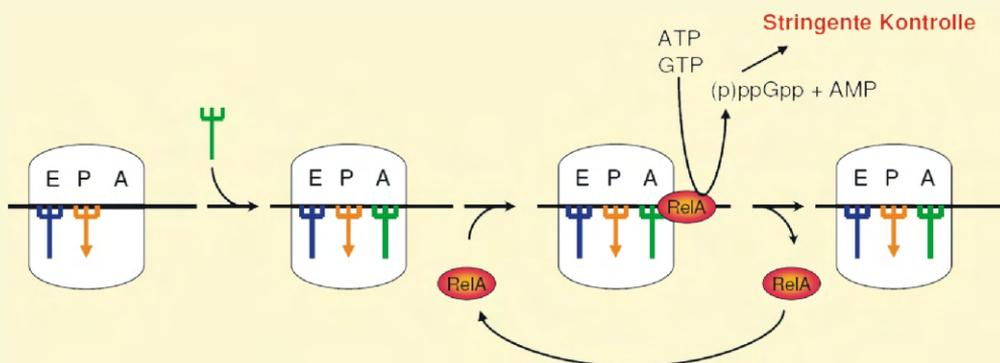


TINA KNAUBER

DER EINFLUSS DER STRINGENTEN KONTROLLE
AUF DIE MORPHOLOGISCHE UND
PHYSIOLOGISCHE DIFFERENZIERUNG IN
SORANGIUM CELLULOSUM So ce56

INAUGURAL-DISSERTATION

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



Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Der Einfluss der stringenten Kontrolle
auf die morphologische und physiologische
Differenzierung
in *Sorangium cellulosum*
*So ce56***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie und Chemie
am Institut für Mikro- und Molekularbiologie
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

Tina Knauber
aus Giessen

Giessen, Dezember 2005

Dekan : Prof. Dr. Jürgen Mayer

1. Gutachter: Prof. Dr. Gabriele Klug
2. Gutachter: Prof. Dr. Alfred Pingoud

eingereicht am: 16.12.05

mündliche Prüfung (Disputation) am: 3.03.06

*Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems,
das gelöst werden will*
(Galileo Galilei 1564-1642)

Meinem Großvater

1. Einleitung	1
1.1. Einleitung	1
1.2. Geschichte der Aufklärung des Sekundärmetabolismus	2
1.3. Myxobakterien und die Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen	3
1.3.1. Morphologische Differenzierung	4
1.3.2. Produktion von Sekundärmetabolite	5
1.4. Stringente Antwort	7
1.4.1. Ablauf der stringenten Kontrolle	8
1.5. Rel-Proteine	10
1.5.1. Molekularer Mechanismus der Stringenten Antwort in <i>M. xanthus</i>	12
1.6. Genomprojekt <i>Sorangium cellulosum</i> So ce56	12
1.7. Zielsetzung der Arbeit	14
2. Material	15
2.1. Bakterienstämme	15
2.1.1. <i>Escherichia coli</i> Stämme	15
2.1.2. <i>S. cellulosum</i> Stämme	16
2.1.3. andere Bakterien Stämme	16
2.2. Plasmide	16
2.3. Zellanzucht	17
2.3.1. Bakterienkultur- Medien und – Agarplatten	17
2.3.1.1. LB-Medium	17
2.3.1.2. LB-Agarplatten	17
2.3.1.3. M-Medium	17
2.3.1.4. M-Agarplatten	17
2.3.1.5. P-Medium	17
2.3.1.6. P-Agarplatten	18
2.3.1.7. SM-Medium	18
2.3.1.8. SM-Agarplatten	18
2.3.1.9. SM-Diff-Medium	18
2.3.1.10. SM-Diff-Agarplatten	19
2.3.1.11. P-Diff-Medium	19
2.3.1.12. P-Diff-Agarplatten	19
2.3.1.13. M-Diff-Medium	19
2.3.1.14. M-Diff-Agarplatten	19
2.3.1.15. C/2 Medium abgewandelt	20
2.3.2. Antibiotika	20
2.4. Oligonukleotide	20
2.5. Enzyme	23
2.6. Antikörper	24
2.7. Molekularbiologische Kits	24
2.8. Größenstandards DNA/Proteine	25
2.9. Puffer und Lösungen	25
2.9.1. Allgemeine NEB Puffer für Restriktionsendonukleasen	25
2.9.2. Allgemeine Fermentas Puffer für Restriktionsendonukleasen	25
2.9.3. Auftragspuffer	25
2.9.3.1. DNA Auftragspuffer	25
2.9.3.2. 5 x SDS Auftragspuffer für SDS-PAGE	25
2.9.4. Puffer für die Elektrophorese	26
2.9.4.1. 10 x TBE	26
2.9.5. Puffer für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	26
2.9.5.1. 10x Tris-Glycin-SDS Puffer	26

2.9.6. Puffer und Lösungen für die Semi-Dry Western-Blot Analyse	26
2.9.6.1. TBS	26
2.9.6.2. Puffer Anode A	26
2.9.6.3. Puffer Anode B	26
2.9.6.4. Puffer Kathode C	27
2.9.7. Zellaufbruchpuffer	27
2.9.8. Puffer für Northern-Blot	27
2.9.8.1. 20x SSC	27
2.10. Lösungen für die Minipräparation	27
2.10.1. Lösung I	27
2.10.2. Lösung II	28
2.10.3. Lösung III	28
2.11. Lösungen für die Isolierung chromosomaler DNA	28
2.11.1. TE-Puffer	28
2.11.2. CTAB-Solution	28
2.12. Lösungen für Isolierung von Gesamt-RNA	28
2.12.1. AE-Puffer	28
2.12.2. DNase-Puffer2	29
2.13. Lösungen für 2D-PAGE	29
2.13.1. Harnstofflysepuffer	29
2.13.2. Rehydrierungs-Lösung	29
2.13.3. Äquilibrierlösung-Grundlösung	29
2.14. Puffer für die Heparinsäule	30
2.14.1. Puffer A	30
2.14.2. Puffer B	30
2.15. Puffer für die Präparation Hitzeschock kompetenter Zellen	30
2.15.1. TFB 1 Puffer	30
2.15.2. TFB 2 Puffer	30
2.16. Lösungen zum Silberfärben von Polyacrylamidgelen	31
2.16.1. Fixier-Lösung	31
2.16.2. Thiosulfat Lösung	31
2.16.3. Silbernitrat-Lösung	31
2.16.4. Entwickler	31
2.16.5. Stop-Lösung	31
2.17. Coomassie-Färbelösung für SDS-PAGE	31
2.17.1. Färbelösung	31
2.17.2. Entfärbelösung	31
2.18. Puffer für eine Polymerase-Kettenreaktion	32
2.18.1. 10x Taq-Puffer	32
2.18.2. 10x Pfu-Puffer	32
2.19. Lösungen für Streptavidin/Biotin- <i>fishing</i>	32
2.19.1. 2x TGED	32
2.19.2. Waschlösung	32
2.19.3. Elutionslösung	32
2.20. Lösungen zur Probenvorbereitung für MALDI-TOF Analysen	33
2.20.1. Coomassie gefärbte Spots	33
2.20.2. Silber gefärbte Spots	33
2.21. Radioaktive Nukleotide	33
2.22. Chemikalien	34
2.23. Spezielle Artikel und Geräte	35
3. Methoden	36

3.1. Mikrobiologische Methoden	36
3.1.1. Herstellung von Plattenkulturen	36
3.1.2. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	36
3.1.3. Kultivierung von <i>S. cellulosum</i>	36
3.1.4. Bestimmung der Gesamtzellzahl einer Bakterienflüssigkultur	37
3.1.4.1. OD-Bestimmung	37
3.1.4.2. Klettmetre	37
3.1.4.3. Zählkammer	37
3.1.5. Erstellung einer Wachstumskurve von <i>S. cellulosum</i> -Bakterienkultur	38
3.1.6. Bestimmung der Verdopplungszeit t_d einer Bakterienkultur	38
3.1.7. Herstellung einer Bakteriendauerkultur	38
3.1.8. Transformation	39
3.1.8.1. Herstellung elektro-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	39
3.1.8.2. Elektroporation	40
3.1.8.3. Herstellung Hitzeschock-kompetenter <i>E. coli</i> – Zellen	40
3.1.8.4. Hitzeschock Transformation	41
3.1.9. Konjugation	41
3.1.9.1. Konjugation von <i>S. cellulosum</i>	41
3.2. Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	42
3.2.1. Behandlung von Geräten und Lösungen	42
3.2.2. Plasmid-Isolierung	42
3.2.2.1. Plasmid-Minipräparation	43
3.2.2.2. Plasmid-Minipräparation nach Qiagen	43
3.2.2.3. Plasmid-Minipräparation nach PeqLab	44
3.2.3. Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. cellulosum</i>	45
3.2.4. Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>S. cellulosum</i> (Treuner-Lange, 1996)	46
3.2.5. Quantifizierung von Nukleinsäuren	47
3.2.6. Reinigung und Konzentration von Nukleinsäuren	48
3.2.6.1. Phenol-Chloroform-Extraktion	48
3.2.6.2. Alkoholfällung von Nukleinsäuren	48
3.2.6.3. Fällung mit Isopropanol	49
3.2.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	49
3.2.8. Reinigung von Nukleinsäure-Fragmenten nach PCR und anderen enzymatischen Modifikationen	50
3.3. Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	51
3.3.1. Restriktion von DNA	51
3.3.2. Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen	51
3.3.3. Phosphorylierung von DNA	52
3.3.4. Ligation von DNA	53
3.4. Molekularbiologische Methoden	54
3.4.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	54
3.4.2. Real-time RT-Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	56
3.4.3. Sequenzierung von DNA	58
3.5. Protein-Analysen	58
3.5.1. Western-Analyse von Proteinen (<i>Westernblot</i>)	58
3.5.1.1. Blotten von SDS-Polyacrylamid- und nicht-denaturierenden Gelen	59
3.5.2. Northernblot-Analyse	60
3.5.2.1. Northern Hybridisierung mit radioaktiv endmarkiertem Oligonukleotid	60
3.5.2.2. ^{32}P -Endmarkierung von Oligonukleotiden und deren Aufreinigung	62
3.5.3. Glutaminsynthetase-Test	63
3.6. Computeranalysen	64

3.7. Biochemische und physikalische Methoden	64
3.7.1. Gelelektrophorese	64
3.7.1.1. DNA-Agarosegele	64
3.7.1.2. SDS-Polyacrylamidgele für die SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	65
3.7.1.3. Silber-Färbung von Polyacrylamidgelen	66
3.7.1.4. Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	66
3.7.1.5. Nicht-denaturierende Gele (Nativ-Gele)	67
3.7.1.6. Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D- PAGE)	68
3.7.1.7. Radioaktive Markierung von <i>S. cellulosum</i> -Zellen/ <i>pulse-labeling</i>	68
3.7.1.8. Isoelektrische Fokussierung (IEF)	68
3.7.1.9. 2D-SDS-PAGE	69
3.7.2. (p)ppGpp-Synthese <i>in vivo</i>	70
3.7.3. Dünnschichtchromatographie von Nukleotiden	70
3.7.4. Phosphoprotein-Isolierung in <i>S. cellulosum</i>	71
3.8. Säulenchromatographische Methoden	71
3.8.1. Affinitätschromatographie	72
3.8.1.1. Heparinsäule	72
3.8.2. <i>Metal-chelat</i> Affinitätschromatographie	72
3.9. Streptavidin-Biotin- <i>fishing</i>	73
3.10. Produktionsanalyse von Sekundärmetaboliten	74
3.10.1. Quantitativer Nachweis mit Hilfe von Bioassay Experimenten	74
3.10.2. Detektion von Chivosazol A und Etnangien durch HPLC Analysen	74
3.11. Probenvorbereitung für MALDI-TOF	75
3.11.1. Coomassie gefärbte Spots	75
3.11.2. Nitratsilber gefärbte Spots	75
3.12. Proteinanalytik	76
3.12.1. Fällungsmethoden für Proteine	76
3.12.1.1. Ammoniumsulfatfällung	76
3.12.1.2. Acetonfällung	77
3.12.2. Proteinbestimmung nach Bradford	77
3.12.3. Zellaufschlussmethoden	78
3.12.3.1. Ultraschall	78
4. Ergebnisse Teil I	79
4.1. Potentielle ppGpp-Synthetase kodierende Gene in <i>Sorangium cellulosum</i>	79
4.1.1. Die <i>rel</i> -Region in <i>S. cellulosum</i>	84
4.1.2. Weitere potentielle <i>rel</i> -Gene in <i>So ce56</i>	84
4.2. Konstruktion einer <i>rel</i> -Mutante	86
4.2.1. Klonierung und Identifizierung des Konjugationsplasmids <i>psupHyg:relint</i>	86
4.2.2. Klonierung des Konjugationsplasmids <i>pSupHyg</i>	87
4.2.3. Konjugation in <i>So ce56</i>	88
4.3. Westernblot-Analyse der <i>rel</i> -Mutante	90
4.4. „Northernblot“-Hybridisierung mit einer <i>relint</i> -Sonde	92
4.5. <i>rel</i> kodiert die einzige (p)ppGpp-Synthetase in <i>S. cellulosum</i>	94
4.6. Bioassay-Experiment: qualitative Analyse von Sekundärmetaboliten	101
4.6.1. HPLC, quantitative Analyse von Sekundärmetaboliten	102
4.7. Untersuchung des Phänotyps von <i>Soce:relint</i>	104
4.8. Phänotypische Charakterisierung der <i>Soce:relint</i> Mutante	105
4.8.1. Wachstumsversuch in M-Medium	105
4.8.2. „ <i>Live and dead staining</i> “	107

4.8.3. Vegetativer Phänotyp	109
4.8.4. Schwärmverhalten	110
4.8.5. Zelldifferenzierung (Sporulation)	111
4.8.5.1. Glycerin	112
4.8.5.2. Sporulationsaktivierung durch weitere Chemikalien	113
4.8.6. 3-AT-Versuch	113
4.8.7. Cellulose-Test	114
4.8.8. <i>Soce:relint</i> transkribiert kein <i>Chivosazol</i> -Gen im <i>Chivosazol</i> -Cluster	115
4.8.9. <i>Soce:relint</i> transkribiert kein <i>asgA</i> -Gen	118
5. Ergebnisse Teil II:	119
Charakterisierung der <i>relint</i> -Mutante aus <i>S. cellulosum</i>	
5.1. Zweidimensionalen Gelelektrophorese zur Aufklärung der <i>rel</i> Defekte	119
5.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese zur Aufklärung der Proteinexpression in <i>Soce:relint</i> .	124
5.3. Isolation DNA bindender Proteine anhand eines Biotin/Streptavidin Affinitätssystems	126
5.4. Westernblot-Analyse: NtcA- Antikörper unter Differenzierungsbedingungen	131
5.5. Identifizierung potentieller DNA-Bindeproteine mit Hilfe der Heparinsäule	134
5.5.1. Heparinsäule mit SM-Mannose Extrakten	134
5.5.2. Heparinsäule mit SM-Kulturen und unterschiedlichen Kohlenstoffquellen	137
6. Ergebnisse Teil III:	139
Konstruktion und Charakterisierung einer Serin-Threonin-Kinase Mutante (<i>pkn859</i>) in <i>So ce56</i>	
6.1. Klonierung und Identifizierung des Konjugationsplasmids pSupHyg: <i>pkn859</i>	140
6.1.1. Isolierung und Sequenzierung des <i>pkn859</i> -Fragments	140
6.1.2. Klonierung des Konjugationsplasmids pSupHyg: <i>pkn859</i>	141
6.1.3. Konjugation in <i>So ce56</i>	141
6.2. Untersuchung des Phänotyps von <i>Soce:pkn859</i>	143
6.2.1. Wachstumsversuch	143
6.2.2. Aggregationsversuch	144
6.2.3. Physiologische Differenzierung (<i>in vivo</i>)	145
6.3. <i>Soce:relint</i> produziert hohe mRNA-Level des <i>pkn859</i> -Gens	146
6.4. Identifikation von Phosphoproteinen in <i>So ce56</i> und <i>Soce:pkn859</i>	146
6.4.1. Glutaminsynthetase-Test	150
6.4.2. Westernblot-Analyse von PII-Protein	152
7. Diskussion und Ausblick	155
7.1. Ist <i>Rel_{S.cellulosum}</i> eine (p)ppGpp Synthetase III?	155
7.1.1. Die Familie der Rel/RelA- und SpoT-Proteine	155
7.1.2. Klonierung einer <i>rel</i> -Mutante in <i>So ce56</i>	157
7.1.3. <i>rel</i> -Mutationen in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien	158
7.1.4. Die <i>rel</i> -Mutante zeigt reduzierte GTP-Level	160
7.1.5. Charakterisierung der <i>relint</i> -Mutante	162
7.2. Identifizierung von NtcA	166
7.3. Identifizierung und Charakterisierung einer Serin/Threonin Kinase	170
7.4. Phosphoprotein-Muster in <i>So ce56</i> und <i>Spkn859</i>	173

8. Zusammenfassung	177
9. Literaturangabe	179
10. Abkürzungsverzeichnis	191
11. Anhang	194
12. Danksagung	199

1.1. Einleitung

Mikroorganismen haben sich die unterschiedlichsten Lebensräume dieser Erde erfolgreich erschlossen. Sie haben einerseits eine hoch spezialisierte biochemische Struktur entwickelt, um sich extreme Habitate, wie heiße Quellen, Salz- und Alkaliseen, sowie anaerobe Lebensräume zu erschließen. Andererseits besitzen sie unterschiedlichste, hoch koordinierte Anpassungsmechanismen, um sich an verändernde Umweltparameter, wie Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck und Nährstoffversorgung, auch im nicht extremen Habitat schnell und effizient anzupassen.

Die meisten Mikroorganismen sind in ihrem Habitat längeren Perioden ausgesetzt, in denen ein Mangel an Energiequellen, an Grundbausteinen für Biosynthesen herrscht. Um sich von guten, wachstumsfördernden Bedingungen auf Mangelbedingungen umzustellen, besitzt die Zelle Regulationsmechanismen für Anabolismus, Katabolismus und das Überleben bei längerem Wachstumsstillstand, der Stationärphase.

Manche Bakterien sind in der Lage, unter solchen Bedingungen unterschiedliche Schutzmechanismen zu aktivieren. Darunter fallen unter anderem die Produktion von Sekundärmetaboliten (physiologische Differenzierung) sowie die morphologische Differenzierung (Sporenbildung), aber auch Langzeitüberlebensstrategien ohne Sporenbildung.

Betrachtet man die Gruppe der Gram-positiven Bakterien und darunter die Familien der *Bacillen* und *Streptomycceten*, findet man in beiden eine Kopplung zwischen der physiologischen und morphologischen Differenzierung. Kommt es bei *Streptomycceten* zu Stickstoffmangel, Hitze- oder osmotischen Schock (Sun, *et al.*, 2001, Chakraburty, R., 1997) bzw. bei den *Bacillen* zu Kohlenstoffmangel (Hueck und Hillen, 1995; Stülke und Hillen, 2000), folgt die transkriptionelle Aktivierung eines genetischen Programms, das eine Kaskade von Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Sensoren und Response-Regulatorproteinen beinhaltet. Dieses Programm bewerkstelligt die Umwandlung von der vegetativen Zelle in unterschiedliche Überdauerungsformen. Bevor es zur Umwandlung kommt, verfolgen *Bacillen* sowie *Streptomycceten* alternative Strategien, sich mit Streß- und Hungersituationen auseinander zu setzen. Darunter fällt auch die Anhäufung des Alarmons ppGpp durch die einsetzende stringente Kontrolle, die Ausbildung der Kompetenz, die Bildung extrazellulärer Enzyme zur Erschließung neuer Nahrungsquellen, die Ausscheidung von Sekundärmetaboliten zur Hemmung von Konkurrenten oder die generelle Stressantwort.

1.2. Geschichte der Aufklärung des Sekundärmetabolismus

Bakterien und Pilze produzieren eine Fülle von Stoffen, die gemeinsam mit den „sekundären Pflanzenstoffen“ als sekundäre Metabolite bezeichnet werden. Hierunter fallen Antibiotika, Immunsuppressiva, antitumorale und antivirale Wirkstoffe, Enzym-Inhibitoren, Rezeptor-Antagonisten und -Agonisten, Siderophore, Toxine, Pflanzenwachstums-Regulatoren, Insektizide und Herbizide, sowie Signalstoffe. Viele dieser Stoffe spielen als Therapeutika, Stimulantien, Futtermittelzusätze usw. eine große Rolle in der heutigen Biotechnologie. Den Sekundärstoffen ist gemeinsam, dass sie für das Wachstum und Überleben des jeweiligen Organismus nicht essentiell sind.

Funktions- und evolutionsbasierte Erklärungsmodelle

Symbiotische und antagonistische Beziehungen zwischen Mikroorganismen sind schon seit dem 19. Jahrhundert bekannt. Die **Verteidigungs-Hypothese** geht davon aus, dass viele Sekundärstoffe zur chemischen Verteidigung gegen konkurrierende Organismen dienen. Diese Funktion liegt bei antibiotisch wirkenden Substanzen nahe und wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Sekundärstoffe fast ausschließlich von Organismen produziert werden, die kein eigenes Immunsystem besitzen. Den Anstoß zur Aufklärung des stofflichen Prinzips einer Antibiose machte A. Fleming 1928 mit der Entdeckung von Penicillin aus *Penicillium notatum*. Er konnte feststellen, dass eine Pilzkolonie das Wachstum von Staphylokokken hemmt. Mit der Einführung als effizientes antibakterielles Therapeutikum bei Wundinfektionen, während des zweiten Weltkrieges 1941/42 begann die Ära der Mikroorganismen in der Arzneimittelforschung. Seither sind zahlreiche antibiotisch wirkende Stoffe isoliert worden. Antibiotika sind Substanzen biologischer Herkunft, die schon in geringen Konzentrationen das Wachstum von Mikroorganismen hemmen. Man unterscheidet zwischen hemmend wirkenden (Bacteriostatica, Fungistatica) und abtötenden Stoffen (Bakterizide, Fungizide usw.).

Als Produzenten sekundärer Metabolite haben die Mikroorganismen größte wirtschaftliche Bedeutung erlangt.

Man findet Sekundärmetabolit-Produzenten in der Gruppe der *Streptomyceten*, *Bacillen* aber auch in der Gruppe der Myxobakterien.

1.3. Myxobakterien und die Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen

Die stäbchenförmigen Myxobakterien gehören zu der Gruppe von Gram-negativen, δ -Proteobakterien (Ludwig, 1983). Sie zeigen sowohl Merkmale von einzelligen, sowie von mehrzelligen Organismen.

Beschrieben wurden die Myxobakterien das erste Mal 1882 von Roland Thaxter. Insgesamt sind bis zur heutigen Zeit 12 Familien mit 40 verschiedenen Arten von Myxobakterien untersucht und zum Teil charakterisiert worden. Die Gruppe der Myxobakterien (*Myxococcales*) wird in zwei Untergruppen aufgeteilt.

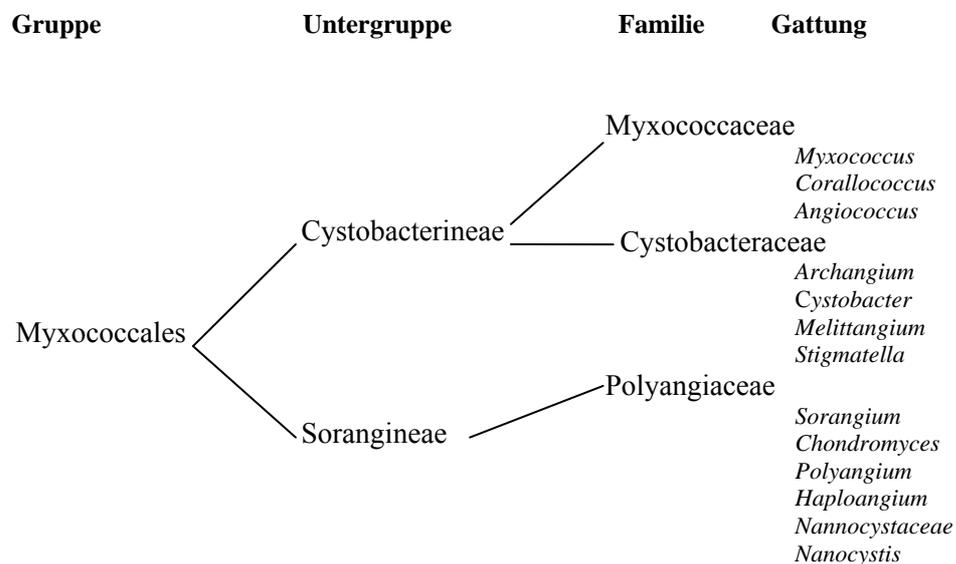


Abb. 1.1.: Taxonomie der Myxobakterien in Anlehnung an Prokaryotes (3.19; 3/18/2005)

Es handelt sich zum einen um die Untergruppe der *Cystobacterineae* und zum anderen um die Untergruppe der *Sorangineae*. Zur Untergruppe der *Cystobacterineae* gehört das Myxobakterium *Myxococcus xanthus*. 90 % aller bisherigen Forschungsarbeiten der Gruppe der Myxococcales wurden in *M. xanthus* unternommen. Zur Untergruppe der *Sorangineae* gehört die Familie der Polyangiaceae, welche die Gattung *Sorangium* beinhaltet. Nur innerhalb der *Sorangineae* findet man Spezies, die in der Lage sind, Cellulose zu zersetzen. So zum Beispiel der Organismus *Sorangium cellulosum*. Bei den vegetativen Zellen, der Gruppe der *Sorangineae*, handelt es sich um dicke, zylindrische, manchmal würfelförmige Zellen mit beträchtlichen Rundungen (Abb.1.2.). Sie sind zwischen 2,5 - 6 μm lang und 0,6 -1,0 μm breit. Man findet, im Gegensatz zur Gruppe der *Cystobacterineae*, keine verzweigten Fettsäurereste im Fettsäuremuster.



Abb. 1.2.: Abbildung einer vegetativen Kolonie (A) und von Zellen (B) von *S. cellulosum* So ce56

1.3.1. Morphologische Differenzierung

Einer der ungewöhnlichsten Aspekte der Myxobakterien ist ihre Fähigkeit zur morphologischen Differenzierung. Sie sind unter Mangelbedingungen in der Lage, sich zu Fruchtkörpern zusammenzuschließen und Sporen zu bilden.

Die Sporen stellen eine metabolisch weitgehend ruhende, gegenüber äußeren Einflüssen, wie z.B. hohe Temperaturen, UV-Licht etc., resistente Dauerform der Zellen dar. Die Fruchtkörper der Myxobakterien variieren von einfachen kugelförmigen Massen mit Myxosporen in lockerem Schleim bis zu komplexe Formen mit einer Fruchtkörperwand und einem Stiel. Die Färbung der Fruchtkörper ist je nach Spezies unterschiedlich zwischen „sonnengelb“ bei *M. xanthus* und „leuchtend-orange“ bei *S. cellulosum*.

Die Fruchtkörperbildung von Myxobakterien ähnelt sehr der Fruchtkörperbildung von *Dictyostelium discoideum*, einem eukaryotischen Schleimpilz. Diese beiden Lebenszyklen sind zum Vergleich in Abb. 1.3. dargestellt.

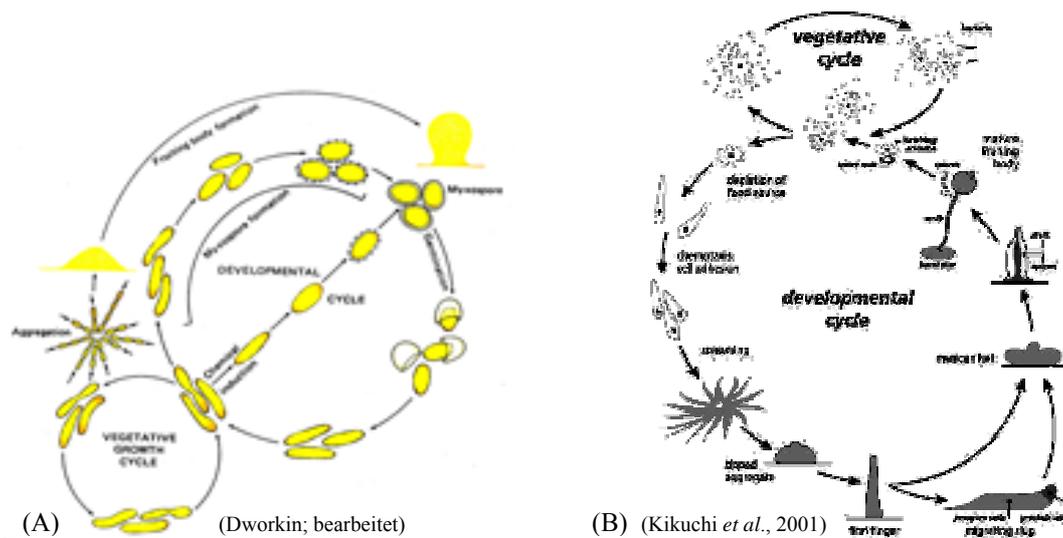


Abb. 1.3.: Vergleich der Lebenszyklen eines prokaryotischen Myxobakteriums; *M. xanthus* (A) und des eukaryotischen Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (B)

(A) Lebenszyklus eines Myxobakteriums: Die Zellen aggregieren, induziert durch ein Hungersignal, zu Fruchtkörpern, in denen sich Sporen bilden. Die Sporen im Fruchtkörper keimen wieder aus, wenn sich die Umweltbedingungen verbessern.

(B) Lebenszyklus von *Dictyostelium discoideum*: Die Schleimpilz-Amöben aggregieren bei Nahrungsentzug und bilden einen wandernden Klumpen, der dann einen Fruchtkörper bildet (Sporenbildung). Wenn die Umweltbedingungen wieder besser werden, keimen die freigesetzten Sporen aus und bilden neue Amöben.

1.3.2. Produktion von Sekundärmetaboliten

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde die Familie der Myxobakterien aufgrund ihres interessanten Differenzierungsweges genauer untersucht. Jedoch besitzen sie, wie auch der eukaryotische Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (Kikuchi *et al.*, 2001; Takaya *et al.*, 2000), sowie die Gram-positiven *Streptomyceten* und *Bacillen*, neben ihrer morphologischen auch eine physiologische Differenzierung.

Die Familie der Myxobakterien hat einen bedeutenden Stellenwert in Bezug auf die bakterielle Sekundärmetabolit-Produktion. Man findet die Gruppe der Myxobakterien auf Platz drei der Sekundärmetabolit-Produzenten (Tabelle 1.1.). Sie stehen somit vor der Gruppe der Pseudomonaden und Cyanobakterien.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden insgesamt 50 neue und unterschiedliche Grundstrukturen, sowie 350 unterschiedliche Strukturvarianten, aus unterschiedlichen Myxobakterien isoliert. Viele der myxobakteriellen Metabolite zeigen im Vergleich zu bereits isolierten Metaboliten von *Bacillen* und *Actinomyceten* eine vollständig neue chemische Struktur.

Tabelle 1.1.: Prozentanteil der Sekundärmetabolit-Produktionsmenge mikrobieller Produzenten

Organismen	Angaben der Gesamtmenge von Sekundärmetabolite in %
Actinomyceten	64,5
Bacillen	6,5
Myxobakterien	5,0
Andere	<u>Pseudomonaden</u> Cyanobakterien
Pilze	18,0

Über 50 % der charakterisierten myxobakteriellen Sekundärmetabolite, spielen eine wesentliche bzw. angehende Rolle in der medizinischen Forschung (Demain, 1999). Darunter findet man antibakterielle, antivirale und antitumorale Verbindungen, sowie Substanzen zur Behandlung von Immunsuppressiva. Der Weiteren Medikamente zur Bekämpfung von Diabetes, Malaria und Hypercholesterinämie (Grabley und Thiericke , 1999). Betrachtet man die einzelnen Familien der Myxobakteriengruppe in Bezug auf die Produktion von Naturstoffen, zeichnet sich ein deutlicher Unterschied ab. Ungefähr die Hälfte aller Sekundärmetabolite wird von der Untergruppe der *Sorangineae* gebildet (Abb.1.4.).

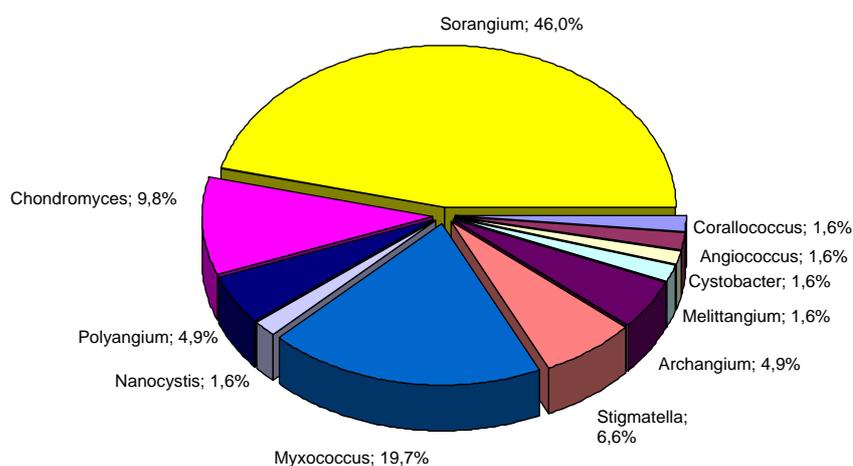


Abb.1.4.: Prozentuale Aufteilung der Sekundärmetabolit-Produktion in der Gruppe der Myxobakterien

Von *Sorangium* gebildete Sekundärmetabolite haben hohe biotechnologische und ökonomische Relevanz. Beispiele sind Ambruticin (Höfle *et al.*, 1991), Jerangolid, Sorangicin, Disorazole, Soraphen, Ratjadon (Gerth *et al.*, 1995) und Epothilon (Gerth *et al.*, 1996). Auf die Osmoregulation von Pilzen wirken die Stoffe Jerangolid und Ambruticin

(Knauth and Reichenbach, 2000). Sorangicin, isoliert aus *So ce12*, blockiert die RNA-Polymerase in Eubakterien (Irschik *et al.*, 1987). Im Bereich der klinischen Tumorthherapie wird Disorazol eingesetzt. Es handelt sich hierbei um einen Tubulin-Polymerisationsinhibitor, der das Wachstum der Tumorzellen blockiert (Reichenbach, 1999/2000). Als letztes Beispiel Epothilon; sein Wirkstoff stabilisiert das Tubulingerüst von Eukaryonten und ist somit eines der wenigen bekannten Komponenten, die eine Antitumor-Wirkung besitzen (Bollag, 1997).

Die Bildung der Sekundärstoffe setzt zum größten Teil erst mit Beginn der stationären Phase ein. Somit werden die Sekundärmetabolite erst nach Abschluss des Zellwachstums, entweder durch eine veränderte Verstoffwechslung des noch vorhandenen Energiesubstrates oder durch die weitere Umsetzung der zuvor gebildeten Primärmetabolite gebildet. Die stringente Antwort ist z.T. an der Regulation des Sekundärstoffwechsels beteiligt. Kommt es bei den *Streptomyceten* zu Stickstoffmangel-Bedingungen bzw. bei den *Bacillen* zu Kohlenstoffmangel wird die stringente Kontrolle in der Zelle aktiviert.

1.4. Stringente Antwort

Bei Aminosäure- und Kohlenstoffmangel kommt das Nettowachstum an Zellmasse schnell zum Erliegen. In einer ersten Phase werden die DNA-Synthese und die Zellteilung noch fortgesetzt. Allerdings werden die Zellen kürzer und leichter. Die RNA-Synthese und die Proteinbiosynthese werden jedoch relativ schnell eingestellt. Es folgt eine Inhibierung der Biosynthese von Kohlenhydraten, Phospholipiden und Zellwandbestandteilen. Dagegen werden selektive Gene für die Aminosäuresynthese und katabole Wege aktiviert, um der Mangelsituation entgegenzuwirken. Diesen Gesamtprozess der physiologischen Anpassung bezeichnet man als stringente Kontrolle.

Geschichte der stringenten Kontrolle:

Die ersten Untersuchungen der stringenten Kontrolle wurden in den sechziger Jahren an *Escherichia coli* durchgeführt. Dabei wurden durch chemische Mutagenese des Genoms Mutanten gesucht, die im Gegensatz zum Wildtyp, Defekte in der Anpassung aufwiesen. Durch weitere genetische Kreuzungsexperimente konnte ein genetischer Locus

identifiziert werden, der für den beobachteten Phänotyp der Mutante verantwortlich gemacht werden konnte.

Stent und Brenner beschrieben 1961, dass in diesen Mutanten nach Nährstoffmangel der Inaktivierungsmechanismus der RNA-Synthese blockiert vorliegt. Man bezeichnete diesen Phänotyp als relaxierend. Aus dem relaxierten Phänotyp wurde der Name für den Genlocus *rel A* abgeleitet.

1.4.1. Ablauf der stringenten Kontrolle

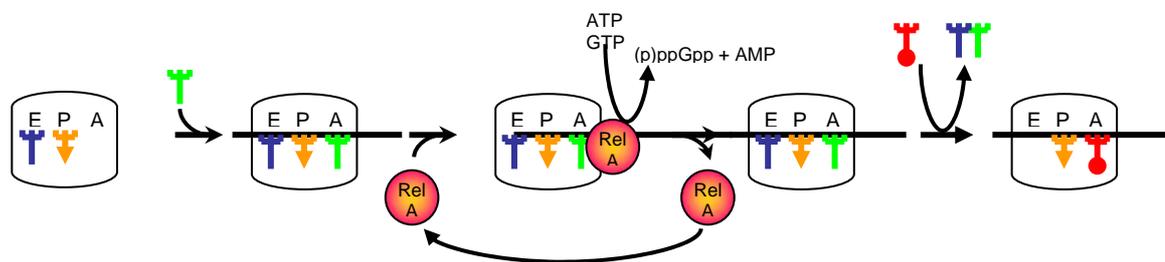


Abb. 1.5.: Model über RelA abhängige (p)ppGpp Synthese (Wendrich *et al.*, 2002)

Durch Aminosäuremangel werden in Bakterien unbeladene tRNAs angehäuft. Infolgedessen kommt es am Ribosom zur Anlagerung einer ungeladenen tRNA in die Aminoacylstelle (*A-site*). Die Peptidkettenverlängerung wird abgebrochen. Dadurch wird die (p)ppGpp-Synthetase I (RelA) aktiviert, die an der großen 50S ribosomalen Untereinheit gebunden ist. Sie katalysiert den Transfer der $\beta\gamma$ -Pyrophosphatgruppe von ATP auf die 3'-Hydroxylgruppe von GTP (seltener auch GDP), um (p)ppGpp zu bilden. Gebildetes (p)ppGpp wird durch eine 5'-Phosphohydrolase in das eigentliche Alarmon ppGpp überführt. Eine zweite (p)ppGpp Synthetase (SpoT) wird durch Kohlenstoffmangel aktiviert und führt ebenfalls zur Alarmonbildung. Die Konzentration von ppGpp kann durch ein Recyclingsystem aus SpoT und einer Nukleotiddiphosphat-Kinase (Ndk) wieder gesenkt werden (Abb. 1.6.), da SpoT auch über ppGpp-hydrolytische Aktivität verfügt. Die intrazelluläre Anhäufung von ppGpp führt zu einer Veränderung der β -Untereinheit der RNA-Polymerase, so dass diese tRNA- und rRNA-Gene mit stark verminderter Effizienz transkribiert.

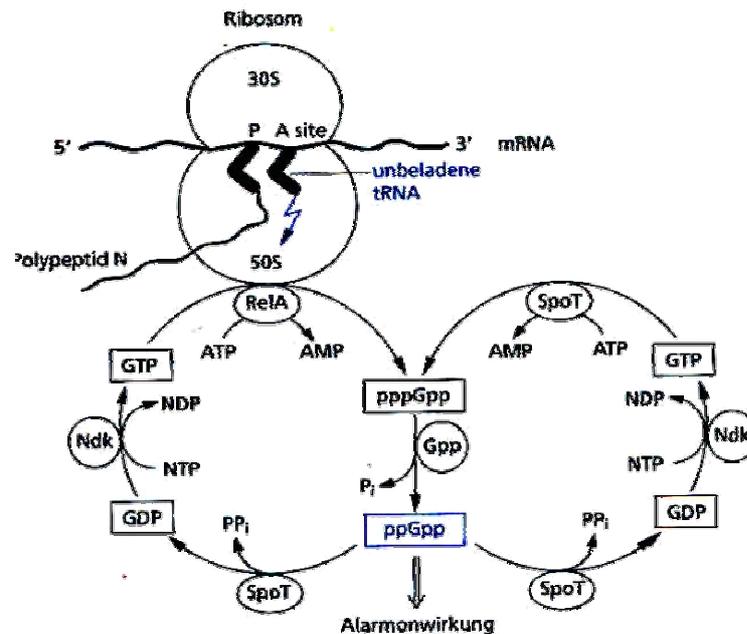


Abb. 1.6.: Ablauf der stringenten Kontrolle am Beispiel von *E. coli* (Mikrobiologie, 2001):

Die (p)ppGpp Synthetasen I und II (RelA bzw. SpoT) katalysieren den Pyrophosphattransfer von ATP auf GTP oder GDP zu den Produkten (p)ppGpp bzw. ppGpp. Die Guanosinpentaphosphatase (Gpp) hydrolysiert die γ -Phosphatgruppe, so dass aus (p)ppGpp ppGpp entsteht. Nur SpoT besitzt eine manganabhängige Hydrolaseaktivität, bei der die 3'-Pyrophosphatgruppe von (p)ppGpp oder ppGpp abgespalten wird. Die Nukleotiddiphosphat-Kinase (Ndk) katalysiert den Transfer terminaler γ -Phosphatgruppen zwischen verschiedenen Nukleotiden.

Akkumulierende ribosomale Proteine, die nun wegen fehlender rRNA nicht mehr zum Ribosomaufbau benötigt werden, unterdrücken die Translation ihrer eigenen mRNAs. Dies ist die Ursache für weniger Ribosomen in der Zelle und eine stark reduzierte Proteinbiosynthese. Im Gegenzug werden Operons, die Enzyme der Aminosäure- und Nukleotidbiosynthese, sowie Enzyme diverse Kohlenstoffabbauwege kodieren, verstärkt transkribiert.

Der in Abb. 1.6. dargestellte Kreislauf der (p)ppGpp-Synthese und Degradation fasst die erwähnten Eigenschaften von RelA und SpoT aus *E. coli* zusammen:

Die Guanosinpentaphosphatase (Gpp) und die Nukleotiddiphosphat-Kinase (Ndk) schließen den Kreislauf der Guanosinphosphorylierungen. Gpp hydrolysiert die γ -Phosphatgruppe von (p)ppGpp. Da bisher kein physiologischer Unterschied in der stringenten Antwort von (p)ppGpp im Vergleich zum ppGpp entdeckt wurde (Belitskii und Shakulov, 1986), bleibt die Bedeutung der Pentaphosphatase für die stringente Antwort unklar.

Der Ablauf der stringenten Kontrolle in Bakterien welche nur ein RelA/SpoT Paralog besitzen, ist dem von *E. coli* ähnlich. Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass die

Funktionen in einem Protein kombiniert vorliegen und nicht in zwei unterschiedlichen Proteinen. Sowohl die Ribosomen-abhängige, die Ribosomen-unabhängige ppGpp-Synthese als auch die ppGpp-Hydrolyse werden von einem Protein (Rel) katalysiert.

1.5. Rel-Proteine

Um den Einfluss von (p)ppGpp auf die zellulären Prozesse zu verstehen, wurden *in vitro* und *in vivo* Experimente durchgeführt. Die beobachteten Effekte sind sehr verschieden und ermöglichen der Zelle eine Adaption ihres Wachstums an das limitierte Nahrungsangebot ihrer Umgebung. *In vivo* Mutageneseexperimente an *E. coli* zeigten *relA*, *relC* und *rpoB* als die drei häufigsten betroffenen Genloci, die einen relaxierten Phänotyp lieferten. Sie konnten folgenden Proteinen zugeordnet werden:

1. *relA* kodiert RelA, den stringenten Faktor, der die (p)ppGpp-Synthese katalysiert
2. *relC* kodiert das ribosomale Protein L11, das für die RelA vermittelte (p)ppGpp Synthese essentiell ist (Friesen *et al.*, 1974; Parker *et al.*, 1976)
3. *rpoB* kodiert die β -Untereinheit der RNA-Polymerase, an die (p)ppGpp bindet und so die Synthese stabiler RNA reprimiert (Hernandez und Cashel, 1995)

Erst 1988 wurde durch DNA-Sequenzierung der Beweis erbracht, dass das *relA*-Gen für die stringente Kontrolle kodiert (Metzger *et al.*, 1988). In *E. coli* konnte nach dem Entfernen des *relA*-Gens weitere (p)ppGpp-Synthese gemessen werden. Diese Synthese erfolgte als Antwort auf die Limitierung von Kohlenstoff. Die Mutation des zweiten (p)ppGpp-Synthasegenes (Laffler und Gallant, 1974; Hernandez und Bremer, 1991) erzeugte in *E. coli* schließlich einen (p)ppGpp⁰-Phänotyp. Das betreffende Gen trug den Namen *spoT* ((p)ppGpp-Synthetase II).

Auch in *B. subtilis* wurde die Repression der RNA-Synthese beobachtet, und durch Mutagenese eine *rel*-Mutante isoliert (Swanton und Edlin, 1972). Diese Mutante konnte nicht mehr auf Aminosäuremangel mit der Repression der Synthese stabiler RNA reagieren (Gallant und Margason, 1972). Nach der Mutation des *relA*-Gens wurde nur noch eine geringe Menge von (p)ppGpp analysiert. Da die isolierte Mutante von Swanton auch nach Kohlenstoffmangel keine (p)ppGpp-Akkumulation aufweist (Nishino *et al.*, 1979), deutete dies eher auf einen SpoT-Phänotyp hin. Es konnte bei späteren Untersuchungen ein *relA/spoT*-homologes Gen identifiziert werden ((p)ppGpp-Synthetase III). Dieses *relA/spoT*-homologe Gen wurde auch in weiteren Gram-positiven Bakterien identifiziert. Unter anderem in *Streptomyces coelicolor* und *Streptococcus equisimilis* (Chakraborty *et al.*, 1996; Mechold *et al.*, 1996). Aber auch der Gram-negative

Organismus *M. xanthus* besitzt ein *relA/spoT*-homologes Gen. Alle drei unterschiedlichen (p)ppGpp-Synthetasen sind in der Abb. 1.7. dargestellt.

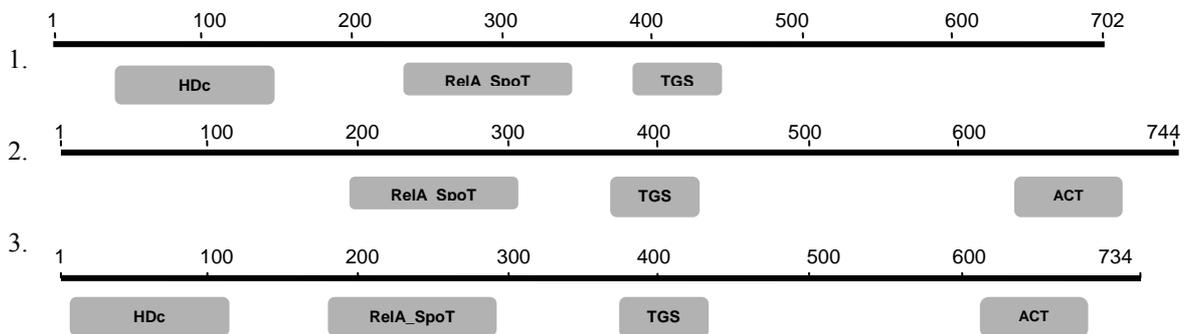


Abb. 1.7.: Grafische Darstellungen der (p)ppGpp Synthetasen mit der Position der unterschiedlichen Domänen: 1. (p)ppGpp Synthetase I (RelA); 2. (p)ppGpp Synthetase II (spoT) und 3. (p)ppGpp Synthetase III (relA/spoT) = Rel

HD-Domäne: Diese Domäne findet man in Enzymen die Phosphohydrolaseaktivität aufweisen. Diese Enzyme sind in der DNA-Synthese, sowie an der Signaltransduktion beteiligt. Bei den hoch konservierten Resten dieser HD-Familie handelt es sich um Aspartat bzw. Histidin-Reste. Solche sind in der Lage eine Verbindung mit mehrwertigen Kationen einzugehen, welche für die Aktivität dieser Proteine notwendig sind.

TGS-Domäne: Diese Domäne wurde nach ThrRS, GTPase und SpoT benannt. Zudem wurde die TGS-Domäne im Aminoterminus der Uridinkinase von *Treponema pallidum* detektiert. Die TGS-Domäne ist eine kleine Domäne aus ~ 50 Aminosäureresten. Bis jetzt gibt es keine direkte Information zur Funktion dieser Domäne. Sie ist jedoch in zwei Typen von Regulatorproteinen integriert, welche zum größten Teil eine Liganden bindende, regulatorische Rolle besitzen.

ACT-Domäne: Diese Domäne ist eine regulatorische Domäne. Man findet sie in den Sequenzen zahlreicher metabolischer Enzyme, die durch Aminosäurekonzentrationen reguliert werden.

RelA_SpoT-Domäne: Diese Domäne findet man in allen ppGpp-Synthetasen. Bei RelA handelt es sich um eine Guanosin 3',5'-bis-pyrophosphatase-Synthetase. Wohin gegen SpoT ein bifunktionales Enzym darstellt, das sowohl ppGpp synthetisieren als auch degradieren kann.

Charakteristisch für die unterschiedlichen (p)ppGpp-Synthetasen ist die unterschiedliche Domänenorganisation. Diese Organisation spiegelt die Aktivität der Proteine wider.

1.5.1. Molekularer Mechanismus der Stringenten Antwort in *M. xanthus*

Sobald *M. xanthus* Nährstoffmangelbedingungen ausgesetzt wird, startet es sein Differenzierungsprogramm, in welchem über 100.000 Zellen aggregieren und einen Fruchtkörper bilden. Einzelne Zellen im Fruchtkörper differenzieren zu umweltresistenten und metabolisch inaktiven Myxosporen. Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Phosphatlimitierung aktivieren in Myxobakterien den Differenzierungsprozess (Dworkin, 1962; Wireman *et al.*, 1977, Manoil und Kaiser, 1980 (I)).

Die stringente Kontrolle kontrolliert mit Hilfe des Signalmoleküls Guanosin-5'-(tri)-di-3'-diphosphat ((p)ppGpp) die ständige Verfügbarkeit der geladenen tRNA Moleküle (Mechold *et al.*, 1996).

Untersucht man die myxobakteriellen Genome von *M. xanthus* und *S. cellulosum* nach (p)ppGpp Synthetasen findet man, wie schon zuvor erwähnt, jeweils eine (p)ppGpp Synthetase III (Abb. 1.8.)

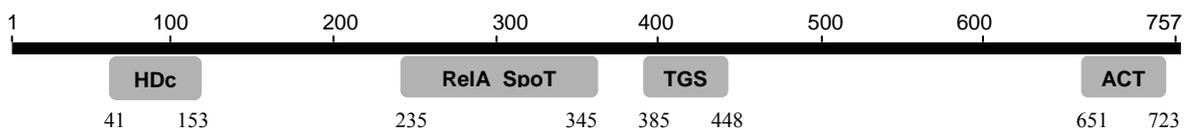


Abb. 1.8.: (p)ppGpp-Synthetase von *S. cellulosum*. Die Zahlen kennzeichnen die Größe der einzelnen Domänen mit Hilfe der Aminosäureposition

Bei der (p)ppGpp Synthetase III handelt es sich um ein RelA/SpoT Paralog, wie es auch in *B. subtilis* und *S. coelicolor* zu finden ist.

Unter Nährstoffmangelbedingungen sind Myxobakterien in der Lage, mit dieser Stresssituation auf zwei unterschiedliche Arten umzugehen. Zum einen besitzen die Zellen die Möglichkeit, die Wachstumsrate soweit zu reduzieren, dass sie mit der verbleibenden Nährstoffmenge zu Recht kommen, des Weiteren können sie aggregieren und Fruchtkörper bilden. Das RelA-Protein in *M. xanthus* wird während Nährstoffmangelbedingungen angeschaltet, (p)ppGpp wird akkumuliert und somit wird die Expression früher Differenzierungsgene in der Zelle initiiert (Singer und Kaiser, 1995).

1.6. Genomprojekt *Sorangium cellulosum* So ce56

Das Genomprojekt *Sorangium cellulosum* So ce56 wurde 2001 vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gestartet und finanziert. Unterstützt und initiiert wurde dieses Projekt vom „GenoMik“ Netzwerk. So ce56 wurde für dieses Projekt aufgrund der Sekundärmetabolite Chivosazol A und Etnangien (Abb. 1.10.) ausgewählt.

welcher mit einem Oxazolrest verbunden ist. Dieser Oxazolrest stammt von der Aminosäure Serin (Abb. 1.10.).

Etnangien konnte zuvor aus *So ce750* isoliert werden. Seine Struktur wurde an der GBF ermittelt und analysiert. Etnangien ist aus einem 22 Makrolactonring mit einem ungesättigten Carbonylseitenstrang aufgebaut (Abb.1.10.).

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Ausgehend von einem mikro- und molekularbiologischen Ansatz sollte in der vorliegenden Arbeit der Zusammenhang zwischen Initiation der Fruchtkörperbildung und Sekundärstoffbildung von *So ce56* analysiert werden. Da über 95 % aller Untersuchungen zur myxobakteriellen Differenzierung an *M. xanthus* durchgeführt wurden, beschränkten sich die bisherigen Kenntnisse überwiegend auf die Familie der *Myxococcaceae* aus der Unterordnung der *Cystobacterineae*.

Hierzu wurde zu Beginn das autoannotierte Genom nach *rel*-homologen Genen untersucht und anschließend eine stringente Mutante mit Hilfe biparentaler Konjugation konstruiert.

Die konstruierte Mutante sollte anschließend in Bezug auf potentielle Differenzierungsdefekte und Sekundärstoffbildungsdefekte analysiert werden.

Ein weiterer interessanter Punkt ist die Induktion der Fruchtkörperbildung bei *S. cellulosum*. Bei *M. xanthus* wird die Differenzierung durch Nährstoffmangelbedingungen, insbesondere durch Aminosäurelimitierung, induziert. Das Hungersignal „(p)ppGpp“ ist dabei an die Expression der ersten Differenzierungsgene gekoppelt. Es soll die Frage beantwortet werden, ob und wenn ja, durch welche Signale (p)ppGpp in *S. cellulosum* gebildet wird und ob auch hier die Expression morphologischer und physiologischer Differenzierungsgene an dieses Signal gekoppelt ist.

Zudem sollen potentielle Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, deren Inaktivierung eine erhöhte oder erniedrigte Syntheseleistung hervorrufen.

2. Material

2.1. Bakterienstämme

2.1.1. Escherichia coli Stämme

Tab.2.1.: verwendete *E.coli* Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
JM 109	F'Episom für filamentöse Phageninfektion; α -Komplementation; <i>lacI^q</i> repressor, <i>recA⁻</i> ; geeignet für M13 und pGEM; <i>e/4⁻(mcrA⁻)</i> ; <i>recA1</i> ; <i>endA1</i> ; <i>gyrA 96</i> ; <i>thi⁻</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k-mk⁻</i>); <i>supE44</i> , <i>relA1</i> ; λ^- ; $\Delta(lac-proAB)$;	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
XL₁blue	$\Delta(mcrA)$; 183 $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$; 173 <i>endA1</i> ; <i>supE 44</i> ; <i>thi-1</i> ; <i>recA 1</i> ; <i>gyrA 96</i> ; <i>relA 1</i> ; <i>lac</i> ; [F' <i>proAB lac^qZ</i> Δ M15Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene
DH5α	F ⁻ ; $\Delta(lacZYA-argF)$, U169 <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k-m_k+)</i> <i>phoA supE44</i> λ^- , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
Top 10	F ⁻ ; <i>mcrA</i> ; $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$; Φ_{80lacZ} Δ M15; $\Delta lacX 74$; <i>recA 1</i> ; <i>deoR</i> ; <i>araD 139</i> ; $\Delta(ara-leu) 7696$; 7(7697) <i>galU</i> ; <i>galK</i> ; <i>rpsL</i> ; (Str ^r); <i>endA 1</i> ; <i>nubG</i>	Stratagene
ET12567	<i>dam13::Tn9</i> , <i>dcm-6 hsdM hsdR</i> , <i>recF143</i> , <i>zjj201 ::Tn10 galK2</i> , <i>galT22 ara-14 lacY1 xyl-5</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>tonA31</i> , <i>rpsL136</i> , <i>hisG4</i> , <i>tsx-78mttl</i> , <i>glnV44F</i>	MacNeil <i>et al.</i> , 1992
ET12567puB307	<i>dam13::Tn9</i> , <i>dcm-6 hsdM hsdR</i> , <i>recF143</i> , <i>zjj201 ::Tn10 galK2</i> , <i>galT22 ara-14 lacY1 xyl-5</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>tonA31</i> , <i>rpsL136</i> , <i>hisG4</i> , <i>tsx-78mttl</i> , <i>glnV44F</i> ; puB307 Derivat von RP1	Luzhetskii <i>et al.</i> , 2001
HB101	F ⁻ Pro ⁻ Leu ⁻ Thi ⁻ (<i>r_k-m_k-</i>) RecA, Sm ^R ; ATCC33694	Jarman, 2000
S17	pJQmp18-Tc ^r :: Δ edaH16	Friedrich <i>et al.</i> , 1981

2.1.2. *S. cellulosum* Stämme

Tab.2.2: verwendete *S. cellulosum* Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>So ce56</i>	Wildtyp, Kan ^R	Pradella <i>et al.</i> , 2002
<i>Soce:relint (Srel)</i>	<i>rel</i> Defekt, Insertionsmutante 723bp; Kan ^R , Hyg ^R	diese Arbeit
<i>Soce:pkn859</i>	<i>pkn859</i> Defekt; Insertionsmutante; 890bp; Kan ^R , Hyg ^R	diese Arbeit

2.1.3. andere Bakterien Stämme

Tab. 2.3: verwendete Kontrollstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>Bacillus subtilis</i> , 168	Wildtyp, trpC2	Anagnostopoulos <i>et al.</i> , 1961
<i>Synechocystis sp. PCC6803</i>	Wildtyp	Kaneko <i>et al.</i> , 1996
<i>Hansenula anomala</i>	Wildtyp (Hefestamm)	Tabachnik <i>et al.</i> , 1953
<i>Micrococcus luthes</i>	Wildtyp	Wieser <i>et al.</i> , 2002

2.2. Plasmide

Tab. 2.4.: verwendete Plasmide in *E. coli*

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pGemT-Vektor	Amp ^r ; linearisiert; vielfache Klonierungstelle flankiert mit den Enzymen <i>Bst</i> ZI, <i>Not</i> I, <i>Eco</i> RI;; Schnellligation 1 Stunde; Blau-weiß Screening; fl <i>origin of replication</i>	Promega
psupHyg (pSUP102)	Hyg ^r , Tet ^r ; Hyg-Kassette aus Ωhyg (Blondelet-Rouault <i>et al.</i> , 1997); Integriert in pJKB10	Pradella <i>et al.</i> , 2002
Zero Blunt [®] - Topo [®] PCR Cloning Kit	Kan ^r ; Zeocin ^r ; Linearisiert; <i>Vaccinia</i> Topoisomerase an 3'-Enden, dadurch „einkleben“ von PCR-Produkten; <i>lacZ-ccdB</i> Fusion, die durch Ligation unterbrochen wird ermöglicht Selektion auf positive Rekombinante;	Invitrogen

2.3. Zellanzucht

2.3.1. Bakterienkultur- Medien und – Agarplatten

2.3.1.1. LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) (*E. coli*)

10 g	Pepton (Trypton)
5 g	Hefeextrakt
10 g	Natriumchlorid (17.1 mM)
ad 1000 ml	ddH ₂ O

Autoklavieren

2.3.1.2. LB-Agarplatten LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto Agar

2.3.1.3. M-Medium (Gerth *et al.*, 2002) (*S. cellulosum*)

1 %	Pepton (Soya)
1 %	Maltose
0,1 %	MgSO ₄ x 7H ₂ O
0,1 %	CaCl ₂
50 mM	HEPES (11,9 mg/ml)
8 µg/ml	Fe-EDTA

auf pH 7,2 einstellen; Autoklavieren

2.3.1.4. M-Agarplatten 400 ml M-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto Agar

2.3.1.5. P-Medium (*S. cellulosum*)

0,1	%	Probion
0,2	%	Pepton
0,05	%	MgSO ₄ x 7H ₂ O
0,5	%	Stärke
0,05	%	CaCl ₂
50	mM	HEPES (11,9 mg/ml)

auf pH 7,2 einstellen; Autoklavieren

2.3.1.6. **P-Agarplatten** 400 ml P-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto Agar

2.3.1.7. **SM-Medium** (*S. cellulosum*)

0,5	%	Asparagin
0,05	%	MgSO ₄ x 7H ₂ O
100	mM	HEPES (11,9 mg/ml)
10	µg/ml	Fe-EDTA

auf pH 7,0 einstellen; Autoklavieren; anschließend Zugabe von

1	ml	5	%	CaCl ₂
1	ml	0,6	%	K ₂ HPO ₄

Sowie als C-Quelle:

SC	Cellobiose	5 ml einer 20 %igen Stammlösung
SG	Glukose	5 ml einer 20 %igen Stammlösung
SM	Maltose	5 ml einer 20 %igen Stammlösung
SMA	D-Mannose	5 ml einer 20 %igen Stammlösung

2.3.1.8. **SM-Agarplatten** 400 ml SM-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto Agar

2.3.1.9. **SM-Diff-Medium** (*S. cellulosum*)

0,3	%	Asparagin
0,05	%	MgSO ₄ x 7H ₂ O
100	mM	HEPES (11,9 mg/ml)
10	µg/ml	Fe-EDTA
ad	100	ml ddH ₂ O

auf pH 7,0 einstellen; Autoklavieren; anschließend Zugabe von

1	ml	5	%	CaCl ₂
1	ml	0,6	%	K ₂ HPO ₄

Sowie als C-Quelle:

SC	Cellobiose	5 ml einer 1 %igen Stammlösung
SG	Glukose	5 ml einer 1 %igen Stammlösung
SM	Maltose	5 ml einer 1 %igen Stammlösung

SMA D-Mannose 5 ml einer 1 %igen Stammlösung

2.3.1.10. SM-Diff-Agarplatten

400 ml SM-Diff-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto Agar

2.3.1.11. P-Diff-Medium (*S. cellulosum*)

0,001	%	Probion
0,002	%	Pepton
0,05	%	MgSO ₄ x 7H ₂ O
0,005	%	Stärke
0,05	%	CaCl ₂
50	mM	HEPES (11,9 g/l)

auf pH 7,2 einstellen; Autoklavieren

2.3.1.12. P-Diff-Agarplatten

400 ml P-Diff-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto Agar

2.3.1.13. M-Diff-Medium (*S. cellulosum*)

0,01	%	Pepton (Soya)
0,01	%	Maltose
0,1	%	MgSO ₄ x 7H ₂ O
0,1	%	CaCl ₂
50	mM	HEPES (11,9 mg/ml)
8	mg/l	Fe-EDTA

auf pH 7,2 einstellen; Autoklavieren

2.3.1.14. M-Diff-Agarplatten

400 ml M-Diff-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto Agar

2.3.1.15. **C/2 Medium abgewandelt** (*S. cellulosum*)

0,5 %	Chitin
0,1 %	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
0,5 mg/l	Vitamin B12
1,5 % (w/v)	Agar (Difco)

Vor dem Autoklavieren wird mit 10 % KOH ein pH von 7,2 eingestellt.

2.3.2. **Antibiotika**

Tab. 2.5: weitere Medien-Zusätze

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration <i>E. coli</i>	Endkonzentration <i>S. cellulosum</i>
Ampicillin, Roth	25 mg/ml in ddH ₂ O	50-100 µg/ml	50 µg/ml
Kanamycin, Serva, Gibco	25 mg/ml in ddH ₂ O	50-100 µg/ml	50-100 µg/ml
Hygromycin, Invitrogen	10 mg/ml in ddH ₂ O	50-100 µg/ml	50-100 µg/ml

2.4. **Oligonukleotide (Roth)****M13F**

5'>TGT AAA ACG ACG GCC AG< 3'

Dieses Oligonukleotid ist spezifisch für die pGemT-Vektoren oder pZeroTM2-Vektoren;
17nt; St~ 47°C

M13R

5'>CAG GAA ACA GCT ATG AC< 3'

Dieses Oligonukleotid ist spezifisch für die pGemT-Vektoren oder pZeroTM2-Vektoren;
17nt; Sr~ 45°C

relint+

5'>CGG ACG CTC GAG TTC ATG< 3'

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zu einem internen 3' Bereich vom *rel*-Gen;

18nt; $S_t \sim 53^\circ\text{C}$

relint-

5'>GTG TGC GTC CAG CCG CTC< 3'

Dieses Oligonucleotid ist komplementär zu einem internen 5' Bereich vom *rel*-Gen;

18nt; $S_t \sim 57^\circ\text{C}$

relup1

5'>CAT CGT CGC CGG CGA GCG GC< 3'

Dieses Oligonukleotid ist 713 *codons* oberhalb des *rel*-Gens angelagert und ist

komplementär zum 3' Bereich des *rel*-Gens in *Soce56*; 20 nt; $S_t \sim 67^\circ\text{C}$

reldown1

5'>CGT GGA ACG CCG ATC CCC< 3'

Dieses Oligonukleotid ist 6 *codons* unterhalb des *rel*-Gens angelagert und ist

komplementär zum 5' Bereich des *rel*-Gens in *So ce56*; 18 nt; $S_t \sim 57^\circ\text{C}$

reldown2

5'>CGA AGC TCG GGA GCT CTA GC< 3'

Dieses Oligonukleotid ist 858 *codons* unterhalb des *rel*-Gens angelagert und ist

komplementär zum 5' Bereich des *rel*-Gens in *So ce56*; 20 nt; $S_t \sim 61^\circ\text{C}$

Srelprom up +SpeI

5'>CTC ACG CGC GGC ATC CCG <3'

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zum oberen 3' Bereich des *rel*-Gens in *So*

ce56; 18 nt; $S_t \sim 59^\circ\text{C}$; führt *SpeI*- Schnittstelle ein

rell

5'>TGT AGC TCT TGT CGA AGC< 3'

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zum 5' Bereich des *rel*-Gens in *So ce56*; 18 nt;

$S_t \sim 54^\circ\text{C}$

rel2

5'>GGA GGT GGC GTT CCT CG<3'

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zum 3' Bereich des *rel*-Gens in *So ce56*; 17 nt;

$S_t \sim 58^\circ\text{C}$

rel4

5'>GAG CTT CTA GGC GTT GA< 3'

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zum 5' Bereich des *rel*-Gens in *So ce56*; 17 nt; $S_t \sim 47^\circ\text{C}$

chivo156_For

5'>GGA GAC CCG ATC GAG GTG GA< 3'

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zum 3' Bereich des ersten *Chivosazole*-Gens im Chivosazol-Cluster von *So ce56*; 20 nt; $S_t \sim 63^\circ\text{C}$, für Real-Time RT-PCR Analysen; Primer aus Saarbrücken

chivo156_Rev

5'>GCG TGC CCG ATG TTG GTC TTC< 3'

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zum 5' Bereich des ersten *Chivosazole*-Gens im Chivosazol-Cluster von *So ce56*; 21 nt; $S_t \sim 63^\circ\text{C}$, für Real-Time RT-PCR Analysen, Primer aus Saarbrücken

asgF prom+ (1-20)

5'>ACC GCC GTG GAC GGG AAC CT< 3'

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zum 3' Bereich des *asgA*-Gens in *So ce56*; 20 nt; $S_t \sim 63^\circ\text{C}$, besitzt am N-Terminus einen Biotinschwanz

asgF prom- (500-520)

5'>GCG CGG TTC CAT CGG AGT CA< 3'

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zum 5' Bereich des *asgA*-Gens in *So ce56*; 20 nt; $S_t \sim 61^\circ\text{C}$, besitzt am N-Terminus einen Biotinschwanz

pknH 560up

5'>CAC AAC GAA GCC GCG AGG< 3'

Dieses Oligonukleotid ist 560 *codons* oberhalb des *pkn859*-Gens angelagert und ist komplementär zum 3' Bereich in *So ce56*; 18 nt; $S_t \sim 55^\circ\text{C}$

pknH 550down

5'>CTG AGC AGC AGG GCA AGC< 3'

Dieses Oligonukleotid ist angelagert 550 *codons* unterhalb des *pkn859*-Gens und ist komplementär zum 5' Bereich in *So ce56*; 18 nt; $S_t \sim 55^\circ\text{C}$

pknHint+

5'>CGC GTT GAT CAC GCC CAC< 3'

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zum 3' Bereich des *pkn859*-Gens in *So ce56*; 18 nt; $S_t \sim 55^\circ\text{C}$

pknH2+

5`>CCC TGT TCT CGC GCA TGG<3`

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zum 3`Bereich des *pkn859*-Gens in *So ce56*;
18 nt; $S_t \sim 55^\circ\text{C}$ (Invitrogen)

pknHint-

5`>CTC GAG CTT GCG GGT GAG< 3`

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zum 5`Bereich des *pkn859*-Gens in *So ce56*;
18 nt; $S_t \sim 55^\circ\text{C}$

pknHstartBamHI

5`>TTC GGA TCC GAG CGC GCG AAT TCA GCG< 3`

Dieses Oligonukleotid is komplementär zum 3`Bereich des *pkn859*-Gens in *So ce56*; 18
nt; $S_t \sim 55^\circ\text{C}$, fügt eine *BamHI* Schnittstelle ein

pknHstopHindIII

5`>CCC AAG CTT GTT GCG CTC GGT CGC GT< 3`

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zum 3`Bereich des *pkn859*-Gens in *So ce56*;
26 nt; $S_t \sim 72^\circ\text{C}$, fügt eine *HindIII* Schnittstelle ein

16S+2

5`>GGT AGT CCA CGC CGT AAA CG< 3`

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zum 3`Bereich von 16S in *So ce56*; 20 nt; $S_t \sim$
 59°C

16S-

5`>GAC GGG CGG TGT GTA CAA GG< 3`

Dieses Oligonukleotid ist komplementär zum 5`Bereich von 16S in *So ce56*; 20 nt; $S_t \sim$
 61°C

2.5. Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Kälbern (CIAP)	MBI Fermentas
Alkalische Phosphatase aus Shrimps (SAP)	USB
Klenow (2 U/ μl)	MBI Fermentas
DNase	MBI Fermentas
Fail Safe TM PCR Enzym Mix (Polymerase) (2,5 U/ μl)	Biozym
Restriktionsendonukleasen	NewEngland Biolabs
	MBI Fermentas
RNaseA	MBI Fermentas

RNasin	MBI Fermentas
SYBR-Green	J. Glaeser
Taq Polymerase	MBI Fermentas
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
T4-DNA-Polynukleotidkinase (PNK)	NewEnglandBiolabs, MBI Fermentas
Proteinase K (20mg/ml)	Qiagen, MBI Fermentas

2.6. Antikörper

- | | |
|--|----------------|
| 1. Antikörper: (anti-Rabbit Protein-NtcA-Antikörper) | K. Forchhammer |
| (anti RelA-Kaninchenserum) | M. Wendrich |
| 2. Antikörper: (anti-Rabbit IgG (FC) POD-Konjugat) | Biorad |

2.7. Molekularbiologische Kits

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR purification Kit	Qiagen
ZERO Blunt [®] TOPO [®] PCR Cloning Kit	Invitrogen
pGem-T-Vector [®] PCR Cloning Kit	Promega
E.Z.N.A High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
Plasmid Miniprep Kit II	Peqlab
QIAGEN One-Step RT-PCR Kit	Qiagen
FailSafe [™] PCR PreMIX Selection Kit	Biozym
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
Lumi-Light Western Blotting substrate	Roche
LIVE/DEAD [®] BacLight [™] Bacterial Viability Kit	Molecular Probes

2.8. Größenstandards DNA/Proteine

DNA 1kb-Leiter	MBI Fermentas
Prestained Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas

2.9. Puffer und Lösungen

2.9.1. Allgemeine NEB Puffer für Restriktionsendonukleasen

Die Enzympuffer werden vom Hersteller als 10x Puffer geliefert und so verwendet, dass sie im Reaktionsansatz als 1x Puffer vorliegen.

Falls es das Enzym erfordert, wird 10fach BSA (Bovines Serum Albumin) (1 mg/ml) zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 100 µg/ml BSA erreicht wird.

2.9.2. Allgemeine Fermentas Puffer für Restriktionsendonukleasen

Die Puffer liegen 10x konzentriert vor und enthalten bereits BSA (1 mg/ml), so dass im 1x konzentrierten Puffer eine Endkonzentration von 100 µg/ml BSA erreicht wird.

DTT muss –falls erforderlich- zugesetzt werden.

2.9.3. Auftragspuffer

2.9.3.1. DNA Auftragspuffer

4	M	Harnstoff
5	%	Saccharose
50	mM	EDTA
0,1	%	Bromphenolblau
0,1	%	Xylencyanol
pH 7,0		

2.9.3.2. 5 x SDS Auftragspuffer für SDS-PAGE

0,5	ml Glycerin
0,3	ml Bromphenolblau (0,1%)
0,4	ml SDS (10 %)
0,2	ml β-Mercaptoethanol
0,25	ml 4x Sammelgelpuffer
ad	2 ml ddH ₂ O

2.9.4. Puffer für die Elektrophorese

2.9.4.1. 10 x TBE	108	g	Tris- HCl
	55	g	Borat
	25	mM	EDTA
	ad 1000	ml	ddH ₂ O
	pH 8,3		

2.9.5. Puffer für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)**2.9.5.1. 10x Tris-Glycin-SDS Puffer**

250	mM	Tris
1,92	M	Glycin
1	%	SDS

2.9.6. Puffer und Lösungen für die Semi-Dry Western-Blot Analyse**2.9.6.1. TBS**

	40	mM	Tris-HCl, pH 7,4
	9	g	NaCl
ad	2000	ml	ddH ₂ O

2.9.6.2. Puffer Anode A

	18,17	g	Tris
	100	ml	Methanol
ad	500	ml	ddH ₂ O

2.9.6.3. Puffer Anode B

	1,51	g	Tris
	100	ml	Methanol
ad 500		ml	ddH ₂ O

2.9.6.4. Puffer Kathode C

	1,51	g	Tris	
	100	ml	Methanol	
	2,62	g	ϵ -Amino-n-caproic- Säure	
ad	500	ml	ddH ₂ O	

2.9.7. Zellaufbruchpuffer

	50	mM	Tris-HCl pH 7,5	
	1	mM	EDTA	
	5	mM	MnCl ₂	
	5	mM	MgCl ₂	
	1	mM	Benzamidin	

2.9.8. Puffer für Northern-Blot**2.9.8.1. 20x SSC**

	173,3	g	NaCl	
	88,2	g	Natriumcitrat	
ad	1000	ml	ddH ₂ O	

2.10. Lösungen für die Minipräparation

2.10.1. Lösung I	50	mM	Glucose	
	25	mM	Tris-HCl(pH 8,0)	10
	mM		EDTA	

autoklavieren; bei 4°C aufbewahren; vor dem Gebrauch, Zugabe von 100 µg/ml RNase

2.10.2. Lösung II

2,0	N	NaOH
1	%	SDS

2.10.3. Lösung III

60	ml	Kalium-Acetat (3 M)
11,5	ml	Eisessig
ad 100	ml	ddH ₂ O

nicht autoklavieren; bei 4°C aufbewahren

2.11. Lösungen für die Isolierung chromosomaler DNA**2.11.1. TE-Puffer**

1	mM	EDTA
10	mM	Tris HCL (pH 8,0)

autoklavieren

2.11.2. CTAB-Solution

2,05	g	NaCl
5	g	Cetyl-Trimethyl- Ammonium-Bromid
ad 50	ml	mit ddH ₂ O

auffüllen, erhitzen auf 65°C; anschließend aufbewahren bei RT

2.12. Lösungen für Isolierung von Gesamt-RNA**2.12.1. AE-Puffer**

40	mM	Na-Acetat
1	mM	EDTA
ad 100	ml	ddH ₂ O

pH 5,5

2.12.2. DNase-Puffer

	40	mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	6	mg	MgCl ₂
ad	100	ml	ddH ₂ O

2.13. Lösungen für 2D-PAGE**2.13.1. Harnstofflysepuffer**

	7	M	Harnstoff
	2	M	Thioharnstoff
	1	%	Triton X-100
	1	%	DTT
	0,02	%	Pefablock (ersatzweise 14 mg PMSF)

aliquotieren, bei -80 °C aufbewahren

2.13.2. Rehydrierungs-Lösung

	7	M	Harnstoff
	2	M	Thioharnstoff
	0,5	%	Triton X-100
	0,2	%	DTT
	0,5	%	Servalyte

einige Körnchen Bromphenolblau; aliquotieren, bei -80 °C aufbewahren

2.13.3. Äquilibrierlösung-Grundlösung

		50	mM	Tris/HCl (pH 8,8)
		6	M	Harnstoff
		30	%	Glycerin
		3	%	SDS
Lösung 1:	+	10	mg/ml	DTT
Lösung 2:	+	25	mg/ml	Iodacetamid
				einige Körnchen Bromphenolblau

2.14. Puffer für die Heparinsäule

2.14.1. Puffer A

50	mM	Na-Phosphat pH 6,8
1	mM	Benzamidin

2.14.2. Puffer B

50	mM	Na-Phosphat pH 6,8
1	mM	Benzamidin
2	M	NaCl

2.15. Puffer für die Präparation Hitzeschock kompetenter Zellen

2.15.1. TFB 1 Puffer

100	mM	RbCl
50	mM	MnCl ₂
30	mM	Kaliumacetat
10	mM	CaCl ₂
15	%	Glycerol

auf pH 5,8 einstellen; sterilfiltrieren

2.15.2. TFB 2 Puffer

10	mM	MOPS
10	mM	RbCl
75	mM	CaCl ₂
15	%	Glycerol

mit KOH auf pH 8,0 einstellen; sterilfiltrieren

2.16. Lösungen zum Silberfärben von Polyacrylamidgelen

2.16.1. Fixier-Lösung

	500	ml	Methanol
	120	ml	Essigsäure
	0,5	ml	Formaldehyd
ad	1000	ml	ddH ₂ O

2.16.2. Thiosulfat Lösung

	0,2	g	Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O
ad	1000	ml	ddH ₂ O

2.16.3. Silbernitrat-Lösung (immer frisch zubereiten)

	100	mg	AgNO ₃
ad	50	ml	ddH ₂ O

Handschuhe tragen!

2.16.4. Entwickler

	100	ml	Na ₂ S ₂ O ₃ 1x Lösung
ad	1000	ml	ddH ₂ O

2.16.5. Stop-Lösung

	18.6	g	EDTA (50mM)
ad	1000	ml	ddH ₂ O

2.17. Coomassie-Färbelösung für SDS-PAGE

2.17.1. Färbelösung

50	% (v/v)	Methanol
10	% (v/v)	Essigsäure
0,06	% (v/v)	Brilliant blueG250

2.17.2. Entfärbelösung

7,5	% (v/v)	Essigsäure
5	% (v/v)	Methanol

2.18. Puffer für eine Polymerase-Kettenreaktion

2.18.1. 10x Taq-Puffer

100	mM	Tris-HCl, pH 9
500	mM	KCl
15	mM	MgCl ₂
1	%	Triton X-100

Der Puffer sollte einen pH-Wert von 9 haben und wird bei 4 °C gelagert

2.18.2. 10x Pfu-Puffer

200	mM	Tris-HCl, pH 8,8
100	mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
100	mM	KCl
1	%	Triton X-100
1	mg/ml	BSA
20	mM	MgSO ₄

2.19. Lösungen für Streptavidin-Biotin-*fishing*

2.19.1. 2x TGED

20	mM	Tris-HCl, pH 8,0
1	mM	EDTA
10	%	Glycerin
1	mM	DTT
100	mM	NaCl
20	µl	Poly (ID), ersatzweise Lachssperma, 10 mg/ml

2.19.2. Waschlösung

15	ml	2x TGED
300	µl	Triton X-100

2.19.3. Elutionslösung

15	ml	2x TGED
300-500	mM	NaCl

2.20. Lösungen zur Probenvorbereitung für MALDI-TOF

2.20.1. Coomassie gefärbte Spots

200-400	μl	50% Acetonitril
10	mM	NH ₄ HCO ₃

2.20.2. Silber gefärbte Spots

Lösung A	30	mM	Kaliumhexacyanoferrat
Lösung B	100	mM	Na-Thiosulfat x 5 H ₂ O
Lösung C	200	mM	Ammoniumhydrogencarbonat

2.21. Radioaktive Nukleotide

- zur Endmarkierung von Oligonukleotiden (Hybridisierung) und zur Phosphoprotein-Markierung	[γ- ³² P]-ATP (20μCi)	Amersham
- Markierung aktiver Proteinexpression	[α- ³⁵ S]-dATP	Amersham

2.22. Chemikalien

Agarose	FMC, Rockland; Comprex; Biozyme
Ammoniumpersulfat (APS)	Aldrich
Aspartat	Sigma
ATP, ADP, AMP	Sigma
Bacto-Agar	Difco
Benzamidine	Sigma
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
Calciumchlorid	Merck
D (+)-Cellobiose	Fulka
Chloroform	Merck
Denhardts	
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma
Eisen-EDTA	Sigma
Ficoll	Pharmacia

Formaldehyd	Sigma
Formamid	Sigma, Merck
GDP, GMP, GTP	Sigma
Harnstoff	Sigma
Hefeextrakt	Gibco
Kaliumhydroxyd	Ferak
L-[³⁵ S] Methionin	Biotech
Magnesiumacetat	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
α -Methylglykosid	Fulka
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumsulfat	Merck
DL-Norvalin	Fulka
ppGpp	Uni Düsseldorf
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma
Procion	Mercor M
Sepharose 4B	Pharmacia
Thioharnstoff	Sigma
Tween 20	Serva
Alle weiteren Chemikalien	Roth

2.23. Spezielle Artikel und Geräte

3 mm und 6 mm-Papier	Whatman
Blot-Apparatur	Keutz
Chromatographieanlage BioLogic HR System	Biorad
Dialyseschläuche	Roth
Digitalkamara	NikonDolpix995
Elektrophoresegelekkammern	Biorad
Elektroporation <i>E.coli</i> Pulser	Biorad
Elektroporationsküvetten, 0,2 cm	Biorad; Peqlab
Geltrockner	Biorad
Glasperlen, 0,1-0,11 mm Ø	B.Braun, Biotech

	International GmbH
Gene Amp PCR System 2400	Perkin-Elmer
Genetic Analyzer 310 (Sequenzierungsgerät)	ABI
Klettmeter	Scienceware
Klettkolben	Scienceware
Kühlzentrifuge RC-5B	Sorvall
Kühlzentrifuge RC-5C Plus	Sorvall
Mikroskop	Nikon Eclipse E200
Nitrocellulose-Membran 0,45 µm	Schleicher & Schnell, BioScience
pH-Meter cG820	Schott Geräte
Photometer	
PVDF-Membran 0,45µm	Roche
Reinstwasseranlage Typ Hp6 UV/UF	TKA
Ribolyser	Hybaid-AGS, Heidelberg
Röntgenfilmentwickler OPTIMAX, X-ray film processor Typ TR	PROTEC, Medizintechnik GmbH & Co KG
Sepharose 4B	Pharmacia
Speed-Vac-Concentrator (Vakuumzentrifuge)	Savant
Spektralphotometer (Ultraspec 3000pro)	Pharmacia Biotech
Sterilfilter, 0,2 µm	Nalgene
Stereoskop	Nikon SMZ800
Tischzentrifuge Biofuge 13	HeraeusSepatech
Ultraschallgerät Sonoplus GM70 (Sonifier)	Bandelin
UV-Crosslinker-Apparatur (UV-Stratalinker 1800)	Stratagene
Videodokumentationsanlage für Gele	Herolab
XAD-16	Rohm and Haas
Zählkammer	Thoma

3. Methoden

3.1. Mikrobiologische Methoden

3.1.1. Herstellung von Plattenkulturen

Zur Herstellung von Plattenkulturen werden die Bakterien unter sterilen Bedingungen mit einer Impföse bzw. mit einem sterilen Zahnstocher auf einer LB-Agarplatte (*E. coli*, Sambrook *et al.*, 1989/ Luria Bertani) oder einer M-, SM- oder, P-Platte (*S. cellulorum Kan^R*) mit den dazu vorgesehenen Antibiotika ausgestrichen bzw. auf eine Platte getropft. Anschließend wird *E. coli* bei 37 °C für 24 Stunden und *S. cellulorum* bei 32 °C für 2-3 Tage im Brutschrank/-raum inkubiert.

3.1.2. Kultivierung von *Escherichia coli*

E. coli Flüssigkulturen werden bei 37 °C aerob unter Schütteln bei ca. 180 rpm (dies gewährleistet eine ausreichende Belüftung) in LB-Medium mit den dafür nötigen Antibiotika und Supplementen kultiviert. Das Animpfen erfolgt mittels einer sterilen Impföse oder eines sterilen Zahnstochers.

Die Generationszeit der Bakterien beträgt ungefähr 30 Minuten. Eine Übernachtskultur besitzt eine Keimzahl von circa 2×10^9 Zellen/ml.

Die zur Selektion zugegebenen Antibiotika verhindern, dass die Zellen mit plasmidgekoppelter Resistenz diese während der Zellteilung wieder verlieren.

Die Sterilität gewährleistet ein Bunsenbrenner, der zum Abflammen der Impföse und der Glaswaren genutzt wird.

3.1.3. Kultivierung von *S. cellulorum*

S. cellulorum Flüssigkulturen werden bei 32 °C unter Schütteln bei ca. 180 rpm in M-Vollmedium, in P-Vollmedium bzw. in SM-(synthetischem) Medium oder in Minimalmedium (SM-Diff, P-Diff) kultiviert, wobei, wenn nötig, Antibiotika und Supplemente in den üblichen Konzentrationen verwendet werden. Die Flüssigkulturen werden für mindestens vier Tage inkubiert.

3.1.4. Bestimmung der Gesamtzellzahl einer Bakterienflüssigkultur

3.1.4.1. OD-Bestimmung

Aus der photometrisch bestimmten optischen Dichte (OD) einer Bakterienkultur lässt sich die Gesamtzellzahl der Kultur errechnen. Diese Möglichkeit besteht, da bei einzelligen Mikroorganismen die optische Dichte parallel zur Zellmasse und damit auch zur Zellzahl ist. Die Methode macht sich den Effekt der Lichtstreuung an den in der Flüssigkultur enthaltenen Zellen zu Nutze. Die OD-Bestimmung einer *E. coli* Kultur oder *S. cellulosum*-Kultur erfolgt bei einer Wellenlänge von 600 nm. Als Nullwert dient zellfreies Medium. Ein gemessener Wert von 1 bei *E.coli* entspricht dabei etwa 5×10^8 Zellen/ml. Allerdings kann bei dieser Methode nicht zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden, so dass die Lebendzellzahl geringer sein kann.

3.1.4.2. Klettmeter

Das Klettmeter ist ein photoelektrisches Colorimeter. Es nutzt spezielle Lichtfilter von 380nm bis 740nm. Die Skalabeschriftung ist direkt proportional zur der Konzentration nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

3.1.4.3. Zählkammer

Die in der Bakteriologie gebräuchlichste Zählkammer trägt eine Netzteilung nach Thoma. Das Zählfeld ist hier in 16 Großquadrate eingeteilt. Unter dem Mikroskop lässt sich erkennen, dass jedes Großquadrat aus 16 Kleinquadraten besteht. Die Kleinquadrate haben eine Seitenlänge von 0,05 mm. Da zwischen dem korrekt aufgelegten eingeschliffenen Deckglas und dem Gitternetz ein Abstand von 0,1 mm besteht, ergibt sich folgendes Volumen über dem Kleinquadrat:

$$0,05 \text{ mm} \times 0,05 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,00025 \text{ mm}^3$$

Dieses Volumen muss mit dem so genannten Kammerfaktor von 4×10^6 multipliziert werden, um auf die übliche Bezugsgröße von 1 ml (= 1 cm^3) zu kommen.

Für die Bestimmung gilt also:

Durchschnittliche Zahl der Bakterien pro Kleinquadrat multipliziert mit 4×10^6 ergibt die Bakterienzahl pro ml.

In der vorliegenden Arbeit dient uns die Zählkammer zum Auszählen der Zellen und der Sporen nach Ultraschall-Behandlung.

3.1.5. Erstellung einer Wachstumskurve von *S. cellulorum* -Bakterienkultur

Um das Wachstum einer *S. cellulorum*-Kultur bei unterschiedlichen Bedingungen (z.B. Vollmedium, Minimalmedium, synthetischem Medium etc.) zu untersuchen, werden die Kulturen auf eine optische Dichte von 10-20 Klett bzw. 0,4 OD_{600nm} eingestellt. Die Kulturen werden unter den zu untersuchenden Wachstumsbedingungen inkubiert. Soll eine Wachstumskurve mit Minimalmedium erstellt werden, wird die Bakterienkultur schon im Vorfeld für einen Tag in diesem Medium kultiviert, damit die Bakterien sich an das Medium gewöhnen können und die Nährstoffe aus dem Vollmedium abgebaut werden.

Ausgehend vom Zeitpunkt t_0 wird bei einem Vollmedium alle 12 Stunden (alle 20 Stunden bei Minimalmedium) ein Klettwert bzw. OD_{600nm}-Werten der Bakterien-Kulturen gemessen. Zur grafischen Darstellung der Wachstumskurve wird in halblogarithmischer Skalierung der Klettwert gegen die Zeit aufgetragen.

3.1.6. Bestimmung der Verdopplungszeit t_d einer Bakterienkultur

Um die Verdopplungszeit t_d zu berechnen, wird der Klettwert bestimmt und halblogarithmisch gegen die Zeit grafisch aufgetragen. Es ergibt sich bei exponentiellen Wachstum eine Gerade, deren Steigung

$(y_2 - y_1) / (x_2 - x_1)$ der Wachstumsrate μ
entspricht

Mit Hilfe der Formel

$$t_d = \ln 2 / \mu$$

lässt sich die Verdopplungszeit t_d ermitteln.

3.1.7. Herstellung einer Bakteriendauerkultur

Um *E. coli*- oder *S. cellulorum*-Kulturen über einen längeren Zeitraum aufbewahren zu können, werden Dauerkulturen angelegt. Dazu werden von einer über Nacht bzw. einer in zwei bis drei Tagen gewachsenen Kultur 0,9 ml in Kryoröhrchen überführt und 0,1 ml

DMSO zugegeben. DMSO wird als Gefrierschutzmittel eingesetzt, da es als stark polare Verbindung Wasser bindet und somit Makromoleküle stabilisiert. In den Zellen wird dadurch der Wasserentzug, die Konzentration der Elektrolyte und die Bildung von Eiskristallen verhindert. Diese Kryoröhrchen müssen schnell nach der Zugabe bei -80 °C eingefroren werden, da ansonsten das DMSO die Zellen angreift und zerstört.

3.1.8. Transformation

Unter Transformation von Bakterien versteht man die Einschleusung fremder DNA in eine Bakterienzelle. Für diesen Vorgang werden salzfreie Zellen benötigt.

Man unterscheidet verschiedene physikalische und chemische Methoden der Transformation für *E. coli*. Bei der Elektrotransformation (Elektroporation; physikalische Methode, Dower *et al.*, 1988) kann ein zu hoher Salzgehalt innerhalb der verwendeten Kultur beim Anlegen von elektrischer Spannung zum Kurzschluss führen. Im Gegensatz zur Hitze-Schock-Transformation (RbCl-Transformation; chemische Methode), welche CaCl_2 - oder RbCl-kompetente Zellen benötigen. Diese Zellen besitzen einen hohen Salzgehalt.

3.1.8.1. Herstellung elektro-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung elektro-kompetenter Zellen werden von frisch angelegten Plattenkulturen der verschiedenen *E. coli*-Stämme je eine einzelne Bakterienkolonie in 50 ml LB-Medium (ggf. mit Antibiotikum) steril überimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Am nächsten Tag werden 500 ml LB-Medium mit der Übernachtskultur angeimpft. Nach Erreichen einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,5 bis max. 0,8 (exponentielle Wachstumsphase) werden die Kulturen für 20 min auf Eis abgekühlt und unter sterilen Bedingungen in 250 ml Zentrifugenbecher überführt. Alle nachfolgenden Schritte finden auf Eis bzw. bei 4 °C statt. Die Zellen werden abzentrifugiert (4.000 rpm, 10 min, 4 °C) und zweimal nacheinander in einem Volumen eiskaltem, sterilem Wasser und zweimal in je 30 ml eiskaltem, 10 %igem (w/v) Glycerin gewaschen. Durch das Waschen wird der Salzgehalt der Zellsuspension drastisch reduziert. Die Zellen lassen sich zunehmend schlechter sedimentieren, so dass die Zentrifugationen nach den einzelnen Waschschritten mit stetig steigenden g-Zahlen durchgeführt werden. Anschließend werden die Zellen in 0,5 - 0,75

ml 10 %igem (w/v) Glycerin aufgenommen. Danach werden sie in 40 µl-Volumina aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Zelldichte beträgt nun circa $1-3 \times 10^{10}$ Zellen / ml.

3.1.8.2. Elektroporation

Die Elektroporation erfolgt in einem Elektroporation-Pulser der Firma BioRad Laboratories GmbH München. Pro Elektroporation wurden 40 µl salzfreie Zellen auf Eis aufgetaut mit 0,5-5 µl DNA-Lösung (20-500 ng in H₂O oder TE-Puffer [10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0]) versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 0,2 cm überführt.

Bei der Elektroporation wird die Bakterienmembran durch einen elektrischen Impuls destabilisiert, d.h. durchlässig gemacht. Die Membran wird nun leichter von DNA durchdrungen, und die Zellen werden so transformierbar.

Die Elektroporation erfolgt mit 1,8-2,5 kV für ca. 5 ms. Sofort nach dem Strompuls werden die Zellen mit 1 ml LB-Medium ohne zugesetzte Antibiotika aufgenommen und zum Regenerieren für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Anschließend können die Zellen auf dem entsprechenden Selektivmedium ausplattiert werden.

3.1.8.3. Herstellung Hitzeschock-kompetenter *E. coli*-Zellen

Hier wird das Verfahren nach dem Handbuch *the QIAexpressionist* genutzt. Zur Herstellung von Hitzeschock-kompetenten *E. coli*-Zellen wird von frisch angelegten Plattenkulturen der verschiedenen *E. coli*-Stämme je eine einzelne Bakterienkolonie in 10 ml LB-Medium (ggf. mit Antibiotikum) mit einem sterilen Zahnstocher überimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 1 ml dieser Übernachtskultur wird zu 100 ml vorgewärmtem LB-Medium mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum in einen 250 ml Kolben gegeben und unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600nm} von 0,5 bis maximal 0,8 (exponentielles Wachstum) werden die Kulturen für 5 min auf Eis abgekühlt und unter sterilen Bedingungen in Zentrifugenbecher überführt. Alle nachfolgenden Schritte finden auf Eis bzw. bei 4 °C statt. Die Zellen werden für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand wird vorsichtig dekantiert. Das Pellet wird in 30 ml kaltem TFB1 Puffer resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert.

Danach werden die Zellen wieder für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, und der Überstand wird vorsichtig abgegossen. Das Zellpellet wird nun in 4 ml eiskaltem TFB2

Puffer resuspendiert. Diese Lösung wird in 200 µl Volumina aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.1.8.4. **Hitzeschock Transformation**

Zu 200 µl kompetenten Zellen werden ein bis vier µl (20-500 ng) Fremd-DNA gegeben. Die Mischung wird anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Dabei lagert sich die DNA an die Membran der kompetenten Zellen an. Der Hitzeschock erfolgt, indem die Zellen zunächst für 5 min in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt und dann für 15 min zurück auf Eis gestellt werden. Diese Schritte werden zweimal wiederholt. Anschließend werden die Zellen mit einem ml RT oder vorgewärmten LB-Medium ohne Antibiotika resuspendiert und zur Regeneration für 60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Zellen können auf die entsprechenden Selektivmedien ausplattiert werden.

3.1.9. **Konjugation**

Als Konjugation wird die Übertragung von DNA über eine Cytoplasmabrücke von einer Donorzelle auf eine Empfängerzelle bezeichnet. Die Empfängerzelle wird anschließend als Transkonjugant bezeichnet. Konjugation kann ausschließlich, durch konjugative Plasmide vermittelt werden. Ein gleichzeitig in der Zelle befindliches nicht konjugatives aber mobilisierbares Plasmid kann bei Stattfinden der Konjugation mit übertragen werden. Nicht mobilisierbare Plasmide (die meisten Klonierungsvektoren) und das Chromosom können in einer Konjugation nur dann übertragen werden, wenn sie mit dem konjugativen Plasmid eine physikalische Einheit bilden. Nachgewiesen wurde das Ereignis der Konjugation 1946 von Joshua Lederberg und Edward Tatum (Lederberg, 1996).

3.1.9.1. **Konjugation von *S. cellulosum***

Die Herstellung von Mutanten in *S. cellulosum* ist bisher nur mit Hilfe einer Konjugation möglich. Es wurden 3 verschiedene Strategien der Konjugation verwendet:

1. Biparentale Konjugation: *E. coli* ET12567puB307-pSupHyg:“Insert“
2. Triparentale Konjugation: *E. coli* ET12567-pSupHyg:“Insert“ + *E. coli* HB101
3. Biparentale Konjugation : *E. coli* S17- pSupHyg:“Insert“

Die entsprechenden *E. coli*-Kulturen werden, für die Konjugation, über Nacht in LB-Medium kultiviert und am nächsten Tag mit einer OD_{600nm} von 0,2 in 10 ml LB angeimpft und bei einer OD_{600nm} von 0,8 geerntet. Die geernteten Zellen werden einmal in frischem LB-Medium gewaschen und anschließend auf eine Dichte von 10^{10} Zellen ml^{-1} konzentriert.

S. cellulosum wird für 2-3 Tage in 50 ml P- und M-Medium kultiviert. Für die Konjugation wird die Kultur, bei einer Zelldichte von 5×10^8 ml^{-1} - 10^9 Zellen ml^{-1} geerntet. Das *S. cellulosum* Pellet wird vor der Konjugation zweimal in P- bzw. M-Medium gewaschen und anschließend auf eine Zelldichte von 10^{10} Zellen ml^{-1} konzentriert. Diese Suspension wird jeweils mit 100 μ l der zur Verfügung stehenden, *E. coli*-Kulturen vermischt. Nach dem gründlichen Mischen der Kulturen werden diese auf eine P-Agarplatte getropft und zum Konjugieren für 40 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen in 1ml P-Medium aufgenommen und resuspendiert. Jeweils 350 μ l Suspension werden auf P-Platten mit Hygromycin ausgestrichen. Es bilden sich orangefarbene Kolonien nach bis zu 10 Tagen Inkubation bei 32 °C. Diese werden in 5 ml M-Medium angeimpft und durch PCR überprüft.

3.2. Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.2.1. Behandlung von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Geräte und Lösungen werden für 20 min bei 121 °C autoklaviert, um Nukleasen zu inaktivieren. Nicht hitzestabile Geräte werden mit 70%igem (w/v) Ethanol gespült, hitzelabile Lösungen werden sterilfiltriert.

3.2.2. Plasmid-Isolierung

Für die Isolierung von Plasmiden werden die Zellen durch Lyse in Gegenwart von SDS (Natriumdodecylsulfat) bei alkalischem pH-Wert aufgeschlossen (Birnboim und Doly, 1979). Das eingesetzte SDS denaturiert zelluläre Proteine sowie chromosomale und Plasmid-DNA. Durch Zugabe von Kaliumacetat wird die Lösung neutralisiert. Unter den hohen Salzkonzentrationen renaturiert die Plasmid-DNA, die somit von der chromosomalen DNA getrennt werden kann. Diese wird zusammen mit anderen zellulären Bestandteilen präzipitiert. Plasmide variieren in der Anzahl der Kopien, mit der sie in einer Zelle vorliegen, so dass man zwischen *high copy*, *low copy* und *very low copy* Plasmiden

unterscheiden kann. Abhängig vom jeweiligen *origin of replication* unterscheidet man zwischen *high copy* Plasmiden mit 300 bis 1.000 Kopien pro Zelle, *low copy* Plasmiden, die mit weniger als 200 Kopien pro Zelle vorliegen und *very low copy* Plasmiden, deren Kopienzahl weniger als 10 pro Zelle beträgt.

3.2.2.1. Plasmid-Minipräparation

Hierbei wird Plasmid-DNA in kleinem Maßstab isoliert. Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* werden 2 x 1,5 ml einer 5 ml Übernachtskultur für 1 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen werden in 100 µl kalter Lösung I durch vortexen oder vorsichtiges Auf- und Abziehen mit Hilfe der Pipette resuspendiert. Danach werden 200 µl Lösung II zugegeben, die Suspension 4 bis 6 Mal invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit erfolgt die Lyse der Bakterienzellen, was an der zähen Konsistenz zu erkennen ist. Nach Zugabe von 150 µl Lösung III wird der Ansatz erneut geschüttelt. Es bildet sich weißer Niederschlag, der durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 min sedimentiert wird. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt und noch einmal erneut für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um allen Niederschlag zu entfernen. Zum Überstand wird anschließend mit 1/10 Volumen (40 µl) 3 M Natrium-Acetat (pH 5,2) sowie 1 ml eiskalter, 100%iger Ethanol zur Fällung zugefügt. Der Ansatz wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder für mindestens 30 min bei -20 °C inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm wird das Präzipitat mit 100 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die gefällte Plasmid-DNA wird für 3-5 min bei Raumtemperatur in der *speed-vac* getrocknet und danach in 50 µl ddH₂O, EB- oder TE-Puffer aufgenommen.

3.2.2.2. Plasmid-Minipräparation nach Qiagen

Für die Plasmid-Minipräparation nach Qiagen wird das Protokoll für die Reinigung von Plasmid-DNA der Firma Qiagen und die in diesem Kit enthaltenen Puffer und Säulen verwendet. Das *QIAprep Miniprep* Verfahren basiert auf der alkalischen Lyse von Bakterienzellen durch selektive Adsorption von DNA unter Hochsalzbedingungen auf eine Silica-Gel Membran. Die Elution erfolgt mit Nidrigsalzpuffer.

Durchführung

Es werden 2 x 1,5 ml einer Übernachtskultur für je 3 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Die pelletierten Bakterienzellen werden dann in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 250 µl Puffer P2 und N3 wie in der Anleitung beschrieben. Die Suspension trübt sich und es bildet sich weißer Niederschlag. Der Ansatz wird dann 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Es formt sich ein kompaktes weißes Pellet. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, wird auf eine *spin column* pipettiert, die sich in einem 2 ml Auffang-Gefäß befindet. Nach 30–60 sec Zentrifugation bei 13.000 rpm wird der Durchfluss verworfen, die Säule mit 500 µl PB Puffer beladen und erneut zentrifugiert. Auch dieser Durchfluss wird verworfen und es folgt ein weiterer Waschschrift mit 750 µl PE Puffer. Um verbliebene Puffer- und Ethanolreste zu entfernen, die ansonsten enzymatische Reaktionen (z.B. Restriktionen) inhibieren können, wird für weitere 60 sec zentrifugiert. Die Säule wird in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Elution werden 50 µl ddH₂O, EB Puffer (10 mM Tris HCl; pH 8,5) oder TE-Puffer (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) genau in die Mitte der Membran platziert und nach einminütiger Inkubation wird für weitere 60 sec zentrifugiert. Um eventuell verbliebene Ethanolreste zu entfernen, wird die Probe anschließend für 2 min in der *speed vac* behandelt.

3.2.2.3. Plasmid-Minipräparation nach PeqLab

Für die Plasmidpräparation nach PeqLab wird das Protokoll für die Reinigung von Plasmid-DNA der Firma PeqLab und die in diesem Kit enthaltenen Puffer und Säulen verwendet.

Mit diesem Kit kann man aus 15 ml einer LB-Übernachtskultur bis zu 75 µg hochreiner Plasmid-DNA isolieren. Der E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit 2 kombiniert eine modifizierte alkalische Lyse mit den selektiven und reversiblen DNA-Bindungseigenschaften von HiBind[®]- Silikamembranen und der Schnelligkeit und leichten Durchführbarkeit von Zentrifugationssäulenmethoden.

Durchführung:**A) High Copy-Number Plasmide**

Es werden 10-15 ml LB-Medium in einen 50 ml Kolben gefüllt und mit geeignetem Antibiotikum versetzt. Dieses komplettierte Medium wird mit den Bakterien angeimpft, die das gewünschte Plasmid enthalten und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Übernachtskultur wird am nächsten Tag durch Zentrifugation für 10 min bei 5.000 rpm in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen pelletiert. Das Pellet wird durch sorgfältiges vortexen in 500-1000 µl Lösung I (enthält RNase A) resuspendiert. Die nun vorhandene Suspension wird in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 500-1000 µl Lösung II vermischt, bis ein klares Lysat entsteht. Im Notfall sollte 5 min bei RT inkubiert werden.

Das klare Lysat wird mit 700-1400 µl Lösung III versetzt und durch mehrmaliges Invertieren gemischt, bis sich ein weißes, flockiges Präzipitat bildet. Das Reaktionsgefäß wird anschließend für 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert.

Eine HiBind[®]- Miniprep-Zentrifugensäule wird in ein 2 ml Auffanggefäß gesteckt und es werden vorsichtig 800 µl des klaren Überstandes in die Säule gefüllt, ohne dabei Teile des Pellets aus dem 2 ml Auffanggefäß zu übertragen. Es wird für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, bis das Lysat vollständig die Silikanmembran passiert hat. Der Säulendurchfluss wird verworfen. Mit dem restlichen Lysat wird genauso verfahren.

Anschließend wird die Zentrifugensäule in das bereits verwendete 2 ml Sammel-Gefäß gesteckt und 500 µl HB-Puffer auf die Säule pipettiert. Es folgt eine einminütige Zentrifugation bei 10.000 rpm. Das zweite Waschen erfolgt mit 750 µl DNA-Waschpuffers. Diesen Schritt wiederholt man ein zweites Mal. Anschließend wird das Zentrifugensäulchen in das leere 2 ml Auffanggefäß gesteckt und durch einminütiges Zentrifugieren bei 13.000 rpm vollständig getrocknet.

Die DNA wird in 50-100 µl Wasser oder EB-Puffer (10 mM Tris HCl; pH 8,5) eluiert.

3.2.3. Isolierung chromosomaler DNA aus *S. cellulosum*

Für die Isolierung chromosomaler DNA werden 2x 1,5 ml einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur bei 13.000 rpm für 4-5 min abzentrifugiert.

Das Pellet wird in 567 µl TE-Puffer resuspendiert. Anschließend werden 30 µl 10%iger SDS Lösung und 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) zu der Suspension dazugegeben und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

Nach dieser Stunde wird die Lösung mit 100 µl 5 M NaCl gemischt und mit 80 µl CTAB/NaCl Lösung versetzt und für 10 min bei 65 °C inkubiert.

Es folgt eine Zugabe von 180 µl Chloroform/Isoamylalkohol und es wird für 4-5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Auffanggefäß überführt und mit 180 µl Phenol/Chloroform versetzt. Es folgt ein erneutes Zentrifugieren von 4-5 min bei 13.000 rpm.

Der Überstand wird in ein neues Auffanggefäß überführt und mit 0,6 Vol. Isopropanol versehen. Durch mehrmaliges Schütteln der Lösung präzipitiert die DNA vollständig und wird vorsichtig mit der Pipettenspitze entnommen.

Fällt die DNA jedoch nicht aus, wird die Lösung für 30 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Die DNA wird mit 70 %igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die getrocknete DNA wird in 10-15 µl ddH₂O oder EB-Puffer aufgenommen.

3.2.4. Isolierung von Gesamt-RNA aus *S. cellulosum* (Treuner-Lange, 1996)

Um den Abbau der mRNA durch zelleigene RNasen zu minimieren, musste eine schnelle Ernte der Zellen erfolgen. Um dies zu verhindern, werden alle Arbeitsschritte soweit es geht auf Eis durchgeführt. Hierfür werden 30 ml Zellkultur in einem 30 ml Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert (10.000 rpm, 10 min, RT). Das Pellet wird in 8 ml des erhaltenen Überstandes resuspendiert und auf vier 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt und nach erneutem Abzentrifugieren auf Eis gestellt.

Zur Vorbereitung der RNA-Isolierung werden pro RNA-Probe (4 x 2ml) 6 ml Phenol-Lösung mit 60 µl einer 25 %igen (w/v) SDS-Lösung versetzt und auf 60 °C vortemperiert. Die nun sedimentierten Zellen werden wie folgt behandelt:

Zu Beginn werden die gefrorenen Zellen in 3 ml eiskaltem AE-Puffer resuspendiert und anschließend in die heiße phenolische Lösung überführt. Es folgt eine Inkubation bei 60 °C für 10 min unter kräftigem Schütteln. Anschließend findet durch ein niedrigtouriges Zentrifugieren (8.000 rpm, 15 min, 4 °C) die Phasentrennung statt. Die oberer wässrige Phase wird mit 40 µl einer 2 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2) versetzt. Die Extraktion der wässrigen Phase erfolgt mit Phenol, Phasentrennung durch niedertourige Zentrifugation, Abnahme der geklärten Phase (2x). Die RNA wird durch die Zugabe von 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol (96 %, v/v) und anschließender Inkubation bei -20 °C über Nacht gefällt. Am nächsten Tag erfolgt die Sedimentation bei 13.000 rpm (30 min, 4 °C). Das Pellet wird mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur DNase-Behandlung wird das Pellet zuvor in 500 µl DNase-Puffer aufgenommen und mit 100 U RNase-freier DNase versetzt. Die Inkubation erfolgt für 30 min bei 37 °C. Anschließend erneute Zugabe von 75 µl einer 2 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2). Erneute Extraktion der wässrigen Phase mit Phenol, Phasentrennung durch niedrigtourige Zentrifugation und anschließende Abnahme der geklärten Phase (2x). Die Fällung der RNA erfolgt durch Zugabe von 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol (96 %, v/v) und anschließender

Inkubation bei -20 °C über Nacht. Die Sedimentation der RNA geschieht durch hochtourige Zentrifugation (13000 rpm, 30 min, 4 °C).

Anschließendes Waschen des Sediments mit 70 % (v/v) Ethanol und Trocknung in einer Vakuumentrifuge. Die getrocknete RNA wird in 50 µl TE-Puffer oder reinem ddH₂O aufgenommen und bei -80 °C gelagert

Die Qualität der isolierten RNA-Proben wird in einem nicht-denaturierenden Agarose-Gel überprüft. Die Ausbeute dieser Methode lag zwischen 2300-900 µg RNA/ml eingesetzter Kultur.

Verwendet man kleinere Kulturmengen zur Isolierung geringerer Mengen RNA, werden dementsprechend die Zutaten prozentual reduziert.

3.2.5. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgt mittels spektralphotometrischer Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm. Für die Messung werden Quarzküvetten verwendet. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich dabei aus der Wellenlänge von 260nm, der Verdünnung und einem für die DNA, RNA, bzw. für Oligonukleotide spezifischen Multiplikationsfaktor. Für eine Absorption von 1 wird von folgenden Konzentrationen ausgegangen.

Für die Bestimmung der Konzentration gilt:

ds DNA $1A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$

ss DNA $1A_{260} = 30 \mu\text{g/ml}$

Oligonukleotide $1A_{260} = 30 \mu\text{g/ml}$

RNA $1A_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$

(A_{260} = Absorption bei 260 nm)

Die Reinheit der DNA-Lösung wird durch die Absorption bei 260nm und 280nm, ermittelt. Für DNA werden Werte von 1,8–1,9 toleriert. Hohe Absorptionen bei 280nm deuten auf Protein- oder Phenolverunreinigungen hin.

Bei Oligonukleotiden sollte die *ratio* ca. 1,5 und bei RNA ca. 2 betragen.

3.2.6. Reinigung und Konzentration von Nukleinsäuren

3.2.6.1. Phenol-Chloroform-Extraktion

Eine Phenolextraktion wird zur Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäure-Lösungen durchgeführt. Dazu wird in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, w/v) zu der Nukleinsäure-Lösung gegeben. Der Ansatz wird gut gemischt und anschließend zur Verbesserung der Phasentrennung 1 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase enthält die Nukleinsäuren. Sie kann vorsichtig in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Sollte die Nukleinsäure-Lösung anschließend einer Ethanol-Fällung unterzogen werden, so wird bereits vor der Zugabe von Phenol die Ionenkonzentration auf 0,3 M Na-Acetat (pH 5,2) eingestellt, da dadurch die Denaturierung von Proteinen erleichtert wird (Wallace, 1987).

Nach erneuter Zentrifugation von 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C wird der Alkohol abgenommen und das Pellet in der *speed vac* getrocknet. Danach kann die Nukleinsäure in einem entsprechendem Volumen in ddH₂O oder TE Puffer (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen, bei -20 °C gelagert oder weiter verwendet werden. Eine Ethanolfällung empfiehlt sich beispielsweise für einen Ligationsansatz vor einer Elektrotransformation, da hier hohe Salzkonzentrationen zu einem Kurzschluss führen können.

3.2.6.2. Alkoholfällung von Nukleinsäuren

Nach Zugabe von Alkohol kommt es in Gegenwart erhöhter Konzentrationen an monovalenten Kationen zu einer Aggregation der in der Lösung befindlichen Nukleinsäure-Moleküle (DNA, RNA). Dies geschieht, indem deren Löslichkeit durch Absättigung der negativ geladenen Phosphatgruppen herabgesetzt wird. Die Nukleinsäuren fallen aus, während niedermolekulare Moleküle, wie Oligonukleotide, gelöst bleiben. Mit Hilfe einer Alkoholfällung lässt sich also die Konzentration der Nukleinsäuren erhöhen und die Lösung von Salzen befreien, die eventuell bei der späteren Verwendung störend wirken können. Zur Präzipitation können verschiedenen Alkohole verwendet werden.

Der Ansatz wird dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder für mind. 30 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm und 4

°C. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet durch Waschen mit 70 %igem, kaltem Ethanol von überschüssigen Salzen befreit.

3.2.6.3. Fällung mit Isopropanol

Zur Fällung von stark verdünnten Nukleinsäuren wird Isopropanol bevorzugt, da der Ansatz lediglich mit dem 0,7 fachen Volumen an Isopropanol und der entsprechenden Menge an Natrium-Acetat (Endkonzentration 0,3 M) versetzt werden muss. Nach Mischen des Ansatzes erfolgt die Präzipitation durch Zentrifugation bei 13.000 rpm und 15 min bei Raumtemperatur. Analog zur Ethanolpräzipitation wird das Nukleinsäurepellet anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen und getrocknet.

3.2.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente, die beispielsweise nach PCR oder Restriktionen über präparative Agarosegele präpariert wurden, müssen zur weiteren Verwendung aus dem Gel isoliert werden. Dazu verwenden wir den *Gel-Extraction Kit* der Firma Peqlab. Die im Reagenziensatz enthaltenen Puffer und Säulen werden dabei nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Das Prinzip basiert auf der irreversiblen Verflüssigung der Agarose und der Bindung der im Gel befindlichen DNA an das Säulenmaterial, wobei mit diesem Kit DNA-Fragmente von 70 bp bis 10.000 bp isoliert werden können.

Das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel wird mit UV-Licht beleuchtet, und die zu isolierenden DNA-Fragmente gewünschter Größe werden mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Das zum Färben verwendete Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA, so dass diese sichtbar wird, wenn man die Chemikalie mit UV-Licht anregt. Es ist darauf zu achten, die Exposition so kurz wie möglich und bei richtiger Wellenlänge zu halten, da die DNA sonst beschädigt (Strangbrüche, Depurinierung, usw.) wird.

Zur Isolierung der Nukleinsäure werden dann 3 Volumen QG Puffer zu einem Volumen Gel hinzugefügt und für ca. 10 min bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Nachdem das Gelstück komplett verflüssigt ist, wird ein Volumen an Isopropanol zugegeben und gemischt, allerdings nicht gevortext. Zur Bindung der in Flüssigkeit befindlichen DNA an das Säulenmaterial, wird die Lösung auf eine *QIAquick* Säule gegeben und für 1min bei

13.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wird dann nochmals mit 500 µl Puffer beladen und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Es schließt sich ein zweiter Waschschrift mit 750 µl Puffer PE an. Um die DNA zu eluieren, wird die Säule auf ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert und mit 30 bis 40 µl ddH₂O oder EB-Puffer in die Mitte der Membran beträufelt. Nach bis zu 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wird erneut bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die so gewonnene DNA kann sofort weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

3.2.8. Reinigung von Nukleinsäure-Fragmenten nach PCR und anderen enzymatischen Modifikationen

Die Reinigung von DNA-Fragmenten nach PCR und anderen enzymatischen Modifikationen, wie Restriktionen, erfolgt mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* der Firma Qiagen.

Es werden die im Kit enthaltenen Puffer und Säulen verwendet. Der Reagenziensatz ist für einzel- oder doppelsträngige DNA-Produkte zwischen 100 bp und 10 kb Größe geeignet.

Zu einem Reaktionsvolumen werden fünf Volumen Puffer PB gegeben und gemischt. Die gesamte Probe wird dann auf eine *QIAquick*-Spinsäule (die sich in einem 2 ml Reaktionsgefäß befindet) aufgebracht. Durch die einminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm kommt es zur Bindung der DNA an die Säulenmembran. Der Durchlauf wird verworfen und die gebundene DNA wird mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Anschließend wird eine weitere Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert um sicherzustellen, dass der Ethanol vollständig entfernt ist. Nun wird die Spinsäule in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Elution der DNA werden 50 µl ddH₂O oder TB Puffer genau in die Mitte der Membran platziert, 1min bei Raumtemperatur inkubiert und dann zentrifugiert. Anschließend werden die Proben noch zwei min in der *speed vac* getrocknet, und so vollständig von Ethanol befreit. Anschließend wird es in einem adäquaten Volumen ddH₂O oder EB-Puffer gelöst.

Auch für Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung eingesetzt werden soll und die nicht über den *QIAprep Spin Miniprep Kit* isoliert wurde, empfiehlt sich eine zusätzliche Reinigung über den oben beschriebenen Reagenziensatz.

3.3. Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

3.3.1. Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen haben normalerweise in Bakterien die Funktion, das Eindringen von Fremd-DNA zu vermeiden, indem sie diese abbauen. Ihre eigene DNA schützen die Bakterien durch Methylierung.

Restriktionsendonukleasen katalysieren innerhalb ihrer spezifischen Erkennungssequenz von ungefähr 4-6 Nukleotiden eine hydrolytische Spaltung der DNA, wobei glatte oder 5'- bzw. 3'-überhängende DNA-Enden entstehen. Dies ist anhand der hier u. a. verwendeten Restriktionsenzyme *EcoRI* und *KpnI* dargestellt (Tabelle: 3.1.):

Tabelle 3.1.: Restriktionsenzyme

	<i>EcoRI</i>	<i>KpnI</i>
Erkennungssequenz	▼ 5'...GAATTC...3' 3'...CTTAAG...5' ▲	▼ 5'...GGTACC...3' 3'...CCATGG...5' ▲
Resultierende Enden (überhängend)	5'...GA ATTC...3' 3'...CTTAA G...5'	5'...GGTAC C...3' 3'...C CATGG...5'

Die Restriktion von Plasmid-DNA wird gemäß den Standardvorschriften (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt. Dabei werden die Reaktionsbedingungen und Enzympuffer entsprechend den Empfehlungen des Herstellers gewählt. Das Schneiden der DNA erfolgt in einem Gesamtvolumen von mind. 10 µl pro µg DNA, bei 37 °C für 1-12 h. Der Enzymanteil im Reaktionsansatz sollte 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da die Endonukleasen in glycerinhaltigen Puffern aufbewahrt werden und zu hohe Glycerinkonzentrationen (> 5 %) den Reaktionsverlauf negativ beeinflussen. Die Vollständigkeit der Restriktion wird auf 1 %igem Agarosegelen überprüft. Das Erhitzen eines Reaktionsansatzes für 20 min auf 65 bis 80 °C gewährleistet meist die Inaktivierung der Restriktionsendonuklease.

3.3.2. Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen

Zur Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren mit glatten Enden wird die CIAP benutzt. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine Alkalische Phosphatase, welche die Freisetzung von terminalen 5'-Phosphatgruppen von DNA, RNA, Ribo- und Desoxyribonukleosid Triphosphaten katalysiert.

Bei Klonierungen wird damit die Rezirkularisierung eines linearisierten Vektors ohne den Einbau von Fremd-DNA minimiert, da diese Phosphatgruppe essentiell für die Ligation ist (Seeburg *et al.*, 1977; Ulrich *et al.*, 1977).

Verwendet wird vorwiegend die Alkalische Phosphatase aus Kälber-Intestinum (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIAP*), wobei die Behandlung gemäß der Empfehlung des Herstellers erfolgt.

Dephosphorylierungsansatz

1-20	pmol	DNA in 10-40 µl Lösung
5	µl	10x Reaktionspuffer
ad 50	µl	ddH ₂ O
0,05		U/pmol DNA CIAP (1 U/µl)

Die Anzahl an pmol zu dephosphorylierenden Enden berechnet sich nach der Formel:

$$\frac{\text{pmol Enden}}{\mu\text{g DNA}} = \frac{2 \times 10^6}{\text{Anzahl an Basenpaaren} \times 660}$$

Die Reaktion wird für 30 min bei 37 °C inkubiert und dann durch Erhitzen für 15 min bei 85 °C oder Phenol-Chloroform-Extraktion beendet. Die DNA wird anschließend mit Ethanol gefällt.

3.3.3. Phosphorylierung von DNA

Die zur Gelextraktion verwendeten Kits scheinen zu einem gewissen Anteil an DNA-Fragmenten die Phosphatgruppen zu entfernen. Ebenso besitzen die von der Firma Roth synthetisierten Oligonukleotide, die in der PCR als Primer dienen, keine endständigen Phosphatgruppen.

Um die Ligierbarkeit von DNA-Fragmenten, insbesondere von PCR-Produkten zu erhöhen, werden diese an ihrem 5'-Ende phosphoryliert.

Das zu diesem Zweck eingesetzte Enzym T4-DNA-Polynukleotidkinase (PNK) katalysiert den reversiblen Transfer der γ -Phosphatgruppe von ATP zur 5'-Hydroxylgruppe von DNA, aber auch von RNA, Oligonukleotiden oder 3'-Monophosphaten.

Phosphorylierungsansatz

1- 20	pmol	dephosphorylierte DNA
2	μl	10x Reaktionspuffer
20	pmol	[γ - ³² P oder γ ³³ P]
ad 20	μl	ddH ₂ O
1	μl	T4 PNK (10 U/μl)
1	μl	10 x Ligationspuffer

Der Ansatz wird bei 37 °C für 30 min inkubiert.

Anschließend wird der Reaktionsansatz, bei 85 °C für 15 min hitzeinaktiviert oder durch Zugabe von 1 μl 0,5 M EDTA (pH 8,0) beendet.

3.3.4. Ligation von DNA

Unter Ligation versteht man die Ausbildung einer neuen Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe zweier DNA-Enden. Bei dieser Reaktion wird das Enzym T4-DNA-Ligase verwendet. Die Ligation schließt eine Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-OH-Gruppe und einer 3'-Phosphatgruppe zweier DNA-Enden.

Für die Aktivierung der Phosphatgruppe benötigt die DNA-Ligase den Cofaktor ATP. Die Ligase katalysiert die Verknüpfung verschiedener DNA-Moleküle (Vektor, *insert*) oder die Zirkularisierung eines linearen DNA-Moleküls (Vektor) und kann dabei sowohl überhängende, als auch glatte DNA-Enden verbinden.

Ligationsansatz

50-400	ng	Vektor- DNA, Insert-DNA im 3 fachen Überschuss (pmol Enden; siehe Formel)
2	μl	10 x Ligationspuffer
2	U	(<i>sticky ends</i>) T4-DNA-Ligase
4	U	(<i>blunt ends</i>)
2	μl	(<i>blunt ends</i>) PEG4000
ad 20	μl	ddH ₂ O

Die Ligation wird mindestens im Verhältnis 2:1 von Insert zu Vektor angesetzt und nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{pmol Enden}}{\mu\text{g DNA}} = \frac{2 \times 10^6}{\text{Anzahl an Basenpaaren} \times 660}$$

Die Ligation wird über Nacht bei RT (*blunt ends*) oder 16 °C (*sticky ends*) inkubiert. Die Ligase wird durch Hitze (15 min bei 65 °C) inaktiviert und der Ansatz Phenol-Chloroform gefällt und Ethanol präzipitiert.

3.4. Molekularbiologische Methoden

3.4.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Hitzestabile DNA-Polymerase (aus *Thermus aquaticus* oder *Pyrococcus woesei*) wird in der Polymerase-Kettenreaktion (Mullis *et al.*, 1987) verwendet, um mit Hilfe eines Primerpaares ein DNA-Fragment aus zum Teil genomischer DNA zu amplifizieren.

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht auf der enzymatischen Amplifikation von DNA, wobei selbst kleinste Nukleinsäuremengen stark vervielfältigt werden können.

Dazu wird das DNA-*template* in sukzessiven Zyklen von Denaturierung (Trennung des Doppelstrangs in die Einzelstränge), *primer annealing* (Hybridisierung zweier komplementärer Oligodeoxynukleotide an mehr oder weniger weit auseinander liegenden Regionen des „oberen“ bzw. „unteren“ Stranges der doppelsträngigen DNA) und Polymerisation exponentiell amplifiziert. Durch 20-35 Wiederholungen dieses Zyklus kommt es zu einer Vervielfältigung von circa 10^6 - 10^7 -fachen des ursprünglichen *templates*.

Das *template* ist die Ausgangs-DNA, an der die beiden komplementären *primer* gegenläufig binden können. Als *primer* werden Oligodeoxynukleotide (Oligonukleotide) von mindestens 17 Basenpaaren Länge und nicht zu geringem GC-Gehalt eingesetzt, um zu gewährleisten, dass das *annealing* spezifisch ist und das *primer-template*-Paar bei der optimalen Polymerisationstemperatur von 70-75 °C nicht dissoziiert.

Neben *template* und *primer*, werden dem PCR-Ansatz eine thermostabile DNA-Polymerase, freie dNTPs und die entsprechenden Puffer hinzugefügt. In einem *thermocycler* wird das Reaktionsgemisch (0,1–1 µg DNA-*template*, 0,1–1 µM *primer*, 200

μM dNTPs und thermostabile DNA-Polymerase) einem zyklisch ablaufenden Temperaturprogramm unterworfen.

Dauer und Temperatur der einzelnen Phasen sind vom GC-Gehalt der *primer* und der Länge des gewünschten Amplifikats abhängig. Für die Amplifizierungszeit wird eine Rate von 1000 bp/min zugrunde gelegt und entsprechend dieses Wertes berechnet. Die Analyse der PCR-Produkte wird elektrophoretisch durchgeführt, da die amplifizierte DNA in Bezug auf ihre Größe charakterisiert werden kann.

PCR-Ansatz

Tab. 3.2.: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes

Taq-Polymerase	Pfu-Polymerase (prove reading)
1 μl DNA- <i>template</i>	1 μl DNA- <i>template</i>
1 μl 10 mM dNTP's	1 μl 10 mM dNTP's
1 μl 5'- <i>primer</i> (50 pmol/ μl)	1 μl 5'- <i>primer</i> (50 pmol/ μl)
1 μl 3'- <i>primer</i> (50 pmol/ μl)	1 μl 3'- <i>primer</i> (50 pmol/ μl)
5 μl 10x Taq Puffer (+ MgCl ₂)	5 μl 10x Pfu Puffer (+ MgCl ₂)
4 μl DMSO	4 μl DMSO
0,35 μl Taq Polymerase	0,35 μl Pfu Polymerase
ad 50 μl ddH ₂ O	ad 50 μl ddH ₂ O

Programm für die PCR-Reaktionen

Tab.3.3.: Schema eines PCR-Programms

Zeit	Temperatur	Prozess
5 min	94 °C	Denaturierung der Ziel-DNA
30 sec	94 °C	Denaturierung der Ziel-DNA
30 sec	X °C	Hybridisierung der Oligonukleotide (<i>primer</i>)
30 sec - 2 min	72 °C	Elongation des Gegenstrangs
7 min	72 °C	Beendigung der DNA-Synthese

35 x



Da es wegen der anfänglich noch niedrigen Temperaturen im PCR-Ansatz zu unerwünschten Nebeneffekten, wie Fehlhybridisierung der *primer* oder *primer*-Dimerbildung, kommen kann, wird der PCR-Ansatz zunächst für einige Minuten auf 94 °C vorgeheizt und erst dann die Polymerase hinzugefügt, wenn die richtige Arbeitstemperatur erreicht ist (*hot start*).

Nach Beendigung der PCR werden 5-8 µl des Ansatzes auf einen analytischen Agarosegel überprüft.

3.4.2. Real-time RT-Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit der Real-time RT-PCR wurde ein schnelles und vollautomatisiertes Verfahren zur Quantifizierung von mRNA-Expressionsleveln entwickelt. In einem geschlossenen System werden in einem Schritt Amplifikation, PCR-Produkt-Detektion und Quantifizierung kombiniert, ohne dass weitere Arbeitsschritte nach der PCR erforderlich sind (Higuchi *et al.*, 1993; Gibson *et al.*, 1996; Heid *et al.*, 1996). Die Methode erlaubt die direkte Detektion der PCR-Produkt-Akkumulation während der log-linearen Phase der Reaktion über Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonden. Diese binden während des PCR-Zyklus an die Ziel-DNA. Das Signal der durch eine Lichtquelle angeregten Fluoreszenzfarbstoffe korreliert dabei quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt und kann über eine Software in Echtzeit (RealTime) dargestellt werden.

Verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe können zum Einsatz kommen. In unserem Fall handelt es sich um SYBR Green I, ein nicht-gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff, der generell an jede dsDNA bindet (Morrison *et al.*, 1998).

Absolute Quantifizierung:

RealTime RT-PCR erlaubt neben verschiedenen relativen Quantifizierungsstrategien auch die absolute Quantifizierung von Ziel-mRNA über so genannte externe Standards. Der Standard kann generell jede mRNA-Probe sein, die die Sequenz des Ziel-Gens enthält und deren Konzentration bekannt ist. Über eine Verdünnungsreihe dieser Probe, die in der PCR mitgeführt wird, lässt sich eine Standardkurve konstruieren und so einen absoluten Wert (z.B. Kopienzahl) für die Ausgangskonzentration unbekannter Proben ermitteln.

Normalisierung:

Die Ergebnisse jeder quantitativen RT-PCR Methode, so auch der RealTime RT-PCR, werden durch RT-PCR spezifische Störfaktoren wie Unterschiede in der Ausgangsmenge an RNA sowie Unterschiede in der Reversen Transkription oder den PCR-Effizienzen entscheidend beeinflusst und führen zu einer Missinterpretation der ermittelten Expressionsprofile. Für eine verlässliche Quantifizierung ist daher eine Korrektur dieses Faktors notwendig. Die derzeit am häufigsten akzeptierte Methode ist dabei die Normierung der Expression des Ziel-Gens zur Expression eines Referenzgens. Das

bedeutet: in derselben Probe wird die Expression des Ziel-Gens relativ zu dieser internen Kontrolle angegeben. Der Expressionslevel eines idealen Referenzgens sollte daher in unterschiedlichen Zelltypen konstant sein. Er sollte nicht aktiv reguliert werden und unter den experimentellen Bedingungen nicht variieren. Darüber hinaus sollte das Referenzgen in identischen Level exprimiert werden, wie das Ziel-Gen.

Zur RealTime RT-PCR Analysen wird der *One-Step RT-PCR-Kit* der Firma Qiagen verwendet.

Tabelle 3.4.: Zusammensetzung eines RealTime RT-PCR-Ansatzes; ¹: Inhalt vom Qiagen *One-Step RT-PCR Kit*; ²: Fermentas RNAsin 40 U/ μ l

Lösung	Ansatz (μ l)
RNA (20 ng/ μ l)	2
RNase freies H ₂ O	3,3
5x Puffer ¹ (12,5 mM MgCl ₂)	2
dNTPs (10 mM) ¹	0,4
Primer A (10 pmol/ μ l)	0,3
Primer B (10 pmol/ μ l)	0,3
RT-PCR ¹ Enzym	0,4
Q-Lösung ¹	2
RNAsin (5 U/20 μ l) ²	0,1
SYBR-Green (1:1000)	0,2

Programm für die PCR-Reaktionen

Tab.3.5.: Schema eines PCR-Programms

Zeit	Temperatur	Prozess
30 min	50 °C	Reverse-Transkription
15 min	96 °C	Aktivierung der Taq-Polymerase, Inaktivierung der RT
15 sec	94 °C	Schmelzen, Denaturierung der Ziel-DNA
20 sec	61 °C	Hybridisierung der <i>primer</i>
40 sec	72 °C	<i>Extension</i> , Elongation des Gegenstrangs
	25 °C	Aufbewahrung

45 x 

Nach Beendigung der RealTime RT-PCR werden 5-8 µl des Ansatzes auf einem analytischen Agarosegel überprüft. Die Auswertung erfolgt anhand der Software von Pfaffl (Pfaffl, 2001).

3.4.3. Sequenzierung von DNA

Zur DNA-Sequenzierung wird das Kapillarsequenzierungsgerät *Genetic Analyzer 310* der Firma Applied Biosystems (ABI) genutzt.

Das Prinzip der Sequenzierung basiert auf dem Einbau von fluoreszenz-markierten Di-Desoxynukleotiden, wobei die vier ddNTPs eine unterschiedliche Fluoreszenz aufweisen. Auf Grund des Fehlens der 3'-OH-Gruppe kommt es während der PCR-Reaktion zum Kettenabbruch: an jedem Ende einer Kette befindet sich somit ein fluoreszenz-markiertes Nukleotid.

Das entsprechende endständige Nukleotid kann während der Kapillarelektrophorese mit Hilfe eines Lasers detektiert werden.

Anhand von Größe und Fluoreszenz der einzelnen PCR-Fragmente kann somit die Sequenz (Nukleotid Abfolge) der Probe bestimmt werden. Die Sequenzierungen wurden außerhalb des Instituts getätigt und nicht selber vorgenommen.

3.5. Protein-Analysen

3.5.1. Western-Analyse von Proteinen (*Westernblot*)

Mit Hilfe der Western-Analyse können Proteine über eine immunologische Reaktion mit einem Antikörper nachgewiesen werden. Dazu müssen die Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine Membran, z.B. Nitrocellulose oder PVDF, transferiert werden (Timmons und Dunbar, 1990). Zuvor werden die Proteine in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die qualitative und quantitative Bestimmung von Proteinen wurde mit spezifischen Antikörperreaktionen durchgeführt. i.d.R. werden hierbei zwei Antikörper (AK) verwendet. Der erste AK erkennt spezifisch sein Target (Protein) und dient selbst als Target für den zweiten AK. Dieser ist mit einem Enzym gekoppelt, das eine Lichtreaktion (Meerrettich-Peroxidase, HRP) verursacht. Als Substrat für die Peroxidase (POD) wird das *Lumi-Light Western Blotting* Substrat von Roche verwendet.

3.5.1.1. Blotten von SDS-Polyacrylamid- und nicht-denaturierenden Gelen

Die Probengemische werden mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 2-5 min auf 100 °C erhitzt. Je 30-50 µg der Proben werden auf einem SDS-Polyacrylamidgel für 2-3 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird das Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dieser Transfer geschieht im Semi-Trocken- Verfahren mit einer *Blot*-Apparatur der Firma Keutz.

Von dem zu blottenden Proteingel wird das Sammelgel entfernt. Ein PVDF Membranstück (Polyvinylidenidifluorid Membran; Roche), 2 Stücke 3 mm Whatman-Papier und 2 Stücke 6mm Whatman-Papier werden entsprechend der Gelgröße zurechtgeschnitten.

Es wird ein dickes Whatman-Papier in Puffer Anode A getränkt, ein dünnes Whatman-Papier in Puffer Anode B, sowie ein dickes und ein dünnes in Puffer Kathode C. Die Membran wird kurz in ddH₂O geschwenkt. Das in Puffer Anode B getränkte dünne Whatman-Papier wird auf das dicke Whatman-Papier aus Puffer Anode A gelegt. Anschließend wird auf diesen Stapel die Membran und das Gel gebracht und darauf das dünne und das dicke Whatmanpapier aus Puffer Kathode C und mit einer Glaspipette luftblasenfrei glattgestrichen. Der Transfer erfolgt bei negative geladenen Proteinen, von oben nach unten, von der Kathode (-) zur Anode (+) und damit vom Gel auf die Membran. Um einen effizienten Transfer zu gewährleisten sollten sämtliche Bestandteile des *sandwiches* die gleiche Größe besitzen.

Die angelegte Stromstärke beträgt 0,8 mA/cm² Gelfläche und benötigt 25-30 min. Nach erfolgtem Transfer wird die Membran zunächst unter Schütteln für eine Stunde in TBS-Puffer mit Magermilchpulver geblockt, wodurch unspezifische Bindestellen abgesättigt werden. Alle Schritte erfolgen unter ständigem Schütteln. Dazwischen wird jeweils dreimal für 5 sec mit 1 x TBS gespült. Nach dem Blocken erfolgt die Inkubation mit dem 1. Antikörper (1:10.000 in Tris-PM) über Nacht, bei 4 °C. Danach wird die Membran für dreimal 5 min in 1 x TBS gewaschen. Jetzt wird der 2. Antikörper (Anti-Rabbit IgG (FC) HRP, von Promega; 1:10.000 in Tris-PM) zugegeben. Nach einer Inkubation von 3 Stunde bei RT wird erneut für dreimal 5 min mit 1 x TBS gewaschen. Zur Detektion wird die Membran zwei Minuten in Lumineszenz-Lösung inkubiert, anschließend ein Film aufgelegt. Nach einer bestimmten Inkubationszeit kann der Film mit Hilfe von Entwickler und Fixierer entwickelt werden.

3.5.2. Northernblot-Analyse

Bei einem Northern Blot wird die elektrophoretisch aufgetrennte Gesamt-RNA aus einem Formaldehyd-Agarosegel auf eine Membran übertragen. Das Gel sollte vorher nicht mit Ethidiumbromid gefärbt worden sein, da bei starkem Färben die Effizienz des Transfers heruntergesetzt wird. Bevor die RNA transferiert wird, muss das Gel entsprechend vorbehandelt werden:

1. 0,05 M NaOH/ 0,15 M NaCl 30 min

Dadurch wird die RNA hydrolisiert und die Transfereffizienz von RNA erhöht, die größer als 2,5 kb ist. Zur Neutralisierung dient die Inkubation mit:

2. 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 / 0,15 M NaCl 30 min

Diese Waschschritte sind auf einem Schüttler bei 50-100 rpm durchzuführen. Sie dienen auch zur Entfernung des Formaldehyds, das den Transfer u.U. negativ beeinflussen kann. Die Lösungen sollten in DEPC-H₂O angesetzt werden, um RNasen zu inaktivieren. Der Transfer kann per Kapillarblot (oder Vakuumbloit) erfolgen mit 20x SSC (ohne DEPC-H₂O).

3.5.2.1. Northern Hybridisierung mit radioaktiv endmarkiertem Oligonukleotid

Die Blotmembran wird erst mit 6x SSC benetzt und dann in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben, wo die fertige Prähybridisierungslösung zugesetzt wird. Die Menge der Lösung sollte bei 0,2 ml lsg/cm² Membran liegen. Die Prähybridisierung erfolgt für 2 Stunden bei 68 °C.

Prähybridisierungslösung 6x SSC
 5x Denhardts
 0,5 % SDS
 vorwärmen auf 68 °C
 Lachssperma-DNA (LSD) [100 µg/ml]

Die LSD wird für 5 min bei 95 °C erhitzt, 5 min auf Eis gestellt und dann zu erwärmten Lösung gegeben.

50x Denhardts 5 g Ficoll (Typ 400, Pharmacia)
 5 g Polyvinylpyrrolidone
 5 g Rinderserum-Albumin (Fraktion V, Sigma)
 ad 500 ml mit ddH₂O

Die Hybridisierung erfolgt bei einer für das Oligonukleotid geeigneten Temperatur über Nacht. Die Hybridisierungstemperaturen von den in dieser Arbeit verwendeten Primern, die zwischen 10 und 30 Nukleotide umfassten, wurden folgendermaßen berechnet:

Berechnung der Hybridisierungstemperatur:

$[(\text{Anzahl A-T-Paare in Sonde} \times 2) + (\text{Anzahl G-C Paare} \times 4)] = \text{Schmelztemperatur}$

Schmelztemperatur – 8 °C = Hybridisierungstemperatur

Läßt sich das Oligonukleotid schlecht hybridisieren, kann die Temperatur abgesenkt werden, wobei die Bindung allerdings auch unspezifischer wird.

Hybridisierungslösung: 6x SSC
 0,5 % SDS
 LSD [100 µg/ml]
 Sonde [2,5-5 x 10⁶ cpm/Ansatz]

Vor dem Zusetzen der Sonde wird diese bei 100 °C aufgeköcht. Mit Hilfe des Kochens kann der Doppelstrang in zwei Einzelstränge zerteilt werden.

Am nächsten Tag erfolgen mehrere Waschschrir, wobei nach jedem Waschschrir die Radioaktivität der Blotmembran überprüft werden sollte. Der erste Waschschrir dient der Entfernung ungebundener Sonde. Die folgenden Waschschrir dienen der Reduzierung des Hintergrundes durch unspezifisch gebundene Sonde.

Die einzelnen Waschschrir:

- | | | | | |
|----|------|-------------|-----|---------------------|
| 1. | 2x | SSC / 0,5 % | SDS | 5 min bei RT |
| 2. | 2x | SSC / 0,1 % | SDS | 10 min bei RT |
| 3. | 0,1x | SSC / 0,5 % | SDS | 30-60 min bei 37 °C |
| 4. | 0,1x | SSC / 0,5 % | SDS | 30-60 min bei 68 °C |

(sollte 1 °C unter der Schmelztemperatur des Oligonukleotides bleiben)

- | | | | |
|----|------|-----|-----------------------|
| 5. | 0,1x | SSC | einige Minuten bei RT |
|----|------|-----|-----------------------|

Ist die Radioaktivität nur noch an einzelnen Stellen mit dem Zähler zu detektieren, sollte der Waschvorgang beendet werden. Die noch feuchte Blotmembran wird luftblasenfrei in eine Folie geschweißt und auf einem *Phosphoimagerscreen* exponiert.

Durch Erhöhung der SSC-Konzentration in den Waschlösungen 1-5 kann eine erhöhte Stringenz erreicht werden, die ein leichteres Ablösen der hybridisierten Sonde verhindert.

3.5.2.2. ³²P-Endmarkierung von Oligonukleotiden und deren Aufreinigung

³²P-endmarkierte Oligonukleotide kann man als Sonden für Northern Hybridisierungen einsetzen. Hierbei handelt es sich um eine Phosphorylierungs-Reaktion, die von der Polynukleotidkinase (PNK) durchgeführt wird. Dabei wird der γ -Phosphatrest des verwendeten [γ -³²P]-ATP auf die endständige 5'-Hydroxyl-Gruppe des Oligonukleotides übertragen.

Reaktionsansatz:

- 1 μ l Oligonukleotid [10 pmol]
- 1 μ l 10x PNK-Puffer
- 2 μ l [γ -³²P]-ATP (10 μ Ci)
- 5 μ l ddH₂O
- 1 μ l T4-PNK (10U)
- 10 μ l

Dieser Ansatz wird für 30-60 min bei 37 °C inkubiert, und die Reaktion durch Zugabe von 60 μ l STE-Puffer abgestoppt.

STE-Puffer:

- 20 mM Tris-HCl
- 100 mM NaCl
- 10 mM EDTA
- pH 7,8

Die nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide werden durch eine Aufreinigung über ein *NucTrap Column* der Firma Stratagene entfernt. Hierbei binden die während der Reaktion nicht eingebauten, Nukleotide an das Säulenmaterial, während das markierte Oligonukleotid im Eluat vorliegt.

Das Säulenmaterial wird dafür zuerst mit 70 μ l STE-Puffer equilibriert. Der Puffer wird dabei auf die Säule gegeben und mit einer 10 ml luftgefüllten Spritze langsam durchgedrückt. Das markierte Oligonukleotid wird anschließend auf die Säule aufgetragen

und ebenfalls durchgedrückt. Zum Eluieren werden 60 µl STE-Puffer verwendet. Von dem gereinigten markierten Oligonukleotid werden 2 µl des Reaktionsansatzes im Szintillationszähler gemessen.

3.5.3. Glutamin-Synthetase Test

Die Glutamin-Synthetase katalysiert bei der Synthese von Glutamin eine Zweischrittreaktion bei der ein Zwischenprodukt entsteht. Die Gesamtreaktion, welche aus einem Biosynthese- und einem Transferaseschritt zusammengesetzt ist, ist folgendermaßen aufgebaut:

1. Schritt: $\text{Glutamat} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glutamyolphosphat} + \text{ADP} + \text{H}_2\text{O}$
2. Schritt: $\text{Glutamyolphosphat} + \text{Ammoniak} \rightarrow \text{Glutamin} + \text{P}_i$

In dieser Arbeit wurde ausschließlich der biosynthetische Test durchgeführt. In diesem Test katalysiert die Glutamin-Synthetase zwei Reaktionen, wobei Glutamat zunächst durch die Hydrolyse von ATP am C5-Atom phosphoryliert wird und so Glutamyolphosphat und ADP entstehen. Im nächsten Schritt wird die Phosphatgruppe durch Hydroxamat ersetzt, wobei γ -Glutamylohydroxamat und Orthophosphat (P_i) gebildet werden. In diesem Test wurde Mg^{2+} als divalentes Kation für die Aktivität der Glutamin-Synthetase eingesetzt.



Die Glutamin-Synthetase wurde in definierten Konzentrationen in 450 µl des Reaktionsmixes (100 mM Imidazol, pH 7,0; 125 mM Hydroxylamin pH 7,0 (da Hydroxylamin bei einem pH = 7 instabil ist, wird es unmittelbar vor Gebrauch aus gleichen Teilen 1,6 M Hydroxylammoniumchlorid und 1,6 M NaOH hergestellt); 20 mM MgCl_2 ; 10 mM ATP) gemischt und für 5 min bei 37 °C im Heizblock vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 0,5 M Glutamat gestartet. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Stopplösung (5 % $\text{FeCl}_3 \cdot x \text{H}_2\text{O}$; 8 % Trichloressigsäure; 300 mM HCl) beendet. Durch die Zugabe der Stopplösung bildet sich Glutamylohydroxamat, das einen braunen Komplex bildet und gelegentlich ausfällt. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm wird die Absorption bei 540nm bestimmt. Als Leerkontrolle diente ein Reaktionsansatz, dem keine Glutamin-Synthetase zugesetzt wurde.

Eine Einheit (U) Glutamin-Synthetase katalysiert die Umsetzung von 1 μmol Glutamat pro Minute und wurde mit einem molaren Absorptionskoeffizienten von 553 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (A_{540}) des γ -Glutamylhydroxamat- Fe^{3+} -Komplexes berechnet (Bender *et al.*, 1977).

3.6. Computeranalysen

Computeranalysen wurden über das WWW bei folgenden Servern durchgeführt:

1. NCBI (National Institutes of Health, Bethesda, USA) unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
 - BLAST2 und Phi-BLAST2 (Sequenzvergleich)
 - ENTREZ (Suche nach Literatur, DNA- und Aminosäuresequenz)
2. Institut for Genomik Research (TIGR) unter <http://www.tigr.org>
 - Genomdatenbank verschiedenster Organismen

3.7. Biochemische und physikalische Methoden

3.7.1. Gelelektrophorese

3.7.1.1. DNA-Agarosegele

Agarosegele werden unter anderem, zur Auftrennung von isolierter Plasmid-DNA (linear oder zirkulär) und Restriktionsansätzen verwendet.

Die Konzentration an Agarose beträgt i.d.R. 1 % (w/v). Die benötigte Menge an Agarose wird in dem entsprechenden Volumen 1 x TBE- Puffer aufgekocht, bis sie sich vollständig gelöst hat. Anschließend wird die flüssige Agarose in einen rechteckigen Flachbettschlitten gegossen und bis zum vollständigen Erstarren bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die aufzutrennenden Proben werden mit DNA- Probenpuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert.

200-300 ng 1 kb-Größenmarker (Fermentas 1 kb-*ladder*) werden als Größenstandard mit auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt in 1 x TBE-Puffer bei einer Stromstärke von ~ 50 mA (\sim Spannung von 150 V). Anschließend wird das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (EtBr 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ H_2O) gefärbt und unter UV-Licht fotografiert.

3.7.1.2. SDS-Polyacrylamidgele für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) ist die am weitesten verbreitete Elektrophoresetechnik für Proteine. Die Trennung erfolgt dabei ausschließlich nach dem Molekulargewicht, da das anionische Detergenz SDS die Proteine nicht nur denaturiert, sondern ihnen auch eine negative Oberflächenladung verleiht. Die hohe Trennschärfe wird durch die Diskontinuität dieser Technik erreicht. Der prozentuale Anteil an Acrylamid bestimmt den Vernetzungsgrad des Polyacrylamidgels und somit dessen Trennleistung. Die Polyacrylamidgel-Elektrophorese wird in vertikalen Elektrophoresegelkammern von BioRad mit einer Gelgröße von 10,2 cm x 7,3 cm durchgeführt. Zur Herstellung der Plattengele werden die Glasplatten und die Abstandhalter mit 70 %igem Ethanol gereinigt, zusammengebaut und in einem BioRad Gelkammerhalter eingespannt. Die Zusammensetzung der Gele aus den im Folgenden aufgeführten Lösungen ist in Tabelle 3.7. dargestellt.

Tab. 3.7.: Zusammensetzung der Lösungen für 10, 12 oder 15 % SDS-Gele

Lösungen	Trenngel			Sammelgel
	10 %	12 %	15 %	
				5 %
H ₂ O	4,0	3,3	2,3	2,7
30 % Acrylamid Mix	3,3	4,0	5,0	0,67
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5	2,5	2,5	-
1,0 M Tris (pH 6,8)	-	-	-	0,5
10 % SDS	0,1	0,1	0,1	0,04
10 % APS	0,1	0,1	0,1	0,04
TEMED	0,004	0,004	0,004	0,004

Die Angaben beziehen sich auf 10 ml Trenngel und 4 ml Sammelgel; die Prozentangabe für den Acrylamid Mix bezieht sich auf (w/v)

Die Vernetzung von Acrylamid und Bisacrylamid wird durch Ammoniumpersulfat (APS) initiiert, das leicht Radikale bildet. Als Katalysator dient dabei N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED). Diese freien Radikale bewirken die Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid. Das Trenngel wird bis ca. 2 cm unterhalb der Gelkante gegossen und dann mit 1-Butanol überschichtet, um eine gerade Gelkante zu erzeugen und Sauerstoff fern zu halten.

Auf das auspolymerisierte Trenngel wird das Sammelgel bis zur Gelkante gegossen. Der Probenauftragskamm wird möglichst gerade und ohne Luftblasen eingeschoben. Wenn auch das Sammelgel auspolymerisiert ist, kann die Apparatur in eine BioRad-Gellaufvorrichtung eingespannt werden, und die Proben können vorbereitet und geladen werden. Die Proben werden mit 2 x SDS Auftragspuffer versetzt und 10 min gekocht. Der entstandene Zwischenraum zwischen den Gelplatten wird mit Tris-Glycin Elektrophorese Puffer gefüllt, und auch der Boden der "Laufkammer" wird mit Puffer aufgefüllt. Der Gellauf erfolgte mit 80 V im Sammelgel und mit 150 V im Trenngel.

3.7.1.3. Silber-Färbung von Polyacrylamidgelen

Die hier beschriebene Methode beruht auf der Reaktion von Silbernitrat mit Proteinen unter sauren Bedingungen, gefolgt von einer Reduktion der Silberionen durch Fomaldehyd unter alkalischen Bedingungen zu metallischem Silber. Die reaktiven Proteingruppen sind nach allgemeiner Auffassung die freien Amine und die Schwefelgruppen. Die Silberfärbung führt dabei abhängig von den Färbebedingungen und den verschiedenen Proteinen zu braunen, schwarzen, gelben oder orange-farbenen bis roten Banden. Dies ist auf Brechungseffekte an verschieden großen Silberpartikeln zurückzuführen.

Durchführung:

Zunächst wird das Proteingel für mind. 30 min oder über Nacht in der Fixierlösung geschwenkt. Anschließend wird es zweimal für je 10 min in 50%igem Ethanol gewaschen und dann für 1 min in Thiosulfat-Lösung geschwenkt. Um überschüssiges Thiosulfat zu entfernen, wird das Gel dreimal für 5 sec in H₂O gewaschen. Nachfolgend wird das Gel 15 min in Silbernitrat-Lösung inkubiert und erneut 3 x für 5 sec in H₂O gewaschen. Zum Entwickeln wird das Gel, bis zum Erreichen der gewünschten Bandenintensität, in Entwickler-Lösung inkubiert. Nachdem diese erreicht ist, wird das Gel in die Stop-Lösung überführt und dort für mindestens 15 min belassen. Man sollte bedenken, dass die Proteinbanden dadurch noch ein wenig nachdunkeln. Das Gel wird anschließend für mindestens 3 Stunden auf einem Gelrockner getrocknet.

3.7.1.4. Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Zum Anfärben der Proteinbanden, inkubiert man die Gele für einige Minuten in Coomassie-Blau-G25-Färbelösung. Danach werden die Gele für einige Stunden in der

Entfärbelösung entfärbt. Mit Hilfe der Entfärbelösung reduziert sich Hintergrundfärbung und die angefärbten Proteinbanden werden sichtbar.

3.7.1.5. Nicht-denaturierende Gele (Nativ-Gele)

Hier erfolgt die Auftrennung der Proteine unter nicht denaturierenden Bedingungen. Die Proben wurden mit 1x Nativ-Auftragspuffer gemischt und sofort auf ein 7,5 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Um eine bessere Auflösung der Proteinbanden zu erreichen, enthielt das Sammel- und das Trenngel 0,05% NP40, ein nichtionisches Detergenz (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1994). Sowohl das Gel, als auch Auftrags-Laufpuffer waren frei von SDS. Die Elektrophorese wurde zunächst mit einer Spannung von 100 V gestartet, die nach dem Einlaufen der Front in das Trenngel auf 160 V erhöht wurde. Im Anschluss erfolgte die Detektion der Proteinbanden mit der Immunoblotanalyse.

Laufpuffer nicht denaturierende Polyacrylamidgele:

25 mM	Tris
192 mM	Glycin

1x Nativ-Auftragspuffer:

(Mischung Puffer I, Puffer II und Puffer III im Verhältnis 5:5:1)

Puffer I:

50 mM	Tris/HCl pH 6,8
20 %	Glycerin
	Bromphenolblau

Puffer II:

50 mM	Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4
5 mM	MgCl ₂
5 mM	DTT
0,5 mM	EDTA
50 mM	KCl
2 mM	Benzamidin

Puffer III:

80 µg/µl	BSA in Puffer I
----------	-----------------

3.7.1.6. **Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)**

Die Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE, O'Farrell, 1975) kann in mehrere Teilerperimente unterteilt werden, nämlich die Probenbereitung, die isoelektrische Fokussierung (IEF, erste Dimension, (Robertson *et al.*, 1987)) und die normale SDS-PAGE (zweite Dimension, (Laemmli, 1970)). Die Proteine werden nach Extraktion in einem pH-Gradientengel aufgetrennt. Aufgrund einer angelegten Spannung wandern sie bis zum Erreichen ihrer spezifischen Nullpunktladung in diesem Gel (IEF). Das IEF-Gel wird dann auf das Trenngel eines 12 %igen SDS-Gels gelegt und die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Bei radioaktiv markierten Proteinen kann nach dem Trocknen des Geles mit Hilfe eines Phosphoimagerscreens das Expressionsmuster der Bakterienzellen sichtbar gemacht werden.

3.7.1.7. **Radioaktive Markierung von *S. cellulosum*-Zellen/ pulse-labeling**

L-[³⁵S] Methionin dient zur Identifizierung der exprimierten Proteine. Durch das Wachstum sind die Zellen in der Lage, das L-[³⁵S] Methionin aufzunehmen und dieses in die Proteine einzubauen. Somit kann die eingebaute Radioaktivität mit Hilfe eines *Phosphoimagerscreen* detektiert werden.

Hierzu wird *S. cellulosum* in einem synthetischen Medium bei 30 °C kultiviert. Zur exponentiellen und stationären Phase werden jeweils 5 ml Kultur entnommen und mit L-[³⁵S] Methionin für 6h markiert.

Nachdem die Zellen mit L-[³⁵S] Methionin radioaktiv markiert wurden, werden die Zellen abzentrifugiert und bei -20 °C eingefroren.

Die Zellen werden mindestens dreimal mit 80 % eiskaltem Aceton gewaschen, bis der Überstand nicht mehr gelblich gefärbt ist. Anschließend werden die Zellen in 100 µl Harnstofflysepuffer aufgenommen. Um einen Proteinextrakt herzustellen, wird zu der Suspension Glasperlen gegeben. Mit Hilfe der Glasperlen können die Zellen im Ribolyser (zweimal 10 sec bei 6,5) zerstört werden. Die Suspension wird anschließend zentrifugiert (10.000 rpm, 5 min, 4 °C) und die Proteinkonzentration mittels des Bradfordassays bestimmt.

3.7.1.8. **Isoelektrische Fokussierung (IEF)**

Die DryStrips (Amersham Pharmacia) werden bei -20 °C gelagert. Zur Vorbereitung der ersten Dimension werden die Strips über Nacht in 140 µl Rehybridisierungslösung gelegt.

Zuvor wurde die gewünschte Proteinextraktmenge in die Rehybridisierungslösung gegeben. Der Streifen wird anschließend mit Mineralöl überschichtet.

Am nächsten Tag wird der Streifen kurz mit ddH₂O abgespült, um das Kristallisieren des Harnstoffs auf der Geloberfläche zu verhindern. Anschließend wird der Streifen in die Wanne mit der Kathoden-Seite nach oben gelegt. Der Stromkreislauf zwischen Anode und Kathode wird geschlossen und der Streifen mit Mineralöl überschichtet.

Das Vorfokussieren findet bei 150 V, 20 °C für 10 min statt. Die anschließende Fokussierung der Proteine in der ersten Dimension ist in der nächsten Tabelle aufgelistet.

Tabelle 3.8.: Konstante 20 °C, Programm für 7 cm Streifen pH 4-7 im Gradientenmodus

Zeit	V (Volt)	kVh
1 min	200	
1,5 h	3500	2,8
1-1,5 h	3500	5,2

Nach Ablauf der ersten Dimension wird der Streifen equilibriert. Dazu wird er zunächst vom Mineralöl befreit. Anschließend wird der Streifen in unbenutzte Klarsichthüllen gelegt und mit der Gelseite nach oben befestigt. Somit kommen mehrere Streifen nicht miteinander in Berührung. Zudem können sie so für mehrere Monate bei -80 °C gelagert werden.

Zum equilibrieren wird eine Seite der Klarsichthülle aufgeschnitten, so dass die Streifen jedoch weiterhin befestigt sind. Streifen nach unten in eine geeignete Wanne legen.

Anschließend wird die Lösung 1 zu den Streifen gegeben. Die Inkubation findet unter schütteln für 15 min, bei 37 °C statt. Nach dem Waschen mit ddH₂O findet die Inkubation von Lösung 2 unter gleichen Bedingungen statt.

Vor dem Auftragen der ersten Dimension auf das Trenngel werden die Streifen erneut durch ddH₂O gezogen um ein Auskristallisieren des Harnstoffs zu verhindern.

3.7.1.9. 2D-SDS-PAGE

Die zweite Dimension wird mit 12 %-Acrylamid-SDS-Gelen in den *BioRad*-Kammern nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach dem Zusammenbau der Apparatur kann das Trenngel bis zu einer bestimmten Markierung in die Kammer gefüllt, mit ddH₂O überschichtet und zur Polymerisation stehen gelassen werden. Die auf RT erwärmten und behandelten IEF-Gele werden nun vorsichtig auf die Geloberfläche des Trenngeles gelegt

und nachfolgend mit heißer Agarose blasenfrei festgekittet. Nach Erkalten der Agarose wird der Elektrodenpuffer in die Apparatur gefüllt und die Elektrophorese zuerst 1 h/ 25 mA und anschließend bei 60 mA Stromstärke durchgeführt. Kurz vor dem Herausfließen des Farbstoffes kann das Gel gestoppt werden. Die Gelplatten werden anschließend vorsichtig aufgehebelt und die Acrylamid-Gele können anschließend von den Glasplatten auf Whatman-Papier überführt werden. Es folgt das Trocknen bzw. Färben der Gele.

3.7.2. (p)ppGpp-Synthese *in vivo*

Zwei Stressarten wurden für die Induktion der (p)ppGpp-Synthese beschrieben, nämlich der Aminosäure- (AS-) und der Kohlenstoff-(C-)Mangel. Der AS-Mangel kann durch das Analogon D-Norvalin und der C-Mangel durch Zusatz von α -Methylglykosid hervorgerufen werden. Die Absolutmengen dieser Signalstoffe sind jedoch gering, so dass zur Detektion des Alarmons (p)ppGpp, den Zellen [^{32}P]- H_3PO_4 verfüttert werden muss.

Die Zellen werden in SM-Medium mit Glukose kultiviert. Bei einer $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,4$ wird die Ausgangskultur geteilt. Die eine Hälfte der Zellen wird [^{32}P]- H_3PO_4 (100 $\mu\text{Ci/ml}$) zugesetzt. Die andere Hälfte diente als Kontrolle zur Messung des Zellwachstums. Bei $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,9$ werde den Zellen D-Norvalin (0,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$) bzw. α -Methylglykosid (1 % (w/v)) zugesetzt. Nach 30 und 60 min Inkubation werden jeweils 500 μl -Aliquots entnommen und zentrifugiert. Die vorhandenen Pellets werden in 20 μl 1 M Ameisensäure resuspendiert. Es folgen drei Gefrier-($\text{N}_{2\text{fl}}$) und Auftau-Zyklen (37 $^\circ\text{C}$). Nach Zentrifugation (13.000 rpm, 4 $^\circ\text{C}$, 5 min) der Zelltrümmer kann der Überstand bei -20 $^\circ\text{C}$ gelagert werden.

3.7.3. Dünnschichtchromatographie von Nukleotiden

Die Dünnschichtchromatographie wird mit Hilfe von Polyethylenimin (PEI) beschichteten Celluloseplatten von *Macherey & Nagel* mit 1.5 M KH_2PO_4 (pH 5) als Laufmittel durchgeführt. Die Platten werden zuvor mit 2 M Ameisensäure-Pyridin, pH 2,2 und anschließend mit ddH_2O gewaschen und gut getrocknet.

Auf den Platten wird zuvor mit einem weichen Bleistift eine Markierung für die Auftragung der Extrakte eingezeichnet (2 cm von allen Seiten entfernt, mindestens 1 cm Abstand zueinander). Von den *in vivo* Extrakten werden 20 μl (in 4x5 μl Portionen) aufgetragen. Als Größenmarker können Standards (ATP, GTP, GDP, AMP, etc.) verwendet werden. Nach dem Auftragen der Extrakte auf die Platte wird diese getrocknet

(Fön). Nach Beendigung der Chromatographie wird die Platte nochmals getrocknet, in eine Klarsichthülle gehüllt und mittels Autoradiographie ausgewertet.

3.7.4. Phosphoprotein-Isolierung in *S. cellulosum*

Zur Identifizierung von Phosphoproteinen im Proteom von *S. cellulosum* werden Proteinextrakte mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ markiert.

Hierzu wird *S. cellulosum* in einem synthetischen Medium bei 32 °C kultiviert. Aus exponentieller und stationärer Phase werden aus jeweils 5 ml Kultur ein Proteinextrakt hergestellt. Zudem werden jeweils 5 ml einer stationären Kultur für 2 h in Differenzierungsmedium überführt. Von allen Proben werden Proteinextrakte hergestellt und anschließend mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ für 45 min markiert.

Nachdem die Phosphoproteine mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ radioaktiv markiert wurden, werden diese mit Hilfe von Aceton gefällt und anschließend in 1x SDS-Auftragspuffer aufgenommen.

Die Proben werden anschließend auf einem 12 %igem SDS-Gel aufgetrennt. Die radioaktiv markierten Proteine können nach dem Trocknen des Gels mit Hilfe eines *Phosphoimagerscreens* sichtbar gemacht werden.

3.8. Säulenchromatographische Methoden

Chromatographie beruht auf der unterschiedlichen Verteilung von verschiedenen Stoffen auf zwei nicht miteinander mischbaren Phasen. Die eine Phase ist stationär und die andere mobil. Bei der Säulenchromatographie stellen die Partikel in der Säule die stationäre Phase dar, während die Lösung, die durch die Säule fließt (Eluens), als mobile Phase definiert ist. Man unterscheidet verschiedene Arten der Säulenchromatographie. Bei der Adsorptionschromatographie werden die Substanzen stabil an die Säulenmatrix gebunden. Die Elution erfolgt dann durch ein geändertes Lösungsmittel (i.d.R. ein Salzgradient). Demgegenüber steht die Verteilungschromatographie, bei der die Trennung durch die unterschiedliche Laufgeschwindigkeit des Eluens erfolgt.

Die in dieser Arbeit verwendete Säulenapparatur ist das BioLogic HR System von Bio-Rad. Dieses System beinhaltet das *inject valve*, ein spezielles Ventil, in welches die Probe geladen wird. Von dort aus gelangt die Probe zur Säule. Die Puffer, die von der *workstation* aus durch die Gradientenpumpe zur Säule gepumpt werden, fließen ebenfalls durch dieses Ventil. Die Gradientenpumpe sorgt für das Mischen von Puffer 1 und 2, z. B. für einen Salzgradienten. Nach der Säule fließt die Probe an einem UV-Detektor und an einem Konduktivitätsmonitor vorbei, der die Laufprotokoll-Daten zum Computer sendet.

Vom Computer aus wird das ganze System gesteuert, hier werden die verschiedenen Optionen d.h. Methoden gewählt und eingestellt. Am Ende des Systems ist ein Fraktionssammler, der die Fraktionen mit einstellbaren Volumina sammelt. Die Proben werden geladen und das Programm startet. Alle Puffer, die für die Säulenchromatographie genutzt werden, müssen filtriert und entgast sein.

3.8.1. Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen Interaktion zweier Reaktionspartner z.B. Antikörper und Antigen, Enzym und Coenzym, allgemein Protein und Ligand. Bei der Affinitätschromatographie enthält die Säulenmatrix kovalent einen Liganden. An diesen Liganden bindet spezifisch der zu isolierende Stoff, und von dort kann dieser spezifisch eluiert werden (Pingoud und Urbanke 1997).

3.8.1.1. Heparinsäule

Diese Art der Affinitätschromatographie beruht auf der Interaktion: Protein und Ligand. Der Ligand ist hier das Heparin, das an die Sepharosematrix gekoppelt vorliegt. Proteine, die eine Heparinbindungsdomäne besitzen, binden an diese Matrix und können somit aus heterologen Proteinlösungen gereinigt werden. Es handelt sich hierbei um potentielle DNA-Bindeproteine. Nach dem Binden der potentiellen DNA-Bindeproteine an die Heparinsäule werden hohe Salzkonzentrationen zur Elution verwendet.

3.9. Streptavidin-Biotin-fishing

Um spezifische Proteine aus einem Protein-Pool heraus zu trennen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine darunter ist das Streptavidin-Biotin-*fishing*.

Hierfür werden bestimmte *primer* der zu untersuchenden Promotorregion benötigt, die am N-terminalen Ende einen Biotin-Schwanz erhalten.

Nach dem Amplifizieren der Promotorregion mit Hilfe von chromosomaler DNA, ist es möglich, das vorhandene PCR-Produkt an Streptavidin-DynaBeads zu binden. Dies geschieht durch eine Kopplung des Biotin-Schwanzes mit den Streptavidin-Rezeptoren.

Die amplifizierte Promotorregion befindet sich exponiert an den magnetischen DynaBeads. Zu diesen Kügelchen wird nun ein frischer Proteinextrakt des zu untersuchenden Stammes gegeben. Hierbei sollte beachtet werden, dass beim Vergleich verschiedener *S. cellulosum* Stämme die gleiche Konzentration von Extrakt verwendet werden. Die Inkubation der

DynaBeads mit den Proteinextrakten findet bei RT unter ständiger Bewegung für mindestens 1 Stunde statt.

Die Proteine, die eine Affinität für die Promotorregion aufweisen binden an diese. Der restliche Proteinextrakt wird mit Hilfe zahlreicher Waschschriffe entfernt (2x mit Polyd (ID), 2x ohne Polyd (ID)).

Das Eluieren der gebundenen Proteine findet durch die Zugabe von 300-500 mM NaCl statt. Dazu werden 200 µl der Elutionslösung in das Eppendorfgefäß mit den DynaBeads gegeben und für 1 Stunde bei RT und unter ständigem Schütteln eluiert.

Die Proteine werden anschließend Aceton gefällt und mit Hilfe eines SDS-Gels analysiert.

3.10. Produktionsanalyse von Sekundärmetaboliten

3.10.1. Quantitativer Nachweis mit Hilfe von Bioassay Experimenten

Die zu untersuchenden Stämme werden mit einer OD_{600nm} : 0,5 in 10 ml Produktionsmedium (8 g/l Stärke, 2 g/l Glucose, 0,2 g/l Probiol, 1 g/l $CaCl_2 \times 2H_2O$, 1 g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$, 11,9 g/l HEPES, 8 mg/l Na-Fe-EDTA; pH 7,4) angeimpft. Zu den Kulturen werden 2 % Absorber-*resin* XAD-16 gegeben. Mit Hilfe des XAD-16 können die produzierten Sekundärmetabolite gebunden werden. Zudem regt dieses *resin* die Produktion der Sekundärmetabolite an. Die Kulturen werden 10 Tage bei 32 °C geschüttelt. Anschließend werden die XAD-16 Kügelchen mit Hilfe eines Filters von der übrigen Kultur befreit. Zum Lösen der gebundenen Sekundärmetabolite werden die XAD-16 Kügelchen in Methanol gegeben und dort für 30 min inkubiert. Der Überstand wird anschließend in der *speed-vac* um das $\frac{3}{4}$ ihres Volumens eingeengt.

Das Bakterium *M. luteus* dient als Bio-Indikator für Etnangien, wohingegen *H. ansenula* als Indikator für Chivosazol verwendet wird. Beide Stämme werden in den für sie nötigen Medium angezogen. Eine dicke Übernachtskultur wird mit Hilfe von Top-Agar auf die dazu gehörige Platte gegossen.

3 µl der jeweils extrahierten Bioassay-Proben werden auf ein Filterpapier getropft und anschließend auf die frisch beimpften Platten gelegt. Die Platten werden anschließend bei 32 °C inkubiert. Mit Hilfe des entstandenen Hemmhofes lässt sich die Sensitivität der Bakterien in Bezug auf die Sekundärmetabolite überprüfen.

3.10.2. Detektion von Chivosazole A und Etnangien durch HPLC Analysen

Die HPLC-Analysen werden in der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF)-Braunschweig vorgenommen.

Zur Detektion der Sekundärmetabolite Chivosazole A und Etnangien werden die zu untersuchenden Stämme in 100 ml Produktionsmedium (8g/l Kartoffelstärke (Maizena, Germany), 2g/l Glukose (Maizena, Germany), 0.2g/l Probion (SCP from Hoechst, Germany), 1g/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 11.9g/l Hepes (Roth, Karlsruhe, Germany), 8 mg/l Na-Fe-EDTA; Aldrich, Reinheim, Germany; pH 7,4) angeimpft. Anschließend werden die gewachsenen Kulturen in einen 15 Liter Bioreaktor mit 10 Litern Produktionsmedium (ohne Hepes) überführt. Die Fermentation wird bei 30 °C und einer Belüftung von 0,1 vvm durchgeführt. Für die ständige Sekundärmetabolismus Produktion werden 2 % des Absorber-*resins* XAD-16 hinzu gegeben.

Um den Produktionsverlauf der Sekundärmetabolite zu verfolgen wird jeden Tag eine *resin*-Probe aus dem Fermenter gezogen. Die Metabolite werden danach mit Hilfe von Methanol aus den Kügelchen gelöst. Die aufkonzentrierten Proben können anschließend mit dem HPLC System 1090 (Hewlett Packard) analysiert werden. Zur Auftrennung wird einen 3 µm Hypersil HyPurity Säule 125/3 mm (Thermo Quest) verwendet. Die Temperatur sollte 60 °C und die Flussrate 0,5 ml/min⁻¹ betragen. Die Äquilibrierungslösung enthält 0,2 % Essigsäure in HPLC-H₂O/ Acetonitril (50:50, v/v). Der 100 % Gradient verläuft innerhalb von 5,5 min.

3.11. Probenvorbereitung für MALDI-TOF

3.11.1. Coomassie gefärbte Spots

Das zu untersuchende Protein wird eng ausgeschnitten und in ein Eppendorfgesäß überführt. Mit Hilfe von NH_4HCO_3 wird es für 15 min neutralisiert.

Nach zweimaligem Waschen des Gelstücks mit Acetonitril und NH_4HCO_3 , wird es anschließend in der *speed-vac* getrocknet.

3.11.2. Silber gefärbte Spots

Tabelle 3.9. : Angaben der Lösungen zum Entfärben der Spots

Stoff	Gewicht [g]	Lösungsvolumen [ml]	Endkonzentration [mM]
Kaliumhexacyano-ferrat (A)	0,987	100	30
Na-thiosulfat x 5 H ₂ O (B)	2,4818	100	100
Ammoniumhydrogen-carbonat (C)	1,5812	100	200

Kurz vor dem Gebrauch werden die Lösungen A und B im Verhältnis 1 : 1 gemischt. Die Mischung wird anschließend auf die zu entfärbenden Spots gegeben und solange inkubiert bis die Silberfärbung verschwunden ist (2-30 min). Danach wird mehrfach mit ddH₂O gewaschen bis die zuvor entstandene gelbe Farbe entfernt ist. Das Gelstück wird nun für 20 min in Lösung C stehen gelassen und anschließend zweimal mit ddH₂O gewaschen. Bevor das nun entfärbte Gelstück in die *speed-vac* kommt, wird es noch mit Hilfe von 100 %igen Acetonitril dehydriert.

3.12. Proteinanalytik

3.12.1. Fällungsmethoden für Proteine

Bei globulären Proteinen, die in nativer Konformation vorliegen, sind die unpolaren Aminosäurereste im Inneren des Proteins und die polaren Aminosäurereste nach außen angeordnet. Die stabile Konformation nativer Proteine wird durch hydrophobe Wechselwirkungen im Inneren der Proteine, elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen in der Zwischenphase, nach außen zum Lösungsmittel hin, bewirkt. Störungen in diesem System können dazu führen, dass die Balance zwischen diesen Wechselwirkungen gestört wird, was zur Aggregation zwischen Proteinen und schließlich zur Präzipitation führt. Bei Erhöhung der Ionenstärke ist ein Ausfällen („Aussalzen“) der Proteine zu beobachten. Dies ist auf die Abschirmung von Oberflächenladungen sowie auf die Konkurrenz um Lösungsmittel (Erniedrigung der

Wasseraktivität) zurückzuführen. Dieser Prozess ist reversibel, d.h. verringert man die Ionenstärke, werden die Proteine wieder gelöst.

3.12.1.1. Ammoniumsulfatfällung

Die Ammoniumsulfatfällung kann zur Konzentrierung und auch zur Anreicherung eines gewünschten Proteins eingesetzt werden. Sie ist aus mehreren Gründen unter den salzinduzierten, reversiblen Verfahren die Verbreitetste. Beispielsweise können Ammoniumsulfatlösungen ausreichend hochkonzentriert hergestellt werden, um fast alle Proteine zu fällen.

Bei der Konzentrierung von Proteinen wird im Eisbad unter Rühren portionsweise festes, fein zerriebenes NH_4SO_4 zu der Proteinlösung gegeben. Die Menge des zugesetzten NH_4SO_4 hängt davon ab, zu wie viel Prozent die Lösung gefällt werden soll (Pingoud und Urbanke, 1997). Nach ca. 30min kann der Fällungsansatz bei 10.000 rpm und 0-4 °C zentrifugiert werden. Der Überstand wird vorsichtig dekantiert, und der Niederschlag in Puffer resuspendiert.

Anstelle von festem NH_4SO_4 kann auch eine gesättigte NH_4SO_4 -Lösung verwendet werden, was allerdings zu größeren Volumina führt.

Zur Anreicherung von Proteinen wird die so genannte fraktionierte Fällung durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird ausgenutzt, dass verschiedene Proteine bei unterschiedlichen NH_4SO_4 -Konzentrationen ausfallen. Zuerst wird die Proteinlösung einer 30 %igen Fällung unterzogen. Bei 10.000 rpm und 0-4°C wird zentrifugiert, der Überstand abgenommen, und dazu weiteres Ammoniumsulfat für eine 40 %ige Ammoniumsulfatfällung zugegeben. Die Proteinlösung wird wieder zentrifugiert. Zu diesem Überstand wird dann so oft weiteres Ammoniumsulfat gegeben, bis eine maximalen Konzentration von 80 % erreicht ist und alle Proteine ausgefallen sind. Um festzustellen, bei welcher Ammoniumsulfatkonzentration das gewünschte Protein präzipitiert, werden die Überstände mit Hilfe der Gelelektrophorese untersucht.

3.12.1.2. Acetonfällung

Die Acetonfällung ist eine weitere Methode zur Konzentrierung und auch zur Anreicherung eines gewünschten Proteins.

Hierzu wird die bestimmte Menge des Proteinextraktes mit der 3 fachen Menge 100 %igem Aceton versetzt.

Die Mischung wird bei -20 °C für mindestens 20 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (13.000 rpm, 15 min, 4 °C). Das Pellet wird in 1x SDS-Auftragspuffer aufgenommen.

3.12.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Mit Hilfe der colorimetrischen Bestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) lässt sich die Proteinkonzentration einer Lösung bestimmen. Diese Methode basiert auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue in saurer Lösung an Protein. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465nm auf 595nm, so dass schon wenige µg an Protein nachgewiesen werden können.

Zunächst wird eine Eichgrade mit definierten Proteingehalten angelegt. Als Eichprotein dient eine BSA-Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mg/ml. Ausgehend von dieser BSA-Stammlösung werden verschiedene Verdünnungen hergestellt, die in einem Diagramm gegen die Absorption aufgetragen werden. Anhand der Steigung der Geraden wird ein Faktor ermittelt, mit dem man die Absorption der Proben multipliziert, um den Proteingehalt der Probe zu ermitteln.

Durchführung

In einer Küvette mischt man 799 µl ddH₂O mit 1 µl Probe. Dazu werden dann 200 µl Bradford-Reagenz gegeben. Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 595nm die Absorption bestimmt.

Um die Genauigkeit zu erhöhen, werden Parallelbestimmungen sowohl für die Eichkurve, als auch für die zu bestimmenden Proben durchgeführt und die Messwerte gemittelt.

3.12.3. Zellaufschlussmethoden

Zur Gewinnung von Proteinextrakten aus ganzen Zellen müssen die Zellen aufgebrochen werden. Um zu verhindern, dass die zu untersuchenden Proteine Schaden nehmen, werden die Proben während des gesamten Vorgangs auf Eis gekühlt. Um Degradation durch Proteasen zu verhindern, die während des Zellaufbruchs freigesetzt werden, setzt man den Proben zusätzlich den Proteasehemmer PMSF in einer Konzentration von 0,1 mM zu.

3.12.3.1. **Ultraschall**

Beim Ultraschall werden die Bakterienzellen durch so genannte Kavitationseffekte aufgebrochen.

In dieser Arbeit erfolgte der Zellaufschluss mit dem Ultraschallgerät Bandelin Sonoplus GM70 MS 72 LD. Es wurde die MS 73 Sonotrode verwendet.

4. Ergebnisse, Teil I:

Das Myxobakterium *S. cellulosum* ist in der Lage, sowohl physiologisch als auch morphologisch zu differenzieren. Während ersteres zur Bildung so genannter Sekundärmetabolite führt, resultiert die morphologische Differenzierung in der Bildung multizellulärer Aggregate, in denen die Zellen zu Sporen umgewandelt werden. Beide Prozesse kann man nur unter Wachstumslimitierenden Bedingungen beobachten (Reichenbach und Höfle, 2003).

Neben den Myxobakterien verfügen auch *Bacillen* und *Streptomyceten* über die Fähigkeit, Sekundärmetabolite und Sporen unter Nährstoffmangelbedingungen zu bilden. Insbesondere die Aminosäurelimitierung ist eine wichtige Voraussetzung, um die verschiedenen Differenzierungsphänomene zu beobachten (Ochi *et al.*, 1981). In Bakterien löst die Aminosäurelimitierung die Aktivierung der stringenten Kontrolle aus. Dieser globale Regulationsmechanismus bewirkt durch die Bildung des Alarmons (p)ppGpp, dass Energiezehrende Prozesse gedrosselt werden (DNA- und Proteinsynthese). Darüber hinaus werden durch (p)ppGpp Aminosäurebiosynthesegene aktiviert, um der Aminosäurelimitierung entgegen zu wirken. Diese positiven als auch negativen Effekte erfolgen im Bereich der Transkription. In *B. subtilis* und *S. coelicolor* konnte bereits gezeigt werden, dass unter Aminosäuren-Limitierung ohne die stringente Kontrolle keine Differenzierung erfolgt (Chakraborty *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2003).

Somit stellte sich die Frage, ob die morphologische und physiologische Differenzierung von *So ce56* ebenfalls der stringenten Kontrolle unterliegt.

Das Ziel der Arbeit war zum einen die Analyse und Identifizierung von (p)ppGpp-Synthetasen kodierenden Genen in *So ce56*. Des Weiteren die Analyse des potentiellen Zusammenhangs zwischen stringenter Kontrolle und Initiation der Fruchtkörperbildung und Sekundärstoffbildung. Für diese Analyse sollte eine Mutante konstruiert werden, in der die stringente Kontrolle gestört ist.

Ein langfristiges Ziel der Arbeiten an dem Organismus *S. cellulosum* ist die Identifizierung spezifischer Transkriptionsaktivatoren für die verschiedenen Differenzierungsprozesse. Mit Hilfe von Proteinanalysen von Wildtyp und Mutante sollten potentielle Aktivatoren identifiziert werden.

4.1. Potentielle ppGpp-Synthetase kodierende Gene in *Sorangium cellulosum*

Zunächst wurde im Genom nach potentiellen (p)ppGpp-Synthetase Genen gesucht. Nur ein (p)ppGpp-Synthetase Gen wurde gefunden. Die Sequenz dieses Genprodukts (sce_20050509_3596) wurde mit folgenden bekannten Rel/RelA- bzw. SpoT-Proteinen verglichen: das RelA Protein von *M. xanthus* (1), das Rel Protein von *A. dehalogenans* (2), *S. cellulosum* (3), *G. sulfurreducens* (4) und *D. desulfuricans* (5), SpoT-Protein von *E. coli* (6), sowie das Rel-Protein von *B. subtilis* (7) und *S. coelicolor* (8) und das RelA Protein von *E. coli* (9) (alle Abb. 4.3.).

Das Genprodukt zeigt mit einer 56%igen Identität die größte Homologie zu den myxobakteriellen Rel Proteinen (Tabelle 4.1.). Das Protein aus *So ce56* wird daher im Folgenden auch als Rel-Protein bezeichnet. Rel_{*S. cellulosum*} besteht aus 724 Aminosäuren und liegt somit im gleichen Größenbereich wie andere (p)ppGpp-Synthetasen (80,54 kDa). Dieses Rel-Protein von *So ce56* besteht aus vier verschiedenen Domänen:



Abb. 4.1.: Rel-Protein von *So ce56*

HD-Domäne: Diese Enzyme sind in der DNA-Synthese, sowie an der Signaltransduktion beteiligt.

RelA_SpoT-Domäne: Bei RelA handelt es sich um eine Guanosin 3',5'-bispyrophosphatase-Synthetase. Wohingegen SpoT ein bifunktionales Enzym darstellt, das sowohl (p)ppGpp synthetisieren als auch degradieren kann.

TGS-Domäne: Die TGS-Domäne ist eine kleine Domäne aus ~ 50 Aminosäureresten. Bis jetzt gibt es keine direkte Information zur Funktion dieser Domäne. Man findet sie jedoch in zwei Typen von Regulatorproteinen, die zum größten Teil eine Liganden bindende, regulatorische Rolle besitzen.

ACT-Domäne: Diese Domäne ist eine regulatorische Domäne. Man findet sie in den Sequenzen zahlreicher metabolischer Enzyme, die durch Aminosäurekonzentrationen reguliert werden.

Diese typische Domänenstruktur von einer (p)ppGpp-Synthetase vom Typ III lässt folgende Enzymaktivität erwarten:

1. Ribosomen-abhängige (p)ppGpp Produktion unter Aminosäurelimitierenden Bedingungen
2. Ribosomen-unabhängige (p)ppGpp Produktion durch anhaltenden Kohlenstoffmangel
3. (p)ppGpp Hydrolyse

Des Weiteren zeigt das Protein hohe Ähnlichkeit zu Proteinen anderer Delta-Proteobakterien.

Tabelle 4.1.: Homologie der (p)ppGpp-Synthetase von *So ce56* zu anderen

Organismus	Länge (aa)	<i>e-value</i>	Identität (%)
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> Rel	945	0.0	56
<i>Myxococcus xanthus</i> Rel	757	0.0	55
<i>Geobacter sulfurreducens</i> Rel	716	0.0	54
<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> Rel	738	0.0	49
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> Rel	715	0.0	48
<i>Bacillus subtilis</i> Rel	734	0.0	43
<i>Streptomyces coelicolor</i> Rel	847	7e-168	43
<i>Escherichia coli</i> RelA	702	e-153	40
<i>Escherichia coli</i> SpoT	744	e-130	36

Die ClustalW-Analyse zeigt deutlich, dass diese fünf Proteine der Delta-Proteobakterien in einem Cluster zu finden sind (Abb. 4.2.). Dieses Cluster ist zum einen eingerahmt von dem SpoT- aus *E. coli* und andererseits dem RelA-Protein aus *E. coli*. Die Rel-Proteine der Gram-positiven Organismen *B. subtilis* und *S. coelicolor* zeigen in dieser Analyse höhere Ähnlichkeit zu dem RelA-Protein von *E. coli*.

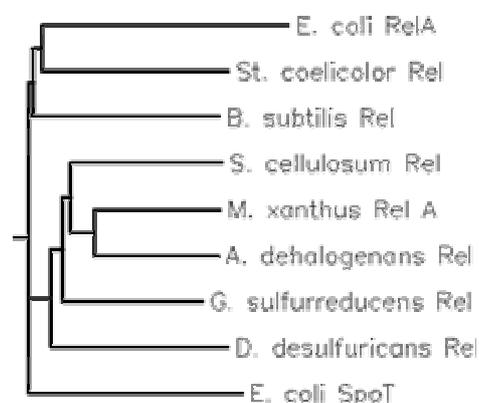


Abb. 4.2.: Stammbaum-Analyse verschiedener (p)ppGpp Synthetasen

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen dieser verschiedenen Proteine ist in Abb. 4.3. dargestellt. Die unterschiedlichen Domänen sind in verschiedenen Grautönen unterlegt (Abb. 4.3.). Übereinstimmung der Aminosäuren sind in rot gehalten.

1	---	M--14--SFDD	---	PERHPTVSQYHP	---	DPDL	DI	IKKAVYSAKVHQQQLFKSGEPYLVHPLVAGILGELKLEDEASIVTGL	88																																																																																																						
2	---	M-20--LRNDI	---	LDL---	VSGYHP	---	DPDL	DLIKKAVYSAKVHQQQLFKSGEPYLVHPLVAGILGELKLEDEASIVTGL	290																																																																																																						
3	---	LTLTEL---	VDR---	VRTYQP	---	AADV	L	IARAYASDAHKQTFKSGDPYFSPASVAIITELKLDTASVAGL	70																																																																																																						
4	---	IRLNDI---	LDK---	VVTYNP	---	VADL	DL	IRKAVYCAKVHQQQTFKSGEPYLVHPLVAGILGELKLEDEASIVTGL	70																																																																																																						
5	---	IRIQDI---	LDL---	IAERYQ	---	DADIA	L	IKAVYSAKVHQQQTFKSGEPYLVHPLVAGILGELKLEDEASIVTGL	70																																																																																																						
6	---	YLFESL---	NQL---	IQTYLP	---	EDQI	K	RLRQAVLVARDAHEGQTFKSGEPYLVHPLVAGILGELKLEDEASIVTGL	70																																																																																																						
7	---	5-LTAEQV---	IDK---	ARSYLS	---	DEHIA	F	VEKAYLYAFDAHREQYFVHPLVAGILGELKLEDEASIVTGL	75																																																																																																						
8	---	94-ORANPNVLEPLLRIVGNDPKIETSTLRQIERAQAERWHRQKFKSGDPYI	THPLA	VTTHIAELGMDPAILMAGL	174																																																																																																										
9	---	8-NKAGEFD---	PEKWIA	-SLGITS	---	QKSC	E	LAEWTAYCIQQTQGHPIAS--LLLWRGVEWEILSTLSMDIDTLRAAL	80																																																																																																						
1	LHDTI	EDTLATEEELTELFGSEVAHLVDGVTKLSKF-SASASL	---	SQEEKQ	AENFRKMII	AWAQ	IR	VLKADRTHNMRTLDHMSEEQARIAQETLDIYAPLANRGLGELKLEDEASIVTGL	205																																																																																																						
2	LHDTI	EDTLATEEELTELFGSEVAHLVDGVTKLSKF-SASASL	---	TQEEKQ	AENFRKMII	AWAQ	IR	VLKADRTHNMRTLDHMSEEQARIAQETLDIYAPLANRGLGELKLEDEASIVTGL	405																																																																																																						
3	LHDV	EDTLATEEELTELFGSEVAHLVDGVTKLSKF-SASASL	---	SKEDRQ	AENFRKMII	AWAQ	IR	VLKADRTHNMRTLDHMSEEQARIAQETLDIYAPLANRGLGELKLEDEASIVTGL	184																																																																																																						
4	LHDTI	EDTLATEEELTELFGSEVAHLVDGVTKLSKF-SASASL	---	TKEESQ	AENFRKMII	AWAQ	IR	VLKADRTHNMRTLDHMSEEQARIAQETLDIYAPLANRGLGELKLEDEASIVTGL	184																																																																																																						
5	LHDTI	EDTLATEEELTELFGSEVAHLVDGVTKLSKF-SASASL	---	SKEEAQ	AENFRKMII	AWAQ	IR	VLKADRTHNMRTLDHMSEEQARIAQETLDIYAPLANRGLGELKLEDEASIVTGL	184																																																																																																						
6	LHDVI	EDTLATEEELTELFGSEVAHLVDGVTKLSKF-SASASL	---	DKKEA	AENFRKMII	AWAQ	IR	VLKADRTHNMRTLDHMSEEQARIAQETLDIYAPLANRGLGELKLEDEASIVTGL	184																																																																																																						
7	LHDV	EDTLATEEELTELFGSEVAHLVDGVTKLSKF-SASASL	---	SQEEQ	AENFRKMII	AWAQ	IR	VLKADRTHNMRTLDHMSEEQARIAQETLDIYAPLANRGLGELKLEDEASIVTGL	189																																																																																																						
8	LHDTI	EDTLATEEELTELFGSEVAHLVDGVTKLSKF-SASASL	---	EAAQ	AETFRKMII	AWAQ	IR	VLKADRTHNMRTLDHMSEEQARIAQETLDIYAPLANRGLGELKLEDEASIVTGL	286																																																																																																						
9	LFL	LADANVSEDLRESVGRKSVNLLHGVDRMAAIRQLKATHDTSVSEQVDNVR	MLL	AMVDD	FR	CV	VI	KLAE	IAER	I	AHL	RE	VD	PA	DE	DER	V	L	A	A	E	C	T	N	I	A	P	L	A	N	R	L	G	I	G	L	K	L	E	D	E	A	S	I	V	T	G	L	200																																																														
1	LSFR	YKPKQEFFALQAKLNKRKEREKI	EDT	CDL	IR	SKLAE	RGL	KE	VSGR	F	KH	Y	S	I	YK	K	S	Q	I	D	F	Q	I	H	D	I	I	A	F	R	I	I	A	P	T	A	P	S	C	E	A	L	G	L	V	H	E	M	K	P	V	P	G	R	F	K	D	F	I	A	I	P	K	P	N	M	Y	Q	325																																										
2	LSFY	LRPADYSELNEKVSRAEREREK	EFV	AE	VE	I	IR	RL	EA	EG	M	K	A	D	V	S	G	R	V	H	S	I	YK	K	S	Q	I	D	F	Q	I	H	D	I	I	A	F	R	I	I	A	P	T	A	P	S	C	E	A	L	G	L	V	H	E	M	K	P	V	P	G	R	F	K	D	F	I	A	I	P	K	P	N	M	Y	Q	525																																		
3	LSFR	YKPKQEFFALQAKLNKRKEREKI	EDT	CDL	IR	SKLAE	RGL	KE	VSGR	F	KH	Y	S	I	YK	K	S	Q	I	D	F	Q	I	H	D	I	I	A	F	R	I	I	A	P	T	A	P	S	C	E	A	L	G	L	V	H	E	M	K	P	V	P	G	R	F	K	D	F	I	A	I	P	K	P	N	M	Y	Q	304																																										
4	LSFR	YKPKQEFFALQAKLNKRKEREKI	EDT	CDL	IR	SKLAE	RGL	KE	VSGR	F	KH	Y	S	I	YK	K	S	Q	I	D	F	Q	I	H	D	I	I	A	F	R	I	I	A	P	T	A	P	S	C	E	A	L	G	L	V	H	E	M	K	P	V	P	G	R	F	K	D	F	I	A	I	P	K	P	N	M	Y	Q	304																																										
5	LSLR	YLRPDVMSQLSDWLEKKR	VAD	S	D	Y	I	D	N	V	I	S	L	R	G	M	D	E	N	D	I	P	G	K	V	G	R	I	K	H	I	N	S	I	YK	K	S	Q	I	D	F	Q	I	H	D	I	I	A	F	R	I	I	A	P	T	A	P	S	C	E	A	L	G	L	V	H	E	M	K	P	V	P	G	R	F	K	D	F	I	A	I	P	K	P	N	M	Y	Q	304																						
6	LG	F	E	A	L	Y	P	N	R	Y	V	I	K	E	V	V	K	A	R	G	N	R	K	E	M	I	Q	K	L	S	E	T	E	G	R	L	Q	E	A	G	I	P	C	R	V	S	G	R	E	K	H	L	Y	S	I	YK	K	S	Q	I	D	F	Q	I	H	D	I	I	A	F	R	I	I	A	P	T	A	P	S	C	E	A	L	G	L	V	H	E	M	K	P	V	P	G	R	F	K	D	F	I	A	I	P	K	P	N	M	Y	Q	304	
7	TAL	R	Y	L	N	P	Q	Q	Y	R	I	V	N	L	M	K	K	R	A	E	R	E	L	Y	D	E	V	V	N	E	V	K	R	V	E	F	V	N	I	K	A	D	F	S	G	R	P	K	H	Y	S	I	YK	K	S	Q	I	D	F	Q	I	H	D	I	I	A	F	R	I	I	A	P	T	A	P	S	C	E	A	L	G	L	V	H	E	M	K	P	V	P	G	R	F	K	D	F	I	A	I	P	K	P	N	M	Y	Q	309				
8	LA	F	A	I	L	Y	P	K	M	D	E	I	V	R	L	V	A	E	R	A	P	K	R	D	E	Y	L	A	V	V	T	D	E	V	Q	D	L	R	A	A	R	I	K	A	T	V	G	R	P	K	H	Y	S	I	YK	K	S	Q	I	D	F	Q	I	H	D	I	I	A	F	R	I	I	A	P	T	A	P	S	C	E	A	L	G	L	V	H	E	M	K	P	V	P	G	R	F	K	D	F	I	A	I	P	K	P	N	M	Y	Q	406		
9	Y	C	F	R	Y	L	H	P	T	E	Y	K	R	I	A	K	L	L	H	E	R	R	I	E	E	F	V	G	H	L	R	A	E	M	K	A	E	G	V	K	A	E	V	I	G	R	P	K	H	Y	S	I	YK	K	S	Q	I	D	F	Q	I	H	D	I	I	A	F	R	I	I	A	P	T	A	P	S	C	E	A	L	G	L	V	H	E	M	K	P	V	P	G	R	F	K	D	F	I	A	I	P	K	P	N	M	Y	Q	320				
1	S	L	H	T	T	I	G	P	L	S	E	R	V	E	Q	I	R	T	E	M	H	K	I	A	E	G	I	A	A	H	M	K	Y	K	E	---	G	K	A	V	---	---	I	S	K	D	E	K	---	---	F	A	M	L	R	Q	L	M	E	W	Q	D	L	K	P	K	E	F	L	E	T	V	K	V	D	L	F	T	D	E	V	F	V	T	T	P	K	G	D	V	R	S	L	P	R	G	A	T	P	V	D	F	429								
2	S	L	H	T	T	I	G	P	L	S	E	R	V	E	Q	I	R	T	E	M	H	K	I	A	E	G	I	A	A	H	M	K	Y	K	E	---	G	K	A	V	---	---	E	L	S	R	K	D	A	S	---	---	F	G	W	L	Q	L	V	E	F	Q	R	D	L	A	D	P	R	E	L	E	T	V	K	D	L	S	D	E	V	F	V	T	T	P	K	G	A	V	S	L	P	R	G	A	T	P	V	D	F	635									
3	S	L	H	T	T	I	G	P	L	S	E	R	V	E	Q	I	R	T	E	M	H	K	I	A	E	G	I	A	A	H	M	K	Y	K	E	---	D	P	K	D	A	R	---	---	F	G	W	L	R	Q	L	M	E	F	Q	K	L	D	P	A	E	L	E	S	V	K	V	D	L	F	Q	D	E	V	I	V	T	T	P	K	G	D	V	R	V	F	P	G	S	T	P	I	D	F	410																
4	S	L	H	T	T	I	G	P	L	S	E	R	V	E	Q	I	R	T	E	M	H	K	I	A	E	G	I	A	A	H	M	K	Y	K	E	---	D	R	K	E	V	R	---	---	F	A	M	L	R	Q	L	M	E	W	Q	D	L	K	P	K	E	F	L	E	T	V	K	V	D	L	S	D	E	V	F	V	T	T	P	K	G	D	V	R	V	F	P	G	S	T	P	I	D	F	408																
5	S	L	H	T	T	I	G	P	L	S	E	R	V	E	Q	I	R	T	E	M	H	K	I	A	E	G	I	A	A	H	M	K	Y	K	E	---	G	K	V	R	---	---	F	A	M	L	R	Q	L	M	E	W	Q	D	L	K	P	K	E	F	L	E	T	V	K	V	D	L	S	D	E	V	F	V	T	T	P	K	G	D	V	R	V	F	P	G	S	T	P	I	D	F	408																		
6	S	L	H	T	T	I	G	P	L	S	E	R	V	E	Q	I	R	T	E	M	H	K	I	A	E	G	I	A	A	H	M	K	Y	K	E	---	T	T	A	Q	I	R	A	---	---	Q	R	W	S	L	L	E	T	Q	S	A	G	S	S	F	E	I	E	S	V	K	S	D	L	F	D	E	I	Y	V	F	T	T	P	K	G	E	V	I	E	L	P	A	G	A	T	P	V	D	F	409															
7	S	L	H	T	T	I	G	P	L	S	E	R	V	E	Q	I	R	T	E	M	H	K	I	A	E	G	I	A	A	H	M	K	Y	K	E	---	G	K	A	A	---	---	N	E	G	A	T	F	E	K	---	---	L	S	W	F	E	I	Q	N	E	S	T	D	A	E	E	F	E	M	E	S	L	I	D	L	F	D	M	V	I	V	T	T	P	K	G	D	V	I	E	L	P	A	G	A	T	P	V	D	F	415									
8	S	L	H	T	T	I	G	P	L	S	E	R	V	E	Q	I	R	T	E	M	H	K	I	A	E	G	I	A	A	H	M	K	Y	K	E	---	F	A	V	A	G	S	K	R	T	D	A	P	K	S	S	G	K	S	K	D	H	L	N	D	M	A	W	L	R	Q	L	D	K	E	T	D	P	G	E	F	L	E	S	L	R	F	D	L	S	R	N	E	V	F	V	T	T	P	K	G	D	V	I	A	L	P	A	G	A	T	P	V	D	F	526
9	S	L	H	T	T	I	G	P	L	S	E	R	V	E	Q	I	R	T	E	M	H	K	I	A	E	G	I	A	A	H	M	K	Y	K	E	---	A	G	A	---	---	R	S	G	H	E	D	R	---	---	I	A	W	L	R	Q	L	M	E	W	Q	D	L	K	P	K	E	F	L	E	T	V	K	V	D	L	S	D	E	V	F	V	T	T	P	K	G	D	V	L	P	A	G	S	T	P	I	D	F	427											

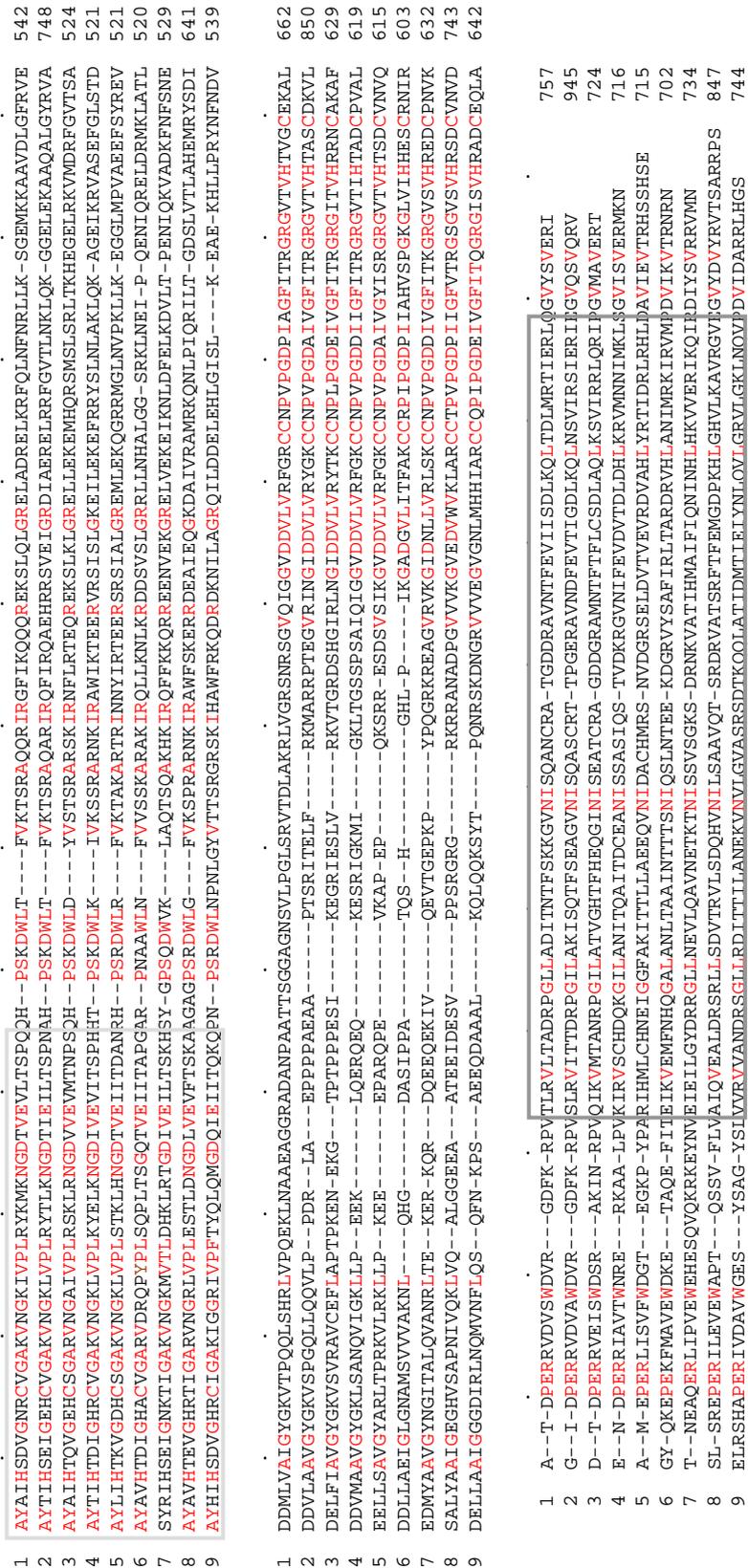


Abb. 4.3.: Aminosäuresequenzvergleich von RelA- und SpoT-homologen Proteinen; (1) RelA von *M. xanthus*, (2) Rel von *A. dehalogenans*, (3) Rel? *S. cellulosum*, (4) Rel von *G. sulfurreducens*, (5) Rel von *D. desulfuricans*, (6) SpoT von *E. coli*, (7) Rel von *B. subtilis*, (8) Rel von *S. coelicolor*, (9) RelA von *E. coli*; Domänen sind in unterschiedlichen Grautönen hinterlegt: HDc (dunkel grau), RelA_SpoT (schwarz), TGS (hellgrau), ACT (antrazit) bearbeitet mit dem Programm CLUSTALW (Ver. 1.6) (Thompson *et al.*,1994)

4.1.1. Die *rel*-Region in *S. cellulosum*

In Gram-positiven Bakterien, findet man eine Coorganisation zwischen dem Gen der (p)ppGpp Synthetase *rel* und dem *apt*-Gen (Wendrich, Beckering *et al.*, 2000). Das *apt*-Gen kodiert eine Adenin-Phosphoribosyltransferase. Diese Coorganisation finden wir jedoch nicht in dem Gram-negativen Bakterium *S. cellulosum*.

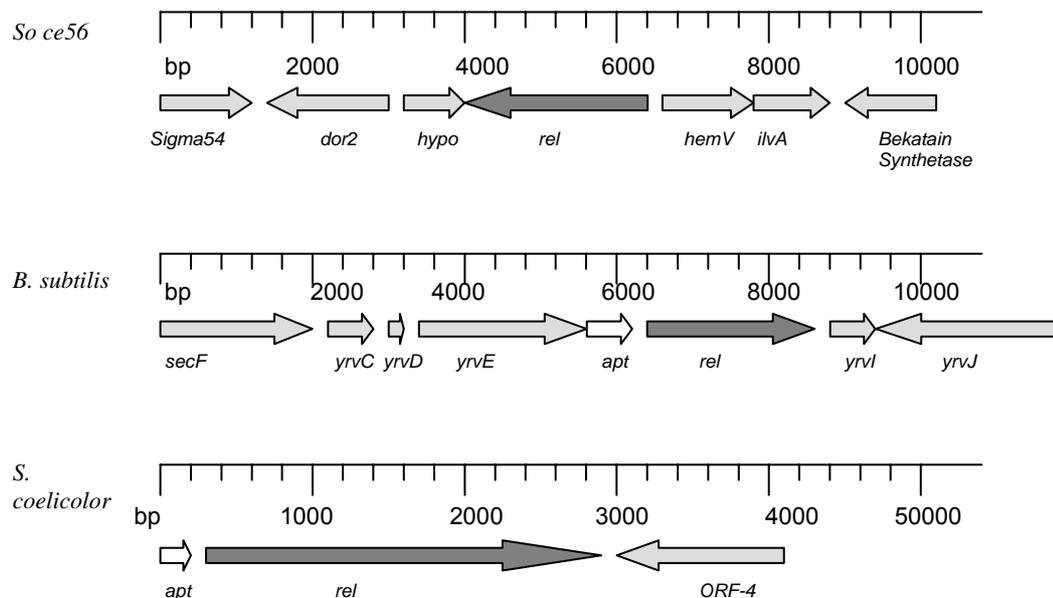


Abb. 4.4.: genetische Organisation der *relA/spoT*-Region verschiedener Eubakterien: die Bezeichnung und Zuordnung der Gene wurde aus den Datensätzen direkt übernommen. Bestimmte Gene wurden farblich unterlegt: *relA* bzw. *rel* (anthrazit); *apt* kodiert für Adenin-Phosphoribosyltransferase (weiß)

4.1.2. Weitere potentielle *rel*-Gene in *So ce56*

Das *rel*-Gen von *S. cellulosum* wird als monocistronische Untereinheit transkribiert. Gene ober- und unterhalb des *rel*-Gens sind in unterschiedlichen Richtungen organisiert. Das *rel*-Gen besitzt eine Größe von 2175 Nukleotiden und kodiert ein Protein von 724 Aminosäuren. Der GC-Gehalt des Gens beträgt 65,8 %. Dies ist jedoch keine Besonderheit, da schon zuvor von hohen GC-Gehalten im Chromosom, von Vertretern der Myxobakterienfamilie berichtet wurde (Mandel und Leadbetter, 1965; Mc Curdy und Wolf, 1967).

Weitere Untersuchungen am Genom von *So ce56* brachten noch zwei weitere Gene zum Vorschein, die eine SpoT-ähnliche HDc Domäne kodieren. Genauere Analysen ergaben *e-values* zwischen $3e^{-6}$ bis zu $2e^{-12}$. Je niedriger ein *e-value* Ergebnis ist, desto besser ist die Übereinstimmung zum gesuchten Protein. Je höher ein *e-value* Ergebnis ist, desto schlechter ist die Übereinstimmung. Die zwei identifizierten Proteine besitzen eine geringe

Das *relint*-Fragment wurde mittels PCR aus der chromosomalen DNA von *So ce56* amplifiziert. Hierzu wurden die *primer relint⁺* und *relint⁻* verwendet. Das 850 bp große amplifizierte interne Stück des *rel*-Gens (Abb.4.5.) wurde anschließend in den Vektor *pGemT-Vektor*[®] kloniert.

Der Vektor ist Bestandteil des *pGem[®]-T easy Vector System* der Firma Promega und eignet sich für eine Klonierung von *blunt end* PCR-Produkten. Im nächsten Schritt wurden die potentiellen Klone per PCR mit den *primern relint⁺* und *relint⁻* überprüft.

Die Plasmid-DNA der potentiellen Klone wurde durch zusätzliche Restriktionen und durch Sequenzierung überprüft.

4.2.2. Klonierung des Konjugationsplasmids pSupHyg

Aus dem *pGem:relint* Plasmid wurde mit Hilfe der Enzyme *SphI* und *PstI* das interne Stück von *rel* ausgeschnitten und das anschließend erhaltene Fragment wurde mit dem Klenow Enzym behandelt. Das interne Stück des *rel*-Gens wurde in den zuvor mit *HindIII* und *BamHI* geschnitten und Klenow behandelten *pSupHyg*-Vektor (Abb. 4.6.) ligiert. Der Vektor *pSupHyg* besitzt eine Größe von 8233 bp und enthält eine Hygromycin und eine Tetrazyklin-Kassette (Pradella *et al.*, 2002).

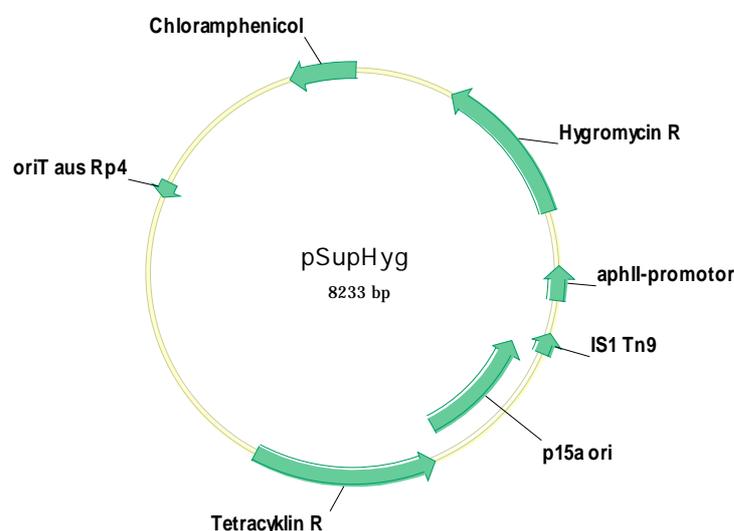


Abb. 4.6.: Graphische Darstellung des Vektors *pSupHyg*: Der Vektor enthält eine Hygromycin-, eine Tetrazyklin- und eine nicht vollständige Chloramphenicol-Kassette. Zusätzlich verfügt der Vektor über einen *p15a ori* (*origin of replication*) und ein *IS1 Tn9* und einen *aphII* Promoter.

Die integrierte Hygromycin-Kassette im *pSupHyg*-Vektor, enthält das Hygromycin-Resistenzgen von *Streptomyces hygroscopicus*. Hygromycin (Hyg) wird als Selektionsantibiotikum in *So ce56* verwendet. Der *oriT* dient der Mobilität, der *aphII* als

Promotor für das *hyg*-Gen (Pradella *et al.*, 2002). Dieser *aphII* Promotor wurde vor das *hyg*-Gen kloniert, da man in Vorversuchen gesehen hatte, dass *So ce56* diesen Promotor erkennt. Bei dem Vektor pSupHyg handelt es sich um einen *tra*-negativen (Transferregion; Operon) aber *mob*-positiven (Mobilisierungsgene; *nic/bom*-Region) Vektor Abb. 4.7. zeigt den pSupHyg-Vektor mit dem internen *relint*-Fragment.

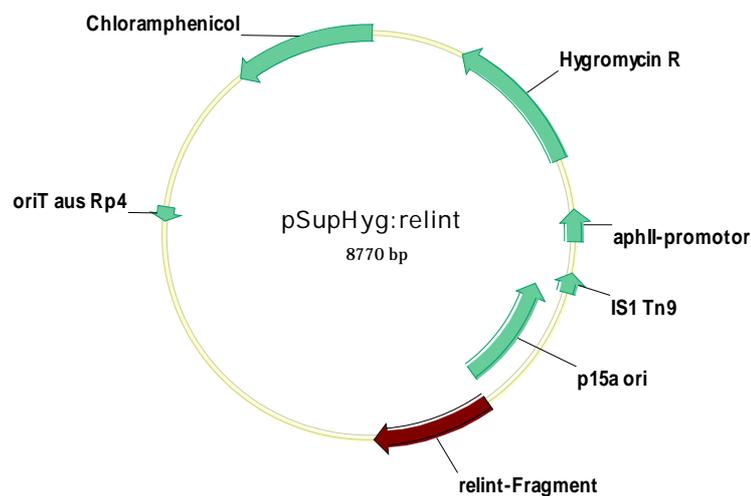


Abb. 4.7.: Graphische Darstellung von pSupHyg:*relint*; Größe: 8770 bp

Die nach der Transformation in *E. coli* DH5 α erhaltenen Plasmide wurden mit Hilfe von PCR und Testrestriktionen überprüft und anschließend sequenziert. Es konnte ein richtiger pSupHyg:*relint* Klon identifiziert werden.

4.2.3. Konjugation in *So ce56*

Die Konjugation beschreibt den gerichteten Gentransfer von Plasmiden aus einer Spenderzelle in eine entsprechende Empfängerzelle. Besitzen die mobilen Elemente bestimmte Gene, die zum Transfer notwendig sind, werden sie als konjugativ bezeichnet. Diese Gene sind im *tra*-Genkomplex lokalisiert. Weiterhin verfügen konjugative Elemente über Mobilisierungsgene (*mob*) und den *origin-of-transfer* (*oriT*)-Bereich, an dem die Mobilisierungsproteine binden und anschließend den für die Übertragung notwendigen Einzelstrangbruch durchführen.

Um eine Konjugation in *So ce56* vorzunehmen, wurde das konstruierte pSupHyg:*relint* Plasmid in den *E. coli* Stamm ET12567pUB307 (*tra*-positiv, *mob*-positiv) (Pradella, 2002) transformiert. Mit Hilfe von ET12567pUB307 kann die Konjugation mit der Empfängerzelle durchgeführt werden.

Es wurde eine biparentale Konjugation vorgenommen. Nach 10 Tagen Inkubation konnten die ersten potentiellen Mutanten von der Konjugationsplatte gepickt werden. Zur weiteren Analyse wurden zwei Klone in nährstoffreichem Medium angeimpft, die chromosomale DNA isoliert und anschließend durch PCR überprüft. Hierzu wurden die internen *primer* relint+ und relint-, sowie die *upstream* liegenden *primer* rel4 und reldown und die *downstream* liegenden rel2 und relup verwendet.

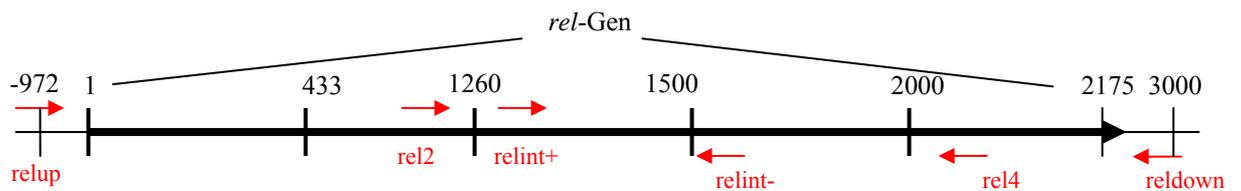


Abb. 4.8.: Schema der *rel*-Region mit *primer*-Positionen

Tabelle 4.2.: *primer*-Kombinationen mit den erwarteten PCR-Produktgrößen

<i>Primer</i>	Erwartung	
	<i>So ce56</i>	<i>Soce:relint</i>
relint +	Kontrolle: keine Bande	Kontrolle: keine Bande
relint-	Kontrolle: keine Bande	Kontrolle: keine Bande
rel2	Kontrolle: keine Bande	Kontrolle: keine Bande
rel4	Kontrolle: keine Bande	Kontrolle: keine Bande
rel2 und rel4	1000 bp	-
rel2 und relint-	987 bp	987 bp
relint- und relint+	827 bp	827 bp
rel4 und relint+	987 bp	987 bp

Das Ergebnis der PCR-Analyse wurde über eine elektrophoretische Auftrennung auf einem 1% Agarosegel analysiert (Abb.4.9.)

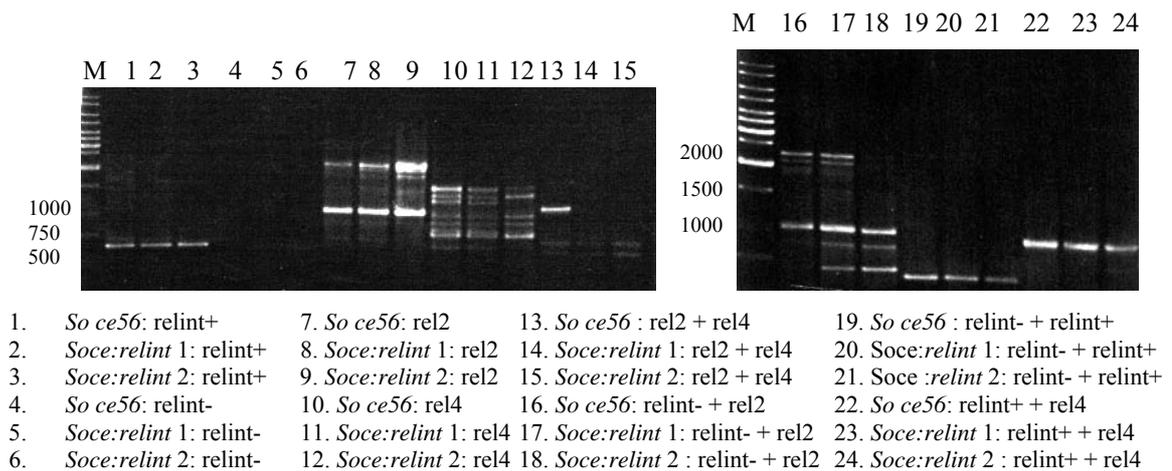


Abb. 4.9.: 1%iges Agarosegel der PCR-Analyse auf chromosomaler DNA potentieller *rel*-Mutanten in *So ce56*. Als Marker wurde der 1 kb DNA *ladder* von Fermentas verwendet.

Um die unspezifischen Banden von der amplifizierten Bande zu unterscheiden, wurden als Kontrolle die Primer einzeln eingesetzt. Tatsächlich amplifizierten die *primer* relint+, rel2 und rel4 mit chromosomaler DNA unspezifische Fragmente. Ignoriert man die unspezifischen Banden lässt sich erkennen, dass beide Mutanten richtig sind. Die *primer*-Paarung rel2 und rel4 zeigt im Wildtyp das erwartete Fragment von 1000 bp (Spur 13). Dieses Fragment konnte in den Mutanten nicht amplifiziert werden (Spuren 14 und 15). Des Weiteren wurden Kontrollen unternommen, die auch mit chromosomaler DNA der Mutanten eine Amplifikation erlauben sollten. Die Kombination rel2 und relint- sollte sowohl im Wildtyp und auch in der Mutante ein 987 bp großes Fragment erzeugen (Spuren 16-18). Das erwartete Fragment konnte in allen Proben amplifiziert werden. Die Kombination relint+ und relint- zeigte wie erwartet sowohl im Wildtyp, wie auch in den beiden Mutanten die erwartete Bande von 827 bp (Spuren 19-21). Die letzte Kontrollreaktion bildete die *primer*-Kombination relint+ und rel4, auch in diesem Fall konnten die erwarteten Fragmente von 987 bp sowohl im Wildtyp, wie auch in der Mutante amplifiziert werden (Spuren 22-24). Für alle weiteren Versuche wurde die erste Mutante verwendet. Die Mutante wird im Weiteren als *Soce:relint* bezeichnet.

4.3. Westernblot-Analyse der *rel*-Mutante

Die Abbildung 4.10. zeigt die Domänenstruktur der (p)ppGpp-Synthetase von *B. subtilis* (Nr. 1). Es zeigt die charakteristischen Domänen einer (p)ppGpp Synthetase III. Nummer 2 in Abbildung 4.10. zeigt das Rel Protein von *So ce56*. Wie auch bei *B. subtilis* zeigt es die Domänenstruktur einer (p)ppGpp Synthetase III. Das in *Soce:relint* eventuell noch

vorhandene Protein ist in Nummer drei abgebildet. Die Insertion des Plasmids pSupHyg:*relint* unterbricht das *rel*-Gen nach Nukleotid 1260. Die ersten 420 Aminosäuren werden also möglicherweise in der Mutante noch exprimiert.

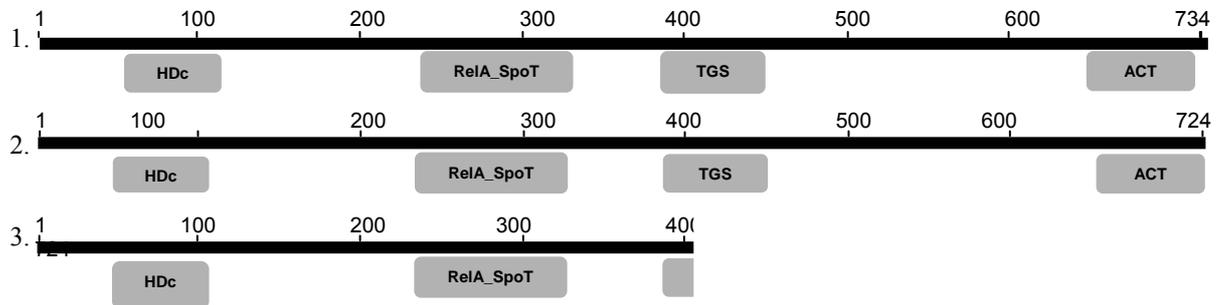


Abb. 4.10.: Rel-Proteine: 1. *B. subtilis* RelA/SpoT Paralog; 2. *So ce56* Rel; 3. *Soce:relint* (Insertion der homologen Rekombination durch rotes Kästchen markiert)

Ein verkürztes Protein hätte nur die Hälfte der TGS-Domäne. Die errechneten molekularen Massen von *B. subtilis*, *So ce56* und *Soce:relint* sind in Tabelle 4.3. zusammen gefasst.

Tabelle 4.3.: Die erwartete molekulare Masse von den Rel-Proteinen *B. subtilis*, *So ce56* und *Soce:relint* (wenn aktiv)

Probe	Molekulare Masse
<i>B. subtilis</i>	84,70 kDa
<i>So ce56</i>	80,53 kDa
<i>Soce:relint</i>	47,60 kDa

Um zu überprüfen ob der vordere Teil des *rel*-Gens in der Mutante noch exprimiert wird, wurde eine Westernblot-Analyse mit einem Antikörper gegen das Rel Protein (Abb. 4.11.) durchgeführt. Hierzu verwendeten wir einen Antikörper, der gegen das Rel-Protein aus *B. subtilis* gerichtet ist (Wendrich *et al.*, 2000).

In der Analyse wurden Kulturen aus der späten exponentiellen Phase verwendet. *So ce56* und *Soce:relint* wurden in SM-Mannose Medium angezogen und bei einem Klettwert 118 (*So ce56*) und 83 (*Soce:relint*) geerntet. Als Positivkontrolle wurde eine Übernachtskultur von *B. subtilis* verwendet. Aus allen drei Proben wurde ein Proteinextrakt hergestellt und es wurden jeweils 40 µg Protein geladen.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben wurde der Western-Blot mit dem 1. Antikörper des Isotyps Hase IgG und einem 2. Antikörper Anti-Hase IgG, „Peroxidase“-Konjugat durchgeführt.

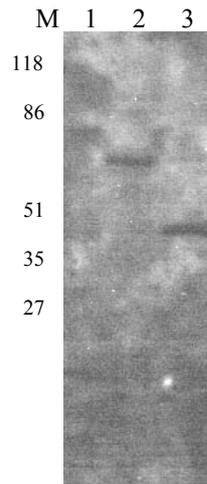


Abb. 4.11.: Nachweis der Rel-Proteine durch Westernblot-Analyse. Der Nachweis erfolgte unter Verwendung des Anti-Rel-Antikörpers sowie des anti-Rabbit IgG POD-Antikörpers. Als Marker wurde *Prestained* Proteinmarker von Fermentas verwendet. Spur 1 zeigt *B. subtilis* (84,7 kDa); Spur 2: *So ce56* (80,53 kDa) und Spur 3: *Soce:relint* (Rel*) (47,6 kDa)

Wie in Abb. 4.11. zu sehen ist, haben der Proteintransfer und die immunologische Reaktion funktioniert. In Spur 1 mit dem aufgetragenen *B. subtilis* Extrakt konnte eine Proteinbande detektiert werden. Die Höhe dieser Bande entspricht dem erwarteten Molekulargewicht des Rel_{*B. subtilis*}. Auch in Spur (*So ce56* Extrakt) konnte eine Proteinbande detektiert werden. Die Höhe dieser Bande entspricht dem erwarteten Molekulargewicht von Rel_{*S. cellulosum*} 80,53 kDa. Im *Soce:relint* (Rel*) Extrakt in Spur 3 wurde ebenfalls eine Proteinbande detektiert. Sie entspricht dem erwarteten Molekulargewicht von *Soce:relint*, 47, 6 kDa (Rel*). Dies würde bedeuten, dass der vordere Bereich des Rel-Proteins in *Soce:relint* noch exprimiert werden kann. Bei der Konstruktion von *Soce:relint* wurde die TGS Domäne zerstört. Die HDc-Domäne und Teile der RelA_SpoT Domäne sind noch intakt.

4.4. „Northernblot“-Hybridisierung mit einer *relint*-Sonde

Der Nachweis des verkürzten Rel-Proteins anhand des Westernblots injiziert die Produktion eines stabilen *rel*-mRNA Fragments in der Mutante. Ein Nachweis dieses potentiellen Fragments sollte durch Northern-Hybridisierung erfolgen. Bei dieser Hybridisierung wurde die *relint*-Sonde eingesetzt.

Für die Northernblot Analyse wurde ein Formaldehyd-Agarosegel mit Gesamt-RNA beladen. Die dabei benutzte Gesamt-RNA stammte aus *So ce56* Zellen, die zu den

Zeitpunkten 0 h, 3 h und 6 h nach Differenzierungsbeginn geerntet wurden. Nach dem Isolieren der Gesamt-RNA aus den Zellen wurde die RNA-Konzentration bestimmt. Es wurde von jeder Probe dieselbe RNA-Menge auf eine Blotmembran mit Hilfe von Vakuumblotting transferiert und mit der *relint*-Sonde hybridisiert.

Mit Hilfe der *nick translation* konnte das *relint* PCR-Fragment *in vitro* radioaktiv markiert werden. Das verwendete radioaktiv markierte *relint*- Fragment (Abb. 4.12.) bindet nur an die RNA von *So ce56*. In der Abb. 4.12. ist die Northern Hybridisierung mit den Proben aus unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung abgebildet, sowie das dazugehörige Formaldehyd-Gel mit den geladenen RNA-Proben. Es wurden jeweils 35 µg RNA pro Probe verwendet.

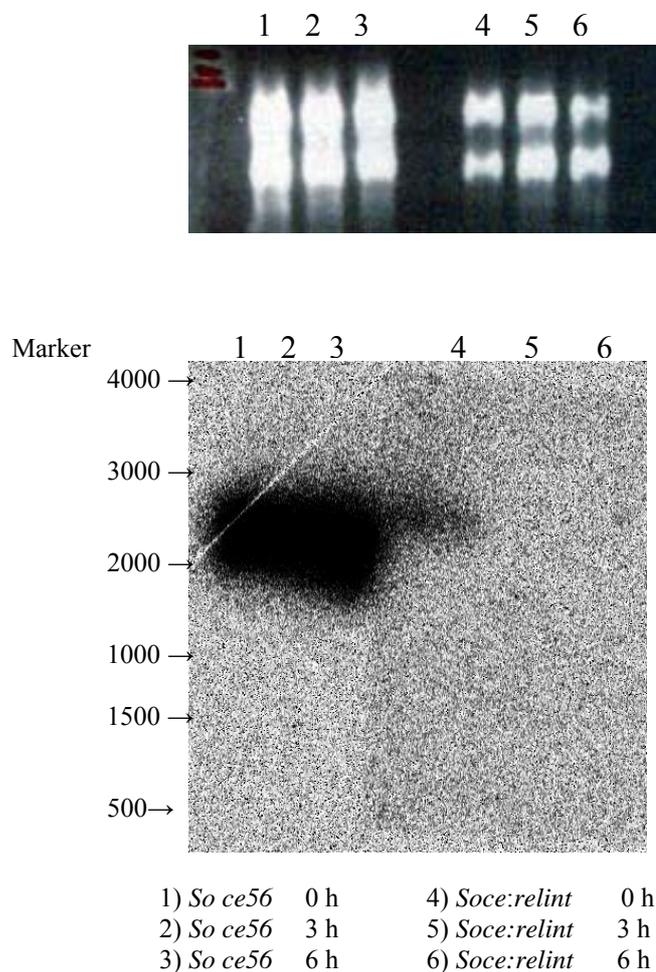


Abb. 4.12.: Northernblot-Analyse: ^{32}P -*relint* Sonde; 35 µg RNA pro Probe. *So ce56* und *Soce:relint* zu den Differenzierungszeitpunkten 0, 3 und 6 Stunden. Die erwartete Größe der *relint*-mRNA betrug um die 2790 Basen

Mit dieser Methode konnten wir nur in den RNA-Proben des Wildtyps eine stabile *relint*-mRNA zu allen Differenzierungszeitpunkten nachweisen.

4.5. *rel* kodiert die einzige (p)ppGpp-Synthetase in *S. cellulosum*

Das Ergebnis des Westernblots zeigte deutlich, dass die *rel*-Mutante den vorderen Teil des Rel-Proteins exprimiert. Es stellte sich somit die Frage, ob dieses verkürzte Rel-Protein noch in der Lage ist, (p)ppGpp zu synthetisieren.

Der Effekt der *rel*-Insertionsmutation auf die (p)ppGpp-Synthese wurde *in vivo* sowohl unter Aminosäure-Stress als auch unter Kohlenstoffmangelbedingungen untersucht.

Ersterer wird durch Norvalin (Nov), einem Aminosäure-Analogen hervorgerufen, das die Aminoacylierung blockiert (Eymann *et al.*, 2002). Dies führt zur Bindung von deacylierter tRNA^{Ile} und tRNA^{Leu} in der A-Stelle von Ribosomen und ist höchst wahrscheinlich der Auslöser für die stringente Kontrolle durch die Imitierung von Leucin und Isoleucin-Limitierung. Das Gleiche bewirkt auch das Serinhydroxamat, das auch zu den Aminosäure-Analogen zählt und Seryl-tRNA Synthetasen blockiert (Tosa und Pizer, 1971). Dies führt zur Bindung von deacylierter tRNA^{Ser} in der A-Stelle von Ribosomen und ist höchst wahrscheinlich der Auslöser für die (p)ppGpp-Synthese durch Rel. In einem Wachstumsversuch wurde getestet, wie diese beiden Substanzen auf *So ce56* wirken (Abb.4.13.).

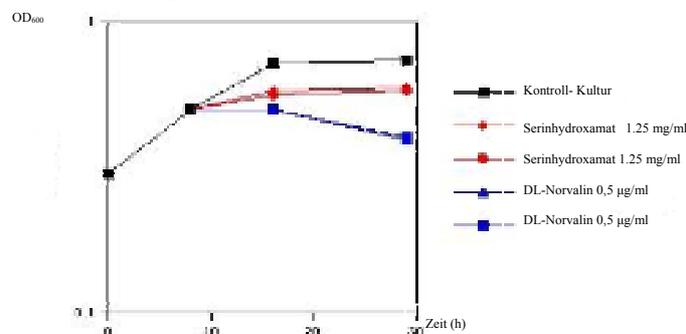


Abb.4.13.: Wachstumskurven in M-Medium von *So ce56*, Kulturen werden mit unterschiedlichen Aminosäure-Analoga induziert

Wie man anhand des Vorexperiments sehen kann, bewirkt die Zugabe von DL-Norvalin einen sofortigen Wachstumsstopp, wohingegen Serinhydroxamat in den eingesetzten Konzentrationen einen nicht so plötzlichen Wachstumsstillstand hervorruft. Ein weiterer Testversuch zeigt das Verhalten von *So ce56* und *Soce:relint* nach zweistündiger Inkubation mit DL-Norvalin. Die Kulturen wurden anschließend zentrifugiert und die Zellen auf einen OD_{600nm} von 25 aufkonzentriert. Es wurden jeweils 10 µl der

hochkonzentrierten Zellsuspension auf Nährstoffminimal-Agar (P-Diff Agar) und auf nährstoffreichen Agar (P-Agar) getropft (Abb 4.14.) und bei 32 °C inkubiert.

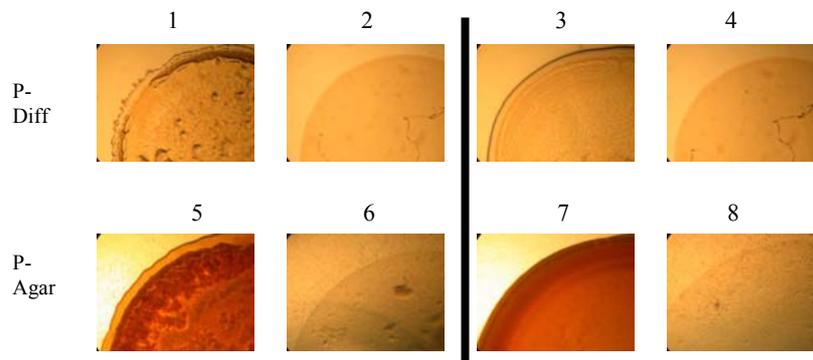


Abb. 4.14.: Verhalten von *So ce56* (1,2,5,6) und *Soce:relint* (3,4,7,8) nach Inkubation mit (2,6,4,8) und ohne (1,3,5,7) DL-Norvalin (0,5 µg/ml) auf nährstoffreichem und nährstoffarmen Agar.

Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Kulturen zu erkennen. Mit Hilfe von DL-Norvalin wurde keine Fruchtkörperbildung auf Minimalmedium, im Wildtyp-Stamm beobachtet (Nr.2). Wohingegen die Aggregation des Wildtyp-Stammes (Nr.1) auf P-Diff Agar vollständig abgeschlossen ist. Betrachtet man die *Soce:relint* Mutante ist auch keine Fruchtkörperbildung durch Zugabe von DL-Norvalin zu erkennen (Nr.3). Auf Vollmedium zeigt der Wildtyp nach Inkubation mit DL-Norvalin einen Wachstumsstillstand (Nr.6), eine typische Reaktion von Myxobakterien, um neue Nährstoffe zu finden. Es konnte trotz Schwärmdefekt eine Art Schwärmverhalten sichtbar gemacht werden. Die Mutante zeigt wie der Wildtyp auf Vollmedium einen Wachstumsstillstand nach der Inkubation mit DL-Norvalin (Nr.7), wohingegen die Kontrolle vegetativ wächst (Nr.8). Es konnte somit festgestellt werden, dass die Zugabe von DL-Norvalin alleine nicht den Beginn der Differenzierung auslöst.

Die Aktivität von ppGpp-Synthetasen bzw. die Produktion von ppGpp lässt sich durch Dünnschichtchromatographie analysieren. Mit dieser Methode wurde die ppGpp-Produktion im Wildtyp und in der *Soce:relint* Mutante verglichen.

In allen drei TLC-Versuchen wurden Zellen aus synthetischem Medium, mit Mannose, verwendet.

Die Zellen von *So ce56* (wt) und *Soce:relint* (Srel) wurden in synthetischem Medium mit 0,5 mM Mannose (5 ml) angezogen und bei einer OD_{600nm} von 0.5 mit 100µCi/ml ^{32}P - H_3PO_4 über Nacht markiert.

Die TLC von Abb. 4.15. zeigt diese verschiedenen Ergebnisse, die durch Zugabe von DL-Norvalin beobachtet wurden. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden jeweils 500 µl Kultur zentrifugiert. Die Zellen wurden jeweils mit dem gleichen Volumen HCOOH (1M)

vermischt. Nach drei Gefrier-Auftauzyklen (N_2 flüssig/ $37\text{ }^\circ\text{C}$) und nachfolgender Zentrifugation ($1\text{ min}/4\text{ }^\circ\text{C}/13000\text{ rpm}$) wurden $20\text{ }\mu\text{l}$ des Extraktes auf PEI-Platten (*Macherey & Nagel*) chromatographiert. Zur besseren Auftrennung der Proben wurden die PEI-Platte zuvor in 2 M Ameisensäure-Pyridin, $\text{pH } 2,2$ und anschließend mit Wasser gewaschen. Nach dem vollständigen Trocknen der Platten konnten diese beladen werden. Die beladene Platte wurden anschließend in $1,5\text{ M}$ $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, $\text{pH } 7,0$ chromatographiert.

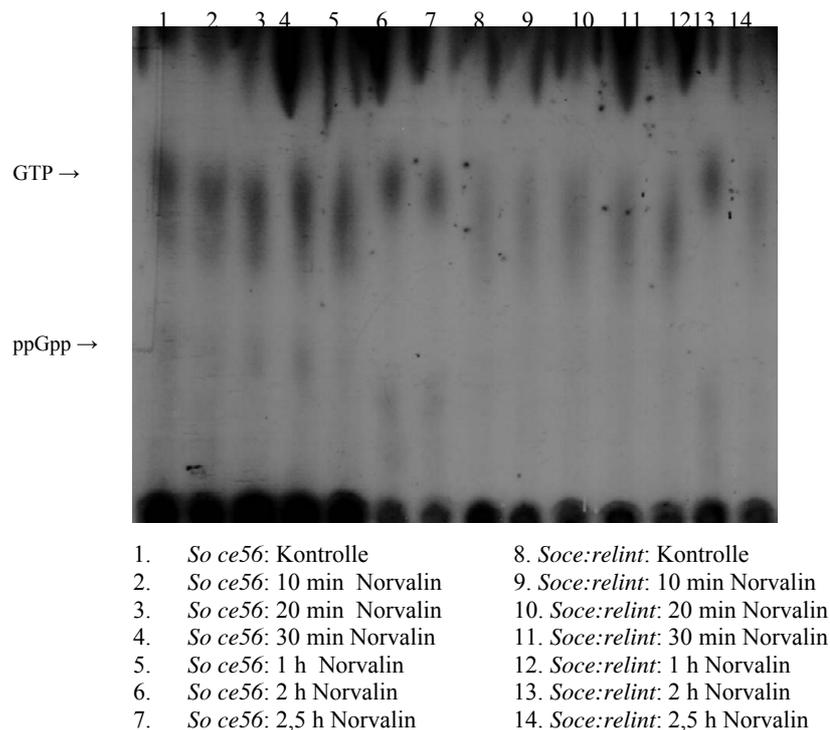


Abb. 4.15.: *in vivo* (p)ppGpp-Synthese der Stämme *So ce56* und *Soce:relint* nach Zugabe von Norvalin, Röntgenfilm-Analyse

Abb. 4.15. zeigt das Ergebnis einer TLC, die mit Hilfe eines Röntgenfilmes ausgewertet wurde. In diesem Versuch wurden die Zellen von *So ce56* und *Soce:relint* nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit dem Aminosäure-Analogon DL-Norvalin geerntet. Spur 1-7 zeigt *So ce56*-Extrakte zu den Zeitpunkten 0, 10, 20, 30 min, 1, 2 und $2\frac{1}{2}$ Stunden in der entsprechenden Reihenfolge. In der gleichen zeitlichen Abfolge wurde die hergestellte *Soce:relint* Suspension in den Spuren 8–14 aufgetragen. Die Kontrolle von *So ce56* (Spur 1) zeigte schon einen gewissen Level ppGpp, doch durch die Inkubation mit DL-Norvalin konnte in den Spuren 2-4 eine Zunahme von ppGpp verzeichnet werden. Nach der Inkubationszeit von $1-2\frac{1}{2}$ Stunden mit DL-Norvalin ist jedoch eine Abnahme von ppGpp ersichtlich. Betrachtet man die Spuren von *Soce:relint* (Spur 8-14) ist auch nach $2\frac{1}{2}$ Stunden Inkubation mit dem Aminosäure-Analogon DL-Norvalin, keine ppGpp

Produktion ersichtlich. Zudem ist in der Mutante der GTP Level zu den Zeitpunkten (0 – 1 Stunde) stark reduziert. Zu den späten Zeitpunkten erscheint sowohl in den Spuren 6 und 7 als auch 13 und 14 eine neue Bande, die noch näher am Auftragspunkt liegt. Ein solches Laufverhalten würde man von (p)ppGpp erwarten. Leider stand uns diese Substanz als Standard nicht zur Verfügung. Es ist also nicht mit Sicherheit zu sagen, ob es bei diesem Signal um (p)ppGpp oder um einen anderen Metabolit wie z.B. CAMP oder cyclic di-Guanosin-Monophosphat (Jenal, 2004) handelt.

Abb. 4.16. zeigt das Ergebnis einer weiteren TLC, die mit Hilfe eines Röntgenfilmes ausgewertet wurde. In diesem Versuch wurden die Zellen von *So ce56* und *Soce:relint* nach unterschiedlichen Inkubationszeiten in SM-Diff geerntet und wie zuvor beschrieben behandelt. Inkubiert man eine hohe Zellzahl von *So ce56* auf festem P-Diff-Agar, so kommt es innerhalb von 96 h zur Fruchtkörperbildung.

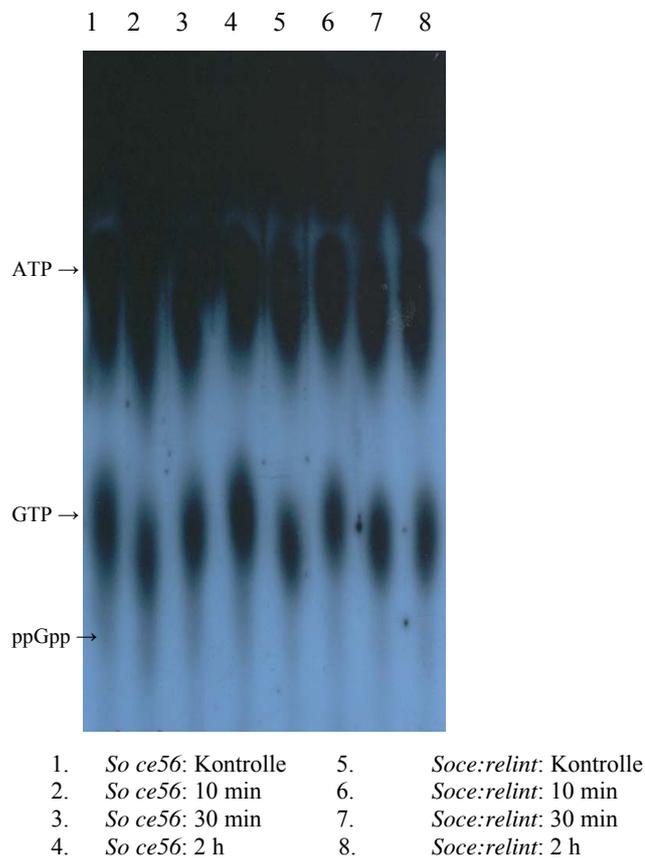


Abb. 4.16.: *in vivo* (p)ppGpp-Synthese der Stämme *So ce56* und *Soce:relint*; Röntgenfilm-Analyse; verschiedene Zeitpunkte der Differenzierung

Die Kulturen mit einer OD_{600nm} von 1.0 wurden zentrifugiert und in SM-Diff (0,3mM Asparagin und 0,05 mM Mannose/ 5 ml) überführt. Zu den Zeitpunkten 0, 10, 30, 240 min wurden jeweils 500 μ l der Zellen geerntet und wie oben beschrieben vorbereitet. Die Extrakte wurden auf eine nicht behandelte PEI-Platte getropft. Spur 1-4 zeigt den Wildtyp-

Extrakt, Spur 5-8 den behandelten Extrakt von der stringenten Mutante. Betrachtet man das Ergebnis von *So ce56* und *Soce:relint* ist ein deutlicher GTP-Level zu erkennen. Jedoch konnte kein ppGpp zu irgendeinem Zeitpunkt gemessen werden. Zur Identifizierung der ppGpp-Produktion *in vivo*, reicht es scheinbar nicht aus, die Zellen in SM-Diff zu schütteln. Der ppGpp-Level scheint unter diesen Bedingungen nicht stark genug hervorzutreten, oder aber die ppGpp-Produktion ist noch nicht vollständig aktiviert. Erniedrigte GTP-Level sind auch bei anderen stringenten Mutanten beobachtet wurden. Die bisherigen Ergebnisse deuteten an, dass die *Soce:relint* Mutante unter nicht (p)ppGpp produzierenden Bedingungen normale GTP-Level hat (Abb. 4.16.). Kommt es aber zur Induktion der ppGpp Produktion durch Norvalin (Abb. 4.15.), erniedrigen sich die GTP-Level in der Mutante. Kohlenstoffmangel (C-Mangel) wurde durch Einsatz des nicht metabolisierbaren Glukose-Derivats α -Methylglykosid (α MG) verursacht. Der Wirkmechanismus, der bei C-Mangel zu einer (p)ppGpp-Akkumulation führt, ist noch nicht verstanden. Wahrscheinlich wird die Akkumulation durch eine SpoT-bedingte, verringerte (p)ppGpp-Hydrolyse erzeugt und nicht durch eine erhöhte Rel-Synthetaseaktivität (Murray und Bremer, 1996). Wie α -Methylglykosid auf *So ce56* und *Soce:relint* wirkt, wurde wie zuvor in Abb. 4.14. beschrieben, untersucht. Die Kulturen, die aus M-Medium kamen, wurden jeweils für 2 Stunden mit α -Methylglykosid inkubiert, anschließend zentrifugiert und auf eine OD_{600nm} von 25 aufkonzentriert. Auch in diesem Versuch wurden jeweils 10 μ l der hochkonzentrierten Zellsuspension auf P-Diff-Agar und P-Agar getropft. Die Tropfen wurden bei 32 °C inkubiert und nach 7 Tagen fotografiert (4.17.)

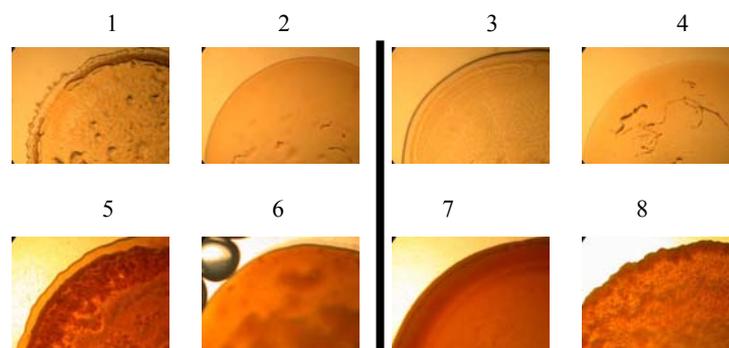


Abb. 4.17.: Verhalten von *So ce56* (1,2,5,6) und *Soce:relint* (3,4,7,8) nach Inkubation mit (2,6,4,8) und ohne (1,3,5,7) α -Methylglykosid (1 %) auf nährstoffreichem und nährstoffarmen Agar

Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Kulturen zu erkennen. Die Inkubation mit α -Methylglykosid ergab keine Fruchtkörperbildung auf Minimalmedium im Wildtyp-Stamm (Nr.2). Betrachtet man die *Soce:relint* Mutante, ist keine

Fruchtkörperbildung durch Zugabe von α -Methylglykosid zu erkennen (Nr.4). Stattdessen konnte eine leichte Braunfärbung unter vegetativen Bedingungen beobachtet werden (Nr.8). Diese Färbung deutet das Absterben der Zellen an. Diese Braunfärbung war auf der Kontrolle nicht so schnell erkennbar (Nr.7). Trotz Vollmedium ist die Mutante nach der Inkubation mit α -Methylglykosid nicht in der Lage, zu wachsen, sie stirbt ab.

Abb. 4.18. zeigt das Ergebnis einer TLC, die mit Hilfe eines *Phosphoimagerscreens* entwickelt wurde. Sie wurde anschließend quantitativ ausgewertet.

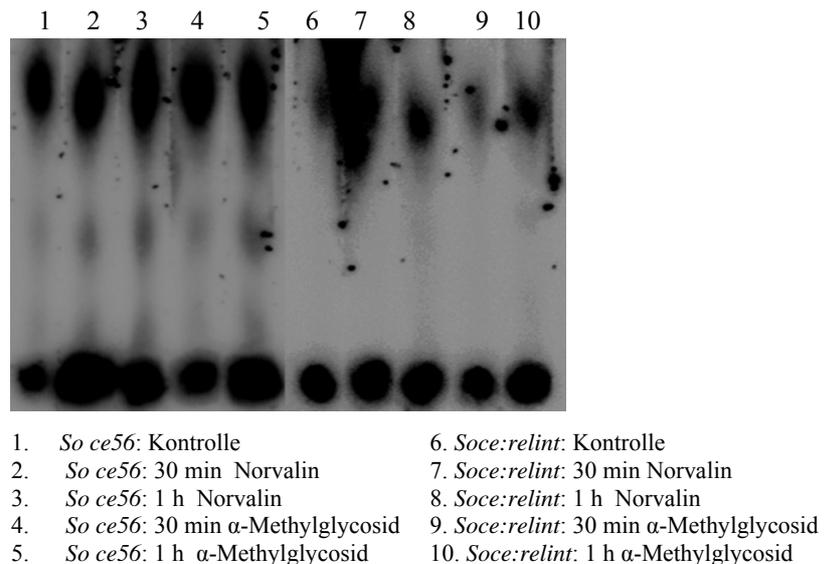


Abb. 4.18.: *in vivo* (p)ppGpp-Synthese der Stämme *So ce56* und *Soce:relint*; gezeigt ist die Auswertung eines *Phosphoimagerscreens*; Unterstützt wurde die Aktivierung der (p)ppGpp Synthese durch DL-Norvalin und α -Methylglykosid

In diesem Versuch wurden die Zellen von *So ce56* und *Soce:relint* nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit dem Aminosäure-Analogon DL-Norvalin bzw. des nichtmetabolisierbaren Glukose-Derivats α -Methylglykosid (α MG) in SM-Medium (+ Mannose) geerntet, und wie zuvor beschrieben, behandelt. Die Proben wurden auf eine zuvor behandelte PEI-Platte getropft. Spur 1-5 zeigt die Proben des Wildtyps. In Spur 1 ist der Extrakt der unbehandelten Zellen von *So ce56* (Kontrolle) aufgetragen worden. Es ist, wie schon im ersten Versuch gezeigt, ein leichter ppGpp Level ersichtlich. Spuren 2 und 3 zeigen die Extrakte von *So ce56* nach der 30-minütigen und einstündigen Inkubation mit DL-Norvalin, Spur 4 und 5 nach der Inkubation mit α -Methylglykosid. Betrachtet man dort den ppGpp Level, ist mit längerer Inkubationszeit in beiden Fällen eine Zunahme zu erkennen. Die GTP-Level erscheinen unverändert. Spuren 6-10 zeigten die Extrakte von *Soce:relint*. Spur 6 zeigt die Kontrolle, aber sowohl diese als auch die Spuren 7 und 8

(Inkubation mit DL-Norvalin) bzw. die Spuren 9 und 10 zeigen kein ppGpp Signal. In allen Spuren erkennt man im Vergleich zum Wildtyp wiederum erniedrigte GTP-Level. Zur Veranschaulichung des Ergebnisses wurden eine Quantifizierung der TLC vorgenommen (Ab.4.19.). Schwarze Balken repräsentieren den Wildtyp die weißen Balken die Mutante. In Spur 1 ist der Kontrollextrakt abgebildet. Spur 2 und 3 zeigen das Resultat der Extrakte nach 30 und 60 Minuten Inkubation mit DL-Norvalin. Spuren 4 und 5 nach der Inkubationszeit mit α -Methylglykosid (30 und 60 Minuten). Die Balken verdeutlichen den ermittelten ppGpp-Level sowohl im Wildtyp, als auch in der Mutante. Es ist ein deutlicher Defekt der ppGpp Produktion in *Socce:relint* zu erkennen.

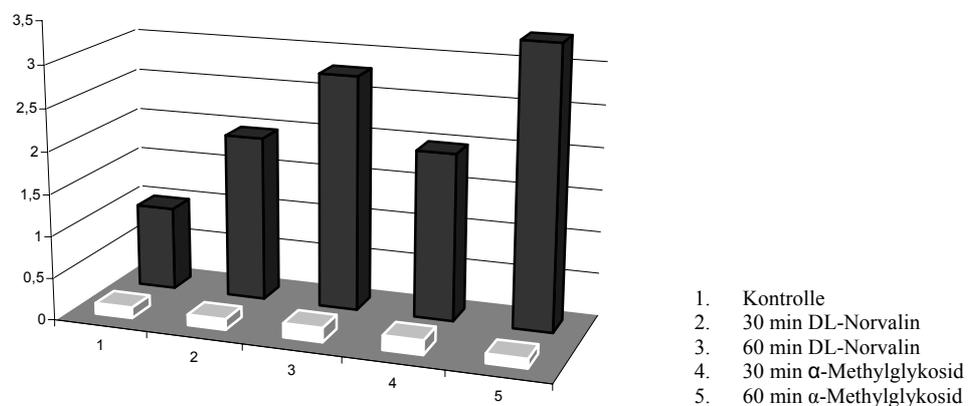


Abb.4.19.: Quantifizierung der Dünnschichtchromatographie, mit dem *Phosphoimager*, schwarze Balken repräsentieren den Wildtyp. Die weißen Balken repräsentieren die *Socce:relint* Mutante.

Es lässt sich aus allen 3 Experimenten ersehen, dass *Socce:relint* nicht in der Lage ist, ppGpp im gleichen Maßstab wie der Wildtyp zu produzieren. Wenn weder im Wildtyp noch in der Mutante ppGpp produziert wird, können auch identische Level an GTP nachgewiesen werden. Unter Bedingungen, unter denen *So ce56* jedoch ppGpp synthetisiert, zeigt die Mutante erniedrigte GTP Level.

Es ist aus allen drei TLC-Experimenten zu entnehmen, dass *rel* in der Tat die einzige (p)ppGpp-Synthetase in *S. cellulosum* kodiert. Die Tatsache, dass auch unter Kohlenstoffmangel keine (p)ppGpp-Akkumulation zu beobachten ist, deutet darauf hin, dass *Rel_{S.cellulosum}* offensichtlich auch die Funktion von SpoT besitzt, bzw. nicht nur durch Aminosäurelimitierung aktiviert wird. Dies ließ, wie bereits beschrieben, die Domänenstruktur der Proteine auch erwarten.

4.6. Bioassay-Experiment: qualitative Analyse von Sekundärmetaboliten

Die stringente Kontrolle besitzt laut Literatur nicht nur einen regulatorischen Einfluss auf die morphologische Differenzierung, sondern betrachtet man *Bacilli* und *Streptomyces*, auch auf die Produktion der Sekundärmetabolite. Mit Hilfe der TLC-Analysen, konnte der Nachweis erbracht werden, dass die stringente Mutante nicht in der Lage ist, ppGpp zu produzieren. Somit stellte sich die Frage, ob die stringente Mutante in der Lage ist, Sekundärmetabolite zu produzieren.

So ce56 produziert die Sekundärmetabolite Etnangien und Chivosazol A. Mit Hilfe eines Bioassay-Experiments sollte nach dem Einfluss der stringenten Kontrolle auf die Produktion dieser Metabolite geschaut werden.

Hierzu wurden die zwei Stämme *So ce56* und *Soce:relint* in 10 ml Produktionsmedium mit dem Absorber-resin XAD-16 kultiviert. Es handelt sich bei XAD-16 um ein *resin*, das in der Lage ist, die produzierten Sekundärmetabolite zum einen aus dem Medium aufzufangen und zu binden und zum anderen die Produktion der Sekundärmetabolite in der wachsenden Kultur anzuregen. Zuvor getätigte Wachstumsversuche ließen keinen Wachstumsunterschied zwischen Wildtyp und Mutante erkennen. Nach 14 Tagen Inkubation wurde das XAD-16 geerntet und in 1 ml Methanol aufgenommen. Die Proben wurden wie im Methodenteil beschrieben bearbeitet. Anschließend wurden 500 µl abgenommen und auf eine Volumenmenge von ungefähr 50 µl in der *Speed vac* eingengt. Die Extrakte wurden anschließend auf eine Platte mit *M. luteus* (Etnangien-sensitiv) bzw. *H. anomala* (Chivosazol A-sensitiv) getropft. Die Platten wurden bei 32 °C inkubiert. Durch die Bildung der Hemmhöfe (Abb. 4.20.) konnte man in diesem Experiment qualitativ feststellen, ob *Soce:relint* in der Lage ist, die Sekundärmetabolite zu produzieren.

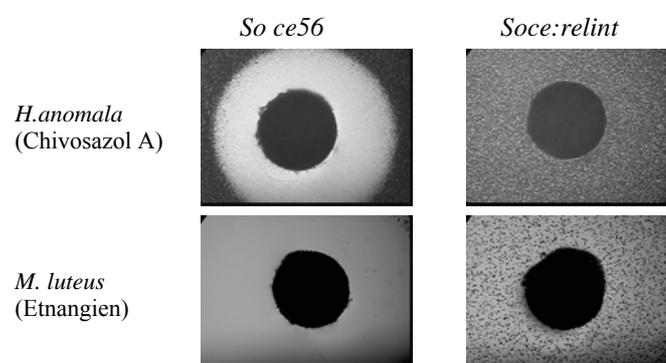


Abb. 4.20.: Hemmhof-Bildung durch XAD-Extrakte von *So ce56* und *Soce:relint*. Es wurden im Chivosazol A-Versuch jeweils 1µl Extrakt und im Etnangien-Versuch 3 µl Extrakt eingesetzt.

Die Hemmhöfe zeigen, dass durch die Extrakte des Wildtyps das Wachstum von *H. anomala* und *M. luteus* deutlich inhibiert werden konnte. Das Ergebnis dieses Bioassay-Experiments zeigte dagegen einen deutlichen Defekt der *rel*-Mutante in Bezug auf die Produktion von Chivosazol A und Etnangien. Da es sich hierbei um einen qualitativen Test handelte und die genauen Produktionsunterschiede der zwei Metabolite in Wildtyp und Mutante nicht gemessen werden konnten, wurden anschließend quantitative HPLC-Analysen durchgeführt.

4.6.1. HPLC, quantitative Analyse von Sekundärmetaboliten

Anhand des *Bioassay* Experiments wurde schon festgestellt, dass *Soce:relint* einen Defekt in der Produktion von den Sekundärmetaboliten Chivosazol A und Etnangien aufweist. Um quantitative Aussagen treffen zu können, wurden HPLC-Analysen an der GBF in Braunschweig durchgeführt. Hierzu wurden beide Stämme in großen Mengen Produktionsmedium im Fermenter angeimpft und kultiviert.

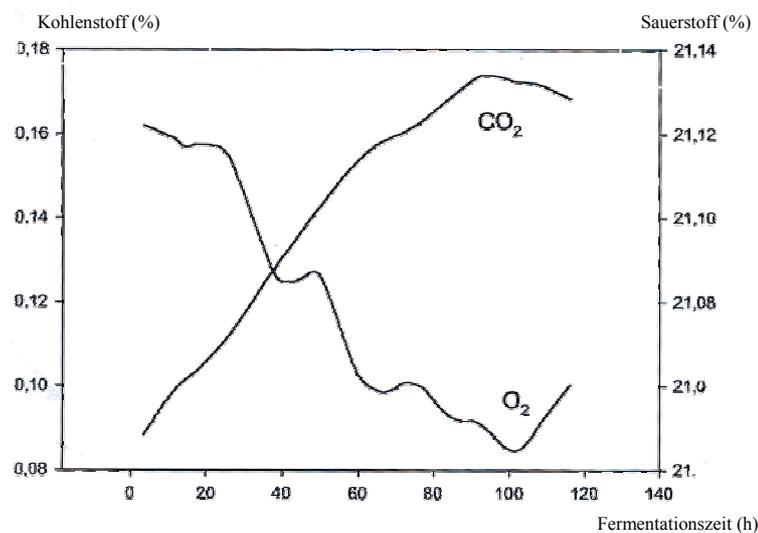


Abb. 4.21.: Verlauf von Sauerstoff und Kohlendioxid während der Kultivierung im Fermenter.

Abb. 4.21. zeigt den CO₂- und O₂-Gehalt während des Experiments im Fermenter. Zu Beginn des Versuches wachsen die Zellen und verbrauchen somit Sauerstoff, der CO₂-Gehalt steigt und der O₂-Gehalt sinkt. Mit dem Übergang in die stationäre Phase nimmt das Wachstum der Zellen ab, der CO₂-Gehalt bleibt nahezu unverändert, da die Zellen kaum noch Sauerstoff verbrauchen.

Abb. 4.22. zeigt den Produktionsablauf von Chivosazol A und Etnangien in *So ce56* (schwarz) und *Soce:relint* (rot) im Fermenter.

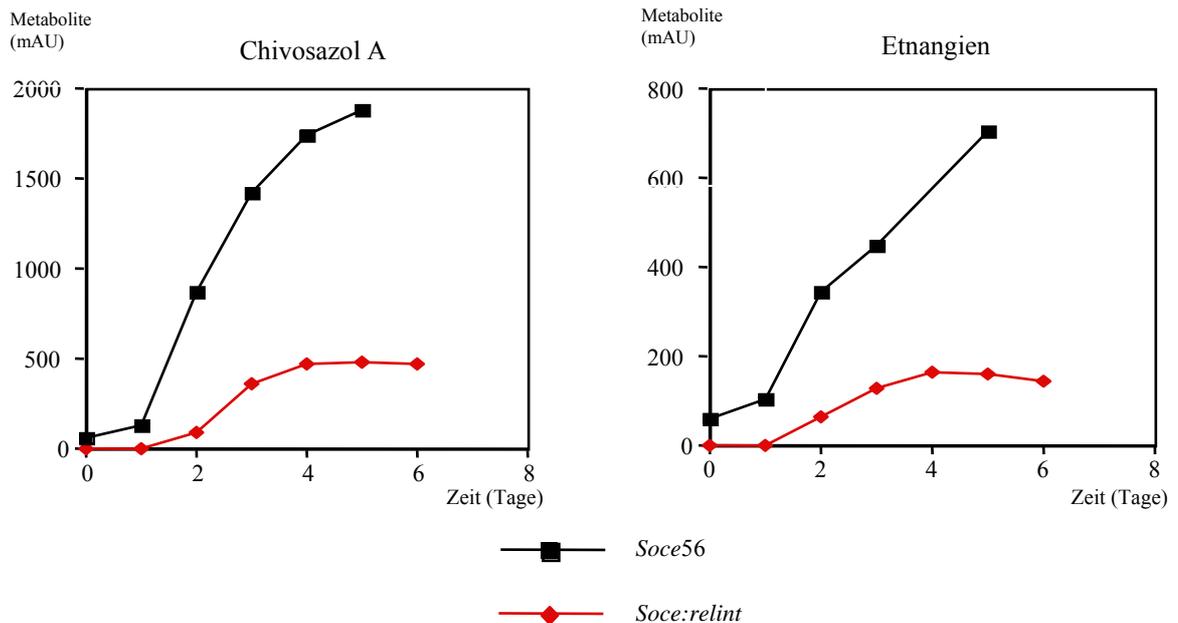


Abb. 4.22.: HPLC-Analysen von Chivosazol A und Etnangien Produktion in Bezug auf *So ce56* und *So ce:relint*

Die Grafik auf der linken Seite in der Abb. 4.22. zeigt die Produktionsergebnisse von Chivosazol A nach der HPLC-Analyse. Abgebildet ist der Kurvenverlauf vom Wildtyp (schwarz) im Vergleich zum Kurvenverlauf der Mutante (rot). Anhand der Grafik, aber auch anhand der Daten (siehe Anhang) kann man einen deutlichen Defekt in der Produktion von Chivosazol A in der stringenten Mutante erkennen. *So ce:relint* (467,5 mAU/im Maximus) produziert im Vergleich zum Wildtyp (1874,6 mAU) vierfach weniger Chivosazol A. Zudem ist die Produktion von Chivosazol A in *So ce:relint* stark verzögert, sie beginnt verspätet (2 Tage).

Betrachtet man die Grafik der Etnangien-Produktion (rechte Grafik, Abb. 4.22), lässt sich dort das Gleiche erkennen. *So ce:relint* (141,4 mAU) ist in der Etnangien-Produktion im Vergleich zum Wildtyp (701,2 mAU) fast fünffach schwächer. Die Produktion setzt auch hier, im Vergleich zum Wildtyp, erst verspätet ein.

Abschließend ist festzuhalten, dass die Sekundärmetabolit-Produktion in *S. cellulosum* nicht, wie in *Streptomyces* und *Bacillus*, beim Erreichen der stationären Phase aktiviert wird. Bereits in der exponentiellen Phase lässt sich ein basaler Level von Chivosazol A und Etnangien erkennen. Jedoch nimmt die Produktion mit Einsetzen der stationären Phase (nach 4 Tagen) deutlich zu. Die stringente Mutante hingegen ist nicht in der Lage, die Sekundärmetabolite in der gleichen Menge wie *So ce56* zu produzieren.

4.7. Untersuchung des Phänotyps von *Soce:relint*

Die *rel*-Mutante von *S. coelicolor* (Chakraborty *et al.*, 1997) zeigte sowohl einen Phänotyp in der morphologischen als auch der physiologischen Differenzierung. Die durch Aminosäurelimitierung induzierte morphologische als auch physiologische Differenzierung in *S. coelicolor* benötigt eine funktionelle stringente Kontrolle. Aber nicht nur in *Streptomyceten* sondern auch in *Bacilli* und Myxobakterien konnte ein regulatorischer Einfluss der stringenten Kontrolle auf die morphologische Differenzierung gezeigt werden. Um heraus zu finden, ob die stringente Kontrolle auch in *S. cellulosum* einen Einfluss auf die morphologische Differenzierung hat, wurden *So ce56* und *Soce:relint* auf eine OD_{600nm} von 4 angezogen und anschließend auf eine OD_{600nm} von 25 konzentriert. 50 μ l der hochkonzentrierten Suspensionen wurden anschließend in 12er-Mikrotestplatten (Cellstar, Greiner) getropft, die je 3 ml P-Diff-Agar enthielten. Nach 2 Tagen Inkubation bei 32 °C ließ sich ein Unterschied zwischen *So ce56* und *Soce:relint* erkennen.

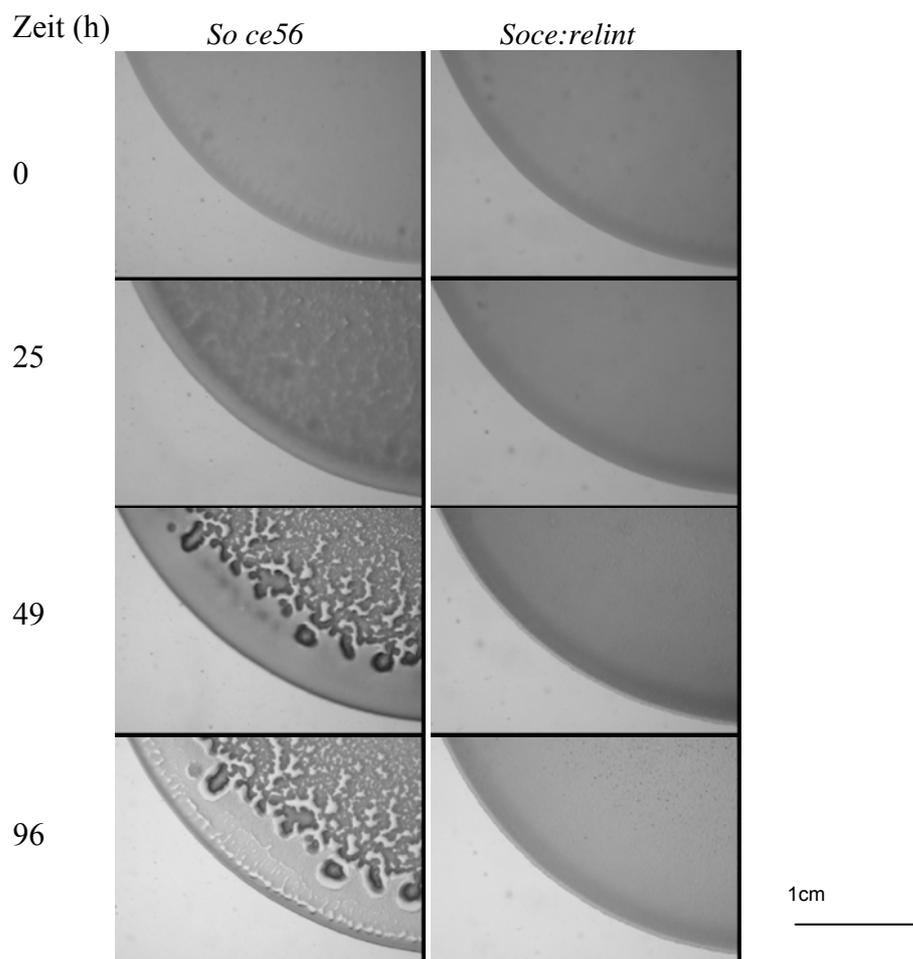


Abb. 4.23.: Differenzierungsassay auf P-Diff-Medium: 50 μ l Spots mit einer OD_{600} von 25

Unter nährstoffarmen Bedingungen bildet *S. cellulosum* wie alle Myxobakterien multizelluläre Fruchtkörper. Im Gegensatz zu den Spezies *Myxococcus*, *Chondromyces* und *Stigmatella*, die nach oben aufgerichtete Fruchtkörper bilden, sind die Fruchtkörper von *S. cellulosum* eher flach und bilden sich im oder auf dem Substrat. Die Fruchtkörper bestehen dabei immer aus zahlreichen *geclusterten* Sporangiolen. Durch dieses Kriterium heben sich die Fruchtkörper von *S. cellulosum* auch von den anderen in der Gruppe der Sporangiceae ab, die nur eine Sporangiole bilden (zum Beispiel: *Haploangium*). Die Sporangiolen von *S. cellulosum* liegen dicht bei einander und erscheinen oft wie dicht gepackte Zellmassen (Reichenbach *et al.*, 1991). Abbildung 4.23. zeigt den Differenzierungsablauf von *So ce56* und *Soce:relint* auf P-Diff-Medium. Nach 25 Stunden beginnt *So ce56* zu aggregieren und kann nach 96 Stunden die Differenzierung abschließen. *Soce:relint* zeigt keine Aggregation. Auch nach 96 Stunden Inkubation sind keine Anzeichen der Differenzierung zu erkennen. Inkubiert man die Platten länger als 96 Stunden färbt sich die *Soce:relint* Mutante braun und stirbt.

4.8. Phänotypische Charakterisierung der *Soce:relint* Mutante

Nachdem sowohl ein morphologischer und ein physiologischer Phänotyp von *Soce:relint* ermittelt werden konnte, sollte die *Soce:relint*-Mutante in Hinblick auf Wachstum, Lebensfähigkeit, Sporulation etc. mit dem Wildtyp verglichen werden.

4.8.1. Wachstumsversuch in M-Medium

In diesem Experiment wurden die Stämme *So ce56* (SocE) und *Soce:relint* (*Srel*) in einem Komplexmedium angeimpft. Bei diesem Medium handelt es sich um das M-Medium, das alle nötigen Substanzen zum Wachstum von *So ce56* beinhaltet. Der Wachstumsversuch wurde sowohl anhand der OD_{600nm}-Werte, als auch anhand der Klettwerte verfolgt. Insgesamt wurde der Versuch dreimal wiederholt.

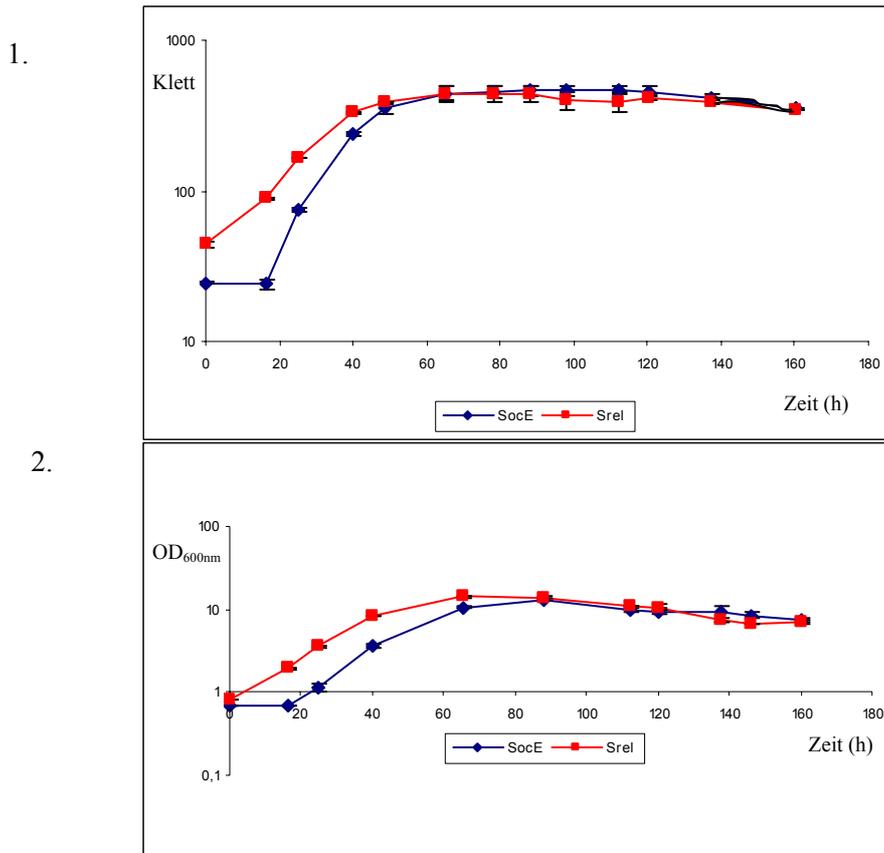


Abb. 4.24.: 1. Wachstumskurve in M-Medium mit Klettbestimmung
 2. Wachstumskurve in M-Medium mit OD_{600nm} -Bestimmung;
 Wachstumsversuche wurden 3mal wiederholt und anschließend gemittelt.
 Standardabweichungen sind durch Balken gekennzeichnet.

Tabelle 4.4.: Vergleich der Verdopplungszeit (in Stunden). Bestimmt durch Messung von OD_{600nm} und Klett

Medium	So ce56	SocE:relint
M-Medium	14+/-3	16.5 +/- 3

Das Wachstumsverhalten der beiden Stämme ist in Abb.4.24. dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Wachstum zwischen Wildtyp und Mutante festgestellt werden. Betrachtet man die errechnete Verdopplungszeit zeigt auch diese keine deutlichen Unterschiede.

Die Wachstumsversuche in SM-, Elektroporations- und Produktions-Medium zeigten ebenfalls keine Unterschiede zwischen der Mutante und dem Wildtyp. Daraufhin wurde überprüft, ob die Mutante länger bzw. in stationärer Phase im gleichen Maß überlebt wie der Wildtyp.

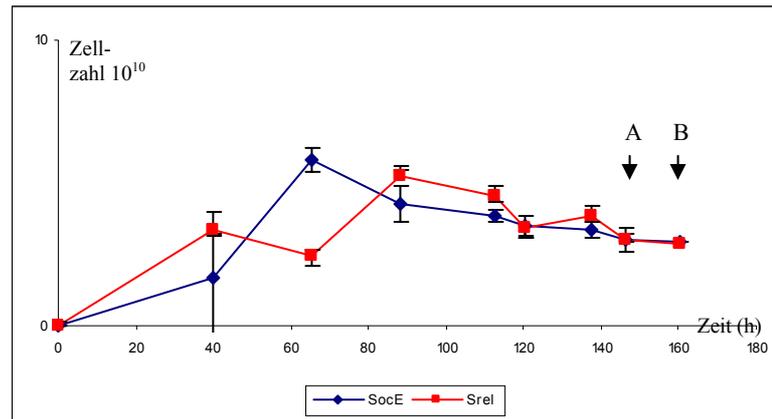


Abb. 4.25.: Lebendzellzahl-Bestimmung von *So ce56* und *Soce:relint* in M-Medium

Die Ermittlung der Gesamtzellzahl ergab, wie erwartet, keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4.25). Die Zellen wurden parallel zum Zeitpunkt A und B (Abb. 4.25.) entnommen und in entsprechenden Verdünnungen auf Agarplatten ausplattiert. Die darauf folgenden Auszählungen zeigten signifikante Unterschiede (Tab. 4.5).

Tabelle 4.5.: Lebendzellzahl von *So ce56* und *Soce:relint*

M-Medium	<i>So ce56</i> Cfu	<i>Soce:relint</i> Cfu
A	2875-6850	200-275 (10.5-34)
B	200-500	100-65 (2-7.7)

Vor allem zu dem Zeitpunkt A bildete die Mutante 10,5 – 34-fach weniger Kolonien als der Wildtyp. Dieser Effekt sank auf eine 2 - 7,7-fache Reduktion zum Zeitpunkt B.

4.8.2. „Live and dead staining“

Der Lebendzellzahl-Versuch zeigte eine reduzierte Lebensfähigkeit der *Soce:relint* Zellen nach längerer Inkubation in stationärer Phase. Um diesen Defekt genauer zu untersuchen, wurde ein weiteres Experiment unternommen.

Der „Live/dead“[®] *BacLight*TM-Reagenziensatz von *Molecular Probes* erlaubt die Abschätzung bakterieller Lebensfähigkeit, da mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen die lebenden und die toten Zellen einer Zellkultur unterschiedlich markiert werden können. Unterschiede in der Lebensfähigkeit von Bakterien werden hier durch die geänderte Membranpermeabilität der Zellen bewertet. Bei „Live/dead“[®] *BacLight*TM handelt es sich um einen Mix aus SYTO[®] 9 Grün-Fluoreszenz für DNA und

dem Rot-Fluoreszenzfarbstoff Propidium-Jodid. Die SYTO[®] 9 Grün-Fluoreszenz-Lösung ist in der Lage, sowohl durch intakte als auch defekte Membranhüllen in die Zellen einzudringen. Wohingegen die Propidium-Jodid-Lösung nur durch defekte Membranhüllen in die Zelle gelangen kann. Das Eindringen der Propidium-Jodid Lösung führt zur Verdrängung der SYTO[®] 9 Grün-Fluoreszenz-Lösung in der Zelle und färbt somit die Zelle rot. In diesem Experiment soll die unterschiedliche Lebensfähigkeit von Wildtyp und Mutante deutlich gemacht werden.

Hierfür wurden während eines Wachstumsexperiments zu verschiedenen Zeitpunkten Zellen entnommen und diese mit den dazu verwendeten Farbstoffen gefärbt und mikroskopiert. Pro Zeitpunkt wurden 100 µl Zellen abzentrifugiert, in SM-Medium gewaschen und in 10 µl aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 0,3 µl SYTO[®] 9 Grün-Fluoreszenz Lösung und 0,3 µl I Propidium-Jodid Lösung versehen und für mindestens 15 min in Dunkelheit inkubiert.

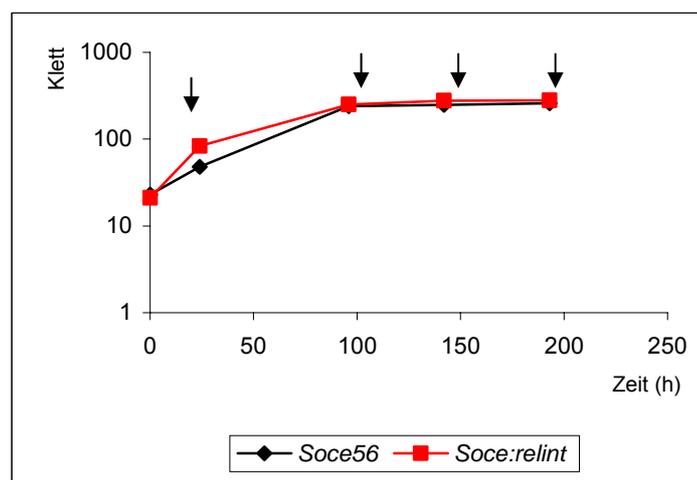


Abb.4.26.: Wachstumskurve zum *Live and dead staining* Versuch; Pfeile zeigen die Färbezeitpunkte

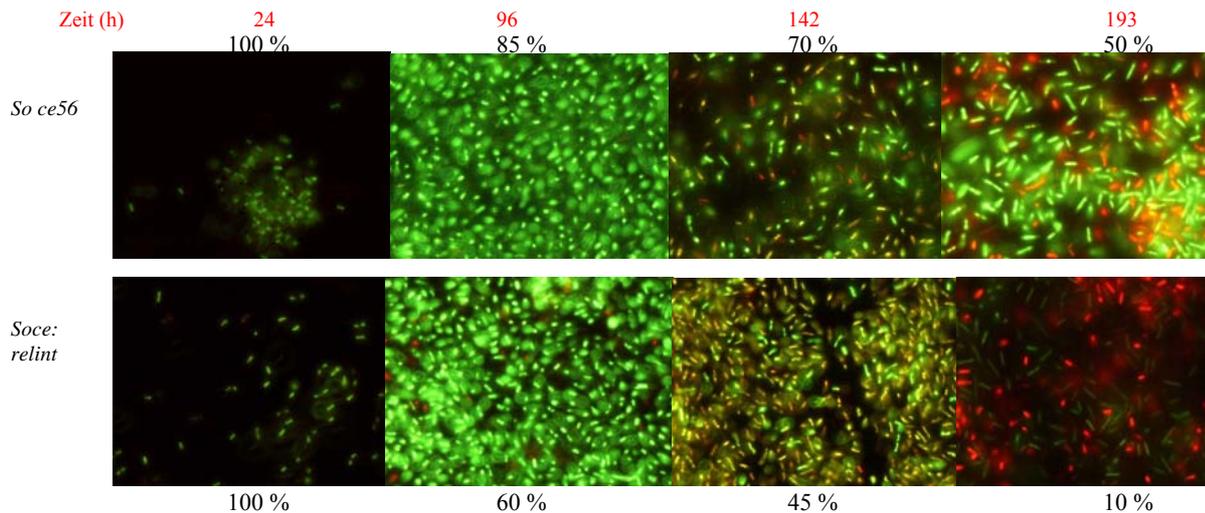


Abb. 4.27.: Mikroskopische Aufnahme der Zellen nach dem *live and dead staining* (1000x). Die obere Zeile zeigt den Wildtyp die untere die stringente Mutante. Die lebende Zellen sind grün angefärbt bei den roten handelt es sich um tote Zellen. Die Prozentangaben geben den Anteil der Lebendzellen an.

Abb. 4.26. zeigt die zum Versuch gehörige Wachstumskurve. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte, an denen die Zellen entnommen wurden.

Das Resultat dieses Experiments spiegelt das Ergebnis des vorhergehenden Versuches wider. Es bringt deutlich zum Ausdruck, dass *Soce:relint* Zellen im Vergleich zum Wildtyp in der stationären Phase schneller altern. Die Prozentzahlen unter den Abbildungen geben die Anteile der lebenden Zellen in der Kultur an.

Zum Ende des Versuches sind in der Kultur der Mutante nur insgesamt 10 % lebende Zellen zu finden, wohingegen in der Kultur des Wildtyps noch 50 % lebende Zellen beobachtet werden konnten.

4.8.3. Vegetativer Phänotyp

Es konnte kein signifikanter Unterschied im Wachstum zwischen der stringenten Mutante und dem Wildtyp festgestellt werden.

Als nächstes sollte das Schwärmverhalten auf einer nährstoffreichen Platte untersucht werden. Hierzu wurden die zwei Stämme in Komplexmedium angezogen und bei einer OD_{600nm} von 1,3 (*So ce56*) bzw. 1,1 (*Soce:relint*) geerntet und auf eine OD_{600nm} von 10 aufkonzentriert. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 10 μ l (OD_{600nm} : 10), auf Platten mit Minimalmedium getropft. Als Kohlenstoffquelle wurde in diesem Fall Glukose verwendet (SM-Glukose). Die Platten wurden bei 32°C inkubiert und beobachtet.

Abb. 4.28. zeigt das Resultat nach 7 Tagen Inkubation.

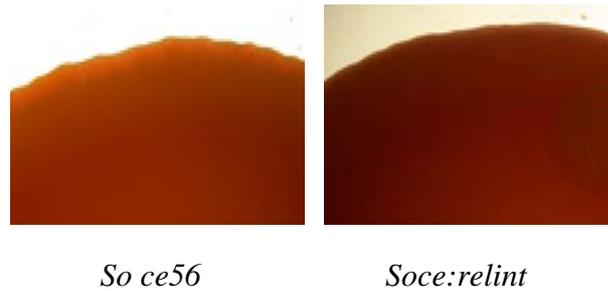


Abb. 4.28.: Wachstum auf SM-Glukose: beides stereoskopische Vergrößerung

Betrachtet man das Wachstum auf diesen Platten, so lässt sich wiederum kein wesentlicher Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante erkennen.

4.8.4. Schwärmverhalten

Um das Schwärmverhalten von *So ce56* und *Soce:relint* untersuchen zu können, wurden die beiden Stämme auf cellulosehaltige Platten getropft.

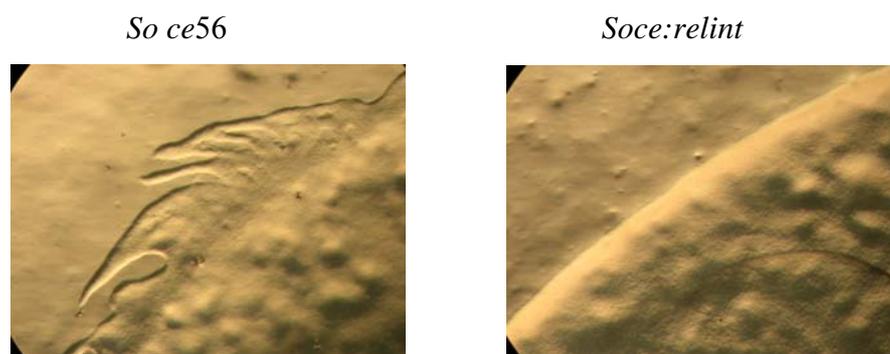


Abb. 4.29.: Schwärmverhalten auf VC/2-Platten (Cellulose), gezeigt ist eine stereoskopische Vergrößerung eines Schwärmrandes von *So ce56* und *Soce:relint*

Für diesen Versuch wurden die Stämme in M-Medium kultiviert und bei einer OD_{600nm} von 1 auf eine OD_{600nm} von 25 hochkonzentriert. 20 μ l der hergestellten Zellsuspensionen wurden anschließend auf eine VC/2-Platte getropft und bei 32 °C inkubiert. Der Schwärmrand wurde nach 24 h Inkubation fotografiert.

Das Ergebnis zeigte einen deutlichen Unterschied da der Wildtyp ein leichtes Schwärmverhalten aufweist, wohin *Soce:relint* einen Schwärmdedefekt zeigt. Dieses eingeschränkte Schwärmverhalten im Wildtyp, kommt durch das homogene Wachstum der Kulturen zustande. *So ce56* wurde unter anderem durch seine Fähigkeit, homogen zu wachsen, als Untersuchungsstamm ausgewählt. Nur mit solchen Stämmen lassen sich Wachstumsversuche sinnvoll durchführen. Flüssigkulturen von myxobakteriellen

Wildtypen klumpen in der Regel sehr stark. Homogenes Wachstum ist in der Regel nur durch den Verlust oder die Reduzierung von Oberflächenstrukturen wie Typ 4 Pili zu erreichen. Da diese Strukturen aber für das Schwärmen auf festen Oberflächen benötigt werden, können homogen wachsende Myxobakterien in der Regel nur sehr ineffizient schwärmen. *So ce56* und entsprechende Mutanten können daher nur eingeschränkt in Bezug auf Schwärmedefekte untersucht werden.

4.8.5. Zelldifferenzierung (Sporulation)

Bei den Myxobakterien ist die Sporenbildung in der Regel streng an die vorhergehende Bildung eines multizellulären Fruchtkörpers gekoppelt. Trotzdem gibt es Beschreibungen von Mutanten, die auch außerhalb des Fruchtkörpers sporulieren (Rasmussen *et al.*, 2005; Cho und Zusman, 1999). Die ausbleibende Fruchtkörperbildung der *Soce:relint*-Mutante lässt es, als sehr wahrscheinlich erscheinen, dass auch keine Sporulation stattfindet. Rein morphologisch lässt sich Sporulation aber leider nicht bewerten, da die Sporen von *S. cellulosum* in ihrer Form nicht von den vegetativen Zellen zu unterscheiden sind. Entgegen den Angaben von Reichenbach (Reichenbach *et al.*, 1991), die besagen, dass die Sporen der *Sporangineae* trotz einer fehlenden oder geringen Kapsel lichtbrechend sind, konnten wir in den Fruchtkörpern von *So ce56* niemals lichtbrechende Sporen entdecken. 1993 veröffentlichte Reichenbach (Reichenbach, 1993) Bilder von einer ausbrechenden *S. cellulosum* Sporangiole und beschreibt, dass die Sporen nahezu gleich erscheinen wie die vegetativen Zellen. Die fehlende Lichtbrechung der *So ce56* Sporen ist also entweder stamm- oder speziesspezifisch. Da also die direkte mikroskopische Auszählung von Sporen als Instrumentarium zur Bewertung der Sporulationseffizienz wegfiel, untersuchte man die Auskeimung der potentiell gebildeten Sporen. In *M. xanthus* bricht man die Fruchtkörper zunächst durch Ultraschall auf und tötet dann verbleibende vegetative Zellen durch eine 1-2 stündige Inkubation bei 50 °C. Durch das Ausplattieren einer so behandelten Sporensuspension auf Komplexmedium kann die Sporulationseffizienz anhand der Zahl auskeimender Sporen bzw. neu entstehender Kolonien bewertet werden. Diese Strategie übertrug man auf die Sporangiolen von *So ce56*. Zunächst einmal war es extrem schwierig, die Sporangiolen von der Agaroberfläche zu lösen, da *S. cellulosum* sehr stark in den Agar hinein wächst. Trotz verbleibender Agarreste wurden die Sporangiolen mit Ultraschall und Hitze behandelt. Das Ausplattieren der erhaltenen Suspension brachte niemals Kolonien von *So ce56* hervor. Eine weitere Möglichkeit war die Zugabe von bekannten sporulationsaktivierenden Chemikalien. Hierzu wurden die beiden Stämme mit

unterschiedlichen Chemikalien versetzt und das anschließende Verhalten der Zellen durch Wachstumsversuchen und Mikroskop beobachtet.

4.8.5.1 Glycerin

Die Zugabe von 0,5 M Glycerin zählt zu den Stressbedingungen, die eine generelle Stressantwort in *M. xanthus* auslösen, die Sporulation von der Fruchtkörperbildung entkoppelten und in schüttelnden Flüssigkulturen künstlich einleiteten. Somit ist es möglich, *M. xanthus* Zellen innerhalb von 120 min vollständig sporulieren zu lassen (Müller und Dworkin, 1991).

Um zu überprüfen, ob die *Soce:relint*-Mutante Sporulationsdefekte aufweist, wurde zunächst zu exponentiell wachsenden Kulturen Glycerin zugesetzt.

Hierzu wurde ein Doppelansatz von Wildtyp und Mutante mit einer OD_{600nm} von 1 in Komplexmedium angeimpft. Ein Ansatz diente als Kontrolle und ein weiterer Ansatz wurde mit 0,5 M Glycerin versetzt. Die Zellen wurden sowohl in Bezug auf ihr Wachstum als auch mikroskopisch beobachtet. Bei *M. xanthus* führt die Glycerinzugabe innerhalb von 10-30 Minuten zum Wachstumsstillstand.

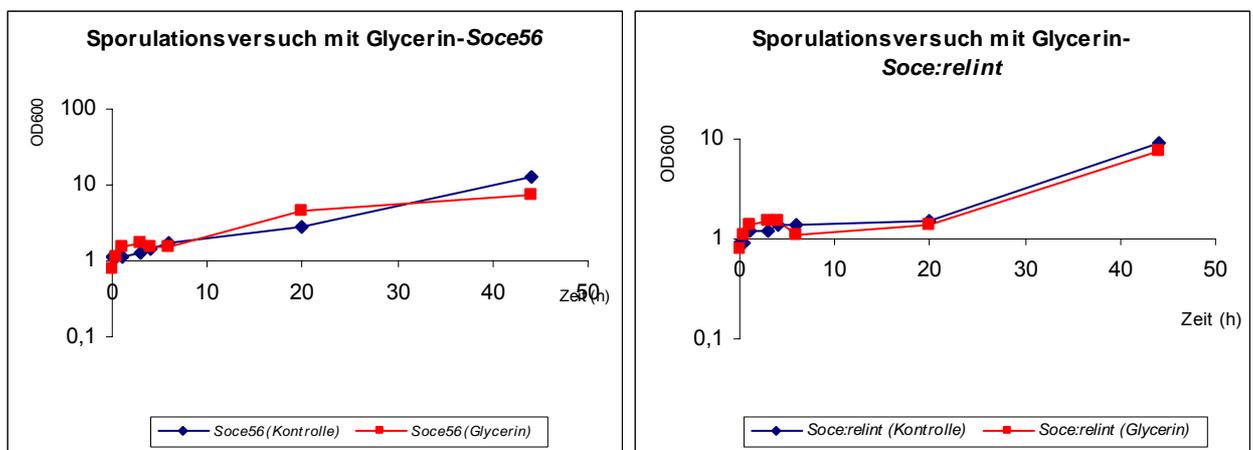


Abb. 4.30.: Wachstumskurven von *So ce56* und *Soce:relint* in Komplexmedium mit und ohne 0,5 M Glycerin

Eine Aktivierung der Sporulation durch Glycerin erzielte bei *So ce56* sowie bei *Soce:relint* keine Wirkung. Glycerin bewirkt weder einen Wachstumsstillstand in den Kulturen noch sichtbare morphologische Veränderungen.

4.8.5.2. Sporulationsaktivierung durch weitere Chemikalien

Des Weiteren wurden die Chemikalien Indol, DMSO und Isopropanol verwendet. Wie schon bekannt, aktivieren diese Chemikalien ebenfalls eine künstliche Sporulation bei *M. xanthus* bzw. *Stigmatella* (McBride *et al.*, 1992).

Auch in diesem Versuch wurden die beiden Stämme mit einer OD_{600nm} von 1 in Komplexmedium angeimpft und jeweils mit 0,4 M DMSO, 0,5 M Indol bzw. 0.4 M Isopropanol versehen. Die Kulturen wurden sowohl hinsichtlich ihres Wachstums untersucht, wie auch mikroskopisch beobachtet. Bei keiner dieser Behandlungen konnte eine Wachstumsinhibierung bzw. Sporulation beobachtet werden. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte die Sporulation in *So ce56* nicht eingehender untersucht werden.

4.8.6. 3-AT-Versuch

Die Sensitivität gegen über dem Histidin-Analogon 3-Amino-1,2,4-triazol (AT) ist eine indirekte Folge von *relA*- und/oder *spoT*-Deletionen. AT blockiert im *de novo*-Biosyntheseweg von Histidin die Imidazol-Glycerolphosphat-Dehydratase, die durch das *hisB*-Gen kodiert wird (Hilton *et al.*, 1965). Eine erhöhte Expression des *hisB*-Gens erhöht auch die AT-Resistenz. Dies kann durch Mutation des Promotors, bzw. durch ein erhöhtes (p)ppGpp-Niveau erreicht werden. Wird durch *spoT*-Mutationen das (p)ppGpp-Niveau angehoben, so steigt die AT-Resistenz, wohingegen durch *relA*-Mutationen aufgrund geringer oder nicht vorhandener (p)ppGpp-Basalmengen, die AT-Sensitivität zunimmt. Eine erhöhte AT-Sensitivität der *rel*-Mutante aus *B. subtilis* ist bereits beschrieben (Gropp *et al.*, 1994). Zudem konnte unter anderem auch in der stringenten Mutante von *S. coelicolor* (Xu *et al.*, 2002) eine erhöhte Sensitivität gegenüber AT aufgezeigt werden. Um zu untersuchen, ob *So ce56*, und natürlich auch dessen stringente Mutante, auf AT sensitiv reagieren, wurde ein Wachstumsversuch gestartet. Hierzu wurde der Wildtyp sowie *Soce:relint* in Komplexmedium angeimpft und mit AT versetzt. Es wurden 2 verschiedene Konzentrationen verwendet, 15 mM und 30 mM AT.

Nach dem Versetzen der Kulturen mit 3-AT wurde in regelmäßigen Abständen die OD bestimmt. Das Resultat ist in den nächsten zwei Grafiken verdeutlicht.

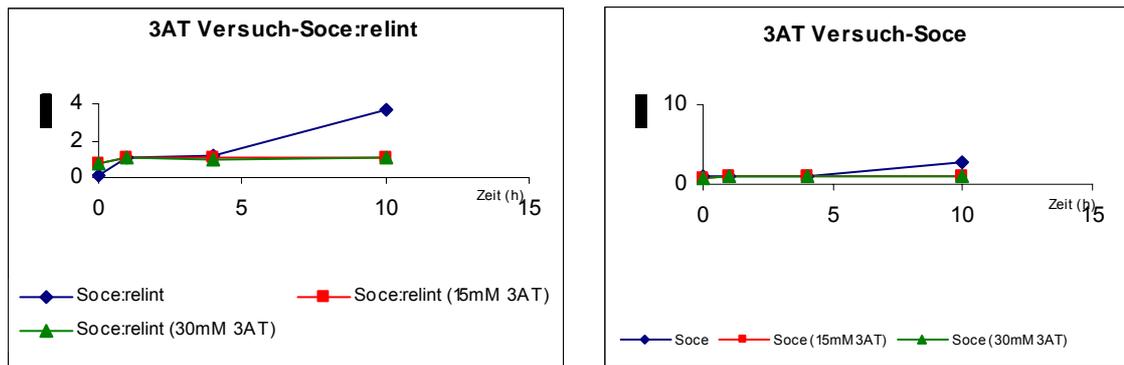


Abb.4.32.: zeigt die Wachstumskurven von 1. *So ce56* (rechte) und 2. *Soce:relint* (links) während der Inkubation mit 3-AT.

Trotz kurzer Inkubationszeit der Kulturen mit AT ist bereits bei 15 mM eindeutig eine Reaktion zu erkennen. Sowohl *So ce56* als auch die stringente Mutante zeigen eine starke Sensitivität auf AT. Die *rel*-Mutation führt aber weder zu einer erhöhten Resistenz noch zur Sensitivität.

4.8.7. Cellulose-Test

S. cellulosum Stämme sind in der Lage, Cellulose zu zersetzen. Um zu sehen, ob die *Soce:relint* Mutante einen Defekt in der Zersetzung von Cellulose besitzt, wurde ein Experiment durchgeführt. Hierzu wurden die beiden Stämme in Komplexmedium angezogen und nach dem Wachstum auf OD_{600nm} von 25 eingestellt. Die Suspension wurde anschließend auf ein Stück Cellulose getropft. Als Untergrund diente M-Diff-Agar. Die Platten wurden bei 32 °C inkubiert und beobachtet.

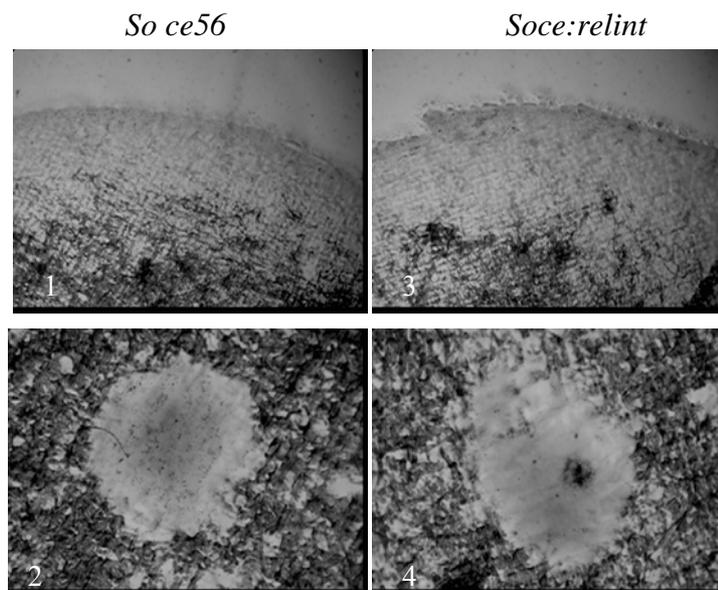


Abb 4.33.: Abbildung 1 zeigt den Wildtyp beim Zersetzen eines Cellulosepapiers (dunkles Papier) Abbildung 3 zeigt die Mutante beim zersetzten eines Cellulosepapiers. Abbildungen 2 verdeutlicht die Zersetzungsstelle von Cellulose bei *So ce56*. Abbildungen 4 verdeutlicht die Zersetzungsstelle von Cellulose bei *Soce:relint*. Stereoskop 1x bzw. 3x Vergrößerung

Nach 12 Tagen Inkubation war deutlich zu erkennen, dass sowohl der Wildtyp als auch die Mutante in der Lage sind, Cellulose abzubauen. Dies wurde durch das Zersetzen des Cellulose Papiers deutlich.

4.8.8. *Soce:relint* transkribiert kein *Chivosazol*-Gen im *Chivosazol*-Cluster

Die Synthese der rRNA- und tRNA- wird durch Aminosäuremangel unterbrochen. Nur die mRNA-Synthese läuft teilweise weiter. In *E. coli* existieren sieben verschiedene rRNA-Operons. Die Transkription dieser Operons wird sehr vielfältig reguliert. Eine sehr wichtige Regulation erfolgt durch die stringente Kontrolle. Der augenscheinlichste Effekt ist die Repression der Transkription ribosomaler RNAs.

HPLC Analysen und Bioassay-Experimente konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* deutlich machen, dass die stringente Mutante von *So ce56* weniger der Sekundärmetabolite produziert als der Wildtyp. Dies wirft die Frage auf, ob dieser Defekt daran liegt, dass die *Soce:relint* Mutante nicht in der Lage ist, dass dazu gehörige Operon zu transkribieren. Um diese Frage zu beantworten, wurden Real-Time RT-PCR Analysen durchgeführt. Hierzu wurden Primer konstruiert, welche in einem vorderen Gen des *Chivosazol* A-Clusters binden (Abb. 4.34.).



Abb.4.34.: Abfolge der einzelnen Gene im *Chivosazol*-Gen-Cluster von *So ce56*

Als Referenz wurde 16S rRNA verwendet. Da die 16S rRNA durch die Aktivierung der stringenten Kontrolle im Normalfall schnell abgebaut wird, wurden zuvor Northernblot Analysen getätigt. Hierzu wurden RNA-Proben verwendet, die in der danach anstehenden Real-Time PCR-Analyse benötigt wurden. Die Konzentration der isolierten RNA wurde zuvor photometrisch bestimmt, um anschließend dieselben Mengen RNA zu laden.

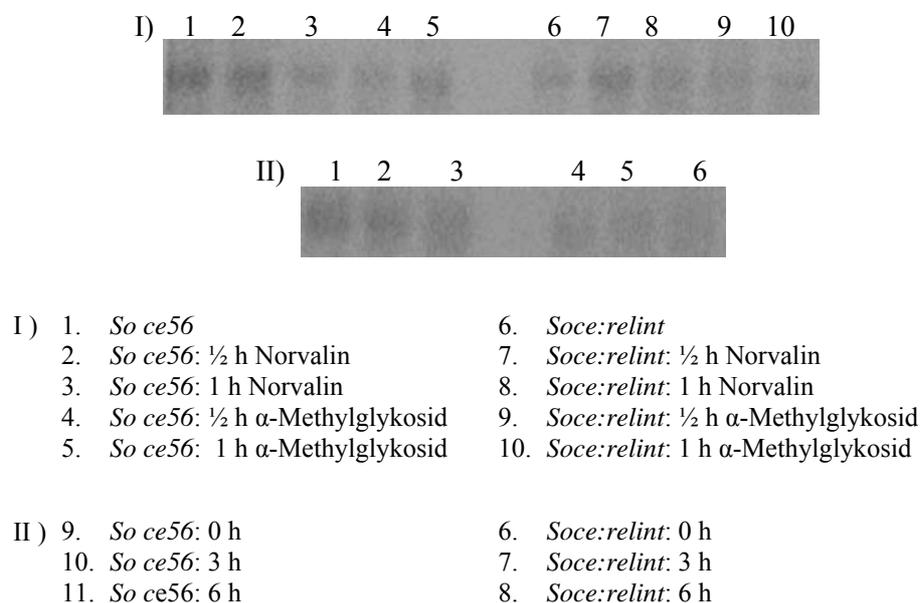


Abb. 4.35.: Northernblot: 16S DNA-Sonde zur Kontrolle der Real-Time RT-PCR-Analyse. Es wurden jeweils 15 µg RNA geladen

Das Ergebnis des Northernblots (Abb. 4.35.) zeigte jedoch einen Unterschied in den RNA-Mengen. Die RNA-Proben wurden einem weiteren DNase I-Verdau unterzogen und deren Konzentration erneut photometrisch bestimmt. Die darauf folgenden Real-Time RT-PCR Analysen zeigten in allen Proben eine identische Steigung in dem erwarteten Zyklusbereich. Somit konnte 16S rRNA in den anschließenden Real-Time RT-PCR Analysen als Referenz verwendet werden. Die unterschiedlichen Stärken der RNA auf dem Northernblot sind wahrscheinlich, auf ungenaue Konzentrationsbestimmungen zurückzuführen.

Es wurden zwei unabhängige PCR-Analysen durchgeführt. Beide wurden je dreimal wiederholt und die Werte inklusive Fehlerbalken gegenüber gestellt. Es sollte bei dieser

Real-Time RT-PCR Analyse sowohl unter Differenzierungsbedingungen als auch unter Bedingungen geschaut werden, in denen die stringente Kontrolle durch Chemikalien aktiviert wurde.

In den Abb. 4.36. und Abb. 4.37. sind beide Real-Time PCR-Analysen grafisch dargestellt.

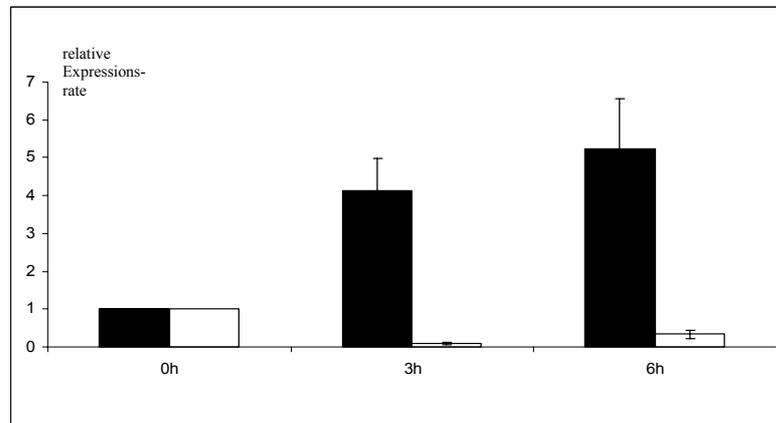


Abb.4.36.: Real-Time RT-PCR Analyse: relative *Chivosazol A*-Gen-Expression zu 3 verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung; die relativen Expressionslevel von *So ce56* wurden durch schwarze Balken sichtbar gemacht, die relative Expression von *Soce:relint* wurde in weiß gekennzeichnet.

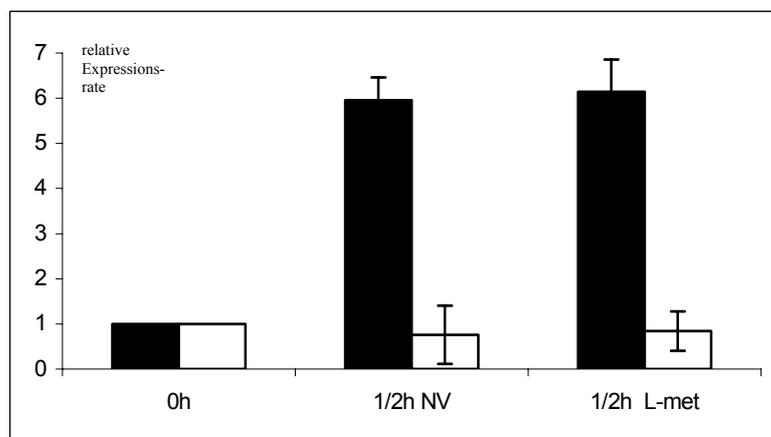


Abb.4.37.: Real-Time RT-PCR Analyse: relative *Chivosazol A*-Gen-Expression nach Aktivierung der stringenten Kontrolle durch Chemikalien; relative Expressionslevel von *So ce56* wurden durch schwarze Balken sichtbar gemacht, die relative Expression von *Soce:relint* wurde in weiß gekennzeichnet.

Beide unabhängig voneinander getätigten Versuche konnten zeigen, dass die schwache Produktion von Chivosazol A auf einen Defekt der mRNA- Level zurückzuführen ist. Wie aus Abb. 4.33. geschlossen werden kann, zeigt der Wildtyp (schwarz) bei zunehmender Zeit unter Nährstoffmangel einen steigenden Transkriptlevel des Chivosazol A-Gens, wohingegen die *Soce:relint* Mutante (weiß) keinen sichtbaren Anstieg zeigt. In den ersten 6 h der Differenzierung ist die Mutante nicht in der Lage, denselben Transkriptlevel zu erreichen. Betrachtet man Abb. 4.34. etwas näher, kann auch hier ein Defekt in den mRNA

Level von Chivosazol A in der *Soce:relint* Mutante (weiß) wahrgenommen werden. Die Auswertung wurde nach Pfaffl (Pfaffl, 2001) getätigt. In diesem Fall wurde der erste Wert auf 1 gesetzt.

4.8.9. *Soce:relint* transkribiert kein *asgA*-Gen

Unter Nährstoffmangelbedingungen sind Myxobakterien in der Lage, Fruchtkörper zu bilden. Bis es jedoch zur vollständigen Sporulation kommt, durchläuft die Zelle eine Abfolge von verschiedenen Prozessen, die durch verschiedene Signale gesteuert werden. Diese Signale heißen A, B, C, D und E Signal. Bei den ersten Anzeichen von Nährstofflimitierung wird in *M. xanthus* das (p)ppGpp abhängige A-Signal in der Zelle produziert. An der Produktion des A-Signals ist in *M. xanthus* das *asgA*-Gen beteiligt.

Analysen am Genom von *So ce56* identifizierten ein *asgA* homologes Gen. Die dazu gehörige *Soce:asgA* Mutante ist nicht in der Lage, Fruchtkörper zu bilden, produziert jedoch die Sekundärmetabolite Chivosazol A und Etnangien (persönliche Aussage Sabrina Doß). Dies bestätigte die Vermutung, dass das *asgA*-Gen in *So ce56* eine Rolle in der Differenzierung besitzt. Um zu klären, ob dieses differenzierungsspezifische Gen ebenfalls (p)ppGpp - abhängig transkribiert wird, wurden Real-Time RT-PCR Analysen durchgeführt. Hierzu wurden *primer* konstruiert, die im *asgA*-Gen hybridisieren.

Die Analysen wurden dreimal wiederholt und die Werte inklusive Fehlerbalken gegenüber gestellt. In den Abb. 4.36. ist die Real-Time RT-PCR Analyse grafisch dargestellt. Zur Normalisierung wurde ebenfalls 16S rRNA verwendet.

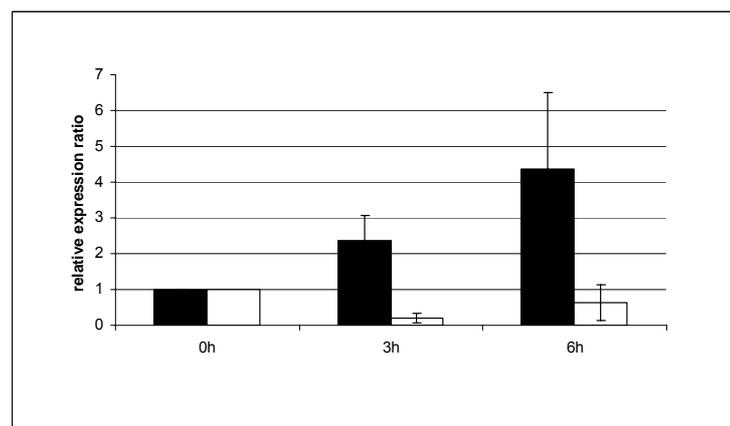


Abb.4.38.: Real-Time RT-PCR Analyse: relative *asgA*-Gen-Expression in 3 verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung, relative Expressionslevel von *So ce56* wurden durch schwarze Balken sichtbar gemacht, die relative Expression von *Soce:relint* wurde in weiß gekennzeichnet.

Abb. 4.38. zeigt das Ergebnis der Real-Time RT-PCR. Die Expression der RNA im Wildtyp (schwarz) zeigte im Verlauf der Differenzierung eine Zunahme der mRNA Level

des *asgA*-Gens. Die RNA-Expression der *Soce:relint* Mutante (weiß) hingegen zeigte keine Zunahme der mRNA Level. In den ersten 6 h der Differenzierung ist die Mutante nicht in der Lage, denselben *asgA*-Transkriptlevel zu erreichen.

Der Defekt der physiologischen und morphologischen Differenzierung von *Soce:relint* kann somit in beiden Fällen zumindest teilweise auf Defekte in der mRNA Bildung zurückgeführt werden.

5. Ergebnisse Teil II:

Charakterisierung der *relint*-Mutante aus *S. cellulorum*

Die Ergebnisse der Real-Time RT-PCR deuten an, dass in *Soce:relint* wichtige Regulatoren und/oder Transkriptionsaktivatoren fehlen, die für die Expression der differenzierungsspezifischen Gene oder Operons benötigt werden. Daraufhin sollte im zweiten Abschnitt das Proteom von *So ce56* und *Soce:relint* näher untersucht werden, um diese potentiellen Regulatoren zu identifizieren.

5.1. Zweidimensionalen Gelelektrophorese zur Aufklärung der *rel* Defekte

Zur Identifizierung von Regulatoren in *So ce56* und *Soce:relint* wurden 2D-Gele angefertigt.

Die 2D-Gel-Technik wurde angewandt, um den Einfluss der *rel*-Mutation auf das Expressionsmuster von *S. cellulorum*-Zellen zu untersuchen. Die Zellen wurden in synthetischem Medium (SM-Medium) mit Mannose als Kohlenstoffquelle angezogen. In der stationären Phase wurden Proben entnommen (Abb.5.1.). Die Probenentnahme wurde mit einem Pfeil gekennzeichnet, es wurden 100 ml Kultur für den anstehenden Versuch verwendet.

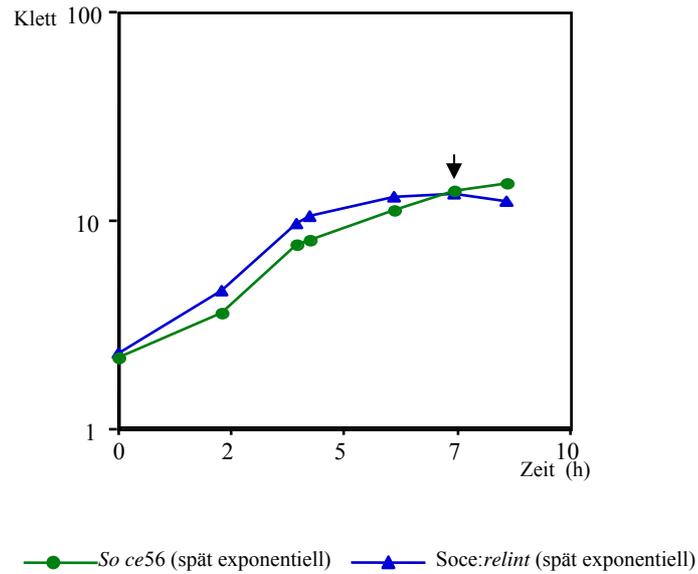


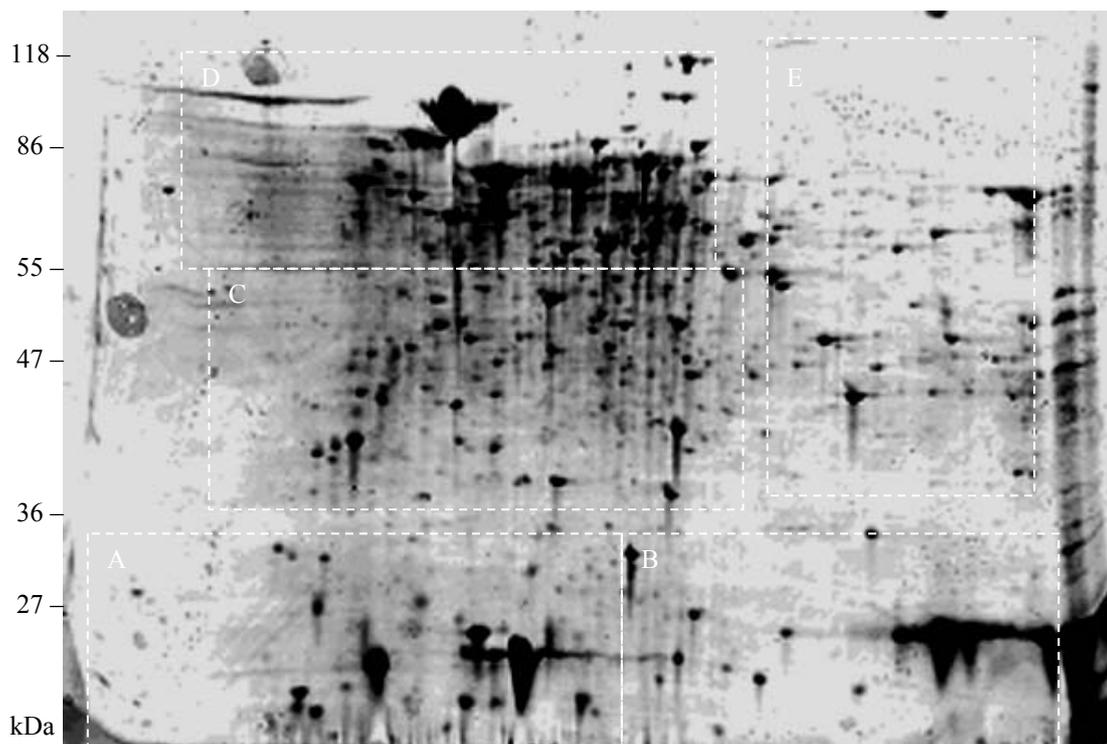
Abb.5.1.: Wachstumskurve von *So ce56* (grün) und *Soce:relint* (blau) in SM-Medium (Mannose)

Die Zellen wurden wie im Methodenteil beschrieben, isoliert und behandelt. Es wurden 200 µg Protein der jeweiligen Extrakte pro Gel aufgetragen. Verwendet wurden für die 1. Dimension ein pH-Gradient zwischen pH 4 und 7. Zum Analysieren der Proben wurden die aufgetrennten Proteine mit Coomassie-G250 blau angefärbt.

Abb. 5.2. zeigt die fertigen 2D-Gele, die mit Hilfe von Coomassie-G250 angefärbt wurden.

(1) pH 4

7



(2) pH 4

7

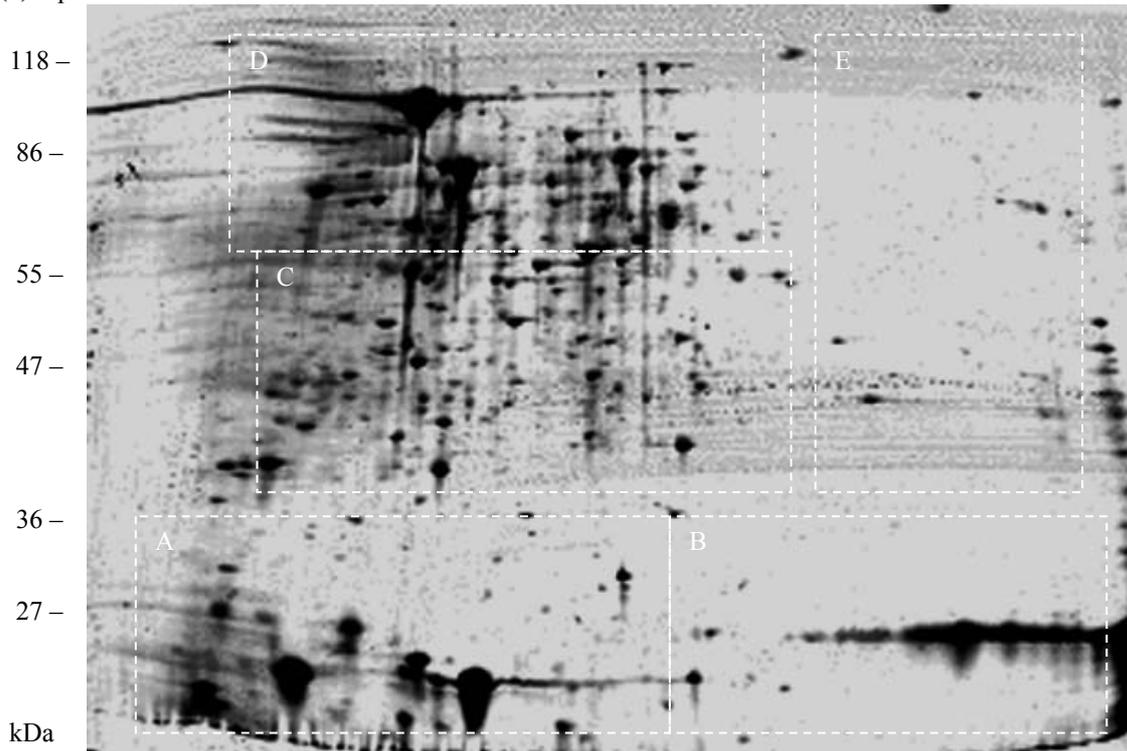
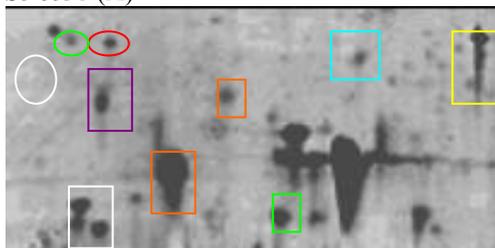
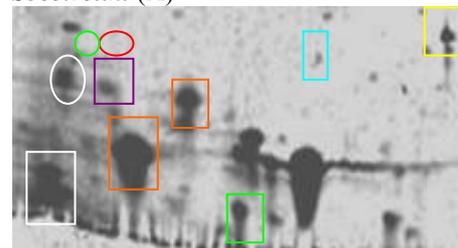
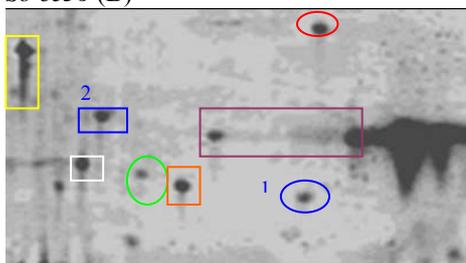
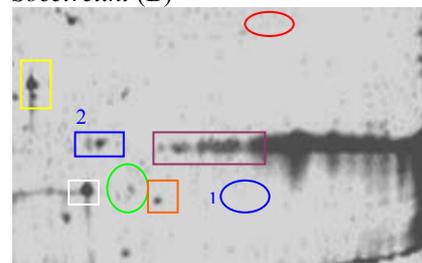


Abb. 5.2.: 2D-Gele von *So ce56* (1) und *Soce:relint* (2) Extrakten aus stationärer Phase. Es wurden jeweils 200 µg Protein pro Gel aufgetragen. Die Gele wurden anschließend Coomassie gefärbt. Zur besseren Analyse der Proteinunterschiede werden die gestrichelten Bereiche vergrößert in Abb. 5.3. dargestellt.

Die 2D-Gele zeigen sichtliche Unterschiede im Proteinmuster. Zur genaueren Analyse und zur Verdeutlichung der Proteinunterschiede wurden die Bereiche in den gestrichelten Kästchen vergrößert in Abbildung 5.3. dargestellt.

So ce56 (A)*Soce:relint* (A)*So ce56* (B)*Soce:relint* (B)

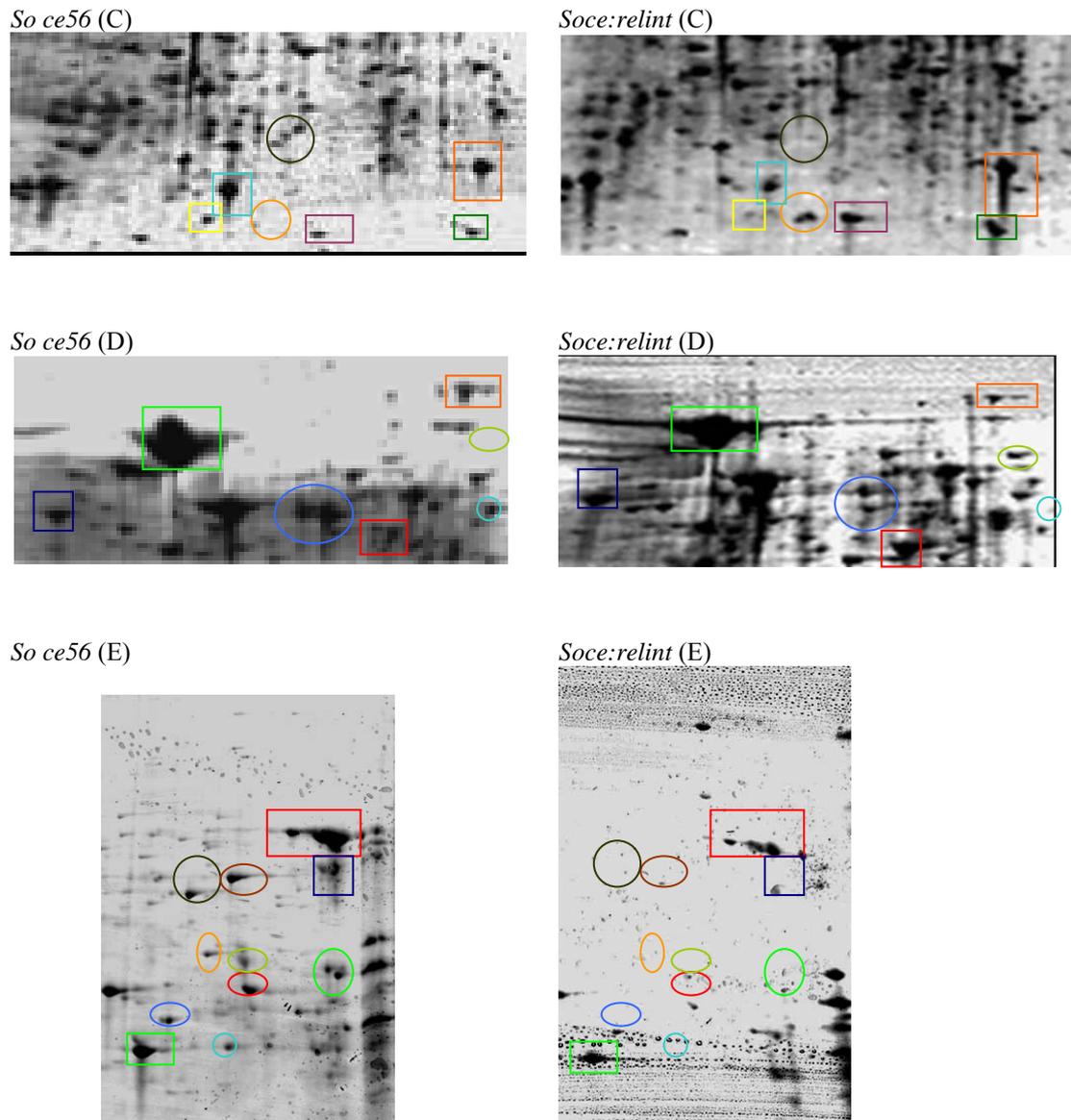


Abb. 5.3. Ausschnitte aus den 2D-Gelelen der späten exponentiellen Phase *So ce56* und *Soce:relint*. Kreise zeigen Proteine die im jeweils anderen Stamm fehlen. Kästchen zeigen Proteine die unterschiedlich stark vorhanden sind. Zur Verdeutlichung wurden die Spots mit unterschiedlicher Farbe markiert. Blaue Markierung mit Nummer zeigen Proteine, die per MALDI-TOF-Analyse bestimmt wurden.

Proteinspots die in *So ce56* bzw. *Soce:relint* nicht exprimiert vorlagen, wurden in den ausgewählten Bereichen durch Kreise kenntlich gemacht. Die Kästchen zeigen Proteinspots, die in Wildtyp und Mutante unterschiedlich stark exprimiert werden.

Eine Anzahl unterschiedlich exprimierter Proteine (Abb. 5.2./5.3.) wurde ausgeschnitten und anschließend für MALDI-TOF-Analysen nach Bielefeld geschickt. Wie anhand der Resultate der 2D-Gele zu erkennen ist, sind deutliche Unterschiede im Proteinmuster von Wildtyp und Mutante zu erkennen. Einige dieser Proteine wurden freundlicherweise an der Universität Bielefeld von Aysel Alici per MALDI-TOF-Analyse analysiert (siehe Anhang).

5.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese zur Aufklärung der Proteinexpression in *Soce:relint*

Die 2D-Gel-Analyse legte die Vermutung nahe, dass die *Soce:relint* Mutante in der stationären Phase kaum noch Proteine synthetisiert. Da anhand der Gesamtproteom-Analyse sowohl die zu diesem Zeitpunkt exprimierten aber auch die nicht exprimierten Proteine analysiert werden, sollten mit der Markierung von [³⁵S]-Methionin die aktiv translatierten Proteine detektiert werden. Um die unterschiedlichen Expressionsmuster von Wildtyp und Mutante besser untersuchen zu können, wurden die Zellen wie im Versuch zuvor, in SM-Medium (mit Mannose) angeimpft. Der Wachstumsverlauf dieses Versuches wurde durch Klettbestimmung verfolgt und dokumentiert (Abb.5.5.).

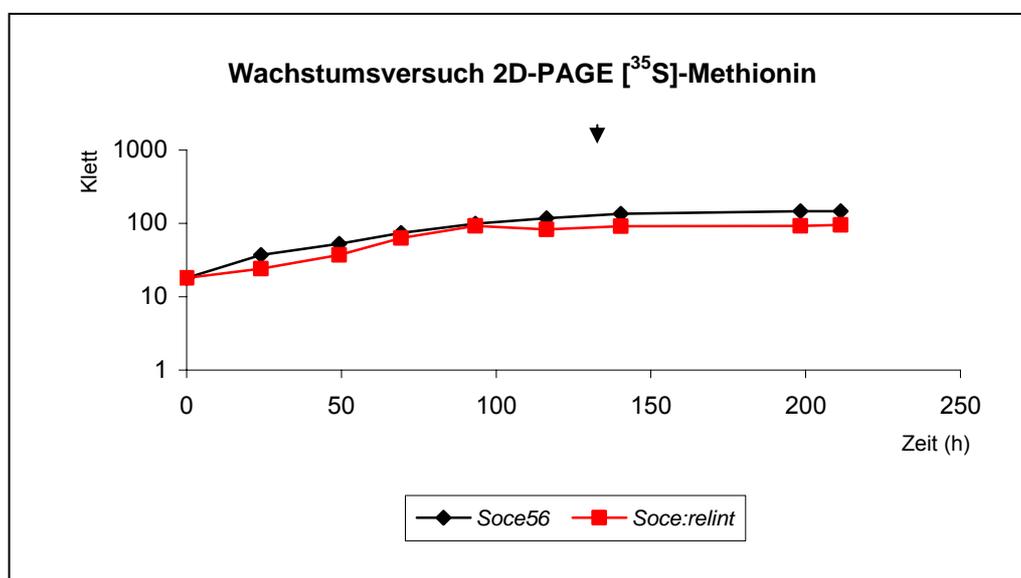


Abb.5.5.: Wachstumskurve von *So ce56* und *Soce:relint* in SM-Mannose. Zum markierten Zeitpunkt wurden jeweils 5 ml beider Kulturen in neue Kolben überführt und für 6 h mit 12 μ Ci [³⁵S]-Methionin markiert.

Die nötige Zeit der Markierung wurde mit Hilfe von Vorversuchen ausfindig gemacht. Um 80% des vorhandenen [³⁵S]-Methionin aufzunehmen war ein „pulse-labeling“ von 6 h notwendig. Für den Versuch wurde eine 5 ml Kultur verwendet. Die Zellen wurden beim gewünschten Klettwert geerntet und anschließend in 80 % Aceton solange gewaschen bis der Überstand klar blieb. Das Pellet wurde in 200 μ l Hybridisierungspuffer resuspendiert. Die Zellen wurden mit Hilfe von Glasperlen aufgebrochen und die Proteinkonzentration der Proteinextrakte wurde nach der Methode von Bradford bestimmt.

Für die 2D-PAGE wurden die gleichen Mengen Protein (90 μ g) auf die erste Dimension gebracht.

Der Ablauf der 2D-Gelelektrophorese ist im Methodenteil ausführlich beschrieben. Die Gele wurden nach der zweiten Dimension zum einen auf ein Whatmann-Papier überführt und getrocknet. Die anderen zwei Gele wurden mit Silbernitrat angefärbt. Sie dienen zur Kontrolle der Proteinmenge. Nach dem Trocknen konnten mit Hilfe eines *Phosphoimagerscreens*, die exprimierten Proteine sichtbar gemacht werden.

Abb. 5.6. zeigt die Detektion der markierten Proteine auf dem *Phosphoimagerscreen* (Bild A und C) nach 8 Tagen.

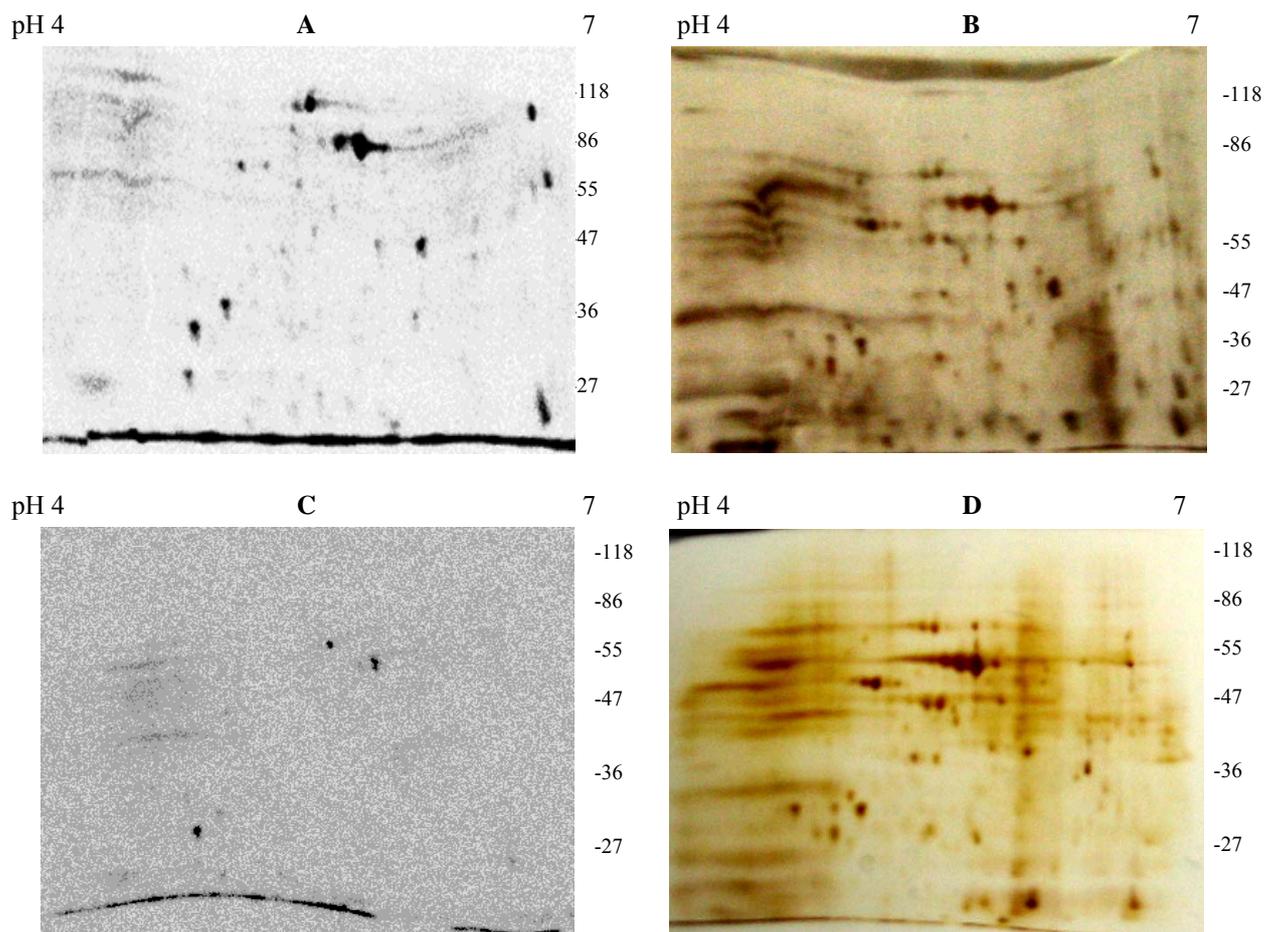


Abb. 5.6.: 2D-PAGE-Autoradiographien von *S. cellulorum*-Gesamtzellextrakten der Stämme *So ce56* (A) und *Soce:relint* (C) in stationärer Phase. Gezeigt ist das Expressionsmuster nach [³⁵S]-Methionin-„pulse-labelling“. (B) zeigt das entsprechende 2D-Gel von *So ce56* nach Silberfärbung und (D) das entsprechende 2D-Gel von *Soce:relint*-Extrakten.

Diese Gele zeigen deutlich, dass sowohl der Wildtyp als auch die *Soce:relint* Mutante in der stationären Phase nur noch wenige Proteine neu synthetisieren. Vergleicht man jedoch Wildtyp und Mutante, zeigt die *Soce:relint* Mutante einen noch größeren Verlust. Um sicherzustellen, dass es sich hierbei nicht um Artefakte aufgrund fehlerhafter

Proteinkonzentrationsbestimmung handelt, wurden die entsprechenden Gele mit Silber gefärbt. Die in Abb. 5.6. gezeigten Silbergele (Wildtyp (B) und Mutante (D)) zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Proteinkonzentration.

5.3. Isolation DNA bindender Proteine anhand eines Biotin/Streptavidin Affinitätssystems

Die Ergebnisse der RealTime RT-PCR zeigten in der *Soce:relint* Mutante einen Defekt sowohl in der Expression des *Chivosazol*-Operons, wie auch in der Expression des *asgA*-Gens. Die Identifizierung von potentiellen Transkriptionsaktivatoren mit Hilfe der 2D-Gel-Analyse brachte keinen Erfolg. Es war nicht möglich, aus dem Gesamtproteom von *So ce56* und *Soce:relint* Transkriptionsaktivatoren zu identifizieren. Um Transkriptionsaktivatoren zu identifizieren, die in der morphologischen und physiologischen Differenzierung von *So ce56* eine Rolle spielen, wurde ein weiterer Versuch gestartet. Es handelte sich dabei um Biotin/Streptavidin-Affinitätschromatographie.

Diese Methode beruht auf der irreversiblen Komplexbildung von Biotin und Streptavidin und dient der Isolierung von Proteinen aus einem Gemisch.

Ein mit Biotin markiertes DNA-Fragment, welches potentielle DNA-Bindungsstelle des zu untersuchenden Proteins beinhaltet, wird hierbei über das Biotin an ein zuvor mit Streptavidin gekoppeltes magnetisches Kügelchen (Streptavidin Dynabeads, Dynal) gebunden. In diesem Fall wurden zwei verschiedene Biotin markierte DNA-Fragmente konstruiert. Zur Identifizierung von DNA-Bindeproteinen, die im frühen Verlauf der morphologischen Differenzierung benötigt werden, wurde die Promotorregion des *asgA*-Operons verwendet. Zur Identifizierung von DNA-Bindeproteinen, welche in der physiologischen Differenzierung involviert sind, wurde die Promotorregion vom *Chivosazol*-Operon verwendet.

Beim Mischen des Komplexes aus DNA und Magnetkügelchen mit einem spezifischen Proteinextrakt soll es zur Bindung der gesuchten Proteine an die DNA kommen.

Der Ablauf des Biotin-Streptavidin Versuches ist in Abb.5.7. deutlich gemacht.

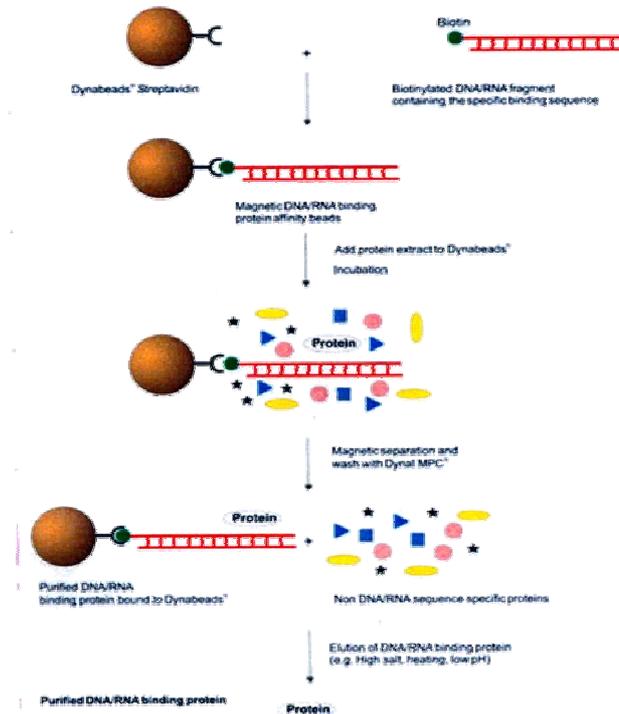


Abb. 5.7.: Ablauf des Streptavidin-Biotin-Versuchs (Abb. www.rockland-inc.com)

Das mit Hilfe der PCR amplifizierte Biotin-markierte DNA-Fragment wurde zur Identifizierung von Proteinen verwendet. Die isolierten Proteine wurden anschließend über ein 12 %iges SDS-Gel aufgetrennt und mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert, um gegebenenfalls einen Unterschied der Proteinzusammensetzung zwischen Wildtyp und Mutante festzustellen. Dazu wurde, wie zuvor beschrieben, zunächst das Biotin-markierte DNA-Fragment an die markierten Magnetkügelchen (Dynabeads M-280) gekoppelt und somit die Bindungsreaktion durchgeführt. Für den Versuch wurden 100 ml Zellen einer spät-exponentiellen Kultur verwendet. Die Stämme wurden in SM-Medium mit Mannose angeimpft und bei Klettwert 86 geerntet. Aus den Zellen wurde ein Proteinextrakt hergestellt. Zur Bindungsreaktion wurde die identische Menge an Protein verwendet (120 µg). Die Isolierung der gebundenen Proteine erfolgte anschließend mit Salz (0,5 M NaCl).

Die eluierten Proteine wurden mit Aceton gefällt und über ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie blau gefärbt und zur MALDI-TOF Analyse an die Universität des Saarlandes gegeben.

Abbildung 5.8. zeigt die eluierten Proteine vom Streptavidin-Biotin-*asgA*-Promotor-fishing-Experiment.

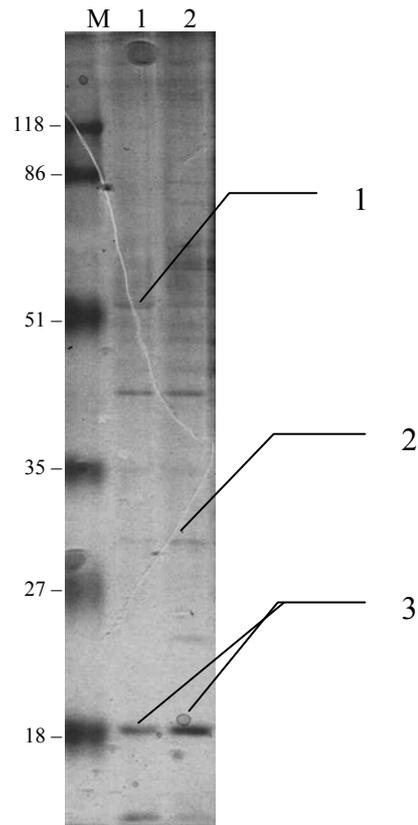


Abb. 5.8.: Proteine, die an dem *asgA*-Promotor binden. Isolierte Proteine von *So ce56* und *Soce:relint* nach Acetonfällung. Das 10 %ige SDS-Gel wurde Coomassie gefärbt; M: Marker *prestained protein marker, Fermentas*, 1: *So ce56*; 2: *Soce:relint*

Abb. 5.8 zeigt das 10 %ige SDS Gel mit den potentiellen *asgA*-Promotor bindenden Proteinen. Als Kontrolle wurden reine Dynabeads mit Proteinextrakt versehen. Ein Binden von Proteinen an die Dynabeads ohne *asgA*-Promotor-DNA-Fragment ist nicht erfolgt. Spur 1 zeigt die eluierten Proteine aus dem Extrakt von *So ce56*. Spur 2 zeigt die gebundenen Proteine vom *Soce:relint* Extrakt. Betrachtet man die Proteinmuster von Wildtyp und Mutante, ist eine deutliche Anzahl von Proteinen in der Lage an die Promotor-Region des *asgA*-Promotors zu binden. Es konnten einige Unterschiede zwischen den Proteinmustern sichtbar gemacht werden. Es wurden alle eindeutigen Proteinbanden ausgeschnitten und zu MALDI-TOF Analysen nach Saarbrücken gesendet. Es war nicht möglich alle Proteinbanden zu identifizieren. Proteine, die erfolgreich mit Hilfe von MALDI-TOF identifiziert wurden, sind in Tabelle 5.1. zusammengestellt.

Tabelle: 5.1. Identifizierung der an den *asgA*-Promotor gebundenen Proteine

Bande Nr.	Protein	berechnete Masse des Genprodukts (kDa)	sce-Nummer	<i>So ce56</i>	<i>Soce:relint</i>
1	McrB, rgl 5-Methylcytosin-spezifisches Restriktionsenzym B	63,3	sce_20050509_5136	*	
2	NtcA, Stickstoffregulierendes Protein	27,8	sce_20050509_3515		*
3	DNA-Bindeprotein (HTH Interpro, Fis Typ)	16,14	sce_20050509_6834	*	*

Ein interessantes Protein wurde in Bande 2 identifiziert. Es handelt sich hierbei um ein NtcA-Stickstoff-Regulatorprotein. Gefunden wurde es verstärkt in *Soce:relint*. Eine schwache Bande ist auch im Wildtyp-Extrakt zu erkennen. Bei NtcA handelt es sich um einen Transkriptionsaktivator (Vega-Palás *et al.*, 1992), der an der Aktivierung der Transkription stickstoffregulierter Gene beteiligt ist. Nr. 1 wurde nur im Wildtyp identifiziert. MALDI-TOF-Analysen identifizierten ein McrBC, Restriktionsenzym B. Es handelt sich hierbei um ein Enzym, dessen Spaltaktivität strikt abhängig von der Anwesenheit methylierter Cytosinreste in den DNA-Erkennungssequenzen ist. Die Aktivität dieser Enzyme ist abhängig von der Hydrolyse von GTP (Pieper *et al.*, 1999). Des Weiteren konnte ein potentiell DNA-Bindeprotein (Bande 3) analysiert werden. Leider konnte das Protein in Spur 2 zwischen Bande 2 und 3 trotz mehrfacher Wiederholungen nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Dieses Protein erscheint besonders interessant, da es nur im *Soce:relint* Extrakt gefunden wurde.

Hierbei könnte es sich um einen differenzierungsspezifischen Regulator handeln.

Proteine, die mit Hilfe des *chivosazol(chivI)*-Promotor-DNA-Fragments eluiert werden konnten, sind in Abb. 5.9. gezeigt.

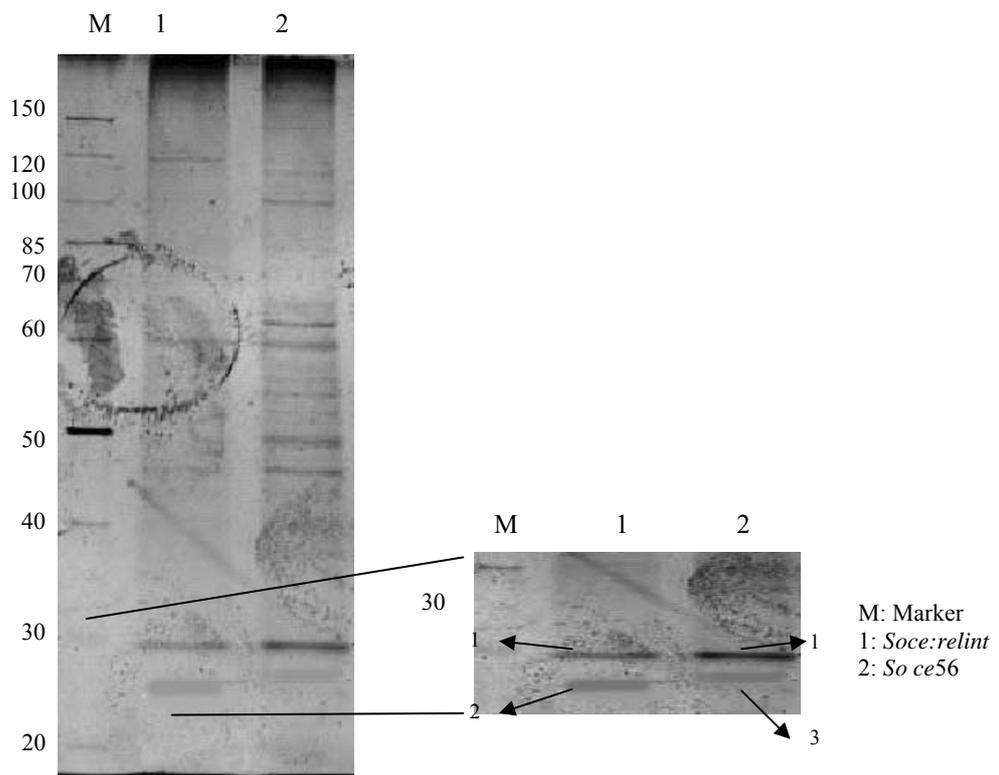


Abb.5.9.: Proteine, die an dem *chivosazol(chiv1)*-Promotor binden. Isolierte Proteine von *So ce56* und *Soce:relint* nach Acetonfällung. Das 10 %ige SDS-Gel wurde Coomassie gefärbt; M: Marker *prestained protein marker, Fermentas*, 1: *Soce:relint*; 2: *So ce56*

Die gekennzeichneten Banden 1-3 wurden ausgeschnitten und zu MALDI-TOF Analysen nach Saarbrücken geschickt. Das Ergebnis der MALDI-TOF Analyse ist in Tabelle 5.2. aufgelistet.

Tabelle: 5.2. Identifizierung der an den *chivosazol*-Promotor gebundenen Proteine

Bande Nr.	Protein	berechnete Masse des Genprodukts (kDa)	sce-Nummer	<i>So ce56</i>	<i>Soce:relint</i>
1	DeoR	35	sce_20050509_3745	*	*
2	NtcA–Nitrogen Regulatorprotein	27,8	sce_20050509_3515		*
3	Pyrophosphorylase	29	sce_040811_2351		*

Bande 1 wurde mit Hilfe von MALDI-TOF-Analysen als DeoR identifiziert. DeoR konnte sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante identifiziert werden. Die *deoR*-Mutante von *So ce56* ist nicht mehr in der Lage, Chivosazol A zu produzieren (mündliche Aussage von Dr. Shwan Rachid). Bei DeoR handelt es sich um einen essentiellen Aktivator der Expression des *chivosazol(chiv1)*-Operons. Bande 2 konnte nur im Wildtyp identifiziert werden. Es wurde als NtcA-Protein identifiziert. Dieses wurde bereits zuvor im *Soce:relint*-Extrakt als potentiell *asgA*-Promotor bindendes Protein identifiziert.

Der Versuch mit Hilfe verschiedener Promotorregionen, Transkriptionsaktivatoren zu identifizieren, hat sehr gut funktioniert. Es konnten in beiden Versuchen unterschiedliche Proteinmuster in *So ce56* und *Soce:relint* aufgezeigt werden.

Die Identifizierung des Transkriptionsaktivators NtcA im *Soce:relint* Extrakt mit Hilfe beider Promotoren, war sehr interessant. Es handelt sich bei NtcA um ein DNA-Bindeprotein. In Cyanobakterien ist NtcA in der Lage, sowohl als Aktivator aber auch als Repressor zu fungieren (Wisén, 2003). NtcA ist Mitglied der cAMP Rezeptor Protein (CAP) Familie der prokaryotischen Transkriptionsfaktoren. Es wurden daraufhin nähere Untersuchungen bezüglich NtcA in *So ce56* und der Mutante *Soce:relint* unternommen.

5.4. Westernblot-Analyse: NtcA- Antikörper unter Differenzierungsbedingungen

NtcA gehört zur Familie der CAP (*catabolic activator protein*) Proteine. Proteine dieser Familie bilden ein Dimer und binden mit Hilfe eines *Helix-Turn-Helix* Motifs in der Promotorregion der Gene, die sie kontrollieren (Steitz *et al.*, 1982). Bei NtcA handelt es sich um einen globalen Stickstoffregulator. Wie zuvor durch die Biotin/Streptavidin-Affinitätschromatographie gezeigt werden konnte, bindet NtcA sowohl an die *asgA*-Promotor-Region, wie auch an die *chivosazol*-Promotor-Region von *Soce:relint*. Wohingegen keine Bindung bei der Analyse des Proteinextraktes von *So ce56* gefunden werden konnte.

In *Myxococcus xanthus* findet man auch ein NtcA ähnliches Protein (Tabelle 5.6.). Es handelt sich um das Protein MrpC. MrpC ist ein differenzierungsspezifisches Protein, das eine wesentliche Rolle in der Fruchtkörperbildung von *M. xanthus* spielt. Westernblot-Analysen mit Proteinextrakten von *So ce56* und *Soce:relint* mit MrpC-Antikörper ergaben trotz gewisser Homologie keine signifikanten Banden. Prof. Dr. Forchhammer stellte uns freundlicherweise einen gegen NtcA aus *Synechococcus* gerichteten Antikörper zur Verfügung.

Um zu testen, ob NtcA unterschiedlich stark in *So ce56* und *Soce:relint* akkumuliert wird, wurde eine Westernblot-Analyse vorgenommen.

Als 1. Antikörper wurde der NtcA-Antikörper von *Synechococcus* verwendet. Die Stämme wurden in SM-Medium (+ Mannose) angezogen und an zwei verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 1 ml Kultur abgenommen. Nach der Zentrifugation wurden die Zellpellets bei -20 °C weg gefroren. Abb. 5.10. zeigt den Wachstumsverlauf mit den zwei Zeitpunkten der Probenentnahme.

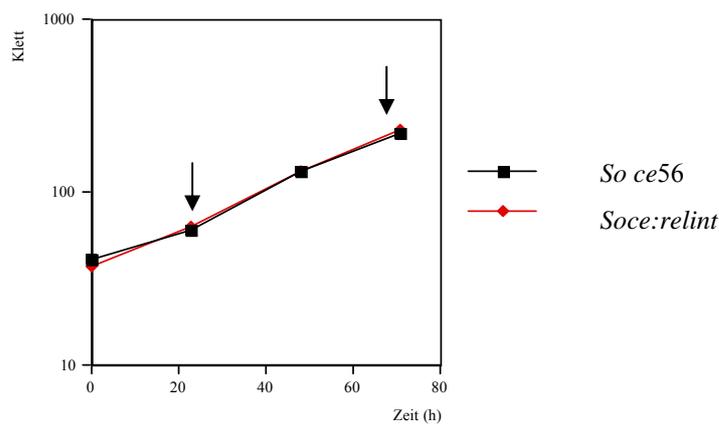


Abb.5.10.: Wachstumsverlauf von *So ce56* und *Soce:relint* in SM-Medium mit Mannose als Kohlenstoffquelle. Zu den mit Pfeilen gekennzeichneten Zeitpunkten wurden Proben für den anstehenden NtcA-Westernblot entnommen.

Anschließend wurden die Zellen in Zellaufbruchpuffer aufgenommen und mit Hilfe des Ribolysers aufgebrochen. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt und 25 µg Protein wurden jeweils auf ein 15 %-iges SDS-Gel geladen.

Das Gel wurde anschließend wie im Methodenteil beschrieben weiter bearbeitet. Als Membran wurde Nitrocellulose verwendet. Nach dem Transfer wurde der *blot* mit dem ersten Antikörper über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach gründlichem Waschen der *blot* für 2 Stunden mit dem 2. Antikörper versehen. Anschließend wurde die Membran in einer Chemilumineszenz-Lösung inkubiert und zum Entwickeln ein Film aufgelegt. In Abb. 5.11. ist das Ergebnis des *blots* abgebildet.

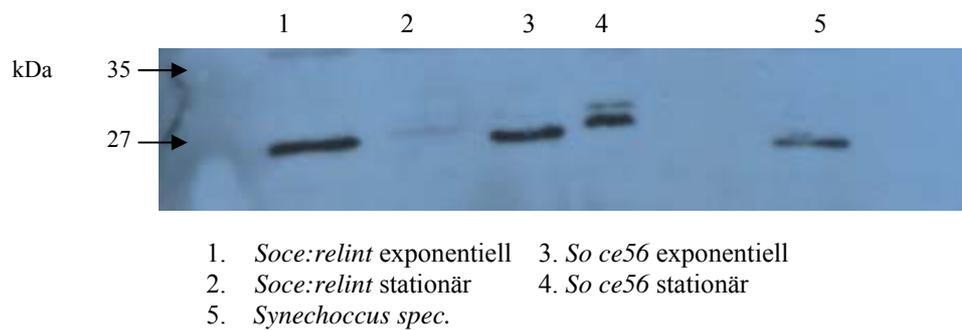


Abb. 5.11.: Western-Blot mit Extrakten von *So ce56* und *Soce:relint*. NtcA-Antikörper verdünnt 1:10.000

Betrachtet man zunächst den Wildtyp Extrakt (Spur 3 und 4) sind drei unterschiedliche Banden zu erkennen. Die niedrigste Bande sieht man nur im Extrakt der exponentiell gewachsenen Zellen (Spur 3). Spur 4 zeigt die zwei höher liegenden Banden. Auf diese Spur wurde Extrakt von stationär gewachsenen Wildtyp-Zellen aufgetragen. Spur 1 enthielt *Soce:relint* Extrakt aus exponentiell gewachsenen Kulturen. Hier erkennt man eine Proteinbande die in Größe und Qualität durchaus mit der Bande in Spur 3 zu vergleichen ist. Aus den Extrakten der stationär gewachsenen *Soce:relint* Zellen (Spur 2) konnte jedoch nur eine ganz geringe Menge des größeren Proteins nachgewiesen werden und die größte Proteinbande fehlt komplett. Diese Daten eröffnen zwei Möglichkeiten. Entweder existieren in *So ce56* mehrere NtcA-ähnliche Proteine, oder das eine NtcA-ähnliche Protein wird unterschiedlich modifiziert. Diese Modifikationen können das Laufverhalten des Proteins in SDS-Gel beeinflussen. Unter stationären Bedingungen sind im Wildtyp (Spur 4) zwei etwas höher liegende Banden erkennbar.

Daraufhin wurde das Genom von *So ce56* nach NtcA-ähnlichen Proteinen abgesucht. Diese Untersuchungen ergaben, dass neben dem annotierten NtcA-Protein (*sce_20050509_3515*) mit der Größe von 27 kDa, noch zwei weitere Proteine mit einer hohen Homologie zum NtcA-Protein von *Synechococcus* von einem *e-value* von $9e^{-20}$ (*sce_20050509_6642*; 28 kDa) und einem *e-value* von $2e^{-19}$ (*sce_20050509_91*; 26.1 kDa) vorhanden sind. Je niedriger ein *e-value* Ergebnis ist desto besser ist die Übereinstimmung zum gesuchten Protein. Je höher ein *e-value* Ergebnis ist desto schlechter ist die Übereinstimmung. Alle drei Proteine besitzen die identische Größe und variieren nur gering. Da mit Hilfe des Biotin/Streptavidin Affinitätssystems nur geringe Mengen des NtcA's (*sce_20050509_3515*) in *Soce:relint* identifiziert werden konnten, stellte sich somit die Frage, welches der drei durch den NtcA-Antikörper detektierten Proteine, diesem

Protein entspricht. Um zu überprüfen, welches der drei potentiellen Proteine, das NtcA-Protein *sce_20050509_3515* ist, sollte erneut eine Westernblot-Analyse durchgeführt werden. Als Kontrolle sollten sowohl eine *ntcA*-Mutante (*sce_20050509_3515*) von Dr. Shwan Rachid, sowie ein Proteinextrakt von *Synechococcus* dienen. Es war leider nicht möglich, dieses bis zum Ende der Arbeit durchzuführen.

5.5. Identifizierung potentieller DNA-Bindeproteine mit Hilfe der Heparinsäule

Mit Hilfe der Gesamtproteom-Analyse durch 2D-Gel Experimente konnten keine spezifischen Transkriptionsaktivatoren in *So ce56* und *Soce:relint* identifiziert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung spezifischer Transkriptionsaktivatoren war die Anreicherung potentieller DNA-Bindeproteine. Zur Isolierung der potentiellen DNA-Bindeproteine aus dem Gesamtproteinextrakt der Kulturen, wurde die Heparinsäule verwendet.

5.5.1. Heparinsäule mit SM-Mannose Extrakten

Die Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen Interaktion zweier Reaktionspartner z.B. Protein und Ligand. In unserem Fall diente Heparin als Ligand für potentielle DNA-Bindeproteine.

Die polyanionische Struktur des Heparins wirkt bei dieser Methode als ein DNA- bzw. RNA-Analog, und ermöglicht die Reinigung von Proteinen, die mit DNA und RNA interagieren. Polymerasen, Ligasen, Kinasen und ribosomale Proteine kann man z.B. mit dieser Methode erfolgreich reinigen.

Mit der Hilfe der Heparin-Affinitätschromatographie sollten potentielle DNA-Bindeproteine aus dem „Pool“ von Proteinen separiert werden. Dazu wurden die zwei Stämme *So ce56* und *Soce:relint* in jeweils 50 ml SM-Medium (+ Mannose) angezogen und bis zum Erreichen eines Klettwert von 230 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit der Hilfe des Ribolysers ein Proteinextrakt (4 ml) hergestellt.

Die Extrakte wurden mit dem Absorptionpuffer auf die identische Proteinkonzentration von 11,8 mg/ml eingestellt. Je 10 ml der verdünnten Extrakt-Mischung wurden auf die Säule geladen.

Die Abbildung 5.12. zeigt die Elutionsprofile von *So ce56* und *Soce:relint*. Es sind deutlich zwei Peaks zu erkennen. Bei dem Ersten handelt es sich um den Durchlaufpeak der Proteine enthält, die nicht an die Säule gebunden haben. Das Spülen der Säule mit Puffer B

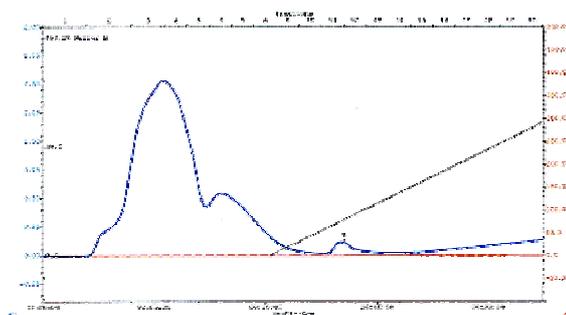
(50 mM Na-Phosphat pH 6,8 + 2 M NaCl + 1 mM Benzamidin) bewirkt die Elution der gebundenen Proteine. Die Elution der Proteine erfolgt bereits im Bereich von 200 – 400 mM Salz im Elutionspuffer. Nur ein sehr geringer Teil (< 5 %) der Gesamtproteine haben unter diesen Bedingungen an das Heparin gebunden. Die Elutionsfraktionen wurden einer Ammoniumsulfatfällung unterzogen und das entstandene Pellet wurde anschließend in 500 µl Phosphatpuffer pH 6,8 aufgenommen. 40 µg Protein wurden von jeder Probe auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen (Abb.5.13.).

Das Gel wurde anschließend mit Coomassie blau gefärbt. Einige der Proteinbanden konnten durch MALDI-TOF erfolgreich identifiziert werden (Tabelle 5.3.)

Tabelle.5.3.: Laufprotokoll

Laufprotokoll	Flussrate	Zeit (min)
Probeneinlauf	0,5 ml / min	20
Absorptionspuffer	1 ml/ min	40
Elution (2 M NaCl) Gradient (100 % A → 100 %B)	2 ml/ min	40
Fraktionssammler	2 ml pro Röhrchen	

1. Soce56 Elutionsprofil



2. Soce:relint Elutionsprofil

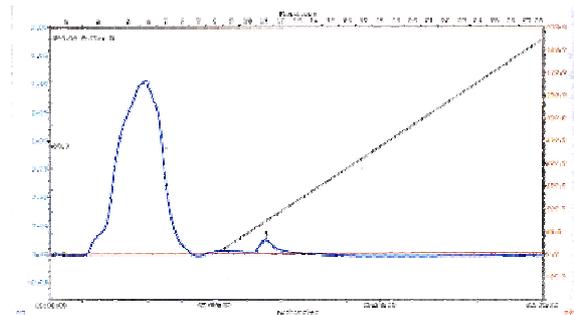


Abb. 5.12.: Elutionsprofile der Heparinsäule

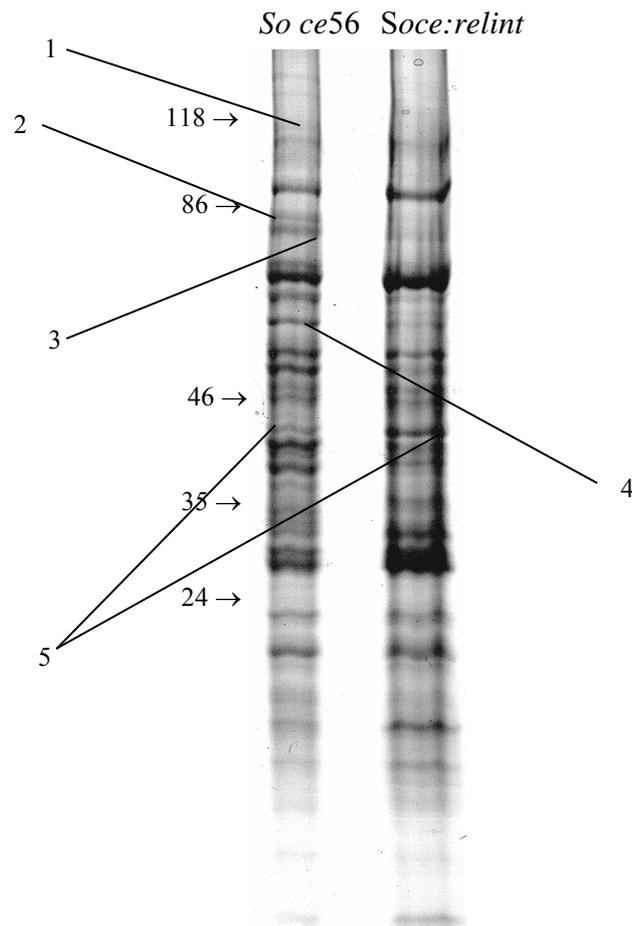


Abb. 5.13.: potentielle DNA-Bindeproteine, die mit Hilfe der Heparinsäule aus dem Gesamtproteinextrakt eluiert werden konnten. Das 12 % ige SDS-Gel mit potentiellen DNA- Bindeproteinen von *So ce56* und *Soce:relint* wurde Coomassie gefärbt. Die nummerierten Proteinbanden wurden mit Hilfe von MALDI-TOF Analysen identifiziert.

Die mit Nummer markierten Proteinbanden wurden zu MALDI-TOF Analysen nach Bielefeld geschickt. Die identifizierten Proteine wurden in Tabelle 5.4. zusammengefasst.

Tabelle 5.4. :Analyse der Proteine nach MALDI-TOF; Regulierung der Proteine im Wildtyp und in *Soce:relint*

Bande Nr.	Protein	Masse des Genprodukts (kDa)	sce_Nummern	<i>So ce56</i>	<i>Soce:relint</i>
1	RpoB, DNA RNA Polymerase	155,0	sce_040811_443	*	
2	GyrA DNA Gyrase, A Untereinheit	98,28	sce_040811_3483	*	
3	PolA, DNA Polymerase I	96,14	sce_040811_7995	*	
4	Serine-Theronin- Proteinkinase (pknH)	64,58	sce_040811_859	*	
5	Rho, Transkriptions- terminations-Faktor	46,62	sce_040811_7308	*	*

Es konnten mit Hilfe der Heparinsäule viele DNA-Bindeproteine isoliert werden. Das Proteinmuster zeigt uns zahlreiche Unterschiede zwischen den Proben von *So ce56* und *Soce:relint*. Es war jedoch nicht möglich, alle Proteine zu identifizieren. Dies liegt zum einen an der unvollständigen Annotierung des Genoms und zum anderen an der nicht ausreichenden Separierung der Proteine durch ein eindimensionales Gel. Das wichtigste Ergebnis dieser Analyse war die Identifizierung einer Serin/Threonin-Proteinkinase im Wildtyp (4). Dieses Protein ist deutlich in der Probe des Wildtyps zu erkennen und nur schwach in der Probe der *Soce:relint* Mutante.

5.5.2. Heparinsäule mit SM-Kulturen und unterschiedlichen Kohlenstoffquellen

Die ersten Versuche mit der Heparinsäule wurden mit Kulturen unternommen, die als Kohlenstoffquelle Mannose enthielten. Es wurde Mannose verwendet, da es sich hierbei um eine Kohlenstoffquelle handelt, die in *S. cellulosum* die höchste Produktion von den Sekundärmetaboliten Chivosazol A und Etnangien fördert. Die Abb. 5.14. zeigt die unterschiedlichen Produktionsraten von Chivosazol A und Etnangien in Anwesenheit von verschiedenen Kohlenstoffquellen.

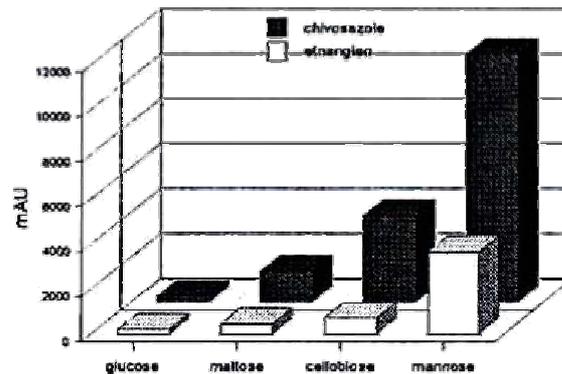


Abb.5.14.: Produktion von Chivosazol A und Etnangien in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle, (Müller *et al.*, accepted)

Die Zugabe von unterschiedlichen Kohlenstoffen bewirkt, wie in der Grafik verdeutlicht wird, eine unterschiedlich hohe Produktion der Sekundärmetabolite. Zur Überprüfung ob die Pkn859-Kinase auch in Kulturen mit Glucose und Cellobiose als Kohlenstoffquellen identifiziert werden kann, wurden weitere Versuche an der Heparinsäule unternommen. Die Stämme *So ce56* und *Soce:relint* wurden daher auch in SM-Kulturen mit den unterschiedlichen Kohlenstoff-Quellen Glukose und Cellobiose kultiviert. Die Kulturen wurden beim gleichen Klettwert wie zuvor geerntet und weiter aufbereitet.

Es wurde die gleiche Menge Protein auf die Säule gegeben und die entstandenen Elutionspeaks wurden, wie im Versuch zuvor, mit Ammoniumsulfat gefällt und auf einem 12 % SDS Gel analysiert.

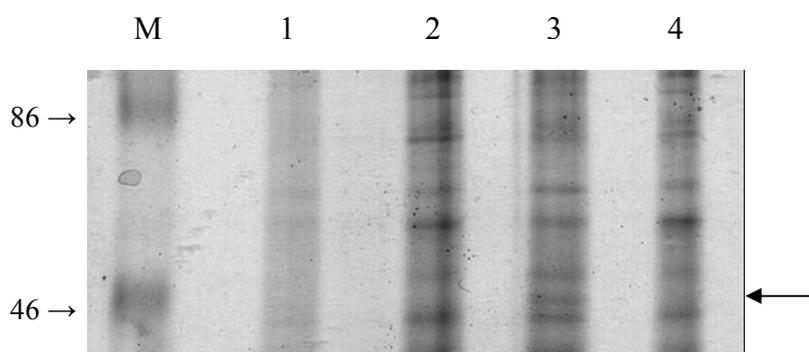


Abb.5.15.: Analyse von DNA-Bindeproteinen mit Hilfe eines 12 %igen SDS-Gels. Fraktionen wurden zuvor Ammoniumsulfat gefällt. 40 µg Protein wurden pro Spur aufgetragen.

Aus den Zellen, die mit Glukose und Cellobiose kultiviert wurden, konnte Pkn859 nicht in dem Pool der potentiellen DNA bindenden Proteine nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass Pkn859 nur beim Wachstum mit Mannose als Kohlenstoffquelle stärker im Wildtyp akkumuliert bzw. so modifiziert wird, dass es an die Heparinsäule bindet. Ein Wachstumsversuch mit allen vier C-Quellen (Abb. 5.16./Anhang) zeigte keine signifikanten Wachstumsunterschiede zwischen dem Wildtyp und der *Soce:relint* Mutante.

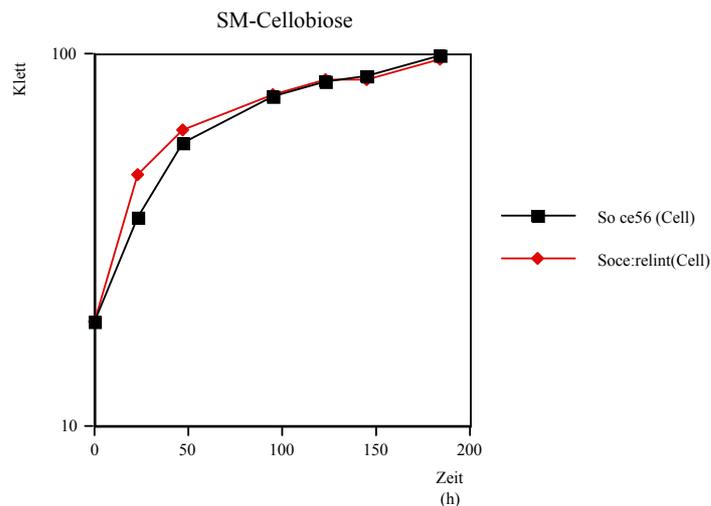


Abb. 5.16.: Wachstumskurve von Kulturen in SM-Medium mit Cellobiose als Kohlenstoffquelle. Wachstumsversuche mit anderen Kohlenstoffquellen zeigten keinen Unterschied (siehe Anhang).

Die Versuche zeigten, dass die unterschiedlichen Kohlenstoffquellen keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen haben. Trotz allem zeigten Mannose umsetzende Zellen eine gesteigerte Sekundärmetabolit-Produktion. Es ist also nicht auszuschließen, dass die spezifische Akkumulation von Pkn859 in dem Pool der potentiellen DNA bindenden Proteinen von physiologischer Relevanz für die Zellen in Bezug auf die morphologische und/oder physiologische Differenzierung ist.

6. Ergebnisse Teil III:

Konstruktion und Charakterisierung einer Serin-Threonin-Kinase Mutante (*pkn859*) in *So ce56*

Proteinkinasen sind Enzyme, die den Transfer einer Phosphatgruppe von einem Donor (meist ATP) auf einen Aminosäurerest von Proteinen katalysieren. Der Mechanismus der Proteinphosphorylierung wird in der Signaltransduktion genutzt. Die Phosphorylierung

von Proteinen ist die wichtigste Proteinmodifikation innerhalb von Signaltransduktionssystemen. Die eukaryotische Signaltransduktion basiert im Wesentlichen auf Protein-Phosphorylierungs-Kaskaden an Ser/Thr- oder Tyrosphosphorylierten Proteinen (Edelmann *et al.*, 1987). Enzyme, die diesen Vorgang katalysieren, bezeichnet man als Proteinkinasen und Proteinphosphatasen. Das Zusammenspiel von Protein-Phosphorylierung durch Proteinkinasen und Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen dient der Regulation vieler wichtiger Zellprozesse (Hunter, 1995).

So ce56 besitzt ca. 300 Serin/Threonin Kinasen. Mit Hilfe der Heparinsäule konnte eine Serin/Threonin Kinase in *So ce56* identifiziert werden, die unter den gegebenen Bedingungen in dem Extrakt der *Socce:relint* Mutante nicht gefunden wurde. Eine genauere Betrachtung zeigte, dass diese Serin/Threonin-Kinase (Pkn859) keine der bekannten DNA-Bindedomänen besitzt. Das Protein besteht aus 583 Aminosäuren. Am N-Terminus befindet sich die stark konservierte Proteinkinase-Domäne. Der C-Terminus zeigt eine Homologie zu einer *t-snare* Domäne, die man aus eukaryotischen Proteinen kennt. Generell zeigt Pkn859 höchste Homologie über die gesamte Länge des Proteins zu verschiedenen eukaryotischen ribosomalen Protein S6-Kinasen ($4e^{-108}$) oder zu Rho-assoziierten, „*coiled-coil*“ Protein Kinasen ($5e^{-105}$). Um zu prüfen, ob diese Kinase ein wichtiges Protein in Bezug auf die morphologische und/oder physiologische Differenzierung darstellt, wurde eine Insertionsmutation in *pkn859* durchgeführt. Die konstruierte Mutante wurde anschließend charakterisiert.

6.1. Klonierung und Identifizierung des Konjugationsplasmids pSupHyg:pkn859

6.1.1. Isolierung und Sequenzierung des *pkn859*-Fragments

Das interne *pkn859*-Fragment konnte aus der chromosomalen DNA von *So ce56* mittels PCR amplifiziert werden. Hierzu wurden die *primer* pknHint+ und pknHint- verwendet.

Das 877 bp amplifizierte interne Stück des *pkn859*-Gens (siehe Anhang) wurde anschließend in den Vektor *Topo-Vektor*[®] kloniert.

Der Vektor ist Bestandteil des *Zero Blunt*[®] *TOPO*[®] *PCR Cloning Kits* der Firma Invitrogen und eignet sich für eine Klonierung von *blunt end* PCR-Produkten. Potentielle Klone wuchsen auf LB-Platten mit Kanamycin.

Im nächsten Schritt wurden die potentiellen Klone per PCR mit den *primern* pknHint+ und pknHint- überprüft. Die Plasmid DNA der potentiellen Kandidaten wurde zur

vollständigen Überprüfung sowohl einem Testverdau unterzogen, als auch zur Sequenzierung abgegeben. Sowohl das Sequenzierergebnis, als auch die Testverdaus identifizierten einen richtigen *Topo:pkn859* Klon.

6.1.2 Klonierung des Konjugationsplasmids *pSupHyg:pkn859*

Aus dem *Topo:pkn859*-Plasmid wurde mit Hilfe der Enzyme *Bam*HI und *Nru*I das interne Stück von *pkn859* ausgeschnitten. Das interne Stück des *pkn859*-Gens wurde in den zuvor mit *Nru*I und *Bam*HI verdauten *pSupHyg*-Vektor ligiert. Die nach der Transformation in *E.coli* DH5 α erhaltenen Plasmide wurden mit Hilfe von PCR und Testrestriktionen überprüft und anschließend sequenziert. Es konnte ein richtiger *pSupHyg:pkn859* Klon identifiziert werden.

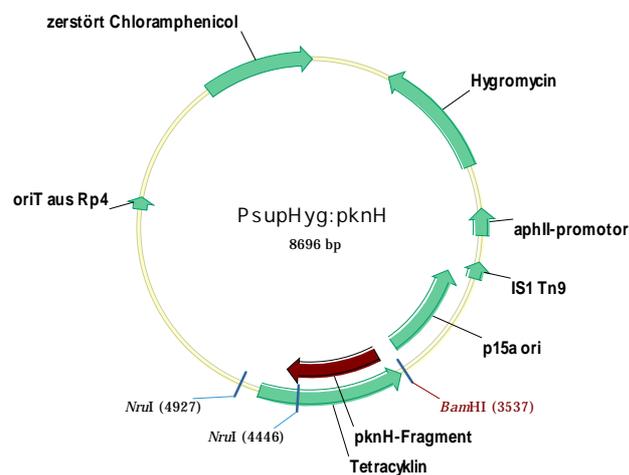


Abb. 6.1. : Konjugationsvektor mit dem internen Fragment von *pkn859*

6.1.3. Konjugation in *So ce56*

Die Konjugation dient zur Übertragung von DNA über eine Cytoplasmabrücke von einer Donorzelle auf eine Empfängerzelle. Hierzu wurden konjugative Plasmide verwendet. Um eine Konjugation in *So ce56* vorzunehmen, wurde das konstruierte *pSupHyg:pkn859* Plasmid in den *E.coli* Stamm S17-1 transformiert. Mit Hilfe von S17-1 kann die Konjugation auf die Empfängerzelle durchgeführt werden.

Es wurde eine biparentale Konjugation in den Stamm *So ce56* vorgenommen. Nach 10 Tagen Inkubation konnten die ersten potentiellen Mutanten von der Konjugationsplatte gepickt werden. Zur weiteren Analyse wurde ein Klon in nährstoffreichem Medium angeimpft, die chromosomale DNA isoliert und anschließend durch PCR überprüft. Hierzu wurden die internen *primer* *pknHint+* und *pknHint-*, sowie der *upstream* liegende *primer*

pknHstart und der *downstream* liegende primer pknHstop verwendet. Abb. 6.2. verdeutlicht die Position der primer im *pkn859*-Gen.

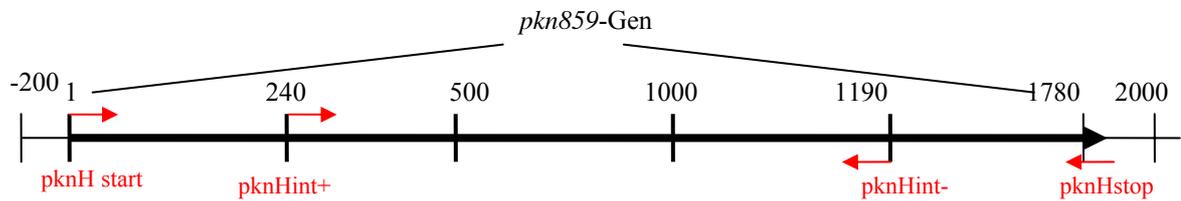
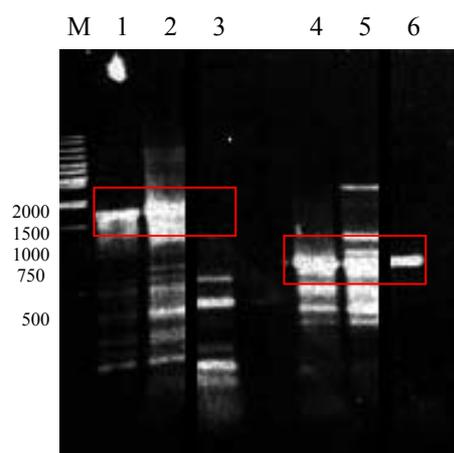


Abb. 6.2.: Grafik des *pkn859*-Gens und die Position der *primer*

Tabelle: 6.1.: *primer*-Kombinationen und erwartete Bandengröße

Primer		<i>So ce56</i>	<i>Soce:pkn859</i>	<i>Soce:relint</i> (Kontrolle)
pknHint- und pknHint+		890 bp	890 bp	890 bp
pknHstart und pknHstop		1788 bp	-	1788 bp

Die verschiedenen PCR-Ansätze wurden über eine elektrophoretische Auftrennung auf einem 1% Agarosegel analysiert (Abb.6.3.)



1. *So ce56*: pknHstart + pknHstop
2. *Soce:relint*: pknHstart + pknHstop
3. *Soce:pkn859*: pknHstart + pknHstop
4. *So ce56*: pknHint+ + pknHint⁻
5. *Soce:relint*: pknHint+ + pknHint⁻
6. *Soce:pkn859*: pknHint+ + pknHint⁻

Abb. 6.3.: 1 %iges Agarosegel der PCR-Analyse der potentiellen Pkn859-Mutanten in *So ce56*. Als Marker wurde der 1 kb DNA *ladder* von Fermentas verwendet.

Leider wurden mit der PCR-Analyse neben den erwarteten PCR-Banden auch unspezifische Banden amplifiziert. Die erwarteten Banden wurden mit einem roten Kästchen hervorgehoben. Die *primer*-Paarung *pknHstart* und *pknHstop* zeigte im Wildtyp das erwartete Fragment von 1788 bp (1). Dieses Fragment konnte in der stringenten Mutante auch amplifiziert werden (2), jedoch nicht in der potentiellen *Soce:pkn859* Mutante (3). Des Weiteren wurden Kontrollen unternommen, die auch mit chromosomaler DNA der Mutante eine Amplifikation erlauben sollten. Die Kombination *pknHint+* und *pknHint-* sollte sowohl im Wildtyp (4), in *Soce:relint* (5) als auch in der *Soce:pkn859* (6) Mutante ein 980 bp großes Fragment erzeugen. Das erwartete Fragment konnte in allen Proben amplifiziert werden.

6.2. Untersuchung des Phänotyps von *Soce:pkn859*

Das Ziel der folgenden Analysen war es, den Phänotyp der *Soce:pkn859* Mutante mit dem des Wildtyps zu vergleichen. Hierfür wurden die üblichen Standardversuche zur Überprüfung einer Mutante unternommen.

6.2.1 Wachstumsversuch

In diesem Versuch wurden die Stämme *So ce56* und *Soce:pkn859* in einem Komplexmedium angeimpft. Bei diesem Medium handelt es sich um das M-Medium, welches alle nötigen Substanzen zum Wachstum von *So ce56* beinhaltet. Der Versuch wurde in Klettwerten verfolgt und insgesamt dreimal wiederholt.

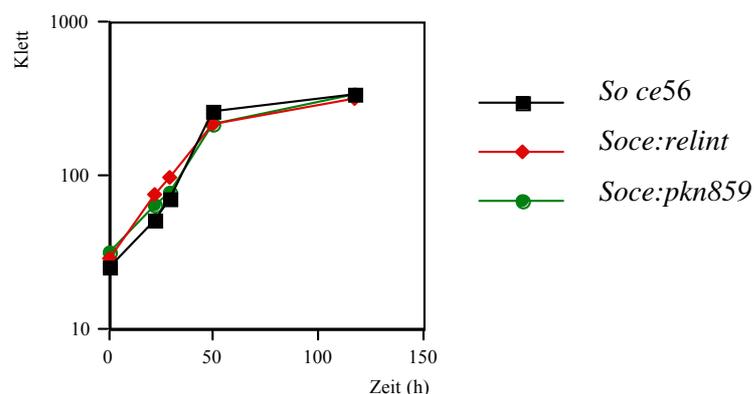


Abb. 6.4.: Wachstumsversuch von *So ce56* und *Soce:pkn859* in Komplexmedium

Tabelle 6.2.: Zusammenfassung der maximalen Verdopplungszeit (in Stunden). Bestimmt in Klett

Medium	So ce56	Soce:pkn859	Soce:relint
M-Medium	14 +/- 3	15 +/- 1	16,5 +/- 3

Das Wachstumsverhalten der drei Stämme ist in Abb. 6.4. dargestellt. *So ce56* zeigt im Vergleich zur *Soce:pkn859* Mutante keinen signifikanten Unterschied im Wachstum. Dies wird durch die errechnete Verdopplungszeit bestätigt, die ebenfalls keinen signifikanten Wachstumsdefekt beim Wachsen im Komplexmedium zeigt.

Die Wachstumsversuche in SM-, Elektroporation- und Produktions-Medium zeigten im Vergleich zum M-Medium keinen Unterschied und werden dementsprechend nicht gezeigt.

6.2.2. Aggregationsversuch

Wie zu Beginn erwähnt, findet man zahlreiche Hinweise in der Literatur, die besagen, dass das Zusammenspiel von Protein-Phosphorylierung durch Proteinkinasen und Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen der Regulation vieler wichtiger Zellprozesse (Hunter, 1995) dient. Zudem ist zu erwähnen, dass viele Ser/Thr- Kinasen in dem mit *S. cellulosum* verwandten *M. xanthus* an der Regulation der Differenzierung beteiligt sind (Jain *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1996). In der Gruppe der *Streptomyceten* besitzen Ser/Thr-Kinasen sowohl einen regulatorischen Einfluss auf die morphologische als auch auf die physiologische Differenzierung (Petrickova, *et al.*, 2003; Umeyama, *et al.*, 2002). Um herauszufinden, ob die Kinase Pkn859 auch in *S. cellulosum* einen Einfluss auf die morphologische Differenzierung hat, wurde *So ce56* und *Soce:pkn859* auf eine OD_{600nm} von 4 in M-Medium angezogen und anschließend auf OD_{600nm} von 25 hochkonzentriert. 50 µl der hochkonzentrierten Suspensionen wurden anschließend in 12er-Mikrotestplatten (Cellstar, Greiner) getropft, die 3 ml P-Diff-Agar enthielten.

Bereits nach 2 Tagen Inkubation bei 32°C ließ sich ein Unterschied zwischen *So ce56* und *Soce:pkn859* erkennen.

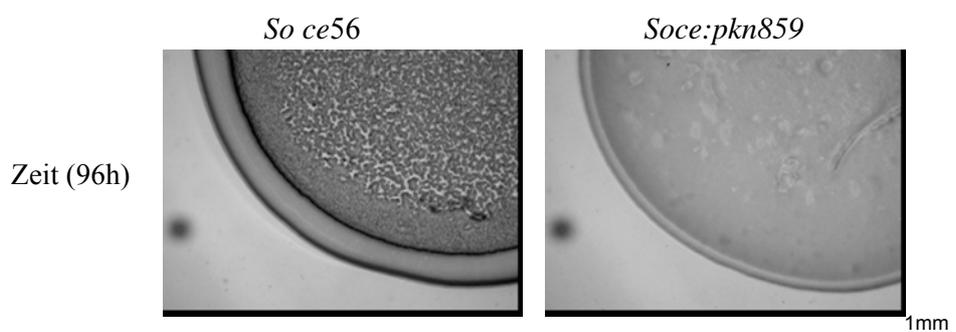


Abb. 6.5.: Differenzierungsassay auf P-Diff: 50µl Spots mit einer OD₆₀₀ von 25

Anhand der Abb. 6.5. ist zu sehen, dass *Soce:pkn859* einen Defekt in der Differenzierung aufweist. Sie ist nicht in der Lage, zu aggregieren und Fruchtkörper zu bilden. Der Wildtyp hingegen vervollständigt seine Differenzierung nach 96 h. Auch nach längerer Inkubation fand keine Fruchtkörperbildung in der *pkn859*-Mutante statt.

6.2.3. Physiologische Differenzierung (*in vivo*)

Ob die Ser/Thr-Kinase Pkn859 eine Rolle in der physiologischen Differenzierung von *So ce56* spielt, sollte mit Hilfe des *Bioassay*-Experiments überprüft werden.

Hierzu wurden die zwei Stämme *So ce56* und *Soce:pkn859* wie zuvor eingehend beschrieben, angezogen und bearbeitet. Die Lysate wurden anschließend auf eine Platte mit *Micrococcus luteus* (Etnangien-sensitiv) bzw. *Hansenula anomala* (Chivosazol A-sensitiv) getropft und bei 32°C inkubiert.

Die Bildung der Hemmhöfe diente als qualitativer Nachweis der Sekundärmetabolit-Produktion.

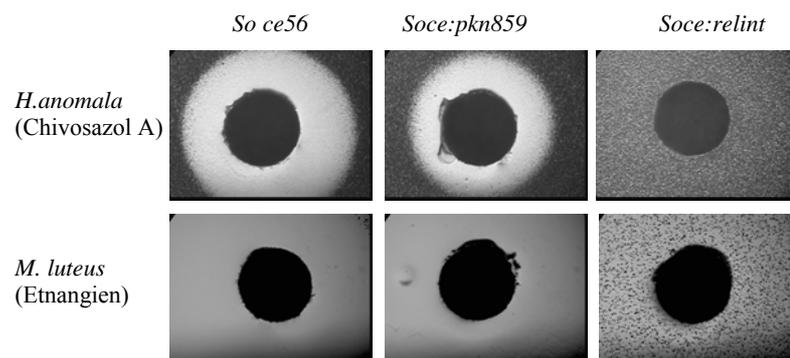


Abb.6.6.: Hemmhof-Bildung des Wildtyps *So ce56* im Vergleich zu der *Soce:pkn859* Mutante. *Soce:relint* diente als Kontrolle. Es wurden im Chivosazol A-Versuch jeweils 1µl Extrakt und im Etnangien-Versuch 3µl Extrakt eingesetzt

Abb. 6.6. zeigt das Ergebnis des *Bioassay*-Experiments. Als Positivkontrolle diente der Extrakt von *So ce56*. Der Extrakt konnte eine deutliche Hemmhof-Bildung bei *H. anomala* (Chivosazol A) und bei *M. luteus* (Etnangien) hervorrufen. Als Negativkontrolle diente der Extrakt von *Soce:relint*. Dieser bewirkt, wie zuvor schon einmal erwähnt, weder eine Hemmhof-Bildung bei *H. anomala* (Chivosazol A) noch bei *M. luteus* (Etnangien). Betrachtet man somit die Mutante *Soce:pkn859* ist ersichtlich, dass diese Serin/Threonin-Kinase-Mutante keinen Defekt in der Sekundärmetabolit-Produktion besitzt. Der Extrakt von *Soce:pkn859* bewirkt sowohl eine Hemmhof-Bildung bei *M. luteus*, sowie bei *H. anomala*. Das Resultat dieses Experiments zeigt, dass diese Ser/Thr-Kinase nicht oder nur minimal in der Regulation der physiologischen Differenzierung von *So ce56* involviert ist.

6.3. *Soce:relint* produziert hohe mRNA-Level des *pkn859*-Gens

Die Ser/Thr-Kinase Pkn859 wurde bei der Identifizierung potentieller DNA-Bindeproteine entdeckt. Die dazu konstruierte Insertionsmutante zeigte, dass Pkn859 zwar in die Regulation der morphologischen Differenzierung jedoch nicht in der physiologischen Differenzierung involviert ist. Pkn859 wurde mit Hilfe der Heparinsäule, in wiederholten Versuchen, (viermal) nur in *So ce56* gefunden. *Soce:relint* zeigte dieses Protein nicht. Es stellte sich somit die Frage, ob das *pkn859*-Gen von *Soce:relint* transkribiert wird. Um diese Frage zu beantworten, wurden Real-Time RT-PCR Analysen angefertigt. Verwendet wurden die internen *primer* von *pkn859*: *pknHint-* und *pknHint+*.

Es wurde RNA von 2 Differenzierungszeitpunkten 0 und 3 Stunden verwendet.

Das Ergebnis der Real-Time RT-PCR ist in Abb. 6.8. dargestellt. Zur Normalisierung wurde 16S rRNA verwendet. Dieser Versuch wurde dreimal wiederholt und der Mittelwert aller Ergebnisse wurde in die Grafik eingetragen.

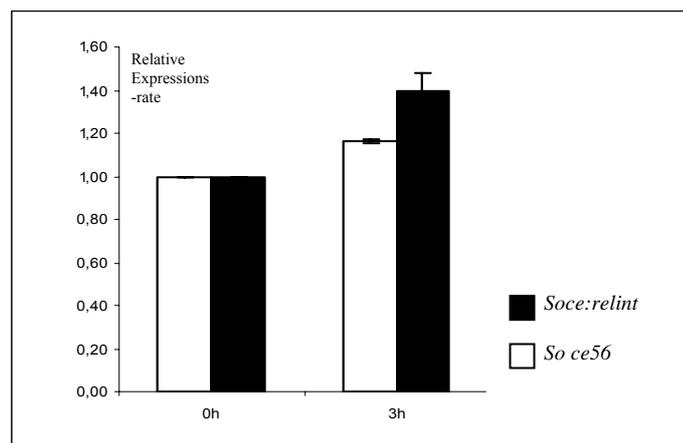


Abb. 6.7.: Real-Time RT-PCR Analyse: relative *pkn859*-Gen-Expression nach Aktivierung der stringenten Kontrolle durch Differenzierung; Expressionslevel von *So ce56* wurden durch weiße Balken sichtbar gemacht, die relative Expression von *Soce:relint* ist in schwarz erkenntlich

Die Abbildung 6.7. zeigt, dass *Soce:relint* keinen Defekt im transkribieren von *pkn859* besitzt. Zudem wird deutlich das Pkn859 unter Differenzierungsbedingungen leicht verstärkte mRNA Level aufweist. Es ist eine leichte Steigung der mRNA-Level sowohl im Wildtyp als auch in der stringenten Mutante ersichtlich.

6.4. Identifikation von Phosphoproteinen in *So ce56* und *Soce:pkn859*

Wie zuvor schon erwähnt, basiert die Signaltransduktion im Wesentlichen auf Protein-Phosphorylierungs-Kaskaden und reversiblen Phosphorylierungs-Prozessen an Ser/Thr- oder Tyr-phosphorylierten Proteinen (Edelman *et al.*, 1987). Enzyme, die diesen Vorgang

katalysieren, werden als Proteinkinasen bzw. Proteinphosphatasen bezeichnet. Somit kommt es durch Proteinkinasen zur Phosphorylierung von Proteinen, wohingegen die Dephosphorylierung der Proteine durch eine entsprechende Proteinphosphatase katalysiert werden kann. Ist aber eine Ser/Thr-Kinase defekt, sollte somit eine Phosphorylierung der spezifischen Substrate unterbleiben. Um eventuelle Unterschiede im Phosphorylierungsmuster zwischen *So ce56* und *Soce:pkn859* zu analysieren, wurden phosphorylierte Proteine mit Hilfe von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP kenntlich gemacht. Proteinkinasen werden selbst auch oft durch Phosphorylierung aktiviert, wodurch komplexe Proteinkinase-Kaskaden in den Zellen entstehen. Eine solche Kaskade wurde gerade in *M. xanthus* identifiziert (Nariya, *et al.*, 2005).

Für diesen Versuch wurden die Stämme *So ce56* und *Soce:pkn859* verwendet. Die Stämme wurden in SM-Medium (+ Mannose) angezogen und bei einem Klettwert von 60 geerntet. Die Hälfte der Kultur wurde anschließend für 2 h in SM-Diff-Medium geschüttelt. Dies diente zur Initiation der Differenzierung.

Die Zellen wurden anschließend geerntet und von allen Proben wurde ein Proteinextrakt vorbereitet.

Es wurde von jeder Probe 60 μg Protein mit jeweils 8,57 μCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP für 45 min bei RT markiert. Anschließend wurden die Extrakte mit Aceton gefällt. Die gewonnenen Präzipitate wurden in 1x SDS-Auftragspuffer aufgenommen und auf ein 12 %iges Gel geladen.

Zur anschließenden Identifizierung der phosphorylierten Proteine wurde ein *Phosphoimagerscreen* auf das getrocknete Gel gelegt. Zur Kontrolle wurde ein identisches Gel mit unmarkierten Extrakten geladen. Dieses Gel sollte als Kontrolle der geladenen Proteinmengen dienen. Des Weiteren wurden hier einzelne Proteinbanden für MALDI-TOF Untersuchungen ausgeschnitten und nach Saarbrücken gesendet.

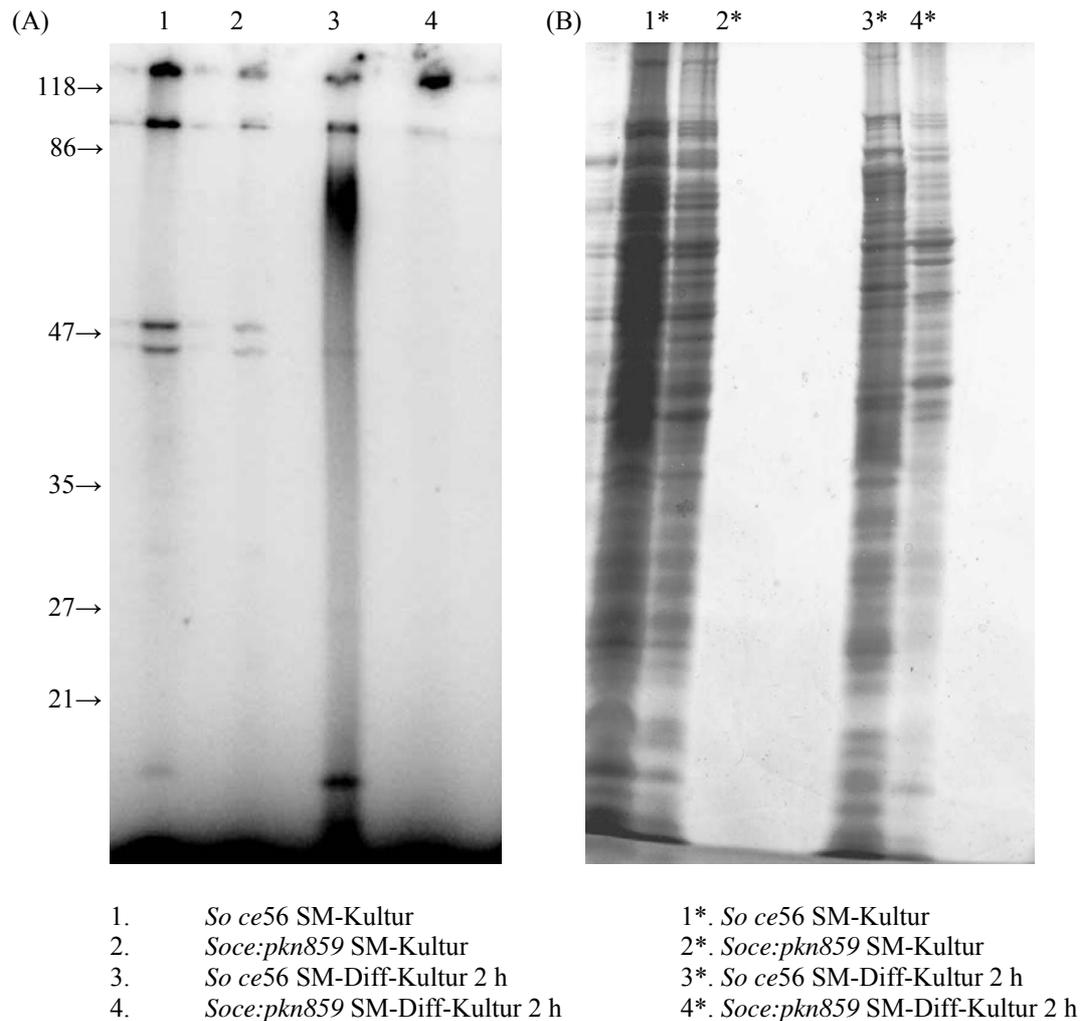


Abb.6.8.: es sind zwei 12 %ige SDS-Gele abgebildet. (A) *Phosphoimagerscreens*: ^{32}P - γ^{ATP} markierte Proteinextrakte, (60 μg Protein pro Spur aufgetragen) (Spur 1-4). (B) Unmarkierte Proteinextrakte (60 μg Protein pro Spur) und anschließend Silber gefärbt (Spur 1*-4*).

Abb. 6.8. (A) zeigt das Ergebnis des *Phosphoimagerscreens*, nach Exposition von 5 Tagen (Spur 1-4) und das dazu gehörige Silbergel (B) (Spur 1*-4*). Spur 1 des *Phosphoimagerscreens*, zeigt den Wildtyp Extrakt. Spur 2 zeigt *Soce:pkn859* Extrakt. Die Proben zeigen ein relativ ähnliches Proteinmuster. Jedoch fehlt in den Spuren 2 und 4 des *Phosphoimagerscreens* mit *Soce:pkn859* Extrakten die untere kleine Bande. Spur 3 und 4 zeigen die Extrakte von *So ce56* und *Soce:pkn859* Zellen nach zweistündiger Inkubation in SM-Diff-Medium. Zusätzlich sieht man in den Spuren 1-3 des *Phosphoimagerscreens* zwei Banden mit einer Größe von ca. 49 und 52 kDa. Wobei sie in Spur 3 etwas abgeschwächt zu erkennen sind. In Spur 4 (*Soce:pkn859* 2 h SM-Diff) fehlen sie komplett. Prinzipiell ist zu sagen, dass das radioaktive Gel bei längerer Exposition noch zahlreiche

schwache Banden im Hintergrund zeigte, die oftmals identisch in den Extrakten des Wildtyps und der Mutante zu sehen waren.

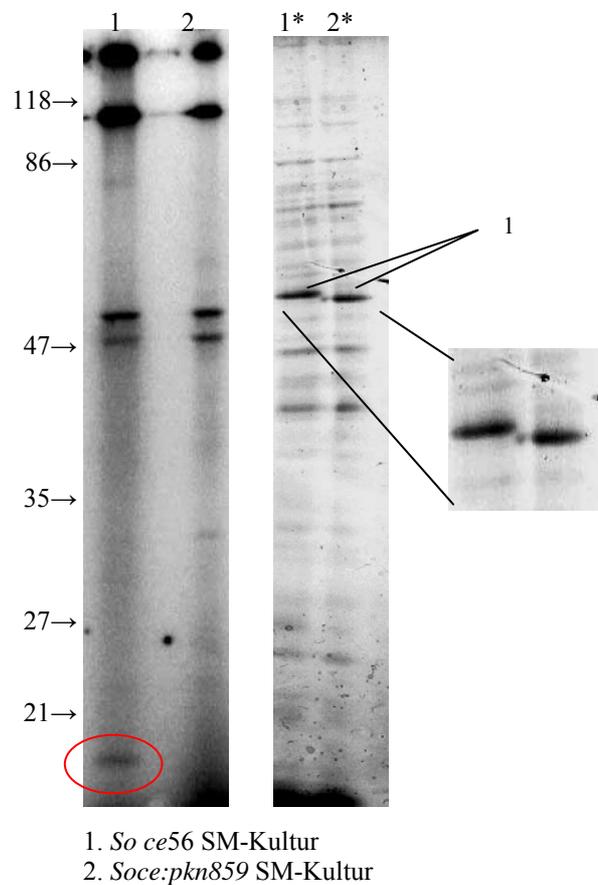


Abb. 6.9.: 12 %iges SDS-Gel mit *So ce56* (Nr. 1 und 1*) und *Soce:pkn859* (Nr. 2 und 2*). Nr. 1 und 2 zeigen das Ergebnis radioaktiv markierter Extrakte. Nr. 1* und 2* zeigen das dazu gehörige Silbergel.

Die Betrachtung der Spuren 1* und 2* zeigte eine interessante Proteinbande (1) mit unterschiedlichem Laufverhalten. Es handelt sich dabei nicht um die in 1 und 2 abgebildeten Banden. Da die Quantität recht identisch erschien, und auch sonst die Spuren 1* und 2* recht vergleichbar erschienen, wurden diese Banden durch MALDI-TOF-Analyse identifiziert.

Tabelle 6.3. : Analyse der Proteine nach MALDI-TOF; Regulierung der Proteine im Wildtyp und in *Soce:pkn859*

Bande Nr.	Protein	Errechnete Masse des Genprodukts (kDa)	sce-Nummer	<i>So ce56</i>	<i>Soce:pkn859</i>
1	Glutamin Synthetase I	52,14	Sce_20050509_6663	*	*

Das Ergebnis der MALDI-TOF-Analysen wurde in Tabelle 6.3. zusammengefasst. Es konnte mit Hilfe der MALDI-TOF-Analysen eine Glutaminsynthetase I (Nr.1) sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante identifiziert werden. Bei der Glutaminsynthetase handelt es sich um ein Schlüsselenzym im Stickstoffwechsel. Sie katalysiert die ATP-abhängige Synthese von Glutamin aus Glutamat und NH_4^+ , wobei ATP verbraucht und $\text{ADP} + \text{P}_i$ freigesetzt wird. Die Bande der identifizierten Glutaminsynthetase I in *So ce56* besitzt eine größere molekulare Masse als die identifizierte Bande in der Mutante. Verdeutlicht wird dieses durch das Silbergel, in der ein unterschiedliches Laufverhalten der beiden Banden zu erkennen ist. Dieses unterschiedliche Laufverhalten könnte auf eine Proteinmodifikation zurückzuführen sein. Eine bekannte Proteinmodifikation beider Glutaminsynthetasen in *E. coli*, (GS) ist die Adenylierung (Senior, 1975). Eine Adenylierung führt bei anderen Organismen zur Reprimierung der GS-Aktivität. Um zu überprüfen, ob in *Soce:pkn859* eventuell die GS weniger adenyliert ist, wurde ein GS-Aktivitätstest unternommen.

Zudem konnte neben den identifizierten Proteinen in Abbildung 6.11. ein zusätzliches Protein analysiert werden, welches durch einen roten Kreis gekennzeichnet ist. Es handelt sich um ein Protein, das im phosphorylierten Zustand vorliegt. Dieses Protein konnte nur im Wildtyp identifiziert werden. Mit einer molekularen Masse von ungefähr 12 kDa, könnte es sich um das PII-Protein handeln.

6.4.1. Glutaminsynthetase-Test

Die Stickstoffassimilation unterliegt wie alle Stoffwechselprozesse der Zelle einer genauen Kontrolle. Ein wesentlicher Faktor ist hierbei die verfügbare Stickstoffquelle. Ammonium ist der bevorzugte Stickstofflieferant, da es die energetisch günstigste Stickstoffverbindung für die Zelle darstellt. Durch die Assimilation von Ammonium wird die Verwertung alternativer Stickstoffquellen wie Nitrat und Nitrit unterdrückt. Diese Regulation erfolgt sowohl auf transkriptionaler als auch auf posttranslationaler Ebene.

Eine Schlüsselrolle in der Koordination des Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus spielen Signalproteine der PII-Familie. Am besten untersucht ist das PII-System in *E. coli*. Es reguliert die Aktivität der Glutaminsynthetase (Ninfa und Atkinson, 2000; Ninfa und Jiang, 2005). Die Regulation der Glutaminsynthetase-Aktivität beinhaltet eine komplexe Kaskade von Vorgängen. Diese Regulation kann einerseits auf einer transkriptionellen Ebene aber auch durch Enzymmodifikation erfolgen. Die Glutaminsynthetase (GS) wird durch die Enzymmodifikation der Adenylierung bzw. der Deadenylierung reguliert.

Die GS setzt sich aus 12 Untereinheiten zusammen, die je zwei Sechsringe bilden. An jeder ihrer 12 Untereinheiten ist Platz für die Bindung eines AMP. Je mehr AMP gebunden ist, desto mehr wird die Aktivität der GS heruntergeregelt. Die Adenylylierung der GS wird, in *E. coli*, durch die Adenyltransferase GlnE und das PII-Protein (codiert durch *glnB*) reguliert. Die adenylylierte GS ist inaktiv. Für die Deadenylierung wird ebenfalls GlnE benötigt, diesmal jedoch in Zusammenarbeit mit einem uridylyliert vorliegenden PII-Protein.

Das Genom von *So ce56* kodiert sowohl eine Glutaminsynthetase GS (*sce_20050509_6663*), eine Adenyltransferase GlnE (*sce_20050509_1696*), eine Uridylyltransferase GlnD (*sce_20050509_2942*) und ein PII-Protein, GlnB (*sce_2005050509_6664*).

Daher lag der Verdacht nahe, dass das unterschiedliche Laufverhalten des identifizierten GlnA Proteins im Wildtyp und der Mutante, auf eine Adenylylierung zurückzuführen ist. Auszuschließen ist auch nicht, dass die Proteine unterschiedlich phosphoryliert vorliegen, da das *glnA* Gen zusammen mit *glnB* (kodiert PII) und einer Serin/Threonin-Proteinkinase in einem potentiellen Operon organisiert sind. Im ersten Falle sollte die Aktivität des Enzyms im Wildtyp erniedrigt sein, da die Adenylylierung in der Regel mit einer Aktivitätsreduktion einhergeht.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein Glutaminsynthetase Test durchgeführt. Hierzu wurden aus Zellen der späten exponentiellen Phase je zwei Proteinextrakte vom Wildtyp und der Mutante hergestellt. Die Stämme wurden in SM-Medium mit Mannose als Kohlenstoffquelle angezogen. Für den Test wurden jeweils 100 µl Proteinextrakt eingesetzt. Zur genaueren Bewertung wurden Doppelansätze unternommen. Durch photometrische Messung (540nm) der Reaktionsansätze, und eine Proteinbestimmung kann durch folgende Formel die spezifische GS-Aktivität berechnet werden:

$$(\text{OD}_{540\text{nm}} / \text{min} * \text{OD}_{595\text{nm}}) * 46464 = \text{nmol}_\gamma\text{GSH} / \text{min} * \text{mg Protein}$$

Tabelle 6.3.: Glutaminsynthetase-Test von *So ce56* und *Soce:pkn859* unter stationären Bedingungen

Probe	OD540nm	Minuten	OD595nm	Glutaminsynthetase-aktivität ($\mu\text{mol}_\text{GSH} / \text{min} \cdot \text{mg Protein}$)	Glutaminsynthetase-aktivität ($\mu\text{mol}_\text{GSH} / \text{min} \cdot \text{mg Protein}$) Mittelwert
<i>So ce56</i> (1)	3,0	10	0,245	56,89	54,99
<i>So ce56</i> (2)	2,8	10	0,245	53,10	
<i>Soce:pkn859</i> (1)	1,533	10	0,34	20,94	20,38
<i>Soce:pkn859</i> (2)	1,45	10	0,34	19,82	

Anhand des Glutaminsynthetase-Tests in Tabelle 6.3., ist ein eindeutiger Unterschied zu erkennen. Im Wildtyp Extrakt konnte eine 2,6fach höhere Aktivität gemessen werden. Da es sich hierbei um Extrakte von Zellen aus der späten exponentiellen Phase handelt, kommt es unter diesen Bedingungen zu einer immer schlechteren Stickstoffversorgung. Ausgehend von der Annahme, dass die Regulation der GlnA in *So ce56* ähnlich wie bei *E. coli* reguliert wird, müsste man im Wildtyp in dieser Phase eher unadenylylierte aktive GlnA vermuten. Das unterschiedliche Laufverhalten der Proteine geht daher wahrscheinlich nicht auf eine Adenylylierung zurück.

6.4.2. Westernblot-Analyse von PII-Protein

Eine große Rolle bei der Regulation der Glutaminsynthetase-Aktivität spielt in *E. coli* das eben schon erwähnte PII-Signalprotein. Das PII-Protein ist bei *E. coli*, sowie bei *So ce56* ein ungefähr 12,5 kDa großes trimeres Protein. Es besitzt bei *E. coli* an jeder Untereinheit jeweils eine Bindestelle für das 2-Oxoglutarat und für ATP. Die Bindung des 2-Oxoglutarat erfolgt dabei antikooperativ, das heißt, die Affinität der anderen Untereinheiten ein 2-Oxoglutarat zu binden, nimmt ab. Die Bindung von ATP hingegen erfolgt kooperativ. PII steuert den Stickstoffmetabolismus. Zellinterne Konzentrationen von 2-Oxoglutarat, ATP und Glutamat wirken dabei als Effektoren von PII. Die 2-Oxoglutaratkonzentration zeigt die Versorgung mit Kohlenstoffquellen an, während die ATP-Konzentration den Energiehaushalt der Zelle widerspiegelt.

In den Extrakten von *So ce56* konnte im Gegensatz zu den Extrakten der *pkn859*-Mutante ein kleines (< 25 kDa) Protein nachgewiesen werden, dass offenbar im Wildtyp

unterschiedlich stark phosphoryliert wird. Während es im Extrakt der exponentiell wachsenden Zellen nur schwach phosphoryliert ist, erscheint es stark phosphoryliert im Extrakt der stationär wachsenden Zellen. Im Zusammenhang mit der Stickstoffregulation betrachtet man auch PII. *So ce56* besitzt ein *glnB* Gen, das ein Protein mit einer Masse von 12,1 kDa kodiert.

Um zu testen, ob in der *pkn859*-Mutante veränderte PII-Spiegel existieren, wurde ein Westernblot gemacht. Dazu wurden die gleichen Extrakte aufgetragen, die für den GS-Test verwendet wurden.

Jeweils 30 µg Protein wurden auf ein 15 %-iges SDS-Gel geladen. Als Positivkontrolle wurde *E. coli* verwendet. Als Membran wurde Nitrocellulose verwendet. Nach dem Transfer wurde der *blot* mit dem ersten Antikörper (anti-PII von *E. coli*) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach gründlichem Waschen der *blot* für 2 Stunden mit dem 2. Antikörper versehen.

In Abb. 6.10. ist das Ergebnis des *blots* abgebildet.

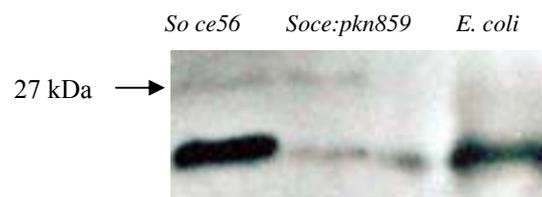


Abb. 6.10. Western-Blot mit Extrakten von *So ce56* und *Soce:pkn859*. Der PII-Antikörper wurde 1:10.000 verdünnt. Es wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein aufgetragen

Betrachtet man zunächst den Wildtyp Extrakt (Spur 1), ist eine deutliche Bande im Bereich von 12 kDa zu erkennen. Spur 2 zeigt den Extrakt von *Soce:pkn859*. Hier ist in diesem Bereich, nur eine ganz schwache Bande zu erkennen. Die dritte Spur zeigt den Extrakt von *E. coli*. Da es sich um einen PII-Antikörper von *E. coli* handelt, diente diese Spur als Kontrolle. Hier erkennt man eine Proteinbande, die in Größe und Qualität durchaus mit der Bande in Spur 1 zu vergleichen ist. Diese Daten zeigen, dass die *Soce:pkn859* Mutante einen Defekt in der Akkumulation von PII besitzt. Um zu überprüfen ob PII im phosphorylierten Zustand vorlag, wurden Nativgel-Analysen unternommen. Das Nativgel wurde mit den gleichen Extrakten (30 µg Protein) beladen, die zuvor für den GS-Test sowie für den Westernblot verwendet wurden. Die mit Hilfe des Gels separierten Proteine wurden anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Nach dem Transfer wurde der *blot* mit dem ersten Antikörper (anti-PII von *E. coli*) über Nacht inkubiert. Am

nächsten Tag wurde nach gründlichem Waschen der *blot* für 2 Stunden mit dem 2. Antikörper versehen.

Diese Daten zeigen, dass sowohl *So ce56* als auch *Soce:pkn859* Mutante in der Lage ist, PII zu modifizieren. Die Daten konnten durch den starken Hintergrund des Filmes nicht eingescannt werden. Es war aber eine schwächere Modifizierung bei *Soce:pkn859* zu verzeichnen.

7. Diskussion und Ausblick

7.1. Ist Rel_{S.cellulosum} eine (p)ppGpp Synthetase III?

Myxobakterien sind in der Lage, bei Nährstofflimitierung auf zwei unterschiedliche Weisen zu reagieren. Zum einen sind sie in der Lage, ihre Wachstumsrate so zu reduzieren, dass sie mit den Nährstoffen in ihrem Umfeld überleben können. Zum anderen sind sie in der Lage, Fruchtkörper zu bilden. Frühere Untersuchungen an *M. xanthus* zeigten, dass das Rel-Protein die Akkumulation von (p)ppGpp katalysiert und für die Expression früher Differenzierungsgene benötigt wird (Singer und Kaiser, 1995). Somit ist die Zunahme von (p)ppGpp ein wichtiger Bestandteil der Aktivierung des Differenzierungsprozesses.

Die Aktivierung der stringenten Kontrolle, welche sich durch die Akkumulation von ppGpp auszeichnet, wurde in vielen Bakterien beobachtet und beschrieben. Dabei wurde in Gram-positiven Bakterien, wie *B. subtilis* und *S. coelicolor*, aber auch im Gram-negativen Bakterium *M. xanthus* eine durch das *rel*-Gen kodierte ppGpp Synthetase identifiziert. Es handelt sich hierbei um ein trifunktionelles Protein, das sowohl die Ribosomen-abhängige als auch die Ribosomen-unabhängige Synthese und Hydrolyse von (p)ppGpp katalysiert. Bei (p)ppGpp handelt es sich um ein Effektormolekül (Alarmon), das sowohl positiv als auch negativ wirkt. Dies geschieht durch die veränderte Transkription von Genen, die bestimmte Enzyme kodieren, die an Schlüsselprozessen der Zelle (Transkription, Translation und Replikation) beteiligt sind (Mechold *et al.*, 1996). Im Gram-negativen Bakterium *E. coli* übernehmen zwei Gene diese Aufgabe, *relA* (Stent und Brenner, 1961) und *spoT* (Laffler und Gallant, 1974). Auch hier wurde die stringente Antwort sowohl nach Aminosäure- als auch nach Kohlenstoffmangel beobachtet.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu *E. coli* in *S. cellulosum* nur eine ppGpp Synthetase (Rel) existiert. Die Inaktivierung des dazu gehörigen Gens bewirkt signifikante Differenzierungsdefekte. In dieser Arbeit wurde der Beweis geführt, dass mit Hilfe dieser Mutante wichtige Regulatoren der Differenzierungsprozesse in *S. cellulosum* identifiziert werden können.

7.1.1. Die Familie der Rel/RelA- und SpoT-Proteine

Zu Beginn der Arbeit standen verschiedene DNA-Sequenzen von *rel/relA* bzw. *spoT*-homologen Genen in den Datenbanken zu Verfügung. Der Vergleich dieser Proteine zum identifizierten Rel-Protein aus *S. cellulosum* zeigte die höchste Homologie zu den myxobakteriellen Rel-Proteinen von *M. xanthus* mit 55 % und *A. dehalogenans* mit 56 %. Das identifizierte Protein von *So ce56* umfasst 724 Aminosäuren und besitzt 4

verschiedene Domänen (ACT, HDc, RelA_SpoT, TGS). Die Kombination dieser vier Domänen ist ein charakteristisches Merkmal einer (p)ppGpp Synthetase III.

Eine nähere Untersuchung der Sequenzregion von *rel*-homologen Genen zeigte, dass nicht nur *rel* selbst, sondern auch die Lage und zum Teil die Orientierung der benachbarten Gene konserviert sind (Abb. 7.1.). So findet man in vielen Genomen eine Koorganisation von *rel* mit dem *apt* Gen.

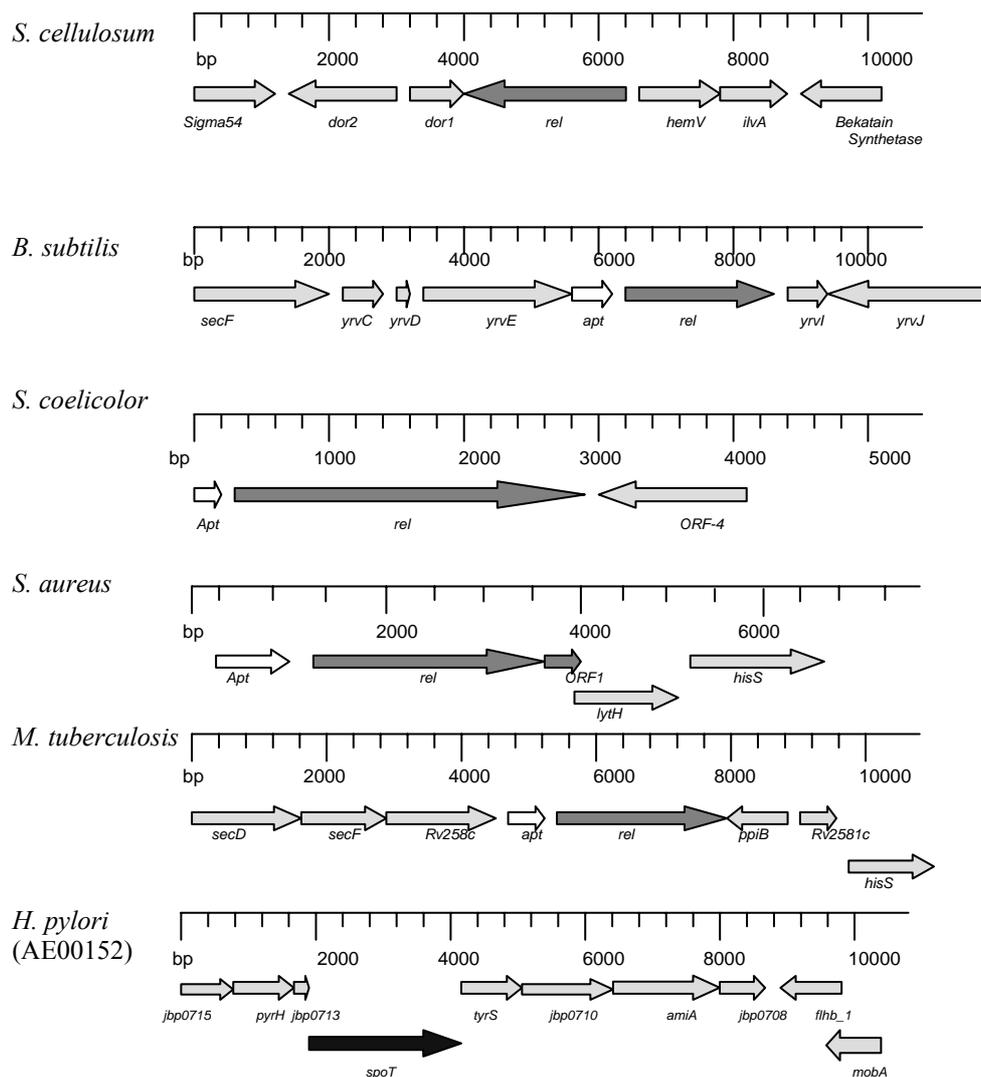


Abb. 7.1.: Genetische Organisation der *rel* -Region verschiedener Eubakterien: Die Bezeichnung und Zuordnung der Gene wurde aus den Datensätzen (Genbank 'Acc'.-Nr.) direkt übernommen.

Eine Ausnahme hierbei bilden die Regionen der *relA*- und *spoT*- Gene von *E. coli*, *Vibrio*, *H. pylori* und *H. influenza*.

Nur in den Gram-positiven Bakterien wie *B. subtilis*, *S. coelicolor*, *S. aureus* und *M. tuberculosis* konnte eine Kopplung zwischen der Adenin-Phosphoribosyltransferase (*apt*) und dem *rel* homologen Gen kenntlich gemacht werden. Es handelt sich bei Apt um eine

Membran gebundene Adenin-Phosphoribosyltransferase; sie katalysiert die kovalente Bindung von Adenin mit 5'-Phosphoribosyl-1'-pyrophosphat zu AMP und PPi. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass sie durch (p)ppGpp gehemmt und somit auf enzymatischer Ebene während der stringenten Antwort reguliert wird (Hochstadt-Ozer *et al.*, 1972). Betrachtet man Gram-negative Bakterien, lässt sich ein Unterschied in der Abfolge der Gene sichtbar machen. In Abbildung 7.1. ist *H. pylori* als Beispiel aufgeführt. Es zeigt in der Genregion des *spoT*-Gens kein *apt*-Gen. Dies gilt auch für die Genregion von *E. coli*. Betrachtet man das Gram-negative Bakterium *So ce56* ist auch dort keine Kopplung zwischen dem *apt*-Gen und dem *rel*-Gen sichtbar. Auch Untersuchungen der entfernteren liegenden Genregionen (bis 2000 bp rechts und links des *rel*-Gens), identifizierten kein *apt*-Gen in *So ce56*. Weitere Analysen des Genoms von *So ce56* identifizierten ein sehr entfernt liegendes *apt*-Gen. Die Funktion des *apt*-Gens an dieser Position des Genoms von *So ce56* ist jedoch unklar. Auch Analysen an *M. xanthus*, zeigten keine Koorganisation des *apt*- und *rel*-Gens. Es ist somit davon auszugehen, dass die Kopplung zwischen *rel*-Gen und *apt*-Gen nur in Gram-positiven Bakterien konserviert ist.

7.1.2. Konstruktion einer *rel*-Mutante in *So ce56*

Die Konstruktion einer stringenten Mutante in *So ce56* erwies sich nicht als einfach. Zuvor mussten genetische Methoden für *So ce56* im Labor etabliert werden. Zudem war ein kontinuierliches Wachstum der Kultur Voraussetzung für alle weiteren Experimente. Die Konstruktion einer Mutante konnte, bis zum jetzigen Zeitpunkt, nur mit Hilfe einer Konjugation durchgeführt werden. Des Weiteren musste zur Konjugation in *So ce56* ein mindestens 850 bp großes Fragment verwendet werden. Mit Hilfe einer biparentalen Konjugation und eines daraus resultierenden *single-crossover*, konnte das *rel*-Gen in *So ce56* unterbrochen werden (Abb. 7.2.).

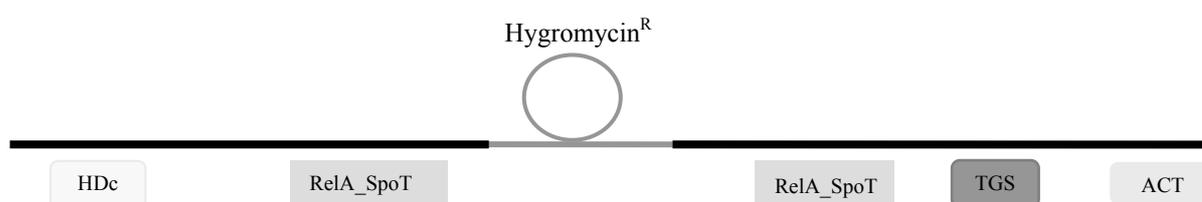


Abb. 7.2.: Schematische Darstellung des *rel*-Gens von *Soce:relint*. Die Schleife zeigt die angedeutete Position der Hygromycin-Kassette im *rel*-Gen. Die Kästchen deuten die Positionen der einzelnen Domänen des dazu gehörigen Proteins an.

Zur Identifizierung und Überprüfung der konstruierten *relint*-Mutante, wurden PCR-Analysen und ein anschließender Westernblot getätigt. Mit Hilfe von Northernblot-Analysen war es jedoch nicht möglich, ein *rel*-mRNA Signal in *Soce:relint* zu erhalten. *Soce:relint* ist in der Lage, ein verkürztes Rel-Protein zu akkumulieren, die Stabilität des dazugehörigen mRNA-Transkript ist im Vergleich zum Wildtyp-Transkript, hingegen geringer. Des Weiteren besteht die Möglichkeit das *Soce:relint* nur geringe Mengen dieser *rel*-mRNA bildet, zu geringe Mengen, um von der *relint*-Sonde detektiert zu werden. Eine positive Wirkung des Rel-Proteins bzw. des gebildeten (p)ppGpp's auf die *rel*-Genexpression in *So ce56* kann also nicht ausgeschlossen werden.

7.1.3. *rel*-Mutationen in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien

Nur die Auswertung der Dünnschichtchromatographie mit dem *Phosphoimager* zeigte, dass *Soce:relint* einen minimalen Level von ppGpp produziert. Da keine weiteren ppGpp Synthetase kodierenden Gene im *So ce56* Genom identifiziert werden konnten und es unwahrscheinlich erscheint, dass ein bisher unbekanntes Protein für diese Synthese verantwortlich gemacht werden kann, muss *Soce:relint* noch in der Lage sein, minimale Mengen an ppGpp zu produzieren. Sowohl für Rel bzw. RelA Proteine konnte das minimale ppGpp synthetisierende Proteinfragment identifiziert werden. Abb. 7.3. zeigt einige charakterisierte ppGpp Synthetase-Fragmente aus unterschiedlichen Organismen. Das Rel-Protein von *Streptomyces coelicolor* wurde durch Expression verschiedener Konstrukte in *E. coli (relA)* charakterisiert. Ähnlich verkürzte Proteine wie Rel* in *Soce:relint* haben dabei ebenfalls noch einen basalen Level von (p)ppGpp produziert (Martínez-Costa *et al.*, 1998). Das Rel-Protein von *S. coelicolor* in seiner gesamten Länge (847 aa), zeigte eine Ribosomen-abhängige ppGpp Produktion. Die folgenden verkürzten Proteine waren dabei immer noch zu einer Ribosomen-unabhängigen Produktion im Stande. Zur Verdeutlichung sind die verkürzten Proteine mit den entsprechenden AS-Bereichen von Rel_{S.cellulosum} gegenüber gestellt:

<i>S. coelicolor</i>		Rel _{S.cellulosum}
1-489	=	1-373
1-453	=	1-337
479-847	=	363-724
267-453	=	165-337

Da Rel* von *So ce56* noch die ersten 420 N-terminalen Aminosäuren umfasst, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Rel* tatsächlich noch geringe Mengen ppGpp produzieren kann.

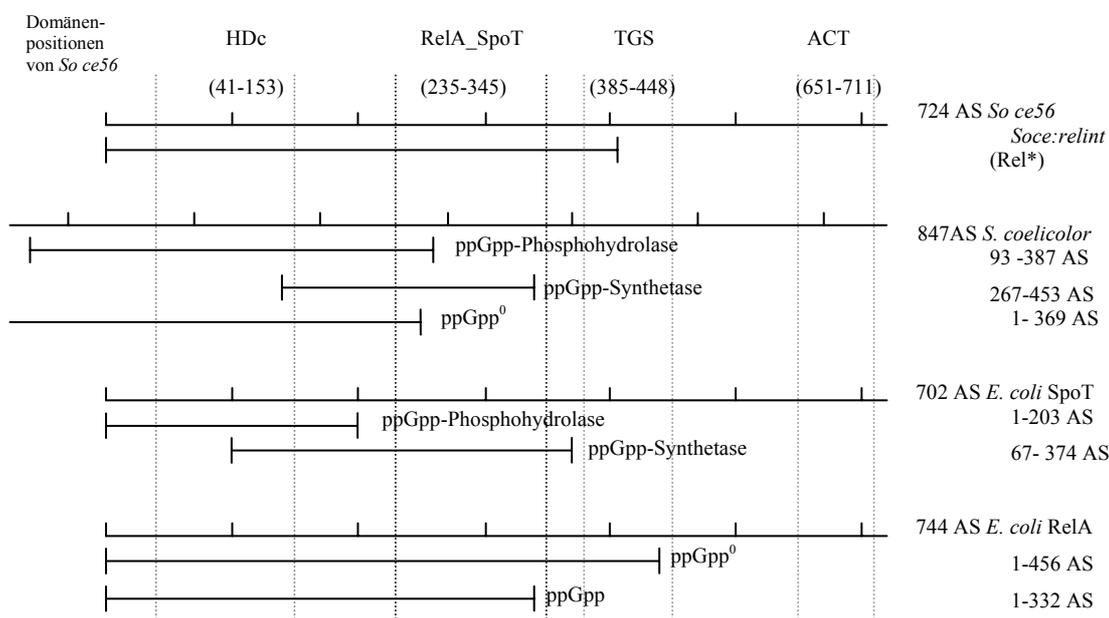


Abb. 7.3. Schematischer Vergleich bekannter Verkürzungsmutationen von Rel, RelA und SpoT-Proteinen. Die Größe und die Lage der kodierenden Fragmente sind auf die Längenskala von *So ce56* projiziert. Die eingezeichneten Bereiche kennzeichnen den Umfang der verkürzten Proteine.

Das verkürzte Rel-Protein 93-387 aa von *S. coelicolor* zeigte zwar keine synthetisierende Aktivität mehr, jedoch noch eine ppGpp-Phosphohydrolase Aktivität. Wohingegen das verkürzte Protein 267-453 aa noch eine ppGpp Synthetase Aktivität zeigte, aber keine Phosphohydrolase Aktivität mehr. Das minimale ppGpp Hydrolase Modul umfasst daher die aa 93-387, wohingegen das minimale ppGpp Synthetase Modul die aa 267-453 umfasst (Abb. 7.3.).

Das minimale ppGpp Hydrolase Modul von SpoT aus *E. coli* umfasst dagegen nur die ersten 203 aa, ist somit um 100 aa kürzer (Hernandez *et al.*, 1991). Das minimale ppGpp Modul von *E. coli* RelA enthält die Aminosäuren 1- > 332 < 456 (Schreiber *et al.*, 1997).

Diese Daten erlauben die Schlussfolgerung, dass Rel* sowohl alle notwendigen Aminosäuren für die synthetisierende Aktivität, als auch für die hydrolysierende Aktivität besitzt. Allerdings kann es durch den Verlust des C-Terminus Rel* weder mit Ribosomen assoziieren, noch adäquat auf Aminosäurelimitierung bzw. durch künstliche Aktivierung mit DL-Norvalin reagieren. Dies erklärt jedoch nicht, warum Rel* durch künstlich

eingeleiteten Kohlenstoffmangel (Zugabe von α -Methylglykosid) ebenfalls kein ppGpp akkumuliert. Für diesen Befund gibt es mehrere ungetestete Erklärungen:

1. der Bereich, der für die Kohlenstoffmangel-Erkennung notwendig ist, befindet sich auch im C-Terminus
2. der Kohlenstoffmangel führt indirekt durch eine nachfolgend eintretende Aminosäurelimitierung zur ppGpp Akkumulation
3. Rel* ist in der Lage, den Kohlenstoffmangel zu erkennen, kann aber ppGpp durch die gleichzeitige Synthetase und Hydrolyse Aktivität nicht akkumulieren

Da es in der Literatur keine Information darüber gibt, wie Rel oder SpoT Proteine Kohlenstoffmangel erkennen, kann man die erste Erklärung nicht ausschließen. Sehr viel wahrscheinlicher erscheint dagegen Erklärung zwei, da zum Beispiel in *Salmonella* Kohlenstoffmangel regulierte Gene unter der Kontrolle von RelA stehen (Spector *et al.*, 1992). Ähnliche Beobachtungen konnten auch in dem Gram-negativen Bakterium *Vibrio sp.* gemacht werden (Östling *et al.*, 1996). Auch die dritte Möglichkeit ist nicht komplett auszuschließen. Experimentell ließe sich diese Hypothese nur testen, wenn man in der Lage wäre, die unterschiedlichen Aktivitäten durch Inhibitoren spezifisch zu unterbinden. Ein Vergleich mit anderen *rel*-Insertionsmutanten ist hier nicht sinnvoll, da in keiner dieser Mutanten der komplette minimale ppGpp-synthetisierende Proteinbereich erhalten wurde. Nach meinem Erkenntnisstand gibt es keine zu *Soce:relint* vergleichbare *rel*-Insertionsmutante. Es ist also nicht auszuschließen, dass Rel* gebildetes ppGpp sofort wieder hydrolysiert.

7.1.4. die *rel*-Mutante zeigt reduzierte GTP-Level

Die Dünnschichtchromatographie Analysen zeigten in *Soce:relint* immer dann reduzierte GTP-Level, wenn der Wildtyp, unter Nährstoffmangel, ppGpp synthetisierte. Dagegen waren unter günstigen Wachstumsbedingungen die GTP-Level in beiden Stämmen identisch.

Dieser Befund ist von keiner anderen *rel*-Insertionsmutante beschrieben (Tabelle 7.1.) worden.

Tabelle 7.1.: Auflistung unterschiedlicher *rel*-Mutationen und ihr ppGpp- bzw. GTP-Level

Stämme	Mutation	ppGpp-Produktion	GTP-Level
<i>S. clavuligerus</i> (Jin <i>et al.</i> , 2004)	Δrel	ppGpp ⁰	unverändert
	Δrsh (2. <i>rel</i> -Gen)	ppGpp reduziert	unverändert
<i>S. coelicolor</i> (Chakraburttty <i>et al.</i> , 1997)	Δrel (M570)	ppGpp ⁰ , bei Aminosäure- limitierung	unverändert
<i>S. coelicolor</i> (Martinez-Costa <i>et al.</i> , 1998)	Δrel (18J)	ppGpp ⁰ , bei Stickstoffmangel und stationärer Phase	unverändert
<i>B. subtilis</i> (Wendrich, 1999)	Δrel (TW30)	ppGpp ⁰ , bei Inkubation mit Serinhydroxamat bzw. α -Methylglykosid	unverändert

In *S. coelicolor* und *B. subtilis* hat die Synthese von (p)ppGpp einen Abfall des GTP Levels zur Folge (Chakraburttty *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2003), der mit zunehmender ppGpp Produktion weiter sinkt. Dies konnte auch in *M. xanthus* beobachtet werden (Harris *et al.*, 1998). Ist das *rel*-Gen unterbrochen und somit die ppGpp Synthese blockiert, bleibt es in den *rel*-Mutanten von *S. coelicolor* und in *S. clavuligerus* bei einem konstanten GTP-Level.

Eine interessante Beobachtung machten Zhang und Haldenwang (2003), beim Messen der GTP-Level in einer *rel*-Mutante von *Bacillus* in Phosphat-limitiertem Medium. Unter diesen Bedingungen war der GTP-Pool der Mutante immer geringer als der des Wildtyps. Die Autoren postulierten daher eine Verbindung zwischen dem Rel Protein und dem Nukleotid-Pool in der Zelle. Da die Zellen in dem von uns verwendeten SM-Medium Phosphat-limitiert wachsen, könnte ein solcher Zusammenhang auch für *So ce56* postuliert werden. Das würde auch erklären, warum die Zellen nach Waschen und Aufnahme in Differenzierungsmedium Wildtyp-ähnliche GTP-Level zeigen, denn somit erhielten diese Zellen neues Phosphat. Erwähnenswert ist hierbei auch die Identifizierung der Nukleotid-Diphosphat Kinase (Ndk) in den 2D-Gelen. Diese Gele zeigten, dass *Soce:relint* in stationärer Phase Ndk nicht im gleichen Maße akkumuliert wie *So ce56*. Die Ndk ist für die Aufrechterhaltung des GTP-Pools während der stringenten Kontrolle zuständig. Die Expression des *ndk*-Gens wird möglicherweise indirekt oder direkt durch ppGpp kontrolliert.

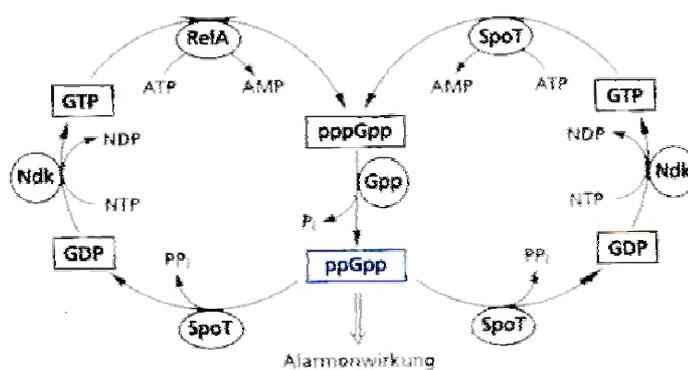


Abb. 7.4.: schematische Darstellung der stringenten Kontrolle von *E. coli*

7.1.5. Charakterisierung der *relint*-Mutante

Unterschiedliche Modifikationen des *rel*-Gens in verschiedenen Bakterien zeigten unterschiedliche Phänotypen im Bezug auf die morphologische und physiologische Differenzierung. Charakteristika einiger Mutanten sind in Tabelle 7.2. zusammen gefasst.

S. coelicolor ist in der Lage, mit Eintreten in die späte exponentielle bzw. frühe stationäre Phase, die Sekundärmetabolite Undecylprodigiosin (Red) und Actinorhodin (Act) zu produzieren.

Chakraborty *et al.* zeigten 1997 in der *S. coelicolor rel*- Mutante M570 einen Defekt der Sekundärmetabolit-Produktion. Die *rel*-Deletionsmutante (18J) aus *S. coelicolor* von Martínez-Costa, war ebenfalls nicht mehr in der Lage, Act zu produzieren (Martínez-Costa *et al.*, 1996). In *B. subtilis* konnte jedoch keine reduzierte Produktion des Peptidantibiotikums Surfestatin nach der Deletion von *rel* festgestellt werden (Wendrich, 1999).

Tabelle 7.2.: Auflistung unterschiedlicher *rel*-Mutationen und ihrer Unterschiede in morphologischer und physiologischer Differenzierung

Stämme	Mutation	ppGpp	Wachstum im Vergleich zum Wildtyp	morphologische Differenzierung	physiologische Differenzierung
<i>S. clavuligerus</i> (Jin <i>et al.</i> , 2004)	Δrel	ppGpp ⁰	Stark reduziert	Keine Differenzierung	Reduzierte Produktion von Cephامycin und Clavulansäure
	Δrsh	ppGpp reduziert	Schwach reduziert	Differenzierung	
<i>S. coelicolor</i> (Chakraburty <i>et al.</i> , 1997) N-terminal 500 nt	Δrel (M570)	ppGpp ⁰	identisch	Keine Differenzierung	Stickstofflimitierung: Act ⁻ und Red ⁻ , Phosphatlimitierung: Act ⁺ und Red ⁺
<i>S. coelicolor</i> (Martínez-Costa <i>et al.</i> , 1996) C-terminal 491 nt	Δrel (18J)	ppGpp ⁰	reduziert	späte Differenzierung	Act ⁻ Red ^{+/-}
<i>B. subtilis</i> (Wendrich, 1999)	Δrel (TW30)	ppGpp ⁰	nicht untersucht	sporuliert schlechter	Surfestin Produktion
<i>M. xanthus</i> (Harris <i>et al.</i> , 1998)	Punktmutation (MS10)	ppGpp Produktion in den ersten 15 Minuten bei Aminosäurelimitierung	nicht untersucht	Keine Differenzierung	nicht untersucht

Des Weiteren konnte in *S. coelicolor* ein zweites *rel*-Gen entdeckt werden. Der Name ist *rsh* (Sun *et al.*, 2001). Im Vergleich zu *S. coelicolor*, wo die Sekundärmetabolit-Produktion erst mit Eintritt in die stationäre Phase einsetzt, konnte in *So ce56* schon zu Beginn des Wachstums eine leichte Sekundärmetabolit-Produktion analysiert werden. Mit Beginn der exponentiellen Phase konnte ein kontinuierlicher Anstieg der Sekundärmetabolite in *So ce56* verzeichnet werden. Den maximalen Level der Sekundärmetabolit-Produktion erreicht *So ce56* in stationärer Phase. Die *rel*-Mutation in *So ce56* zeigte wie auch in *S. coelicolor* einen Einbruch in der Sekundärmetabolit Produktion.

Die ppGpp Synthese ist durch den Abfall der intrazellularen GTP Konzentration in der Zelle gekennzeichnet (Ochi *et al.*, 1986, Ochi *et al.*, 1987). Verantwortlich für die Sekundärmetabolit-Produktion ist somit eher die Konzentration von GTP als die Akkumulierung von ppGpp in der Zelle (Ochi *et al.*, 1987). Die Zugabe des GMP-Synthetase-Inhibitors Decoyinin initiiert die Sporulation in verschiedenen *Streptomyces* Arten, sowie in *B. subtilis* (Lopez. *et al.*, 1981). Sie ist jedoch nicht in der Lage, die

Sekundärmetabolit-Produktion zu aktivieren. Da die ppGpp Synthese die Sekundärmetabolit-Produktion in der Zelle aktiviert, vermuteten Ochi *et al.* (Ochi *et al.*, 1987), dass im Gegensatz dazu die morphologische Differenzierung der Zellen durch den fallenden GTP-Level initiiert wird. Die Inkubation von M570 (*Arel-S. coelicolor*) mit Decoyinin bestätigte die Hypothese von Ochi *et al.*. Mit Hilfe von Decoyinin war die Mutante in der Lage, zu differenzieren (Sun *et al.*, 2001). Die Inkubation von *So ce56* und *Soce:relint* mit Decoyinin zeigte keine Anzeichen der Differenzierung (Abb. 7.5.).

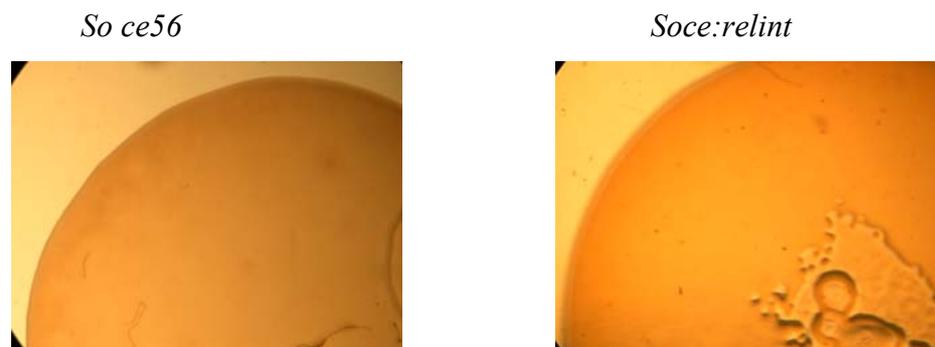


Abb. 7.5.: Stereoskopische Aufnahmen von *So ce56* und *Soce:relint* nach 9 Tagen Inkubation auf P-Diff-Agar mit Decoyinin (10 mg/ml). Die Kulturen wurden zuvor 2 Stunden mit Decoyinin inkubiert, anschließend auf OD 25 hochkonzentriert und es wurden 50 μ l getropft. Bei der Struktur in der Abb. von *Soce:relint* handelt es sich um eine Luftblase.

In *Myxococcus xanthus* bewirkt Decoyinin keine Fruchtkörperbildung (Singer *et al.*, 1995) und die Bildung von ppGpp konnte eindeutig mit der Aktivierung differenzierungsspezifischer Gene assoziiert werden. Die Synthese von ppGpp hat in *M. xanthus* keine signifikante Erniedrigung des GTP-Levels zur Folge. Nach den bisherigen Kenntnissen erscheint es für *So ce56* auch eher unwahrscheinlich, dass eine Erniedrigung des GTP-Levels die morphologische Differenzierung initiiert.

1. In der *Soce:relint*-Mutante konnte ein erniedrigter GTP-Level beobachtet werden, trotz allem kam es nie zur Fruchtkörperbildung
2. die Decoyinin-Zugabe bewirkte keine Fruchtkörperbildung

Allerdings muss hier kritisch angemerkt werden, dass ein GTP-senkender Effekt von Decoyinin experimentell weder für *M. xanthus* noch für *So ce56* nachgewiesen wurde.

Eventuell wirkt Decoyinin auch effizienter auf Gram-positive Bakterien. Bei *So ce56* handelt es sich um einen Gram-negativen Organismus. Der Zellwandaufbau von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien unterscheidet sich im Wesentlichen durch die

Anzahl der Membranen. Gram-positive Bakterien besitzen eine Membran, auf die eine Peptidoglykanschicht aufgelagert ist. Gram-negative Bakterien besitzen eine innere und eine äußere Membran und dazwischen eine Peptidoglykanschicht (Mikrobiologie, 2001). Dadurch kann es zur unterschiedlich guten Aufnahme von Decoyinin kommen. Somit könnte sich die ausreichende Inkubationszeit von 5 Tagen bei *Streptomyces* (Sun *et al.*, 2001) bei *So ce56* verlängern. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die benötigte Menge von Decoyinin zur Initiierung der morphologischen Differenzierung, von Spezies zu Spezies variiert. Sie beträgt bei *S. coelicolor* 10 mg/ml (Sun *et al.*, 2001) und bei *B. subtilis* 500 ng/ml (Lopez *et al.*, 1981). In unserem Versuch wurden nur eine Konzentration von 10 mg/ml Decoyinin eingesetzt.

Grossman konnte 1995 die Hypothese von Ochi *et al.* verfestigen. Auch er konnte in *B. subtilis* zeigen, dass bestimmte Regulationskaskaden *rel*-unabhängig ablaufen. Die Endosporenbildung der relaxierten *B. subtilis* -Mutante BR17 wird eingeleitet, wenn der intrazelluläre GTP-Spiegel abgesenkt wird. Da die Endosporenbildung von *B. subtilis* wahrscheinlich durch den intrazellulären GTP-Spiegel ausgelöst wird, konnte in der TW30 *Arel*-Mutante nur ein leichter aber kein vollständiger Sporulationsdefekt, festgestellt werden (Wendrich, 1999).

In *M. xanthus* (Harris *et al.*, 1998) wird ein Signal (A-Faktor) in das Medium sezerniert, und so ab einer bestimmten Konzentration die Zelldifferenzierung induziert. Die konstruierte *Soce:relint* Mutante ist, wie erwartet, nicht in der Lage, zu differenzieren. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob *Soce:relint* neben dem Defekt der Fruchtkörperbildung auch einen Sporulationsdefekt wie *B. subtilis* aufweist. Unterschiedliche Versuche zur künstlichen Aktivierung der Sporulation scheiterten. Das Auskeimen von Sporen ist in *S. cellulorum* im Vergleich zu *M. xanthus* unterschiedlich. In *M. xanthus* kann eine einzige Spore bei guten Nährstoffbedingungen wieder auskeimen. *S. cellulorum* hingegen benötigt möglicherweise eine Gruppe von Sporen um auszukeimen. *So ce56* ist nicht in der Lage, als einzelne Zelle zu überleben. Aus diesem Grund bildet *So ce56* als Schutzmechanismus während der nährstoffarmen Periode Sporangien. Diese enthalten mehrere Sporen. Somit ist die Auskeimung in einer Gruppe von Zellen gesichert. Die Analyse von Sporen und der daraus resultierenden auskeimenden Zellen war somit ein Problem.

Viele *rel*-Mutanten zeigen gleichzeitig auch Wachstumsdefekte (Sarubbi *et al.*, 1989; Jin *et al.*, 2004). All diesen Mutanten ist gemeinsam, dass sie einen messbaren Basallevel von ppGpp produzieren wobei ppGpp einen negativen Einfluss auf das Wachstum besitzt. Eine

spoT-Mutante hingegen ist lethal für *E. coli*, da dann zu hohe Mengen an ppGpp akkumuliert werden (Sarubbi, *et al.*, 1989). In *S. cellulosum* konnte hingegen kein Wachstumsdefekt der konstruierten *Soce:relint* Mutante festgestellt werden. Dies lässt sich unterschiedlich erklären:

1. Durch den Verbleib der kompletten RelA_SpoT Domäne der *Soce:relint* Mutante kommt es sowohl zur Synthese als auch zur Hydrolyse von ppGpp. Wenn überhaupt, sind die ppGpp-Level in der Mutante extrem niedrig
2. durch die zuvor beobachteten reduzierten GTP-Level wird in der Mutante nicht viel ppGpp akkumuliert.

Die *rel*-Mutante von *Mycobacterium tuberculosis* zeigte im Vergleich zum Wildtyp ein langsames Wachstum und unter stationären Bedingungen sowie unter Aminosäurelimitierung eine reduzierte Überlebensfähigkeit. *Soce:relint* zeigt kein langsames Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Es konnte aber eine reduzierte Überlebensfähigkeit der Zellen unter stationären Bedingungen festgestellt werden. Mäder *et al.*, (2002) zeigten in *B. subtilis*, dass die Überlebensfähigkeit von Zellen in der exponentiellen Phase und die daraus resultierenden Sporen abhängig von der Aminosäurelimitierung sind. Bei Aminosäure- und Kohlenstoffmangel kommt das Nettowachstum an Zellmasse schnell zum Erliegen.

In einer ersten Phase werden die DNA-Synthese und die Zellteilung noch fortgesetzt. Die RNA-Synthese und die Proteinbiosynthese werden jedoch relativ schnell eingestellt. Es folgt eine Inhibierung der Biosynthese von Kohlenhydraten, Phospholipiden und Zellwandbestandteilen. Dagegen werden selektive Gene für die Aminosäuresynthese und katabole Wege aktiviert, um der Mangelsituation entgegenzuwirken. Diesen Gesamtprozess der physiologischen Anpassung bezeichnet man als stringente Kontrolle. Durch die Konstruktion der *Soce:relint* Mutante wurde das *rel*-Gen in *So ce56* unterbrochen. Durch die Unterbrechung des *rel*-Gens ist der Ablauf der stringenten Kontrolle unterbrochen. Es ist somit möglich, dass eine Detektion der Aminosäurelimitierung in der Zelle unter diesen Umständen nicht mehr möglich ist.

7.2. Identifizierung von NtcA

Die morphologischen sowie physiologischen Differenzierungsdefekte in den *rel*-Mutanten von *Streptomyces* (Chakraborty *et al.*, 1997) aber auch in *So ce56* lassen die Vermutung zu, dass unterschiedliche Gene von den entsprechenden Mutanten während der

Differenzierung reguliert werden. Um diese Hypothese im Fall von *So ce56* zu bekräftigen, wurden die dazu gehörigen Regulatoren im Proteom der *Soce:relint* Mutante analysiert. Mit Hilfe eines mit Biotin markierten DNA-Fragments, welches die potentielle DNA-Bindungsstellen der zu untersuchenden Proteine beinhaltet, konnte ein Transkriptionsregulator in *Soce:relint* identifiziert werden. Als DNA-Fragmente wurden die Promotorregionen des *asgA*-Gens, sowie des *chiv1*-Gens verwendet. Diese beiden Gene zeigten zuvor in Real-Time RT-PCR Analysen reduzierte mRNA Level in der Mutante und standen somit als potentielle Kandidaten zur Untersuchung von morphologischen wie auch physiologisch involvierten Regulatoren zur Verfügung.

Bei diesem Transkriptionsregulator handelt es sich um das Regulatorprotein NtcA, welches sowohl an die Promotorregion von *asgA* sowie an die Promotorregion von *chiv1* in *Soce:relint* gebunden hatte. Im Wildtyp konnte diese Bande nicht detektiert werden. Das könnte bedeuten, dass NtcA an diesen Promotoren als Repressor wirkt und somit in der *Soce:relint* Mutante die Expression des *chiv1* und *asgA*-Operons verhindert.

NtcA, wurde bisher nur in Cyanobakterien identifiziert. Es ist für die Transkription der Gene verantwortlich, die durch Ammonium reprimiert werden (Luque *et al.*, 1994). Hier erkennt NtcA die palindromische Sequenz (GTA(N₈)TAC) ca. 40 Basenpaare stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes (Cohen-Kupiec *et al.*, 1995). In filamentösen Cyanobakterien ist NtcA auch an der Regulation der Heterocysten-Differenzierung beteiligt, wie zum Beispiel in *Anabaena sp.* Stamm PCC 7120 (Meeks und Elhai, 2002). Das für die morphologische Differenzierung wichtige Schlüsselprotein MrpC von *M. xanthus* hat ebenfalls Ähnlichkeit zu NtcA von *Synechococcus*.

Sowohl MrpC (Ueki *et al.*, 2003), als auch NtcA dienen unabhängig von einander in unterschiedlichen Organismen, als Schlüsselpunkt in der Differenzierung. Untersuchungen am Genom von *So ce56* identifizierten neben dem annotierten *ntcA*-Gen (*sce_200560509_3515*) noch zwei weitere Gene, die NtcA-ähnliche Proteine kodieren. Vergleicht man die Proteinsequenzen der drei unterschiedlichen NtcA-Proteine bzw. NtcA-ähnlichen Proteine (Abb.7.6.) sind Bereiche mit signifikanter Übereinstimmung festzustellen. Bei all diesen Proteinen handelt es sich jedoch um cAMP-Bindeproteine. Abb.7.6. zeigt die DNA-Sequenzen von *So ce56* und NtcA von *Synechococcus*.

```

Soce_91          -----VRGPTHGHGMGVEGVRGG-ASQDAEKERILSRSPLASLASPSR---R-LLF
Soce_3515       ---MMMGKDAMARSVRVQPGALGNDGG-LDLSRKRRVRRGAIGNAASPAT---QSALA
Soce_6642       VSTHAVWITLLFPTVSDLDSQYAQDAGRQPTDPVKARVARAFRLSSLFAQVDREVREAVT
NtcA_Synechococcus -----MLANENSLLTMFRELGSGKLLPLQ-----
                :   :   :
Soce_91          ELGRVERLARRQCVCQQGAPPRHLFLIGARVKVER-VADGRVVPLGHRGPGELVGEGAL
Soce_3515       DGGTIQRVAKGRHLVTQGDAATALAMLSLGRVRLVRGMSDGRSLSSLGYRGAGDVLGEAAL
Soce_6642       DAAVLEVVASDAAIFEQGAPADTLVVLGRGRARVERVNEAGAAFPLSYRGTGDVLGESCL
NtcA_Synechococcus ----IEQFERGKTIFFPGDPAERVYLLVKGAVKLSRVYESGEEITVALLRENSVFGVLSL
                : : . : * . . : : : * . : : * * . . . . . : : * . *
Soce_91          AG--AAVSSESATVLDEGHALVVPLAGLERQLASDAALRGALAAALVARQLETEARLGSL
Soce_3515       GG--VTAHRESAIATEDVEALLVPLATVRNLMATDANFAAAIVTTLVERHTDTEERLASM
Soce_6642       GG--LETRTERAIAMDEAEVVRPLLALVRELCAQHPGLGGAVFALLVARQRETEDRIESM
NtcA_Synechococcus LTGQRSDRFYHAVAFTPVQLFSVPIEFMQKALIERPELANVMLQGLSSRILQTEMMIETL
                * . . . . . ** : : . . : : * . : : * * : : * : :
Soce_91          LLCTVEARLIEFLRAARRWGQPHTAGQLVSAPFTHADIALLIGSTRETVTLLLGKLKRA
Soce_3515       LFRNVEARLCEFLLKAATRWGIPDPRGVLISAPFTHQEMASMIGSTRETVTLTLGDLRRK
Soce_6642       LFKNVGRLAEFLLHAAERWGVPTPRGTLISAPITHAEIAQVIGSTRETVTLTLGAFRKE
NtcA_Synechococcus AHRDMGSRLVSFLLILCRDFGIPSPDGITIDLKLSHQAIAEAIGSTRVTVTRLLGDLRES
                : . ** . ** . : * * . * : . : : * : * * * * * * * * * : :
Soce_91          GLIAFDRRRIVIRDGEHLEALAATA
Soce_3515       GVIEIDRRRIVVLDRDALKGRI---
Soce_6642       GVLDAAGRRLIVKDREALARKR---
NtcA_Synechococcus KLIAIHKRITVFNPVALSQQFS--
                : : : * : : : : *

```

Abb. 7.6.: Protein-Sequenz von NtcA und NtcA-ähnlichen Proteinen. Bei sce_6642, sce_3515 und sce_91 handelt es sich um Mitglieder der Familie der cAMP-Bindeproteine; sce_3515 wurde als NtcA in *So ce56* annotiert. In blau gekennzeichnete Aminosäuren sind 100 % konserviert. Grün markierte Reste (:) sind untereinander ähnlich.

Es konnten eindeutige Homologien identifiziert werden. Wie zuvor schon erwähnt, sind die NtcA-Bindestellen in der Familie der Cyanobakterien hoch konserviert. Man findet sie in den potentiellen Promotor-Bereichen von Genen, die positiv durch NtcA reguliert werden (Su *et al.*, 2005), zum Beispiel *xisA* und *glnA* (Jiang *et al.*, 1997). Analysen an *So ce56* zeigten keine Homologien zwischen der potentiellen Promotorregion vor dem *ntcA*-Gen (sce_20050509_3515) und den verwendeten potentiellen Promotorregion des *asgA*- und *chivI*-Operons. Nur in dem potentiellen Promotorbereich des *ntcA*-Gens findet sich eine ähnliche Sequenz (GAACCGAAAGGTAC) und zwar 132 Nukleotide vor dem potentiellen ATG-Startcodon. Signifikant erscheint der hohe AT-Gehalt dieser Region, eine für *So ce56* ungewöhnliche Häufung. Man findet in Cyanobakterien diese Bindestelle im Promotorbereich von NtcA positiv regulierten Genen. NtcA wirkt aber auch negativ auf einige Gene, so z.B. *rbclS* und *gor*-Gen (Jiang *et al.*, 1997), hier findet man keine NtcA-Box.

Die von uns gefundenen NtcA-bindenden Promotoren scheinen ebenfalls negativ reguliert zu werden. Die von uns verwendeten DNA-Bereiche wurden verglichen und zeigten einen identischen hochkonservierten Bereich (Abb.7.7).

```

asgA      AGCTCAGCATCGCCGGCGAGCACTAC-TGCACGGCGGTACGCAGATGATCCTGGGCCAG
chiv     --CTCTGC-CTATCGACGGTCCCAGCGGACGACGGCCTCG---GCCGCGTGGA----
          *** **          *** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
asgA      CTCTATCCGCTCGTCGTACGCCGATCGCGCCGGC-CGCCCCTCGTGGCCACCCCGGT
chiv     -TACATACGAA-ATCAGGAGAGGAAATCGCGCCGAAATATGGTTGCGCTACTATGTTAAT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
asgA      GGACGGGAACCT--CCACGAGATCGGCGCGCCTTCGTTCGCGGATTTCTTCGAAATGGCG
chiv     TGTATTGCATCTTGAACCAAGATGCGACATATGGCGGCGCAGGATCGATGCAAACTGCG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
asgA      GGGTGGGACACCTTCTATCTCGGGGCCAGCAG---CCCGCAGC-ACGTGATCCAGG
chiv     CACCACGCAGCTCAGCCGCTCGACAGATGCGCGAGACCTGATCGAGTTGAGTGTCCGCGC
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
asgA      AGGTCGTCCAGCGGAAGGCCGACGTCTTCGCGGTCTCG-GCCGCGCTCAGCGA---TCA
chiv     GTGTCCACATTGTGGGACGAATTGTTTGGCAAATATGTGCCTTGATAGCAAGATTTCC
          *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
asgA      GCTGTCGAGCGTCCGCCAGGTGATCACC CGGTGCGCGGCGACCGGTGCAGGGGCGT
chiv     GCTGTAGGCTAGGCGCCAGGTGGTTGT-AAGCTGAGAAA CGGCCCTGAGGGCTCGACCAT
          ***** * ***** * * * * * * * * * * * * * * * *
asgA      CGTCGTCTG-GCCGGCGGCCAGC-CGT-TCCGCGTCTCGACGACCTCTGGAGGCAGCT
chiv     -GACGTGCAGCGTCTGTGGG CAGCGCGTGTCTGCTCCGACGCTCGTTGATGGTTTGTCT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
asgA      CGGGGCCGACGGCTCGGCGCCGAGCGCAGAGCGCGCGTCCGCACGGCGG-AGCAGCTCC
chiv     GCAGACCA AAGAGTAGACATTGC-TGTGGCCATGGCG-CTGTCCAGCGTCAATGGTGCC
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
asgA      TCGCGGCGGAGCGCATGACCCCGCTCCGCGCCTTCGACCGCCGGCCCCCGAG-GGCGC
chiv     GCGCGCCCGTTCGCGCCCGTTGCGCCGCGAGGTGCCGCGGAGACTATGCGGTGGTGC
          ***** * ***** * * * * * * * * * * * * * * * *
asgA      GTTTCGCATAGCGAGCTCCACGCCGGCCTGCCAAGGACAGATCGCCTCCACCGC---AAG
chiv     GCCACGAGGCCTGATCTCGTTGGT GCGAGGCGCCAGT CATGATGCATCCAGTGC TTTGCA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
asgA      CGAGGGAGAGGCTTTGATTTCGGATG
chiv     CAACTGTGAGGCGGTGATG
          * * * * * * * * * *

```

Abb 7.7.: Alignment der beiden *upstream*-Regionen vor dem *asgA*-Gen und dem *chiv 1*-Gen. Das Kästchen zeigt einen hoch konservierten Bereich an.

Der in Abbildung 7.7. in rot eingegrenzte Bereich zeigt eine hoch konservierte Region, die in den *upstream*-Regionen von *asgA* und *chiv1* identisch ist. Bei genauerer Betrachtung finden wir auch hier ein ähnliches palindromisches Motif wie in Cyanobakterien. In Cyanobakterien besitzt das palindromische Motif die Abfolge GTA N8 TAC. Auch in dem identifizierten Bereich erkennt man ein Palindrom, dass durch 12 Nukleotide getrennt ist. Ob es sich dabei tatsächlich um eine Binderegion handelt kann nur durch entsprechende Verkürzungen des palindromischen Bereichs geklärt werden.

NtcA gehört zur Familie der cAMP-Bindeproteine und ist unter anderem an der Stickstoffregulation und Heterocystenbildung in Cyanobakterien beteiligt (Meeks und Elhai, 2002). Kommt es zum Beispiel zur Stickstofflimitierung wird durch Konformationsänderungen die cAMP-Bindestelle des NtcA Proteins verändert. Durch die Konformationsänderung ist NtcA nicht mehr in der Lage, an den Promotor zu binden und fällt ab (Wisén, 2003). Dies würde auch das Fehlen der NtcA Bande in *So ce56* unter

diesen Bedingungen in stationärer Phase erklären. Die Vermutung liegt somit nahe, dass NtcA in *Soce:relint* keine Konformationsänderung der cAMP-Bindestelle während der stationären Phase durchläuft. Da es zu keiner Konformationsänderung kommt, kann somit NtcA in den Extrakten von *Soce:relint* identifiziert werden. Dadurch bleibt NtcA auch während der stationären Phase an den Promotorbindestellen gebunden. Das würde bedeuten, dass es sich in diesem Fall bei NtcA, wie zuvor erwähnt, um einen Repressor handelt. Eine Identifizierung ähnlicher Repressoren im Genom von *So ce56* war nicht möglich. Diese Daten deuten daraufhin, dass in *Soce:relint* eventuell veränderte cAMP-Spiegel in der stationären Phase vorliegen (Abb. 7.8.).

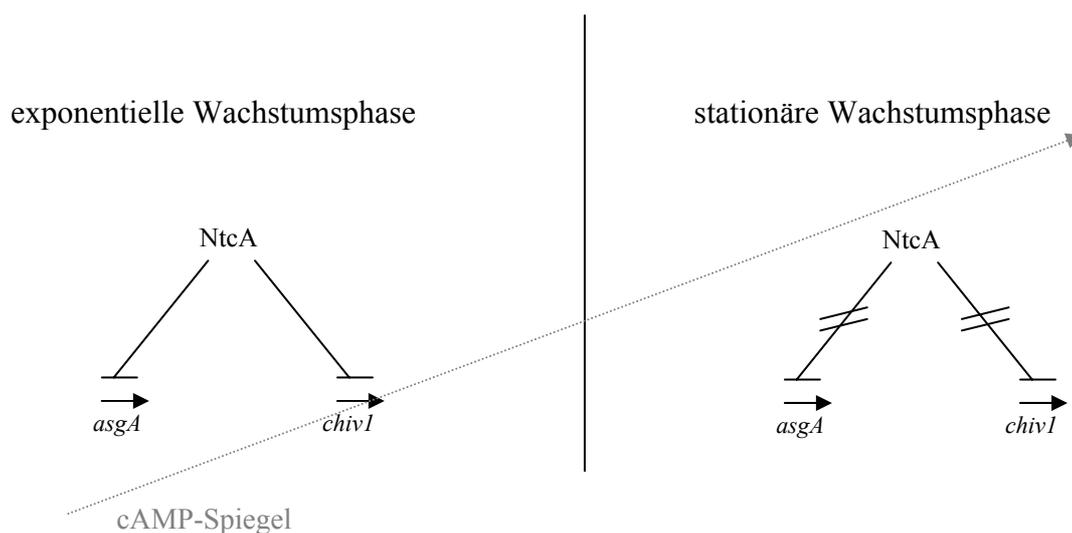


Abb. 7.8.: Mögliche Funktion von NtcA als Modell dargestellt. Die Erklärung der Grafik ist im oberen Abschnitt des Textes beschrieben.

7.3. Identifizierung und Charakterisierung einer Serin/Threonin Kinase

Im Allgemeinen findet man Serin/Threonin Kinasen in Bakterien wie *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Myxococcus* und *Synechococcus*. Alle diese Bakterien besitzen einen komplexen Lebenszyklus mit morphologischer und physiologischer Differenzierung. Der Besitz eines komplexen Lebenszykluses und das Vorhandensein von Proteinkinasen scheint in einem Zusammenhang zu stehen (Nováková *et al.*, 2005).

Vergleicht man die Anzahl der Serin/Threonin Kinasen in der Gruppe der Myxobakterien, lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen *M. xanthus* und *So ce56* ausmachen. Mit 108 Serin/Threonin Kinasen (Nariya *et al.*, 2005) besitzt *M. xanthus* schon eine sehr hohe Anzahl an Kinasen, aber mit insgesamt ca. 300 verschiedenen Serin/Threonin Kinasen (STPK) ist *So ce56*, unter den bekannten Bakterien das mit der höchsten Anzahl. Im

Vergleich zu anderen Bakterienarten besitzt die Familie der Myxobakterien mit Abstand die größte Anzahl (Tabelle 7.3.).

Tabelle.7.3.: Anzahl an Kinasen in sequenzierten bakteriellen Genomen

Organismus	Anzahl der Kinasen	Chromosomen-Größe (Mbp)
<i>S. cellulosum</i>	ca. 300	12.3
<i>M. xanthus</i> ^a	108	6.3
<i>B. subtilis</i> ^b	36	4.2
<i>S. coelicolor</i> ^c	33	8,67
<i>Synechocystis sp.</i> ^d	42	3.6

^a Nariya *et al.*, 2005
^b <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/framik.cgi?db=genome&gi=27>
^c <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/framik.cgi?db=genome&gi=238>
^d <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/framik.cgi?db=genome&gi=112>

Betrachtet man die Gruppe der Serin/Threonin Kinasen in *So ce56* eingehender, findet man darunter keine mit einer DNA-Bindedomäne. Die Einteilung der Serin/Threonin Kinasen erfolgt durch die Aufteilung in cytoplasmatische und membrangebundene Proteinkinasen. In *So ce56* finden wir sowohl cytoplasmatische als auch membrangebundene Kinasen. Bei der identifizierten Kinase handelt es sich um die Serin/Threonin Kinase 859. Es handelt sich bei Pkn859 um ein cytoplasmatisches Protein. Mit Hilfe der Heparinsäule war es möglich, potentielle DNA-Bindeproteine aus dem Gesamtpool der Proteine zu separieren. Bei der Identifizierung von Pkn859 wurde ein Gesamtproteinextrakt aus SM-Mannose kultivierten Zellen von *So ce56* und *Soce:relint* verwendet. Pkn859 konnte nur in *So ce56* Extrakten identifiziert werden. Aus Extrakten von Zellen, die mit anderen Kohlenstoffquellen wie z. B. Glucose inkubiert wurden, konnte Pkn859 nicht identifiziert werden. An dieser Stelle kann man nur spekulieren, worin der Unterschied besteht. Die Beobachtung, dass mit letzterer C-Quelle eine erhöhte Chivosazol Produktion zu beobachten ist, bringt NtcA wieder in den Vordergrund. Bleibt man bei dem jüngst aufgestellten Model, dass NtcA durch steigende cAMP-Spiegel vom Chivosazol-Promotor gelöst wird, müssten also beim Wachstum in Mannose möglicherweise höhere cAMP-Spiegel in der Zelle erreicht werden. Dies ließe sich eventuell dadurch erklären, dass Mannose im Gegensatz zu Glucose von *So ce56* nicht über das Phosphotransferasesystem aufgenommen wird. In *E. coli* führt der Transport von z.B. Glucose über diese Kette zu einer Blockierung der Adenyltransferase und dadurch zu einem niedrigen cAMP-Spiegel in der Zelle. Im Genom von *So ce56* finden sich zahlreiche Gene, die Komponenten des

Phosphotransferasesystems und weitere Zuckertransportproteine kodieren. Über deren Spezifität kann auf Sequenzebene allerdings keine Aussage getroffen werden.

In *Streptomyces* spielen Serin/Threonin-Kinasen sowohl eine Rolle in der morphologischen, als auch in der physiologischen Differenzierung (Umeyama *et al.*, 2002). AfsR zum Beispiel, dient als Transkriptionsfaktor in der Regulation der physiologischen Differenzierung von *S. coelicolor*, aber auch in der morphologischen Differenzierung von *S. griseus* (Umeyama *et al.*, 2002). Unter allen Serin/Threonin Kinase von *Streptomyces* zeigte AfsR als einzige einen starken Einfluss auf die Sekundärmetabolit-Produktion (Matsumoto *et al.*, 1994).

Nach der Konstruktion der STPK-Mutante *pkn859* wurde sowohl die morphologische, als auch die physiologische Differenzierung untersucht. Das Verhalten auf Hungermedium zeigte einen eindeutigen Defekt in der *pkn859*-Mutante. Im Vergleich zum Wildtyp war die Serin/Threonin-Kinase Mutante nicht in der Lage, zu aggregieren, zu differenzieren und Fruchtkörper zu bilden. Sie zeigte wie die stringente Mutante nicht einmal den Beginn einer Aggregation und nach längerem Inkubieren färbte sich die Mutante braun. Die Zellen starben ab. Untersuchungen des physiologischen Phänotyps mit Hilfe des Bioassay Experiments zeigten im Vergleich zum Wildtyp keinen signifikanten Unterschied. Die *pkn859*-Mutante zeigte bei beiden Bio-Indikatoren, sowohl bei *M. luteus* (Etnangien) wie auch bei *H. anomala* (Chivosazol A) eine Hemmhofbildung.

1997 entdeckte Hanlon die Serin/Threonin-Kinase Pkn9 in *M. xanthus*, welche nur in der morphologischen Differenzierung beteiligt ist. Nähere Untersuchungen konnten zeigen, dass es sich bei dieser Kinase um eine cAMP-abhängige Proteinkinase handelt. Die dazu gehörige *pkn9*-Mutante zeigte einen morphologischen Differenzierungsdefekt.

Wie auch in *M. xanthus* zuvor analysiert wurde, handelt es sich bei Pkn895 von *So ce56* auch um eine Serin/Threonin-Kinase, die offenbar nur am Ablauf der morphologischen Differenzierung involviert ist. Die Identifizierung von Pkn859 nur in SM-Medium mit Mannose könnte somit auch in einem Zusammenhang gebracht werden. Bleibt man beim aufgestellten NtcA Model und dem steigenden cAMP Spiegel, kommt die Vermutung auf, dass durch die möglicherweise reduzierten cAMP Spiegel in der *Soce:relint* Mutante die Serin/Threonin-Kinase Pkn859 in *Soce:relint* gar nicht aktiviert wird. Das würde erklären, weshalb Pkn859 nicht in der Lage ist, an die Heparin-Säule zubinden.

7.4. Phosphoprotein-Muster in *So ce56* und *Spkn859*

Reversible Proteinphosphorylierungen sind ein wichtiger Mechanismus zur Kontrolle zellulärer Prozesse. Darunter zählen Stoffwechsel, Transport, Sekretion, Zellteilung und Signaltransduktionen. Sie werden überwiegend von eukaryotischen Organismen, aber auch von Prokaryoten ausgeführt. Dieses System basiert auf der Bildung von stabilen Phosphoestern von Serin, Threonin oder Tyrosin. Durch die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Serin, Threonin bzw. Tyrosinresten wird eine Konformationsänderung der zu regulierenden Proteine ausgelöst. Die auf diese Weise eingeführte/ reduzierte Phosphatgruppe verändert die biologischen Eigenschaften dieser Proteine. Sowohl Enzymaktivität als auch die Bindung an andere regulatorische Moleküle können so kontrolliert werden.

Durch die Inaktivierung der Serin/Threonin-Kinase Pkn859 fehlt das Phosphorylierungspotential dieser Kinase. Proteine, die normalerweise von der Pkn859 phosphoryliert werden, liegen dann im unphosphorylierten Zustand vor. Die Untersuchung der phosphorylierten bzw. unphosphorylierten Proteine zeigten einige Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante. Die Identifizierung der Glutaminsynthetase I, GlnA, in Wildtyp und in der Mutante war eine interessante Entdeckung.

Das Enzym Glutaminsynthetase katalysiert den Einbau von NH_4^+ in Glutamat. Im Gegensatz zur Glutamat-Dehydrogenase benötigt diese Assimilierungsreaktion die Hydrolyse einer energiereichen Verbindung (ATP). Die meisten Bakterien, darunter auch *E. coli*, besitzen eine Glutaminsynthetase (GS I) (Streicher *et al.*, 1975). *S. coelicolor* hingegen besitzt noch eine zweite Glutaminsynthetase GS II, kodiert durch *glnII* (Fink *et al.*, 1999).

Die Genregion der identifizierte Glutaminsynthetase I von *So ce56* ist in Abbildung 7.9. dargestellt.

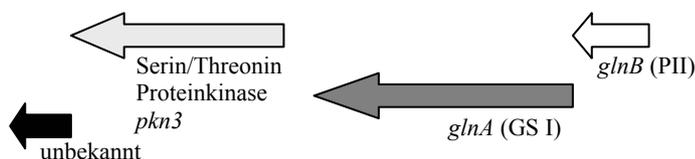


Abb.7.9.: Genetische Organisation der *glnA*-Region in *So ce56*. *pkn3* (sce_20050509_6662), *glnA* (sce_20050509_6663); *glnB* (sce_20050509_6664)

Die Glutaminsynthetase kann in *E. coli* und vielen anderen Bakterien mit Hilfe der Adenylylierung durch die Zugabe von ATP modifiziert werden. Dies wird durch PII und

der Uridylyltransferase (GlnD) reguliert (Paz-Yepes *et al.*, 2003). Entsprechende Gene konnten im Genom von *So ce56* identifiziert werden.

Die Banden der Glutaminsynthetase I von *So ce56* und *Soce:pkn859* zeigten im Gel einen deutlichen Größenunterschied. Untersuchungen der Aminosäuresequenz des identifizierten GlnA Proteins (Abb. 7.10.) zeigen eine potentielle ATP Bindungsstelle sowie eine potentielle Adenylylierungsstelle (rot)

```

1  MKAKDVVAFK KENDVKFVDL KFIDLPGIWQ HTTPASRLN EDLFEEGIGF DGSSVRGWQP 60
61  INASDMLMTP DPSTAKLDPF HAQKTLSMIC KISDPVTGQP YGRDPRYIAQ KAENHLRASG 120
121 IADTSYFGPE AEFVFDVSVR YESSQRGAFY EIDSDEAVWN SGKAGPNLGH KIRSKEGYFP 180
181 VAPTDTLGDL RGQMMSTLIE TGIAVEVGHH EVASAGQCEI GIKFSTLTSM ADNLMWFKYV 240
241 IKNVGRKNGK SVTFMPKPLF GDNGSGMHCH QSLWKEGKPL FAGDGYAGMS DTGLWYIGGI 300
301 LKHAKALAAL TNPTTNSYRR LVPGYEAPVN LAYSSRNRSA SIRIPLAPGN SPKGRRIEVR 360
361 FPDASCNPYL AFAAMMAGL DGVQNRIDPG DPLDKDIYAL SPEELKEVPH MPGLSDEALG 420
421 ALERDHEFLL RGDVFTRDII KTWLDYKRER EVDVRLRPV PHEFFLYYDV 450

```

Abb. 7.10.: Aminosäuresequenz von GlnA (sce_20050509_6663) aus *So ce56*. Unterstrichene Bereiche zeigen die Übereinstimmungen mit der MALDI-TOF Analyse. Rot gekennzeichnete Bereich deutet die potentielle Adenylylierungsschnittstelle an, der blau gekennzeichnete Bereich zeigt die potentielle ATP-Bindungsstelle

Zusätzlich konnte das Trypsin Fragment aus dem GlnA Protein der *pkn859*-Mutante identifiziert werden. Dieses Fragment fand man nicht bei der Analyse des GlnA Proteins aus dem Wildtyp. Stattdessen wurde eine Masse detektiert, die diesem Fragment in einer einfachen phosphorylierten Form entsprechen könnte. Eine Phosphorylierung eines GlnA Proteins ist bisher noch nicht beschrieben.

In einer Studie von Shapiro (1969), in der die Komponenten des Regulationssystems der Glutaminsynthetase-Aktivität in *E. coli* untersucht wurde, konnte das PII-Protein im zweiten Elutionspeak eines Gelfiltrationslaufes entdeckt werden und erhielt den Namen GlnB. Das PII-Signalprotein wird in *E. coli* durch die Uridylyltransferase GlnD uridylyliert. Auf diese Uridylylierung des PII-Proteins wirkt sich jedoch auch der zelluläre Glutaminspiegel aus. Als Antwort auf Stickstoffmangel kommt es zu einer Akkumulation von 2-Oxoglutarat in der Zelle. Dieses bindet an das PII-Protein, welches dadurch in seiner Konformation stabilisiert wird, die eine Uridylylierung durch die Aktivität der bifunktionellen Uridylyltransferase begünstigt. Die Uridylyltransferase (GlnD) in *E. coli* katalysiert die Uridylylierung des PII-Proteins. Das uridylylierte PII-Protein stimuliert nun die Deadenylylierung der GS. Die deadenylylierte GS ist die aktive Form des Enzyms. Ist

die Umgebung reich an Stickstoff, so ist auch die Konzentration an Glutamin hoch und das uridylylierte PII-Protein wird wieder deuridylyliert. Die Konzentration des 2-Oxoglutarats (= α -Ketoglutarat) nimmt wieder ab. Im Gegenzug wird die GS adenylyliert und somit wieder inaktiv.

Der Mechanismus der Signalwahrnehmung durch PII-Proteine basiert auf der Bindung von Effektormolekülen, hauptsächlich ATP und α -Ketoglutarat (Kamberov *et al.*, 1995; Forchhammer und Hedler, 1997; Jiang *et al.*, 1998). Diese Effektormoleküle binden in Synergie an das PII-Protein. In *E. coli* verstärkt ATP die Bindung von α -Ketoglutarat, während in Cyanobakterien α -Ketoglutarat nur an ATP-ligandierte PII-Proteine binden kann. Bei Änderungen der zellulären Kohlenstoff-Stickstoff-Balance können PII-Proteine an einem Aminosäurerest an der Spitze des flexiblen T-Loops kovalent modifiziert werden. Die unterschiedlichen Modifikationszustände ermöglichen die Interaktion des PII-Proteins mit verschiedenen Rezeptorproteinen. Jedoch ist die Modifikationsart der PII-Proteine nicht universell. In Proteobakterien wird der Tyrosinrest 51 von dem bifunktionelle Enzym Uridylyltransferase/Uridylylremovase (UTase/UR; kodiert von *glnD*) uridylyliert/deuridylyliert (Jaggi *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1998a). In den Actinobakterien *Streptomyces coelicolor* und *Corynebacterium glutamicum* ist der Tyrosinrest 51 des PII-Proteins konserviert und ein GlnD-homologes Protein konnte identifiziert werden. Jedoch wird in diesen Bakterien der Tyrosinrest 51 von dem GlnD-Protein adenylyliert/deadenylyliert (Hesketh *et al.*, 2002; Strösser *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu wird in Cyanobakterien, mit Ausnahme der *Prochlorococcus*-Stämmen, nicht der Tyrosinrest 51, sondern der Serinrest 49 phosphoryliert (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1994 und 1995; Laurent *et al.*, 2004). In marinen Prochlorococcen (Palinska *et al.*, 2002), wie auch in Firmibakterien (Wray *et al.*, 1994; Detsch und Stülke, 2003) und Pflanzen (Smith *et al.*, 2004) wird das PII-Protein offenbar nicht modifiziert.

Die Phosphoproteinanalyse zeigte ein kleines Protein im Wildtyp Extrakt, das in der Mutante nahezu fehlte. Ob PII in *So ce56* aber wirklich phosphoryliert wird, müssen zukünftige Analysen zeigen.

Analysen im Genom von *S. cellulosum* identifizierten *glnA* (kodiert Glutaminsynthetase I, sce_20050509_6663), *glnB* (kodiert PII-Protein, sce_2005050509_6664), *glnD* (kodiert Uridylyltransferase, sce_20050509_2942) und *glnE*, (kodiert Adenyltransferase, sce_20050509_1696). Über die Möglichkeit Stickstoff zu fixieren und den daraus resultierende Ablauf der Stickstofffixierung in *So ce56* ist gar nichts bekannt. Die Identifizierung von GlnD lässt vermuten, dass es sich hierbei um eine ähnliche

Stickstoffregulierung wie in *E. coli* handelt. In *E. coli* führt Stickstoffüberschuss zu einer Erhöhung des zellulären Glutaminspiegels. Diese Änderung wird von UTase/UR (GlnD) registriert, wodurch modifiziertes PII (PII-UMP) von der Uridylylremovase-Aktivität des GlnD-Proteins deuridylyliert wird. PII kann nun das bifunktionale Enzym Adenyltransferase (ATPase; *glnE*) binden (Jaggi *et al.*, 1997).

Neben GlnB besitzt *E. coli* ein weiteres PII-homologes Protein, GlnK. Da das *glnK*-Gen mit *amtB* ein Operon bildet und dessen Transkription von NtrC kontrolliert wird, liegt GlnK nur unter Stickstofflimitierung in der Zelle vor. Dieses Protein kann wie GlnB uridylyliert werden. In *So ce56* konnte kein weiteres PII-homologes Protein identifiziert werden. NtrC ist ein *response regulator*-Protein. Gene, die solche Proteine kodieren, finden sich zahlreich im *So ce56*-Genom, welches davon tatsächlich ein Protein mit NtrC-Funktion kodiert kann ohne Experiment nicht gesagt werden.

In Cyanobakterien wird die Stickstoffregulierung nicht durch eine PII-Uridylylierung, sondern durch eine PII-Phosphorylierung reguliert (Forchhammer und Tandeau de Marsac, 1994 und 1995).

PII-Westernblot Analysen zeigten eine PII Akkumulation im Wildtyp, jedoch abgeschwächt in *Soce:pkn859*. Es ist nicht auszuschließen, dass Pkn859 Teil einer Phosphorylierungskaskade ist, die für die von Stickstoff relevanten Proteinen (PII und/oder GlnA) benötigt wird. Sollte cAMP eine Rolle bei der Aktivierung einer solchen Kaskade spielen, würde durch einen solchen Mechanismus Signale des Kohlenstoffmangels mit dem des Stickstoffmangels verknüpft werden.

Insgesamt haben die erzielten Ergebnisse und Vergleiche zwischen *So ce56* und stringenter Kontrolle zur Identifizierung interessanter Proteine geführt. Interessant ist, dass offenbar die Expression des *Chivosazol*- und *asgA*-Operons nicht positiv aktiviert wird, sondern durch NtcA reprimiert wird. Darüber hinaus wurden 2 weitere NtcA-ähnliche Proteine gefunden, die in der stringenten Mutante kaum akkumulieren. Interessant wäre, es die *targets* dieser Proteine zu identifizieren.

8. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, den Bezug zwischen der morphologischen und der physiologischen Differenzierung und der stringenten Kontrolle in *Sorangium cellulosum* *So ce56* zu untersuchen und Regulatoren der Differenzierungsprozesse zu identifizieren.

1. Die Analysen am auto-annotiertem Genom von *So ce56* identifizierten ein *relA_spoT*-homologes Gen. Dabei handelte es sich um eine (p)ppGpp-Synthetase III. Es wurde eine *rel*-Insertionsmutante in *So ce56* konstruiert.
2. *Soce:relint* war nicht in der Lage, unter Nährstoffmangelbedingungen zu differenzieren. Zudem zeigte sie einen Defekt in der Sekundärmetabolit-Produktion von Chivosazol A und Etnangien.
3. Wachstumsversuche zeigten keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante. Weitere Analysen identifizierten jedoch eine verminderte Lebensfähigkeit von *Soce:relint* Zellen.
4. Westernblot-Analysen zeigten, dass *Soce:relint* in der Lage ist, ein verkürztes Rel-Protein zu akkumulieren. Das dazugehörige mRNA-Transkript konnte durch Northernblot-Analysen jedoch nicht gezeigt werden.
5. Die Auswertung der Dünnschichtchromatographie ergab, dass *Soce:relint* einen minimalen Level von ppGpp produzierte. Da keine weiteren ppGpp Synthetase kodierenden Gene im *So ce56* Genom identifiziert wurden, muss *Soce:relint* noch in der Lage sein, minimale Mengen an ppGpp zu produzieren. Zudem zeigte *Soce:relint* immer dann reduzierte GTP-Level, wenn der Wildtyp ppGpp synthetisierte. Dagegen waren unter günstigen Wachstumsbedingungen die GTP-Level in beiden Stämme identisch.
6. Die Ergebnisse der RealTime RT-PCR deuteten an, dass in *Soce:relint* wichtige Regulatoren und/oder Transkriptionsaktivatoren fehlten, die für die Expression der differenzierungsspezifischen Gene oder Operons benötigt wurden.
7. 2D-Gel Analysen mit Zellen aus der stationären Phase zeigten, dass *Soce:relint* eine stark eingeschränkte Proteinneusynthese vollzieht. Dadurch ergaben sich Akkumulationsunterschiede in Bezug auf Nukleosiddiphosphat-Kinase und diverse Hitzeschockproteine und Chaperone.
8. Mit Hilfe des Biotin/Streptavidin Affinitätssystems konnte an den Promotorbereichen der Gene *asgA* und *chivI* in *Soce:relint* das NtcA-Protein als potentieller Transkriptionsrepressor identifiziert werden. Das Vorhandensein von NtcA-ähnlichen Proteinen war zuvor nur von Cyanobakterien bekannt.

9. Analysen an potentiellen DNA-Bindeproteinen, identifizierten Pkn859 eine Serin/Threonin-Kinase. Pkn859 wurde ausschließlich im *So ce56* Extrakt (aus SM+Mannose kultivierten Zellen) gefunden. Eine der ca. 300 Serin/Threonin-Kinasen von *So ce56*, welche nicht im entsprechenden *Soce:relint* Extrakt identifiziert werden konnte.
10. Die entsprechende *Spkn859*-Mutante zeigte einen morphologischen Differenzierungsdefekt. In Bezug auf die physiologische Differenzierung konnte kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden.
11. Eine verminderte Glutaminsynthetase Aktivität und eine wahrscheinlich damit einhergehende fehlende Modifikation dieses Enzyms in der Mutante, deuten einen direkten oder indirekten Defekt der Mutante in der Stickstoffregulation an.

9. Literaturverzeichnis

A

Anagnostopoulos, C. and Spizizen, J. 1961. Requirements for transformation in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* **81**: 741-746.

B

Belitskii, B. R., Kulakauskas, S. T., Sukhodolets, V. V. and Shakulov, R. S. 1986. [Precise mapping of the *gpp* gene involved in guanosine tetraphosphate synthesis and *ilvC-gpp* deletion in the region of the *Escherichia coli* chromosome]. *Genetika* **22**: 2775-2783.

Bender, R. A., Janssen, K. A., Resnick, A. D., Blumenberg, M., Foor, F. and Magasanik, B. 1977. Biochemical parameters of glutaminyl synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* **129**: 1001-1009.

Bibb, M. J. 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr.t opin. in Microbiol.* **8**: 208-215.

Birnboim, H. C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc. Acids Res.* **7**: 1513-1523.

Block, W. and Pingoud, A. 1981. The identification and analysis of nucleotides bound to the elongation factor Tu from *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **114**: 112-117.

Bollag, D. M. 1997. Epothilones: novel microtubule-stabilising agents. *Expert Opin. Investig. Drugs* **6**: 867-873.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **7**: 248-254.

C

Chakrabarty, A. M. 1998. Nucleoside diphosphate kinase: role in bacterial growth, virulence, cell signalling and polysaccharide synthesis. *Mol. Microbiol.* **28**: 875-882.

Chakrabarty, R., White, J., Takano, E. and Bibb, M. 1996. Cloning, characterization and disruption of a (p)ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **19**: 357-368.

Chakrabarty R. and Bibb M. 1997. The ppGpp Synthetase Gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J. Bacteriol.* **179**: 5854-5861.

Cho, K. and Zusman, D. R. 1999. Sporulation timing in *Myxococcus xanthus* is controlled by the espAB locus. *Mol. Microbiol.* **34**:714-725.

Cohen-Kupies, R, Zilberstein, A. and Gurevitz, M. 1995. Characterization of cis elements that regulate the expression of *glnA* in *Synechococcus sp.* strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* **177**: 2222-2226.

D

Demain, A. L. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 455-463.

Detsch, C. and Stülke, J. 2003. Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. *Microbiology* **149**: 3289-3297.

Dower, W. J., Miller, J. F. and Ragsdale, C. W. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**: 6127-6145.

Dworkin, M. 1962. Nutritional requirements for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **84**: 250-257.

E

Edelmann, P., Martin, R. and Gallant, J. 1987. Nonsense suppression context effects in *Escherichia coli* bacteriophage T4. *Mol. Gen. Genet.* **207**: 517-518.

Eymann, C., Mittenhuber, G. and Hecker, M. 2001. The stringent response, σ^H -dependent gene expression and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **264**: 913-923.

Eymann, C., Homuth, G., Scharf C. and Hecker, M. 2002. *Bacillus subtilis* functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* **184**: 2500-2520.

F

Fink, D., Falke, D., Wohlleben, W. and Engels, A. 1999. Nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2): modification of glutamine synthetase I by an adenylyltransferase. *Microbiol.* **145**: 2313-2322.

Forchhammer, K. and Tandeau de Marsac, N. 1994. the PII protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. *J. Bacteriol.* **176**: 84-91.

Forchhammer, K. and Tandeau de Marsac, N. 1995. Phosphorylation of the PII protein (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: analysis of in vitro kinase activity. *J. Bacteriol.* **177**: 5812-5817.

Forchhammer, K. and Hedler, A. 1997. Phosphoprotein PII from cyanobacteria-analysis of functional conservation with the PII signal-transduction protein from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **244**: 869-875.

Frias, J. E., Flores, E. and Herrero, A. 1994. Requirement of the regulatory protein NtcA for the expression of nitrogen assimilation and heterocyst development genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* **14**: 823-832.

Friedrich, B., Hogrefe, C and Schlegel, H. G. 1981. Naturally occurring genetic of hydrogen-oxidizing ability between strains of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **147**: 198-205.

Friesen, J. D., Fill, N. P., Parker, J. M. and Haseltine, W. A. 1974. A new relaxed mutant of *Escherichia coli* with an altered 50S ribosomal subunit. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **71**: 3465-3469.

G

Gallant, J. and Margason, G. 1972. Amino acid control of messenger ribonucleic acid synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **247**: 2289-2294.

Gentry, D. R. and Cashel, M. 1996. Mutational analysis of the *Escherichia coli* *spoT* gene identifies distinct but overlapping regions involved in ppGpp synthesis and degradation. *Mol. Microbiol.* **19**: 1373-1384.

Gerth, K., Schummer, D., Hofle, G., Irschik, H. and Reichenbach, H. 1995. Ratjadon: a new antifungal compound from *Sorangium cellulosum* (myxobacteria) production, physicochemical and biological properties. *J. Antibiot.* **48**: 973-976.

Gerth, K., Steinmetz, H., Hofle, G. And Reichenbach, H. 1996. Studies on the biosynthesis of epothilones: hydroxylation of Epo A and B to epothilones E and F. *J. Antibiot.* **55**: 41-45.

Gibson, U. E., Heid., C. A. and Williams, P. M. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* **6**: 995-1001.

Grabley, S. and Thiericke, R. 1999. Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **64**: 101-154.

Gropp, M., Eizenman, E., Glaser, G., Samarrai, W. and Rudner, R. 1994. A *relA(S)* suppressor mutant allele of *Bacillus subtilis* which maps to *relA* and responds only to carbon limitation. *Gene* **11**: 91-96.

H

Harris, B. Z., Kaiser, D. and Singer M. 1998. The guanosine nucleotide (p)ppGpp initiates development and A-factor production in myxococcus xanthus. *Genes Dev.* **12**:1022-35.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. and Williams, P. M. 1996. Real Time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**: 986-994.

Hernandez, J. V. and Bremer, H. 1991. *Escherichia coli* ppGpp Synthetase II Activity Requires spoT*. *J. Biol. Chem.* **266**: 5991-5999.

Hernandez, J. V. and Cashel, M. 1995. Changes in conserved region 3 of *Escherichia coli* σ^{70} mediate ppGpp-dependent functions *in vivo*. *J. Mol.Biol.* **252**: 536-549.

Hesketh, A., Sun, J. and Bibb, M. 2001. Induction of ppGpp synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown under conditions of nutritional sufficiency elicits *actII-ORF4* transcription and actinorhodin biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **39**: 136-144.

Hesketh, A., Fink, D., Gust, B., Rexer, H. U., Scheel, B., Chater, K., Wohlleben, W. and Engels, K. 2002. The GlnD and GlnK homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2) are functionally dissimilar to their nitrogen regulatory system counterparts from enteric bacteria. *Mol. Microbiol.* **46**: 319-330.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* **11**: 1026-1030.

Hilton, J. L., Kearney, P. C. and Ames, B. M. 1965. Mode of action of the herbicide, 3-amino-1,2,4-triazole(amitrol): inhibition of an enzyme of histidine biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **112**: 544-547.

Hochstadt-Ozer, J. and Cashel, M. 1972. The regulation of purine utilization in bacteria. V. inhibition of purine phosphoribosyltransferase activities and purine uptake in isolated membrane vesicles by guanosine tetraphosphate. *J. Biol. Chem.* **247**:7067-7072.

Höfle, M., L., Blouin, L., T., Fleming, R., W., Hastings, S., Hinkley, J., M., Mertz, T., E., Steffe, T., J., Stratton, C., S. and Werbel, L., M. 1991. Synthesis and antiarrhythmic activity of alpha-[(diarylmethoxy)methyl]-1-piperidineethanols. *J. Med. Chem.* **34**: 7-12.

Hoog, T., Mechold, U., Malke, H., Cashel, M. and Hilgenfeld, R. 2004. Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p)ppGpp metabolism during the stringent response. *Cell.* **117**: 57-68.

Hueck, C., J. and Hillen, W. 1995. Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the Gram-positive bacteria? *Mol. Microbiol.* **15**: 395-401.

Hunter, T. 1995. When is a lipid kinase not a lipid kinase? When it is a protein kinase. *Cell.* **9**:1255-1266.

I

Inaoka, T., Takahashi, K., Ohnishi-Kameyama, M., Yoshida, M. and Ochi, K. 2003. Guanine nucleotides guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate and GTP co-operatively regulate the production of an antibiotic Bacilysin in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chemistry.* **278**: 2169-2176.

Irschik, H., Jansen, R., Gerth, K., Höfle, G. and Reichenbach, H. 1987. The sorangicins, novel and powerful inhibitors of eubacterial RNA polymerase isolated from myxobacteria. *J. Antibiot.* **40**: 7-13.

J

Jain, R. and Inouye, S. 1998. Inhibition of development of *Myxococcus xanthus* by eukaryotic protein kinase inhibitors. *J. Bacteriol.* **180**: 6544-6550.

Jaggi, R., Ybarlucea, W., Cheah, E., Carr, P. D., Edwards, K. J., Ollis, D. L. and Vasudevan, S. G. 1996. The role of the T-loop of the signal transducing protein PII from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **391**: 223-228.

Jaggi, R., van Heeswijk, W. C., Westerhoff, H. V., Ollis, D. L. and Vasudevan, S. G. 1997. The two opposing activities of adenylyl transferase reside in distinct homologous domains, with intramolecular signal transduction. *EMBO J.* **16**: 5562-5571.

Jarman, K. H., Cebula, S. T., Saenz, A. J., Petersen, C. E., Valentine, N. B., Kingsley, M. T. and Wahl, K. L. 2000. An algorithm for automated bacterial identification using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **72**: 1217-1223.

- Jenal, U. 2004. cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating structures in Bacteria? *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 185-191.
- Jiang F., Mannervik, B. and Bergman, B. 1997. Evidence for redox regulation of the transcription factor NtcA, acting both as an activator and a repressor, in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Biochem. J.* **327** :513-517.
- Jiang, P., Peliska, J. A. and Ninfa, A. J. 1998. The regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase revisited: role of 2-ketoglutarate in the regulation of glutamine synthetase adenylation state. *Biochemistry* **37**: 12802-12810.
- Jiang, P., Peliska, J. A. and Ninfa, A. J. 1998a. Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein. *Biochemistry* **37**: 12782-12794.
- Jin, W., Ryu, Y. G., Kang, S. G., Kim, S. K., Saito, N., Ochi, K., Lee, S. H. and Lee, K. J. 2004. Two *relA/spoT* homologous genes are involved in the morphological and physiological differentiation of *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiol.* **150**: 1485-1493.
- Jones, G. H. 1994. Purification and properties of ATP: GTP 3'-pyrophosphotransferase (guanosine pentaphosphate synthetase) from *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.* **176**: 1475-1481.
- Jung, H.-Y. 2003. First complete nucleotide sequence and heterologous gene organization of the two rRNA operons in the phytoplasm genome. *DNA and Cell Biol.* **22**: 209-215.
- K**
- Kamberov, E. S., Atkinson, M. R. and Ninfa, A. J. 1995. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. *J. Biol. Chem.* **270**: 17797-807.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. II Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**: 109-136.
- Kikuchi, H., Saito, Y., Komiya, J., Takaya, Y., Honma, S., Nakahata, N., Ito, A. and Oshima, Y. 2001. Furanodictine A and B: amino sugar analogues produced by cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* showing neuronal differentiation activity. *J. Org. Chem.* **66**: 6982-6987.
- Knauth, P. and Reichenbach, H. 2000. On the mechanism of action of the myxobacterial fungicide ambruticin. *J. Antibiot* **53**: 1182-1190.
- Kopp, M., Irschik, H., Gross, F., Perlova, O., Sandmann, A., Gerth, K. and Müller R. 2004. Critical variations of conjugational DNA transfer into secondary metabolite multiproducing *Sorangium cellulosum* strain So ce12 and So ce56: development of *mariner*-based transposon mutagenesis system. *J. Biotech.* **107**: 29-40.

L

Laffler T. and Gallant, J. A. 1974. Stringent control of protein synthesis in *E. coli*. *Cell*. **3**: 47-49.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Laurent, S., Forchhammer, K., Gonzalez, L., Heulin, T., Zhang, C. C., Bedu, S. 2004. Cell-type specific modification of PII is involved in the regulation of nitrogen metabolism in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *FEBS Lett.* **576**: 261-5.

Lederberg, J. 1996. Genetic recombination in *Escherichia coli*: Disputation at cold spring harbor, 1946-1996. *Genetic Society of America*. **144**: 439-445.

Lopez, J. M., Dromerick, A. and Freese, E. 1981. Response of guanosine 5'-triphosphate concentration to nutritional changes and its significance for *Bacillus subtilis* sporulation. *J. Bacteriol.* **146**: 605-613.

Ludwig, L. 1983. Staff managment and motivation. *Biomed. Commun.* **11**: 20-22.

Luque, I., Flores, E. and Herrero, A. 1994. Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *EMBO J.* **13**: 5794.

Luzhetskii, A. N., Ostash, B. E. and Fedorenko, V. A. 2001. Interspecies conjugation of *Escherichia coli*-*Streptomyces globisporus* 1912 using integrative plasmid pSET152 and its derivatives. *Genet.* **37**: 1340-1347.

M

Mac Neil, J., Gewain, K. M., Ruby, C. L., Dezeny, G., Gibbons, P. H. and Mac Neil, T. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* **111**: 61-68.

Mäder, U., Antelmann, H., Buder, T., Dahl, M. K., Hecker, M. and Homuth, G. 2002. *Bacillus subtilis* functional genomics: genome-wide analysis of the DegS-DegU regulon by transcriptomics and proteomics. *Mol. Genet. Genomics* **268**: 455-467.

Mandel, M. and Leadbetter E. R. 1965. Deoxyribonucleic acid base composition of myxobacteria. *J Bacteriol.* **90**:1795-6.

Manoil, C., Kaiser, D. 1980. Guanosine pentaphosphate and guanosine tetraphosphate accumulation and induction of *Myxococcus xanthus* fruiting body development. *J. Bacteriol.* **141**: 305-315.

Manoil, C. and Kaiser, D. 1980. Accumulation of guanosine tetraphosphate in *Myxococcus xanthus* during starvation and myxospore formation. *J. Bacteriol.* **141**: 297-304.

Martinez-Costa, O. H., Arias, P., Romero, N. M., Parro, V., Mellado, R. P. and Malpartida, F. 1996. A *relA/spoT* homologous gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2) controls antibiotic biosynthetic genes. *J Biol Chem.* **271**: 10627-10634.

- Martínez-Costa, O. H., Fernandez-Moreno, M. A. and Malpartida, F. 1998. The *relA/spoT*-homologous gene in *Streptomyces coelicolor* encodes both ribosome-dependent (p)ppGpp-synthesizing and -degrading activities. *J. Bacteriol.* **180**: 4123-32.
- Matsumoto A., Hong, S. K., Ishizuka, H., Horinouchi, S. and Beppu, T. 1994. Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene* **146**: 47-56.
- Mc. Bride, M. J., Köhler, T., and Zusman, D. R. 1992. Methylation of FrzCD, a methyl-accepting taxis protein of *Myxococcus xanthus*, is correlated with factors affecting cell behavior. *J. Bacteriol.* **174**: 4246-4257.
- Mc Curdy, H. D. and Wolf, S. 1967. Deoxyribonucleic acid base compositions of fruiting Myxobacterales. *Can. J. Microbiol.* **13**: 1707-1708.
- Mechold, U., Cashel, M., Steiner, K., Gentry, D. and Malke, H. 1996. Functional analysis of a *relA/spoT* gene homolog from *Streptococcus equisimilis*. *J. Bacteriol.* **178**: 1401-1411.
- Mechold, U., Murphy, H., Brown, L. and Cashel, M. 2002. Intramolecular regulation of the opposing (p)ppGpp catalytic activities of Rel_{Seq}, the Rel/Spo enzyme from *Streptococcus equisimilis*. *J. Bacteriol.* **184**: 2878-2888.
- Meeks, J. C. and Elhai, J. 2002. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 94-121.
- Metzger, S., Dror, I. B., Aizenman, E., Schreiber, G., Toone, M., Friesen, J. D., Cashel, M. and Glaser, G. 1988. The nucleotide sequence and characterization of the *relA* gene of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**: 15699-15704.
- Morrison, T. B., Weis, J. J. and Wittwer, C. T. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **24**: 954-958, 960, 962.
- Motley, S. T. and Lory, S. 1999. Functional characterization of a serine/threonine protein kinase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. and Immun.* **67**: 5386-5394.
- Müller, C. and Dworkin, M. 1991. Effects of glucosamine on lysis, glycerol formation, and sporulation in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **173**: 7164-7175.
- Müller, R. and Gerth, K. accepted. Development of simple media which allow investigations into the global regulation of chivosazol biosynthesis with *Sorangium cellulosum* So ce56. *J. Biotechnol.*(accepted)
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350.
- Murray, D. K. and Bremer, H. 1996. Control of *spoT*-dependent ppGpp synthesis and degradation in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **259**: 41-57.

N

Nariya, H., and Inouye, S. 2005. Identification of a Ser/Thr kinase cascade that regulates essential transcriptional activators in *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* **58**: 367-379.

Ninfa, A. J. and Atkinson, M. R. 2000. PII signal transduction proteins. *Trends Microbiol.* **8**: 172-179.

Ninfa, A. J. and Jiang, P. 2005. PII signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 168-173.

Nishino, T., Gallant, J., Shalit, P., Palmer, L. and Wehr, T. 1979. Regulatory nucleotides involved in the Rel function of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **140**: 671-679.

Norén, B. and Raper, K. B. 1962. Antibiotic activity of myxobacteria in relation to their bacteriolytic capacity. *J. Bacteriol.* **84**: 157-162.

Nováková, L., Sasková, L., Pallová, P., Janeček, J., Novotná, J., Ulrych, A., Echenique, J., Trombe, M.-C. and Branny, P. 2005. Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates. *FEBS* **272**: 1243-1254.

O

O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.

Ochi, K., Kandala, J. C. and Freese, E. 1981. Initiation of *Bacillus subtilis* sporulation by the stringent response to partial amino acid deprivation. *J. Biol. Chem.* **256**: 6866-6875.

Ochi, K. 1986. A decrease in GTP content is associated with aerial mycelium formation by *Streptomyces griseus* MA406-A-1. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 299-305.

Ochi, K. 1987. Metabolic initiation of differentiation and secondary metabolism by *Streptomyces griseus*: significance of the stringent response (ppGpp) and GTP content in relation to A factor. *J. Gen. Microbiol.* **169**: 3608-3616.

Ogilvie, A., Wiebauer, K. and Kersten, W. 1975. Stringent control of ribonucleic acid synthesis in *Bacillus subtilis* treated with Granaticin. *Biochem. J.* **152**: 517-522.

Östling, J., Homquist, L. and Kjelleberg, S. 1996. Global analysis of the carbon starvation response of a marine *Vibrio* species with disruptions in genes homologous to *relA* and *spoT*. *J. Bacteriol.* **178**: 4901-4908.

P

Palinska, K. A., Laloui, W., Bedu, S., Loiseaux-de Goer, S., Castets, A. M., Rippka, R. and Tandeau de Marsac, N. 2002. The signal transducer P(II) and bicarbonate acquisition in *Prochlorococcus marinus* PCC 9511, a marine cyanobacterium naturally deficient in nitrate and nitrite assimilation. *Microbiology* **148**: 2405-2412.

Parker, J., Watson, R. J. and Friesen, J. D. 1976. A relaxed mutant with an altered ribosomal protein L11. *Mol. Gen. Genet.* **144**: 111-114.

Paz-Yepes, J., Flores, E. and Herrero A. 2003. Transcriptional effects of the signal transduction protein P(II) (*glnB* gene product) on NtcA-dependent genes in *Synechococcus* sp. PCC 7942. *FEBS Lett.* **543**: 42-46.

Petřičková, K. and Petřiček, M. 2003. Eukaryotic-type protein kinases in *Streptomyces coelicolor*. Variations on a common theme. *Microbiol.* **149**: 1609-1621.

Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in RealTime RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**: 2002-2007.

Pingoud, A. and Urbanke, C. 1997. Arbeitsmethoden der Biochemie. *Walter de Gruyter & Co.*, D-10785 Berlin.

Pieper, U., Schweitzer, T., Groll, D. H., Gast, F.-U. and Pingoud, A. 1999. The GTP-binding domain of McrB: more than just a variation on a common theme? *J. Mol. Biol.* **292**: 547-556.

Pradella, S., Hans, A., Spröer, C., Reichenbach, H., Gerth, K. and Beyer, S. 2002. Characterization, genome size and genetic manipulation of the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56. *Arch. Microbiol.* **178**: 484-492.

R

Rasmussen, A. A., Eriksen, M., Gilany, K., Udesen, C., Franch, T., Petersen, C. and Valentin-Hansen, P. 2005. Regulation of *ompA* mRNA stability: the role of a small regulatory RNA in growth phase-dependent control. *Mol. Microbiol.* **58**: 1421-1429.

Reichenbach, H. and Dworkin, M. 1991. The myxobacteria. *The Prokaryotes.* **4**: 3416-3488. A Handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application. 1991. *Springer-Verlag*.

Reichenbach, H. 1993. Biology of the Myxobacteria: Ecology and Taxonomy. Myxobacteria II *American society for Microbiology, Washington DC*: 1-13.

Reichenbach, H. 1999. The ecology of the myxobacteria. *Environ. Microbiol.* **1**: 15-21.

Robertson, E. F., Dannelly, H. K., Malloy, P. J. and Reeves, H. C. 1987. Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Anal. Biochem.* **167**: 290-294.

S

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Cold Spring Harbor USA*.

Sarubbi, E., Rudd, K. E., Xiao, H., Ikehara, K., Kalman, M. and Cashel, M. 1989. Characterization of the *spoT* gene of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**: 15074-15082.

Schreiber, G., Metzger, S., Aizenman, E., Roza, S., Cashel, M. and Glaser G. 1997. Overexpression of the *relA* gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**: 3760-3767.

Seeburg, P. H., Martial, J. A., Baxter, J. D. and Goodman, H. M. 1977. Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone. *Nature* **270**: 486-494.

- Senior, P. J. 1975. Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous cultur technique. *J. Bacteriol.* **123**: 407-418.
- Shapiro, B. M. 1969. The glutamine synthetase deadenylylating enzyme system from *Escherichia coli*. Resolution into two components, specific nucleotide stimulation, and cofactor requirements. *Biochemistry* **8**: 659-670.
- Singer, M. and Kaiser, D. 1995. Ectopic production of guanosine penta- and tetraphosphate can initiate early developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev.* **9**: 1633-1644.
- Smits, W. K., Dubois, J. Y., Bron, S., van Dijl, J. M. and Kuipers, O. P. 2005. Tricky business: transcriptome analysis reveals the involvement of thioredoxin A in redox homeostasis, oxidative stress, sulfur metabolism, and cellular differentiation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **187**: 3921-3930.
- Smith, C. S., Morrice, N. A. and Moorhead, G. B. 2004. Lack of evidence for phosphorylation of *Arabidopsis thaliana* PII: implications for plastid carbon and nitrogen signaling. *Biochem. Biophys. Acta.* **1699**: 145-154.
- Steiner, K. and Malke, H. 2001. *relA*-independent amino acid starvation response network of *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.* **183**: 7354-7364.
- Steitz, T. A., Ohlendorf, D. H., Mc Kay, D. B., Anderson, W. F. and Matthews, B. W. 1982. Structural similarity in the DNA-binding domains of catabolite gene activator and co repressor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 3097-3100.
- Stent, G. S. and Brenner, S. 1961. A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **47**: 2005-2014.
- Streicher, S. L., Bender, R. A. and Magasanik, B. 1975. Genetic control of glutamine synthetase in *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* **121**: 320-331.
- Strauch, E., Takano, E., Baylis, M. A. and Bibb, M. J. 1991. The stringent response *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **5**: 289-298.
- Strösser, J., Ludke, A., Schaffer, S., Kramer, R. and Burkovski, A. 2004. Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **54**: 132-147.
- Stülke, J. and Hillen, W. 2000. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus species*. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 849-880.
- Spector, M. P. and Cubitt, C. L. 1992. Starvation-inducible loci of *Salmonella typhimurium*: regulation and roles in starvation-survival. *Mol. Microbiol.* **6**: 1467-1476.
- Su, Z., Olmann, V., Mao, F. and Xu, Y. 2005. Comparative genomics analysis of NtcA regulons in cyanobacteria: regulation of nitrogen assimilation and its coupling to photosynthesis. *Nucleic Acids Res.* **33**: 5156-5171.

Sun, J., Hesketh, A. and Bibb, M. 2001. Functional analysis of *relA* and *rshA*, two *relA/spoT* homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **183**: 3488-3498.

Swanton, M. and Edlin, G. 1972. Isolation and characterization of an RNA relaxed mutant of *B. subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**: 583-588.

T

Tabachnick, J. and Joslyn, M. A. 1953. Formation of esters of yeast. I. The production of ethyl acetate by standing surface cultures of *Hansenula anomala*. *J. Bacteriol.* **65**: 1-9.

Takaya, Y., Kikuchi, H., Terui, Y., Komiya, J., Furukawa, K. I., Seya, K., Motomura, S., Ito, A. and Oshima, Y. 2000. Novel acyl alpha-pyrone, dictyopyrone A, B, and C, from *Dictyostelium* cellular slime molds. *J. Org. Chem.* **65**: 985-989.

Timmons, T. M. and Dumbar, B. S. 1990. Protein blotting and immunodetection. *Methods Enzymol.* **182**: 679-688.

Tosa, T. and Pizer, L. I. 1971. Biochemical bases for the antimetabolite action of L-serine hydroxamate. *J. Bacteriol.* **106**: 972-982.

U

Ueki, T. and Inouye, S. 2003. Identification of an activator protein required for the induction of *fruA*, a gene essential for fruiting body development in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**: 8782-8787.

Ulrich, R., Levy, L., Kasson, B., Harwick, H. J. and Brammer, G. 1977. Developmental changes of immunoglobulins in rats treated neonatally with hydrocortisone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **154**: 107-111.

Umeyama, T., Lee, P. C. and Horinouchi, S. 2002. Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 419-425.

V

Vega-Palas, M. A., Flores, E. and Herrero, A. 1992. NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of bacterial regulators. *Mol. Microbiol.* **6**: 1853-1859.

W

Wang, J. Y. J. and Koshland, Jr., D. E. 1978. Evidence for protein kinase activities in the prokaryote *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **253**: 7605-7608.

Wendrich, T. M. 1999. <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z1999/0394/>

Wendrich, T. M., Beckering, C. L. and Marahiel, M. A. 2000. Characterization of the *relA/spoT* gene from *Bacillus stearothermophilus*. *FEMS* **190**: 195-201.

Wendrich, T. M., Blaha, G., Wilson, M. A. and Nierhaus, K. H. 2002. Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Mol. Cell* **10**: 779-788.

Wieser, M., Denner, E. B., Kampfer, P., Schumann, P., Tindall, B., Steiner, U., Vybiral D., Lubitz, W., Maszenan, A. M., Patel, B. K., Seviour, R. J., Radax, C. and Busse, H. J. 2002. Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos *et al.*, 1974). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 629-637.

Wireman, J. W. and Dworkin, M. 1977. Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **129**: 798-802.

Wisén, S. 2003. Characterization of the DNA-binding properties of the cyanobacterial transcription factor NtcA. *Summeries of Uppsala Dissertations from the faculty of science and technology*

Wray, L. V. Jr. and Fisher, S. H. 1994. Analysis of *Bacillus subtilis* hut operon expression indicates that histidine-dependent induction is mediated primarily by transcriptional antitermination and that amino acid repression is mediated by two mechanisms: regulation of transcription initiation and inhibition of histidine transport. *J. Bacteriol.* **176**: 5466-5473.

X

Xu, J., Tozawa, Y., Lai, C., Hayashi, H. and Ochi, K. 2002. A rifampicin resistance mutation in the *rpoB* gene confers ppGpp-independent antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Genet. Genomics* **268**: 179-189.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and puC 19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.

Z

Zhang, W., Inouye, M. and Inouye S. 1996. Reciprocal regulation of the differentiation of *Myxococcus xanthus* by Pkn5 und Pkn6, eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases. *Mol. Microbiol.* **20**: 435-447.

Zhang, S. and Haldenwang, W. G. 2003. RelA is a component of the nutritional stress activation pathway of the *Bacillus subtilis* transcriptional factor σ^B . *J. Bacteriol.* **185**: 5714-5721.

Bücher:

Dworkin, M. and Kaiser, D. 1993. Myxobacteria II. *American Society for Microbiology, Washington ,DC.*

Madigan, M. T. and Martinko, J. M. 2005. Brock: Biology of Microorganisms. Eleventh Editions. *Pearson Prentice Hall Upper Saddle River, NJ 07458.*

Munk, K. 2001. Grundstudium Biologie: Mikrobiologie. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.*

Schlegel, H. G. 1992. Allgemeine Mikrobiologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart- New York.*

10. Abkürzungsverzeichnis

A

aa	Aminosäuren
Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicilin
APS	Amoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat

B

Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bzw.	beziehungsweise

C

°C	Grad Celsius
ca.	Circa
cfu	<i>colony forming units</i>
Cm	Chloramphenicol
cm ²	Quadratzentimeter

D

d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynucleotid-triphosphat
DTT	Dithiothreitol

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere

F

FPLC	Fast Performance Liquid Chromatographie
------	---

G

GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat

H

h	Stunden
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hyg	Hygromycin

I	
i.d.R.	in der Regel
K	
Kan	Kanamycin
kb	Kilo-Basen
kDa	Kilo-Dalton
L	
l	Liter
Lsg	Lösung
M	
M	Molar
mA	Miliamper
max.	Maximal
Mg	Magnesium
Mg	Miligramm
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Mililiter
µl	Microliter
mm	Milimeter
mM	milimolar
<i>M. xanthus</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>
N	
N	Stickstoff
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
Ndk	Nukleotiddiphosphatkinase
ng	nanogramm
O	
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
P	
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pmol	picomol
(p)ppGpp	Guanosin-5'-tri-3'-diphosphat
ppGpp	Guanosin-5'-di-3'-diphosphat
R	
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
tRNA	<i>transfer</i> Ribonukleinsäure
rRNA	<i>ribosomale</i> Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur

S*S. celluloseum*

SDS

sec.

s.o.

So ce56

sog.

Srel

s.u.

Sorangium celluloseum Stamm 56

Natriumdodecylsulfat

Sekunde

siehe oben

Sorangium celluloseum Stamm 56

so genannt

Soce:relint

siehe unten

T

t

Tab.

TCA

TEMED

Tris/HCl

Zeit

Tabelle

Trichloressigsäure

Tetramethylethyldiamin

Tris(hydroxymethyl)aminomethan mit HCl
titriert**U**

U

U/min

u.a.

u.U.

UV

unit/ Einheit

Umdrehung pro Minute

unter anderem

unter Umständen

Ultraviolett

V

V

v/v

Volt

Volumen/Volumen

W

W

wt

w/v

Watt

Wildtyp

Masse/Volumen

Z

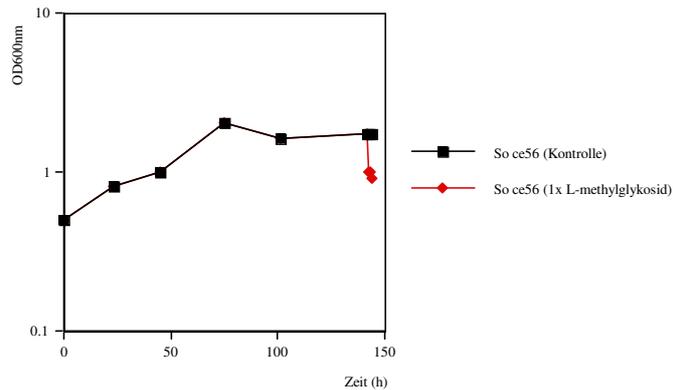
z.B.

zum Beispiel

11. Anhang

4.5. *rel* kodiert die einzige (p)ppGpp-Synthetase in *S. cellulorum*

Wachstumskurve von *So ce56* inkubiert mit α -Methylglykosid



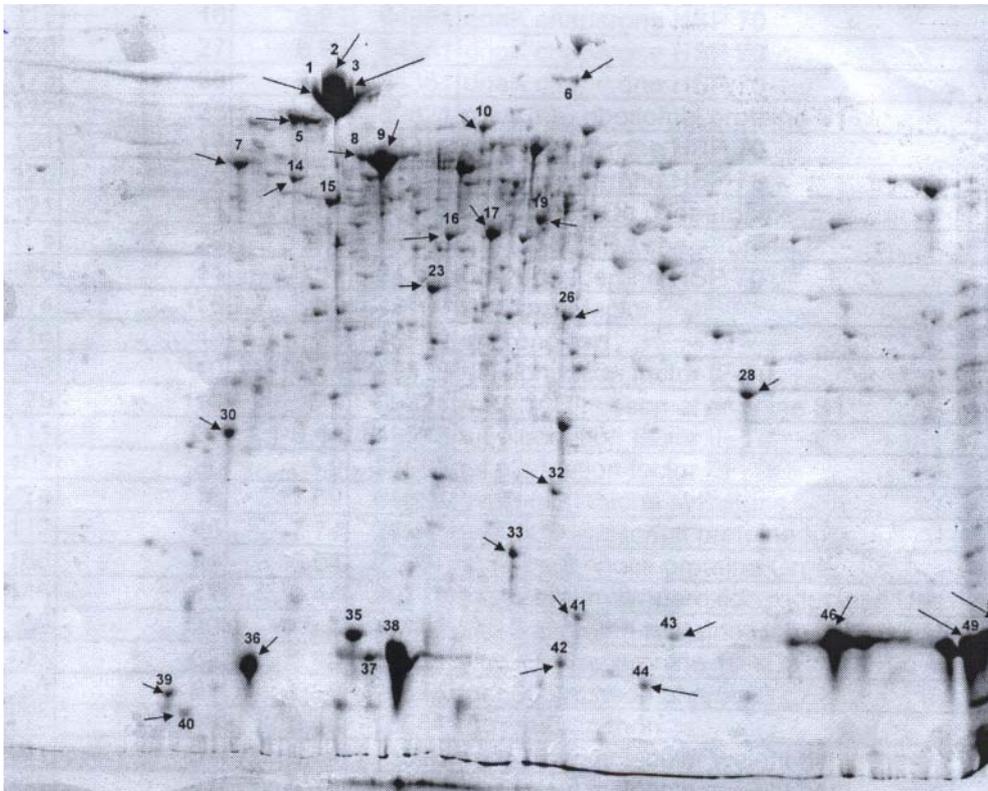
4.6.1. HPLC, quantitative Analyse von Sekundärmetaboliten

Tabelle 4.4.: Daten der HPLC-Analyse

Tag	Chivosazol A (mAU)		Etnangien (mAU)	
	<i>So ce56</i>	<i>Soce:relint</i>	<i>So ce56</i>	<i>Soce:relint</i>
0	598	0	598	0
1	1235	0	1049	0
2	8689	843	3448	648
3	14166	3501	4467	1270
4	17333	4615		1626
5	18746	4711	7012	1575
6		4675		1414

5.1. Zweidimensionale Gelelektrophorese zur Aufklärung der *rel* Defekte

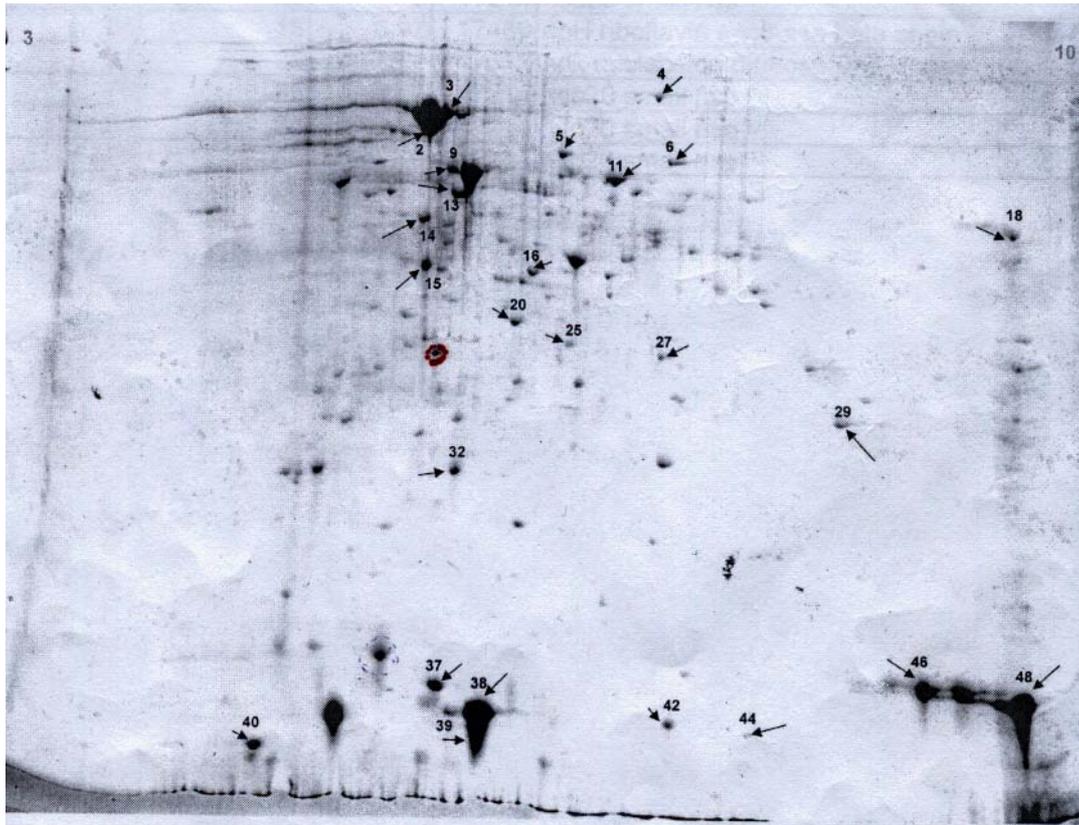
So ce56 stationär



Wildtyp stationäre Phase 14.10.03 (Giessen)

Pr.	Tot. Score	Seq.Cov.%	pi-Wert	Masse	Protein	sce
1	117	16	8,93	84351	dnaK chaperone HSP 70	8269
2	200	27	8,93	84351	dnaK chaperone HSP 70	8269
3	173	28	8,93	84351	dnaK chaperone HSP 70	8269
5	132	28	5,7	69821	rpsA 30S ribosomal proteine S1	3776
6	131	17	8,93	84351	dnaK chaperone HSP 70	8269
7	125	20	8,93	84351	dnaK chaperone HSP 70	8269
8	121	31	5,6	56503	gro EL 60 kDa chaperonine	6561
9	165	29	5,6	56503	gro EL 60 kDa chaperonine	6561
10	80	11	8,93	84351	dnaK chaperone HSP 70	8269
14	74	16	5,33	48197	tig trigger factor	3551
15	216	43	5,35	45942	eno enolase	2753
16	66	10	6,44	43518	tuf elongation factor tF-Tu	1137
17	79	10	5,7	69821	rpsA 30S ribosomal proteine S1	3776
19	111	26	6,44	43518	tuf elongation factor tF-Tu	1137
23	109	30	5,9	33995	tsf elongation factor EF-Ts	3563
26	74	16	11,69	64684	gshB glutathione sythetase	5427
28	112	48	7,74	24141	rplY 50S ribosomal proteine L25	3825
30	166	44	5,04	21062	grpE heat shock proteine GrpE	8568
32	145	47	6,44	20714	ahp c alkylhydroperoxide reductase Uec	3849
33	69	20	6,2	18786	hsp 2 secreted proteine Hcp	766
35	133	62	5,49	10681	gro ES chaperonine 10 kDa	6560
37	90	51	5,12	13435	rpl L50S ribosomal protein L7/L12	2442
38	117	59	5,48	15544	rubY rubrerythrin	3324
39	141	37	5,74	13846	hsp20 low molecular weight hsp	1974
40	111	27	5,74	13846	hsp20 low molecular weight hsp	1974
41	110	46	9	17214	hsp20 small hsp	1973
42	110	46	9	17214	hsp20 small hsp	1973
43	65	18	6,97	17489	ribH riboflavin synthase beta chain	4614
44	67	28	9,1	17512	ndk nucleoside diphosphate kinase	3736
46	75	38	9	17214	hsp20 small hsp	1973
47	88	34	9	17214	hsp20 small hsp	1973
48	106	45	9	17214	hsp20 small hsp	1973

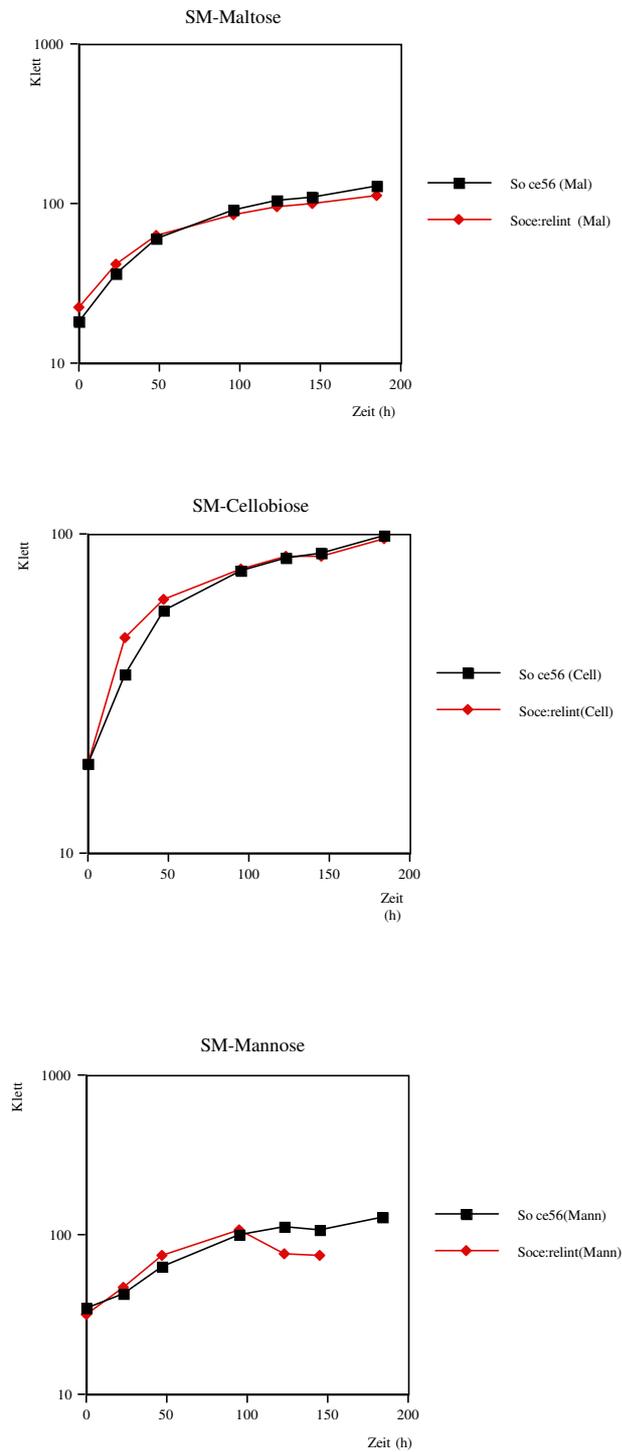
Soce:relint stationär



Stationäre Phase 14.10.03 (Giessen)

	Tot.Score	Seq.Cov.%	pI-Wert	Masse	Protein
2	183	28	8,93	84351	dnaK chaperone HSP 70
3	124	17	8,93	84351	dnaK chaperone HSP 70
4	168	26	6,5	97337	clpB endopeptidase clp ATP-binding chainB
5	185	27	8,93	84351	dnaK chaperone HSP 70
6	86	13	8,43	63527	appA ABC-type dipeptide transport system
9	107	32	7,26	40103	gapA glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogen.
11	111	29	6,31	51033	pykA pyruvate kinase
13	190	35	5,6	56503	gro EL 60kDa chaperonin
14	237	57	5,35	45942	eno enolase
15	111	17	8,93	84351	dnaK chaperone HSP 70
16	76	24	6,44	43518	tu elongation factor EF-Tu
18	79	14	8,89	42968	putative lipoprotein yiiG
20	115	31	5,9	33938	elongations factor EF-Ts
25	134	45	6,19	32865	etfA, etfL electron transfer flavoprotein
27	208	34	11,69	64684	gshB glutathione synthetase
29	130	54	7,74	24141	rplY 50S ribosomal protein L25
32	64	19	7,79	22651	ycel conserved hypothetical protein
37	113	69	5,49	10681	gro Es chaperonin 10kDa
38	151	38	5,74	13846	hsp20 low molecular weight heat shock protein
39	137	38	5,74	13846	hsp20 low molecular weight heat shock protein
40	78	27	5,74	13846	hsp20 low molecular weight heat shock protein
42	131	52	9	17214	hsp small heat shock protein
44	79	40	9,1	17512	ndk nucleotide diphosphate kinase
46	91	41	9	17214	hsp small heat shock protein
48	67	25	9	17214	hsp small heat shock protein

5.5.2. Heparinsäule mit SM-Kulturen und unterschiedlichen Kohlenstoffquellen



6.1. Klonierung und Identifizierung des Konjugationsplasmids pSupHyg:pkn859

Abb. 6.1.: *pkn859*-Gen von *So ce56*. Eingezeichnet sind die internen *primer* zur Amplifikation einer „*pkn859*“ Mutante.

```

atggagcgcg cgattcagcg accggcaggt cccaaggctt cgagcaccga tccgttgatc ggaaggtcg tggccggcag
tgcctcgcgc gctaagtcgc tggccgtcca gggttccgaa gctcgtggct aggcactag ccctccagc accggccgctc

gtaccggctc gaggcaccgc ttggcgaagg cggcatgggc gtcgtttatc gcgcccgcga cgtgctgac cttggcccagc
catggccgag ctccgtgccc aaccgcttcc gccgtaccgc cagcaaatag cgcgggcggt gcacgactag gaccgggtcg

agcgggactt cgagtaggccc gggctagagg cgcctctctg ggtggaggcg cgcacctacg acgcgctccg cgcgcccgct
tcgcctgaa gctcatccgg cccgatctcc gcggagagac ccacctccgc gcgtggatgc tgcgcgaggc gcgcccgcga

aaccgcttg pkn#int+ atcacgccc catcatcgat atccacgaca tcggcgagac cgaggaggcc gagctctatc tgcctatgga
ttggcgaac tagtgccgggt gtagtagcta taggtgctgt agccgctctg gctcctccc ctcgagatag agcagtaact

gtacctgctc ggcacgcgc tctcggcggg gctcgcgcgc ggcccgatgc cgatcgcgcg atcgggtggac atcctcgagc
catggagcag ccgtgcggcg agagccgctc cgagcgcgcg cccgggctac gtagcgcgcg tagccacctg taggagctcg

agatgtgcgc ggtctcgcg cgcgccaccg acctcggcgt cgtgcaccgc gatctgaaga gcgacaacat cctgctcacc
tctacacgcg ccgagagcgc gcgcgggtgc ttggaccgca gcactggcg ctagacttct cgtgttgta ggacgagtgg

caccgcccgc gccggaagga tttcgtcaag atcctcgact tcggcctcgc cgcctacgcg cgcgaccgcg gctcgcctcc
gtggccgcgc cggccttcc aaagcagttc taggagctga agccggagcg gcgtagcgc gcgctggcg cggagcgggg

gaaggggcgc gctcttcggga cgcgccagta catgtcgcgc gaggaggcgc gcgcgaggga ggcgacggcg cagtccgacc
cttcccgcgc cagaagccct gcgggctcat gtacagcggg ctctccgcg cgcgctcct ccgctgccc gtccaggttg

tctacgcgct cggcgtgctc ttcttcgaga tctgaccggc cgactcccc ttccgcgcga acgaccgcga cacgctcctc
agatgcgcga gccgcacgag aagaagctct acgactggcc cgtcagaggg aaggcgcgct tgcctggcgt gtgcgaggag

gagatgcagc ggacccacgc gccgcgcgcg ccccgctcga tccgcccga cgcgcacgcg caggggcagg cgatcgtgct
ctctacgtcg cctgggtgcg cgcgcgcgcc gggcgagctc agggcgggct gcgctgccc gctcccctcc gtagcagca

gcgctgctc gagaaggaca tccgcaagcg ctaccgcgac gccaccacc tccaggagga gctgaaggcg ctccagcgcg
cgcggacgag cacttccctc agcgttcgc gatggcgtc cgggtggtgg aggtcctcct cgaactccgc gaggtcgcgc

ggctcccggc ccacgcgtgg gaggtcgagg ggagcagcgg cgtgccggcg ccgcccgcgc cgcgcccgcg gcagagcgcg
ccgagggccg ggtgcgcacc ctccagctcc cctcgtgccc gcacggccac ggcggcgcg gcggcgcgcg cgtctcgcgg

ggcgtcatcg agtggcgag cggggcgccc ctgttctcgc gcatggtctc ccgcccctac ccgtcccggc aggtgcccga
ccgagtagc tcaccgcctc ggcccgcgcg gacaagagcg cgtaccagag ggcgcgatg ggacggccc tccacggcgt

ggaggtccag aacggccttg cgcaggcctg ggacctcgc cgcgcgcgca acaagctcga gggcgaggtc gcgagcctca
cctccaggtc ttgcgggaac gcgtccggac cctggagcgg cgcgcgcggt tgttcgagct cccgctccag cgtcggagt

cccgaagct pkn#int- cgaggcgtc gagcgcgcg gccgcgcgt cgcgcgcgag atcggcccga aggtcgagg gctcgcgcac
ggcggttcga gctccgcgag ctccgcgcgc cggcgcgca cgcgcggtc tagccggcgt tccagctcct cgagcgcgtg

gaggagtgcg gcgtgatgcg ctaggcgatg gccagcggcg aggacgtcga gaaggctccc gtcgagctcg ccgcccgcga
cacctcagcg cgcactacgc gctccgctac cggctgccc tccgcaagca cttccaggcg cagctcgagc gcgcgcgct

gaagctcgcg ctgtcccgcg gccagctggc ggacggggcg gcccccagc gcaaccacga tccgctcctc tacgagcgcg
cttcgagcgc gacagcgcg cgttcgaccg cctgccccgc cggcgcggtc cgttggtgct aggcgagtag atgctcgcgc

cgggcgcgcg cggcgcgacc gcgcagggca agcgcgagca gctcgggctc tacgagcaca agaagaacac gcgagggcg
gcccgcgcg ccccgctggy cgcgtgggct tcgcgctcgt cgagcccga atgctcgtct tcttcttgy cgcgctccc

aacgcgcgcg acctgcgcg ccagatcgac gagctccgcg cccagctcgc ccgctacgccc gaggccctgg aggaggacct
ttgcgcgcg tggacgcggc ggtctagctg ctcgaggcgc gggctcagcg ggcgatgccc ctccgggacc tctcctgga

ggcgcagggg cgcgagcgcg tgcggcgcg caocgcgag gggctcgcct acgagaagtc gttcagcgag gcctcgaacc
ccgctccc gcgctcgcg agcgcgcgcg gtcgctcgc cccgtgcgga tgccttcag caagtcgctc cggagcttgg

tgcgtgctgag ccacctccgc aacaagcccg agtgtcggga cctcgtggcg gagctcctca cgtcccacgc cagcctggc
acgacgactc ggtggagggc ttgttcggcc tcacagcctt ggagcaccgc ctcgaggagt gcaggggtgc gtcgggaccg

gggactcgg gctcggatca gcgactctcc ggtcggatc gccggtgaa caacgcgacc gaggcgaact ga
cgctgaggc cgagcctact cgtgagagg ccgagcctag cggcgcactt gttgcgctgy ctcgcttga ct

```

12. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen lieben Menschen bedanken, ohne deren Hilfe die Verwirklichung dieser Arbeit nicht möglich oder zumindest deutlich schwieriger gewesen wäre.

- Frau Dr. Anke Treuner-Lange, unter deren Leitung die Arbeit angefertigt wurde, für die Bereitstellung dieses sehr interessanten Themas und für die super Betreuung. Danke Anke!
- Frau Prof. Dr. Gabriele Klug, die mir die Anfertigung der Doktorarbeit ermöglichte und für Fragen und Anregungen zur Verfügung stand. Vielen Dank!
- Herrn Prof. Dr. Alfred Pingoud für die freundliche Übernahme der Ko-Korrektur. Vielen Dank!
- Meinen Mädels, Antje, Carolin und Sabrina, die mich oft zum Lachen gebracht haben und mich im allen unterstützten. Danke ihr 3, ihr seid einfach spitze!!
- AG Forchhammer und AG Klug für Unterstützung jeglicher Art. Danke!
- Aysel Alici MALDI-TOF- Analysen, Universität Bielefeld
- Klaus Gerth für die Hilfe mit der HPLC-Analyse, GBF Braunschweig
- Dr. Shwan Rachid für die Hilfe mit der Biotin/Streptavidin Affinitätschromatographie und MALDI-TOF-Analysen, Universität des Saarlandes
- Meinem Freund Felix, der im letzten Abschnitt der Arbeit immer für mich da war und Verständnis für meine Arbeit hatte. Danke!!
- Meinen ganzen Freunden, die an mich dachten und mich unterstützten. Vielen, vielen Dank!

....und zu guter Letzt meiner Familie, für ihr Interesse und ihre permanente Unterstützung während der langen Jahre des Studiums und der Promotion.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Tina Knauber
Geburtsdatum 02.02.1976
Geburtsort Siegen/Weidenau

Schulausbildung

1982-1986 Grundschule, Fernwald Steinbach
1986-1992 August-Herman-Francke-Schule, Giessen
1992-1995 Liebigschule, Giessen

Studium

Oktober 1996 Beginn des Biologiestudiums an der JLU
Giessen
September 2001 Beginn der Diplomarbeit bei Dr. Treuner-
Lange am Institut für Mikro- und
Molekularbiologie der JLU Giessen,
Thema: „Isolierung und Charakterisierung
von PphI-Revertanten in *Myxococcus
xanthus*“
Oktober 2002 Erhalt des akademischen Grades eines
Diplombiologen
Oktober 2002-Dezember 2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut
für Mikro- und Molekularbiologie der JLU
Giessen und Beginn der Doktorarbeit

Präsentationen

Juli 2005 ASM, Congress on Prokaryotic
Development, Vancouver, Kanada, Thema:
The role of the stringent response in the
bacterium *Sorangium cellulosum*
Juli 2005 Myxo 2005, Harrison Hot-Springs, Kanada,
Thema: Identification of regulatory links
between the physiological and
morphological differentiation in *Sorangium
cellulosum*
Mai 2005 Aktuelle Forschungsberichte aus der Zell-
und Molekularbiologie, Giessen, Thema:
The function of the stringent response in the
myxobacterium *Sorangium cellulosum*
April 2005 Symposium on Mechanisms of
Genregulation in Microorganisms,
Blaubeuren, Thema: The function of the
stringent response in the bacterium
Sorangium cellulosum

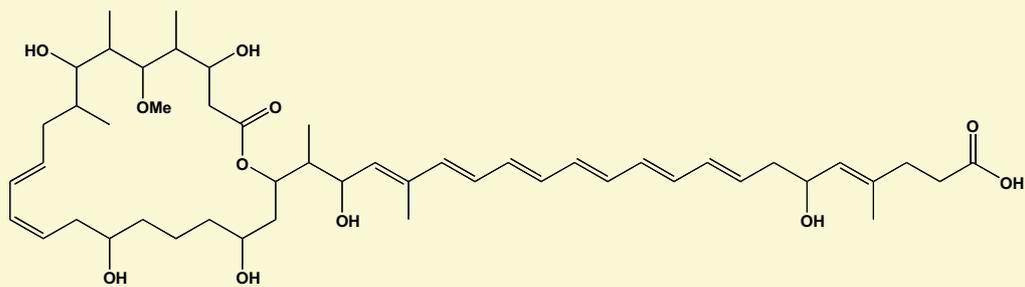
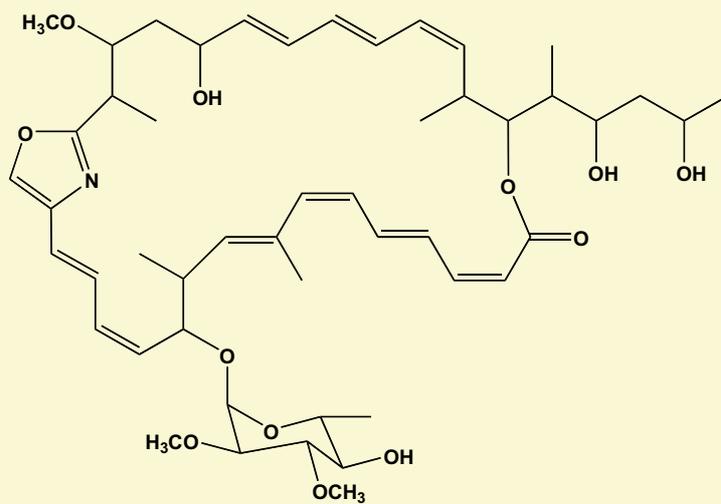
- Juli 2004 Myxo 2004, LO-Skolen, Dänemark, Thema: The function of the Rel-protein in *Sorangium cellulosum*
- Mai 2004 BioPerspectives 2004, Wiesbaden, Thema: Physiological and morphological differentiation in the bacterium *Sorangium cellulosum*
- April 2004 VAAM 2004, Braunschweig, Thema: Analysis of the stringent response in the myxobacterium *Sorangium cellulosum*
- Mai 2003 DECHEMA, Prokaryotic genomes, Göttingen, Thema: The stringent response in the myxobacterium *Sorangium cellulosum*
- November 2002 Gegenwart und Zukunft der bakteriellen Genomforschung in Deutschland, Bielefeld, Thema: Identification of putative regulatory links between the physiological and morphological differentiation in *Sorangium cellulosum*

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Tina Knauber, geboren am 02.02.1976 in Siegen/Weidenau, dass ich die vorliegende Dissertation, gemäß der Promotionsordnung (vom 05. Februar 1990) für die Verleihung des Dr. rer. nat. durch die Naturwissenschaftlichen Fachbereiche der Justus-Liebig-Universität Giessen, selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen Quellen benutzt habe.

Giessen, den 16.12.2005

.....
(Tina Knauber)



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
 STAUFENBERGRING 15
 D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
 redaktion@doktorverlag.de
 www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5049-5



9 783835 195049 8