0742			-1,03	4,62E-16		
Sputcn32_0744			1,21	1,43E-08		
Sputcn32_0745			1,41	1,46E-11	1,02	9,78E-07
Sputcn32_0747			1,10	6,20E-05		
Sputcn32_0751	-1,56	5,19E-23				
Sputcn32_0762			-1,21	1,07E-04		
Sputcn32_0763			-1,25	8,80E-04		
Sputcn32_0776			-1,14	3,20E-12		
Sputcn32_0778	-4,00	1,12E-77	-4,63	2,54E-88		

Locus	$\Delta flrA$ vs WT		$\Delta rpoN$ vs WT		$\Delta fliA$ vs WT	
	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert
Sputcn32_0830	1,42	1,91E-32				
Sputcn32_0835			1,31	6,26E-22		
Sputcn32_0849			1,44	2,04E-44		
Sputcn32_0850			1,72	3,00E-53		
Sputcn32_0851	-1,05	3,93E-15	2,14	2,77E-61		
Sputcn32_0852	-1,04	6,35E-15	2,14	5,38E-66		
Sputcn32_0853			2,34	1,89E-66		
Sputcn32_0854			2,54	3,76E-101		
Sputcn32_0861			1,74	1,95E-40		
Sputcn32_0863			2,14	7,28E-68		
Sputcn32_0870			1,53	6,50E-12		
Sputcn32_0871			1,50	2,21E-34		
Sputcn32_0887			1,07	1,12E-18		
Sputcn32_0889			1,02	4,32E-09		
Sputcn32_0895			1,66	4,72E-19		
Sputcn32_0896			2,78	6,52E-45	1,33	8,12E-11
Sputcn32_0905			1,26	1,68E-12		
Sputcn32_0910			1,31	3,96E-11	1,50	3,45E-14
Sputcn32_0914			1,17	2,36E-08		
Sputcn32_0915					1,19	4,97E-03
Sputcn32_0923			1,75	2,48E-03		
Sputcn32_0924			2,14	2,33E-30	1,16	1,37E-09
Sputcn32_0931			-1,04	2,48E-04		
Sputcn32_0956			4,84	2,28E-24	1,84	1,82E-04
Sputcn32_0960	1,09	2,18E-09			1,39	2,76E-14
Sputcn32_0961			-1,11	2,09E-07	1,71	1,69E-18
Sputcn32_0962	1,23	5,26E-18			1,76	3,73E-35
Sputcn32_0963	1,47	8,28E-10			2,12	4,45E-19
Sputcn32_0964	2,44	4,19E-15	-1,16	4,50E-03	3,41	1,70E-28
Sputcn32_0965			-1,09	3,01E-02	1,04	2,16E-02
Sputcn32_0966	1,35	8,34E-23			2,36	4,55E-67
Sputcn32_0967					1,90	5,12E-23
Sputcn32_0968					1,59	3,46E-13
Sputcn32_0969	1,39	2,49E-21	-1,63	2,76E-27		
Sputcn32_0979			1,13	1,03E-10		
Sputcn32_0980			1,12	7,11E-05		
Sputcn32_1000			1,07	3,06E-12		
Sputcn32_1001			-1,44	3,59E-26	-1,10	5,65E-16
Sputcn32_1014			2,29	1,87E-11		
Sputcn32_1024			-1,83	1,58E-29		
Sputcn32_1048			1,38	1,42E-20		
Sputcn32_1049			1,76	1,28E-39		
Sputcn32_1051			5,41	0,00E+00	3,45	4,87E-167
Sputcn32_1056			1,23	1,43E-07		
Sputcn32_1068			-1,17	1,63E-04		
Sputcn32_1074			-1,22	2,72E-15		
Sputcn32_1080			-1,22	3,26E-14		

Locus	$\Delta flrA$ vs WT		$\Delta rpoN$ vs WT		$\Delta flhA$ vs WT	
	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert
Sputcn32_1099			1,40	1,16E-22		
Sputcn32_1100			1,58	6,71E-12		
Sputcn32_1101	1,16	1,25E-20	-1,55	7,39E-34		
Sputcn32_1106			1,20	2,93E-13		
Sputcn32_1108			1,66	6,76E-31		
Sputcn32_1157			1,31	9,26E-30		
Sputcn32_1168			1,15	4,73E-13		
Sputcn32_1169			1,17	3,77E-16		
Sputcn32_1170			1,01	3,55E-13		
Sputcn32_1171			1,08	5,69E-12		
Sputcn32_1180			1,13	1,99E-08		
Sputcn32_1195			2,12	6,10E-60		
Sputcn32_1201			-1,94	3,54E-53	-1,04	3,59E-17
Sputcn32_1226			1,34	3,49E-16		
Sputcn32_1237	1,03	1,50E-11	1,35	1,02E-18	3,96	4,34E-152
Sputcn32_1246			-1,19	2,51E-06		
Sputcn32_1254			1,16	3,29E-13		
Sputcn32_1256			-1,82	7,61E-09		
Sputcn32_1268					-1,30	2,60E-06
Sputcn32_1269					-1,18	8,83E-25
Sputcn32_1274	1,07	1,71E-11				
Sputcn32_1293			-1,07	1,96E-21		
Sputcn32_1294			1,12	5,43E-16		
Sputcn32_1308					1,35	3,67E-20
Sputcn32_1309			1,29	5,91E-22		
Sputcn32_1317	-1,06	7,27E-07	-5,13	6,34E-50	-2,23	8,33E-22
Sputcn32_1318			-1,44	2,04E-07		
Sputcn32_1321					-1,17	1,35E-03
Sputcn32_1322			-1,62	6,43E-11	-1,44	7,51E-09
Sputcn32_1333			-1,67	3,41E-07		
Sputcn32_1365	-2,82	4,86E-34	-3,67	2,58E-44		
Sputcn32_1397			-2,51	4,62E-79	-1,00	1,52E-15
Sputcn32_1398			-3,05	2,63E-64	-1,57	8,19E-19
Sputcn32_1399			-2,70	1,38E-35	-1,56	3,06E-13
Sputcn32_1400			-2,05	1,56E-17	-1,32	3,71E-08
Sputcn32_1401			-1,85	1,30E-28	-1,53	5,00E-20
Sputcn32_1402			-1,59	5,57E-20	-1,43	1,44E-16
Sputcn32_1403			-1,01	3,00E-10	-1,09	1,76E-11
Sputcn32_1408			1,21	6,35E-24		
Sputcn32_1409			1,31	4,48E-12		
Sputcn32_1414			-1,06	6,82E-04		
Sputcn32_1430			-1,54	1,08E-10		
Sputcn32_1452			-1,04	2,97E-06		
Sputcn32_1453			-1,24	3,37E-16		
Sputcn32_1464			-1,13	1,46E-02		
Sputcn32_1469			1,15	7,62E-22		
Sputcn32_1470			1,18	7,57E-06		

Locus	$\Delta flrA$ vs WT		$\Delta rpoN$ vs WT		$\Delta fliA$ vs WT	
	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert
Sputcn32_1471			1,43	2,55E-05		
Sputcn32_1486			1,19	3,87E-09		
Sputcn32_1487			1,04	1,05E-17		
Sputcn32_1502			-1,25	2,38E-26		
Sputcn32_1503			-1,05	1,45E-09		
Sputcn32_1507			-1,44	3,59E-11		
Sputcn32_1515			1,06	2,42E-15		
Sputcn32_1534	1,28	3,78E-05			1,12	4,03E-04
Sputcn32_1537			1,06	2,43E-17		
Sputcn32_1539			-1,69	5,23E-15		
Sputcn32_1545	-1,32	3,67E-20	-1,91	3,89E-39	-1,70	1,95E-31
Sputcn32_1555					1,12	6,81E-04
Sputcn32_1557			1,03	1,21E-21		
Sputcn32_1577			1,04	1,52E-17		
Sputcn32_1584			1,32	6,75E-21		
Sputcn32_1589			-1,49	1,92E-23		
Sputcn32_1590	1,08	1,45E-11			2,09	2,62E-39
Sputcn32_1591					1,01	2,66E-03
Sputcn32_1598			1,57	1,70E-18		
Sputcn32_1599			-1,58	8,15E-14	-1,56	1,46E-13
Sputcn32_1600			1,12	6,67E-13		
Sputcn32_1601	-3,76	2,64E-93	-4,24	4,91E-102	-3,79	2,28E-87
Sputcn32_1621			-1,03	1,39E-04		
Sputcn32_1626			-1,09	6,08E-03		
Sputcn32_1670			-1,54	7,45E-15	-1,10	2,10E-08
Sputcn32_1671			-2,03	2,86E-11		
Sputcn32_1681					1,15	1,77E-04
Sputcn32_1685					-1,08	1,95E-07
Sputcn32_1703			1,07	4,16E-27		
Sputcn32_1713			-2,26	1,24E-30	-1,17	5,51E-10
Sputcn32_1714			-2,20	2,50E-52	-1,34	4,76E-21
Sputcn32_1715			-2,36	1,41E-61	-1,47	1,53E-26
Sputcn32_1716			-2,54	8,94E-32	-1,44	1,84E-11
Sputcn32_1717			-2,63	1,45E-63	-1,62	4,01E-27
Sputcn32_1718			-2,20	2,71E-42	-1,36	1,81E-17
Sputcn32_1719			-2,39	1,90E-22	-1,19	7,65E-07
Sputcn32_1720			-1,20	1,28E-13		
Sputcn32_1734			2,01	7,94E-45		
Sputcn32_1735			1,10	1,35E-10		
Sputcn32_1743			-1,11	1,31E-05		
Sputcn32_1770			-1,13	7,38E-22		
Sputcn32_1774			-1,15	1,65E-16		
Sputcn32_1775			1,01	1,58E-20		
Sputcn32_1802			-1,23	1,49E-09		
Sputcn32_1811			3,42	3,54E-90	1,81	2,76E-26
Sputcn32_1819			-1,83	1,30E-15		
Sputcn32_1820					-1,07	2,21E-15

Locus	$\Delta flrA$ vs WT		$\Delta rpoN$ vs WT		$\Delta fliA$ vs WT	
	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert
Sputcn32_1821					-1,19	1,46E-08
Sputcn32_1826					1,55	4,05E-40
Sputcn32_1827	-1,32	1,16E-09			-1,01	3,31E-06
Sputcn32_1828			1,18	5,21E-22		
Sputcn32_1831			1,29	5,10E-23		
Sputcn32_1839			1,98	2,67E-23		
Sputcn32_1842					1,39	4,96E-14
Sputcn32_1855			1,39	3,22E-10		
Sputcn32_1856	-5,99	1,13E-29	-4,90	3,25E-27	-5,07	3,17E-26
Sputcn32_1864			1,91	6,63E-63		
Sputcn32_1866			3,05	2,10E-157	1,26	1,48E-27
Sputcn32_1867			2,71	2,47E-59	1,93	2,61E-30
Sputcn32_1868			2,80	1,81E-49	2,22	1,06E-31
Sputcn32_1869			2,89	7,47E-41	2,38	6,68E-28
Sputcn32_1873			1,06	1,10E-09		
Sputcn32_1883			1,45	2,07E-06	1,17	1,41E-04
Sputcn32_1885			-1,10	2,15E-22		
Sputcn32_1886			-1,26	5,30E-09		
Sputcn32_1887			-1,30	5,19E-07		
Sputcn32_1889			3,20	8,53E-82	2,23	1,83E-40
Sputcn32_1891			-1,46	1,17E-41	-1,46	1,44E-41
Sputcn32_1892			-1,17	1,69E-07		
Sputcn32_1895			1,46	8,08E-18	1,47	6,67E-18
Sputcn32_1901			-2,77	4,91E-20	-1,04	1,22E-04
Sputcn32_1902			-2,53	4,26E-21		
Sputcn32_1903			-2,02	1,83E-27	-1,04	1,22E-08
Sputcn32_1904			-1,49	2,10E-09		
Sputcn32_1905			-1,19	6,91E-09	-1,13	4,63E-08
Sputcn32_1929			-1,07	2,85E-07		
Sputcn32_1941	1,46	1,03E-30	-1,17	1,60E-17	2,12	1,45E-63
Sputcn32_1948			1,28	9,34E-07		
Sputcn32_1949			1,40	2,39E-13		
Sputcn32_1970			1,29	5,57E-12		
Sputcn32_1972			-1,43	1,83E-21		
Sputcn32_1980			-2,39	6,99E-12	-1,24	2,03E-04
Sputcn32_1981			-2,50	1,77E-31	-1,64	1,99E-15
Sputcn32_1982			-1,25	2,13E-15		
Sputcn32_1988			-1,02	9,94E-11		
Sputcn32_1995			1,83	8,01E-20		
Sputcn32_1998			1,94	5,58E-03		
Sputcn32_1999			2,72	5,95E-74		
Sputcn32_2015			1,42	7,35E-06	1,04	1,03E-03
Sputcn32_2016			1,37	9,34E-09	1,06	9,32E-06
Sputcn32_2017			1,24	6,47E-10		
Sputcn32_2021			1,19	7,45E-08		
Sputcn32_2028			1,05	1,61E-08		
Sputcn32_2030			1,16	1,55E-07		

Locus	$\Delta flrA$ vs WT		$\Delta rpoN$ vs WT		$\Delta fliA$ vs WT	
	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert
Sputcn32_2041			1,00	3,35E-04		
Sputcn32_2042			1,00	3,33E-15		
Sputcn32_2065			1,44	6,64E-10		
Sputcn32_2089	-1,07	3,93E-06			-1,17	5,73E-07
Sputcn32_2106					1,09	4,95E-08
Sputcn32_2107			-1,10	1,56E-03		
Sputcn32_2108			-1,02	1,77E-03		
Sputcn32_2140	1,02	3,44E-16	-2,75	2,28E-98	-1,18	1,41E-20
Sputcn32_2153			1,76	2,63E-17		
Sputcn32_2171			1,04	1,31E-09		
Sputcn32_2211			1,37	6,87E-22		
Sputcn32_2229			-1,19	3,66E-06		
Sputcn32_2238			-1,24	9,58E-28		
Sputcn32_2246			1,29	1,40E-12		
Sputcn32_2264			1,01	9,24E-10		
Sputcn32_2275			-1,02	6,38E-04		
Sputcn32_2287			3,43	6,64E-27		
Sputcn32_2295			1,82	1,59E-19		
Sputcn32_2298			-1,86	4,09E-47	-1,22	2,03E-21
Sputcn32_2299			-2,38	1,50E-93	-1,38	1,40E-32
Sputcn32_2303			1,17	6,92E-04		
Sputcn32_2309			1,59	5,31E-18		
Sputcn32_2330			-1,15	2,77E-02		
Sputcn32_2331			-1,16	1,18E-10		
Sputcn32_2332			-1,02	3,98E-14		
Sputcn32_2334			-1,39	1,14E-36		
Sputcn32_2349			-1,94	7,22E-26		
Sputcn32_2356			-1,02	8,98E-04		
Sputcn32_2359			-1,13	6,93E-03		
Sputcn32_2362	1,01	2,58E-14	-1,44	1,34E-25		
Sputcn32_2363	1,82	6,06E-12	-1,86	1,19E-10		
Sputcn32_2373			-1,53	4,45E-48		
Sputcn32_2376			1,17	4,89E-05		
Sputcn32_2380			-1,00	7,90E-09		
Sputcn32_2381			2,01	8,66E-40		
Sputcn32_2382			1,51	1,99E-32		
Sputcn32_2384			-1,42	2,94E-21		
Sputcn32_2398			1,22	2,75E-19		
Sputcn32_2400			1,07	3,87E-11		
Sputcn32_2411	1,11	2,50E-04	-1,22	5,14E-04		
Sputcn32_2412			-1,07	3,37E-02		
Sputcn32_2422			2,15	3,59E-34		
Sputcn32_2423			2,20	7,71E-14	1,23	4,61E-05
Sputcn32_2456			-1,06	6,83E-09		
Sputcn32_2457	-2,75	9,15E-14	-2,78	1,80E-13		
Sputcn32_2485			1,33	2,67E-08		
Sputcn32_2490			-1,45	1,02E-18	-1,03	3,09E-10

Locus	$\Delta flrA$ vs WT		$\Delta rpoN$ vs WT		$\Delta fliA$ vs WT	
	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert
Sputcn32_2500			-5,21	2,26E-195	-1,45	8,21E-27
Sputcn32_2501			-4,34	4,19E-65		
Sputcn32_2502			-3,11	1,06E-28		
Sputcn32_2510			-1,96	1,66E-24		
Sputcn32_2511			-1,95	3,44E-65		
Sputcn32_2513			-1,24	7,43E-18		
Sputcn32_2514			-1,67	1,37E-24	-1,02	2,60E-10
Sputcn32_2518			1,12	8,78E-14		
Sputcn32_2559					-4,97	2,56E-184
Sputcn32_2562	-1,01	5,14E-14	-1,46	1,68E-26		
Sputcn32_2571	-1,26	1,68E-22	-1,42	9,11E-28		
Sputcn32_2572			-1,16	2,90E-07		
Sputcn32_2576	-1,97	6,96E-48	-2,19	2,95E-57		
Sputcn32_2577	-2,87	2,57E-65	-3,08	1,96E-70		
Sputcn32_2578	-1,46	2,64E-30	-2,36	1,84E-67		
Sputcn32_2579	-1,64	9,90E-29	-2,55	1,03E-59		
Sputcn32_2580	-4,86	6,26E-304				
Sputcn32_2581	-1,29	6,64E-03	-1,48	1,80E-03		
Sputcn32_2582	-1,52	1,63E-34	-1,74	3,09E-44		
Sputcn32_2583	-1,57	2,52E-43	-1,73	5,11E-52	-1,40	1,19E-34
Sputcn32_2584	-2,04	1,71E-34	-2,14	1,12E-37	-1,93	5,36E-31
Sputcn32_2585	-6,05	0,00E+00	-5,73	0,00E+00	-4,33	3,23E-283
Sputcn32_2586	-3,85	1,13E-167	-4,26	2,38E-191		
Sputcn32_2587	-4,07	6,63E-215	-4,40	9,55E-230		
Sputcn32_2588	-3,44	4,03E-106	-3,80	4,81E-117		
Sputcn32_2589	-4,30	3,23E-79	-4,33	1,76E-76		
Sputcn32_2590	-3,82	6,29E-96	-4,18	1,24E-99		
Sputcn32_2591	-4,72	6,10E-49	-4,73	8,36E-46		
Sputcn32_2592	-5,27	9,40E-153	-5,71	1,12E-141		
Sputcn32_2593	-6,63	5,84E-141	-6,07	1,91E-135		
Sputcn32_2594	-3,47	1,99E-204	-3,66	2,47E-219		
Sputcn32_2595	-4,31	2,00E-131	-4,31	3,23E-126		
Sputcn32_2596	-4,55	1,05E-90	-4,24	4,27E-82		
Sputcn32_2597	-5,40	1,79E-82	-5,12	1,90E-76		
Sputcn32_2600			-1,38	3,56E-10		
Sputcn32_2601			-1,01	3,39E-04		
Sputcn32_2602			-1,28	1,32E-07		
Sputcn32_2603	-2,06	1,28E-23	-2,33	3,79E-28		
Sputcn32_2604	-3,06	2,16E-79	-3,13	7,79E-80		
Sputcn32_2605	-2,04	5,89E-45	-3,13	1,23E-83		
Sputcn32_2607	2,00	4,40E-02				
Sputcn32_2611			-1,67	1,64E-21		
Sputcn32_2616			-1,04	6,37E-06		
Sputcn32_2630			-1,53	5,19E-26		
Sputcn32_2648			1,26	4,68E-10		
Sputcn32_2655			1,81	1,60E-37		
Sputcn32_2672	1,67	4,70E-26	-2,73	1,37E-42		

Locus	$\Delta flrA$ vs WT		$\Delta rpoN$ vs WT		$\Delta fliA$ vs WT	
	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert
Sputcn32_2677			1,84	1,70E-30		
Sputcn32_2679	1,49	1,21E-04			2,47	8,72E-11
Sputcn32_2694			-1,24	1,41E-17		
Sputcn32_2704			-1,13	7,27E-03		
Sputcn32_2710			1,20	3,92E-10		
Sputcn32_2711			1,63	7,18E-25		
Sputcn32_2712			1,92	2,75E-12		
Sputcn32_2713			2,15	5,32E-24		
Sputcn32_2714			2,19	1,80E-47		
Sputcn32_2715			2,58	1,08E-66		
Sputcn32_2716			2,45	1,65E-73		
Sputcn32_2717	-2,54	1,43E-23	-3,13	3,82E-30		
Sputcn32_2722			-1,24	7,41E-06		
Sputcn32_2724			1,12	3,72E-14		
Sputcn32_2725			-1,44	1,74E-29	-1,20	3,92E-21
Sputcn32_2727					1,09	1,95E-03
Sputcn32_2728			-1,06	2,42E-11	1,32	1,17E-18
Sputcn32_2729			-1,91	1,04E-16	1,17	7,19E-08
Sputcn32_2733			1,10	3,58E-17		
Sputcn32_2734			1,05	1,36E-08		
Sputcn32_2785	1,02	3,46E-03				
Sputcn32_2792			1,15	8,40E-06	1,01	1,10E-04
Sputcn32_2797			4,36	0,00E+00		
Sputcn32_2802			1,75	2,47E-20		
Sputcn32_2803			1,07	5,96E-04		
Sputcn32_2808			2,01	4,54E-17		
Sputcn32_2811			-1,14	1,74E-03		
Sputcn32_2815			-1,24	4,01E-25		
Sputcn32_2819			2,75	9,49E-139	1,78	5,76E-59
Sputcn32_2820			2,34	1,02E-119	1,17	9,03E-31
Sputcn32_2821			2,03	2,26E-48	1,02	2,39E-13
Sputcn32_2822			2,40	3,66E-64	1,08	4,52E-14
Sputcn32_2823			1,61	2,43E-15	1,45	8,00E-13
Sputcn32_2824			1,96	8,94E-55	1,75	1,37E-43
Sputcn32_2827			1,44	1,32E-15		
Sputcn32_2842	1,25	1,98E-29				
Sputcn32_2843			1,02	7,20E-04		
Sputcn32_2847			1,43	3,39E-19		
Sputcn32_2855			1,57	9,54E-43		
Sputcn32_2867			1,43	6,15E-15		
Sputcn32_2868			1,39	7,36E-11		
Sputcn32_2874	1,06	2,08E-15				
Sputcn32_2881			1,32	2,66E-23		
Sputcn32_2888			-1,12	1,70E-05		
Sputcn32_2893			-1,27	3,92E-19		
Sputcn32_2896			-1,12	2,91E-05		
Sputcn32_2899					1,10	1,75E-03

Locus	$\Delta flrA$ vs WT		$\Delta rpoN$ vs WT		$\Delta fliA$ vs WT	
	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert
Sputcn32_2928			-1,73	1,25E-33	-1,05	7,83E-14
Sputcn32_2929			-1,01	5,52E-13		
Sputcn32_2932			1,47	4,19E-10		
Sputcn32_2939					-1,18	2,82E-09
Sputcn32_2940					-1,09	3,70E-16
Sputcn32_2945			-1,45	6,92E-34	-1,04	1,57E-18
Sputcn32_2946			-1,12	3,46E-07	-1,80	2,31E-16
Sputcn32_2965			1,38	2,79E-19		
Sputcn32_2971			-1,22	3,01E-12		
Sputcn32_2974			-1,16	6,08E-04		
Sputcn32_3009			1,26	2,99E-19		
Sputcn32_3017			-1,02	3,50E-15		
Sputcn32_3025			2,60	4,36E-59		
Sputcn32_3027			1,02	5,67E-05		
Sputcn32_3059	-1,74	3,78E-12	-1,26	3,13E-07	-2,01	1,20E-14
Sputcn32_3097			1,29	2,39E-11		
Sputcn32_3108			1,94	5,03E-25		
Sputcn32_3143			1,58	3,26E-19		
Sputcn32_3147			-3,23	2,28E-100		
Sputcn32_3148			-1,59	3,31E-15	-1,07	1,24E-07
Sputcn32_3149	-1,19	1,15E-09			-1,27	1,09E-10
Sputcn32_3150					-1,22	1,65E-15
Sputcn32_3152			2,56	4,47E-36		
Sputcn32_3175			-2,00	4,84E-20		
Sputcn32_3176			1,10	1,99E-19		
Sputcn32_3181			-1,23	1,60E-14		
Sputcn32_3182			1,26	7,52E-05		
Sputcn32_3187			1,52	1,71E-08		
Sputcn32_3191	1,03	1,28E-05			2,91	1,41E-37
Sputcn32_3192					2,70	9,47E-06
Sputcn32_3209			-1,31	1,59E-10	-1,29	2,92E-10
Sputcn32_3222			-1,20	9,83E-17		
Sputcn32_3227			-1,11	3,52E-16		
Sputcn32_3231	-1,89	1,43E-07	-2,49	8,36E-11	-1,84	6,02E-07
Sputcn32_3245	1,39	1,44E-25	-1,76	2,07E-36		
Sputcn32_3272			1,09	4,38E-05		
Sputcn32_3273			1,01	3,40E-10		
Sputcn32_3294			1,13	7,33E-18		
Sputcn32_3302			2,10	7,54E-88		
Sputcn32_3313			-2,38	3,24E-03		
Sputcn32_3315			1,55	5,10E-17		
Sputcn32_3381			-1,71	2,53E-27		
Sputcn32_3392	2,05	5,09E-35	-1,32	1,48E-12		
Sputcn32_3393			-1,03	1,18E-08		
Sputcn32_3394					1,03	1,00E-04
Sputcn32_3395					1,28	5,57E-18
Sputcn32_3396	1,21	9,88E-06			1,69	6,84E-10

Locus	$\Delta flrA$ vs WT		$\Delta rpoN$ vs WT		$\Delta fliA$ vs WT	
	\log_2 FC	p -Wert	\log_2 FC	p -Wert	\log_2 FC	p -Wert
Sputcn32_3397	1,28	1,47E-03			1,85	3,55E-06
Sputcn32_3402					-1,20	4,29E-08
Sputcn32_3404			-1,08	3,48E-09		
Sputcn32_3433	1,06	3,58E-10				
Sputcn32_3438	-1,03	1,01E-09				
Sputcn32_3439	-1,07	8,73E-27				
Sputcn32_3443			2,15	4,65E-70		
Sputcn32_3444			2,03	1,90E-19		
Sputcn32_3445			-2,04	7,83E-07		
Sputcn32_3446			-3,15	1,29E-15		
Sputcn32_3447			-3,24	1,24E-92		
Sputcn32_3448			-3,75	5,72E-73		
Sputcn32_3449			-4,41	9,63E-126		
Sputcn32_3450			-3,94	2,97E-92		
Sputcn32_3451			-4,55	3,27E-194		
Sputcn32_3452			-4,33	2,18E-134		
Sputcn32_3453			-4,46	3,29E-144		
Sputcn32_3454			-5,35	0,00E+00		
Sputcn32_3455	-1,06	1,98E-15	-6,86	7,88E-295		
Sputcn32_3456	-1,11	5,69E-11	-6,46	2,94E-222		
Sputcn32_3457			-3,41	2,25E-71		
Sputcn32_3458			-3,39	2,11E-124		
Sputcn32_3459			-3,71	1,62E-174		
Sputcn32_3460			-3,58	9,52E-57		
Sputcn32_3461			-3,72	2,22E-154		
Sputcn32_3462			-4,73	9,10E-195		
Sputcn32_3463			-4,91	2,03E-222		
Sputcn32_3464			-4,80	2,36E-100		
Sputcn32_3465			-5,41	0,00E+00		
Sputcn32_3466			-5,88	7,82E-205		
Sputcn32_3467			-6,94	3,44E-114		
Sputcn32_3468			-6,61	7,79E-99		
Sputcn32_3470			-2,69	7,86E-83		
Sputcn32_3471			-2,58	6,90E-87		
Sputcn32_3492			-1,05	1,53E-16		
Sputcn32_3502					1,18	1,45E-13
Sputcn32_3503	1,65	1,38E-18			2,04	1,33E-27
Sputcn32_3510			1,27	1,54E-24		
Sputcn32_3571			-2,10	3,52E-48	-1,47	1,30E-24
Sputcn32_3577			-1,10	4,20E-08		
Sputcn32_3591	1,88	8,51E-80	-2,62	1,57E-150	-1,70	7,25E-65
Sputcn32_3592	1,62	3,15E-50	-1,18	2,23E-25		
Sputcn32_3593	1,59	2,91E-14	-1,72	5,96E-16	-1,23	6,88E-09
Sputcn32_3594	1,63	3,31E-59	-1,87	9,97E-73	-1,37	2,62E-40
Sputcn32_3595	1,45	1,02E-16	-1,71	8,15E-22		
Sputcn32_3596	1,11	1,98E-21	-1,45	1,26E-32		
Sputcn32_3597	1,09	2,44E-14				

Locus	$\Delta flrA$ vs WT		$\Delta rpoN$ vs WT		$\Delta fliA$ vs WT	
	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert
Sputcn32_3610			-1,42	3,79E-12	1,04	1,11E-14
Sputcn32_3622			-1,02	6,52E-03		
Sputcn32_3630			1,17	5,62E-19		
Sputcn32_3631			1,17	1,80E-13		
Sputcn32_3636					1,71	2,06E-32
Sputcn32_3643			-1,02	2,40E-07		
Sputcn32_3644			-1,36	1,58E-12		
Sputcn32_3645			-1,90	1,24E-23		
Sputcn32_3646			-1,82	4,77E-26	-1,29	4,87E-14
Sputcn32_3647			-1,88	3,64E-19	-1,45	4,33E-12
Sputcn32_3655					1,25	1,54E-05
Sputcn32_3663			-1,47	5,13E-17		
Sputcn32_3671					1,29	1,72E-18
Sputcn32_3678					-1,12	2,01E-04
Sputcn32_3679	-1,36	9,27E-14	2,10	4,26E-31		
Sputcn32_3680	-1,45	2,43E-17	1,97	8,06E-35		
Sputcn32_3681	-1,09	9,09E-07	2,37	1,06E-30		
Sputcn32_3682			1,20	2,65E-14		
Sputcn32_3701			-1,55	7,91E-10		
Sputcn32_3702			-1,41	9,74E-04		
Sputcn32_3709			-1,16	4,84E-02		
Sputcn32_3741	-1,09	5,41E-19				
Sputcn32_3750			2,20	1,18E-34	2,04	6,60E-30
Sputcn32_3751			1,69	1,70E-11	1,96	6,65E-15
Sputcn32_3752			1,63	7,66E-15	1,76	5,01E-17
Sputcn32_3753			1,66	1,71E-25	1,86	1,25E-31
Sputcn32_3754			1,61	4,72E-57	1,72	4,13E-65
Sputcn32_3755			1,63	8,78E-24	1,82	2,52E-29
Sputcn32_3756			1,70	1,00E-21	1,80	3,57E-24
Sputcn32_3757			1,89	2,45E-14	1,78	7,34E-13
Sputcn32_3758			1,85	1,63E-64	1,38	8,48E-37
Sputcn32_3759			2,05	3,38E-70	1,22	5,74E-26
Sputcn32_3760			2,06	4,87E-05	1,16	2,21E-02
Sputcn32_3765			1,29	3,96E-13	1,22	7,40E-12
Sputcn32_3766			1,14	3,81E-14		
Sputcn32_3767			1,38	2,70E-09	1,26	4,87E-08
Sputcn32_3768			1,37	7,68E-31	1,29	1,25E-27
Sputcn32_3770			1,09	4,90E-05		
Sputcn32_3771			1,10	8,60E-18		
Sputcn32_3772			1,12	4,61E-15		
Sputcn32_3786			-1,02	2,98E-05		
Sputcn32_3855			-1,23	1,20E-07		
Sputcn32_3857			1,20	2,00E-06	1,06	3,18E-05
Sputcn32_3858			2,92	2,36E-90	1,43	6,62E-22
Sputcn32_3859			1,84	9,59E-36	1,83	4,61E-35
Sputcn32_3860			1,37	2,15E-08	1,83	6,11E-14
Sputcn32_3861			1,25	3,73E-05	1,76	6,13E-09

Locus	$\Delta flrA$ vs WT		$\Delta rpoN$ vs WT		$\Delta fliA$ vs WT	
	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert	\log_2 FC	p-Wert
Sputcn32_3862			1,10	1,43E-13	1,65	5,67E-29
Sputcn32_3863					1,93	3,34E-44
Sputcn32_3875			1,49	2,97E-12	1,35	4,12E-10
Sputcn32_3879			-3,64	3,24E-68		
Sputcn32_3880			-1,93	3,04E-44		
Sputcn32_3893			1,01	2,49E-09		
Sputcn32_3897			1,30	2,49E-19		
Sputcn32_3909			-1,90	1,55E-10		
Sputcn32_3914			1,51	1,63E-21		
Sputcn32_3921	1,66	3,23E-03			1,76	1,89E-03
Sputcn32_3951			1,77	3,22E-35	1,79	6,80E-36
Sputcn32_3952			1,59	1,98E-13	2,18	7,10E-24
Sputcn32_3953					1,26	6,42E-22
Sputcn32_3967			1,18	3,71E-16		
Sputcn32_3980					1,09	3,54E-08
Sputcn32_R0010			1,03	1,79E-04		
Sputcn32_R0084	1,18	3,76E-02				
Sputcn32_R0113					1,11	1,14E-03
Sputcn32_R0114			1,12	8,62E-05		

Tab. S 2: Signifikant veränderte Proteinmengen in *S. putrefaciens* $\Delta flrA$, $\Delta rpoN$ und $\Delta flhA$ im Vergleich zum WT. Angegeben sind die \log_2 -fachen Veränderungen (\log_2 FC) sowie die p -Werte von der Massenspektrometrie. Die Anzahlen der detektierten Peptiden (nb P) sind aufgelistet. Ebenso sind die \log_2 -fachen Veränderungen sowie die korrigierten p -Werte (PadJ) der RNA-Sequenzierung der entsprechenden veränderten Proteine angegeben.

Locus Names	Protein Description	Transkriptom $\Delta flrA$		Proteom $\Delta flrA$		Transkriptom $\Delta rpoN$		Proteom $\Delta rpoN$		Transkriptom $\Delta flhA$		Proteom $\Delta flhA$		nb P
		\log_2 FC	PadJ	\log_2 FC	p -Wert	\log_2 FC	PadJ	\log_2 FC	p -Wert	\log_2 FC	PadJ	\log_2 FC	p -Wert	
Sputcn32_0055	Transport protein	-0,39	5,3	-0,72	6,0E-02	-1,03	51,9	1,80	3,1E-04	-0,75	24,8	0,87	1,7E-01	1
Sputcn32_0335	Formate dehydrogenase gamma subunit	-0,70	28,6	-0,23	7,3E-01	-1,44	137,1	-1,72	1,2E-02	-0,64	25,1	-0,53	4,2E-01	2
Sputcn32_0336	4Fe-4S ferredoxin, iron-sulfur binding domain protein	-0,80	70,2	0,09	9,8E-01	-1,79	359,1	-2,03	9,1E-07	-0,50	27,5	0,24	1,7E-01	7
Sputcn32_0337	Formate dehydrogenase alpha subunit	-0,69	42,3	0,18	7,6E-01	-2,20	476,7	-3,03	3,1E-08	-0,57	30,2	0,25	1,5E-01	31
Sputcn32_0339	Cytoplasmic chaperone TorD family protein	-0,81	51,6	0,30	6,9E-01	-1,82	282,9	-2,00	8,4E-05	-0,42	14,0	0,17	4,0E-01	5
Sputcn32_0340	4Fe-4S ferredoxin, iron-sulfur binding domain protein	-0,84	80,5	0,23	8,0E-01	-2,01	488,8	-2,72	8,5E-05	-0,51	29,6	0,03	4,8E-01	9
Sputcn32_0341	Uncharacterized protein	-0,69	42,1	0,11	8,1E-01	-2,12	428,2	-3,59	2,1E-05	-0,33	10,0	0,24	2,7E-01	4
Sputcn32_0348	Fumarate hydratase class I	0,27	1,5	-0,05	5,3E-01	0,71	20,4	2,60	3,5E-07	0,01	0,1	-0,17	1,3E-01	9
Sputcn32_0354	Fumarate reductase flavoprotein subunit	0,07	0,3	0,04	5,1E-01	1,40	155,2	3,90	3,3E-06	-0,67	30,1	0,30	1,3E-01	5
Sputcn32_0412	Glutamine synthetase	-0,29	12,4	0,07	4,4E-01	-2,04	709,9	-2,02	2,1E-09	0,72	93,2	-0,03	5,7E-01	21
Sputcn32_0452	OmpA/MotB domain protein	-0,16	1,6	-1,20	1,3E-03	-0,81	72,6	-0,43	1,1E-01	-0,46	21,1	0,58	7,1E-02	2
Sputcn32_0557	Uncharacterized protein	0,23	4,3	-0,04	9,8E-01	0,12	3,0	-1,00	2,0E-03	-0,25	6,8	-0,78	4,5E-02	3
Sputcn32_0664	4Fe-4S ferredoxin, iron-sulfur binding domain protein	-0,56	25,4	3,66	8,2E-02	1,01	100,6	3,31	3,4E-02	-1,16	110,6	3,94	3,0E-02	1
Sputcn32_0714	Sigma 54 modulation protein / SSU ribosomal protein S30P	0,08	0,2	-0,09	2,1E-01	-0,96	34,9	-2,20	1,8E-07	-0,40	5,6	0,14	2,3E-01	2
Sputcn32_0715	RpoN, RNA polymerase sigma-54 factor	0,00	0,0	-0,05	8,1E-01	-4,61	2514,5	-2,34	7,7E-09	-0,30	11,4	-0,08	4,3E-01	7
Sputcn32_0728	2OG-Fe(II) oxygenase	0,19	0,8	-1,40	3,0E-01	-0,43	8,4	-2,84	2,3E-02	0,01	0,0	-1,84	5,2E-01	1
Sputcn32_0748	MotX, Sel1 domain protein repeat-containing protein	-0,25	2,9	-0,93	9,2E-03	-0,21	4,8	-0,72	3,1E-03	-0,36	9,0	-1,22	6,9E-04	2
Sputcn32_0932	O-acetylhomoserine/O-acetylserine sulfhydrylase	0,01	0,0	-0,42	1,6E-01	-0,06	0,6	1,32	8,1E-06	0,03	0,2	-0,11	8,3E-01	5
Sputcn32_0960	HmuV, Hemin import ATP-binding protein HmuV	1,09	71,4	-0,77	3,4E-02	-0,34	8,4	-0,29	7,4E-02	1,39	119,4	-1,13	1,8E-04	2
Sputcn32_0967	HuvX, Heme utilization protein HuvX	0,97	50,0	-0,63	3,5E-02	0,25	5,2	-0,65	2,4E-02	1,90	204,4	-1,13	3,7E-03	3
Sputcn32_0969	Lipid A ABC exporter family, fused ATPase and inner membrane subunit	1,39	186,8	-0,36	3,7E-01	-1,63	251,8	-1,34	8,0E-04	-0,14	2,2	-0,55	2,9E-01	3
Sputcn32_1135	Glutamate synthase (NADPH) small subunit	-0,44	5,1	-0,23	5,4E-01	0,31	5,5	1,11	3,2E-04	-0,46	7,1	-0,23	4,3E-01	3
Sputcn32_1191	Intracellular protease, Pfpl family	-0,36	3,1	-0,38	2,9E-02	0,10	1,2	1,31	2,0E-06	-0,72	17,2	0,03	7,3E-01	2
Sputcn32_1295	Porin, Gram-negative type	0,17	0,7	4,05	1,5E-06	-0,82	29,1	-0,97	3,2E-02	0,31	4,2	2,65	1,4E-03	2
Sputcn32_1298	Phosphate binding protein	-0,12	0,6	1,63	5,0E-05	0,10	1,6	0,24	4,7E-01	-0,14	1,6	0,93	2,1E-03	7
Sputcn32_1343	PurU, Formyltetrahydrofolate deformylase	-0,59	25,2	0,20	2,4E-01	0,97	78,6	1,08	3,0E-06	0,94	69,3	0,02	3,4E-01	1
Sputcn32_1516	TonB-dependent receptor	0,14	1,2	0,42	5,2E-02	-0,39	17,5	1,13	2,2E-03	0,04	0,5	-0,29	9,8E-01	20
Sputcn32_1601	MotY, OmpA/MotB domain protein	-3,76	900,2	-3,95	1,2E-08	-4,24	992,0	-3,65	4,8E-10	-3,79	837,4	-3,99	5,3E-07	1
Sputcn32_1706	GCN5-related N-acetyltransferase	-0,07	0,3	0,12	8,5E-01	0,05	0,8	1,03	2,7E-03	-0,13	1,6	0,03	2,8E-01	1
Sputcn32_1827	Methyl-accepting chemotaxis sensory transducer	-1,32	74,0	-2,88	1,0E-02	-0,90	39,7	-4,07	1,5E-03	-1,01	43,4	-4,73	3,0E-04	1
Sputcn32_1902	NapD family protein	-0,17	0,6	-0,55	4,1E-01	-2,53	191,2	-1,38	7,2E-03	-0,89	24,5	-0,29	9,9E-01	2

Locus Names	Protein Description	Transkriptom $\Delta flrA$		Proteom $\Delta flrA$		Transkriptom $\Delta rpoN$		Proteom $\Delta rpoN$		Transkriptom $\Delta fliA$		Proteom $\Delta fliA$		nb P
		log ₂ FC	PadJ	log ₂ FC	p-Wert	log ₂ FC	PadJ	log ₂ FC	p-Wert	log ₂ FC	PadJ	log ₂ FC	p-Wert	
Sputcn32_2500	TRAP dicarboxylate transporter, DctP subunit	0,30	8,4	-0,11	3,7E-01	-5,21	1921,5	-4,13	1,5E-10	-1,45	241,3	-0,18	1,7E-01	13
Sputcn32_2501	Tripartite ATP-independent periplasmic transporter, DctQ component	0,85	50,8	0,17	1,4E-01	-4,34	626,2	-7,58	5,8E-04	-0,47	14,5	-0,10	2,9E-01	1
Sputcn32_2544	RfaH, Transcription antitermination protein RfaH	-0,02	0,1	0,26	5,6E-01	0,12	3,0	-1,86	2,5E-04	0,00	0,0	-1,44	4,3E-03	1
Sputcn32_2559	RNA polymerase sigma factor FliA	-0,52	21,4	-0,50	2,4E-03	-0,26	8,4	-0,47	5,2E-03	-4,97	1802,9	-3,87	9,7E-08	2
Sputcn32_2575	Flagellar motor switch protein FliG	-0,73	50,7	-1,65	1,5E-04	-0,42	20,2	-1,57	2,5E-04	0,07	0,9	-0,39	8,0E-01	5
Sputcn32_2576	Flagellar M-ring protein FliF	-1,97	449,0	-5,33	8,4E-10	-2,19	548,4	-5,05	8,9E-10	0,34	13,8	0,04	2,3E-01	9
Sputcn32_2578	FliC, Two component, sigma54 specific, transcriptional regulator	-1,46	274,7	-5,13	4,0E-08	-2,36	649,5	-4,81	6,1E-09	-0,05	0,7	0,13	5,9E-01	2
Sputcn32_2580	FliA, Sigma54 specific transcriptional regulator, Fis family	-4,86	2999,0	-2,68	1,3E-07	-0,26	13,4	-0,01	8,4E-01	0,02	0,3	0,18	1,8E-01	9
Sputcn32_2581	Flagellar protein FliS	-1,29	12,4	-1,36	6,3E-06	-1,48	22,7	-1,12	2,8E-06	-0,70	4,6	-0,26	5,7E-02	2
Sputcn32_2582	FliT1	-1,52	316,0	-2,02	1,1E-02	-1,74	419,4	-2,46	3,4E-02	-0,61	50,8	-3,51	1,4E-03	1
Sputcn32_2584	Flagellar protein FlaG protein	-2,04	315,9	-4,91	3,3E-07	-2,14	354,4	-4,05	3,0E-09	-1,93	281,7	-4,44	1,1E-07	3
Sputcn32_2585	Flagellin FlaB1	-6,05		-5,43	4,5E-12	-5,73		-5,65	8,0E-14	-4,33	2788,9	-4,57	6,8E-11	9
Sputcn32_2586	Flagellin FlaA1	-3,85	1640,4	-3,94	4,5E-11	-4,26	1882,2	-3,73	4,4E-11	-0,09	1,5	0,50	1,1E-04	4
Sputcn32_2590	Flagellar P-ring protein FliG	-3,82	926,0	-1,58	2,1E-03	-4,18	968,6	-1,73	7,3E-05	0,13	1,9	0,35	2,0E-01	6
Sputcn32_2592	Flagellar basal-body rod protein FlgG	-5,27	1492,0	-5,58	1,7E-05	-5,71	1386,8	-3,60	1,9E-05	0,10	1,5	-0,12	8,7E-01	1
Sputcn32_2594	Flagellar hook protein FlgE	-3,47	2007,0	-5,72	1,8E-09	-3,66	2160,4	-5,65	1,3E-08	-0,09	1,8	-0,28	8,9E-01	8
Sputcn32_2595	Basal-body rod modification protein FlgD	-4,31	1280,0	-3,73	2,9E-07	-4,31	1232,9	-2,80	3,4E-06	0,02	0,2	-0,90	8,6E-02	4
Sputcn32_2600	Flagella basal body P-ring formation protein FlgA	-0,69	17,5	-4,33	3,2E-06	-1,38	85,2	-5,54	2,5E-05	0,23	2,6	0,03	3,7E-01	2
Sputcn32_2603	FlgP	-2,06	209,0	-5,95	3,1E-07	-2,33	260,3	-5,95	2,3E-06	-0,50	12,8	-0,82	4,0E-03	1
Sputcn32_2625	N-acetylneuraminase synthase	-0,59	49,6	-1,04	1,7E-03	-0,39	25,5	-0,16	9,7E-01	-0,17	4,6	-0,08	7,2E-01	6
Sputcn32_2628	DegT/DnrJ/EryC1/StrS aminotransferase	-0,75	55,7	-1,45	5,0E-03	-0,08	1,8	-0,11	6,4E-01	-0,05	0,6	-0,28	9,6E-01	3
Sputcn32_2630	Uncharacterized protein	-0,95	88,3	-1,21	3,4E-03	-1,53	239,3	-1,43	5,2E-04	-0,09	1,2	0,21	8,8E-02	4
Sputcn32_2726	Methyl-accepting chemotaxis sensory transducer with Pas/Pac sensor	-0,12	0,6	0,87	4,1E-04	-0,41	14,8	-1,17	2,2E-04	-0,42	12,6	-0,86	2,8E-02	2
Sputcn32_2735	Aspartate kinase / homoserine dehydrogenase	-0,09	0,3	0,01	9,7E-01	0,86	42,0	1,03	7,7E-06	0,84	35,6	-0,05	1,9E-01	10
Sputcn32_2865	DNA polymerase III, delta subunit	-0,11	1,0	-0,18	1,4E-01	-0,15	4,9	-0,84	1,6E-03	0,07	1,1	-1,28	1,2E-03	2
Sputcn32_3062	CysH, Phosphoadenosine phosphosulfate reductase	-0,16	1,0	-0,91	7,0E-02	-0,53	21,0	-1,60	7,0E-03	0,00	0,0	-1,10	9,0E-02	1
Sputcn32_3063	CysI, Sulfite reductase [NADPH] hemoprotein beta-component	-0,19	1,3	-0,48	2,8E-01	-0,30	7,2	-1,19	1,5E-02	-0,10	1,0	-0,72	2,6E-01	16
Sputcn32_3064	Sulfite reductase [NADPH] flavoprotein alpha-component	-0,05	0,2	-0,73	2,3E-01	-0,18	3,2	-1,68	1,2E-02	0,20	2,3	-1,40	1,8E-01	4
Sputcn32_3136	Curlin associated repeat protein	0,14	0,6	1,91	4,2E-05	-0,54	16,2	2,30	2,3E-04	-0,20	2,3	0,48	8,0E-01	1
Sputcn32_3170	Macrolide export ATP-binding/permease protein MacB	-0,09	0,5	-0,39	4,0E-01	1,00	111,6	-0,34	6,8E-01	0,08	1,0	-1,71	2,2E-02	2
Sputcn32_3448	MotA/TolQ/ExbB proton channel, MotA	-0,51	12,0	-1,88	5,6E-05	-3,75	704,0	-4,73	1,5E-07	0,16	1,8	2,25	1,4E-05	1
Sputcn32_3450	Flagellar basal body-associated protein FliL2	-0,43	16,5	-1,30	8,7E-04	-3,94	895,4	-3,31	1,3E-08	0,49	26,1	1,57	5,4E-06	3
Sputcn32_3452	Uncharacterized protein	-0,62	42,9	-1,37	9,7E-03	-4,33	1314,5	-1,56	4,3E-03	0,34	13,6	2,63	3,3E-04	1
Sputcn32_3453	Flagellar protein FliS	-0,90	80,5	-1,99	8,9E-04	-4,46	1411,9	-3,43	7,6E-07	0,34	11,1	1,92	2,8E-05	1
Sputcn32_3454	Flagellar hook-associated protein 2, FliD	-0,97	127,4	-1,85	4,4E-04	-5,35		-3,45	8,1E-08	-0,03	0,4	1,76	9,4E-06	3

Locus Names	Protein Description	Transkriptom $\Delta flrA$		Proteom $\Delta flrA$		Transkriptom $\Delta rpoN$		Proteom $\Delta rpoN$		Transkriptom $\Delta fljA$		Proteom $\Delta fljA$		nb P
		log ₂ FC	PadJ	log ₂ FC	p-Wert	log ₂ FC	PadJ	log ₂ FC	p-Wert	log ₂ FC	PadJ	log ₂ FC	p-Wert	
Sputcn32_3455	Flagellin FlaB2	-1,06	128,8	-1,09	5,3E-05	-6,86	2912,7	-1,18	1,6E-05	0,07	1,0	2,41	1,5E-06	2
Sputcn32_3456	Flagellin FlaA2	-1,11	86,5	-1,92	8,4E-08	-6,46	2189,2	-2,01	2,3E-09	-0,10	1,1	2,70	1,4E-07	8
Sputcn32_3461	Flagellar P-ring protein, FlgI	-0,65	50,8	-1,90	4,2E-03	-3,72	1513,2	-2,77	3,0E-05	-0,09	1,4	1,59	7,4E-04	4
Sputcn32_3465	Flagellar hook protein FlgE	-0,50	40,2	-1,61	6,4E-03	-5,41		-3,42	6,6E-07	0,25	10,2	1,71	1,1E-04	3
Sputcn32_3466	Basal-body rod modification protein FlgD	-0,77	53,8	-1,71	2,2E-02	-5,88	2015,7	-4,22	9,4E-06	0,32	9,7	1,35	4,6E-03	1
Sputcn32_3471	Uncharacterized protein	-0,75	75,5	-1,08	8,1E-03	-2,58	842,2	-2,14	4,4E-05	-0,10	1,8	2,13	1,9E-05	1
Sputcn32_3473	FliI2, ATPase, FliI/YscN family	-0,66	22,7	-1,90	5,0E-03	-0,20	4,1	-0,33	8,3E-01	0,03	0,3	0,37	1,1E-01	4
Sputcn32_3475	Flagellar motor switch protein FliG	-0,61	68,2	-1,11	2,4E-02	-0,23	12,4	0,33	1,1E-01	0,17	5,3	1,19	6,6E-03	3
Sputcn32_3476	Flagellar M-ring protein FliF2	-0,61	41,0	-1,59	1,2E-03	-0,25	9,6	0,72	5,1E-03	0,39	17,6	1,46	2,7E-04	10
Sputcn32_3481	Flagellar biosynthetic protein FliP	-0,70	10,8	-0,93	3,4E-03	0,05	0,4	0,92	1,0E-03	0,27	2,4	1,24	7,2E-04	1
Sputcn32_3591	BpfA, Putative outer membrane adhesin like proteiin	1,88	766,1	1,74	5,8E-06	-2,62	1474,9	-2,96	3,1E-10	-1,70	615,4	-1,76	2,7E-07	12
Sputcn32_3592	AggC, ABC transporter related	1,62	472,0	1,20	1,7E-06	-1,18	233,2	-3,16	1,5E-09	-0,62	62,6	-2,33	8,3E-06	13
Sputcn32_3593	Type I secretion membrane fusion protein, HlyD family	1,59	118,0	1,02	1,5E-07	-1,72	141,0	-1,61	1,8E-09	-1,23	68,5	-1,36	1,0E-06	9
Sputcn32_3594	AggA, Type I secretion outer membrane protein, TolC family	1,63	561,6	1,32	2,0E-06	-1,87	701,7	-2,80	9,6E-11	-1,37	372,1	-1,70	2,3E-07	18
Sputcn32_3595	OmpA/MotB domain protein	1,45	141,4	1,41	5,2E-07	-1,71	198,2	-2,55	5,6E-10	-0,95	58,3	-1,69	5,4E-07	9
Sputcn32_3597	Diguanylate cyclase/phosphodiesterase	1,09	118,7	0,86	2,0E-05	-0,86	77,4	-1,31	1,8E-06	-0,87	73,8	-0,94	2,1E-04	11
Sputcn32_3643	Transcriptional regulator, GntR family	0,11	0,5	-0,55	5,7E-02	-1,02	58,4	-1,04	1,9E-02	-0,37	7,3	-0,64	3,8E-01	4
Sputcn32_3657	Stress response kinase A, SrkA	0,03	0,2	-0,07	9,5E-01	0,04	1,0	-0,20	3,0E-01	0,03	0,4	-1,12	5,8E-03	1
Sputcn32_3738	50S ribosomal protein L36, RpmJ	-0,83	59,5	0,57	1,2E-01	0,42	18,5	0,50	8,1E-02	0,54	25,5	1,43	1,9E-04	1
Sputcn32_3879	Extracellular solute-binding protein, family 1	-0,90	37,6	0,17	9,4E-01	-3,64	656,9	-3,73	1,6E-04	-0,51	12,2	0,36	2,1E-01	17
Sputcn32_3881	ABC transporter related	-0,35	15,4	0,12	8,9E-01	-0,73	84,7	-2,24	8,2E-04	-0,34	16,7	0,41	1,7E-01	2
Sputcn32_3882	Molybdenum cofactor guanylyltransferase, MobA	-0,04	0,2	-0,04	8,0E-01	-0,33	10,8	-1,32	1,2E-03	-0,20	3,3	0,17	5,5E-01	7

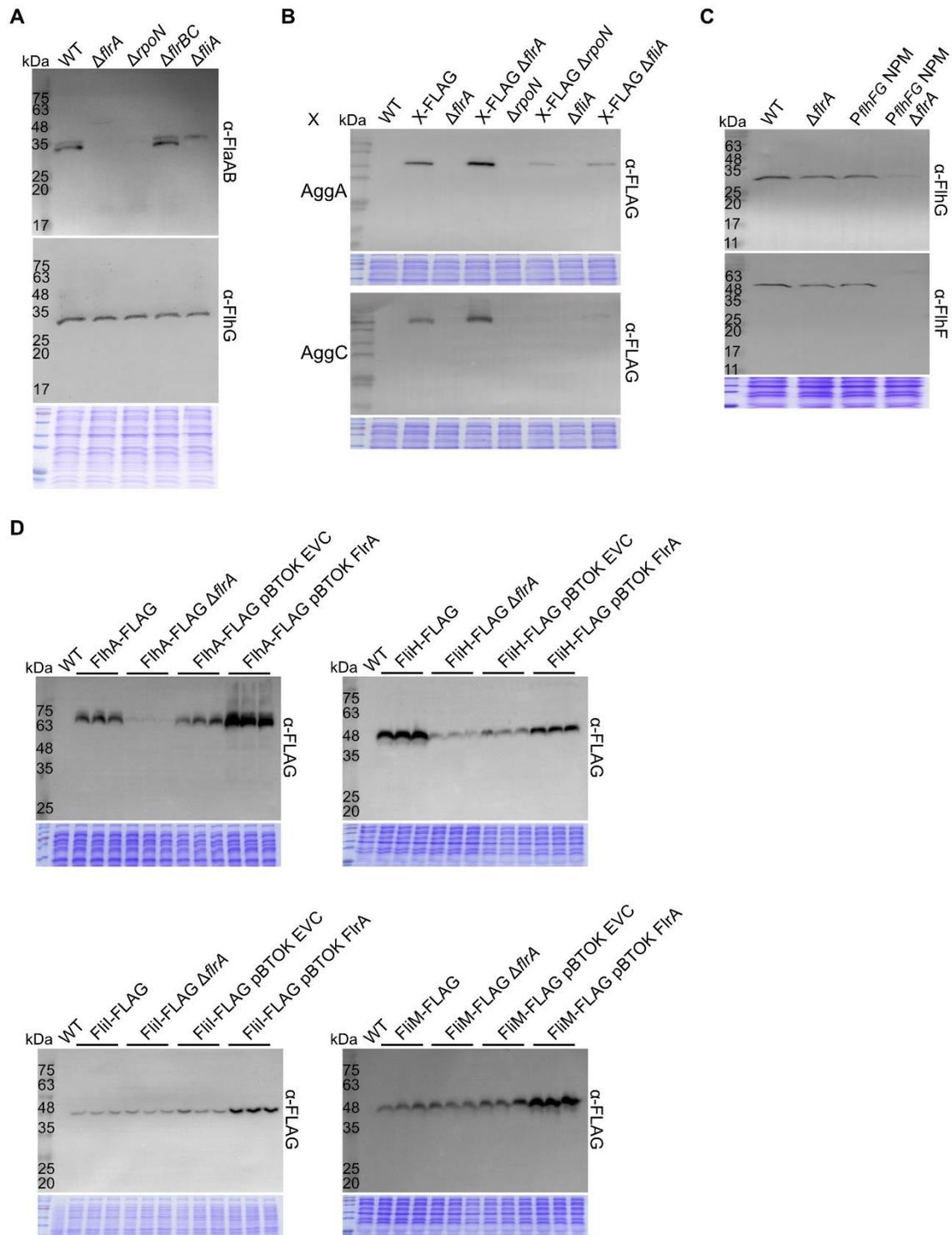


Abb. S 1: Western Blot Analysen. Entsprechende *S. putrefaciens* Stämme wurden mittels einer Immunoblot Analyse untersucht. Als Ladekontrolle dient das Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgel. **A** Bei der oberen Membran wurden mit einem Direktantikörper die polaren Flagelline (α -FlaAB) detektiert. Bei der unteren Membran wurde mit einem Direktantikörper die MinD-ähnliche ATPase FliH (α -FliH) detektiert. **B** Die Membranen wurden mit einem Antikörper gegen die Proteine mit einer FLAG-Fusion (α -FLAG-HRP) inkubiert. **C** Die Membranen wurden mit einem Direktantikörper gegen die MinD-ähnliche ATPase FliH (α -FliH) bzw. die SRP-ähnliche GTPase FliH (α -FliH) inkubiert. **D** Die Membranen wurden mit einem Antikörper gegen die Proteine mit einer FLAG-Fusion (α -FLAG-HRP) inkubiert. Es wurden je biologische Triplikate auf das SDS-Polyacrylamidgel beladen sowie alles als technisches Duplikat durchgeführt.

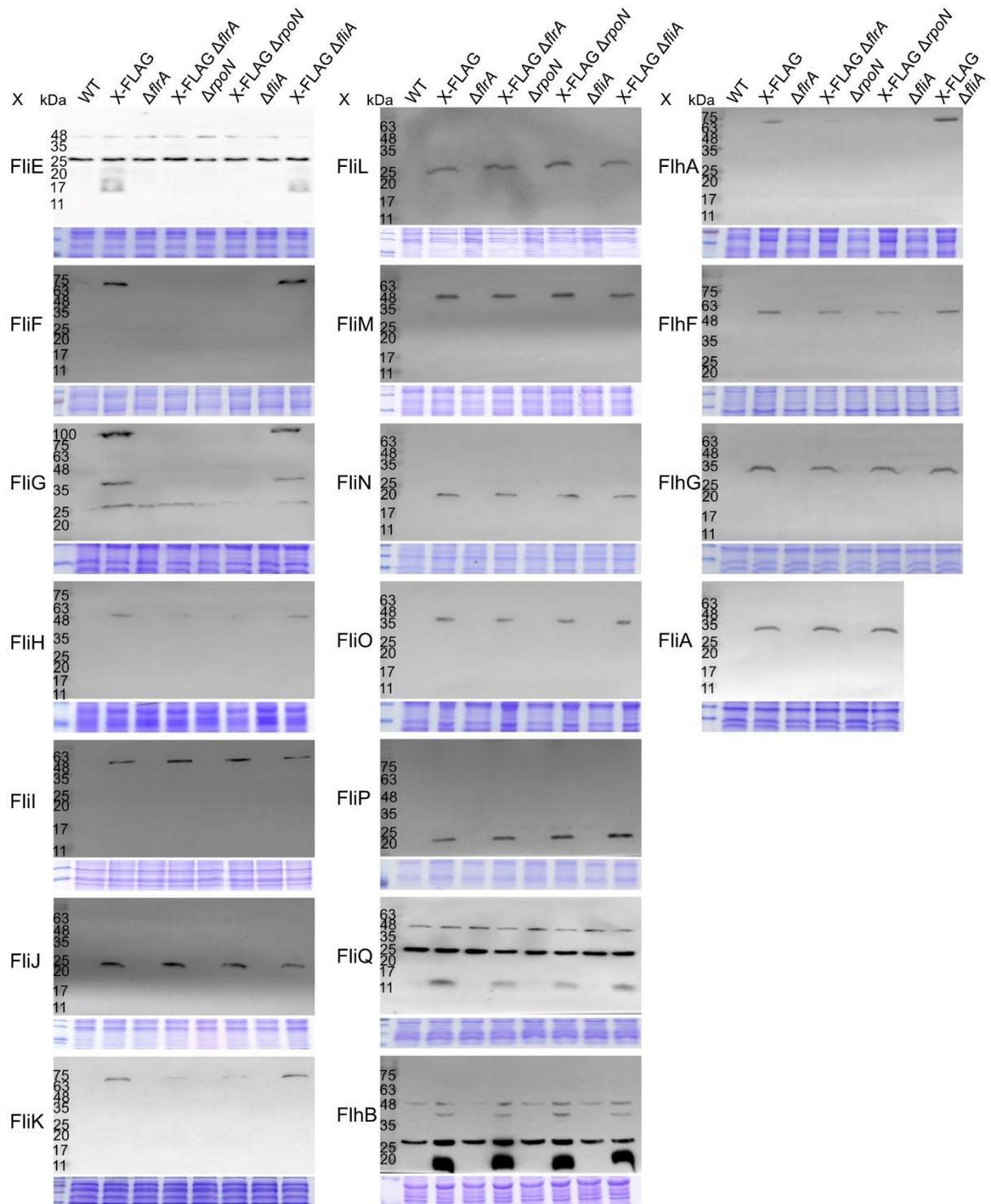


Abb. S 2: Western Blot Analysen. Entsprechende *S. putrefaciens* Stämme wurden mittels einer Immunoblot Analyse untersucht. Die Membranen wurden mit einem Antikörper gegen die Proteine mit einer FLAG-Fusion (α -FLAG-HRP) inkubiert. Außer der Nachweis von FliO erfolgte mit Hilfe einer sfGFP-Fusion sowie einem Antikörper gegen das GFP (α -GFP). Als Ladekontrolle dient das Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgel. Es wurden je biologische Triplikate durchgeführt.

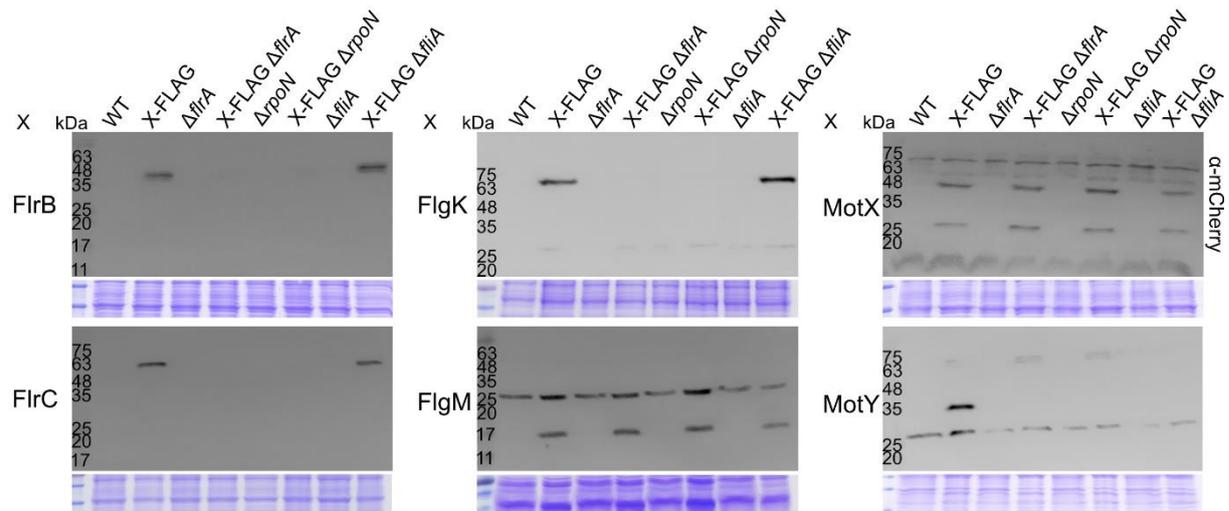


Abb. S 3: Western Blot Analysen. Entsprechende *S. putrefaciens* Stämme wurden mittels einer Immunoblot Analyse untersucht. Die Membranen wurden mit einem Antikörper gegen die Proteine mit einer FLAG-Fusion (α -FLAG-HRP) inkubiert. Außer der Nachweis von MotX erfolgte mit Hilfe einer mCherry-Fusion sowie einem Antikörper gegen das mCherry (α -mCherry). Als Ladekontrolle dient das Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgel. Es wurden je biologische Triplikate durchgeführt.

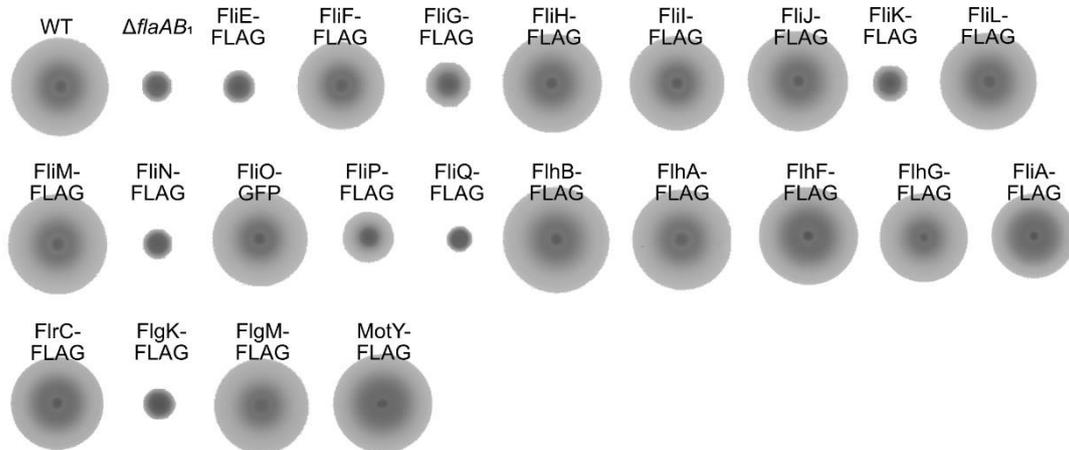


Abb. S 4: Schwimmverhalten von *S. putrefaciens*. *S. putrefaciens* Kulturen mit einer OD_{600} von ca. 0,5 wurden auf LB-Weichagarplatten aufgetropft und üN bei RT inkubiert. Die untersuchten Stämme wurden immer mit dem WT als Kontrolle auf einer Platte aufgetragen.

Tab. S 3: Luciferase-Aktivität der untersuchten Promotoren und trunkierten Bereiche der *fliE*-, *fliK*- und *fliL*-Operons. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von je drei biologischen Replikaten der Luciferase-Aktivitäten der 400 bp *upstream* des Translationsstarts gelegene Fragmente sowie verschiedenste Trunkierungen der Promotorbereiche.

	Luciferase-Aktivität [RLU] \pm SD							
	EVC	<i>fliE</i>	<i>fliF</i>	<i>fliG</i>	<i>fliH</i>	<i>fliI</i>	<i>fliK</i>	<i>fliL</i>
400 bp	142 \pm 7	271680 \pm 107216	65023 \pm 24892	165332 \pm 35635	149 \pm 31	295 \pm 25	40699 \pm 1752	513293 \pm 63059
Trunkierungen		86 bp: 77996 \pm 13991	100 bp: 404 \pm 18	100 bp: 139065 \pm 40048		600 bp: 388 \pm 22	116 bp: 42851 \pm 9812	100 bp: 930003 \pm 4428
			200 bp: 64495 \pm 13223					

Tab. S 4: Luciferase-Aktivität der untersuchten Promotoren und trunkierten Bereiche des *flhA*-Operons. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) von je drei biologischen Replikaten der Luciferase-Aktivitäten der 400 bp *upstream* des Translationsstarts gelegene Fragmente sowie verschiedenste Trunkierungen der Promotorbereiche.

	Luciferase-Aktivität [RLU] \pm SD			
	<i>flhA</i>	<i>flhF</i>	<i>flhG</i>	<i>fliA</i>
400 bp	62320 \pm 11496	203671 \pm 29840	81872 \pm 28137	18983 \pm 4015
Trunkierungen	80 bp: 104049 \pm 55475	100 bp: 147 \pm 9	100 bp: 634 \pm 240	100 bp: 236 \pm 88
		200 bp: 1448 \pm 264	200 bp: 26717 \pm 4976	200 bp: 327 \pm 143
		300 bp: 5496 \pm 1851	300 bp: 24795 \pm 2094	300 bp: 15604 \pm 3177
		550 bp: 194511 \pm 1158	550 bp: 126136 \pm 36668	
		284-550 bp: 205148 \pm 7688	100-400 bp: 82349 \pm 23616	
			-400-550 bp: 12621 \pm 2060	

pol	MMQTDQRILLVGTTPSERLSRLCCIFEFLLGEQIDVIAPEKLSY--LQDTRYRALVLFDT	58
lat	MRSLSIRIEGLNL---SADLICKI-----MHENFCLWNDKMDLPWLTIVNLSDC	46
	* . . ** :. . : * * * : : * : : * : : *	
pol	MPSDAIKLLATQFAWQP-ILLFGEIGDFQVSNVLGQIEEPLSYQLTELLHFCQVYGQVK	117
lat	SPSDVKDYLARFPSPRNQLALLAPEQGEELAAAAMRAGVQDYLLIPVESEQL--LASIHRLR	104
	***. . ** : : * * * : : . : . : : * * : * * : : *	
pol	RPQVPTSANQTKLFRSLVGRSDGIAHVRHLINQVATSDATVVLVGGSGTGKEVVARNIHY	177
lat	RLELPDSS-----LVVSASVSRQLMLLAHRAATTEASVLLLGESGTGKEPLARYIHR	156
	* : * * : * : * : . : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
pol	LSERRDGPPIPVNCGAIPPELLESEELFGHEKGSFTGAICSRKGRFELAEGGTLFLDEIGD	237
lat	HSSRSHKPFIAINCAIPESILESVLFGHVKGAFGTGAICDKAGKFEQANGGTLLEDEIGE	216
	* . * . *** : * * * . : *	
pol	MPLQMQVKLLRVLQERVFERVGGTKTINVDVRVVAATHRDLESMSISGNEFREDLYRLNV	297
lat	MPLTLQAKLLRVLQEREVERLGGQHAIALDIRIIASTNRDLRQAVELGHFREDLFYRLDV	276
	*** : * . *	
pol	FPIEMPALSERKDDVPLLQELVSRVY-NEGRGKVRFTQRAIESLKEHAWSGNVRELSNL	356
lat	LPLKISPLDRKADILPLAEHFLDLYHQDPTTSTCYFSEHAKQALVSYDWPNGNVRELENC	336
	: * : : * : * * * * : * : : . : : . * : : * : * : * : * * * * * *	
pol	VERLTILYPGGLVDVNDLPVKYR----HIDVPEYCVEMSEEQQRDALASIFSEEPVEI	412
lat	IQRALVMRRGLAIQAADLGLNIQLEVQAVEHEPEVTDGLRASKQAE-FQYIIDV-----	389
	: * : : * : : * * : : : : * * : : * : : : : * : .	
pol	PETRFPNELPPEGVNLKDLLAELEIDMIRQALELQDNVVARAAEMLGIRRTTL--VEKM	469
lat	-LKRFRNGQR-----TLQAALGMTTRALRYRLVQM	418
	. * * . : : : : * : * * : * : : * *	
pol	RKYGMTKE-----	477
lat	REAGIDIEMLLEQAGRAA	436
	* : * : *	

Abb. S 5: Vergleich der FlrA Aminosäuresequenzen des polaren und lateralen Flagellensystems von *S. putrefaciens*. Alignment des polaren FlrA (Sputcn32_2580) und lateralen FlrA (Sputcn32_3478) mittels der webbasierten Software *Clustal Omega* (Sievers *et al.* 2011). Die für die Interaktion mit FlhG essenzielle Aminosäure L400 des polaren FlrAs ist rot markiert. Die Aminosäuresequenzähnlichkeit ist bei BLAST mit 48,4 % angegeben. * konservierte Aminosäurereste; : Konservierung zwischen Aminosäuregruppen mit stark ähnlichen Eigenschaften; . Konservierung zwischen Aminosäuregruppen mit schwach ähnlichen Eigenschaften.

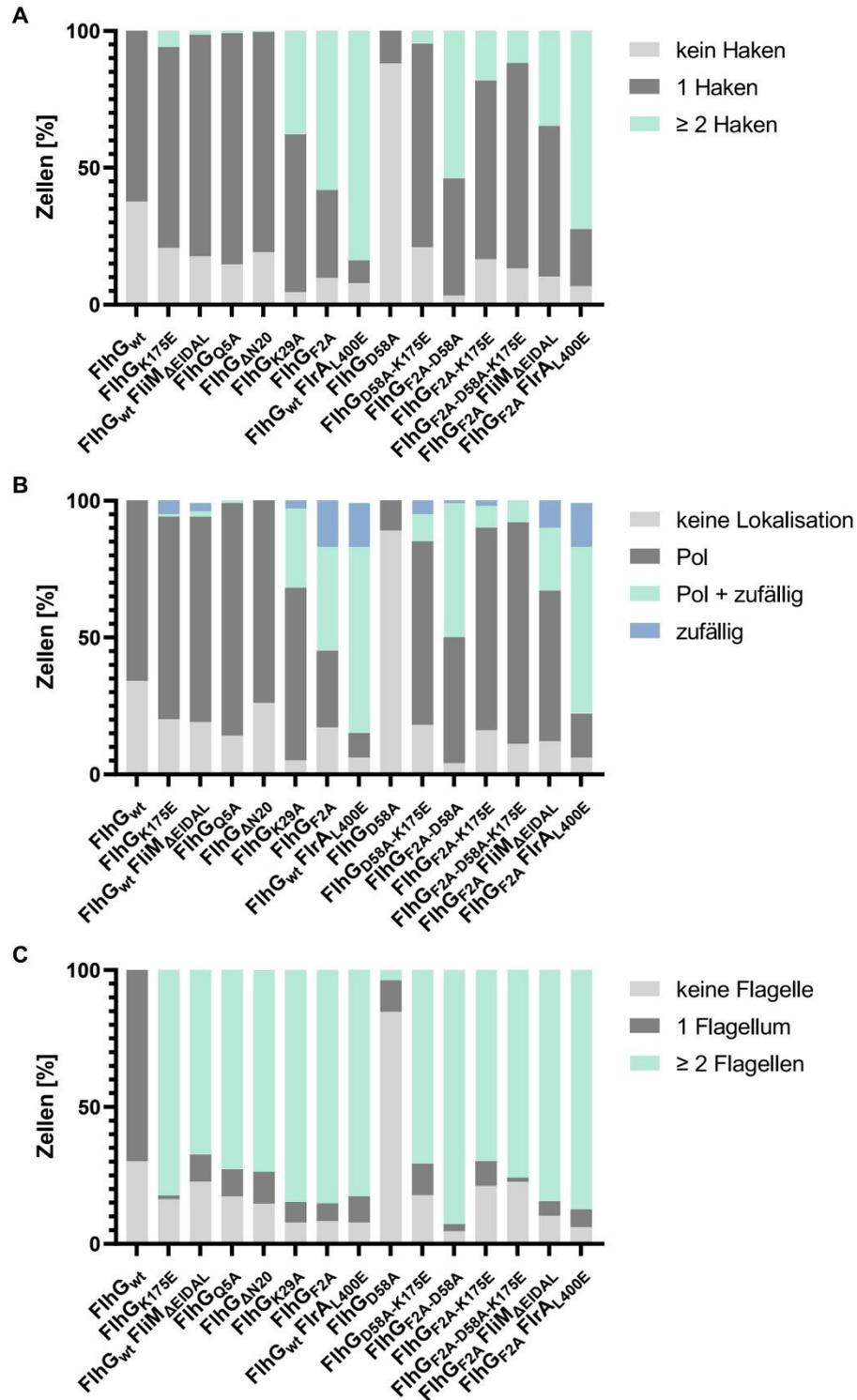


Abb. S 6: Quantifizierung von Haken- und Flagellenfärbungen. **A** Auszählung der Anzahl an Fluoreszenzmarkierten Haken pro Zelle. **B** Bestimmung der Position bzw. Positionen an Fluoreszenz markierten Haken pro Zelle. **C** Auszählung der Anzahl an Fluoreszenz markierten Filamenten pro Zelle. **A-C** Bei jeder Quantifizierung wurde jeder Stamm in Triplikaten mit insgesamt 400 Zellen ausgewertet.

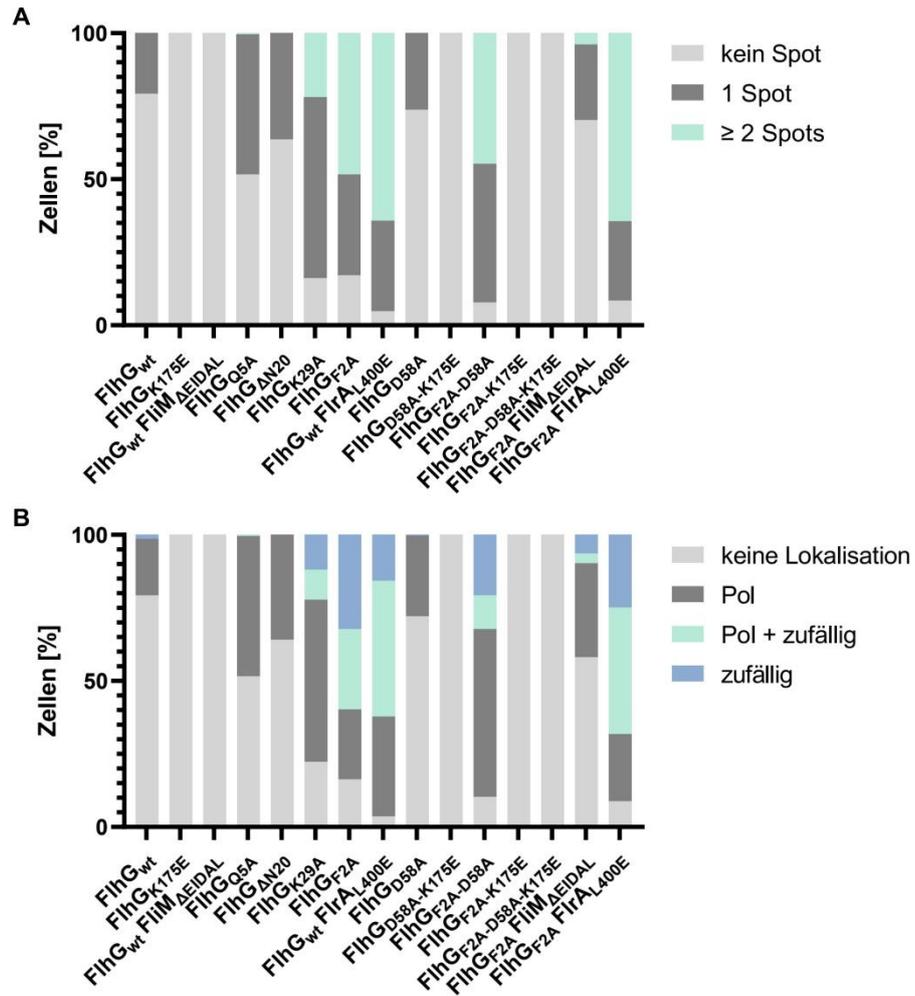


Abb. S 7: Quantifizierung von FlhG-sfGFP. A Auszählung der Anzahl an Fluoreszenzspots von FlhG-sfGFP pro Zelle. **B** Bestimmung der Position bzw. Positionen an Fluoreszenzspots von FlhG-sfGFP pro Zelle. **A-B** Bei jeder Quantifizierung wurde jeder Stamm in Triplikaten mit insgesamt 400 Zellen ausgewertet.

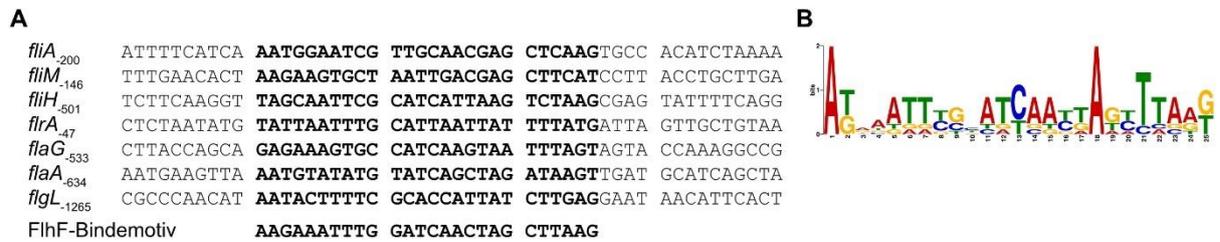


Abb. S 8: Mögliche FlhF-Bindemotive im polaren Flagellengencluster von *S. putrefaciens*. **A** *In silico*-Analysen zur Identifizierung von möglichen FlhF-Bindestellen mittels der webbasierten Software *Pattern Locator*. Das Bindemotiv von FlhF wurde in *C. jejuni* identifiziert (Li *et al.* 2020). **B** FlhF-Bindemotiv in *S. putrefaciens*. Bindemotiv wurde mit der webbasierten Software MEME erstellt (Bailey und Elkan 1994). Die Höhe der Buchstaben steht für die relative Häufigkeit jeder Base an jeder Position in dem Bindemotiv.

A		
SpFlrA	MMQTDQRILLVGTSPSERLSRLCCIFEFLEQIDVIAPEKLNSY---LQDTRYRALVLF-	56
PaFleQ	-MWRETKLLIDNLDNRSDLAVIDLNFLEQDQTCNSDREVAAGLSNSREALCIVLLGS	59
	* : : : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * :	
SpFlrA	DTMPSDAIKLLATQFAW---QPILLFGEIGDFQ-----VSNVLGQIEEPLSYPPQLTELLH	108
PaFleQ	VESKGGAVELLKQLASWDEYLPILLIGEPAPADWPEELRRRVLASLEMPSPYKLLDLSLH	119
	..* : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * :	
SpFlrA	FCQVYGQVVRPQ-VPTSANQTKLFRSLVGRSDGIAHVRHLINQVATSDATVLVLGQSGTG	167
PaFleQ	RAQVYREMYDQAREGRSREPNIIFRSLVGTSAIQVQRMMQVADTDASVLILGESGTG	179
	.* * : : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * :	
SpFlrA	KEVVARNLHYHSKRREGGPFVFNCGAIPAEELLESELFEGHEKGAFTGATSRAGRFELANG	227
PaFleQ	*****:* * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	239
SpFlrA	GTLFLDEIGDMPLQMVKLLRVLQERVFERVGGTKTINVDVRVVAATHRDLESISMISGNEF	287
PaFleQ	GTLFLDEIGDMPLPMQVKLLRVLQERTFERVGSNKTQNVVRIIAATHKNLEKMIEDGTF	299
	***** * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * :	
SpFlrA	REDLYRNLNVFPIEMPALSERKDDVPLLLQELVSRVYNEGRGKVRFTQRAIESLKEHAW	347
PaFleQ	REDLYRNLNVFPIEMAPLRERVEDIALLLNELISRMEHEKRGSI RFNSAAIMSLCRHDWP	359
	***** * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * :	
SpFlrA	GNVRELSNLVERLTILYPGGLVDVNDLPVKYRHIDVPEYCVEMS--EEQQRDALASIFS	405
PaFleQ	GNVRELANLVERLAIMHPYGVIGVGLPKKFRHVDEDEQLASSLREELEERAA-----	413
	*****:* * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
SpFlrA	SEEPVEIPETRFPNELPPEGVNLKDLLAELEIDMIRQALELQDNVVARAAEMLGIRRTTL	465
PaFleQ	--INAGLPMDAPAMLPAGEGLDKDYLANLEQGLIQALDDAGGVVARAAERLRIRRTTL	471
	. : * * * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * :	
SpFlrA	VEKMRKYGMTKE----- 477	
PaFleQ	VEKMRKYGMSRRDDDLSD 490	
	*****: : .	
B		
SpFlhG	MTLDQASGLRMMNQPYNKVKVIAVTGGKGGVGTKSVSINTAVALAEKGRVLDLADLG	60
PaFleN	-----MKQMGSMHPVQVIAVTGGKGGVGTKNVSVNLALALADLGRVMLDADLG	50
	* : . * : * :	
SpFlhG	LANVDVMLGIRAERNLSHVLSGDAELDDIIIVRGPKGIGIVPATSGTQGMVELSPAQHAGL	120
PaFleN	LANVDVLLGLTPKRTLADVIEGRCELKRDVLLGPGGVRIVPAASGTQSMVHLSPMQHAGL	110
	*****:* * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
SpFlhG	IRAFSEMRTQFDILVVDTAAGISDMVLSFSRASQDVLVVVCEPSTITDAYALIKILSRE	180
PaFleN	IQA FSDISDNLVVDVTAAGIGDSVVSFRAAQEVLLVVVCEPSTITDAYALIKLNRD	170
	* * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
SpFlhG	HGVFRFKIVANMVRSLREGMELFAKLSKVTDRELDVALELVATIPFDENLRKSVRQKLV	240
PaFleN	HGMTRFRVLNMAHSPQEGRNLFKLTQVTRDFLDVALQYVGVIPYDESVRKAVQKQRAV	230
	* * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
SpFlhG	VEAYPKSPAAIAYQGLANKIMSWVPVQPGGHLEFFVERLVQRPDFQEEKTSE	293
PaFleN	YEAFPRSKASLAFKAVAQKVDVSWPLPANPRGHLEFFVERLVQHPATGSAV---	280
	* * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

Abb. S 9: Alignment von FlrA und FleQ sowie FlhG und FleN. **A** Sequenzvergleich der Aminosäuren von FlrA aus *S. putrefaciens* (SpFlrA; Sputcn32_2580) und FleQ aus *P. aeruginosa* (PaFleQ; PA1097). **B** Sequenzvergleich der Aminosäuren von FlhG aus *S. putrefaciens* (SpFlhG; Sputcn32_2560) und FleN aus *P. aeruginosa* (PaFleN; PA1454). **A-B** Die rot markierten Aminosäuren sind in *S. putrefaciens* für die Interaktion von FlrA und FlhG essenziell (Abb. 23, Abb. 24, Abb. 27). Die orange markierten Aminosäuren sind an der Interaktion von FleQ und FleN in *P. aeruginosa* essenziell und wurden von Chanchal *et al.* (2021) identifiziert. Die Alignments erfolgten mit Hilfe der webbasierten Software *Clustal Omega* (Sievers *et al.* 2011). * konservierte Aminosäurereste; : Konservierung zwischen Aminosäuregruppen mit stark ähnlichen Eigenschaften; . Konservierung zwischen Aminosäuregruppen mit schwach ähnlichen Eigenschaften.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Thesis selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Thesis 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. Bei den von mir durchgeführten und in der Thesis erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Gemäß § 25 Abs. 6 der Allgemeinen Bestimmungen für modularisierte Studiengänge dulde ich eine Überprüfung der Thesis mittels Anti-Plagiatssoftware.

Ort, Datum

Meike Schwan

Lebenslauf

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Kai Thormann für die Bereitstellung dieses sehr spannende Thema bedanken. Dafür, dass er stets eine offene Tür für Fragen, Problemen und Diskussionen hatte und für all die guten Ratschläge, Anregungen, Ideen und das Vertrauen sowie die Freiheit, mit der ich meiner Forschung nachgehen durfte. Die Zeit in deiner Arbeitsgruppe hat mir stets Freude bereitet und ich bin gerne ein Teil von ihr gewesen.

Danke an Prof. Dr. Marc Erhardt für die Übernahme des Zweitgutachtens und bei Prof. Dr. Till Schäberle sowie Apl. Prof. Dr. Elena Evguenieva-Hackenberg für die Teilnahme an meiner Prüfungskommission.

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Gert Bange und Vitan, Devid, Wieland und allen anderen, die u. a. mit ihren HDX-MS und Pulldown Analysen einen großen Beitrag dazu leisteten, dass wir die Regulation der monopolaren Flagellierung besser verstehen. Vielen Dank für eure Ideen und Diskussionen in Meetings, per Mail oder telefonisch.

Danke an Prof. Dr. Peter Graumann und Ben für die Zusammenarbeit bei der *single molecule tracking* Mikroskopie. Danke Ben für unsere unzähligen Gespräche im kleinen dunklen Kämmerchen über die Bärenforschung in Kanada, die verrücktesten Ideen, Motivation, Reiseerfahrungen und -pläne und natürlich nicht zu vergessen über den tollen *Shewi*.

Natürlich gilt ein großer Dank allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern aus der AG Thormann. Danke dafür, dass ich mich so herzlich aufgenommen habt und so eine schöne sowie besondere Arbeitsatmosphäre geschaffen habt. Danke Marco, Anna, Max, Anja, Ulrike, Tim, Nicole, John, Vanessa, Svenja und Daniel. Vor allem möchte ich unserer guten Fee Ulrike danken, die das Labor immer auf Vordermann gehalten hat, für die große Hilfe beim Erstellen von unzähligen Klonierungen und Stämme sowie deine Ratschläge zu für Klonierungen etc. Besonders meine Bürokollegen Marco, Max und Anna haben mir durch das PowerPoint Verbot für zum Erstellen von Abbildungen und Poster einen großen Beitrag dazu geleistet, dass ich auch dank ihnen mit Adobe Illustrator und Affinity Designer so gut umgehen kann. Meinen Bachelorstudenten Lisa, Svenja und Dorian möchte ich für ihre gute Zusammenarbeit und die praktische Unterstützung meiner Forschungsprojekte bedanken.

Ich danke auch allen weiteren Mitgliedern des Instituts für Mikro- und Molekularbiologie für die gute Zusammenarbeit, die vielen lehrreichen Seminare, die hilfreichen Anregungen und Diskussionen über meine Forschungsergebnisse und den Spaß im und außerhalb des Instituts. Danke für die Hilfsbereitschaft bei allem was mit RNA und Promotoren zu tun hatte, danke insbesondere Carina, Robi und Elena. Danke an Timon für die Hilfe bei der Auswertung der RNA-Seq Daten und alles was mit Statistik zu tun hatte sowie unsere vielen Unterhaltungen in der Kaffeepause. Danke an Julian, der immer ein offenes Ohr hatte und freitags beim Bier um 4 um 3 immer mit dabei war, auch wenn ich mir dann anhören musste, dass ich wieder Sport machen soll. Danke Flo, dass ich deinen Schreibplatz etwas mit Farbe verschönern durfte. Vielen Dank an Cari, Anna, Saina und Robi für die schönen Erlebnisse, egal ob Bachelor/Bachelorette schauen, Essen gehen oder die samstägliche Marktbesuche am Ciabattastand. Robi, vielen Dank, dass du bei allen möglichen Anliegen immer da warst, wir uns gegenseitig zum Sport motiviert haben und somit Sarah, Lotte und manchmal auch bei Dario uns den ein oder anderen Muskelkater eingebracht haben.

Danke, dass ein Teil von TRR174 sein durfte und wir die Möglichkeit hatten, an so vielen Konferenzen, Retreats, Lab exchanges, Winter school und Workshops teilzunehmen. Aber natürlich auch die Freizeitaktivitäten wie Floß bauen, Mathematikum und die unzähligen lustigen Abende egal ob in Gießen, Marburg, München, Würzburg, Bad Staffelstein oder am Spitzingsee waren unvergesslich. Danke an Elli, Julia, Sophie, Devid, Marcel, Kavyaa, Nadja, Muriel, Anita, Hanna, Laura und Carsten. Ohne euch

wüsste ich nicht, dass Physiker berechnen, wie ein Floß im Vakuum schwimmt und Biologen beobachten, wie ein Floß ohne Ruder im Wasser schwimmt.

Auch Dr. med. Stefanie Rummel möchte ich danken für den unvergesslichen Workshop „Presenting Posters Successfully“. Hätte ich doch nur die Hinweise ernst genommen und die unwichtigen Flagellengene entfernt, dann wäre auch nicht alles so komplex.

Danke Prof. Dr. Nicole Frankenberg-Dinkel für den eindringlichen Hinweis, dass ich auf mein Bauchgefühl hören sollte, denn ohne dich wäre ich nicht zur Promotion nach Gießen gegangen.

Vielen Dank für das Korrekturlesen meiner Arbeit: Robi, Jonas, Timon und Matthew.

Ein großes Dankeschön an alle, die mich während meiner Promotion begleitet und die bisherige Zeit in Gießen unvergesslich gemacht haben. Auch meinen Freunden, die mir Rückhalt geben und auf die ich mich immer verlassen kann, möchte ich danken.

Danke an meinen Bruder Marco, der mich jederzeit bei kleinen und großen IT-Problemen unterstützt. Zuletzt möchte ich mich herzlich bei meiner Familie, vor allem meinen Eltern, für ihre permanente Unterstützung bei all meinen Vorhaben bedanken.