

# Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Biologin Susanne Müller  
aus Frankenthal

Tag der mündlichen Prüfung:

**Morphogenese bei *Stigmatella aurantiaca***  
**Studien zur Fruchtkörperbildung**

Gutachter: Prof. Dr. Hans Ulrich Schairer  
Prof. Dr. Thomas Rausch

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Myxobakterien	2
1.2	Gleiten als Bewegungsmechanismus	3
1.2.1	Das A-System	4
1.2.2	Das S-System	4
1.2.3	Das <i>frz</i> - und <i>dif</i> -System	6
1.2.4	Das <i>mgl</i> -System	7
1.3	Fruchtkörperbildung und Sporulation	8
1.3.1	Artifizuell induzierte Sporulation	9
1.3.2	Fruchtkörpersporen	10
1.3.3	Die Fruchtkörperbildung bei <i>M. xanthus</i> und <i>S. aurantiaca</i>	10
1.3.4	Proteinkinasen bei <i>M. xanthus</i>	14
1.3.5	Spezifische Faktoren und Gene der Fruchtkörperbildung bei <i>S. aurantiaca</i>	14
1.4	Transkriptionsregulation bei Myxobakterien	16
1.5	Myxophagen und ortsspezifische Rekombination	17
	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>2.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>20</b>
	<b>Teil I: Klonierung und Charakterisierung der <i>attB</i> site von <i>S. aurantiaca</i></b>	
2.1	<i>attB-attP</i> vermittelte ortsspezifische Rekombination	20
2.1.1	Detektion der <i>S. aurantiaca attB</i> site durch Southern-Analyse	20
2.1.2	Integration des Plasmids pSH8 in die <i>attB</i> site von <i>S. aurantiaca</i>	22
2.1.3	Phänotyp-Analyse der Mutante SM4	24
2.1.4	Konstruktion des Integrationsplasmids pSM28 und der <i>S. aurantiaca</i> Mutante SM12	25
2.1.5	Phänotyp-Analyse der Mutante SM12	27
2.1.6	Weitere morphologische Analysen der Mutanten SM4 und SM12	28
2.2	Klonierung und Sequenzierung der Wirts-Phagen-Verbindungen <i>attL</i> und <i>attR</i> der Mutante SM12	29
2.2.1	Klonierung der <i>attL</i> und <i>attR</i> DNA-Bereiche der Mutante SM12	29
2.2.2	Restriktions- und Southern-Analyse der Plasmide pSM48 und pSM49	30
2.2.3	Sequenzierungsstrategie zur Analyse der Wirts-Phagen-Verbindungen <i>attL</i> und <i>attR</i> von <i>S. aurantiaca</i>	31
2.2.4	Interpretation der <i>attL</i> und <i>attR</i> site Sequenzen; Bildung von <i>intX</i>	33

2.3	Klonierung und Charakterisierung des <i>attB</i> Locus von <i>S. aurantiaca</i>	35
2.3.1	Amplifikation und Sequenzanalyse des <i>attB</i> DNA-Bereiches von <i>S. aurantiaca</i>	35
2.3.2	Vergleich der <i>attB</i> site Bereiche von <i>M. xanthus</i> und <i>S. aurantiaca</i>	36
2.3.3	Struktur der durch die Gene <i>trnD1</i> und <i>trnV1</i> kodierten tRNA Produkte von <i>S. aurantiaca</i>	37
2.3.4	Veränderung des 3'-Bereiches der kodierenden Sequenz von <i>trnD1</i> durch die ortsspezifische Rekombination	39
2.3.5	Analyse der stromaufwärts- und stromabwärts-Bereiche des <i>attB</i> Locus von <i>S. aurantiaca</i>	41
2.3.6	Expression der putativen Integrase/Rekombinase und Isoamylase von <i>S.aurantiaca</i>	43
2.4	Charakterisierung der tRNA Gene des <i>S. aurantiaca attB</i> Locus	45
2.4.1	Inaktivierung der tRNA Gene des <i>S. aurantiaca attB</i> Locus durch Insertion einer Kanamycin-Resistenz-Kassette	45
2.4.1.1	Konstruktion des Plasmids pSM58; Insertion einer Kanamycin-Resistenz-Kassette in das <i>trnD1</i> Gen	45
2.4.1.2	Konstruktion der Plasmide pSM77, pSM80, pSM81 und pSM82; Insertion einer Kanamycin-Resistenz-Kassette in verschiedene Bereiche der tRNA Gene des <i>attB</i> Locus von <i>S. aurantiaca</i>	48
2.4.1.3	Phänotyp-Analyse der Mutanten SM31, SM32 und SM33	52
2.4.2	Studien zur Expression der tRNA Gene, <i>trnD1</i> und <i>trnV1</i>	53
2.4.2.1	Bestimmung des Zeitfensters der <i>trnD1</i> - und <i>trnV1</i> -Expression mittels eines transkriptionellen $\Delta trpA$ - <i>lacZ</i> -Fusionsgens	54
2.4.2.2	Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in der Mutante SM25 im Verlauf der Entwicklung	56
2.4.2.3	Phänotyp-Analyse der Mutante SM25	56
2.4.2.4	Bestimmung des Zeitfensters der <i>trnD1</i> - und <i>trnV1</i> -Expression durch RTPCR-Analyse	58
2.4.2.5	Bestimmung des Zeitfensters der <i>trnD1</i> - und <i>trnV1</i> -Expression durch Northern-Analyse	59
2.4.3	Versuch der Komplementation des Phänotyps der Mutante SM12 durch Bereitstellung des <i>attB</i> Locus	61
2.4.3.1	Konstruktion des Plasmids pSM29 und der <i>S. aurantiaca</i> Mutante SM23	61
2.4.3.2	Phänotyp-Analyse der Mutante SM23	63
2.4.3.3	Konstruktion des Plasmids pSM86 und der <i>S. aurantiaca</i> Mutanten SM34 und SM35	64
2.4.3.4	Phänotyp-Analyse der Mutanten SM34 und SM35	69
<b>Teil II: Analyse der Fruchtkörperbildung von <i>S. aurantiaca</i></b>		
2.5	Konstruktion einer <i>fbfB</i> - <i>fbfA</i> -Doppelmutante und Versuche zur genetischen Komplementation	71
2.5.1	Konstruktion der <i>fbfB</i> - <i>fbfA</i> -Doppelmutante SM1	71
2.5.1.1	Phänotyp-Analyse der Mutante SM1	74

2.5.2	Versuche zur genetischen Komplementation der Mutante SM1	75
2.5.2.1	Integration der beiden <i>fbf</i> Gene in den <i>attB</i> Locus der Mutante SM1	75
2.5.2.2	Phänotyp-Analyse der Mutante SM5	77
2.5.2.3	Integration der beiden <i>fbf</i> Gene, <i>fbfB</i> und <i>fbfA</i> , in den <i>mta</i> Genlocus der Mutante SM1	78
2.5.2.4	Phänotyp-Analyse der Mutante SM17	80
2.6	Genetische Analyse des Gens <i>fbfA</i> und seines stromabwärts-Bereiches	81
2.6.1	Sequenzierung von <i>fbfA</i> , <i>sspA</i> und der stromabwärts-Bereiche dieser Gene	82
2.6.2	Sequenzanalyse der Gene <i>fbfC</i> und <i>fbfD</i>	83
2.7	Genetische Analyse des Bereiches stromabwärts von <i>fbfA</i>	84
2.7.1	Insertion einer Kanamycin-Resistenz-Kassette in verschiedene Stellen des <i>fbfC</i> Gens; Konstruktion der Mutanten SM6 und SM7	85
2.7.1.1	Phänotyp-Analyse der Mutanten SM6 und SM7	89
2.7.2	Insertion einer Kanamycin-Resistenz-Kassette in das Gen <i>fbfD</i> ; Konstruktion der Mutante SM8	90
2.7.2.1	Phänotyp-Analyse der Mutante SM8	91
2.7.3	Insertion einer Kanamycin-Resistenz-Kassette in verschiedene DNA-Bereiche stromabwärts von <i>fbfD</i> ; Konstruktion der Mutante SM16	92
2.7.3.1	Phänotyp-Analyse der Mutante SM16	95
2.8	Expression des <i>fbfC</i> Gens	96
2.8.1	Bestimmung des Zeitpunktes der <i>fbfC</i> -Expression in verschiedenen <i>fbf</i> -Mutanten und im Wildtyp durch RTPCR	96
2.8.2	Bestimmung des Zeitpunktes der <i>fbfC</i> -Expression mittels eines transkriptionellen $\Delta trpA-lacZ$ -Fusionsgens	98
2.8.2.1.	Analyse des <i>fbfC</i> -Genstartes: Konstruktion der Mutante SM10	98
2.8.2.2.	Phänotyp-Analyse der Mutante SM10	100
2.8.2.3.	Untersuchungen zur Abhängigkeit der <i>fbfC</i> -Expression von <i>fbfA</i> ; Konstruktion der Mutanten SM11 und SM18	101
2.8.2.4.	Phänotyp-Analyse der Mutanten SM11 und SM18	103
2.8.2.5.	Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Mutanten SM11 und SM18 im Verlauf der Fruchtkörperentwicklung	104
2.8.2.6.	Untersuchungen zur Promotorregion von <i>fbfC</i>	105
2.8.2.7.	Phänotyp-Analyse der Mutante SM26	107
2.8.3	Bestimmung des Verlaufs der <i>fbfC</i> -Expression mittels eines transkriptionellen $\Delta trpA-lacZ$ -Fusionsgens in verschiedenen <i>fbf</i> -Mutanten	107
2.8.3.1.	Phänotyp-Analyse der Mutanten SM27, SM28, SM29 und SM30	111
2.8.3.2.	Analyse der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Mutanten SM27, SM28, SM29 und SM30 nach unterschiedlichen Zeiten während der Fruchtkörperbildung	112
2.9	Expression der Gene <i>fbfA</i> und <i>fbfB</i> im <i>S. aurantiaca</i> Wildtyp und in verschiedenen <i>fbf</i> -Mutanten	114
2.9.1	Expression von <i>fbfA</i>	114

2.9.2	Expression von <i>fbfB</i>	116
2.10	Expression des Gens <i>fbfD</i>	117
2.10.1	Bestimmung der Expression des <i>fbfD</i> Gens in verschiedenen <i>fbf</i> -Mutanten und im Wildtyp durch RTPCR	11
2.10.2	Bestimmung der <i>fbfD</i> -Expression mittels eines transkriptionellen $\Delta trpA-lacZ$ -Fusionsgens	120
2.10.2.1	Konstruktion der Mutante SM14 und Bestimmung des Verlaufs der <i>fbfD</i> -Expression	120
2.10.2.2	Phänotyp-Analyse der Mutante SM14	122
2.10.2.3	Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Mutante SM14 im Verlauf der Fruchtkörperentwicklung	123
2.10.2.4	Untersuchungen zur Promotorregion von <i>fbfD</i>	123
2.10.2.5	Phänotyp-Analyse der Mutanten SM21 und SM22	126
<b>3.</b>	<b>Diskussion</b>	127
<b>Teil I: Klonierung und Charakterisierung der <i>attB</i> site von <i>S. aurantiaca</i></b>		127
3.1	Lokalisation der <i>attB</i> site im Genom von <i>S. aurantiaca</i>	127
3.2	Ortsspezifische Integration von Plasmiden in die <i>attB</i> site von <i>S. aurantiaca</i> und die Auswirkung auf die Fruchtkörperbildung	128
3.3	Klonierung der Wirts-Phagen-Verbindungen <i>attL</i> und <i>attR</i> der <i>S. aurantiaca</i> Mutante SM12	130
3.4	Klonierung und Sequenzanalyse der <i>attB</i> site von <i>S. aurantiaca</i>	134
3.5	Analyse der Expression der tRNA Gene des <i>attB</i> Locus von <i>S. aurantiaca</i>	139
3.5.1	Analyse der Expression der tRNA Gene des <i>attB</i> Locus von <i>S. aurantiaca</i> durch Fusion der Gene an $\Delta trpA-lacZ$	139
3.5.2	Untersuchung der Expression der tRNA Gene des <i>attB</i> Locus von <i>S. aurantiaca</i> durch RTPCR- und Northern-Analyse	142
3.6	Inaktivierung der tRNA Gene des <i>attB</i> Locus von <i>S. aurantiaca</i> durch die Insertion einer Antibiotika-Resistenz-Kassette	144
3.7	Komplementation des Phänotyps der <i>S. aurantiaca</i> Mutante SM12	147
3.8	Charakterisierung des stromaufwärts- und stromabwärts-Bereiches des <i>S. aurantiaca attB</i> Locus	150
<b>Teil II: Analyse der Fruchtkörperbildung von <i>S. aurantiaca</i></b>		154
3.9	Konstruktion einer <i>fbfB-fbfA</i> -Doppelmutante und Versuche zur genetischen Komplementation	155
3.10	Genetische Analyse des stromabwärts-Bereiches des <i>fbfA</i> Gens	158
3.11	Expression der Gene <i>fbfB</i> und <i>fbfA</i>	160
3.12	Analyse der <i>fbfC</i> -Expression	163

3.12.1	RTPCR-Analyse der <i>fbfC</i> -Expression	163
3.12.2	Studien zur <i>fbfC</i> -Expression in Abhängigkeit von anderen <i>fbf</i> -Genprodukten	164
3.13	Analyse der <i>fbfD</i> -Expression	168
3.13.1	RTPCR-Analyse der <i>fbfD</i> -Expression	168
3.13.2	Weitere Studien zur <i>fbfD</i> -Expression	169
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>171</b>
4.1	Material	171
4.1.1	Chemikalien und Lösungen	171
4.1.2	Spezielle Artikel und Geräte	172
4.1.3	Radioaktives Material	173
4.1.4	Enzyme und Kitsysteme	173
4.1.5	Nukleinsäuren	174
4.1.6	Plasmide	176
4.1.7	Bakterienstämme	177
4.1.8	Medien und Antibiotika-Stammlösungen	177
4.1.9	Puffer und Lösungen	178
4.2	Methoden	
4.2.1	Mikrobiologische Techniken	178
4.2.1.1	Plattenkulturen von Bakterien	178
4.2.1.2	Fruchtkörperbildung und Sporulations-Assay bei <i>S.aurantiaca</i>	179
4.2.1.3	Flüssigkulturen von Bakterien	179
4.2.1.4	Indol-induzierte Sporenbildung bei <i>S.aurantiaca</i>	180
4.2.1.5	Langzeitlagerung von Bakterien	180
4.2.1.6	Auskeimung von <i>S.aurantiaca</i> Sporen; Sporulationsassay	181
4.2.1.7	Elektroporation	181
4.2.2	Isolierung und Bearbeitung von DNA	183
4.2.2.1	Plasmidpräparation	183
4.2.2.2.	Präparation der chromosomalen DNA von <i>S.aurantiaca</i>	183
4.2.2.3	Phenolextraktion von DNA	184
4.2.2.4	Alkoholfällung von DNA	184
4.2.2.5	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA-Lösungen	184
4.2.2.6	Restriktion von DNA	185
4.2.2.7	Ligation doppelsträngiger DNA	185
4.2.2.8	Herstellung und Ligation von DNA-Adapttern	185
4.2.2.9	Auffüllen von 5'-DNA-Überhängen	186
4.2.2.10	Entfernung von 3'-DNA-Überhängen	186
4.2.2.11	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	186
4.2.2.12	Synthese von DNA durch PCR	187
4.2.2.13	Aufreinigung von PCR-Produkten	188
4.2.2.14	DNA-Sequenzierung	188
4.2.3	Elektrophorese-Techniken und Isolierung von DNA aus Agarosegelen	188
4.2.3.1	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	188
4.2.3.2	Isolierung von DNA aus "low melting" Agarose	189
4.2.4	Radioaktive- und Biotin-Markierung von DNA	189
4.2.4.1	Radioaktive Markierung von DNA	189

4.2.4.2	Nicht-radioaktive DNA-Markierung mit Biotin	191
4.2.5	DNA-Hybridisierungstechniken	191
4.2.5.1	Dot-Blot-Verfahren	191
4.2.5.2	Koloniehybridisierung	191
4.2.5.3	Southern-Transfer	192
4.2.5.4	Hybridisierung und Detektion mit Biotin-markierten DNA-Proben	192
4.2.5.5	Hybridisierung und Detektion mit radioaktiv-markierten DNA-Proben	194
4.2.6	Isolierung und Bearbeitung von RNA	194
4.2.6.1.	Isolierung von RNA	195
4.2.6.2	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA	195
4.2.6.3	Gelelektrophorese von RNA	196
4.2.6.4	Northern-Transfer und Hybridisierung	196
4.2.6.5	Reverse Transkriptase PCR	197
4.2.7	Proteinchemische Methoden	197
4.2.7.1	Proteinisolierung	197
4.2.7.2	Proteinbestimmung nach Bradford	197
4.2.7.3	Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität	198
<b>5.</b>	<b>Literatur</b>	<b>199</b>
	<b>Publikationen und Präsentationen</b>	<b>217</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	<b>218</b>
6.1	Abkürzungen	218
6.2	Sequenzen	220
6.3	Plasmidkarten	234
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>238</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>240</b>



# 1. Einleitung

Charakteristika lebender Organismen sind: Metabolismus, Reproduktion, Differenzierung und Kommunikation. Differenzierung äußert sich in der Bildung neuer Substanzen und in der Veränderung der zellulären Morphologie. Zelldifferenzierung ist oft Teil eines Lebenszyklus, in welchem die Zellen spezielle Strukturen bilden, die für das Überleben notwendig sind. Gesteuert wird dieser Prozeß durch intrazelluläre Vorgänge als Reaktion auf Signale aus der Umwelt, wobei die Signale auch von Zellen, die durch Aufnahme und Abgabe von kleinen, diffusiblen Molekülen kommunizieren, gebildet werden können.

Beispiele für prokaryontische Differenzierung der einfachen Form sind die Endosporenbildung bei *Bacillus* und die Bildung von Heterocysten bei Cyanobakterien. Manche Bakterien sind aber durchaus zur Bildung von komplexen, multizellulären Strukturen befähigt, wie die fruchtkörperbildenden Myxobakterien oder wie viele biofilmbildende Organismen. Diese Entwicklungsprozesse sind kompliziert und beinhalten Zellbewegung, Austausch von Signalen, direkten Zell-Zellkontakt und die koordinierte Bildung einer komplexen Struktur, wobei die zeitliche und räumliche Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle spielt.

Myxobakterien besitzen einen zweigeteilten Lebenszyklus. Unter normalen Wachstumsbedingungen vermehren sich die in Schwärmen lebenden Bakterien durch Querteilung. Bei Nahrungsmangel findet ein Entwicklungsprozeß statt, bei der letztlich multizelluläre Fruchtkörper gebildet werden.

Das myxobakterielle System zeigt trotz vieler Unterschiede Parallelen zu dem eukaryontischen Differenzierungsmodell *Dictyostelium discoideum*. Bei beiden Organismen initiiert Hunger den Entwicklungszyklus, in dessen Verlauf im ersten Entwicklungsabschnitt Aggregationszentren gebildet werden, aus welchen die Fruchtkörper entstehen. Nur ein kleiner Teil der am multizellulären Prozeß beteiligten Zellen differenziert zu Sporen.

Myxobakterien besitzen Eigenschaften von einzelligen und mehrzelligen Organismen und liegen so an der Grenze zwischen diesen beiden Lebensformen. Aufgrund ihres komplexen Lebenszyklus stellen sie ein Modellsystem zur Analyse von Morphogenese und Differenzierung dar.

## 1.1 Myxobakterien

Myxobakterien sind weltweit verbreitete gram-negative, stäbchenförmige Bodenbakterien, deren DNA einen GC-Gehalt von 67-70 % aufweist (Reichenbach und Dworkin, 1992). Sie wurden 1892 erstmals von Roland Thaxter als Bakterien angesprochen und in die Familie der Myxobacteriaceae eingruppiert (Thaxter, 1892). Aufgrund der 16S rRNA-Analyse werden sie der  $\delta$ -Gruppe der Purpurbakterien zugeordnet und stehen so in naher Verwandtschaft zu *Bdellovibrio* und den Sulfat-reduzierenden Bakterien (Shimkets und Woese, 1992). Im Vergleich zu anderen Prokaryoten besitzen sie eine enorme Genomgröße, die 9.45 Mbp bei *Myxococcus xanthus* und 9.35 Mbp bei *Stigmatella aurantiaca* beträgt (Chen et al., 1990; Neumann et al., 1992).

Myxobakterien zeichnen sich durch besondere Charakteristika aus (Dworkin, 1996):

1) Sie verfügen über ein großes Synthesepotential für biologisch wirksame Sekundärmetabolite (Antibiotika) wie zum Beispiel Epothilon (Gerth et al., 1996), Myxothiazol (Gerth et al., 1980), Myxalamid (Gerth et al., 1983), Stigmatellin (Kunze et al., 1984), Soraphen (Gerth et al., 1994) und TA (Rosenberg et al., 1973).

2) Myxobakterien besitzen kein Flagellum und bewegen sich auf festen Oberflächen durch Gleiten fort. Bei *M. xanthus* wurden zwei Multigensysteme identifiziert, die diese Art der Fortbewegung kontrollieren. Komponenten der Zelloberfläche wie Typ IV Pili, Fibrillen und Lipopolysaccharide (LPS) spielen bei dieser Art der Fortbewegung eine wichtige Rolle.

3) Vegetative Zellen von Myxobakterien zeigen ein kooperatives Verhalten, welches in der Literatur oft als "sozial" bezeichnet wird. Sie bilden gleitende Zellschwärme auf unlöslichen, organischen Polymeren (verrottendem Holz, abgestorbenem Pflanzenmaterial usw.). Die Polymere werden durch sekretierte lytische Enzyme abgebaut und dem bakteriellen Metabolismus zugeführt. Die Schwarmbildung gewährleistet eine hohe lokale Konzentration an lytischen Enzymen. Die Schleimausscheidung verhindert die Wegdiffusion der Enzyme und der freigesetzten Metabolite. Das Gleiten ermöglicht durch direkten Zell-Zellkontakt einen intensiven Signalaustausch und stabilisiert somit den Schwarm.

4) Die verschiedenen Myxobakterienarten bilden unter Hungerbedingungen Fruchtkörper. Die Form ist genetisch fixiert und variiert innerhalb der Gattung von kugelförmigen (*M. xanthus*), bis hin zu bäumchenartigen, Sporangiolen tragenden Gebilden (*S. aurantiaca*, *Chondromyces crocatus*). Die Fruchtkörper weisen Unterschiede in der Größe (10-100 µm) und der Färbung auf.

## 1.2 Gleiten als Bewegungsmechanismus

Gleiten ist definiert als eine Bewegung von nichtflagellierten Zellen in Richtung ihrer Längsachse auf festen Oberflächen (Henrichsen, 1972). Diese Art der Fortbewegung spielt eine wichtige Rolle im Entwicklungszyklus von Myxobakterien (Reichenbach, 1984) und wurde auch bei Flavobakterien, *Cytophaga* Stamm U67 und dem filamentösen Organismus *Flexibacter polymorphus* beschrieben.

Diskutiert wird das Vorhandensein von kontraktilen Elementen (Burchard, 1981), rotierenden Motoren (Pate und Chang, 1979) oder z. B. eine gerichtete Ausscheidung von Schleim (Ridgway, 1977; Hoicyk und Baumeister, 1998).

In *M. xanthus* und *M. flavus* wurden lineare, kettenähnliche Stränge im periplasmatischen Raum entdeckt, welche mit dem Peptidoglykan und der äußeren Membran assoziiert sind (Freese et al., 1997). Diese kettenähnlichen Stränge bestehen aus multiplen, ringähnlichen Strukturen, die untereinander über zwei parallele Stränge von filamentösen Proteinen verbunden sind. Die abgeleitete Hypothese besagt, daß durch Konformationsänderungen der Stränge mechanische Energie auf die Zelloberfläche transferiert wird und so entstehende Kontraktionswellen die Gleitbewegung ermöglichen. Bei *M. xanthus*, *S. aurantiaca* und nicht fruchtkörperbildenden, gleitenden Bakterien konnte erstmals eine typische bewegungsassoziierte Oberflächenstruktur identifiziert werden, welche bei nicht gleitenden Mutanten oder nach Zugabe von Inhibitoren der Atmungskette nicht mehr vorhanden war. Der Gleitapparat stellt ein gedrehtes, zirkulär geschlossenes Band dar, welches vermutlich mit der Gleitmaschinerie im periplasmatischen Raum assoziiert ist (Lünsdorf und Schairer, 2001). Die von Freese et al. beschriebenen kettenähnlichen Stränge stellen den inneren Teil des Bandes dar. In verschiedenen Mikroorganismen konnte gezeigt werden, daß die Gleitbewegung unabhängig von ATP direkt durch das Protonenpotential angetrieben wird (Dworkin et al., 1983; Blair, 1995; Armittage und Schmitt, 1997).

Zwei Multigenensysteme wurden in *M. xanthus* entdeckt, die für das Gleiten verantwortlich sind. Das A-System (adventurous) ermöglicht das Gleiten von Einzelzellen und das S-System (social) das Gleiten von Zellen in Bakteriengruppen (Hodgkin und Kaiser, 1979 a, b). Zusätzlich zu den A- und S-Genklassen wurden weitere Gene entdeckt, deren Produkte für die Bewegung von *M. xanthus* notwendig sind; sie gehören zum *mgl* (mutual gliding) oder *frz* (frizzy)-Locus.

### 1.2.1 Das A-System

Gene, welche dem A-System zugeordnet werden, rufen inaktiviert in einer  $S^-$ -Mutante einen nichtschwärmenden Doppelmutanten-Phänotyp hervor, lediglich glatte Kolonieränder ohne schwärmende Einzelzellen sind sichtbar (Hodgkin und Kaiser, 1979 a, b). Es wurden 37 verschiedene Genloci identifiziert, welche in 7 Clustern auf dem Chromosom von *M. xanthus* verteilt sind (Chen et al., 1991). Aufgrund der Möglichkeit zur extrazellulären Komplementation durch Wildtypzellen wurden zwei Subklassen definiert (Hodgkin und Kaiser, 1977; Hodgkin und Kaiser, 1979 a; MacNeil et al., 1994 a). Bei Mutanten in den 32 verschiedenen *agl* Genen (adventurous gliding) ist keine extrazelluläre Komplementation möglich, wohingegen Mutationen in den 5 verschiedenen *cgl* Genen (contact or conditional gliding) extrazellulär komplementiert werden können. Mutationen im *cglB* Gen führen zu einem  $A^-S^+$ -Phänotyp. Das Genprodukt, ein putatives Protein der äußeren Membran, besitzt eine typische N-terminale Signalpeptidase-II-Leadersequenz. Weiterhin besitzen einige  $A^-$ -Mutanten einen Defekt in der Biogenese des O-Antigens der Lipopolysaccharide, welche essentiell für einen Zell-Zellkontakt sind (Fink und Zissler, 1989). Das A-System ist weiterhin notwendig für die Reaktion von Zellen auf Stresskräfte (Kompressionen) im Agar, ein Phänomen, das auch als Elastikotaxis bezeichnet wird (Fontes und Kaiser, 1999 ).

### 1.2.2 Das S-System

Gene werden dem S-System zugeordnet, wenn sie mutiert in einer  $A^-S^+$ -Mutante zu einem nichtschwärmenden Doppelmutanten-Phänotyp führen (Hodgkin und Kaiser, 1979 b). Solche Mutanten zeigen eine starke Reduktion der Schwärmrate, die abhängig von der Agarkonzentration ist und besitzen meist einen Defekt in der Entwicklung (Shi und Zusmann, 1993; MacNeil et al., 1994 b). Typ IV Pili sind notwendig für soziales Gleiten (Kaiser, 1979). In *M. xanthus* wurden 17 Gene entdeckt, welche meist ausgeprägte Homologien zu Genen aufweisen, deren Produkte bei *Pseudomonas*

*aeruginosa* an der Expression, der Prozessierung, am Export, am Zusammenbau und der Funktion von Typ IV Pili beteiligt sind (Wu und Kaiser, 1996; Wu und Kaiser, 1997; Wu et al., 1997; Wall et al., 1998; Wu et al., 1998; Wall et al., 1999). Typ IV Pili sind bei Pseudomonaden und Neisserien an einer Oberflächentranslokation beteiligt, die als "Twitching" bezeichnet wird (Henrichsen et al., 1983).

Das *pilA* Gen kodiert für die Hauptkomponente des Pilus (Prepilin). Seine Expression wird durch das Zwei-Komponenten-Regulationssystem PilS/PilR kontrolliert, wobei *pilR* für einen putativen Transkriptionsaktivator kodiert und *pilS* für einen negativen Regulator der *pilA*-Expression (Wu et al., 1997). Die Genprodukte von *pilB* und *pilC* sind aufgrund ihrer Homologie am Piluszusammenbau, das heißt an der Polymerisation der Pilusuntereinheiten, beteiligt (Nunn et al., 1990). PilH zeigt große Homologien zu ABC (ATP-Bindekassette)-Transporterproteinen und ist vermutlich in die Pilusbildung involviert. Die Produkte von *pilG* und *pilI* zeigen keine Homologien zu bekannten Proteinen (Wu et al., 1998). Eine Homologie zu Mitgliedern der Proteinsuperfamilie der Sekretine, welche einen Kanal in der äußeren Membran zum Makromolekültransport bilden, zeigt *pilQ* (Wall et al., 1999). Mutationen in allen bereits erwähnten *pil* Genen führen zu einem Pili<sup>-</sup>/S<sup>-</sup>-Phänotyp, wohingegen eine Mutation im *pilT* Gen einen Pili<sup>+</sup>/S<sup>-</sup>-Phänotyp hervorruft (Wu und Kaiser, 1997). Das PilT-Protein besitzt wie PilB Walker-Boxen, das heißt konservierte Motive, an welche ATP bindet (Walker et al., 1982). Für PilT wird ein Modell postuliert, bei dem das Protein an der Pilus-Retraktion bei *M. xanthus* beteiligt ist (Kaiser, 2000; Sun et al., 2000). Bei *Neisseria gonorrhoeae* konnte gezeigt werden, daß Typ IV Pili eine Retraktionskraft besitzen, die bei nichtpilierten *pilA*-Mutanten hingegen nicht nachgewiesen werden konnte (Kaiser, 2000; Merz et al., 2000).

Die Gene *tgl* (transient gliding) und *dsp* (dispersed) werden auch dem S-System zugeordnet, da Mutationen in ihnen einen S<sup>-</sup>-Phänotyp hervorrufen. *Tgl*-Mutanten besitzen keine Pili (Rodrigues-Soto und Kaiser, 1997 a). Das Tgl-Protein kodiert für ein putatives Lipoprotein in der äußeren Membran. *Tgl*-Mutanten können durch *tgl*<sup>+</sup>-Zellen zum S-Gleiten stimuliert werden, es ist also eine phänotypische Komplementation möglich. Dafür ist ein direkter Zell-Zellkontakt notwendig, kein diffusibler Faktor ist beteiligt (Rodrigues-Soto und Kaiser, 1997 a, b). Die Zellen richten sich linienförmig aus und es wird vermutet, daß Tgl im Piluszusammenbau wirkt und extrazellulär entsprechende Mutanten komplementieren kann (Wall und Kaiser, 1998; Wall et al., 1998). *Dsp*-Mutanten besitzen funktionsunfähige oder keine Fibrillen und somit Defekte

in der Zellkohäsion und in der Entwicklung (Arnold und Shimkets, 1988; Behmlander und Dworkin, 1991). Fibrillen sind extrazelluläre, irreguläre Strukturen mit variabler Dicke und Länge. Sie dienen der Zellkohäsion, werden zelldichteabhängig gebildet und bestehen aus Polysacchariden, welche integrale Fibrillenproteine enthalten (Behmlander und Dworkin, 1991; Behmlander und Dworkin, 1994;). Mutationen im *dsp* Gen können phänotypisch durch die Zugabe von gereinigten Fibrillen komplementiert werden (Chang und Dworkin, 1994).

*M. xanthus* Mutanten mit einem Defekt im *sglk*-Locus besitzen einen S<sup>-</sup>-Phänotyp, keine Fibrillen und haben die Fähigkeit zur Zellkohäsion und zur Ausbildung von Fruchtkörpern verloren. Das *sglk* Gen, welches mit dem stromaufwärts gelegenen *grpS* Gen kotranskribiert wird, zeigt Homologien zum Hsp70 Chaperon (DnaK). *GrpS* kodiert für ein GrpE-Homolog und Mutationen beeinflussen weder das soziale Gleiten noch die Entwicklung. GrpE und DnaK sind zwei der drei Komponenten der Chaperonmaschinerie, die eine Schlüsselrolle in der Polysaccharidsekretion spielen (Weimer et al., 1998).

Lipopolysaccharide sind die dritte extrazelluläre Komponente neben Pili und Fibrillen, die am sozialen Gleiten beteiligt sind. Der *sas*-Locus von *M. xanthus* enthält die Gene *wzm*, *wzt* und *wbgA*. Das Produkt von *wbgA* zeigt keine Homologien zu bereits bekannten Proteinen, wohingegen *wzm* und *wzt* für putative Proteine kodieren, welche Homologien zu ABC-Transportern aufweisen, die für den Export des O-Antigens in den periplasmatischen Raum verantwortlich sind. Ihnen wird eine Rolle in der Lipopolysaccharid O-Antigen-Biosynthese zugeordnet (Bowden und Kaplan, 1998).

### 1.2.3 Das *frz*- und *dif*-System

Neben dem A- und S-System ist der *frz*-Locus (frizzy) für das Gleiten in *M. xanthus* mitverantwortlich, er reguliert die Umkehrfrequenz gleitender Zellen. Mutationen in den *frz* Genen führen zu einem Defekt in der Aggregation und in der Entwicklung. Die Sporulationsrate ist stark vermindert (Zusmann, 1982; Shi und Zusman, 1993). Der Locus enthält 7 Gene (*frzA, B, CD, E, F, G, Z*), die große Homologien zu den Chemotaxisgenen der Enterobakterien aufweisen (Blackhart und Zusman, 1986; McBride et al., 1989; McCleary und Zusman; 1990 Trudeau et al., 1996). Das *frzCD* Gen kodiert für ein putatives MCP (methyl-accepting protein), das cytoplasmatisch lokalisiert ist und in Abhängigkeit von FrzF, einer putativen Methyltransferase,

methyliert wird (McCleary et al., 1990; McBride et al., 1992; Kashefi und Hartzell, 1995). Das FrzCD-Protein liegt in Anwesenheit von Casiton, Hefeextrakt oder speziellen Lipiden und Alkoholen in methylierter Form vor. Unter Hungerbedingungen oder in Anwesenheit von Isoamylalkohol findet keine Methylierung statt (McCleary et al., 1990). Die *frzCD*-Mutante zeigt im Gegensatz zu anderen *frz*-Mutanten eine erhöhte Umkehrfrequenz der Gleitrichtung (Blackhart und Zusman, 1985; Spormann und Kaiser, 1999). Ein positives Signal erhält das *frz*-System durch das C-Signal, welches für die Regulation der Sporulation und der Entwicklungsaggregation verantwortlich ist. Die FrzCD-Methylierung hängt auch von der C-Faktorkonzentration ab (Sogaard-Andersen und Kaiser, 1996; Sogaard-Andersen et al., 1996). *FrzG* kodiert für eine putative Methylesterase und *frzA* für ein CheW-Homolog, welches die Verknüpfung zwischen dem MCP und der Histidinkinase herstellt (Blackhart und Zusman, 1986). Das Genprodukt von *frzE* besitzt eine CheA homologe Histidinkinase-Domäne und eine CheY homologe Regulator-Domäne. FrzE besitzt eine Autophosphorylierungs- und eine Transphosphorylierungs-Aktivität (McCleary und Zusman, 1990). Das FrzZ-Protein enthält zwei CheY Regulator-Domänen und stellt neben FrzE einen möglichen Regulator dar, welcher mit dem hypothetischen Schalter des Gleitmotors wechselwirkt (Trudeau et al., 1996). Als einziges Gen kodiert *frzB* für kein Che-Homolog. Neben dem *frz*-Locus kodieren die Gene *difA-E* (defective in fruiting) für Proteine mit Homologien zu Chemotaxisproteinen von Enterobakterien (Yang et al. 1998). Mutationen im *dif*-Locus führen zu einem Verlust der Fibrillen und somit der Fähigkeit zur Zellkohäsion. Die Mutanten bilden wenige oder keine Aggregate, zeigen aber im Vergleich zu *frz*-Mutanten eine Wildtyp-Umkehrfrequenz der Gleitrichtung. Es wird vermutet, daß die Produkte der *dif* Gene an der Regulation der Biosynthese von Fibrillen oder an der Regulation ihres Zusammenbaus beteiligt sind.

#### 1.2.4 Das *mgl*-System

Zusätzlich den bereits beschriebenen Genloci gibt es den *mgl*-Locus (mutual function for gliding), welcher für das A- und S-Gleiten benötigt wird (Hodgkin und Kaiser, 1979 a). Mutationen führen zu einem nichtschwärmenden Phänotyp, einem Defekt in der Sporulation und Fruchtkörperbildung, sowie zu einem Verlust des C-Signals (Stephens und Kaiser, 1987; Kroos et al., 1988; Stephens et al., 1989). Das *mglBA*-Operon kodiert für ein putatives Protein mit Homologien zur Calcium-Bindestelle des Calmodulins der Hefe im Falle von *mglB*, wohingegen für *mglA* eine Homologie zur Nukleotidbindestelle von Sar1 und p21<sup>ras</sup> der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gefunden wurde. Diese

Proteine gehören zur Familie eukaryontischer GTPasen, welche regulatorische Proteine darstellen (Hartzell und Kaiser, 1991 a,b). In einer *mgIA*-Mutante konnte der Sporulationsdefekt durch die genomische Integration des Hefe *sar1* Gens behoben werden. Die Komplementation des Bewegungsdefektes erforderte zusätzlich die Mutation des *rpm* Gens (restore partial motility). Aufgrund dieser Versuche wurde postuliert, daß MglA eine GTPase ist, welche essentiell für die Sporulation, die Entwicklung und Bewegung ist (Hartzell, 1997). Die Gene *mgIA* und *mgIB* wurden auch bei *S. aurantiaca* kloniert und besitzen eine Sequenzhomologie von 90% zu den *mgI* Genen von *M. xanthus* (Schairer, 1993).

### 1.3 Fruchtkörperbildung und Sporulation

Myxobakterielle Zellen wachsen in Schwärmen vegetativ, solange ausreichend Nährstoffe vorhanden sind. Der komplexe Entwicklungszyklus wird durch einen Nährstoffmangel induziert. Die Zellen im Schwarm bewegen sich rhythmisch (rippling) und bilden Zellaggregate auf festen Oberflächen. Aus diesen entwickeln sich die Fruchtkörper (ca.  $10^5$  Zellen/Fruchtkörper), welche die metabolisch ruhenden, resistenten Sporen beinhalten. Die Sporen können unter geeigneten Nahrungsbedingungen wieder zu Schwärmen vegetativer Zellen auskeimen und sichern so das Überleben der Art (Dworkin, 1996).

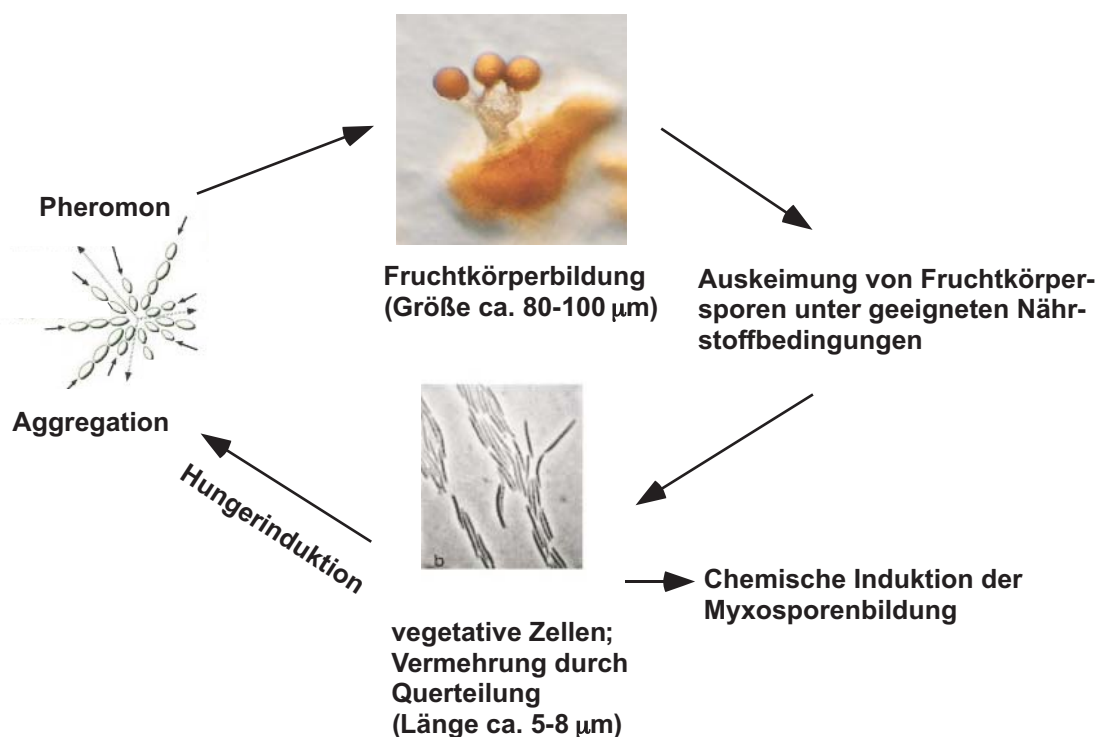


Abbildung 1.1: Der Lebenszyklus von *S. aurantiaca*



### 1.3.1 Artifiziiell induzierte Sporulation

Die Sporulation kann unabhängig von der Fruchtkörperbildung durch Zugabe von Glycerin, DMSO, Indol und einige seiner Derivate induziert werden (Gerth et al., 93; Dworkin, 94; Gerth und Reichenbach, 94; O'Connor und Zusman, 97). Bei *S. aurantiaca* löst auch die Zugabe bestimmter Konzentrationen monovalenter Kationen zu vegetativen Kulturen die Sporenbildung aus (Reichenbach und Dworkin, 1970). Hinsichtlich der Proteinzusammensetzung unterscheiden sich durch artifiziielle Induktion erhaltene Sporen und Fruchtkörpersporen. Die Gene *ops* und *tps* kodieren die Sporenspezifischen Proteine S1 und S von *M. xanthus*, welche untereinander eine Sequenzhomologie von 88% aufweisen (Inouye et al., 1983 a). Protein S1, welches spät in der Entwicklung gebildet wird, ist in beiden Sporentypen vorhanden, wohingegen das früh in der Entwicklung gebildete Protein S nur in den Fruchtkörpersporen auftritt (Downard und Zusman, 1985). Das 19 kDa große Protein S ist die Hauptkomponente (ca. 15% der Zellmasse) der dicken Fruchtkörpersporenhülle und besitzt die Fähigkeit zum "self-assembly" auf der Sporenoberfläche in Anwesenheit von Calciumionen (Inouye et al., 1979 a). Protein S besitzt zwei Domänen mit Homologien zu den Calcium-Bindemotiven von Rinderhirn-Calmodulin und zu Linsenproteinen ( $\beta$ - und  $\gamma$ -Crystallin) vom Rind (Inouye et al., 1983 b; Witsow et al., 1985). Protein S1 akkumuliert in den Sporen (Teintze et al., 1985). Mutationen im *ops* Gen führen zu einer Verzögerung der Fruchtkörperbildung und zu einer verminderten Sporulation. Mutationen in dem *tps* Gen zeigen keinen Phänotyp (Komano et al., 1984).

Aus Indol-induzierten Sporen von *S. aurantiaca* wurde das 21 kDa HspA-Polypeptid (früher SP21) isoliert. Mit Hilfe von Antikörpern konnte HspA in Fruchtkörpersporen, in Hitzeschockzellen und in Zellen, die unter Sauerstoffmangel litten, nachgewiesen werden. In vegetativen Zellen ist HspA nicht nachweisbar (Heidelbach et al., 1993 a, b). Mittels Immunoelektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, daß HspA in Hitzeschockzellen in der Zellperipherie und in Indol-induzierten Sporen sowohl in der Peripherie, als auch im Cytoplasma in Aggregatform vorliegt. In Fruchtkörpersporen findet man HspA bevorzugt an der Zellwand und in der äußeren Peripherie (Lünsdorf et al., 1995). Das HspA-Protein besitzt Homologien zu kleinen Hitzeschockproteinen (LMW-HSP) aus *Arabidopsis* und der Sojabohne (Heidelbach et al., 1993 a). Viele LMW-HSPs wirken als Chaperone oder Proteasen in der Faltung, Reparatur, Translokation, aber auch in der Degradation von Proteinen. Eine Chaperonaktivität von HspA konnte biochemisch nachgewiesen werden (Shen, 1999).

### 1.3.2 Fruchtkörpersporen

In Fruchtkörpersporen von *M. xanthus* konnten weitere spezifische Proteine identifiziert werden, deren Vorkommen in artifiziell erhaltenen Sporen nicht untersucht wurde. Das spät in der Entwicklung gebildete Protein U besitzt eine Signalpeptidsequenz und akkumuliert auf der Sporenoberfläche (Inouye et al., 1979 b; Gollop, 1991). Das 30 kDa große Protein C wird früh in der Entwicklung, noch vor Protein S, gebildet und ist unabhängig von Protein S und S1 auf der Sporenoberfläche lokalisiert (McCleary, 1991). Weiterhin wurde das Sporen-spezifische Protein W identifiziert. In den Sporen bildet Protein W zusammen mit Phosphat, Calcium und Magnesium große Partikel, die zur Phosphatspeicherung dienen. Mutationen im kodierenden Gen (*prw*), welches spät in der Entwicklung exprimiert wird, führen zu einer verzögerten Fruchtkörperbildung und einer verminderten Sporenproduktion. Protein W-Polyphosphatpartikel werden nicht gebildet (Otani et al., 1998). In jüngster Zeit wurde das *espAB*-Operon (early sporulation), welches nur unter Nährstoffmangel exprimiert wird, beschrieben. Nullmutation in *espA* führen zu einer verfrühten Sporenbildung, wohingegen die *espB*-Mutante eine verspätete Sporenproduktion aufweist. Das *espB* Gen kodiert für eine putative Serin/Threonin-Proteinkinase, wohingegen das *espA* Gen eine Homologie zu Histidinkinasen besitzt. Die Autoren postulieren für das EspA-Protein eine inhibitorische Funktion in der Sporulationsregulation (Cho und Zusman, 1999 a).

### 1.3.3 Die Fruchtkörperbildung bei *M. xanthus* und *S.aurantiaca*

Die Entwicklung von myxobakteriellen Fruchtkörpern erfordert den Austausch von diffusiblen Signalsubstanzen und einen direkten Zell-Zellkontakt. Bei *M. xanthus* wurden entwicklungsdefekte Mutanten isoliert (Transposonmutagenese), welche die Entwicklung vollenden konnten, wenn sie mit Wildtyp-Zellen oder Mutanten aus einer anderen Komplementationsgruppe (A-E) gemischt wurden. Die Komplementation findet nicht auf genetischer Ebene statt, sondern durch synergistische Interaktion (Hagen et al., 1978). So kann man bei *M. xanthus* verschiedene Entwicklungsphasen definieren, die von der Produktion unterschiedlicher Signale (*Asg*, *Bsg*, *Csg*, *Dsg*, *Esg*) abhängig sind (Kaiser und Kroos, 1993). Dabei wurde (p)ppGpp als Initiationssignal der Entwicklung unter Hungerbedingungen identifiziert (Singer und Kaiser, 1995).

**A-Signal:** Mittlerweile konnten fünf *asg* Gene (*asgA-E*) identifiziert und charakterisiert werden. Mutationen in den *asg* Genen führen zu einem Defekt in der Aggregation, Sporulation und in einer verminderten A-Faktor Produktion. Die Gene werden früh in

der Entwicklung, ein bis zwei Stunden nach Entwicklungsstart exprimiert (Kuspa und Kaiser, 1989; Mayo und Kaiser, 1989; Cho und Zusman, 1999 b; Garza et al., 2000 a, b). Der A-Faktor besteht aus einem Gemisch von Aminosäuren und Peptiden, welche durch die Wirkung von spezifischen Proteasen gebildet werden, deren Substrat bisher nicht identifiziert wurde (Kuspa et al., 1992 a, b; Plamann et al., 1992). *Asg*-Mutanten können durch die Zugabe definierter Aminosäuren und Peptide ihre Entwicklung vollenden (Kuspa et al., 1992 a). Das *asgA* Gen besitzt N-terminal Homologien zu Domänen von Antwortregulatoren und C-terminal zu Domänen von Histidinkinasen (Plamann et al., 1995). Eine Autokinase- und Autophosphorylierungs-Aktivität konnte für *AsgA* nachgewiesen werden (Li und Plamann, 1996). *AsgB* kodiert für ein putatives Protein mit Helix-Turn-Helix-DNA-Bindemotiv und besitzt Homologien zu dem Hauptsigmafaktor-Segment, welche die -35 Promotorregion erkennt und daran bindet. Da Segmente fehlen, welche mit der RNA-Polymerase oder der -10 Promotorregion interagieren könnten, postulieren die Autoren eine Transkriptionsfaktoraktivität für das *AsgB*-Protein (Plamann et al., 1994). *AsgC* kodiert für den Hauptsigmafaktor (*sigA*) in *M. xanthus* (Davis et al., 1995). Das putative *AsgD*-Protein besitzt N-terminal Homologien zu Antwortregulator-Domänen und C-terminal zu Histidinkinasen. Aufgrund der Fähigkeit der Mutanten zur Bildung von Fruchtkörpern auf einem stringenten Hungermedium wird vermutet, daß *AsgD* direkt oder indirekt an der Detektion der Nährstofflimitierung beteiligt ist (Cho und Zusman, 1999 b). Das Gen *asgE* kodiert für ein Protein mit Homologie zu *AtzA*, *AtzB* von *Pseudomonas*. Die Produkte dieser Gene sind am Abbau des Herbizids Atrazin beteiligt (Garza et al., 2000 a). Als Modell wird postuliert, daß das Hungersignal durch die Wirkung von *AsgA*, ein Antwortregulator und eine Histidinkinase, umgeformt wird. *AsgB*, ein DNA-Bindeprotein mit Transkriptionsfaktoraktivität wirkt und der Hauptsigmafaktor, kodiert durch *asgC*, führt zur Expression von Genen, deren Produkte für die Bildung des A-Signals notwendig sind.

**B-Signal:** *Bsg*-Mutationen fallen in einen Genlocus, *bsgA*, dessen Genprodukt früh in der Entwicklung wirkt. Das Gen *bsgA* kodiert für eine ATP-abhängige intrazelluläre Protease mit Homologien zu den *lon* Genen von *E. coli* und *B. brevis*. Die *bsgA*-Mutanten, welche einen Defekt in der intrazellulären Proteolyse besitzen, bilden weder Fruchtkörper noch Sporen (Gill und Cull, 1986; Gill et al., 1993).

**C-Signal:** Alle *csg*-Mutationen fallen in den Genlocus *csgA*. Mutationen in dem Gen führen zu einem Defekt im Rippling, sowie in der Aggregation und Sporulation (Shimkets und Asher, 1988). Die Expression von *csgA* erfolgt ca. 6 h nach Entwicklungsstart und steigt konstant an. Das C-Signal (C-Faktor kodiert durch *csgA*) wirkt nach dem A- und B-Signal (Hagen und Shimkets, 1990) und die Expression von *csgA* ist abhängig vom C-Faktor. In der stromaufwärts-Region des Gens konnten verschiedene Bereiche identifiziert werden, die unerlässlich sind für die Sporulation, Fruchtkörperbildung und für das Rippling (Kim und Kaiser, 1991; Li et al., 1992). Bei CsgA handelt es sich um ein extrazelluläres Protein, welches mit der Zelloberfläche assoziiert ist (Shimkets und Rafiee, 1990). Es besitzt die konservierten Konsensussequenzen der Klasse-II-Alkohol-Dehydrogenasen, welche in NAD<sup>+</sup>- oder NADP<sup>+</sup>-Anwesenheit bestimmte Reduktions- oder Oxidations-Reaktionen katalysieren (Baker, 1994; Lee und Shimkets, 1994). Eine NADP<sup>+</sup>-Bindestelle wurde in CsgA identifiziert und *csgA*-Mutanten können durch die Zugabe von CsgA-Protein und NAD<sup>+</sup> oder NADP<sup>+</sup> komplementiert werden (Lee et al., 1995). Die Wirkung des C-Signals erfordert einen engen Zell-Zellkontakt, genauer gesagt einen End-zu-End-Kontakt der Zellen (Kim und Kaiser, 1990; Sager und Kaiser, 1994). Der C-Faktor stimuliert den Frz-Signaltransduktionsweg, welcher die Umkehrfrequenz der gleitenden Zellen reguliert. Es konnte gezeigt werden, daß im Gegensatz zum Wildtyp in *csgA*-Mutanten der putative MCP, FrzCD, in der Entwicklung weniger stark methyliert wird. Die Mutanten zeigten nach CsgA-Protein Zugabe eine Wildtyp FrzCD-Methylierung (Sogaard-Anderson und Kaiser, 1996). Das C-Signal führt auf noch nicht geklärte Weise zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsaktivators FruA, welcher Homologien zu bakteriellen Regulatorproteinen mit HTH-Motiv besitzt und ca. 6 h nach Entwicklungsinduktion gebildet wird. Anschließend wird das *frz*- und *dev*-System aktiviert, was dann zur Aggregation und Sporulation führt (Ellehaug et al., 1998). Mutationen im *fruA* Gen ermöglichen die Bildung von Aggregaten, doch findet keine Sporulation statt (Ogawa et al., 1996). Die *fruA*-Expression ist von den Signalen A und E abhängig. Der *dev*-Locus besteht aus den gemeinsam transkribierten Genen *devT*, *devR* und *devS*, deren Genprodukte keine Homologien zu bekannten Proteinen besitzen. Die *dev* Gene werden nur in den Fruchtkörpern exprimiert und nicht in Zellen außerhalb der Fruchtkörper. Das *dev*-Operon wird negativ autoreguliert durch das *devS*-Genprodukt (Julien et al., 2000). In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, daß die Expression von *csgA* abhängig von dem Gen *act1* ist, welches für ein  $\sigma^{54}$  - Aktivatorprotein kodiert. Es wurde postuliert, daß es auf das C-Signal reagiert und in

einem positiven "feedback-loop" die *csgA*-Expression verstärkt (Gorski et al., 2000). Die Isolierung von verschiedenen *csgA* Sporulations-Pseudorevertanten, welche die Entwicklungsdefekte der *csgA*-Mutation supprimieren, führte zum *socABC*- und dem *socE*-Locus (Rhie und Skimkets, 1989; Lee und Skimkets, 1994; 1996). SocE ist essentiell für das vegetative Wachstum von *M. xanthus* und stellt den ersten identifizierten Repressor der Entwicklung dar. Eine Verminderung der SocE-Konzentration in Wildtyp-Zellen führt zu einem Wachstumsstopp, einer Inhibition der DNA-Synthese, der Bildung stabiler RNA, einer (p)ppGpp-Akkumulation und zur Induktion der Sporulation. Eine (p)ppGpp-Akkumulation inhibiert die *socE*- und stimuliert die *csgA*-Transkription sowie die A-Faktor-Produktion. Das *socE* Gen kodiert für ein basisches Protein, das keine signifikanten Homologien zu bekannten Proteinen besitzt (Crawford und Skimkets, 2000 a, b). (p)ppGpp wurde als Initiationssignal der Entwicklung identifiziert und akkumuliert in den Zellen bei Aminosäurenmangel (Manoil und Kaiser, 1980 a, b). Die (p)ppGpp-Synthetase des Myxobakteriums *M. xanthus*, kodiert durch das Gen *relA*, wurde kloniert. RelA-Mutanten besitzen einen Block in der Entwicklung bereits vor der Aggregationsphase und zeigen einen Defekt in der A-Faktor-Produktion sowie in der (p)ppGpp-Akkumulation. Die Mutation konnte durch das RelA-Protein von *E. coli* komplementiert werden (Singer und Kaiser 1995; Harris et al., 1998).

Mit dem *csgA* Gen aus *M. xanthus* als Sonde, konnte das *csgA* homologe Gen aus *S. aurantiaca* isoliert werden. Das Gen besitzt eine Sequenzhomologie von 70% zu *M. xanthus*. Auf der Proteinebene konnte eine Homologie von 54% nachgewiesen werden. Als Folge der Inaktivierung des *csgA* Gens von *S. aurantiaca* entstanden Aggregate, an welche Sporangien angeheftet sind (Butterfaß, 1992). Die Expression von *csgA* im Verlauf der Fruchtkörperbildung konnte nachgewiesen werden (Milosevic, persönliche Mitteilung).

**D-Signal:** Das D-Signal wirkt ca. ein bis zwei Stunden nach Entwicklungsstart. Das *dsg* Gen, welches sowohl vegetativ als auch unter Nährstoffmangel exprimiert wird, zeigt Homologien zu IF3, einem Translationsinitiationsfaktor von *E. coli* (Cheng und Kaiser, 1989 a, b; Kalman et al., 1994). *Tn5*-Insertionsmutanten sind nicht lebensfähig, wohingegen Punktmutationen erzeugt werden können. Diese Mutanten zeigen eine abnormale oder verzögerte Aggregation und die Sporulationsfähigkeit ist reduziert (Cheng und Kaiser, 1989 a, b).

**E-Signal:** *Esg*-Mutanten zeigen eine Veränderung in der Entwicklung nach ca. drei bis fünf Stunden. Eine verminderte Aggregations- und Sporulations-Fähigkeit ist zu beobachten. Der *esg*-Locus enthält zwei Gene, welche sowohl in vegetativen Zellen als auch unter Hungerbedingungen exprimiert werden (Downard et al., 1993). Die *esg*-Genprodukte zeigen Homologien zu den E1 $\alpha$ - und E1 $\beta$ - Unterheiten des BCKAD-Komplexes (branches-chain keto acid dehydrogenase complex), der an der Bildung von kurzkettigen, verzweigten Fettsäuren beteiligt ist (Toal et al., 1995). *Esg*-Mutanten können durch die Zugabe von bestimmten kurzkettigen, verzweigten Fettsäuren ihre Entwicklung vollenden, was vermuten läßt, daß die Mutanten verzweigten Aminosäuren (Leucin, Isoleucin und Valin) nicht mehr über den BCKAD-Komplex umwandeln können. Weiter wird vermutet, daß freigesetzte verzweigte Fettsäuren selbst als E-Signal wirken (Downard und Toal, 1995).

#### 1.3.4 Proteinkinasen bei *M. xanthus*

Aufgrund der Parallelen zwischen der komplexen Entwicklung von *M. xanthus* und *D. discoideum* wurde vermutet, daß auch in Myxobakterien ein Signaltransduktionssystem bestehend aus Rezeptor, Effektor und Proteinkinasen existiert. Unter Verwendung von Oligonukleotiden, welche spezifisch sind für die hoch konservierten Regionen eukaryontischer Protein-Serin/Threonin-Kinasen, konnten 26 Signale detektiert werden (Zhang et al., 1992). Mittlerweile wurden 12 Kinasen kloniert, sequenziert und 5 davon weiter analysiert. Aufgrund der Phänotypen von Mutanten konnten zwei Klassen definiert werden. Proteinkinasen, kodiert durch die Gene *pkn* 1, 2 und 5 stellen potentielle negative Regulatoren der Differenzierung dar, da Mutationen zu einer verfrühten Aggregation und Fruchtkörperbildung führen (Udo et al., 1995; Zhang et al., 1996; Munoz-Dorado et al., 1991). Die Proteinkinasen Pkn 6 und Pkn 9 wirken vermutlich als positive Regulatoren, da Mutationen in den für sie kodierenden Genen zu einer Verzögerung der Aggregation und Fruchtkörperbildung führen (Zhang et al., 1996; Hanlon et al., 1997).

#### 1.3.5 Spezifische Faktoren und Gene der Fruchtkörperbildung bei *S. aurantiaca*

Bei *S. aurantiaca* wird die Aggregation der Zellen in der Entwicklung durch einen niedermolekularen, diffusiblen, extrazellulären Kommunikationsfaktor, ein Pheromon, stimuliert. Dies konnte durch ein Experiment gezeigt werden, bei dem dieser Faktor durch Dialyse entfernt wurde. Die Zellen bilden keine Aggregate mehr, durchlaufen aber

das Entwicklungsprogramm wenn die Dialyse gestoppt wird (Plaga et al., 1998). Das isolierte Pheromon, Stigmolon, ein Hydroxyketon (2,5,8 Trimethyl-8-hydroxy-nonan-4-on) besitzt ein Molekulargewicht von 200. In einen Pheromonbioassay wurde gezeigt, daß das Pheromon bei einer Konzentration von 1 nM bei *S. aurantiaca* seine volle biologische Aktivität entfaltet. Es hat keine Wirkung auf *M. xanthus* (Hull et al., 1998; Plaga et al., 1998).

Zur Identifikation von entwicklungsabhängigen Genen wurden bei *S. aurantiaca* mittels einer *Tn5lacZ*-Promotorsonde über 700 Insertionsmutanten isoliert, welche unterschiedliche Defekte in der Fruchtkörperbildung zeigen. Anhand ihres Phänotyps konnten diese Mutanten in drei Klassen eingeteilt werden: Mutanten, die abnormale Fruchtkörper bildeten, welche, die nur noch zu Klumpen aggregieren konnten und Mutanten, die weder eine Aggregation noch eine Fruchtkörperbildung aufwiesen. Mutante AP182, welche nur noch klumpige Aggregate bilden kann, wurde genauer analysiert (Pospiech, 1992). Die Insertionsstelle der *Tn5lacZ*-Promotorsonde konnte im Gen *fbfB* lokalisiert werden, welches eine Homologie zur Galaktoseoxidase des Pilzes *Dactylium dendroides* aufweist. Die Expression von *fbfB* ist abhängig von der Fruchtkörperentwicklung. Sie beginnt ca. 14 h nach Hungerinduktion und erreicht nach ca. 30 h ihr Maximum. Eine Mischung der *fbfB*-Mutante mit der nichtaggregierenden Transposonmutante AP191 vor dem Hungerbeginn führte zu einem intermediären Phänotyp in der Fruchtkörperbildung. Es wurde eine champignonartige Struktur beobachtet, wie sie auch in der Wildtyp-Entwicklung nach ca. 15 h auftritt (White, 1993; Silakowski et al., 1998). Diese partielle phänotypische, extrazelluläre Komplementation läßt den Schluß zu, daß ein Austausch von Substanzen stattfindet, welche für die Fruchtkörperbildung notwendig sind. Stromabwärts des *fbfB*-Stopkodons wurden weitere offene Leserahmen identifiziert, deren Produkte nicht an der Fruchtkörperbildung beteiligt sind, da Mutationen in diesen Genen keinen Effekt auf die Entwicklung zeigten (Silakowski et al., 1998). Eine Klonierung und Sequenzierung dieser stromabwärts-Region führte zu der Identifikation des *mta*-Genclusters, welcher die Gene *mtaA-G* beinhaltet. Die Produkte sind für die Bildung und Modifikation des Sekundärmetaboliten Myxothiazol (ein Inhibitor der Elektronentransportkette des bc<sub>1</sub>-Komplexes der Atmungskette) verantwortlich und stellen unter anderem Polyketidsynthasen oder auch nichtribosomale Peptidsynthetasen dar (Beyer et al., 1999; Silakowski et al., 1999). Stromaufwärts des *fbfB*-Startkodons wurde ein weiterer offener Leserahmen mit entgegengesetzter Transkriptionsrichtung, *fbfA*, identifiziert, dessen Produkt eine Homologie von 30% zu NodC von Rhizobien, einer N-

Aceylglukosaminyl-Transferase, aufweist. Auch die *fbfA*-Genexpression ist entwicklungsabhängig. Die Expression erfolgt ca. 8 h nach Hungerinduktion und weist ein Maximum nach ca. 40 h auf. Die *fbfA*-Mutante besitzt analog zur *fbfB*-Mutante einen klumpigen Phänotyp. Eine Mischung der Zellen einer *fbfA*-Mutante mit der nichtaggregierenden Transposon-Mutante AP191 vor dem Transfer auf das Hungermedium führt zu einer morchelartigen Struktur, die man auch in der Fruchtkörperentwicklung des Wildtyps nach ca. 12 h beobachten kann (Silakowski et al., 1996). Die Mischung der *fbfA*- und *fbfB*-Mutante führt ebenfalls zu einer morchelartigen Struktur (Silakowski et al., 1998). Ca. 1 kbp stromabwärts des Terminationskodons des *fbfA* Gens wurde ein weiterer offener Leserahmen (ORF), *sspA*, lokalisiert (Silakowski, 1997). *SspA* kodiert für ein putatives Polypeptid mit Homologien zum humanen Phosphoprotein Synapsin IA, SynI, das eine Rolle bei der Regulation der Transmitterausschüttung am synaptischen Spalt haben soll (Thiel, 1993).

## 1.4 Transkriptionsregulation bei Myxobakterien

Bei Prokaryonten wird die Genexpression hauptsächlich auf der Ebene der Transkription reguliert, wobei die Spezifität der RNA-Polymerase bezüglich der Promotorstruktur durch die verschiedenen Sigmafaktoren bestimmt wird. In Myxobakterien werden viele Gene in Abhängigkeit von der Entwicklung, aber auch im vegetativen Stadium exprimiert (Kroos et al., 1986; Kroos und Kaiser, 1987). Bis jetzt konnten sechs verschiedene Sigmafaktoren in *M. xanthus* identifiziert und charakterisiert werden. SigA ist der Hauptsigmafaktor, welcher eine große Homologie zu  $\sigma^{70}$  aus *E. coli* und  $\sigma^{43}$  aus *Bacillus subtilis* aufweist (Inouye, 1990; Biran und Kroos, 1997). Die beiden Sigmafaktoren SigB und SigC sind entwicklungspezifisch, wobei *sigC* im frühen Stadium der Entwicklung gebildet wird und *sigB* im späten Stadium. SigB-Mutanten bilden normale Fruchtkörper, aber kein Sporen-spezifisches Protein S1. In SigC-Mutanten verläuft die Entwicklung normal, sie bilden aber auch auf komplexen Nährmedien Fruchtkörper, was zu der Vermutung führt, daß *sigC* für die Expression von Genen zuständig ist, deren Produkte in die negative Regulation der Fruchtkörperbildung einbezogen sind (Apelian und Inouye, 1990; Apelian und Inouye, 1993). SigD ist essentiell für die stationäre Phase, sowie für die Entwicklung. SigD-Mutanten besitzen Wachstumsdefekte in der späten logarithmischen und der stationären Phase, das heißt sie zeigen eine stark verminderte Lebensfähigkeit (Ueki



und Inouye, 1998). Das  $\sigma^{54}$ -kodierende Gen wurde kloniert und sequenziert. Die Konstruktion einer  $\sigma^{54}$ -Mutante war jedoch nicht möglich, was darauf hindeutet, daß dieser alternative Sigmafaktor essentiell ist (Kessler und Kaiser, 1997). Mittels des Two-Hybrid-Systems konnte ein ECF- (extracytoplasmic-function) Sigmafaktor, kodiert durch das *rpoE1* Gen, identifiziert werden. *RpoE1*-Mutanten zeigen eine Veränderung im Schwärmverhalten und die Aggregation ist beeinträchtigt (Ward et al., 1998).

In *S. aurantiaca* konnte der Hauptsigmafaktor SigA identifiziert werden (Skladny et al., 1994). Weiterhin wurden die beiden alternativen Sigmafaktoren SigB und SigC kloniert und charakterisiert, welche in der Entwicklung wirken. Der alternative Sigmafaktor SigB wird in Indol-induzierten Sporen, während der Fruchtkörperbildung und in Zellen, welche einem Hitzeschock ausgesetzt wurden, gefunden (Skladny et al., 1992.; Skladny, 1994). SigB-Mutanten zeigen keine phänotypischen Veränderungen der Fruchtkörper (Silakowski et al., 2001).

## 1.5 Myxophagen und ortsspezifische Rekombination

Verschiedene Bakteriophagen wurden isoliert, welche *M. xanthus* infizieren können (Burchard und Dworkin., 1966; Martin et al., 1978). Die Mitglieder der beiden Phagenfamilien Mx4 und Mx8 können alle *M. xanthus*-Stämme infizieren, wohingegen *S. aurantiaca* nur durch die Mx4-Phagen infiziert werden kann (Martin et al., 1978; Schairer persönlich Kommunikation). Die Mx8-Phagenfamilie (Mx8, Mx81, Mx82) infiziert den *M. xanthus* Wildtyp, aber auch Mutanten, welche keine Fruchtkörper mehr bilden können und verbleiben auch während der Entwicklung als stabile Prophagen im Genom (Orndorff et al., 1983). Der Phage Mx8, bestehend aus einem polyedrischen Kopf mit einem kurzen Schwanzteil, besitzt einen GC-Gehalt von ca. 67%, ein zirkuläres Genom von 51.7 kbp und integriert über ortsspezifische Rekombination in das Wirtsgenom (Stellwag et al., 1985). Bei der ortsspezifischen Rekombination findet im Gegensatz zur homologen Rekombination ein Austausch zwischen DNA-Segmenten statt, ohne daß eine ausgedehnte Homologie vorhanden ist (Craig, 1988). Ortsspezifische Rekombinasen der Integrase-Familie katalysieren diese Art der Rekombination, wobei die Integration in eine spezifische Stelle des bakteriellen Chromosoms erfolgt, die als *attB* (attachment B site) bezeichnet wird (Grainge und Jayaram, 1999). Analog enthält der das Bakterium infizierende Phage eine *attP* Stelle und kodiert unter anderem für die Integrase und die Excisionase. Ein Vergleich des bakteriellen *attB* Bereiches mit der *attP* Stelle des Phagen zeigt, daß in diesen

Bereichen große Sequenzhomologien existieren und daß ein zentraler Bereich (core) hoch konserviert ist (Campbell, 1992). Sehr häufig liegen die *attB* Domänen in der 3'-Region von tRNA Genen (Reiter et al., 1989; Bruttin et al., 1997; Van Mellaert et al., 1998; Rakin et al., 2001). Bei der Integration in das *M. xanthus* Chromosom entstehen Wirts-Phagen-Verbindungen auf beiden Seiten, welche als *attL* und *attR* bezeichnet werden. Sequenzvergleiche zwischen den DNA-Sequenzen von *attB*, *attP*, *attL* und *attR* bei *M. xanthus* zeigten, daß eine Region von 26 bp hoch konserviert ist. Die Klonierung eines 2.9 kbp Mx8-DNA-Fragmentes (kodiert unter anderem die Integrase) in einen Klonierungsvektor reichte aus, um diesen Vektor in das myxobakterielle Genom zu integrieren. Die *attP*-Sequenz des Phagen Mx8 liegt in der kodierenden Region des Integrase Gens *intP*. Nach der ortsspezifischen Rekombination kommt es zu einer Veränderung in der C-terminalen kodierenden Sequenz von *intP* durch die Einführung eines vorzeitigen Stopkodons. Dies führt zur Bildung des weniger aktiven IntX-Proteins (Tojo et al., 1996). Bei einer systematischen Analyse der Mx8-DNA-Region stromaufwärts des *intP* Gens wurden die Gene *uoi*, *mox* und *imm* identifiziert. *Imm* kodiert für ein putatives Protein mit Sequenzhomologien zu dem *Arabidopsis thaliana* G-Box-Bindefaktor 1 und ist notwendig für die Superinfektionsimmunität (Salmi et al. 98). Das Gen *mox* kodiert für eine putative DNA-Adeninmethylase, welche vermutlich die Mx8-Phagen-DNA vor Restriktion während der Infektion schützt (Magrini et al., 1997). Das *uoi* Gen kodiert für eine putative Excisionase und überlappt mit dem *intP* Gen. In einer detaillierten Sequenzanalyse wurden in *M. xanthus* zwei *attB* Stellen (*attB1*, *attB2*) identifiziert, die in der kodierenden Region von tRNA Genen liegen, welche für Asparaginsäure spezifisch sind (*trnD1*, *trnD2*). Die Integration in die *attB1* Stelle ist stark bevorzugt. Stromaufwärts der beiden beschriebenen tRNA Gene wurde ein weiteres tRNA Gen mit Spezifität für die Aminosäure Valin (*trnV1*) gefunden. Bei der ortsspezifischen Integration des Phagen Mx8 in die *M. xanthus attB1* Stelle wird der 3'-Bereich des tRNA Gens (*trnD1*) durch die Phagen-DNA ersetzt. Dies führt zu einem Austausch der Terminatorsequenz des tRNA Gens ( $t_{D1}$ ) durch einen spezifischen Terminator der Mx8-DNA ( $t_{Mx8}$ ) (Magrini et al., 1999 a,b).

Bei *S. aurantiaca* konnte gezeigt werden, daß Plasmide, welche das *intP* Gen und die dazugehörige stromaufwärts-Region enthalten, stabil in das Genom integrieren können (Shen, 1999).

## Zielsetzung der Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß Plasmide, welche ein bestimmtes DNA-Fragment des Myxophagen Mx8 enthalten (*intP* Gen und seine Promotorregion) stabil in das Genom von *S. aurantiaca* integrieren können. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte der *attB* Locus, in den die Integration über ortsspezifische Rekombination erfolgt, kloniert und genauer charakterisiert werden. Die stromaufwärts- und stromabwärts-Bereiche der *attB* site sollten auf das Vorhandensein von putativen offenen Leserahmen untersucht werden. Da bei *M. xanthus* die beiden *attB* sites in der 3'-Region von tRNA Genen gelegen sind, ist anzunehmen, daß auch die *S. aurantiaca* *attB* site in einem tRNA Gen lokalisiert ist. Der klonierte und sequenzierte *attB* Locus von *S. aurantiaca* sollte demnach auf die Anwesenheit von tRNA Genen untersucht werden. Zusätzlich stellte sich die Frage, ob die Integration von Plasmiden in diesen Bereich die Fruchtkörperentwicklung des Myxobakteriums beeinflusst. Da die ortsspezifische Integration im Vergleich zur homologen Rekombination wesentlich effizienter ist, sollten Plasmidkonstrukte hergestellt werden, um Expressionsanalysen von z.B. *fbf* Genen in dem *attB* Locus von *S. aurantiaca* durchführen zu können.

Ein weiteres Thema dieser Arbeit ist es, die stromabwärts-Region des *fbfA* und *sspA* Gens von *S. aurantiaca* genauer zu analysieren. Die beiden Gene sind in einer Transkriptionsrichtung orientiert und ca. 1 kbp voneinander getrennt. Es lagen zu Beginn der Doktorarbeit keine Informationen über weitere, putative offene Leserahmen in den stromabwärts-Regionen dieser Gene vor. Durch genaueste Sequenzanalysen und durch die Insertion von Antibiotika-Resistenz-Genen in diese Bereiche könnten neue Gene identifiziert werden. Die Beteiligung ihrer Genprodukte an der Fruchtkörperbildung sollte untersucht werden. Das Gen *sspA* besitzt eine Homologie zum humanen Phosphoprotein Synapsin IA. Unbekannt war eine mögliche Beteiligung an der Fruchtkörperentwicklung und der Verlauf seiner Expression sollte unter diesen Bedingungen analysiert werden sollten.

## 2. Ergebnisse

### Teil I: Klonierung und Charakterisierung der *attB* site von *S. aurantiaca*

#### 2.1 *attB-attP* vermittelte ortsspezifische Rekombination

Der Myxophage Mx8 integriert durch ortsspezifische Rekombination stabil in das Genom von *M. xanthus* und verbleibt auch während der Entwicklung lysogen. Diese Art der Rekombination wird durch eine ortsspezifische Rekombinase der Integrase-Familie katalysiert, die in Mx8 durch das Gen *intP* kodiert wird. In der kodierenden Sequenz von *intP* liegt die *attP* site. Komplementär findet man bei *M. xanthus* zwei nahe beieinander gelegene *attB* sites (*attB1* und *attB2*), in die die Integration des Phagen erfolgen kann. Durch die Integration entstehen zwei Wirts-Phagen-Verbindungen, die *attL* und *attR* sites. Bei *M. xanthus* wurde gezeigt, daß Plasmide, welche einen bestimmten Bereich des Mx8 Phagen (*intP* Gen mit *attP* site und das stromaufwärts gelegene *uoi* Gen) enthalten, auch stabil in das Genom des Bakteriums integrieren, ohne einen erkennbaren Phänotyp zu verursachen (Lee und Shimkets, 1996). Dieses System eignet sich für ektopische Komplementationen und für Expressionsstudien von Genen, deren Produkte an der Entwicklung beteiligt sind. Solche Plasmide integrieren auch stabil in das Genom von *S. aurantiaca* und stellen so eine alternative Methode zur homologen Rekombination dar, um DNA effizient in das Genom zu integrieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die *attB* site von *S. aurantiaca* kloniert und genauer charakterisiert werden.

##### 2.1.1 Detektion der *S. aurantiaca attB* site durch Southern-Analyse

Mit Hilfe der Southern-Analyse sollte die putative *attB* site von *S. aurantiaca* auf einem chromosomalen DNA-Fragment lokalisiert werden. Dazu wurde unter Verwendung der Primer SMPCR11 und SMPCR12 ein 592 bp Fragment aus der chromosomalen DNA von *M. xanthus* (DK 1622; Wildtyp) mittels PCR amplifiziert. Dieses Fragment enthält die beiden *attB* sites (*attB1* und *attB2*), welche in den 3'-Bereichen der Gene *trnD1* und *trnD2* (kodieren für tRNA<sup>Asp</sup>) lokalisiert sind. Stromaufwärts der beiden *trnD* Gene liegt

das *trnV1* Gen, welches für eine tRNA mit Spezifität für Valin kodiert (Magrini et al., 1998 a). Weitere offene Leserahmen wurden auf diesem DNA-Fragment nicht identifiziert. Das Fragment wurde als Sonde verwendet, da die Gene der beiden Myxobakterien oft eine hohe Homologie aufweisen und somit die Detektion der *S. aurantiaca attB* site durch Hybridisierung möglich sein sollte. Die chromosomale Wildtyp-DNA von *S. aurantiaca* und *M. xanthus* (diente als Kontrolle) wurde mit dem Enzym *Bam* HI restringiert. Die Southern-Analyse zeigt, daß die *S. aurantiaca attB* site auf einem ca. 4 kbp *Bam* HI DNA-Fragment lokalisiert ist. Bei *M. xanthus* dagegen sind zwei Signale bei ca. 4.5 kbp und ca. 15 kbp sichtbar (Abb. 2.1 A).

Abbildung 2.1: Southern-Analyse genomischer DNA des *S. aurantiaca* und *M. xanthus* Wildtyps. A) Das *M. xanthus attB* DNA-Fragment wurde als Sonde verwendet, die chromosomale DNA mit dem Restriktionsenzym *Bam* HI geschnitten. Spur 1: DNA Molecular Weight Marker IV (Roche Diagnostics); Spur 2: *M. xanthus*-DNA; Spur 3: *S. aurantiaca*-DNA. B) Die in Abb. 2.2 dargestellte 29bp Oligonukleotidsonde-Sonde wurde zur Hybridisierung eingesetzt, die chromosomale DNA mit dem Enzym *Bam* HI restringiert. Spur 1: DNA Molecular Weight Marker IV (Roche Diagnostics); Spur 2: *M. xanthus*-DNA; Spur 3: *S. aurantiaca*-DNA.

Alternativ wurde ein 29 bp großes, synthetisches Oligonukleotid als Sonde verwendet (Bio-*attB*). Diese enthält den als core-Sequenz bezeichneten Bereich, der sowohl in der *attP*, *attB1* und *attB2* in *M. xanthus* zu finden ist. Die core-Sequenz besteht aus einer 7 bp asymmetrische Sequenz, die von jeweils zwei 5 bp symmetrischen Sequenzen flankiert wird. Weiterhin sind in Bio-*attB* 12 bp vorhanden, die sowohl in der *intP*, als auch in der *trnD1* Sequenz bei *M. xanthus* vorkommen (Abb. 2.2; Magrini et al., 1998

a). Die Restriktion der chromosomalen Wildtyp-DNA von *S. aurantiaca* und *M. xanthus* erfolgte wie oben beschrieben. Mittels der Southern-Analyse konnten bei *S. aurantiaca* zwei Signale bei ca. 4 kbp und ca. 3.5 kbp detektiert werden. Bei *M. xanthus* sind zwei Signale bei ca. 4.5 kbp und ca. 20 kbp sichtbar (Abb. 2.1 B).

Abbildung 2.2: DNA-Sequenzvergleich der core-Regionen der Mx8 *attP* site und des *trnD1* Gens von *M. xanthus*. Unterstrichen ist die 7 bp asymmetrische Sequenz, die zu beiden Seiten von 5 bp langen, symmetrischen Sequenzen (Pfeil) flankiert ist. Die dargestellte Sequenz wurde zur Konstruktion der synthetischen Oligonukleotid-Sonde Bio-*attB* verwendet.

### 2.1.2 Integration des Plasmids pSH8 in die *attB* site von *S. aurantiaca*

Für die ortsspezifische Rekombination von Plasmiden in die *attB* site von *S. aurantiaca* wurde das Plasmid pSH8 konstruiert (Shen, 1999). Dieses Plasmid enthält ein 5.5 kbp großes DNA-Fragment des Myxophagen Mx8 mit dem Integrase kodierenden Gen *intP* (*attP* site enthalten) und dem stromaufwärts gelegenen, mit *intP* überlappenden, *uoi*-Gen (kodierend für eine putative Excisionase). Zusätzlich sind 5 kleine offene Leserahmen auf diesem Fragment vorhanden (siehe Abb. 2.3 C), welche keine Homologien zu bereits bekannten Proteinen aufweisen. Das Plasmid enthält ferner eine Kanamycin-Resistenz-Kassette zur Selektion und das promotorlose  $\Delta trpA-lacZ$ -Konstrukt für transkriptionelle Fusionen mit der  $\beta$ -Galaktosidase (Abb. 2.3 A). Durch eine Southern-Analyse vieler verschiedener Mutanten, die nach der Transformation des *S. aurantiaca* Wildtyps mit dem Plasmid pSH8 analysiert wurden, konnte gezeigt werden, daß die Integration von pSH8 immer in dieselbe Stelle des Genoms erfolgt. Dies läßt vermuten, daß *S. aurantiaca* nur eine *attB* site besitzt oder mehrere, welche sehr nahe beieinander lokalisiert sind (Shen, 1999). Zur Bestätigung dieser Ergebnisse und zur Analyse des Phänotyps einer so konstruierten Mutante, wurde das Plasmid pSH8 durch Elektroporation in den *S. aurantiaca* Wildtyp transferiert. Die Transformationseffizienz lag bei  $10^5$ - $10^6$  Transformanten/ $\mu$ g zirkulärer pSH8 Plasmid-DNA.

Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Plasmids pSH8 und des Genotyps der Mutante SM4. A) Plasmid pSH8 enthält ein 5.5 kbp DNA-Fragment des Myxophagen Mx8 mit der *attP* site (weiße Box). Die Transkriptionsrichtung der Integrase *intP* ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. pSH8 enthält ein Kanamycin- ( $Kan^r$ ) und Ampicillin-Resistenz-Gen ( $Amp^r$ ) zur Selektion. *ColE1*, der Replikationsursprung des *E. coli* ColE1 Plasmids; *f1(-)*, der Replikationsursprung des Phagen f1. Das  $\Delta trpA-lacZ$  Fragment ermöglicht transkriptionelle Fusionen mit  $\beta$ -Galaktosidase. Die komplementär in der *S. aurantiaca* Wildtyp-DNA vorhandene *attB* site ist als graue Box gekennzeichnet. B) Darstellung des Genotyps der Mutante SM4. C) Anordnung der ORFs des 5.5 kbp *attP* Fragmentes des Myxophagen Mx8 von Plasmid pSH8.

Mehrere Transformanten wurden in einer Southern-Analyse untersucht und die Ergebnisse von Shen, das heißt die Integration des Plasmids in eine einzige Stelle des Genoms, wurde bestätigt. Eine dieser Mutanten wurde als SM4 bezeichnet (Abb. 2.3 B). Für die Analyse des Genotyps wurde die chromosomale DNA der Mutante SM4 und des *S. aurantica* Wildtyps mit *Bam* HI/*Hind* III restringiert. Als Sonde in der Southern-Analyse diente das 5.5 kbp Mx8 Fragment. Im Gegensatz zum Wildtyp, bei dem keine Integration des Plasmids pSH8 vorliegt, zeigt die Mutante SM4 Signale bei ca. 3 und 9 kbp (Abb. 2.4).

Abbildung 2.4: Southern-Analyse genomischer DNA der Mutante SM4 und des *S. aurantiaca* Wildtyps unter Verwendung des 5.5 kbp *attP* Mx8 DNA-Fragmentes als Sonde. Die chromosomale DNA wurde mit den Enzymen *Bam* HI/*Hind* III restringiert. Spur 1: DNA Molecular Weight Marker II (Roche Diagnostics); Spur 2: DNA des Wildtyps; Spur 3: DNA der Mutante SM4.

### 2.1.3 Phänotyp-Analyse der Mutante SM4

Die Mutante SM4 wurde unter Hungerbedingungen auf ihre Fähigkeit zur Fruchtkörperbildung untersucht. Sie zeigt im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 2.5 A) einen heterogenen Phänotyp, welcher zum Teil aus Klumpen, aber auch aus morchel- oder champignonartigen Strukturen besteht (Abb. 2.5 B). Auf Hungermedium mit X-Gal ( $\beta$ -Galaktosidase-Substrat) zeigt sich ausschließlich die Champignonstruktur (Abb. 2.5 C). Dieser Versuch wurde durchgeführt, da das Plasmid pSH8, welches in dem Genom der Mutante SM4 vorhanden ist, das  $\Delta trpA-lacZ$ -Konstrukt enthält. Die Fähigkeit zur Wildtyp-Fruchtkörperbildung ist in dieser Mutante nicht vorhanden. Zur Absicherung



dieser Beobachtungen wurden mehrere Mutanten, die den selben Genotyp wie SM4 aufweisen, auf Fruchtkörperbildung untersucht. Sie zeigen den gleichen Phänotyp wie die Mutante SM4. Zur Analyse der phänotypischen Komplementation von Mutanten durch den Wildtyp eignen sich Mischexperimente. Dazu wurden Zellen der Mutante SM4 im Verhältnis 1:2 und 1:3 mit Wildtypzellen gemischt und auf Hungermedium inkubiert. Die Mutante SM4 kann durch Mischexperimente mit dem Wildtyp phänotypisch nicht zu einer Wildtyp-Fruchtkörperbildung komplementiert werden. Es konnten nur morchel- oder champignonartige Strukturen detektiert werden (Abb. 2.5 D).

Abbildung 2.5: Fruchtkörperformen verschiedener *S. aurantiaca* Stämme. A) Fruchtkörper des Wildtyps; B) Mutante SM4; C) Struktur der SM4 Fruchtkörper auf Wasseragar mit X-Gal; D) Fruchtkörper des Mischexperimentes der Mutante SM4 und dem Wildtyp (Mischungsverhältnis 1:3).

#### **2.1.4 Konstruktion des Integrationsplasmids pSM28 und der *S. aurantiaca* Mutante SM12**

Die Integration des Plasmids pSH8 in den *S. aurantiaca* Wildtyp erzeugte eine Veränderung der Fruchtkörperbildung. Die Ursache hierfür könnte in dem 5.5 kbp Mx8 DNA-Fragment liegen, da dort mehrere ORFs vorhanden sind, deren Genprodukte und Funktionen noch nicht weiter bekannt sind. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde

ein Plasmid, pSM28, konstruiert, welches ein 2.9 kbp Mx8 DNA-Fragment enthält. Bei *M. xanthus* konnte gezeigt werden, daß dieses kleinere Fragment, welches das *intP* Gen (mit der *attP* site) und dessen stromaufwärts-Region (*uoi* Gen) enthält, für die ortsspezifische Rekombination ausreichend ist (Tojo et al., 1996).

Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des Plasmids pSM28 und des Genotyps der Mutante SM12. A) Plasmid pSM28 mit dem 2.9 kbp Mx8 DNA-Fragment (*attP* site als weiße Box dargestellt; die Transkriptionsrichtung der Integrase *intP* ist durch einen Pfeil gekennzeichnet). Das Plasmid enthält ein Kanamycin- ( $Kan^r$ ) und Chloramphenicol-Resistenz-Gen ( $Cam^r$ ) zur Selektion, den *E. coli* Replikationsursprung *ColE1* und den des Phagen f1 [f1(-)], sowie das *lacZ $\alpha$*  Genfragment. Im Genom des *S. aurantiaca* Wildtyps (DW4/3-1) ist die *attB* site als graue Box eingezeichnet. B) Darstellung der relevanten Bereiche des Genotyps der Mutante SM12.

Für die Konstruktion des Plasmids pSM28 wurde das 2.9 kbp Mx8 Fragment unter Verwendung der Primer SMATT3 und SMATT4 mittels PCR und dem Plasmid pLJS49 (siehe Anhang) als Matrize amplifiziert. Das Produkt wurde mit den Enzymen *Bam* HI und *Eco* RI restringiert und in die *Bam* HI/*Eco* RI-Restriktionsschnittstellen des Vektors pBC KS + (siehe Anhang) kloniert. In die *Sac* I-Schnittstelle wurde das 1.5 kbp Kanamycin-Resistenz-Gen des Vektors pUC4KIXX (siehe Anhang) kloniert. Das resultierende Plasmid wurde als pSM28 bezeichnet und mittels Elektroporation in den *S. aurantiaca* Wildtyp transferiert (Abb. 2.6 A). Die Selektion erfolgte mit Kanamycinsulfat. Die Transformationseffizienz lag bei  $10^5$ - $10^6$  Transformanten/ $\mu$ g zirkulärer pSM28 Plasmid-DNA. Zur Analyse des Genotyps der so konstruierten Mutante SM12 (Abb. 2.6 B) wurde die chromosomale DNA mit *Bam* HI restringiert. Als Sonde in der Southern-Analyse diente das 2.9 kbp Mx8 Fragment. Im Vergleich zum Wildtyp zeigt die Mutante SM12 zwei Signale bei ca. 3.5 und 8 kbp (Abb. 2.7).

Abbildung 2.7: Southern-Analyse genomischer DNA der Mutante SM12 und des Wildtyps unter Verwendung des 2.9 kbp *attP* Mx8 DNA-Fragmentes als Sonde. Chromosomale DNA wurde mit dem Enzym *Bam* HI restringiert. Die Größe der Fragmente wurden anhand des DNA Molecular Weight Markers II (Roche Diagnostics) bestimmt (nicht dargestellt). Spur 1: DNA des Wildtyps; Spur 2: DNA der Mutante SM12.

### 2.1.5 Phänotyp-Analyse der Mutante SM12

Die Mutante SM12 wurde auf ihre Fähigkeit untersucht, Fruchtkörper zu bilden. Auf Hungermedium zeigt die Mutante einen heterogenen Phänotyp, sie bildet Klumpen sowie morchel- und champignonartige Strukturen aus (Abb. 2.8 B). Auch hier ist offenbar die Fähigkeit zur Fruchtkörperbildung durch die Integration des Plasmids pSM28 in die *S. aurantiaca attB* site beeinträchtigt. Durch Mischexperimente der Mutante SM12 mit Wildtyp-Zellen (Mischungsverhältnis 1:2 und 1:3) kann keine

phänotypische Komplementation zum Wildtyp-Phänotyp erzielt werden. Es sind lediglich Aggregate mit Sporangiolen zu beobachten (Abb. 2.8 C).

Abbildung 2.8: Fruchtkörper verschiedener *S. aurantiaca* Stämme. A) Fruchtkörper des Wildtyps; B) Mutante SM12; C) Fruchtkörper des Mischexperimentes aus Mutante SM12 und des Wildtyps (Mischungsverhältnis 1:3).

### **2.1.6 Weitere morphologische Analysen der Mutanten SM4 und SM12**

Der heterogene Phänotyp der beiden Mutanten SM4 und SM12 verdeutlicht, daß die Integration von Plasmiden in die *attB* site von *S. aurantiaca* die Fähigkeit zur Fruchtkörperbildung beeinflusst. Da auch die Bildung von Fruchtkörpersporen beeinträchtigt sein könnte, wurde die Fähigkeit zur Auskeimung der Sporen beider Mutanten untersucht. Dazu wurden Filterkonserven der Mutanten SM4 und SM12 hergestellt. Diese Filterkonserven enthalten die von den Mutanten gebildeten heterogenen Strukturen. Wie der Wildtyp sind beide Mutanten fähig, Fruchtkörpersporen zu bilden, die in der Lage sind auf CY-Agarplatten auszukeimen und Schwärme von vegetativen Zellen zu bilden. Mit diesem Test kann keine quantitative Aussage getroffen werden. Weiterhin wurde die Fähigkeit zur Bildung von Indol-induzierten Sporen der Mutanten SM4 und SM12 untersucht, die im Vergleich zum Wildtyp keine mikroskopischen Veränderung aufzeigen.

## 2.2 Klonierung und Sequenzierung der Wirts-Phagen-Verbindungen *attL* und *attR* der Mutante SM12

Analog der Klonierung der *attB* site von *M. xanthus* (Tojo et al., 1998) sollten zunächst die beiden Wirts-Phagen-Verbindungen *attL* und *attR* der Mutante SM12 kloniert werden, welche nach der Integration des Plasmids pSM28 in die *attB* site von *S. aurantiaca* entstehen. Die chromosomale DNA der Mutante SM12 sollte dazu mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und anschließend religiert werden (Abb. 2.6 B). Auf diese Art und Weise ist es möglich, die beiden Wirts-Phagen-Verbindungen sowie die stromaufwärts- und stromabwärts-Bereiche zu klonieren.

Mit Hilfe der Sequenzinformationen der beiden Wirts-Phagen-Verbindungen können Primer für eine PCR-Reaktion konstruiert werden, um die *attB* site Region aus der chromosomalen DNA von *S. aurantiaca* zu amplifizieren. Dieses chromosomale DNA-Fragment könnte dann durch Sequenzierung genauer analysiert werden, um die *attB* core-Sequenz zu lokalisieren und putative offene Leserahmen in diesem Bereich zu identifizieren.

### 2.2.1 Klonierung der *attL* und *attR* DNA-Bereiche der Mutante SM12

Zur Klonierung der beiden Wirts-Phagen-Verbindungen wurden 10 µg der chromosomalen DNA der Mutante SM12 mit Restriktionsenzymen geschnitten, die in dem integrierten Plasmid pSM28 nur singulär vorkommen. Eingesetzt wurden die Enzyme *Bam* HI, *Cla* I, *Xba* I, *Spe* I und *Kpn* I (Abb. 2.9). Die aufgereinigte, restringierte chromosomale DNA wurde religiert und durch Elektroporation in den *E. coli* Stamm DH5α transferiert. Die Selektion erfolgte mit Chloramphenicol und Kanamycinsulfat. Eine Bildung von replikationsfähigen Plasmiden ist nur möglich, wenn der Replikationsstart *ColE1* des Plasmids pSM28 vorhanden ist. Lediglich die Restriktion der chromosomalen DNA der Mutante SM12 mit den Enzymen *Xba* I oder *Kpn* I mit anschließender Religation und Transformation in den *E. coli* Stamm DH5α führte zur Bildung von Klonen. So konnte ein Plasmid, pSM48, welches die *Kpn* I restringierte und religierte DNA der *S. aurantiaca* Mutante SM12 enthält, isoliert werden. Ein weiteres Plasmid, pSM49, enthält die mit *Xba* I restringierte und religierte DNA von SM12 (Abb. 2.9).

Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der *attL/attR*-Region der Mutante SM12 mit vorhandenen Restriktionsschnittstellen. Die beiden Doppelpfeile zeigen die Restriktion der chromosomalen DNA von SM12 mit den Restriktionsenzymen *Kpn* I bzw. *Xba* I. Die resultierenden Fragmente ergaben nach einer Ligation die Plasmide pSM48 und pSM49. Vorhanden sind ein Kanamycin- ( $Kan^r$ ) und ein Chloramphenicol-Resistenzgen ( $Cam^r$ ) zur Selektion, der *E. coli* Replikationsursprung *ColE1* und der des Phagen f1 [f1(-)], sowie das *lacZ $\alpha$*  Genfragment.

### 2.2.2 Restriktions- und Southern-Analyse der Plasmide pSM48 und pSM49

Das Plasmid pSM48 wurde mit dem Enzym *Kpn* I linearisiert. Es ergibt sich eine Größe von ca. 8 kbp. Eine Restriktion mit den Enzymen *Xba* I und *Kpn* I erzeugt zwei DNA-Fragmente mit den Größen von ca. 5 und 3 kbp. Die Restriktion des Plasmids pSM49 mit dem Enzym *Xba* I führt zu einem Fragment von ca. 12 kbp. Durch eine Restriktion von pSM49 mit den Enzymen *Xba* I/*Cla* I werden zwei DNA-Fragmente von ca. 5 kbp und ca. 7 kbp erzeugt (Abb. 2.10).

Abbildung 2.10: Restriktionsanalyse der Plasmide pSM48 und pSM49. Die Fragmentgrößen der restringierten Plasmide wurden mit Hilfe des DNA Molecular Weight Markers IV (Roche Diagnostics) bestimmt (nicht dargestellt). Spur 1: Plasmid pSM48 linearisiert durch *Kpn* I. Spur 2: Plasmid pSM48 verdaut mit den Enzymen *Kpn* I und *Xba* I. Spur 3: Plasmid pSM49 linearisiert durch *Xba* I. Spur 4: Plasmid pSM49 geschnitten mit den Enzymen *Xba* I/*Cla* I.

Eine Southern-Analyse der restringierten Plasmide pSM48 und pSM49 sollte es ermöglichen die *attL* und *attR* sites auf den Restriktionsfragmenten zu lokalisieren. Dazu wurde pSM48 mit *Xba* I/*Kpn* I und pSM49 mit *Xba* I/*Cla* I restringiert. Als Sonde für die Southern-Analyse wurde das 2.9 kbp Mx8 DNA-Fragment verwendet. Die *attR* site in dem Plasmid pSM48 konnte auf dem 3 kbp DNA-Fragment, die *attL* site in dem Plasmid pSM49 auf dem 7 kbp DNA-Fragment lokalisiert werden (Abb. 2.11). Damit wurde die Struktur der Plasmide wie sie in Abbildung 2.9 angegeben ist bestätigt.

Abbildung 2.11: Southern-Analyse der Plasmide pSM48 und pSM49 unter Verwendung des 2.9 kbp Mx8 *attP* Fragmentes als Sonde. Die Größe der Fragmente wurden mittels des DNA Molecular Weight Markers IV (Roche Diagnostics) bestimmt (nicht dargestellt). Spur 1: Plasmid pSM48 restringiert mit den Enzymen *Kpn* I/*Xba* I. Spur 2: Plasmid pSM49 restringiert mit den Enzymen *Xba* I/*Cla* I.

### **2.2.3 Sequenzierungsstrategie zur Analyse der Wirts-Phagen-Verbindungen *attL* und *attR* von *S. aurantiaca***

Die Wirts-Phagen-Verbindungen *attL* und *attR* wurden sequenziert, um über den Bereich Aufschluß zu geben, in welchen die ortsspezifische Rekombination bei *S. aurantiaca* erfolgt. Dazu wurden zunächst Primer verwandt, die in der bekannten Sequenz der Phagen-DNA der *attL* und *attR* sites hybridisieren. Durch Primer-Walking konnten dann unbekannte DNA-Bereiche entschlüsselt werden. Da die komplette Sequenz des 2.9 kbp Mx8 DNA-Fragments mit der *attP* site sowie die Lokalisation der core-Sequenz von Plasmid pSM28 bekannt ist, konnte eine Restriktionskarte der *attL* und *attR* Bereiche der Plasmide pSM48 und pSM49 erstellt werden (Abb. 2.12). Das 2.9 kbp Mx8 DNA-Fragment enthält das ca. 1.6 kbp große *intP* Gen sowie das stromaufwärts gelegene, für eine putative Excisionase kodierende Gen *uoi* (222 bp). Die beiden Gene überlappen sich mit 130 bp. Die Promotorstruktur des *intP* Gens liegt

in der kodierenden Sequenz des Gens *uoi*. Stromaufwärts davon befindet sich auf dem 2.9 kbp Mx8 DNA-Fragment ein Teil eines offenen Leserahmens (ORF 10), der keine Homologie zu bereits bekannten Proteinen aufweist (Abb. 2.12 A). Die *attP* site ist in der kodierenden Region (bp 2398-2415) von *intP* lokalisiert (Salmi et al., 1998; Magrini et al., 1999). Durch die ortsspezifische Rekombination, und folglich der Integration von Plasmid pSM28, entstehen die beiden Wirts-Phagen-Verbindungen: die *attR* site enthält die bp 1-2415, und die *attL* site die bp 2398-2900 des 2.9 kbp Mx8 DNA-Fragments (Abb. 2.12 B). Zur Charakterisierung der *attR* site wurden zunächst die 2415 bp des 2.9 kbp Mx8 DNA-Fragments sequenziert. Primer-Walking führte zur Sequenz der 0.6 kbp *S. aurantiaca* DNA des *attR* Bereiches. Die Sequenzierung der *attL* site wurde analog durchgeführt, das heißt es erfolgte zunächst die Sequenzierung der bp 2900-2398 des 2.9 kbp Mx8 DNA-Fragments. Durch Primer-Walking konnten ca. 3 kbp *S. aurantiaca* DNA des *attL* Bereiches bestimmt werden (siehe Anhang).

Abbildung 2.12: Darstellung der ORFs des 2.9 kbp Mx8 DNA-Fragmentes und detaillierte Angaben zu den *attR* und *attL* sites der Plasmide pSM48 und pSM49.

A) Schematische Darstellung der auf dem 2.9 kbp Mx8 *attP* Fragment lokalisierten offenen Leserahmen ORF10, *uoi* und *intP*. Die core Sequenz der *attP* site liegt in der kodierenden Sequenz von *intP*. Die beiden Gene *uoi* und *intP* überlappen sich mit 130 bp. B) Die Wirts-Phagen-Verbindungen *attR* auf Plasmid pSM48 und *attL* auf Plasmid pSM49. Die *attR* site besteht aus den bp 1-2415 des 2.9 kbp Mx8 DNA-Fragmentes. Es konnten ca. 600 bp chromosomale *S. aurantiaca* DNA kloniert werden. Die *attL* site beinhaltet die bp 2398-2900 des 2.9 kbp Mx8 DNA-Fragmentes von Mx8. Zusätzlich sind ca. 7 kbp chromosomaler *S. aurantiaca* DNA vorhanden.



#### 2.2.4 Interpretation der *attL* und *attR* site Sequenzen; Bildung von *intX*

Die Sequenzdaten zeigen, daß die hoch konservierte 17 bp core-Sequenz in den beiden Wirts-Phagen-Verbindungen *attL* und *attR* von *S. aurantiaca* vorhanden ist (siehe Anhang). Die core-Sequenz stellt den Übergang zwischen der Phagen-DNA und der *S. aurantiaca* DNA dar. Wie für *M. xanthus* gezeigt werden konnte, führt die ortsspezifische Rekombination zu einer Veränderung der kodierenden Sequenz der Integrase, da die *attP* site in ihr lokalisiert ist. Die Integration hat die Bildung einer weniger aktiven Integrase, kodiert durch das Gen *intX*, zur Folge. Dieser im Vergleich zu *intP* kürzerer ORF entsteht durch die Anwesenheit eines Stopkodons in der Sequenz nach der ortsspezifischen Integration (Tojo et al., 1996; Magrini et al., 1999). Die Sequenzanalyse des *attR* site Bereiches der Mutante SM12 zeigt, daß auch hier die Sequenz des *intP* Gens durch die Integration verkürzt wird. Analog zu *M. xanthus* wird auch hier ein Stopkodon (TAA) in die kodierende Sequenz eingefügt (Abb. 2.13).



## 2.3 Klonierung und Charakterisierung des *attB* Locus von *S. aurantiaca*

Aufgrund der Sequenzierung der beiden Wirts-Phagen-Verbindungen *attL* und *attR* wurden Primer konstruiert, um den Bereich der chromosomalen *S. aurantiaca* DNA zu amplifizieren, der die *attB* site enthält. Die Subklonierung und Sequenzanalyse dieser Region führte zur Identifizierung und Lokalisation der 17 bp *attB* core-Sequenz. Die Sequenz wurde auf das Vorhandensein von putativen offenen Leserahmen untersucht.

### 2.3.1 Amplifikation und Sequenzanalyse des *attB* DNA-Bereiches von *S. aurantiaca*

Die Sequenzen der Wirts-Phagen-Verbindungen der Mutante SM12 dienten als Vorlage zur Konstruktion der PCR-Primer SMATT17 und SMATT18 mit welchen ein 909 bp DNA-Fragment aus chromosomaler *S. aurantiaca* Wildtyp-DNA amplifiziert werden konnte. Das PCR-Produkt wurde mit den Enzymen *Eco* RI und *Bam* HI restringiert und in den *Eco* RI/*Bam* HI linearisierten Vektor pUC 18 eingefügt. Das so konstruierte Plasmid wurde als pSM54 bezeichnet.

Das 909 bp DNA-Insert des Plasmids pSM54 wurde sequenziert und die 17 bp lange, hoch konservierte core-Sequenz der *attB* site konnte bei bp 421-438 lokalisiert werden (siehe Anhang). Bei *M. xanthus* liegt diese Sequenz im 3'-Bereich der Gene *trnD1* und *trnD2*. Diese Gene kodieren für tRNAs, die spezifisch für Asparaginsäure sind. Aufgrund der nahen Verwandtschaft von *M. xanthus* und *S. aurantiaca* wurde vermutet, daß die identifizierte core-Sequenz auch bei *S. aurantiaca* in einem tRNA Gen liegen könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die 909 bp *S. aurantiaca* DNA-Sequenz mit Hilfe des Computerprogramms tRNAscan-SE v.1.11 (Lowe und Eddy, 1997) auf das Vorhandensein von tRNA Genen analysiert. Mit dem Programm wurden zwei tRNA Gene identifiziert. Ein tRNA Gen (*trnV1*), welches für eine tRNA mit Spezifität für Valin kodiert, wurde zwischen den bp 566-496 aufgefunden. Ein weiteres tRNA Gen (*trnD1*), kodierend für eine tRNA spezifisch für Asparaginsäure, konnte bei bp 487-414 lokalisiert werden. Wie bereits beschrieben, wurde die 17 bp core Sequenz bei bp 421-438 lokalisiert und liegt somit im 3'-Bereich des Gens *trnD1* (Abb. 2.14 A). Die beiden tRNA Gene sind durch 8 bp voneinander getrennt.

Abbildung 2.14: Sequenzen der beiden tRNA Gene (*trnD1* und *trnV1*) von *S. aurantiaca* und Vergleich des *attB* Locus mit dem von *M. xanthus*. A) DNA-Sequenz der beiden tRNA Gene, welche in dem *attB* Locus des *S. aurantiaca* Wildtyps identifiziert wurden. Die Transkriptionsrichtung der tRNA Gene ist durch Pfeile gekennzeichnet. Die 17 bp core Sequenz im 3'-Bereich des *trnD1* Gens ist in roten Buchstaben dargestellt. B) Vergleichende Darstellung der *attB* Bereiche von *S. aurantiaca* und *M. xanthus*. Die Lage der *attB* core-Sequenzen ist durch einen schwarzen Balken in denen durch Pfeile dargestellten tRNA Genen gekennzeichnet. Identifizierte "stem-loop" Strukturen als putative Terminatoren in den 3'-Bereichen der beiden *trnD* Gene von *M. xanthus* sind durch einen Strich mit rundem Kopf gekennzeichnet.

### 2.3.2 Vergleich der *attB* site Bereiche von *M. xanthus* und *S. aurantiaca*

Die *attB* Region von *M. xanthus* enthält zwei tRNA Gene (*trnD1* und *trnD2*), welche für Asp-spezifische tRNAs kodieren (tRNA<sup>Asp</sup>). Beide tRNA Gene, enthalten in ihrem 3'-Bereich die hoch konservierte 17 bp core-Sequenz. Die Integration in die *attB* site des tRNA Gens *trnD1* ist stark bevorzugt. Diese beiden Gene sind durch 93 bp voneinander getrennt. Stromaufwärts des *trnD1* Gens (15 bp) liegt ein weiteres tRNA Gen, kodierend für eine tRNA mit Spezifität für Valin (tRNA<sup>Val</sup>). Dieses tRNA Gen, *trnV1*, enthält keine core-Sequenz. Sequenzanalysen dieser tRNA Gene zeigten, daß *trnD1* eine CCA-Sequenz im 3'-Bereich enthält. Sie ist somit eine tRNA der Klasse I. Die Sequenzen der tRNA Gene *trnD2* und *trnV1* enden mit den Sequenzen CTA und CTG. Es wird vermutet, daß diese Gene für tRNAs der Klasse II kodieren und daß der CCA-

Akzeptorarm enzymatisch während der Reifung der tRNAs generiert wird. Die beiden *trnD* Gene enthalten putative "stem-loop" Strukturen als Terminatoren in ihrem stromabwärts-Bereich (Magrini et al., 1999).

Im Vergleich zu dem *M. xanthus attB* Locus enthält *S. aurantiaca* nur zwei tRNA Gene, wobei nur das Gen *trnD1* die 17 bp core-Sequenz enthält. Das 8 bp stromaufwärts gelegene Gen *trnV1* enthält wie auch das *trnD1* Gen keine CCA-Sequenz im 3'-Bereich. Vermutlich kodieren diese tRNA Gene für tRNAs der Klasse II. Für beide Gene konnten keine "stem-loop" Strukturen für die Termination im stromabwärts-Bereich gefunden werden (Abb. 2.14 B).

Ein Vergleich der DNA-Sequenzen (ohne die 3' gelegene CCA-Sequenz) der *trnD* Gene von *M. xanthus* mit dem *trnD1* Gen von *S. aurantiaca* zeigte, daß diese Gene eine Identität von 100 % aufweisen (Abb. 2.15 A). Im Gegensatz dazu zeigen die *trnV* Gene der beiden Organismen einen Unterschied in 3 bp (Abb. 2.15 B).

### 2.3.3 Struktur der durch die Gene *trnD1* und *trnV1* kodierten tRNA Produkte von *S. aurantiaca*

tRNAs besitzen eine charakteristische Sekundärstruktur, die oft auch als Kleeblattform beschrieben wird. Die Sequenzanalyse mit Hilfe der tRNAscan-SE v.1.11 Software führte zur Identifikation von zwei tRNA-Genen, *trnD1* und *trnV1*, in dem *attB* Locus von *S. aurantiaca*. Mit Hilfe dieser Software ist es auch möglich die putative Sekundärstruktur der tRNAs zu modellieren. Wie in Abbildung 2.16 dargestellt ist, besitzen beide tRNAs einen Akzeptorarm, bei dem die 5'- und 3'-Enden über einen 7-Basenpaar-Stamm aneinander gebunden sind. Das 3'-Ende überragt den Stamm und an den endständigen Adenosin- bzw. Guanosinbaustein werden die jeweiligen Aminosäuren angeheftet. Das für die tRNA spezifische Antikodon liegt im Zentrum der 7-Nukleotid-Schleife des Antikodonarms. Die tRNA spezifisch für Asparaginsäure (tRNA<sup>Asp</sup>) besitzt das Antikodon GUC, die tRNA mit Spezifität für Valin (tRNA<sup>Val</sup>) besitzt das Antikodon UAC. Der in der Abbildung linksgelegene D-Arm, der seine Namensgebung durch das Vorkommen des ungewöhnlichen Nukleotids Dihydrouridin erhielt, besteht bei beiden tRNAs aus einem 4-Basenpaar-Stamm und einer Schleife mit variabler Länge. Die tRNA<sup>Asp</sup> enthält in diesem Bereich eine Schleife von 9 Basenpaaren, die tRNA<sup>Val</sup> eine von 7 Basenpaaren. Der in der Abbildung rechtsgelegene T-Arm besteht bei beiden tRNAs aus einem 5-Basenpaar-Stamm mit einer 7-Basenpaar-Schleife. Die zwischen dem Antikodonarm und dem T-Arm gelegene



variable Schleife besteht bei beiden tRNAs aus 5 bp. Mit dieser Analyse können keine Aussagen über spezifische Modifikationen der Nukleoside gemacht werden. Die core-Sequenz der *attB* site des *trnD1* Gens umspannt den T-Arm und den Akzeptorarm.

Abbildung 2.16: Sekundärstrukturmodell der beiden tRNAs, tRNA<sup>Asp</sup> und tRNA<sup>Val</sup> (kodiert durch *trnD1* und *trnV1*), des *S. aurantiaca attB* Locus. Die *attB* core-Sequenz ist in roten Buchstaben dargestellt. Die in Kreisen lokalisierten Basen stellen invariante tRNA-Basen dar. Die Bezeichnung der verschiedenen tRNA Abschnitte ist nur bei der tRNA<sup>Asp</sup> angegeben, gilt analog auch für tRNA<sup>Val</sup>.

### 2.3.4 Veränderung des 3'-Bereiches der kodierenden Sequenz von *trnD1* durch die ortsspezifische Rekombination

Bei *M. xanthus* werden durch die ortsspezifische Integration von Plasmiden in die *attB* site zwei verschiedene Transkriptionseinheiten verändert. Zum einen wird die kodierende Sequenz des *intP* Gens verändert, da die *attP* site in der 3'-Region von *intP* lokalisiert ist. Es entsteht das verkürzte *intX* Gen, das für eine weniger aktive Intgerase kodiert (siehe 2.2.4). Zum anderen wird der natürliche Terminator des *trnD1* Gens durch einen Mx8-spezifischen Terminator ( $t_{Mx8}$ ) ersetzt, der in der kodierenden Sequenz des *intP* Gens distal zu dem *attP* core eingebettet ist. Dieser Mx8-spezifische Terminator zeigt im Vergleich zu dem natürlichen *trnD1* Terminator eine verminderte freie Ennergie für die "hairpin"-Bildung (Magrini et al., 1999).

Die Sequenzanalyse der rechten Wirts-Phagen-Verbindung (*attR*) der *S. aurantiaca* Mutante SM12 ergab, daß auch hier der stromabwärts-Bereich des *trnD1* Gens durch

den Mx8-spezifischen Terminator ( $t_{Mx8}$ ) ersetzt wird (Abb. 2.17). Es wird also eine Terminatorstruktur in den stromabwärts-Bereich des *trnD1* Gens von SM12 eingefügt.



### 2.3.5 Analyse der stromaufwärts- und stromabwärts-Bereiche des *attB* Locus von *S. aurantiaca*

Aufgrund der Sequenzierung der beiden Wirts-Phagen-Verbindungen sowie der angrenzenden Sequenzen der Mutante SM12, die in den Plasmiden pSM48 und pSM49 enthalten sind, konnten auch die stromaufwärts- und stromabwärts-Bereiche des *attB* Locus aufgeklärt werden. Eine Computeranalyse mit Hilfe der DNA STAR (MapDraw)-Software ermöglichte das Auffinden putativer offener Leserahmen in diesen Bereichen. 62 bp stromabwärts des Stops des *trnD1* Gens wurde ein offener Leserahmen (686 bp) mit einem GTG-Startkodon und einer vorgelagerten Shine-Dalgarno-Sequenz (GAAGG) identifiziert (Abb. 2.18).

Abbildung 2.18: Der *attB* Locus von *S. aurantiaca* mit den stromaufwärts- und stromabwärts-Bereichen der beiden tRNA Gene *trnD1* und *trnV1*. Im stromabwärts-Bereich des *trnD1* Gens befindet sich der putative offene Leserahmen *ire*, kodierend für eine putative Integrase/Rekombinase der Integrase-Familie. Im stromaufwärts-Bereich von *trnV1* konnte der putative ORF *isa* lokalisiert werden. Dieser ORF ist nicht vollständig sequenziert, der bekannte Bereich besitzt eine Homologie zu Isoamylasen.

Dieser ORF besitzt Homologien (ca. 30% Identität auf Proteinebene) zur Integrase/Rekombinase *xerD* von *Pyrococcus abyssi* und der Integrase/Rekombinase *xerC* von *Pyrococcus horikoshii* (ca. 31 %). Diese Integrasen/Rekombinasen sind ortsspezifische Rekombinasen der Integrase-Familie (auch als Tyrosin-Rekombinasen bezeichnet). Sie vermitteln den sequentiellen Austausch von DNA-Strängen an definierten Phosphodiesterpositionen. Der Strangaustausch wird durch einen nukleophilen Angriff eines Tyrosinrestes an dem Phosphodiester des DNA-Rückgrats eingeleitet. Typisch für diese Familie der Integrasen ist, daß die katalytische Domäne in verschiedene Bereiche eingeteilt werden kann, in der definierte Aminosäurereste hoch konserviert sind. Das Enzym wird in Patch I, Box I, Patch II, Patch III und Box II unterteilt, wobei meist nur die Boxen I und II wegen der Anwesenheit katalytischer Aminosäurereste verglichen werden, da in den Patches ausgeprägte Unterschiede auftreten können. In Box I ist ein Argininrest hoch konserviert, in Box II ein Histidin-, Arginin- und Tyrosinrest (Nunes-Düby et al., 1998). Wie in Abbildung 19 A gezeigt, sind

die beschriebenen hoch konservierten Aminosäurereste in der putativen Integrase/Rekombinase von *S. aurantiaca* vorhanden.

Abbildung 2.19 A: Aminosäuresequenz-Vergleich der putativen Integrase/Rekombinase Ire aus *S. aurantiaca* mit XerD aus *Pyrococcus abyssi* und XerC aus *Pyrococcus horikoshii*. Identische Aminosäuren sind umrahmt, die Nummerierung der Aminosäurereste ist rechts von der Sequenz angegeben. Die Bereiche der konservierten Boxen I und II sind durch blaue Balken markiert. Rote Sterne kennzeichnen die hoch konservierten Aminosäuren.

Auch in dem stromaufwärts-Bereich der beiden tRNA Gene wurde ein Teil eines putativen ORF lokalisiert. Dieses 268 bp stromaufwärts des Starts des *trnV1* Gens vorhandene Fragment des ORF (453 bp) beginnt mit einem ATG-Startkodon und besitzt eine vorgelagerte Shine-Dalgarno-Sequenz (GGAG). Da von dem stromaufwärts-Bereich der tRNA Gene nur ca. 600 bp kloniert und sequenziert werden konnten, ist das Stopkodon des beschriebenen ORFs nicht bekannt (Abb. 2.18). Eine

Datenbankanalyse zeigt, daß dieser putative offene Leserahmen Homologien zu Isoamylase Vorläufern von *Flavobacterium* und *Pseudomonas* besitzt. Isoamylasen sind Enzyme, welche die  $\alpha$ -1,6-D glykosidischen Bindungen in Stärke, Glykogen und Oligosacchariden spalten. Diese Enzyme besitzen vier kurze, konservierte Regionen mit Spacern in bestimmten Intervallen. Der Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen (Abb. 2.19 B) zeigt, daß die putative Isoamylase von *S. aurantiaca*, von der lediglich 151 Aminosäuren bekannt sind, eine Identität von ca. 30% auf der Proteinebene im N-terminalen Bereich aufweist (es wurden nur die 135 ersten Aminosäuren für den Vergleich herangezogen). Die höher konservierten Regionen sollten außerhalb des sequenzierten Bereiches liegen und können daher nicht zu einem Vergleich auf Proteinebene herangezogen werden.

Abbildung 2.19 B: Vergleich der Aminosäuresequenzen der putativen Isoamylase aus *S. aurantiaca* (Isa; S.) mit Isoamylasen aus *Flavobacterium* (Iam; F.) und *Pseudomonas* sp. (Iam; P.). Identische Aminosäuren sind umrahmt, die Nummerierung der Aminosäurereste ist rechts von der Sequenz angegeben.

### **2.3.6 Expression der putativen Integrase/Rekombinase und Isoamylase von *S.aurantiaca***

Mit Hilfe der RTPCR-Analyse sollte die Expression der Gene, welche für eine putative Isoamylase und Integrase/Rekombinase kodieren, in dem *S. aurantiaca* Wildtyp und der Mutante SM12 untersucht werden.

Die Primer Int1 und Int2 wurden so konstruiert, daß sie einen Bereich der putativen Integrase amplifizieren, welcher unter anderem die hoch konservierte Box II umfaßt

(siehe Abbildung 2.19 A). Die Oligonukleotide Int1 und Int2 hybridisieren 226 bp und 524 bp stromabwärts des putativen Integrase/Rekombinase Startkodons und sollten somit zu einer Amplifikation eines 298 bp DNA-Fragmentes führen. Zur Analyse der Expression der putativen Isoamylase wurden die Primer Iso1 und Iso2 verwendet, welche 93 bp und 427 bp stromabwärts des putativen Isoamylase Startkodons hybridisieren. Die Amplifikation eines 334 bp DNA-Fragmentes ist also zu erwarten. In diesem Fall konnten keine spezifischen Oligonukleotide konstruiert werden, welche in den konservierten Domänen von Isoamylasen hybridisieren, da für diese Bereiche keine Sequenzinformationen vorliegen. Die RNA vegetativer, Indol-behandelter Zellen und aus Fruchtkörpern des Wildtyps und der Mutante SM12 wurde für die RTPCR-Reaktion verwendet. Eine Expression der Isoamylase war weder in der Mutante SM12 noch im Wildtyp nachweisbar. Im Vergleich dazu ist eine Expression der putativen Integrase/Rekombinase im Wildtyp und der Mutante SM12 in vegetativen Zellen detektierbar. In Indol-behandelten Zellen und Fruchtkörpern ist kein RTPCR-Produkt nachweisbar (Abb. 2.20 A, B).

Abbildung 2.20: RTPCR zur Analyse der Expression der putativen Integrase/Rekombinase und Isoamylase im *S. aurantiaca* Wildtyp (A) und der Mutante SM12 (B). Die Größe der RTPCR-Produkte wurde mittels der 100 bp ladder bestimmt (Spur1). Spuren 2-4 (A,B): Isoamylase-Expression: Spur 2: Vegetative Zellen; Spur 3: Indol-Behandlung (15 min); Spur 4: Fruchtkörper nach 20 h Hungern. Spuren 5-7 (A,B): Integrase/Rekombinase-Expression: Spur 5: Vegetative Zellen; Spur 6: Indol-Behandlung (15 min); Spur 7: Fruchtkörper nach 20 h Hungern.

## 2.4 Charakterisierung der tRNA Gene des *S. aurantiaca attB*

### Locus

Der *S. aurantiaca attB* Locus enthält die beiden tRNA Gene *trnD1* und *trnV1*, wobei die core-Sequenz der *attB* site in der kodierenden Sequenz der tRNA<sup>Asp</sup> lokalisiert ist. Die ortsspezifische Rekombination der Plasmide pSH8 und pSM28, welche beide über das Integrase-kodierende Gen *intP* mit der korrespondierenden *attP* site verfügen, erzeugen in den Mutanten SM4 und SM12 eine Veränderung in der Fähigkeit zur Fruchtkörperbildung. Die Ausbildung der beschriebenen heterogenen Strukturen des Phänotyps wird durch die Integration der Plasmide in die kodierende Sequenz der tRNA<sup>Asp</sup> hervorgerufen. Als Folge der Integration wird der nichtkodierende 3'-Bereich des *trnD1* Gens durch den Mx8-spezifischen Terminator t<sub>Mx8</sub> ersetzt. Da in dem natürlichen Bereich des Gens kein Terminator mit "stem-loop" Struktur identifiziert werden konnte, könnte dies zur veränderten Transkription oder Prozessierung der prä-tRNA<sup>Asp</sup> führen. Es wurde zunächst versucht, daß *trnD1* Gen durch die Insertion einer Kanamycin-Resistenz-Kassette zu inaktivieren. Weiterhin wurde die Transkription der beiden tRNA Gene unter verschiedenen Entwicklungsbedingungen analysiert.

Der heterogene Phänotyp der beiden Integrationsmutanten SM4 und SM12 sollte, falls die Integration der Plasmide pSH8 und pSM28 die Transkription des tRNA Locus beeinflusst, durch die Bereitstellung des natürlichen tRNA DNA-Bereiches wieder zu einem Wildtyp-Phänotyp komplementierbar sein.

### 2.4.1 Inaktivierung der tRNA Gene des *S. aurantiaca attB* Locus durch Insertion einer Kanamycin-Resistenz-Kassette

#### 2.4.1.1 Konstruktion des Plasmids pSM58; Insertion einer Kanamycin-Resistenz-Kassette in das *trnD1* Gen

Das Gen *trnD1*, das für eine tRNA<sup>Asp</sup> kodiert, sollte durch die Insertion einer Kanamycin-Resistenz-Kassette inaktiviert werden. Als Insertionsstelle des Antibiotika-Resistenz-Gens wurde die 17 bp core-Sequenz der *attB* site gewählt, welche im 3'-Bereich des *trnD1* Gens lokalisiert ist. Zunächst wurden die Bereiche, welche stromaufwärts und stromabwärts von dieser Region gelegen sind mit Hilfe der PCR-Methode amplifiziert. Unter Verwendung der Primer SMATT18 und SMATT20 wurde ein 479 bp DNA-Fragment aus der chromosomalen DNA von *S. aurantiaca* amplifiziert, welches 342 bp der stromaufwärts-Region der tRNA<sup>Val</sup> enthält, sowie die kodierende

Abbildung 2.21: Darstellung des Plasmides pSM58 und die möglichen Rekombinationsereignisse nach Transfer in den *S. aurantiaca* Wildtyp (DW4/3-1).  
A) In Plasmid pSM58 ist das Kanamycin-Resistenz-Gen in den 3'-Bereich des *trnD1* Gens eingefügt. Zusätzlich zu den beiden tRNA Genen sind 342 bp stromaufwärts und 721 bp stromabwärts vorhanden. B) Darstellung der verschiedenen Genotypen nach doppelter und einfacher Rekombination des Plasmids pSM58 in das Wildtyp-Genom. Die Primer SMATT34 und SMATT35 (Hybridisierungsstellen durch schwarze Pfeile gekennzeichnet) wurden zur Analyse des Genotyps verwendet.

DNA-Region der tRNA<sup>Val</sup> und 57 bp des *trnD1* Gens. Dieses PCR-Fragment wurde mit den Enzymen *Bam* HI und *Sma* I restringiert und in den mit *Bam* HI/*Sma* I linearisierten Klonierungsvektor pUC18 (siehe Anhang) eingefügt. Das resultierende Plasmid wird als pSM56 bezeichnet. In die *Sma* I Restriktionsschnittstelle von pSM56 wurde ein ca. 1.5 kbp großes Kanamycin-Resistenz-Gen kloniert (*Sma* I DNA-Fragment des Vektors pUC4K1XX), was zu Plasmid pSM 57 führte. Mit Hilfe der Primer SMATT19 und SMATT26 wurde ein 733 bp DNA-Fragment aus der chromosomalen *S. aurantiaca* DNA amplifiziert, welches die restlichen 13 bp der kodierenden Sequenz des Gens *trnD1* und 721 bp der stromabwärts Region dieses Gens enthält. Das DNA-Fragment wurde mit den Enzymen *Kpn* I und *Eco* RI restringiert und in das mit *Kpn* I/*Eco* RI verdaute Plasmid pSM 57 ligiert. Das resultierende Plasmid pSM58 (Abb. 2.21 A) enthält den putativen *attB* Locus von *S. aurantiaca*, bei dem das Kanamycin-Resistenz-Gen in die 17 bp core-Sequenz des Gens *trnD1* eingesetzt wurde. Zur Absicherung des Konstruktes pSM58 erfolgte eine Sequenzierung mit Primern, welche stromabwärts und stromaufwärts der Klonierungsstelle hybridisierten. Das Plasmid pSM58 wurde mit dem Restriktionsenzym *Sca* I linearisiert und durch Elektroporation in den *S. aurantiaca* Wildtyp transferiert. Selbst nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen waren keine Transformanten auf den Agarplatten sichtbar. Die Elektroporation wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen der linearisierten pSM58 DNA (1-5 µg) sowie der zirkulären Form (1-3 µg) mehrfach durchgeführt. Die Transformation mit dem zirkulären Plasmid führte zur Bildung von 3 unabhängigen Klonen (C1-C3), wobei die angestrebte doppelte Rekombination mit dem linearisierten Plasmid insgesamt zu 2 Transformanten (L1 und L2) führte. Eine Dot-Blot-Analyse gab Aufschluß, ob es sich bei den 5 unabhängigen Transformanten um Klone mit einer einfachen oder doppelten Rekombination handelt. Als Sonde wurde das Ursprungsplasmid pUC18 verwendet. Im Falle einer einfachen Rekombination, bei der das gesamte Plasmid in das Genom des Wildtyps integriert, war also ein Signal zu erwarten. Die Klone C1-C3 hybridisierten mit der pUC18-Sonde und stellten so Mutanten mit einer einfachen Rekombination dar. Die Klone L1 und L2 zeigten kein Signal und stellten so putative Mutanten nach einem doppelten Rekombinationsereignis dar (Abb. 2.21 B). Zur Analyse des Genotyps der Mutanten L1 und L2 wurde die Methode der PCR gewählt. Mit den spezifischen Primern SMATT34 und SMATT35, welche 211 bp stromabwärts des Gens *trnD1* und 133 bp stromaufwärts des Gens *trnV1* hybridisieren, konnte ein 495 bp DNA-Fragment aus *S. aurantiaca* Wildtyp-DNA amplifiziert werden. Im Falle einer Integration des Kanamycin-Resistenz-Gens durch doppelte Rekombination, sollte ein PCR-Produkt von ca. 2 kbp

mit den Primern SMATT34 und SMATT35 unter Verwendung der chromosomalen DNA der Mutanten L1 und L2 entstehen. Es konnte jedoch auch hier nur ein 495 bp großes DNA-Fragment amplifiziert werden (Abb. 2.22). Die Mutanten L1 und L2 stellen also keine Mutanten mit einem doppelten Rekombinationsereignis dar. Aufgrund ihrer Kanamycin-Resistenz, die bei dem *S. aurantiaca* Wildtyp nicht vorliegt, handelt es sich hier offenbar um spontane, Kanamycin-resistente Klone.

Abbildung 2.22: Analyse des Genotyps der Mutanten L1 und L2 durch PCR unter Verwendung der Primer SMATT34 und SMATT35. Spur 1: 100 bp ladder; Produkte der PCR-Reaktion: Spur2: Wildtyp-DNA; Spur 3: Mutante L1-DNA; Spur 4: Mutante L2-DNA.

#### **2.4.1.2 Konstruktion der Plasmide pSM77, pSM80, pSM81 und pSM82; Insertion einer Kanamycin-Resistenz-Kassette in verschiedene Bereiche der tRNA Gene des *attB* Locus von *S. aurantiaca***

Da die Konstruktion einer *trnD1* *S. aurantiaca* Mutante, bei der eine Kanamycin-Resistenz-Kassette in das Gen inseriert werden sollte, mit dem Plasmid pSM58 nicht erfolgreich war, wurde zunächst ein Plasmid konstruiert, welches einen größeren Bereich der *attB* *S. aurantiaca* Region enthält. Das Plasmid pSM54 beinhaltet (siehe 2.3.1) ein 909 bp *S. aurantiaca attB* DNA-Fragment mit den beiden tRNA Genen *trnD1* und *trnV1* sowie 342 bp der stromaufwärts-Region des *trnV1* Gens und 415 bp der stromabwärts-Region des *trnD1* Gens. Das Plasmid pSM48 (siehe 2.2.3) enthält die Wirts-Phagen-Verbindung *attR* und somit einen Teil des Gens *trnD1*, das Gen *trnV1* und ca. 600 bp der stromaufwärts-Region von *trnV1*. Mit Hilfe dieser Plasmide wurde ein neues Plasmid konstruiert, das einen größeren stromaufwärts-Bereich der tRNA Gene enthält.



### **Konstruktion des Plasmids pSM 77**

Zunächst wurde das Plasmid pSM54 (pUC18-Derivat) mit den Restriktionsenzymen *Eag* I und *Xba* I geschnitten, der Verdau in einem präparativen Gel aufgetrennt und das ca. 3.4 kbp DNA-Fragment isoliert. Dieses DNA-Fragment enthält den pUC18-Vektor und 743 bp des 909 bp *attB* *S. aurantiaca* Fragments (415 bp der stromabwärts-Region des *trnD1* Gens, die beiden tRNA Gene und 176 bp der stromaufwärts-Region des *trnV1* Gens). In diesen so restringierten Vektor wurde ein größeres DNA-Fragment der stromaufwärts-Region des *trnV1* Gens aus Plasmid pSM48 kloniert. Nach Verdau des Plasmids pSM48 mit den Restriktionsenzymen *Xba* I/*Acc* 651, wurde ein 3 kbp DNA-Fragment isoliert, welches die *attR* site und die ca. 600 bp lange *S. aurantiaca* DNA-Sequenz enthält. Das Fragment wurde mit den Enzymen *Pst* I und *Eag* I verdaut und ein ca. 490 bp DNA-Fragment, mit der stromaufwärts-Region des *trnV1* Gens, isoliert. Dieses *Eag* I/*Acc* 651 *S. aurantiaca* DNA-Fragment wurde zunächst in eine Ligationsreaktion mit dem oben beschriebenen *Eag* I/*Xba* I-Fragment aus pSM54 eingesetzt, bei der die beiden kompatiblen *Eag* I-Enden zusammen gefügt wurden. Danach erfolgte ein Auffüllen der 5'-DNA-Überhänge der nicht kompatiblen *Xba* I- und *Acc* 651-Überhänge. Mit dem Produkt wurde eine "blunt-end"-Ligation durchgeführt. Diese Klonierung führte zu dem Plasmid pSM77, das die beiden tRNA-Gene und 416 bp der stromabwärts-Region des *trnD1* Gens sowie 668 bp der stromaufwärts-Region des *trnV1* Gens enthält. Das Plasmid ermöglicht die Konstruktion weiterer Plasmide, welche eine Kanamycin-Resistenz-Kassette an verschiedenen Stellen der beiden tRNAs des *attB* Locus von *S. aurantiaca* oder in der stromaufwärts-Region des *trnV1* Gens enthalten (Abb. 2.23 A).

### **Konstruktion der Plasmide pSM 80, pSM81 und pSM82**

Plasmid pSM77 ist das Ausgangskonstrukt für weitere Klonierungen. Es enthält genügend lange Sequenzbereiche, die eine doppelte Rekombination mit dem *S. aurantiaca* Wildtyp-Genom ermöglichen. Die Plasmide pSM80, pSM81 und pSM82 sind von pSM77 abgeleitet. Für die Konstruktion der Plasmide pSM80 und pSM81 wurde der Vektor pSM77 mit den Enzymen *Bss* HII bzw. *Blp* I restringiert. Die überhängenden Enden wurden aufgefüllt bevor die Ligation der Resistenz-Kassette (*Sma* I-DNA-Fragment aus pUC4K1XX) erfolgte. Plasmid pSM80 enthält diese Resistenz-Kassette in der *Bss* HII-Restriktionsschnittstelle, welche 87 bp stromaufwärts des Starts von *trnV1* lokalisiert ist. In Plasmid pSM81 wurde die Resistenz-Kassette 16 bp stromabwärts des Starts des *trnV1* Gens eingefügt (Abb. 2.23 B). Für die Konstruktion des Plasmids

pSM82 wurde pSM77 mit dem Restriktionsenzym *Nae* I verdaut und die Kanamycin-Resistenz-Kassette aus pUC4KIXX (siehe Anhang) wurde eingefügt. Das Plasmid pSM82 enthält diese Resistenz-Kassette 31 bp stromabwärts des Starts von *trnD1* (Abb. 2.23 B).

Abbildung 2.23 A: Konstruktion des Plasmids pSM77 unter Verwendung der Plasmide pSM54 und pSM48.

Abbildung 2.23 B,C: B) Schematische Darstellung der Plasmide pSM80, pSM81 und pSM83. C) Darstellung der Genotypen der Mutanten SM31, SM32 und SM33, die durch das Ereignis der doppelten Rekombination mit den Plasmiden pSM80, pSM81 und pSM82 in das *S. aurantiaca* Wildtyp-Genom (DW4/3-1) gebildet wurden.

Die Plasmide pSM80-82 (pUC18-Derivate) wurden mit dem Restriktionsenzym *Sca* I linearisiert (schneidet in dem Ampicillin-Resistenzgen), um die Integration des Kan<sup>r</sup>-Gens nur durch doppelte Rekombination zu erreichen. Die linearisierten Plasmide wurden in den *S. aurantiaca* Wildtyp-Stamm mit Hilfe der Elektroporationsmethode transferiert. Zur Analyse der resultierenden Mutanten wurde die Dot-Blot-Methode gewählt. Als Sonde diente der Ausgangsvektor der Klonierung, pUC18, der im Falle der Integration durch doppelte Rekombination im Genom nicht vorhanden ist. Die so selektierten Mutanten (SM31-SM33; siehe Abbildung 2.23 C) die durch Integration der Plasmide pSM80-pSM82 nach doppelter Rekombination entstanden sind, wurden zusätzlich in einer Southern-Analyse überprüft. Dazu wurde die chromosomale DNA des *S. aurantiaca* Wildtyps und der Mutanten mit dem Enzym *Bam* HI restringiert. Als Sonde in der Southern-Analyse diente die Kanamycin-Resistenz-Kassette des Plasmids pUC4K1XX. Im Vergleich zum Wildtyp, der kein Signal in der Hybridisierung zeigt, wird bei den Mutanten SM31, SM32 und SM33 ein Signal bei ca. 5.5 kbp detektiert (Abb. 2.24).

Abbildung 2.24: Genomische Southern-Analyse der Mutanten SM31, SM32 und SM33 im Vergleich zu dem Wildtyp. Die Größe der Fragmente wurde mit Hilfe des DNA Molecular Weight Markers IV (Roche Diagnostics) bestimmt (nicht dargestellt). Die chromosomale DNA des Wildtyps und der verschiedenen Mutanten wurde mit dem Enzym *Bam* HI restringiert. Als Sonde wurde das Kan<sup>r</sup>-Gen verwendet. Spur 1: Wildtyp-DNA; Spur 2: Mutante SM31-DNA; Spur 3: Mutante SM32-DNA; Spur 4: Mutante SM33-DNA.

#### 2.4.1.3 Phänotyp-Analyse der Mutanten SM31, SM32 und SM33

Die Mutanten SM31, SM32 und SM33 (Abb. 2.25 B-D) bilden unter Hungerbedingungen im Gegensatz zum *S. aurantiaca* Wildtyp (Abb. 2.25 A) lediglich eine klumpige Struktur.

Die Ausbildung von Zwischenstadien der Fruchtkörperentwicklung wie z.B. champignon- oder morchelartiger Strukturen kann nicht beobachtet werden.

Zur Analyse der Auskeimungsfähigkeit wurden die Aggregate der Mutanten (auf Filterpapier; siehe 4.2.1.6) auf CY-Agar inkubiert. Sie zeigen im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderung in der Auskeimung von Fruchtkörpersporen zu Schwärmen vegetativer Zellen. Die Bildung von Indol-induzierten Sporen verläuft bei den Mutanten vergleichbar zum Wildtyp.

Abbildung 2.25: Fruchtkörperstrukturen verschiedener *S. aurantiaca*-Stämme. A) *S. aurantiaca* Wildtyp; B) Mutante SM31; C) Mutante SM32; D) Mutante SM33.

#### **2.4.2 Studien zur Expression der tRNA Gene, *trnD1* und *trnV1***

Die Transkriptionseinheit des Gens *trnD1* wird durch die ortsspezifische Rekombination der Plasmide pSH8 und pSM28 in das *S. aurantiaca* Genom verändert. Der nichtkodierende 3'-Bereich der tRNA<sup>Asp</sup>, welcher keine Terminatorstrukturen enthält, wird durch den Prozeß der ortsspezifischen Rekombination ersetzt und beinhaltet dann den Mx8-spezifischen Terminator t<sub>Mx8</sub>. Dieser Terminator enthält eine "stem-loop" Struktur und könnte so die Transkription, die Termination und/oder die Prozessierung der prä-tRNA<sup>Asp</sup> verändern und so die heterogenen Phänotypen der Mutanten SM4 und SM12 erklären. Es stellte sich die Frage, wo die beiden tRNA Genprodukte in der

komplexen Entwicklung von *S. aurantiaca* eine spezielle Rolle spielen und ob sie nur während bestimmter Entwicklungsphasen exprimiert werden. Zur Beantwortung dieser Fragestellung sollte die Expression der Gene in verschiedenen Entwicklungsbedingungen analysiert werden. Als Methoden wurden transkriptionelle Fusionen der tRNA Gene mit dem promotorlosen  $\Delta trpA-lacZ$ -Fusionsgen, die RTPCR-Methode und die Northern-Analyse verwendet.

#### **2.4.2.1 Bestimmung des Zeitfensters der *trnD1*- und *trnV1*-Expression mittels eines transkriptionellen $\Delta trpA-lacZ$ -Fusionsgens**

Für die Konstruktion der transkriptionellen Fusion der tRNA Gene mit dem  $\beta$ -Galaktosidase-kodierenden Gen *lacZ* wurde das Plasmid pSM/lacZ verwendet. Dieses Plasmid trägt ein 3.3 kbp *Eco* RI/*Hind* III-Fragment, welches die  $\Delta trpA-lacZ$ -Genfusion des Plasmids Tn5 lacZ1 (de Lorenzo et al., 1990) enthält (siehe Anhang).

Abbildung 2.26 A,B: Schematische Darstellung des Plasmids pSM63 und des Genotyps der Mutante SM25, die durch ein einfaches Rekombinationsereignis nach Einführung des Plasmides in das Wildtyp-Genom identifiziert wurde. A) In Plasmid pSM63 ist das 3'-verkürzte *trnD1* Gen an das  $\Delta trpA-lacZ$ -Konstrukt fusioniert. Zusätzlich vorhanden ist das *trnV1* Gen sowie 343 bp der stromaufwärts-Region. B) Schematische Darstellung des Genotyps der Mutante SM25. Die Hybridisierungsstellen der Primer SMATT28, SMATT29 und SMATT39, die zur Analyse des Genotyps der Mutante SM25 verwendet wurden, sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Das Konstrukt besteht aus 150 bp des *trpA*-Gens, fusioniert an das 5'-Ende von *lacZ*. Das *trpA*-Fragment enthält 3 Stopkodons in den drei möglichen Leserahmen und unterbindet so die Bildung einer translationalen Fusion mit *lacZ*. Weiterhin beinhaltet das Plasmid pSM*lacZ* eine 1.5 kbp *Hind* III/*Sal* I Kanamycin-Resistenz-Kassette zur Selektion.

Unter Verwendung der Primer SMATT28 und SMATT29 wurde ein 479 bp großes DNA-Fragment aus der chromosomalen *S. aurantiaca* DNA mittels PCR amplifiziert und mit den Enzymen *Spe* I und *Bam* HI restringiert. Dieses 479 bp große DNA-Fragment enthält 343 bp der stromaufwärts-Region des *trnV1* Gens, das *trnV1* Gen und die ersten 57 bp des *trnD1* Gens. Dieses Fragment wurde in die *Spe* I/*Bam* HI-Restriktionsschnittstellen des Plasmids pSM*lacZ* kloniert. Das entstandene Plasmid wurde als pSM63 bezeichnet (Abb. 2.26 A). pSM63 wurde mittels Elektroporation in seiner zirkulären Form in den *S. aurantiaca* Wildtyp transferiert. Der Genotyp der so konstruierten Mutante SM25 (Abb. 2.26 B) wurde mit spezifischen Primern durch PCR-Analyse überprüft.

Abbildung 2.26 C,D: PCR- und Southern-Analyse der Mutante SM25. C) PCR-Analyse der Mutante SM25 mit den Primern SMATT28 und SMATT29 (Spur 1) und den Primern SMATT28 und SMATT39 (Spur 2). Die Größe der Signale wurde mit Hilfe des DNA Molecular Weight Markers IV (Roche Diagnostics) bestimmt (nicht dargestellt). D) Genomischer Southern des Wildtyps und der Mutante SM25. Die chromosomale DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Bam* HI verdaut, die Kanamycin-Resistenz-Kassette diente als Sonde. Die Größe der Fragmente wurde mit Hilfe des DNA Molecular Weight Markers IV (Roche Diagnostics) bestimmt (nicht dargestellt). Spur 1: Wildtyp-DNA; Spur 2: SM25-DNA.

Unter Verwendung der Primer SMATT28 und SMATT29 konnte das oben beschriebene 479 bp DNA-Fragment aus der chromosomalen DNA von Mutante SM25 amplifiziert werden. Die Primerkombination SMATT28 und SMATT39 führte weiterhin zur Bildung eines rechnerisch 712 bp DNA-Fragmentes (Abb. 2.26 C). Zusätzlich wurde der Genotyp von SM25 mit einer Southern-Analyse bestätigt, bei der die chromosomale DNA mit dem Enzym *Bam* HI restringiert wurde. Als Sonde diente die Kanamycin-Resistenz-Kassette. Im Gegensatz zum Wildtyp zeigt die Mutante SM25 ein Signal bei 8 kbp (Abb. 2.26 D).

#### **2.4.2.2 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in der Mutante SM25 im Verlauf der Entwicklung**

Zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Fruchtkörperentwicklung Zellen und Aggregate geerntet. Gleichzeitig wurden auch vegetative, Indol-behandelte Zellen und Zellen, die einem Hitzeschock ausgesetzt waren, aufgearbeitet. Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Rohextrakten (siehe 4.2.7.3) zeigte, daß eine Aktivität in vegetativen [64 Fluoreszenzeinheiten; (FE)] und Indol-behandelten Zellen (62 FE nach 15 min und 64 FE nach 30 min nach Start der Indol-Induktion) vorliegt. Während der Fruchtkörperbildung liegt das Maximum der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bei 4 Stunden nach Beginn des Hungers (81 FE). Nach 6 Stunden hungern kommt es bereits zu einem starken Abfall der Aktivität (60 FE), der sich im weiteren Verlauf der Entwicklung unter Hungerbedingungen fortsetzt (Abb. 2.27). Unter Hitzeschockbedingungen ist nur eine geringe  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (29 FE nach 15 min und 25 FE nach 30 min) messbar.

#### **2.4.2.3 Phänotyp-Analyse der Mutante SM25**

Im Vergleich zum Wildtyp bildet die Mutante SM25 unter Hungerbedingungen nur noch klumpige Aggregate aus (Abb. 2.28 B). SM25 zeigt im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderung in der Fähigkeit zur Bildung von Indol-induzierten Sporen und auch die Auskeimung von Fruchtkörpersporen auf CY-Agar (siehe 4.2.1.6) erfolgt vergleichbar zu dem parallel analysierten Wildtyp.



Abbildung 2.27: Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in der Mutante SM25 während der Fruchtkörperbildung (Diagramm). In der Tabelle ist die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität zu unterschiedlichen Zeiten nach Start der Indol-Induktion oder nach Start eines Hitzeschocks dargestellt.

Abbildung 2.28: Fruchtkörperstrukturen nach Entwicklung auf Hungermedium. A) *S. aurantiaca* Wildtyp; B) Mutante SM25.

#### 2.4.2.4 Bestimmung des Zeitfensters der *trnD1*- und *trnV1*-Expression durch RTPCR-Analyse

Die Expression der beiden tRNAs wurde im Verlauf der Entwicklung auch auf RNA-Ebene analysiert. Dazu eignete sich die Methode der RTPCR. Zunächst wurde die RNA des *S. aurantiaca* Wildtyps DW4/3-1 sowie der Mutante SM12 (siehe Abbildung 2.6 B) auf die Expression der tRNA<sup>Asp</sup> und tRNA<sup>Val</sup> hin untersucht. Dazu erfolgte die RNA-Isolierung aus vegetativen, Indol-behandelten Zellen und Zellen, welche einem Hitzeschock ausgesetzt waren. Weiterhin wurde aus Aggregaten (Mutante SM12) oder Fruchtkörpern des Wildtyps nach verschiedenen Entwicklungszeiten RNA isoliert. Für die RTPCR-Analyse wurden die Primer tRNA2 und SMATT51 verwendet, welche 123 bp stromaufwärts des *trnV1* Starts und 28 bp stromabwärts des *trnD1* Starts hybridisieren (Abb. 2.29 A).

Abbildung 2.29 A: Darstellung der stromaufwärts- und stromabwärts-Regionen des *attB* Locus von *S. aurantiaca*. A) Schematische Darstellung des *attB* Locus von *S. aurantiaca* mit den beiden tRNA Genen *trnD1* und *trnV1* sowie der putativen Integrase/Rekombinase (*ire*) und Isoamylase (*isa*). Die Hybridisierungsstellen der für die RTPCR verwendeten Primer, SMATT51 und tRNA2, sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Als Nachweis der Expression wurde die Amplifikation eines 230 bp Fragmentes erwartet. Die Expression der beiden tRNA Gene erfolgt in Wildtyp-Zellen während des vegetativen Wachstums, bei Induktion der Sporenbildung durch Zugabe von Indol, unter Hitzeschockbedingungen und auch während der Fruchtkörperbildung (Abb. 2.29 B). Analog findet bei der Mutante SM12 die Expression der beiden tRNA Gene unter diesen Bedingungen statt (Abb. 2.29 B). Zusätzlich zur spezifischen Amplifikation einer 230 bp DNA-Bande ist eine weitere DNA-Bande in Wildtypzellen und der Mutante SM12 unter Hitzeschockbedingungen und während der Indol-induzierten Sporulation bei ca. 350 bp sichtbar. Beide DNA-Fragmente wurden aus einem Agarosegel isoliert, kloniert und sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte, daß es sich bei dem 230 bp DNA-Fragment um die beiden tRNA Gene des *S. aurantiaca attB* Locus handelt.

Das größere DNA-Fragment besitzt eine 100%ige Sequenzidentität zu dem Tyrosin-tRNA Gen und zu Teilen des Glycin-tRNA Gens des tRNA-*tufB* Operons von *S. aurantiaca*.

Abbildung 2.29 B: Expressionsanalyse der beiden tRNA Gene im Wildtyp und der Mutante SM12. B) RTPCR-Analyse der Expression der beiden tRNA Gene *trnD1* und *trnV1* des Wildtyps (DW4/3-1) und der Mutante SM12. Die DNA-Fragmentgrößen wurden mit Hilfe der 100 bp ladder bestimmt (Spur1). Spur 2: Vegetative Zellen; Spur 3: Indol-Behandlung nach 15 min; Spur 4: Indol-Behandlung nach 30 min; Spur 5: Hitzeschock für 15 min; Spur 6: Hitzeschock für 30 min; Spur 7: Fruchtkörper nach 6 h; Spur 8: Fruchtkörper nach 20 h; Spur 9: Fruchtkörper nach 30 h.

#### **2.4.2.5 Bestimmung des Zeitfensters der *trnD1*- und *trnV1*-Expression durch Northern-Analyse**

Die Expression der beiden tRNA Gene *trnD1* und *trnV1* wurde bei unterschiedlichen Entwicklungsbedingungen mit Hilfe einer Northern-Analyse untersucht. Zunächst stellte sich die Frage nach einer geeigneten Sonde für die Hybridisierung. Mit Hilfe einer Southern-Analyse in der unterschiedliche Sonden verwendet wurden, sollte eine geeignete DNA-Sequenz identifiziert werden. Die chromosomale DNA des *S. aurantiaca* Wildtyps wurde mit dem Restriktionsenzym *Bam* HI restringiert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Es wurden zwei verschiedene Sonden verwendet. Zum einen wurde mit den Primern Asp1 und Asp2

das *trnD1* Gen (73 bp) amplifiziert und zum anderen wurde ein 253 bp DNA-Fragment mit den Primern tRNA2 und tRNA3 in einer PCR-Reaktion hergestellt, welches 128 bp der stromaufwärts-Region des *trnV1* Gens, das *trnV1* Gen und die ersten 63 bp des *trnD1* Gen besitzt. Wie in Abbildung 2.30 A zu sehen ist, kann mit dem *trnD1* Gen als Sonde ein ca. 4.2 kbp großes, starkes Signal detektiert werden. Zusätzlich sind weitere, schwächere Banden in einem höheren kbp Bereich sichtbar (bei ca. 7, 9 und 15 kbp). Die Verwendung der 253 bp DNA-Sonde, die das *trnV1* Gen mit dessen stromaufwärts-Region und einen Teil des *trnD1* Gens enthält, führt zu einem anderen Ergebnis. Ein starkes Signal ist bei ca. 5 kbp sichtbar. Weitere schwächere Banden sind auch hier sichtbar (Abb. 2.30 B). Beide Sonden liefern also keine spezifische Hybridisierung mit nur einem bestimmten *Bam* HI DNA-Fragment.

Abbildung 2.30: Genomische Southern-Analyse der *S. aurantiaca* Wildtyp-DNA mit *Bam* HI restringiert. Die Fragmentgrößen wurde mittels des DNA Molecular Weight Markers IV (Roche Diagnostics) bestimmt. A, B) Spur 1: DNA Molecular Weight Marker IV; A) Spur 2: *trnD1* Gen als Sonde. B) Spur 2: Eine 253 bp große Sonde wurde verwendet, die das *trnV1* Gen, 128 bp der 5'-Region von *trnV1* und 63 bp des *trnD1* Gens enthält.

Für die Northern-Analyse wurde RNA aus unterschiedlichen Entwicklungsphasen des *S. aurantiaca* Wildtyps isoliert. Es wurden vegetative, Indol-behandelte Zellen, Zellen die einem Hitzeschock ausgesetzt waren und Fruchtkörper nach unterschiedlichen Zeiten der Entwicklung aufgearbeitet. Das oben beschriebene 253 bp DNA-Fragment diente als Sonde, da es beide tRNA Gene beinhaltet. Es kommt unter Verwendung der

verschiedenen Wildtyp RNAs zu einer unspezifischen Bindung der Sonde an die 23S und 16S rRNA (Ergebnis nicht dargestellt).

### **2.4.3 Versuch der Komplementation des Phänotyps der Mutante SM12 durch Bereitstellung des *attB* Locus**

Durch die Integration des Plasmids pSM28 in den *S. aurantiaca* Wildtyp entsteht ein heterogener Phänotyp, welcher teilweise aus klumpigen Aggregaten, aber auch aus morchel- und champignonartigen Strukturen besteht (siehe Abbildung 2.6 B und 2.8 B). Diese Mutante, SM12, besitzt die beiden tRNA Gene *trnD1* und *trnV1*, wobei der stromabwärts-Bereich des *trnD1* Gens, der keine erkennbaren "stem-loop" Strukturen enthält, durch den Mx8-spezifischen Terminator  $t_{Mx8}$  ersetzt wird. Diese Veränderung in der Sequenzstruktur könnte der Grund für die Veränderung des Phänotyps der Mutante SM12 sein. Nach Integration eines Plasmids in das Wildtyp-Genom, welches zusätzlich zu dem *attP* Locus den *attB* Locus von *S. aurantiaca* enthält, sollte der Phänotyp dem des Wildtyps vergleichbar sein, weil auch trotz Integration eine Wildtyp-Version des *attB* Locus vorhanden ist.

Eine weitere Strategie, die zur Komplementation des SM12 Phänotyps führen könnte, wäre eine Integration des *attB* Locus von *S. aurantiaca* in das *mta* Gencluster, welches aus den Genen *mtaA* bis *mtaG* besteht. Diese Gene kodieren für Polyketidsynthasen oder nichtribosomale Peptidsynthasen, die eine Rolle bei der Synthese und Modifikation des Sekundärmetaboliten Myxothiazol spielen. Eine Notwendigkeit der Genprodukte für die Fruchtkörperbildung konnte nicht festgestellt werden (Silakowski et al., 1998).

#### **2.4.3.1 Konstruktion des Plasmids pSM29 und der *S. aurantiaca* Mutante SM23**

Es wurde das Plasmid pSM29 konstruiert, welches zusätzlich zu dem 2.9 kbp *attP* Mx8 DNA-Fragment den *attB* Locus von *S. aurantiaca* trägt. Das mit den Primern SMATT17 und SMATT18 amplifizierte 909 bp *S. aurantiaca attB* DNA-Fragment (siehe 2.3.1), welches die beiden tRNA Gene enthält sowie 416 bp der stromabwärts-Region des *trnD1* Gens und 341 bp der stromaufwärts-Region des *trnV1* Gens, wurde in das *Sca* I linearisierte Plasmid pSM28 (siehe Abb. 2.6 A) kloniert. Das so konstruierte Plasmid pSM29 (Abb. 2.31 A) wurde in seiner zirkulären Form in den *S. aurantiaca* Wildtyp mittels Elektroporation transferiert.

Abbildung 2.31: Schematische Darstellung des Plasmids pSM29 und der ortsspezifischen Rekombination von pSM29 in die *attB* site des Wildtyps (DW4/3-1). A) Das Plasmid pSM29 enthält neben dem 2.9 kbp Mx8 DNA-Fragment, welches die Integrase (*intP* mit *attP* site) für die ortsspezifische Integration kodiert, ein 909 bp großes *attB* site Fragment von *S. aurantiaca*. Das *attB* Fragment wurde in die *Sca* I Restriktionsstelle, die sich in dem Chloramphenicol-Resistenz-Gen (*Cam<sup>r</sup>*) befindet, eingefügt. Plasmid pSM29 enthält weiterhin ein Kanamycin-Resistenz-Gen (*Kan<sup>r</sup>*) zur Selektion, den *E. coli* Replikationsursprung *ColE1* und den des Phagen f1 f1(-) sowie das *lacZ $\alpha$*  Genfragment der  $\beta$ -Galaktosidase. B) Genotyp der Mutante SM23. Der Genotyp der Mutante wurde mit Hilfe von spezifischen Primern, die in der Abbildung durch Pfeile dargestellt sind, via PCR verifiziert.

Zur Analyse des Genotyps der so konstruierten Mutante SM23 (Abb. 2.31 B) wurde die PCR-Methode verwendet. Mit Hilfe verschiedener Primer konnten die beiden Wirts-Phagen-Verbindungen *attL* und *attR* sowie die intakte *attB* Region nachgewiesen

werden. Für die Amplifikation eines 500 bp *attB* DNA-Fragmentes wurden die Primer SMATT34 und SMATT35 verwendet. Zum Nachweis der *attL* site wurden die Primer SMATT34 und SMATT37 verwendet. SMATT34 hybridisiert spezifisch in dem *S.aurantiaca* DNA-Abschnitt und SMATT37 in dem durch Mx8 kodierten DNA-Fragment der *attL* site. So wurde ein 432 bp DNA-Fragment amplifiziert. Zum Nachweis der *attR* site (Amplifikation eines 749 bp DNA-Fragmentes) wurden die Primer SMATT35 und SMATT36 verwendet. Diese Primer waren auch hier so konstruiert, daß einer in dem *S.aurantiaca* DNA-Abschnitt (SMATT35) und der andere in dem durch Mx8 kodierten DNA-Fragment (SMATT36) der *attR* site hybridisierte (Abb. 2.32).

Abbildung 2.32: PCR-Analyse der Mutante SM23. Der Genotyp von SM23 wurde durch PCR mit genomischer DNA als Matrize überprüft. Die Größe der DNA-Fragmente wurde mittels der 100 bp ladder bestimmt (nicht dargestellt). Spur 1: PCR-Produkt mit den Primern SMATT34 und SMATT35; Spur 2: PCR-Produkt unter Verwendung der Primer SMATT35 und SMATT36; Spur 3: PCR-Produkt mit den Primern SMATT34 und SMATT37.

#### **2.4.3.2 Phänotyp-Analyse der Mutante SM23**

Die Mutante SM23 wurde einem Fruchtkörpertest unterworfen. Sie zeigt im Vergleich zum Wildtyp einen heterogenen Phänotyp. Es werden Aggregaten gebildet, aus denen Stiele mit Sporangiolen hervorgehen (Abb. 2.33 B). Im Vergleich zu dem heterogenen Phänotyp der Mutante SM12 (siehe Abb. 2.8 B) kann hier eine fortgeschrittene Strukturentwicklung beobachtet werden, die aber trotzdem nicht dem Wildtyp-Phänotyp entspricht.

Abbildung 2.33: Fruchtkörperstrukturen von *S. aurantiaca*-Stämmen. A) *S. aurantiaca* Wildtyp; B) Mutante SM23.

#### 2.4.3.3 Konstruktion des Plasmids pSM86 und der *S. aurantiaca* Mutanten SM34 und SM35

Wie bereits erwähnt wurde sollte der *attB* Locus von *S. aurantiaca* in das *mta* Gencluster der Mutante SM12 integriert werden, um möglicherweise eine Komplementation des heterogenen Phänotyps zu erzielen. Zur Konstruktion einer solchen Mutante wurde das Plasmid pBS23 verwendet, welches ein 2.3 kbp *S. aurantiaca* DNA-Fragment enthält, auf dem Teile des *mtaB* Gens (eine putative Polyketidsynthase) lokalisiert sind. In dieses Plasmid wurde das 1.2 kbp große *S. aurantiaca attB* DNA-Fragment des Plasmids pSM77 (siehe Abbildung 2.23 A) kloniert. Dazu wurde das Plasmid pSM77 mit den Restriktionsenzymen *Eco* RI und *Hind* III restringiert und das 1.2 kbp *attB* Fragment wurde isoliert. Dieses DNA-Fragment beinhaltet die beiden tRNA Gene *trnD1*, *trnV1* sowie 416 bp der stromabwärts-Region des *trnD1* Gens und 668 bp der stromaufwärts-Region des *trnV1* Gens. Es folgte eine Ligation dieses Fragmentes in den mit *Eco* RI/*Hind* III restringierten Vektor pBS23. Dies führte zu Plasmid pSM85. Da die Mutante SM12 eine Kanamycin-Resistenz besitzt, mußte eine Tetracyclin-Resistenz-Kassette in den Vektor pSM85 eingefügt werden. Unter Verwendung der Primer Tcfw/*Xba* I und Tcrv/*Xba* I und dem Plasmid pBR322 (siehe Anhang) als Matrize, wurde ein ca. 1.3 kbp großes DNA-Fragment amplifiziert, welches die genannte Resistenz vermittelt. Das PCR-Produkt wurde mit dem Enzym *Xba* I restringiert und in den mit dem selben Enzym geschnittenen Vektor pSM85 eingefügt, was zu Plasmid pSM86 führte (Abb. 2.34 A).



Abbildung 2.34: Darstellung des Plasmides pSM86 und des Genotyps der *S. aurantiaca* Mutante SM34. A) Das Plasmid pSM86 enthält neben dem ca. 2.3 kbp *mtaB* Gen-Fragment eine Tetracyclin-Resistenz-Kassette (Tc<sup>r</sup>) und ein 1.2 kbp *attB*-Fragment des Wildtyps. B) Schematische Darstellung des Genotyps der Mutante SM34, welche nach einfacher Rekombination des Plasmids pSM86 in das Genom des *S. aurantiaca* Wildtyps (DW4/3-1) identifiziert wurde.

Der Vektor pSM86 wurde in seiner zirkulären Form in den *S. aurantiaca* Wildtyp und in die Mutante SM12 mittels Elektroporations transferiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte ausgehend vom Wildtyp mit Oxitetracyclin und ausgehend von dem Stamm SM12 mit Oxitetracyclin und Kanamycinsulfat.

Die Integration des Plasmids pSM86 sollte beim Wildtyp hauptsächlich in das *mtaB* Gen erfolgen, da für die ortsspezifische Rekombination, die auch zwischen zwei *attB* sites erfolgen kann, keine aktive Integrase auf dem Plasmid pSM86 vorhanden war. Erwartet wurde die Bildung einer merodiploiden Mutante, in der das Plasmid in das *mtaB* Gen rekombiniert, da zusätzlich zur 1.2 kbp großen *attB* site ein 2.3 kbp *mtaB* Fragment vorhanden ist. Somit war die Wahrscheinlichkeit der Rekombination in diesen chromosomalen Genabschnitt aufgrund der Größe des homologen Bereiches höher.

Der Genotyp der so konstruierten Mutante SM34 (Abb. 2.34 B) wurde durch verschiedene Sonden in einer Southern-Analyse überprüft. Chromosomale DNA des *S. aurantiaca* Wildtyps und der Mutante SM34 wurden mit dem Enzym *Bam* HI restringiert und das Plasmid pSM27 (pBC SK-Derivat), welches das 2.9 kbp *attP* site Fragment des Myxophagen Mx8 enthält, wurde als Sonde verwendet. Bei dem Wildtyp konnte ein Signal bei ca. 4 kbp detektiert werden, was vermutlich die *attB* site darstellt, die aufgrund der homologen Bereiche in der core-Sequenz erkannt wird (siehe 2.1.1). Bei Mutante SM34 sind drei Banden sichtbar. Die ca. 4 kbp Bande des *attB* Locus, ein 1.7 kbp und ein ca. 4.5 kbp Fragment. Das 1.7 kbp Signal entspricht dem *attB* Fragment des Plasmids pSM86. Das ca. 4.5 kbp Signal wird aufgrund der Homologien des Plasmids pSM86 (pBS SK-Derivat) und dem Plasmid pSM27 (pBC SK-Derivat), welches als Sonde verwendet wurde, erkannt (Abb. 2.35 A). In einer weiteren Analyse wurde das 909 bp *attB* DNA-Fragment von *S. aurantiaca*, das die beiden tRNA Gene enthält, als Sonde verwendet. Auch hier konnte bei dem *S. aurantiaca* Wildtyp eine ca. 4 kbp Bande detektiert werden. Im Falle der Mutante SM34 wurden zwei Signale bei ca. 4 und 1.7 kbp sichtbar. (Abb. 2.35 B).

Abbildung 2.35: Southern-Analyse der Mutante SM34 im Vergleich zum *S. aurantiaca* Wildtyp. Chromosomale DNA wurde mit dem Enzym *Bam* HI restringiert. Die Fragmentgrößen wurde mittels des DNA Molecular Weight Markers IV (Roche Diagnostics) bestimmt (nicht dargestellt). A) Plasmid pSM27 wurde als Sonde verwendet. Spur 1: Wildtyp-DNA. Spur 2: DNA der Mutante SM34. B) Als Sonde wurde das 0.9 kbp *attB*-Fragment von *S. aurantiaca* verwendet. Spur 1: Wildtyp-DNA Spur 2: SM34-DNA.

Abbildung 2.36: Schematische Darstellung des Plasmides pSM86 und der möglichen Rekombinationsereignisse in die *attR* oder *attL* site der Mutante SM12. A) Dargestellt ist das Plasmid pSM86 und der Genotyp der Mutante SM12, in die die Transformation des Plasmides erfolgte. B) Das Vorhandensein der weniger aktiven Integrase (kodiert durch *intX*) in der Mutante SM12 ermöglichte zwei verschiedene Ereignisse ortsspezifischer Rekombination, zum einen in die *attR* site von SM12 (Mutante SM35) und zum anderen in die *attL* site von SM12 (diese Möglichkeit wurde bisher nicht verifiziert).

Die erwartete hauptsächliche Integration des Plasmids pSM86 in den *mtaB* Locus der Mutante SM12 wurde auch durch verschiedene Southern-Analysen überprüft. Im Falle der so analysierten Mutante SM35 (Abb. 2.36) erfolgte jedoch keine Bildung einer merodiploiden Mutante analog zum Wildtyp mit einer Integration von pSM86 in den *mtaB* Locus. SM12 enthält die beiden Wirts-Phagen-Verbindungen *attL* und *attR* und somit die weniger aktive Integrase IntX (siehe Abb. 2.13). Wegen dem Vorhandensein dieser Integrase war die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination des Plasmids pSM86 in den *mtaB* Bereich wesentlich geringer. Es wurden 12 verschiedene, unabhängige Transformanten analysiert und alle zeigten eine ortsspezifische Integration von pSM86 in die *attR* site von SM12 (Mutante SM35). Zur Überprüfung des Genotyps wurde die chromosomale DNA der Mutante SM12 und der Mutante SM35 mit dem Enzym *Bam* HI restringiert. Verschiedene Sonden dienten zur Analyse des Genotyps der erhaltenen Mutante: Das Tetracyclin-Resistenz-Gen des Plasmids pSM86 führt bei SM12-DNA zu keinem Signal und bei der SM35-DNA zu zwei Signalen bei ca. 4.3 und 0.4 kbp. Die Verwendung der Kanamycin-Resistenz-Kassette als Sonde zeigte ein Signal von 8 kbp bei beiden Mutanten, SM12 und SM35. Bei einer Integration des Plasmids pSM86 in die *attL* site von SM12 wäre ein Signal bei ca. 6.5 kbp zu erwarten gewesen. Zusätzlich wurde das Plasmid pSM27 (pBC SK-Derivat), welches das 2.9 kbp *attP* site Fragment des Myxophagen Mx8 enthält, als Sonde verwendet. Die Mutante SM12 zeigt zwei Signale von ca. 8 bzw. 3.5 kbp. Drei Signale von ca. 8, 3.5 und 4.5 kbp sind bei der Mutante SM35 sichtbar (Abb. 2.37).

Abbildung 2.37: Genomische Southern-Analyse der Mutante SM35 im Vergleich zur Mutante SM12. Die chromosomale DNA der beiden Mutanten wurde mit dem Enzym *Bam* HI restringiert. Die Größe der Fragmente wurde mit Hilfe des DNA Molecular Weight Markers IV (Roche Diagnostics) bestimmt (nicht dargestellt). A) Das Tetracyclin-Resistenz-Gen wurde als Sonde verwendet. Spur 1: DNA der Mutante SM12; Spur 2: DNA der Mutante SM35. B) Verwendung der Kanamycin-Resistenz-Kassette als Sonde. Spur 1: DNA der Mutante SM12; Spur 2: SM35-DNA. C) Plasmid pSM27 fand in dieser Analyse seine Anwendung. Spur 1: DNA der Mutante SM12; Spur 2: SM35-DNA.

#### 2.4.3.4 Phänotyp-Analyse der Mutanten SM34 und SM35

Die beiden Mutanten SM34 und SM35 bilden wie der *S. aurantiaca* Wildtyp Wildtyp-Fruchtkörperstrukturen unter Hungerbedingungen aus (Abb. 2.38).

Abbildung 2.38: Die Phänotypen der Fruchtkörper der Mutanten SM34 (B) und SM35 (C) im Vergleich zum *S. aurantiaca* Wildtyp (A).

## Teil II: Analyse der Fruchtkörperbildung von *S. aurantiaca*

Die Fruchtkörperbildung von *S. aurantiaca* stellt einen komplexen Prozeß dar, bei dem eine Differenzierung erfolgt, die Bildung der komplexen Fruchtkörperstruktur. Dieser Entwicklungsprozeß erfordert die zeitliche und räumliche Änderung der Expression von Genen, deren Produkte an dieser Strukturausbildung beteiligt sind. Bei *S. aurantiaca* wurden *Tn5lacZ*-Insertionsmutanten konstruiert, die sehr unterschiedliche Phänotypen aufweisen. Sie zeigen Defekte in der Fruchtkörperbildung, die in drei verschiedene Phänotyp-Klassen eingeteilt werden können: Mutanten, die abnormale Fruchtkörper bilden, welche, die nur noch zu Klumpen aggregieren konnten und Mutanten, die weder eine Aggregation noch eine Fruchtkörperbildung aufweisen (Pospiech, 1992). Die Analyse der Region die durch die Insertion in der Mutante AP182 betroffen war, führte zur Identifikation der Gene *fbfB* und *fbfA*. Die putativen Genprodukte zeigen Homologien zur Galaktoseoxidase des Pilzes *Dactylium dendroides* und zu NodC aus Rhizobien, einer N-Acetylglucosaminyl-Transferase. Die Expression des Gens *fbfB* wurde mittels einer merodiploiden Mutante (BS35) analysiert in der das 3'-verkürzte *fbfB* Gen an  $\Delta trp-lacZ$  fusioniert ist. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität beginnt ca. 14 h nach Hungerstart und erreicht nach ca. 30 h ein Maximum. Die Konstruktion einer *fbfB*-Mutante (BS 34), die ein 3'- und ein 5'-verkürztes *fbfB* enthält zeigte, daß das Genprodukt an der Fruchtkörperbildung beteiligt ist. Diese Mutante bildet lediglich Aggregate. Die *fbfA*-Mutante BS14, die eine Insertion (Kanamycin-Resistenz-Kassette) in dem Gen enthält bildete nur klumpige Aggregate aus, was die Beteiligung des Genproduktes an der Fruchtkörperbildung verdeutlicht. In einer merodiploiden *fbfA*-Mutante (BS23) bei der das 3'-verkürzte Gen in einer transkriptionellen Fusion mit  $\Delta trp-lacZ$  vorliegt wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Die Aktivität beginnt ca. 8 h nach Hungerstart und erreicht nach ca. 40 h ein Maximum. Ca. 1 kbp stromabwärts der kodierenden Region des *fbfA* Gens wurde ein weiterer offener Leserahmen (*sspA*) mit Homologien zum humanen Phosphoprotein Synapsin IA identifiziert (Silakowski et al., 96; Silakowski et al., 98). Stromabwärts des *fbfB* Gens konnte das *mta* Gencluster (*mtaA-mtaG*) identifiziert werden, dessen Genprodukte an der Bildung und Modifikation des Sekundärmetaboliten Myxothiazol beteiligt sind (Silakowski et al., 1999).

Zu Beginn dieser Arbeit lagen keine Informationen über offene Leserahmen in den Sequenzen zwischen den Genen *fbfA* und *sspA* und stromabwärts des *sspA* Gens vor. Diese Regionen wurden im Rahmen dieser Arbeit genauer analysiert. Zusätzliche

Gene, die an der Fruchtkörperbildung beteiligt sind, wurden identifiziert und auf ihre Expression in der Entwicklung hin analysiert.

## 2.5 Konstruktion einer *fbfB*-*fbfA*-Doppelmutante und Versuche zur genetischen Komplementation

Die Mutanten BS34 (*fbfB*-Mutante) und BS14 (*fbfA*-Mutante) bilden lediglich klumpige Aggregate unter Hungerbedingungen aus. Mischexperimente mit der Mutante AP191, welche nicht einmal mehr zu Klumpen aggregieren kann, führen bei beiden Mutanten zu einer phänotypischen Komplementation. Die Mutante BS34 bildet in einem Mischexperiment mit AP191 eine Champignonstruktur, wie sie auch während der Wildtyp-Fruchtkörperbildung nach ca. 15 Stunden beobachtet werden kann. Die Mischung der Mutante BS14 mit der Mutante AP191 führt zur Bildung einer Morchelstruktur, wie sie als Zwischenform beim Wildtyp nach ca. 12 Stunden auftritt (Silakowski et al., 1998).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine *fbfB*-*fbfA*-Doppelmutante konstruiert. Es wurde vermutet, daß diese Mutante, analog zu den Mutanten BS34 und BS14, eine klumpige Struktur bildet. Dieser Phänotyp sollte durch die Integration der beiden *fbf* Gene, *fbfA* und *fbfB*, in andere Genombereiche ektopisch komplementierbar sein.

### 2.5.1 Konstruktion der *fbfB*-*fbfA*-Doppelmutante SM1

Zunächst wurde die "multiple cloning site" (MCS) des Klonierungsvektors pBC SK- (siehe Anhang) durch eine selbst konstruierte MCS ersetzt. Dazu wurde die MCS des Vektors durch eine *Bss* HII-Restriktion entfernt. Durch die Hybridisierung der Oligonukleotide *delfbf1* und *delfbf2* entstand die neue MCS, die in den restringierten Klonierungsvektor pBC SK- eingefügt wurde. Das resultierende Plasmid pSM1 enthält folgende Restriktionsschnittstellen in der MCS: *Mlu* I, *Spe* I, *Sal* I, *Kpn* I, *Srf* I, *Eco* RI, *Eco* RV und *Bss* HII. Es wurde ein ca. 2.2 kbp *Sal* I/*Kpn* I und ein ca. 2.2 kbp *Eco* RI/*Srf* I *S. aurantiaca* DNA-Fragment aus dem Plasmid pBS1 (Abb. 2.39 A) isoliert. Das Plasmid pBS1 enthält ein 12 kbp großes *S. aurantiaca* DNA-Fragment, welches die Gene *mtaB* (lediglich die ersten 20 bp) *mtaA*, *fbfB*, *fbfA* und *sspA* enthält. Das 2.2 kbp *Eco* RI/*Srf* I DNA-Fragment des Plasmids pBS1 enthält die stromabwärts-Region des Gens *fbfA*, das Gen *sspA* und dessen stromabwärts-Bereich.

Abbildung 2.39: Schematische Darstellung des Plasmides pSM3 und des Genotyps der *S. aurantiaca* Mutante SM1. A) Plasmid pSM3 enthält die beiden 2.2 kbp Fragmente aus dem chromosomalen 12 kbp DNA-Fragment des Vektors pBS1 sowie das Tetracyclin-Resistenz-Gen ( $Tc^r$ ) zur Selektion. B) Schematische Darstellung des doppelten Rekombinationsereignisses nach Einbringen von pSM3 in den *S. aurantiaca* Wildtyp DW4/3-1. Genotyp der Mutante SM1, die eine *fbfB-fbfA*-Doppelmutante darstellt.



Das 2.2 kbp *Sal* I/*Kpn* I Fragment des Plasmids pBS1 enthält die ersten 20 bp des Gens *mtaB*, das Gen *mtaA* und 63 bp des Gens *fbfB*. Plasmid pSM1 wurde mit den Enzymen *Sal* I/*Kpn* I restringiert und das beschriebene 2.2 kbp *Sal* I/*Kpn* I wurde in den Vektor ligiert. Dieses als pSM1A bezeichnete Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco* RI/*Eco* RV verdaut und das 2.2 kbp große *Eco* RI/*Srf* I *S. aurantiaca* DNA-Fragment wurde in den so restringierten Vektor kloniert. Das entstandene Plasmid wurde als pSM2 bezeichnet. Zwischen die beiden 2.2 kbp *S. aurantiaca* DNA-Fragmente wurde nun eine Tetracyclin-Resistenz-Kassette eingefügt. Das 1.3 kbp Tetracyclin-Resistenz-Gen wurde unter Verwendung der Primer Tcrv und Tcfw aus dem Plasmid pBR322 (siehe Anhang) mittels der PCR-Methode amplifiziert und in das mit dem Enzym *Srf* I restringierte Plasmid pSM2 kloniert. Das so entstandene Plasmid pSM3 (Abb. 2.39 A) wurde mit dem Restriktionsenzym *Sca* I linearisiert und in den *S. aurantiaca* Wildtyp-Stamm durch Elektroporation eingeführt. Die mit Oxitetracyclin selektierten Mutanten wurden in einem Dot-Blot-Experiment mit dem Plasmid pBC Sk- als Sonde untersucht. Im Fall der erwünschten doppelten Rekombination sollte das Ausgangsplasmid pBC SK- kein Signal ergeben. Bei einer Integration von pSM3 durch einfache Rekombination wäre ein Signal zu erwarten. In einer Southern-Analyse wurde die chromosomale DNA des Wildtyps und der Mutante SM1 mit dem Enzym *Sal* I restringiert und ein 2.8 kbp *Sal* I DNA-Fragment des Plasmids pSM3 diente als Sonde für die Hybridisierung. Diese Sonde enthielt 600 bp des Tetracyclin-Resistenz-Gens und 2.2 kbp der *S. aurantiaca* DNA, die 63 bp von *fbfB* und dessen stromabwärts-Region (mit *mtaA* und 20 bp von *mtaB*) beinhaltet. Bei der Wildtyp-DNA ist eine ca. 12 kbp großes, bei der SM1-DNA ein ca. 2.8 kbp Fragment sichtbar (Abb. 2.40).

Abbildung 2.40: Southern-Analyse chromosomaler DNA des Wildtyps und der Mutante SM1. In beiden Fällen wurde die genomische DNA mit dem Enzym *Sal* I restringiert. Als Sonde diente ein 2.8 kbp DNA-Fragment des Plasmides pSM3, welches das Tetracyclin-Resistenz-Gen, Teile von *fbfB*, *mtaA* und Teile von *mtaB* enthielt. Die Größe der Fragmente wurde anhand des DNA Molecular Weight Markers II (Roche Diagnostics) bestimmt (nicht dargestellt). Spur 1: Wildtyp-DNA. Spur 2: DNA der Mutante SM1.

### 2.5.1.1 Phänotyp-Analyse der Mutante SM1

Die Mutante SM1 ist im Vergleich zum Wildtyp unter Hungerbedingungen nur zur Bildung von klumpigen Aggregaten fähig. Ein Mischexperiment dieser *fbfB-fbfA*-Doppelmutante mit der nichtaggregierenden Mutante AP191 (Mischungsverhältnis 1:2 und 1:3) führt zu keiner phänotypischen Komplementation. Auch hier werden unter Hungerbedingungen lediglich klumpige Aggregate gebildet (Abb. 2.41).

Die Fähigkeit zur Bildung von Indol-induzierten Sporen wurde in einem Vergleichsexperiment mit dem Wildtyp durchgeführt. Die Mutante SM1 zeigt keine sichtbare Veränderung in der Bildung von Indol-induzierten Sporen. Auch die Fähigkeit zur Bildung von Fruchtkörpersporen wurde untersucht. Dazu wurden Filterkonserven, die die klumpigen Aggregate von SM1 enthalten auf CY-Agarplatten inkubiert. Die Mutante kann unter diesen Bedingungen wieder zu Schwärmen von vegetativen Zellen auskeimen. Im Vergleich zum Wildtyp kann keine Veränderung in dieser Fähigkeit beobachtet werden. Es können mit diesem Test jedoch keine Aussagen über die Quantität der Fruchtkörpersporen gemacht werden (siehe 4.2.1.6).

Abbildung 2.41: Fruchtkörperformen verschiedener *S. aurantiaca*-Stämme. A) Wildtyp; B) Mutante SM1; C) Mutante AP191; D) Fruchtkörperstruktur aus dem Mischexperiment (SM1 und AP191; Mischungsverhältnis 1:3).

## 2.5.2 Versuche zur genetischen Komplementation der Mutante SM1

Die beiden an der Fruchtkörperbildung beteiligten Gene *fbfB* und *fbfA* sind in der Mutante SM1 weitgehend durch das Tetracyclin-Resistenz-Gen ersetzt. Sie zeigt den gleichen Phänotyp wie die Mutanten BS34 (*fbfB*-Mutante) und BS14 (*fbfA*-Mutante), die anstatt Fruchtkörper zu bilden nur noch zu Klumpen aggregieren können. Der Phänotyp von SM1 sollte durch ektopische Integration der beiden *fbf* Gene wieder zu einem Wildtyp-Phänotyp komplementierbar sein. Gedanklich gab es zu diesem Zeitpunkt der Arbeit zwei Möglichkeiten die Gene ektopisch in die Mutante SM1 zu integrieren. Zum einen in den *mta* Genlocus und zum anderen in den *attB* Locus.

### 2.5.2.1 Integration der beiden *fbf* Gene in den *attB* Locus der Mutante SM1

Um die *fbf* Gene in den *attB* Locus der Mutante SM1 integrieren zu können, wurde das Plasmid pBIM9 verwendet (siehe Anhang). Dieses Plasmid enthält ein ca. 5.5 kbp großes DNA-Fragment des Myxophagen Mx8 mit dem Integrase-kodierenden Gen *intP*, das die *attP* site enthält (Shen, 1999). Ein Kanamycin-Resistenz-Gen wurde in die *Xho* I Restriktionsschnittstelle von Plasmid pBIM9 kloniert, was zu Plasmid pSM9K führte. Die beiden *fbf* Gene, *fbfB* und *fbfA*, wurden aus dem Plasmid pBS1 (siehe Abbildung 2.39 A) als ein 3.6 kbp *Sma* I/*Eco* RI-Fragment herausgeschnitten und in den mit *Kpn* I und *Eco* RI restringierten Vektor pSM9K kloniert. Zunächst erfolgte die Ligation der kompatiblen *Eco* RI DNA-Enden, der sich eine Aufüllreaktion der nichtkompatiblen Enden und eine "blunt-end" Ligation anschlossen. Das 3.6 kbp *Sma* I/*Eco* RI-Fragment enthält neben den beiden *fbf* Genen 609 bp der stromabwärts-Region des *fbfB* Gens und 23 bp der stromabwärts-Region des *fbfA* Gens. Das so konstruierte Plasmid pSM9KAB1 (Abb. 2.42 A) wurde in den *S. aurantiaca* Wildtyp-Stamm mittels Elektroporation überführt. Die Selektion der Transformanten erfolgte mit Oxitetraacyclin und Kanamycinsulfat. Zur Überprüfung des Genotyps der Mutante SM5 (Abb. 2.42 B) wurde deren chromosomale DNA und die des Wildtyps mit dem Restriktionsenzym *Bss* HII verdaut. In einer Southern-Analyse, bei der das *fbfA* Gen als Sonde eingesetzt wurde, kann beim Wildtyp ein ca. 6.8 kbp und bei der Mutante SM5 ein ca. 3 kbp DNA-Fragment detektiert werden (Abb. 2.43).

Abbildung 2.42: Das Plasmid pSM9KAB1 und Darstellung der ortsspezifischen Rekombination des Plasmides in die *attB* site der Mutante SM1 (Bildung der Mutante SM5). A) Plasmid pSM9KAB1 enthält ein 5.5 kbp DNA-Fragment des Phagen Mx8 mit der kodierenden Sequenz der Integrase *intP* und der darin enthaltenen *attP* site für die ortsspezifische Rekombination. Weiterhin enthalten sind die beiden *fbf* Gene, *fbfB* und *fbfA*, sowie das Kanamycin-Resistenz-Gen ( $Kan^r$ ) zur Selektion. B) Genotyp der Mutante SM5 nach Integration des Plasmids pSM9KAB1 in die *attB* site der Mutante SM1.

Abbildung 2.43: Genomische Southern-Analyse der Mutante SM5 im Vergleich zum *S. aurantiaca* Wildtyp. Die chromosomale DNA wurde mit dem Enzym *Bss* HII restringiert und das Gen *fbfA* wurde als Sonde verwendet. Die Größe der Signale wurde anhand des DNA Molecular Weight Markers II (Roche Diagnostics) bestimmt (nicht dargestellt). Spur 1: Wildtyp-DNA; Spur 2: DNA der Mutante SM5.

### 2.5.2.2 Phänotyp-Analyse der Mutante SM5

Die Mutante SM5 bildet eine heterogene Struktur unter Hungerbedingungen, bei der klumpige Aggregate aber auch Stiele sichtbar sind (Abb. 2.44 B).

Abbildung 2.44: Vergleichende Abbildungen verschiedener *S. aurantiaca*-Stämme. A) Wildtyp; B) *S. aurantiaca* Mutante SM5; C) Transposon-Mutante AP191; D) Fruchtkörperform aus dem Mischexperiment der Mutante SM5 mit AP191 (Mischungsverhältnis 1: 3).

Dies stellt jedoch keine Wildtypstruktur dar. Ein Mischexperiment mit der nichtaggregierenden Mutante AP191 (Abb. 2.44 C), in dem die Zellen der Mutante SM5 mit denen der Mutante AP191 vor dem Transfer auf das Hungermedium in den Verhältnissen 1:2 und 1:3 gemischt wurden, führt zu einer partiellen phänotypischen Komplementation des SM5 Phänotyps (Abb. 2.44 D). Es sind Aggregate sichtbar aus denen Stiele mit Sporangiole hervorgehen. Die Mutante SM5 ist weiterhin fähig zur Bildung von Indol-induzierten Sporen. Die in den Fruchtkörpern enthaltenen Sporen können in Anwesenheit von Nährstoffe wieder zu Schwärmen von vegetativer Zellen auskeimen (siehe 4.2.1.6).

### **2.5.2.3 Integration der beiden *fbf* Gene, *fbfB* und *fbfA*, in den *mta* Genlocus der Mutante SM1**

Die beiden *fbf* Gene wurden in den *mta* Genlocus der Mutante SM1 integriert. Dazu wurde Plasmid pBS23 verwendet, welches ein 2.3 kbp *Sal* I Fragment des *mtaB* Gens enthält (pBS SK-Derivat). *MtaB* kodiert für eine Polyketidsynthase, die an der Bildung von Myxothiazol, einen Elektronentransportinhibitor der Atmungskette, beteiligt ist und dessen Inaktivierung die Fruchtkörperbildung nicht beeinträchtigt (Silakowski et al., 1999). Zur Konstruktion des Plasmids pSM32 wurde in die *Spe* I- und *Eco* RI-Schnittstellen des Plasmids pBS23 das 3.6 kbp *Sma* I/*Eco* RI DNA-Fragment aus Plasmids pBS1 (siehe Abbildung 2.39 A) eingefügt. Dieses 3.6 kbp *Sma* I/*Eco* RI DNA-Fragment enthält neben den beiden *fbf* Genen 609 bp der stromabwärts-Region des *fbfB* Gens und 23 bp der stromabwärts-Region des *fbfA* Gens. Durch Einfügen einer Kanamycin-Resistenz-Kassette in die *Hind* III-Restriktionsschnittstelle von pSM32 entstand Plasmid pSM33 (Abb. 2.45 A). pSM33 wurde in die *S. aurantiaca* Mutante SM1 durch Elektroporation transferiert. Die Selektion der rekombinanten Klone erfolgte mit Oxitetracyclin und Kanamycinsulfat. Zur Überprüfung des Genotyps wurde die chromosomale DNA des Wildtyps und der konstruierten Mutante SM17 (Abb. 2.45 B) mit dem Enzym *Sal* I restringiert und mit der *neo* Kassette und dem Plasmid pBS SK- als Sonden in einer Southern-Analyse überprüft. Die DNA des Wildtyps zeigt kein Signal, die der Mutante SM17 zwei hybridisierende Fragmente von ca. 1.5 und 6.5 kbp (Abb. 2.46).

Abbildung 2.45: Schematische Darstellung des Plasmides pSM33 und der Rekombination desselben in den *mtaB* Locus der Mutante SM1 (Bildung der Mutante SM17). A) Plasmid pSM33 enthält die beiden *fbf* Gene, *fbfA* und *fbfB*, sowie ein 2.3 kbp DNA-Fragment des Gens *mtaB*. Die Kanamycin-Resistenz-Kassette ( $Kan^r$ ) dient der Selektion. B) Schematische Darstellung des Genotyps der Mutante SM17 im Vergleich zum Wildtyp (DW4/3-1). Mutante SM17 enthält das Plasmid pSM33 in dem *mtaB* Gen. Zusätzlich sind die beiden *fbf* Gene fast vollständig durch die Tetracyclin-Resistenz-Kassette ( $Tc^r$ ) ersetzt.

Abbildung 2.46: Genomische Southern-Analyse der Mutante SM17 im Vergleich zum Wildtyp. Die chromosomale DNA der beiden *S. aurantiaca*-Stämme wurde mit dem Enzym *Sal* I restringiert. Die Größe der Fragmente wurde anhand des DNA Molecular Weight Markers II (Roche Diagnostics) bestimmt (nicht dargestellt). Spur 1: Wildtyp-DNA; Spur 2: DNA der Mutante SM17.

#### 2.5.2.4 Phänotyp-Analyse der Mutante SM17

Die Mutante SM17 bildet lediglich klumpige Aggregate unter Hungerbedingungen (Abb. 2.47 B).

Abbildung 2.47: Phänotyp-Strukturen verschiedener *S. aurantiaca*-Stämme. A) *S. aurantiaca* Wildtyp; B) Mutante SM17; C) Transposon-Mutante AP191; D) Fruchtkörperform aus dem Mischexperiment der Mutante SM17 mit AP191 (Mischungsverhältnis 1: 3).



Ein Mischexperiment mit der nichtaggregierenden Transposon-Mutante AP191 (Abb. 2.47 C), in dem die Zellen der Mutante SM17 mit AP191 in einem Verhältnis von 1:2 und 1:3 vor der Inkubation auf dem Hungermedium gemischt wurden, führt zu keiner phänotypischen Komplementation. Es sind nur Aggregate zu beobachten (Abb. 2.47 D). Mutante SM17 ist zur Bildung von Indol-induzierten Sporen fähig, die sich nicht von denen des Wildtyps zu unterscheiden scheinen. Auch die Keimungsfähigkeit der in den Aggregaten enthaltenen Sporen scheint der der Fruchtkörpersporen des Wildtyps zu entsprechen (siehe 4.2.1.6).

## 2.6 Genetische Analyse des Gens *fbfA* und seines stromabwärts-Bereiches

Zu Beginn dieser Arbeit wurde angenommen, daß sich lediglich ein offener Leserahmen, *sspA*, 1108 bp stromabwärts des *fbfA*-Stopkodons befindet (Silakowski, 1997). Das 999 bp große Gen zeigt Homologien zum humanen Phosphoprotein Synapsin IA, welches eine Rolle bei der Regulation der Transmitterausschüttung am synaptischen Spalt spielen soll (Thiele, 1993). Es war nicht bekannt, ob das Genprodukt von *sspA* in die Fruchtkörperbildung involviert ist und ob weitere offene Leserahmen in der stromabwärts-Region von *sspA* vorliegen, die notwendig für die Fruchtkörperbildung sind.

Da der Wildtyp-Phänotyp der *fbfB-fbfA*-Doppelmutante SM1 nicht durch die ektopische Integration der beiden Gene in den *mta* Genlocus wieder hergestellt werden konnte, wurde vermutet, daß in dem stromabwärts-Bereich des Gens *fbfA* weitere offene Leserahmen lokalisiert sind. Eine Computeranalyse zeigte, daß zwischen den Genen *fbfA* und *sspA* putative, kleine offene Leserahmen lokalisiert waren, welche jedoch keine signifikanten Shine-Dalgarno-Sequenzen oder Homologien zu bereits bekannten Proteinen aufwiesen. Auch in der stromabwärts-Region von *sspA* wurden offene Leserahmen mit diesen Charakteristika gefunden. Es lag die Vermutung nahe, daß Sequenzierfehler in diesen DNA-Bereichen vorhanden waren, die durch eine erneute Sequenzierung ausgeräumt werden sollten.

### 2.6.1 Sequenzierung von *fbfA*, *sspA* und der stromabwärts-Bereiche dieser Gene

Zur Sequenzierung der DNA-Region zwischen den Genen *fbfA* und *sspA* wurde ein 1.4 kbp *S. aurantiaca* DNA-Fragment mittels PCR unter Verwendung der Primer SMPCR 13 und SMPCR 14 aus chromosomaler DNA amplifiziert. Für die PCR wurde die Vent-DNA-Polymerase verwendet, da diese eine Korrekturlesefunktion besitzt. Die genannten Primer wurden so gewählt, daß 321 bp des *fbfA* Gens und die gesamte stromabwärts-Region bis zum *sspA* Gen enthalten waren. Das PCR-Fragment wurde mit den Enzymen *Spe* I und *Kpn* I restringiert und in den mit den selben Enzymen geschnittenen Klonierungsvektor pBC SK- eingesetzt. Das so entstandene Plasmid pSM20 wurde für die Sequenzierung des Inserts verwendet (Sequenz siehe Anhang). Aufgrund der Computeranalyse der neuen Sequenzdaten wurde ein weiterer offener Leserahmen stromabwärts von *fbfA* identifiziert, der als *fbfC* bezeichnet wurde. Das putative Startkodon von *fbfC* (ATG) überlappt mit dem Stopkodon von *fbfA*. Das Gen *fbfC* besitzt eine Länge von 1095 bp. Sein Stopkodon liegt 16 bp stromaufwärts des GTG Startkodons von *sspA* (Abb. 2.48).

Abbildung 2.48: Schematische Darstellung des *fbf* Genclusters des *S. aurantiaca* Wildtyps (DW4/3-1). Die beiden Gene *fbfB* und *fbfA* sind bezüglich ihrer Transkriptionsrichtung entgegengesetzt orientiert. Die Gene *fbfA*, *fbfC* und *fbfD* sind in einer Transkriptionsrichtung angeordnet. Das Stopkodon von *fbfA* überlappt mit dem Startkodon von *fbfC*. Zwischen den Genen *fbfC* und *fbfD* befinden sich 16 bp.

Auch das Gen *fbfA* wurde nochmals nachsequenziert. Dazu wurde mit den Primern SMPCR21 und SMPCR 22 ein 1544 bp DNA-Fragment aus chromosomaler DNA amplifiziert, welches das gesamte *fbfA* Gen sowie 303 bp seiner 5'-Region enthält. Das PCR-Fragment wurde mit den Enzymen *Eco* RI/*Spe* I restringiert und in den mit den

selben Enzymen geschnittenen Klonierungsvektor pBC SK+ (siehe Anhang) eingefügt. Das Insert dieses Plasmids, pSM24, wurde sequenziert. Die Analyse der Sequenzdaten zeigte, daß drei zusätzliche Basenpaare in der *fbfA*-Sequenz vorhanden sind und sich somit die Größe des Gens von 1243 auf 1246 bp verlängert. Der Leserahmen, sowie das Start- und Stopkodon blieben erhalten (siehe Anhang).

Für die Kontrollsequenzierung von *sspA* wurde Plasmid pBS4 verwendet, das ein ca. 6.1 kbp *S. aurantiaca* DNA-Fragment enthält, auf dem die stromabwärts-Region von *fbfA*, also *fbfC* (die ersten 26 bp fehlen) und *sspA* mit stromabwärts-Bereichen enthalten sind. Das komplette *sspA* Gen und ca. 500 bp der nachfolgenden DNA-Sequenz wurden sequenziert (siehe Anhang). Auch hier konnten mehrere Sequenzfehler aufgedeckt werden. Dadurch wurde der offene Leserahmen von *sspA* verschoben und auch vergrößert (von 999 bp auf 1113 bp). Dieser neue offene Leserahmen wurde *fbfD* statt *sspA* bezeichnet (Abb. 2.48).

## 2.6.2 Sequenzanalyse der Gene *fbfC* und *fbfD*

### Das Gen *fbfC*

Das 1095 bp lange *fbfC* Gen besitzt ein ATG-Startkodon, dem eine Shine-Dalgarno-Sequenz (GGAGGG) vorgelagert ist sowie ein Stopkodon mit der Sequenz TAA. Der Gehalt an G- oder C-Nukleotiden an der dritten Stelle in den Kodons der gesamten Sequenz beträgt ca. 83%. *FbfC* kodiert für ein putatives Protein mit 365 Aminosäuren (davon sind 141 hydrophobe Aminosäuren) und einem abgeleiteten Molekulargewicht von 40981. Mit Hilfe einer Datenbanksuche konnten keine signifikanten Homologien zu bereits bekannten Proteinen gefunden werden.

### Das Gen *fbfD*

*FbfD* besitzt eine Länge von 1113 bp, ein GTG-Startkodon mit vorgelagerter Shine-Dalgarno-Sequenz (AAGGAG) und ein TGA Stopkodon. Der Gehalt an G- oder C-Nukleotiden an der dritten Stelle in den Kodons der gesamten Sequenz beträgt ca. 88%. Das putative *FbfD*-Polypeptid besteht aus 370 Aminosäuren (151 hydrophobe Aminosäuren) und besitzt ein abgeleitetes Molekulargewicht von 40351. Die Datenbankanalyse zeigt eine Homologie (25 % identische Aminosäuren; Abb. 2.49) zu dem putativen ORF2 von *M. xanthus*, der sich stromaufwärts des *argE* Gens (*argE* kodiert für eine putative Acetylornithindeacetylase) befindet und dessen Genprodukt nicht in die Fruchtkörperbildung involviert ist (Harris und Singer, 1998).

Abbildung 2.49: Aminosäuresequenz-Vergleich des putativen FbfD-Polypeptids aus *S. aurantiaca* mit dem ORF2-Protein aus *M. xanthus*. Die Aminosäurenummern sind angegeben und identische Aminosäuren sind umrahmt.

## **2.7 Genetische Analyse des Bereiches stromabwärts von *fbfA***

Wie in Abbildung 2.48 dargestellt ist, überlappt das Stopkodon des Gens *fbfA* mit dem Startkodon von *fbfC*. Zwischen dem Stopkodon von *fbfC* und dem Startkodon von *fbfD* liegen lediglich 16 bp. Diese drei *fbf* Gene werden in eine Richtung transkribiert und liegen dicht gepackt beieinander. Aufgrund dieser Genanordnung lag die Vermutung nahe, daß auch die Gene *fbfC* und *fbfD* eine Rolle bei der Fruchtkörperbildung spielen könnten und vielleicht sogar in einem Operon arrangiert. Um nun die Beteiligung der

beiden neu entdeckten *fbf* Gene an der Bildung der Fruchtkörperstruktur zu untersuchen, wurde zunächst eine Kanamycin-Resistenz-Kassette in verschiedene Restriktionsschnittstellen stromabwärts von *fbfA*, also in *fbfC*, *fbfD* und auch stromabwärts von *fbfD* inseriert. Für dieses Vorhaben eigneten sich die singulären Restriktionsschnittstellen *Eco* RI und *Bgl* II, die 26 bp und 745 bp stromabwärts des *fbfC* Startkodons gelegen sind (Abb. 2.50). Zum anderen befindet sich eine *Fse* I Restriktionsschnittstelle 360 bp stromabwärts des *fbfD*-Startkodons, also direkt in der kodierenden Sequenz von *fbfD*. Zur Analyse der stromabwärts-Region des *fbfD* Gens eigneten sich die singulären Restriktionsschnittstellen *Pml* I, *Avr* II und *Cla* I, welche 521 bp, 3448 bp und 3572 bp stromabwärts des *fbfD* Stopkodons gelegen sind (Abb. 2.50).

Abbildung 2.50: Das *fbf* Gencluster von *S. aurantiaca*. Das *fbfC* Gen überlappt mit seinem Startkodon das Stopkodon von *fbfA* und enthält die beiden Restriktionsschnittstellen *Eco* RI und *Bgl* II. Das 16 bp stromabwärts des *fbfC* Stopkodons beginnende Gen *fbfD* enthält die singuläre Restriktionsschnittstelle *Fse* I. Stromabwärts des *fbfD* Gens befinden sich weitere Enzymschnittstellen (*Pml* I, *Avr* II und *Cla* I). Die Lage der verschiedenen Restriktionsschnittstellen ist in Bezug auf die Startkodons der verschiedenen *fbf* Gene in bp angegeben.

### **2.7.1 Insertion einer Kanamycin-Resistenz-Kassette in verschiedene Stellen des *fbfC* Gens; Konstruktion der Mutanten SM6 und SM7**

Wie in Abbildung 2.50 dargestellt ist, befinden sich in dem *fbfC* Gen zwei singuläre Schnittstellen, *Eco* RI und *Bgl* II, in die eine Kanamycin-Resistenz-Kassette eingefügt wurde, um die Beteiligung des Genproduktes an der Fruchtkörperbildung zu untersuchen.

Für die Konstruktion einer Mutante mit einem Antibiotika-Resistenz-Gen in der *Bgl* II-Schnittstelle, wurde das Plasmid pBS1 (Abb. 2.39 A) verwendet. Das Plasmid pBS1

wurde zu diesem Zweck mit dem Restriktionsenzym *Bgl* II linearisiert. Das zu klonierende Kanamycin-Resistenz-Gen wurde durch einen *Bam* HI-Verdau aus dem Klonierungsvektor pUC4KIXX (siehe Anhang) entfernt und in das linearisierte pBS1 Plasmid eingefügt. Das resultierende Plasmid wird als pSM9 bezeichnet (Abb. 2.51 A).

Abbildung 2.51: Schematische Darstellung des Plasmides pSM9 und des Genotyps der Mutante SM6. A) Plasmid pSM9 enthält eine Kanamycin-Resistenz-Kassette in der *Bgl* II-Restriktionsschnittstelle, die 745 bp stromabwärts des *fbfC* Startkodons gelegen ist. B) Darstellung des Genotyps der Mutante SM6 die nach Einführung des Plasmides pSM9 in das Genom des *S. aurantiaca* Wildtyps durch doppelte Rekombination entstand.

Das Antibiotika-Resistenz-Gen wurde auch in die *Eco* RI-Schnittstelle stromabwärts des *fbfA*-Stopkodons kloniert. Das Plasmid pBS1 besitzt jedoch zwei *Eco* RI-Schnittstellen. Daher wurde Plasmid pBS1 einem *Eco* RI-Partialverdau unterworfen. Die erhaltenen Fragmente wurden in einem low-melting Agarosegel aufgetrennt und das Fragment von ca. 18 kbp (pBS1 Gesamtgröße) isoliert. Die Kanamycin-Resistenz-Kassette wurde durch eine *Eco* RI-Restriktion aus dem Plasmid pUC4KIXX (siehe Anhang) gewonnen und in den linearisierten pBS1 Vektor kloniert. Aufgrund einer Restriktionsanalyse der aus den verschiedenen Transformanten isolierten Plasmide, konnte das Plasmid pSM10 identifiziert werden, welches die Resistenz-Kassette in der gewünschten *Eco* RI-Schnittstelle stromabwärts von *fbfA* enthielt (Abb. 2.52 A).

Abbildung 2.52: Darstellung des Plasmides pSM10 und des Genotyps der Mutante SM7. A) Das Plasmid pSM10 enthält die Kanamycin-Resistenz-Kassette in der *Eco* RI-Restriktionsschnitte, die 26 bp stromabwärts des *fbfC* Startkodons gelegen ist. B) Genotyp der Mutante SM7, die nach einem doppelten Rekombinationsereignis des Plasmids pSM10 mit dem Genom des Wildtyps (DW4/3-1) selektioniert werden konnte.

Beide Plasmide, pSM9 und pSM10, wurden durch das Enzym *Ase I* linearisiert und in dieser Form in den *S. aurantiaca* Wildtyp-Stamm durch Elektroporation überführt. Die Selektion der Transformanten erfolgte mit Kanamycinsulfat. In beiden Fällen sollten lediglich Transformanten nach einem doppelten Rekombinationsereignis identifiziert werden. Die Dot-Blot-Analyse wurde auch hier zur Vorselektion eingesetzt. Da das zur Klonierung verwendete Plasmid pBS1 ein pSUP102-Derivat (siehe Anhang) darstellt, eignete sich dieses als Sonde zur Identifikation von Transformanten die durch eine einfaches Rekombinationsereignis entstanden. So konnten die Mutanten SM6 (Kanamycin-Resistenz-Kassette in der *Bgl II*-Schnittstelle; Abb. 2.51 B) und SM7 (Resistenz-Kassette in der *Eco RI*-Schnittstelle; Abb. 2.52 B) identifiziert werden. Ihr Genotyp wurde in einer Southern-Analyse bestätigt, bei der das Kanamycin-Resistenz-Gen als Sonde Anwendung fand. Die chromosomale DNA von SM6 und des Wildtyps wurde dazu mit den Enzymen *Eco RI/Sal I* restringiert. Die Mutante zeigt im Gegensatz zum Wildtyp ein Signal bei ca. 7.5 und 0.9 kbp (Abb. 2.53 A). Im Fall der Mutante SM7 wurde die DNA und die des Wildtyps mit den Enzymen *Sal I/Xba I* restringiert. Die Mutante SM7 zeigt Signale bei ca. 7 und 5.4 kbp (Abb. 2.53 B).

Abbildung 2.53: Southern-Analyse der Mutanten SM6 und SM7 im Vergleich zum *S. aurantiaca* Wildtyp. Die Größe der Fragmente wurde anhand des DNA Molecular Weight Markers II (Roche Diagnostics) bestimmt (nicht dargestellt). A) Die genomische DNA der Mutante SM6 und des Wildtyps wurde mit den Enzymen *Eco RI/Sal I* restringiert. Als Sonde wurde das Kanamycin-Resistenz-Gen verwendet. Spur1: DNA der Mutante SM6; Spur 2: Wildtyp-DNA. B) Southern-Analyse der Mutante SM7 im Vergleich zum Wildtyp, bei der die chromosomale DNA jeweils mit den Ezymen *Sal I/Xba I* restringiert wurde. Als Sonde diente auch hier die Kanamycin-Resistenz-Kassette. Spur 1: SM7-DNA; Spur 2: Wildtyp-DNA.



### 2.7.1.1 Phänotyp-Analyse der Mutanten SM6 und SM7

Beide Mutanten SM6 und SM7 (Abb. 2.54 B und C) bilden unter Hungerbedingungen klumpige Aggregate aus. Da beide eine *fbfC*-Mutante darstellen, wurde nur SM6 in ein Mischexperiment mit der nichtaggregierenden Transposon-Mutante AP191 (Abb. 2.54 D) eingesetzt, bei dem die Zellen der beiden Mutanten vor dem Transfer auf das Hungermedium in einem Verhältnis von 1:2 und 1:3 gemischt wurden. Wie in Abbildung 2.54 E (Mischungsverhältnis 1:3) zu sehen ist, erfolgt keine phänotypische Komplementation. Der Phänotyp entspricht dem der Mutante SM6.

Beide Mutanten, SM6 und SM7, bilden unter dem Einfluß von Indol Sporen, die sich mikroskopisch nicht von denen des Wildtyps unterscheiden.

Auch die Keimfähigkeit der Sporen, die in den Fruchtkörperformen von SM6 und SM7 vorkommen, zeigt keinen Unterschied zu der der Wildtyp-Fruchtkörpersporen (siehe 4.2.1.6).

Abbildung 2.54: Fruchtkörperformen verschiedener *S. aurantiaca*-Stämme. A) *S. aurantiaca* Wildtyp; B) Mutante SM6; C) Mutante SM7; D) Transposon-Mutante AP191; E) Fruchtkörperstruktur aus dem Mischexperiment SM6 mit AP191 (Mischungsverhältnis 1:3).

## 2.7.2 Insertion einer Kanamycin-Resistenz-Kassette in das Gen *fbfD*; Konstruktion der Mutante SM8

Wie bereits erwähnt enthält das Gen *fbfD* in seiner kodierenden Sequenz eine singuläre Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Fse* I, die zur Konstruktion einer *fbfD*-Mutante diente. Dazu wurde das Plasmid pBS4, welches ein 6.1 kbp *Eco* RI/*Sal* I-DNA-Fragment von *S. aurantiaca* enthält, mit dem Enzym *Fse* I restringiert. Die 3'-Überhänge der entstandenen DNA mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase entfernt und eine 1.4 kbp große Kanamycin-Resistenz-Kassette (*Sma* I-Fragment aus Plasmid pUC4K1XX, siehe Anhang) wurde in den so restringierten und modifizierten Vektor kloniert. Dies führte zu dem Plasmid pSM11 (Abb. 2.55 A ).

Abbildung 2.55: Schematische Darstellung des Plasmides pSM11 und des Genotyps der Mutante SM8. A) Das Plasmid pSM11 enthält eine Kanamycin-Resistenz-Kassette in der *Fse* I-Restriktionsschnittstelle, die in dem *fbfD* Gen lokalisiert ist. B) Genotyp der *fbfD*-Mutante SM8, die durch doppelte Rekombination des Plasmides pSM11 in das Genom des Wildtyps erhalten wurde.

Dieses Plasmid wurde mit Restriktionsenzym *Ssp* I linearisiert und durch Elektroporation in den Wildtyp-Stamm von *S. aurantiaca* transferiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte mit Kanamycinsulfat. Die Identifikation von Mutanten mit einem doppelten Rekombinationsereignis erfolgte mittels Dot-Blot-Methode, bei der das Ursprungsplasmid der Klonierung (pBS4 ist ein pBS SK- Derivat) als Sonde diente. Mittels dieser Vorselektion konnte die Mutante SM8 (Abb. 2.55 B) identifiziert werden, deren Genotyp weiterhin durch eine Southern-Analyse bestätigt wurde. Die chromosomale DNA des Wildtyps und der Mutante SM8 wurden mit *Eco* RI/*Hind* III restringiert und das Kanamycin-Resistenz-Gen wurde als Sonde verwendet. Nur die Mutante zeigt ein Signal bei ca. 2.9 kbp (Abb. 2.56).

Abbildung 2.56: Southern-Analyse der Mutante SM8 im Vergleich zum *S. aurantiaca* Wildtyp. Die chromosomale DNA wurde mit den Enzymen *Eco* RI/*Hind* III restringiert, das Kanamycin-Resistenz-Gen diente als Sonde. Die Größe der Fragmente wurde anhand des DNA Molecular Weight Markers II (Roche Diagnostics) bestimmt (nicht dargestellt). Spur1: Wildtyp-DNA; Spur 2: DNA der Mutante SM8.

### 2.7.2.1 Phänotyp-Analyse der Mutante SM8

Die Mutante SM8 bildete nur klumpige Aggregate unter Hungerbedingungen (Abb. 2.57 B). In einem Mischexperiment, bei dem die Zellen dieser *fbfD*-Mutante mit den Zellen der nichtaggregierenden Mutante AP191 (Abb. 2.57 C) vor dem Hungern in einem Verhältnis von 1:2 und 1:3 gemischt wurden, kann keine phänotypische Komplementation erzielt werden (Abb. 2.57 D; Mischungsverhältnis 1:3).

Die Fähigkeit zur Bildung von Indol-induzierten Sporen aus vegetativen Zellen der Mutante SM8 erfolgte vergleichbar dem *S. aurantiaca* Wildtyp.

Eine Auskeimung der in den Aggregaten der Mutante SM8 vorhandenen Sporen zu Schwärmen vegetativer Zellen auf CY-Agar kann beobachtet werden (siehe 4.2.1.6).

Abbildung 2.57: Phänotypen verschiedener *S. aurantiaca*-Stämme. A) Wildtyp; B) Mutante SM8; C) Transposon-Mutante AP191; D) Fruchtkörperstruktur aus dem Mischexperiment SM8 mit AP191 (Mischungsverhältnis 1:3).

### **2.7.3 Insertion einer Kanamycin-Resistenz-Kassette in verschiedene DNA-Bereiche stromabwärts von *fbfD*; Konstruktion der Mutante SM16**

Aufgrund einer Computeranalyse konnten verschiedene offene Leserahmen stromabwärts des Gens *fbfD* identifiziert werden, die jedoch keine signifikanten Homologien zu bereits bekannten Proteinen zeigten. Dieser Bereich, der bereits kloniert vorlag, betrug ca. 4 kbp. Durch die Insertion einer Kanamycin-Resistenz-Kassette in verschiedene singuläre Restriktionsschnittstellen in diesem Bereich sollten putative Leserahmen identifiziert werden, die an der Fruchtkörperbildung beteiligt sind. Wie in Abbildung 2.50 dargestellt ist, eigneten sich lediglich die Restriktionsschnittstellen *Pml* I, *Avr* II und *Cla* I für dieses Vorhaben.

Das Plasmid pBS4, das ein ca. 6 kbp *Eco* RI/*Sal* I-DNA-Fragment von *S. aurantiaca* mit der stromabwärts-Region von *fbfD* enthält, wurde jeweils mit den Restriktionsenzymen *Pml* I, *Avr* II und *Cla* I geschnitten. Die durch die Restriktion mit den Enzymen *Avr* II und

*Cla* I entstanden 5'-Überhänge wurden aufgefüllt. Die Restriktion mit *Pml* I führte direkt zu glatten DNA-Enden. Eine Kanamycin-Resistenz-Kassette (*Sma* I Fragment aus pUC4K1XX, siehe Anhang) wurde in diesen auf verschiedene Arten linearisierten Klonierungsvektor pBS4 kloniert und führte zu den Plasmiden pSM36, pSM37 und pSM38 (Abb. 2.58).

Abbildung 2.58: Darstellung der Plasmide pSM36, pSM37 und pSM38. Plasmid pSM36 enthält das Kanamycin-Resistenz-Gen in der *Pml* I-Restriktionsschnittstelle (ca. 0.6 kbp stromabwärts des Stopkodons von *fbfD*), pSM37 enthält das Antibiotika-Resistenz-Gen in der *Cla* I-Schnittstelle (ca. 3.6 kbp stromabwärts des Stopkodons von *fbfD*) und in pSM38 ist es in der *Avr* II-Restriktionsschnittstelle (ca. 3.5 kbp stromabwärts des Stopkodons von *fbfD*) inseriert.

Wie in der Abbildung 2.58 dargestellt ist, enthält das Plasmid pSM36 die Antibiotika-Resistenz-Kassette in der *Pml* I-Schnittstelle, die 639 bp stromabwärts des *fbfD* Gens lokalisiert ist. Die Plasmide pSM37 und pSM38 enthalten die Kanamycin-Resistenz-Kassette in den *Cla* I- bzw. *Avr* II-Restriktionsschnittstellen von pBS4, die 3686 bzw. 3562 bp stromabwärts von *fbfD* gelegen sind. Die drei Plasmide wurden mit *Ssp* I linearisiert und durch Elektroporation in den *S. aurantiaca* Wildtyp transferiert. Die

Selektion der Transformanten erfolgte mit Kanamycinsulfat. Da lediglich Transformanten nach einem doppelten Rekombinationsereignis weiter analysiert werden sollten, wurde eine Dot-Blot-Analyse durchgeführt.

Abbildung 2.59: Schematische Darstellung des Genotyps der Mutante SM16. Plasmid pSM36 erzeugte durch doppelte Rekombination mit dem Wildtyp-Genom (DW4/3-1) die Mutante SM16, bei der ein Kanamycin-Resistenz-Gen ca. 0.6 kbp stromabwärts des *fbfD*-Stopkodons inseriert ist.

Als Sonde diente das Ursprungsplasmid der Klonierungen, pBS SK- (pBS4 ist ein pBS SK- Derivat). Nur im Falle einer einfachen Rekombination wäre hier ein Signal zu erwarten. Die zur Transformation eingesetzten Plasmide pSM37 und pSM38 führten nur zur Bildung von Transformaten mit einem einfachen Rekombinationsereignis. Für eine doppelte Rekombination sind demzufolge zu beiden Seiten des Antibiotika-Resistenz-Gens längere homologe Bereiche notwendig, die hier nicht vorlagen. In dem Plasmid pSM37 ist stromabwärts des Antibiotika-Resistenz-Gens nur ein homologer DNA-Bereich von ca. 0.3 kbp vorhanden. Stromaufwärts der Kanamycin-Resistenz-Kassette

in dem Plasmid pSM38 beträgt dieser homologe Bereich ca. 0.4 kbp. Es gibt keine Angaben über die notwendige Länge von homologen Bereichen, die für ein doppeltes Rekombinationsereignis ausreichen. Aufgrund der oben beschriebenen Daten müßten diese aber größer als 0.4 kbp sein. Die Transformation des Plasmids pSM36 hingegen ermöglichte die Selektion einer Mutante, SM16, nach doppeltem Rekombinationsereignis (Abb. 2.59). Der Genotyp von SM16 wurde durch eine Southern-Analyse bestätigt, bei der das Kanamycin-Resistenz-Gen als Sonde verwendet wurde. Die chromosomale DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco* RI/*Sal* I verdaut. Die DNA der Mutante SM16 zeigt ein Signal bei ca. 7.6 kbp während bei der Kontrolle des Wildtyps kein Signal detektiert wird (Abb. 2.60).

Abbildung 2.60: Southern-Analyse des Genotyps der Mutante SM16 im Vergleich zum *S. aurantiaca* Wildtyp. Die chromosomale DNA wurde jeweils mit den Enzymen *Eco* RI/*Sal* I restringiert, das Kanamycin-Resistenz-Gen diente als Sonde. Die Größe der Fragmente wurde anhand des DNA Molecular Weight Markers II (Roche Diagnostics) bestimmt (nicht dargestellt). Spur 1: Wildtyp-DNA; Spur 2: DNA der Mutante SM16.

### 2.7.3.1 Phänotyp-Analyse der Mutante SM16

Die Mutante SM16 bildet normale Wildtyp-Fruchtkörper aus (Abb. 2.61 B). Die Fähigkeit zur Bildung von Indol-induzierten Sporen weicht mikroskopisch nicht von der des Wildtyps ab. Die Fruchtkörper der Mutante SM16 bilden normale Fruchtkörpersporen, die die Fähigkeit besitzen zu Schwärmen vegetativer Zellen auszukeimen (siehe 4.2.1.6).

Abbildung 2.61: Fruchtkörperstrukturen der Mutante SM16 (B) im Vergleich zum *S. aurantiaca* Wildtyp.

## 2.8 Expression des *fbfC* Gens

Der Phänotyp der beiden *fbfC*-Mutanten SM6 und SM7 zeigt die Beteiligung des *fbfC*-Genproduktes an der Fruchtkörperbildung. Analog der Analyse der *fbfA*- und *fbfB*-Expression sollte die Expression des *fbfC* Gens in der Entwicklung untersucht werden. Eine Möglichkeit um die Expression von *fbfC* zu analysieren, stellt die RTPCR-Methode dar, mit der untersucht wurde, ob und zu welchem Zeitpunkt das Gen in unterschiedlichen *fbf*-Mutanten exprimiert wird. Weiter sollte die Expression von *fbfC* in merodiploiden Mutanten untersucht werden, die neben dem Wildtypgen ein 3'-verkürztes *fbfC* Gen enthalten, das mit dem promoterlosen  $\Delta trpA-lacZ$ -Konstrukt eine transkriptionelle Fusion bildet. Mit Hilfe solcher Konstrukte sollte die minimale stromaufwärts-Region von *fbfC* ermittelt werden.

### 2.8.1 Bestimmung des Zeitpunktes der *fbfC*-Expression in verschiedenen *fbf*-Mutanten und im Wildtyp durch RTPCR

Mit Hilfe der RTPCR sollte die *fbfC*-Expression im Wildtyp und in den Mutanten BS34 (*fbfB*-Mutante), BS14 (*fbfA*-Mutante), SM6 (*fbfC*-Mutante) und SM8 (*fbfD*-Mutante) unter verschiedenen physiologischen Bedingungen untersucht werden. Dazu wurde RNA aus vegetativen, Indol-behandelten Zellen und aus Zellen, welche unterschiedlich lange unter Hungerbedingungen inkubiert wurden, isoliert. Nur RNA, die nicht mit DNA verunreinigt war, wurde in die RTPCR eingesetzt. Die *fbfC*-spezifischen Primer *fbfC1* und *fbfC2* wurden verwendet, welche zur Bildung eines 360 bp *fbfC*-Fragmentes führen



sollten, wenn das *fbfC*-Transkript vorhanden ist. Die Primer hybridisieren stromaufwärts und stromabwärts der DNA-Region im *fbfC* Gen, in die die Kanamycin-Resistenz-Kassette bei der *fbfC*-Mutante SM6 inseriert war. Mutante SM6 diente somit als Kontrolle, da die Verwendung ihrer RNA in der RTPCR-Reaktion zu keinem Amplifikat führen kann. Zunächst wurde die Expression von *fbfC* in dem *S. aurantiaca* Wildtyp analysiert (Abb. 2.62).

Abbildung 2.62: RTPCR-Analyse der *fbfC*-Expression des *S. aurantiaca* Wildtyps während verschiedener Entwicklungsphasen. Die Amplifikatgröße wurde anhand der 100 bp ladder (Spur 1) bestimmt. Abkürzungen: V: vegetative Zellen; I: Indol-behandelte Zelle; FK: Fruchtkörper.

Wie in vegetativen Zellen war auch nach Indol-Behandlung ein sehr schwaches Signal zu sehen. Dagegen war in der Fruchtkörperbildung (von 4-40 h Hungern) stets ein starkes Signal vorhanden.

Abbildung 2.63: RTPCR-Analyse der *fbfC*-Expression in verschiedenen *fbf*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp: Wildtyp (WT), *fbfB*-Mutante (BS34), *fbfA*-Mutante (BS14), *fbfC*-Mutante (SM6) und *fbfD*-Mutante (SM8). Abkürzungen: V: vegetative Zellen; I: Indol-behandelte Zelle; FK: Fruchtkörper.

Abbildung 2.63 zeigt, daß die *fbfB*-Mutante BS34, die *fbfD*-Mutante SM8 und die *fbfA*-Mutante BS14 das *fbfC*-Transkript unter allen untersuchten Bedingungen bildet. In der *fbfC*-Mutante SM6 ließ sich das Transkript nicht nachweisen. Zur Bestätigung, daß es sich bei dem 360 bp großen DNA-Fragment auch um *fbfC* handelt, wurde das Amplifikat, welches unter Verwendung von Wildtyp-RNA (Fruchtkörper, 15 Stunden) entstanden war, kloniert. Dazu wurde der Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen) verwendet. Das Insert wurde sequenziert und die Sequenz stimmte mit der zu erwartenden *fbfC* Sequenz überein.

## 2.8.2 Bestimmung des Zeitpunktes der *fbfC*-Expression mittels eines transkriptionellen $\Delta trpA-lacZ$ -Fusionsgens

Zur Bestimmung des Zeitpunktes der *fbfC*-Expression und zur Identifikation der putativen Promotorregion von *fbfC* sollte das 3'-verkürzte Gen mit unterschiedlich großen stromaufwärts-Bereichen mit dem promoterlose  $\Delta trpA-lacZ$ -Fusionsgen verknüpft werden. Diese Konstrukte sollten zur Bildung von merodiploiden Mutanten eingesetzt werden.

### 2.8.2.1. Analyse des *fbfC*-Genstartes: Konstruktion der Mutante SM10

Wie bereits beschrieben, überlappen die Start- und Stop-Kodons der beiden Gene *fbfC* und *fbfA*. Der mit Hilfe einer Computeranalyse definierte Genstart von *fbfC*, dem eine Shine-Dalgarno-Sequenz vorgelagert ist, sollte mit Hilfe einer merodiploiden Mutante überprüft werden. Dazu wurde ein Teil des *fbfC* Gens (719 bp) aus dem Plasmid pBS1 (siehe Abb. 2.39 A) durch *Eco* RI/*Bgl* II-Restriktion gewonnen. Auf diesem Fragment fehlt der putative Start von *fbfC*, da die *Eco* RI-Schnittstelle 26 bp stromabwärts dessen lokalisiert ist. Die *Bgl* II-Schnittstelle befindet sich 745 bp stromabwärts des *fbfC*-Startkodons. Dieses 3'-und 5'-verkürzte *fbfC* DNA-Fragment (*Eco* RI/*Bgl* II) wurde mit einem 4.6 kbp *Bam* HI/*Sal* I  $\Delta trpA-lacZ$ -Kan<sup>r</sup>-Fragment in eine Ligation eingesetzt. Die Enzyme *Bam* HI und *Bgl* II bilden kompatible Enden, die in dieser Reaktion verknüpft wurden. Das Produkt dieser Ligationsreaktion wurde dann in eine weitere Ligation, bei der der *Eco* RI/*Sal* I-restringierte Klonierungsvektor pBC KS+ (siehe Anhang) zugesetzt wurde, eingesetzt. Das so konstruierte Plasmid pSM17 (Abb. 2.64 A) wurde durch Elektroporation in den *S. aurantiaca* Wildtyp eingeführt. Die Selektion der Transformanten erfolgte mit Kanamycinsulfat. Das komplette Plasmid sollte in diesem Fall durch einfache Rekombination in das Genom von *S. aurantiaca* integrieren.

Abbildung 2.64: Schematische Darstellung des Plasmides pSM17 und des Genotyps der Mutante SM10. A) Das Plasmid pSM17 enthält ein 3'- und 5'-verkürztes *fbfC* Gen fusioniert an das  $\Delta trpA-lacZ$ -Konstrukt sowie eine Kanamycin-Resistenz-Kassette zur Selektion. B) Die Mutante SM10 enthält in ihrem Genom zum einen das 3'-verkürzte *fbfC* Gen fusioniert an  $\Delta trpA-lacZ$  und zum anderen ein 5'-verkürztes *fbfC* Gen stromabwärts des integrierten Plasmides pSM17.

Der Genotyp der so konstruierten Mutante SM10 (Abb. 2.64 B) wurde in einer Southern-Analyse bestätigt. Die chromosomale DNA der Mutante SM10 und des Wildtyps wurde mit den Enzymen *Eco* RI/*Sal* I restringiert. Als Sonde diente das 719 bp große *Eco* RI/*Bgl* II-Fragment von *fbfC*. Der Wildtyp zeigt bei ca. 6.1 kbp ein Signal, die Mutante ein weiteres bei ca. 5.3 kbp (Abb. 2.65).

Abbildung 2.65: Southern-Analyse der Mutante SM10 im Vergleich zum *S. aurantiaca* Wildtyp. Die chromosomale DNA wurde mit den Enzymen *Eco* RI/*Sal* I restringiert und das *Eco* RI/*Bgl* II *fbfC*-DNA-Fragment diente als Sonde. Die Größe der Fragmente wurde anhand des DNA Molecular Weight Markers II (Roche Diagnostics) bestimmt (nicht dargestellt). Spur 1: Wildtyp-DNA; Spur 2: DNA der Mutante SM10.

### 2.8.2.2 Phänotyp-Analyse der Mutante SM10

Die Mutante SM10 (Abb. 2.66 B) bildet unter Hungerbedingungen eine klumpige Struktur und keine Fruchtkörper. Die Fähigkeit zur Bildung von Indol-induzierten Sporen und zur Auskeimung der in den Aggregaten vorhandenen Sporen zu Schwärmen vegetativer Zellen ist vorhanden. Es konnten keine Unterschiede zum *S. aurantiaca* Wildtyp festgestellt werden (siehe 4.2.1.6).

Abbildung 2.66: Die Phänotypen der Mutante SM10 (B) und des *S. aurantiaca* Wildtyps (A) unter Hungerbedingungen.

### 2.8.2.3 Untersuchungen zur Abhängigkeit der *fbfC*-Expression von *fbfA*; Konstruktion der Mutanten SM11 und SM18

Der Phänotyp der Mutante SM10 bestätigte, daß das *fbfC*-Startkodon vor der *Eco* RI-Restriktionsschnittstelle gelegen ist, da nur eine klumpige Fruchtkörperstruktur gebildet wird. Wie der Genotyp der Mutante SM10 verdeutlicht, liegt das *fbfC* Gen stromabwärts des Plasmids in einer 5'-verkürzter Form vor (siehe Abbildung 2.64 B). Ein anderer Grund für die Ausbildung des klumpigen Phänotyps könnte jedoch auch das Fehlen von *fbfA* stromabwärts des integrierten Plasmides sein. In diesem Fall wäre die *fbfC*-Expression von *fbfA* abhängig und beide Gene wären vermutlich Teil eines Operons. Um diese verschiedenen Möglichkeiten zu überprüfen, wurden merodiploide Mutanten konstruiert, die stromabwärts des integrierten Plasmids *fbfA*, *fbfC* und *fbfD* mit und ohne dem putativen *fbfA*-Promotor enthalten.

Abbildung 2.67: Schematische Darstellung des Plasmides pSM22 und des Genotyps der Mutante SM11. A) Plasmid pSM22: Das Gen *fbfA* mit seinem putativen Promotorbereich und das 3'-verkürzte *fbfC* Gen wurden an das  $\Delta trpA-lacZ$ -Konstrukt fusioniert. Das Plasmid enthält weiterhin eine Kanamycin-Resistenz-Kassette ( $Kan^r$ ) zur Selektion. B) Schematische Darstellung des Genotyps der merodiploiden Mutante SM11.

Für die Konstruktion solcher merodiploiden Mutanten wurde das Gen *fbfA* mit den Primer SMPCR 21 und SMPCR 26 amplifiziert. Dieses Amplifikat enthält das *fbfA*-Gen sowie 300 bp seiner 5'-Region und 28 bp seiner 3'-Region bis zur *Eco* RI-Schnittstelle. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Spe* I/*Eco* RI verdaut und in den mit diesen Enzymen geschnittenen Vektor pSM17 kloniert (siehe Abbildung 2.64), was Plasmid pSM22 ergab (Abb. 2.67 A). In einer weiteren PCR-Reaktion wurde das Gen *fbfA* unter Verwendung der Primer SMPCR 26 und SMPCR 36 amplifiziert. Dieses DNA-Fragment enthält das Gen *fbfA* ausgehend von seinem ATG-Startkodon bis zur *Eco* RI-Schnittstelle, die 28 bp stromabwärts seines Stopkodons lokalisiert ist. Dieses PCR-Produkt wurde mit den Enzymen *Spe* I/*Eco* RI restringiert und in den mit *Spe* I und *Eco* RI verdauten Vektor pSM17 kloniert (siehe Abbildung 2.64). Das entstandene Plasmid wird als pSM45 bezeichnet (Abb. 2.68 A).

Abbildung 2.68: Darstellung des Plasmides pSM45 und des Genotyps der Mutante SM18. A) Plasmid pSM45 enthält das Gen *fbfA* ohne dessen putative Promotorstruktur und das 3'-verkürzte *fbfC* Gen fusioniert an das  $\Delta trpA-lacZ$ -Konstrukt. Die Kanamycin-Resistenz-Kassette ( $Kan^r$ ) dient zur Selektion. B) Die merodiploide Mutante SM18.

Beide Plasmide, pSM22 und pSM45, wurden in den *S. aurantica* Wildtyp mit Hilfe der Elektroporations-Methode transferiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte mit Kanamycinsulfat. Die chromosomale DNA der selektionierten Mutanten SM11 (Abb. 2.67 B) und SM18 (Abb. 2.68 B) wurde mit den Enzymen *Spe* I/*Sal* I restringiert und in einer Southern-Analyse überprüft, bei der das *fbfA*-Gen als Sonde diente. Die Wildtyp-DNA zeigte jeweils ein Signal bei ca. 12 kbp, die Mutante SM11 hingegen bei ca. 10.5 und 7.6 kbp (Abb. 2.69 A). Die Mutante SM18 zeigte Signale bei ca. 10.5 und 7.3 kbp (Abb. 2.69 B).

Abbildung 2.69: Vergleichende Southern-Analyse der Mutanten SM11 und SM18 mit dem Wildtyp. Die chromosomale DNA wurde mit den Enzymen *Spe* I/*Sal* I restringiert. Als Sonde wurde das *fbfA* Gen verwendet. Die Größe der Fragmente wurde anhand des DNA Molecular Weight Markers II (Roche Diagnostics) bestimmt (nicht dargestellt). A) Spur 1: Wildtyp-DNA; Spur 2: DNA der Mutante SM11; B) Spur 1: Wildtyp-DNA; Spur 2: DNA der Mutante.

#### 2.8.2.4. Phänotyp-Analyse der Mutanten SM11 und SM18

Die Mutanten SM11 (Abb. 2.70 B) und SM18 (Abb. 2.70 C) bilden unter Hungerbedingungen Fruchtkörper aus, die in die Formvarianz der Wildtyp-Fruchtkörper einzuordnen ist. Die Expression von *fbfC* ist somit unabhängig von *fbfA*, da die Mutante SM18, bei der *fbfA* ohne Promotor stromabwärts des integrierten Plasmids fehlt, zur Bildung von Wildtyp-Fruchtkörpern fähig ist. Die Fähigkeit zur Bildung von Indol-induzierten Sporen und zur Auskeimung der in den Fruchtkörpern vorhandenen Sporen zu Schwärmen vegetativer Zellen ist analog dem Wildtyp vorhanden (siehe 4.2.1.6).

Abbildung 2.70: Fruchtkörperphänotypen der Mutanten SM11 (B) und SM18 (C) im Vergleich zum *S. aurantiaca* Wildtyp (A).

#### **2.8.2.5. Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Mutanten SM11 und SM18 im Verlauf der Fruchtkörperentwicklung**

Zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Mutanten SM11 und SM18 wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Zellen, Aggregate und Fruchtkörper geerntet. Gleichzeitig wurden vegetative Zellen aufgearbeitet.

Abbildung 2.71: Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in der Mutanten SM11 und SM18 während der Fruchtkörperbildung. Ein Anstieg der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ist bei beiden Mutanten nach ca. 8 h zu verzeichnen.



Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der verschiedenen Proteinpräparationen zeigte, daß nur eine geringe Aktivität in den vegetativen Zellen vorliegt. Unter Hungerbedingungen startet die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach ca. 8 Stunden und erreicht ihr Maximum bei ca. 40 Stunden (Abb. 2.71).

#### **2.8.2.6. Untersuchungen zur Promotorregion von *fbfC***

Die in Punkt 2.8.2.1 beschriebene merodiploide Mutante SM10 ist nicht fähig Wildtyp-Fruchtkörper zu bilden. Der Grund hierfür ist, daß das *fbfC* Gen stromabwärts des integrierten Plasmids in einer verkürzten Form vorliegt (siehe Abbildung 2.64 B). Die ersten 26 bp des *fbfC* Gens fehlen sowie die Promotorregion. Die Mutante SM18, bei der stromabwärts des integrierten Plasmids *fbfA* ohne Promotor vorhanden ist (siehe Abbildung 2.68 B) sowie *fbfC*, bildet normale Fruchtkörper (siehe Abbildung 2.70). Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, daß *fbfC* nicht zusammen mit *fbfA* exprimiert wird, was auch durch die RTPCR-Ergebnisse der *fbfA*-Mutante (BS14), in der *fbfC* normal exprimiert wird (siehe Abbildung 2.63), bestätigt wurde. Die *fbfA*-Mutante BS14 enthält eine Kanamycin-Resistenz-Kassette in dem *fbfA* Gen, 636 bp stromaufwärts des *fbfC*-Startkodons. Diese Mutante ist nur zur Bildung von klumpigen Aggregaten fähig, da das *fbfA* Gen nicht exprimiert wird. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, daß diese 636 bp vor dem *fbfC*-Startkodon für eine normale Expression des Gens ausreichen. Diese Region wurde nochmals verkürzt, um die putative Promotorregion von *fbfC* einschränken zu können.

Unter Verwendung der Primer SMPCR 26 und SMPCR 41 wurde ein 237 bp DNA-Fragment aus chromosomaler *S. aurantica* amplifiziert, welches 211 bp der stromaufwärts-Region von *fbfC* enthält und die ersten 26 bp (bis zur *Eco* RI-Schnittstelle) des *fbfC* Gens. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco* RI/*Spe* I verdaut und in den ebenfalls mit diesen Enzymen restringierten Vektor pSM17 kloniert (Abb. 2.64 A). Das so gebildete Plasmid pSM65 (Abb. 2.72 A) enthält also ein 3'-verkürztes *fbfC* Gen, welches an das promotorlose  $\Delta$ *trpA-lacZ*-Gen fusioniert ist und 211 bp der stromaufwärts-Region. Das Plasmid wurde in den Wildtyp-Stamm mittels Elektroporation überführt und die Selektion der Mutanten erfolgte mit Kanamycinsulfat.

Abbildung 2.72: Schematische Darstellung des Plasmides pSM65 sowie des Genotyps der konstruierten Mutante SM26. A) pSM65 enthält ein verkürztes *fbfC* Gen sowie 211 bp seiner stromaufwärts-Region Gen fusioniert an das  $\Delta trpA-lacZ$ -Kan<sup>r</sup>-Konstrukt. B) Genotyp der merodiploiden Mutante SM26.

Abbildung 2.73: Southern-Analyse der Mutante SM26 im Vergleich zum Wildtyp. Die chromosomale DNA wurde mit dem Enzym *SaI* I restringiert und die Kanamycin-Resistenz-Kassette diente als Sonde. Die Größe der Fragmente wurde anhand des DNA Molecular Weight Markers II (Roche Diagnostics) bestimmt (nicht dargestellt). Spur 1: Mutante SM26-DNA; Spur 2: Wildtyp-DNA.

Der Genotyp der durch einfache Rekombination gebildeten Mutante SM26 (Abb. 2.72 B) wurde in einer Southern-Analyse überprüft. Dazu wurde die chromosomale DNA des Wildtyps und der Mutante mit dem Enzym *SaI* I restringiert und die Kanamycin-Resistenz-Kassette diente als Sonde. Der Wildtyp zeigt kein Signal, die Mutante SM26 zeigt eines bei ca. 10.5 kbp (Abb. 2.73).

### 2.8.2.7 Phänotyp-Analyse der Mutante SM26

Die Mutante SM26 bildet unter Hungerbedingungen keine Wildtyp-Fruchtkörper aus. Sie kann lediglich klumpige Aggregate bilden (Abb. 2.74 B). Die Fähigkeit zur Bildung von Indol-induzierten Sporen und zur Auskeimung der in den Aggregaten enthaltenen Sporen zu Schwärmen vegetativer Zellen ist vorhanden (siehe 4.2.1.6).

Abbildung 2.74: Fruchtkörperphänotypen der Mutante SM26 (B) im Vergleich zum *S. aurantiaca* Wildtyp (A).

### 2.8.3 Bestimmung des Verlaufs der *fbfC*-Expression mittels eines transkriptionellen $\Delta trpA-lacZ$ -Fusionsgens in verschiedenen *fbf*-Mutanten

Der Verlauf der Expression von *fbfC* sollte zusätzlich in der *fbfA*- (BS14), *fbfB*- (BS34) und der *fbfD*- (SM8) Mutante analysiert werden, um eventuelle gegenseitige Einflüsse oder Abhängigkeiten der Genprodukte zu identifizieren. Dazu wurde das 3'-verkürzte *fbfC* Gen an das promotorlose  $\Delta trpA-lacZ$ -Fusionsgen angefügt. Dieses Konstrukt wurde dann ektopisch in die *attB* site der genannten Mutanten und des *S. aurantiaca* Wildtyps transferiert.



Abbildung 2.75: Schematische Darstellung des Plasmides pSM74 und der Konstruktion der *S. aurantiaca*-Mutanten SM27, SM28, SM29 und SM30. A) Plasmid pSM74 enthält das ca. 2.9 kbp große *attP* site Fragment des Myxophagen Mx8 für die ortsspezifische Rekombination sowie eine Tetracyclin-Resistenz-Kassette ( $Tc^r$ ) und eine Kanamycin-Resistenz-Kassette ( $Kan^r$ ) zur Selektion. Zusätzlich ist das 3'-verkürzte *fbfC* Gen vorhanden mit dem stromaufwärts gelegenen Gen *fbfA* und ca. 300 bp dessen 5'-Region. Die *fbf* Gene sind an das  $\Delta trpA-lacZ$ -Konstrukt fusioniert. B) Genotyp der Mutante SM27 (Wildtyp-Hintergrund). C) Die Mutante SM28 enthält das Konstrukt pSM74 in der *attB* site und stellt zusätzlich eine *fbfD*-Mutante dar. D) Die Mutante BS34, eine *fbfB*-Mutante, diente zur Konstruktion der Mutante SM29. In der Mutante BS34 ist das 3'-verkürzte *fbfB* Gen an das *pufBA*-Fragment (*BA*) von *Rhodobacter capsulatus* fusioniert. E) Mutante SM30 ist eine *fbfA*-Mutante (BS14), bei der das Plasmid pSM74 in die *attB* site durch ortsspezifische Rekombination inserierte.

Eine Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach unterschiedlichen Zeiten in der Fruchtkörperentwicklung sollte mögliche Wechselwirkungen oder Einflüsse der verschiedenen *fbf*-Genprodukte zeigen.

Zunächst wurde in das Plasmid pSM27, welches das ca. 2.9 kbp *attP* Fragment des Myxophagen Mx8 enthält, eine Tetracyclin-Resistenz-Kassette kloniert. Das entstandene Plasmid, pSM71, wurde mit den Enzymen *Xba* I/*Spe* I restringiert. Plasmid pSM22 (siehe Abbildung 2.67 A) wurde mit den Enzymen *Xba* I/*Xho* I geschnitten. Nach einer elektrophoretischen Auftrennung des Restriktionsgemisches wurde ein ca. 6.8 kbp DNA-Fragment isoliert. Dieses Fragment enthält das *fbfA* Gen, sowie 300 bp seiner stromaufwärts-Region und das 3'-verkürzte *fbfC* Gen, welches an das promotorlose  $\Delta trpA-lacZ-Kan^r$ -Konstrukt fusioniert ist. In einer Ligationsreaktion wurden zunächst die kompatiblen *Xba* I-Enden des 6.8 kbp DNA-Fragments und des mit *Xba* I/*Spe* I restringierten Vektors pSM71 zusammengesetzt. Nach einer Auffüllreaktionen der nicht kompatiblen Enden wurde einer weitere Ligationsreaktion durchgeführt, die zu Plasmid

pSM74 führte (Abb. 2.75 A). Plasmid pSM74 wurde durch Elektroporation in den *S. aurantiaca* Wildtyp und in die Mutanten BS14 (*fbfA*-Mutante), BS34 (*fbfB*-Mutante) und SM8 (*fbfD*-Mutante) transferiert (Abb. 2.75 B-E). Die Selektion erfolgte mit Oxitetracyclin (transformierter Wildtyp) oder mit Oxitetracyclin und Kanamycinsulfat in Kombination (transformierte Mutanten SM8, BS14 und BS34).

Plasmid pSM74 enthält das *attP* site Fragment und rekombiniert mit großer Wahrscheinlichkeit in die *attB* site des jeweiligen *S. aurantiaca*-Stammes. Es konnten so vier verschiedene Mutanten isoliert werden (Abb. 2.75 B-E), deren chromosomale DNA jeweils mit dem Enzym *Sal* I restringiert und in einer Southern-Analyse mit dem Kanamycin-Resistenz-Gen als Sonde analysiert wurde (Abb. 2.76 A-D). Als Kontrollen wurde der Wildtyp oder die zur Transformation eingesetzten Mutanten mitgeführt. Die Ergebnisse der Southern-Analyse ist nachfolgend tabellarisch dargestellt.

<u>Mutante</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Southern (Kan<sup>r</sup> als Sonde)</u>
SM27	DW4/3-1 mit pSM74 in der <i>attB</i> site	DW4/3-1: kein Signal SM27: Signal bei ca. 10.8 kbp
SM28	SM8 ( <i>fbfD</i> -Mutante) mit pSM74 in der <i>attB</i> site	SM8: Signal bei ca. 13.5 kbp SM28: Signale bei ca. 13.5 kbp und ca. 10.8 kbp
SM29	BS34 ( <i>fbfB</i> -Mutante) mit pSM74 in der <i>attB</i> site	BS34: Signal bei ca. 11.3 kbp SM29: Signale bei ca. 11.3 kbp und bei ca. 10.8 kbp
SM30	BS14 ( <i>fbfA</i> -Mutante) mit pSM74 in der <i>attB</i> site	BS14: Signal bei ca. 7.9 kbp und bei ca. 4.9 kbp SM30: Signale bei ca. 7.9 kbp ca. 4.9 und 10.8 kbp

Abbildung 2.76: Genomische Southern-Analyse der Mutanten SM27 (A), SM28 (B), SM29 (C) und SM30 (D). Die chromosomale DNA wurde mit dem Enzym *Sal I* restringiert und die Kanamycin-Resistenz-Kassette diente als Sonde. Die Größe der Fragmente wurde anhand des DNA Molecular Weight Markers II (Roche Diagnostics) bestimmt (nicht dargestellt). A) Spur 1: Wildtyp-DNA; Spur 2: Mutante SM27-DNA. B) Spur 1: *fbfD*-Mutante SM8-DNA; Spur 2: SM28-DNA; C) Spur 1: *fbfB*-Mutante BS34-DNA; Spur 2: SM29 -DNA; D) Spur 1: *fbfA*-Mutante BS14-DNA; Spur 2: SM30-DNA.

### 2.8.3.1 Phänotyp-Analyse der Mutanten SM27, SM28, SM29 und SM30

Die Mutante SM27, die das Plasmid pSM74 in der *attB* site des *S. aurantiaca* Wildtyps enthält, bildet unter Hungerbedingungen eine klumpige Struktur (Abb. 2.77 B). Mutante SM28, stellt eine *fbfD*-Mutante (SM8) dar mit pSM74 in der *attB* site und bildet, wie auch die *fbfD*-Mutante (SM8; siehe Abbildung 2.57 B), eine klumpige Struktur (Abb. 2.77 C). Die Mutanten SM29 und SM30 (Abb. 2.77 D und E) sind *fbfB*-(BS34) bzw. *fbfA*-(BS14) Mutanten mit dem Plasmid pSM74 in der *attB* site. Da die Mutanten BS34 und BS14 lediglich zur Bildung von Klumpen fähig sind, war auch hier keine andere Struktur zu erwarten

Abbildung 2.77: Die verschiedenen Fruchtkörperphänotypen der Mutanten SM27 (B), SM28 (C), SM29 (D) und SM30 (E) im Vergleich zum Wildtyp (A).

### **2.8.3.2 Analyse der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Mutanten SM27, SM28, SM29 und SM30 nach unterschiedlichen Zeiten während der Fruchtkörperbildung**

Zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den verschiedenen Mutanten wurden vegetative Zellen sowie Aggregate eines Fruchtkörpertests nach verschiedenen Zeiten gesammelt und aufgearbeitet. Die Analyse der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (Abb. 2.78) in der Mutante SM27 (pSM74 integriert in die *attB* site des *S. aurantiaca* Wildtyps) zeigt einen Anstieg der Aktivität nach ca. 8 h. Die Steilheit des Anstiegs ist aber im Vergleich zu den merodiploiden *fbfC*-Mutanten SM11 und SM18 (siehe Abbildung 2.71) deutlich schwächer. In der Mutante SM30 (pSM74 integriert in der *attB* site der *fbfA*-Mutante BS14) findet ein Anstieg der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach ca. 10 h statt. Auch hier ist der Anstieg der Aktivität deutlich vermindert. Betrachtet man den Verlauf der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Mutanten SM28 (pSM74 integriert in die *attB* site der



*fbfD*-Mutante SM8) und SM29 (pSM74 integriert in die *attB* site der *fbfB*-Mutante BS34) so ist ein steiler Anstieg der Aktivität nach ca. 8 h vorhanden, der sich bei der Mutante SM29 im Verlauf der Entwicklung stetig fortsetzt und bei der Mutante SM28 nach ca. 20 h ein Maximum erreicht. Im Vergleich zur Mutante SM27, in der die *fbfC*-Expression in der *attB* site des *S. aurantiaca* Wildtyps analysiert wurde, findet man bei den Mutanten SM28 (*fbfC*-Expression in der *fbfD*-Mutante) und SM29 (*fbfC*-Expression in der *fbfB*-Mutante) eine 4- und 3.5-fach höhere  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach ca. 20 h Hungern.

Abbildung 2.78: Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in der Mutanten SM27, SM28, SM29 und SM30 während der Fruchtkörperbildung.

## 2.9 Expression der Gene *fbfA* und *fbfB* im *S. aurantiaca* Wildtyp und in verschiedenen *fbf*-Mutanten

Analog der Expression von *fbfC* wurde die Expression der Gene *fbfA* und *fbfB* unter Verwendung der RTPCR-Methode in unterschiedlichen *fbf*-Mutanten (BS34, BS14, SM6 und SM8) untersucht.

### 2.9.1 Expression von *fbfA*

Zur Analyse der Expression von *fbfA* wurden die Primer *fbfA1* und *fbfA2* verwendet. Diese Primer wurden so gewählt, daß sie stromaufwärts und stromabwärts der Insertionsstelle der Kanamycin-Resistenz-Kassette in der *fbfA*-Mutante BS14 hybridisieren und unter Verwendung von Wildtyp-RNA zu einem Amplifikat von 390 bp führen. Mutante BS14 diente hier als Negativ-Kontrolle in der kein Amplifikat entstehen sollte. Für die RTPCR-Analyse wurde DNA-freie RNA von Wildtyp- und Mutanten-Zellen eingesetzt. Zunächst wurde die *fbfA*-Expression im *S. aurantiaca* Wildtyp-Stamm unter verschiedenen Entwicklungsbedingungen getestet (Abb. 2.79).

Abbildung 2.79: RTPCR-Analyse der *fbfA*-Expression des *S. aurantiaca* Wildtyps unter verschiedenen Entwicklungsbedingungen. Die Amplifikatgröße wurde anhand der 100 bp ladder (Spur: 1) bestimmt. Abkürzungen: V: vegetative Zellen; I: Indol-behandelte Zellen; FK: Fruchtkörper.

In vegetativen und in Indol-behandelten Zellen sind nur sehr schwache, *fbfA*-spezifische (390 bp Bande), Signale erkennbar. Nach verschiedenen Zeiten der Entwicklung unter Hungerbedingungen (4-30 Stunden) wird ein *fbfA*-spezifisches Signal bei 390 bp detektiert. In dem Zeitraum von 8-30 Stunden Hungern findet man ein zusätzliches Amplifikat bei ca. 250 bp, das auch während der Indol-Induktion gefunden wird. Das spezifische sowie das unspezifische Signal fehlen 40 Stunden nach Hungerbeginn. Beide Fragmente wurden isoliert und mit Hilfe des Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kits in den Vektor pCR-Blunt II-TOPO kloniert und sequenziert. Das 390 bp Fragment stimmte mit der zu erwartenden *fbfA*-Sequenz überein. Die Sequenz des kleineren Fragmentes wurde in einer Datenbank auf vorhandene Homologien untersucht. Das abgeleitete Polypeptid zeigt keine signifikanten Homologie zu bereits bekannten Proteinen. Die *fbfA*-Expression wurde auch in den Mutanten BS34 (*fbfB*-Mutante), BS14 (*fbfA*-Mutante), SM6 (*fbfC*-Mutante) und SM8 (*fbfD*-Mutante) analysiert. Dazu wurde RNA aus vegetativen bzw. Indol-behandelten Zellen (10 min) und Zellen, welche 15 Stunden unter Hungerbedingungen auf Wasseragar inkubiert wurden, isoliert (Abb. 2.80).

Abbildung 2.80: RTPCR-Analyse der *fbfA*-Expression in verschiedenen *fbf*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp: Wildtyp (WT), *fbfB*-Mutante (BS34), *fbfA*-Mutante (BS14), *fbfC*-Mutante (SM6) und *fbfD*-Mutante (SM8). Die Amplifikatgröße wurde anhand der 100 bp ladder (Spur: 1) bestimmt. Abkürzungen: V: vegetative Zellen; I: Indol-behandelte Zellen; FK: Fruchtkörper.

Als Produkte der RTPCR wurden mit der RNA aus der *fbfB*-Mutante BS34 die beide oben beschriebenen Fragmente unter allen analysierten Bedingungen gefunden. Die RTPCR-Analyse der RNA aus der *fbfA*-Mutante BS14 lieferte lediglich das kleinere unspezifische Fragment unter den untersuchten physiologischen Bedingungen. In der Mutante SM6 (*fbfC*-Mutante) können beide Amplifikate unter den untersuchten Bedingungen identifiziert werden. Letztendlich kann das unspezifische Fragment in der

*fbfD*-Mutante SM8 unter allen genannten Bedingungen nachgewiesen werden. Das *fbfA*-spezifische Fragment lag jeweils nur in sehr geringen Mengen vor.

### 2.9.2 Expression von *fbfB*

Die Expressions-Analyse von *fbfB* mittels der RTPCR wurde unter Verwendung der *fbfB*-spezifischen Primer *fbfB1* und *fbfB2* durchgeführt. Diese Primer wurden so ausgewählt, daß sie bei Verwendung von Wildtyp-RNA zu einem Amplifikat von 351 bp führen sollten. Nur RNA-Präparationen ohne DNA-Verunreinigung wurden verwendet. Zuerst erfolgte die Analyse der *fbfB*-Expression im *S. aurantiaca* Wildtyp unter verschiedenen Bedingungen. Wie in Abbildung 2.81 dargestellt ist, kann das *fbfB*-spezifische Fragment bei ca. 350 bp in vegetativen Zellen als schwaches Signal detektiert werden. Nach Indol-Behandlung findet man das Signal in noch schwächerer Form. Unter Hungerbedingungen kommt es zu einer verstärkten Bildung des *fbfB* Signals (4-20 h). Nach 30 Stunden Hungern ist das Signal jedoch nicht mehr vorhanden.

Abbildung 2.81: RTPCR-Analyse der *fbfB*-Expression des Wildtyps unter verschiedenen Bedingungen. Die Amplifikatgröße wurde anhand der 100 bp ladder (Spur: 1) bestimmt. Abkürzungen: V: vegetative Zellen; I: Indol-behandelte Zellen; FK: Fruchtkörper.

Die Analyse der *fbfB*-Expression wurde nicht in der *fbfB*-Mutante BS34 (merodiploid) durchgeführt, da bei dieser Mutante das *fbfB* Gen in einer 3'- und in einer 5'-verkürzten Form vorliegt (siehe Abb. 2.75 D). In der *fbfA*-Mutante BS14 kann eine dem Wildtyp vergleichbare *fbfB*-Expression nachgewiesen werden (Abb. 2.82). Auch in den Mutanten SM6 (*fbfC*-Mutante) und SM8 (*fbfD*-Mutante) konnte eine *fbfB*-Expression ähnlich der des Wildtyps nachgewiesen werden, die Signale waren jedoch allgemein schwächer. Das RTPCR-Fragment wurde isoliert und mit Hilfe des Zero Blunt TOPO

PCR Cloning Kits in den Vektor pCR-Blunt II-TOPO kloniert und sequenziert. Die *fbfB*-spezifischen Bande von 351 bp zeigte die erwartete Sequenz des *fbfB* Gens.

Abbildung 2.82: RTPCR-Analyse der *fbfB*-Expression in verschiedenen *fbf*-Mutanten und im *S. aurantiaca* Wildtyp: Wildtyp (WT), *fbfA*-Mutante (BS14), *fbfC*-Mutante (SM6) und *fbfD*-Mutante (SM8). Die Amplifikatgröße wurde anhand der 100 bp ladder (Spur: 1) bestimmt. Abkürzungen: V: vegetative Zellen; I: Indol-behandelte Zellen; FK: Fruchtkörper.

## 2.10 Expression des Gens *fbfD*

Die *fbfD*-Mutante SM8 (siehe Abbildung 2.55 B) konnte unter Bedingungen bei denen eine Fruchtkörperbildung stattfinden sollte, lediglich klumpige Aggregate bilden (siehe Abbildung 2.57 B). Dieser Phänotyp verdeutlicht die Beteiligung des *fbfD*-Genproduktes an der Fruchtkörperbildung. Wie bereits für die anderen *fbf* Gene dargestellt, kann die Expression von *fbfD* unter Entwicklungsbedingungen mit verschiedenen Methoden analysiert werden. Die RTPCR-Methode wurde unter Verwendung von *fbfD*-spezifischen Primern mit RNA aus Wildtyp- und verschiedenen *fbf*-Mutanten-Zellen durchgeführt. Weiterhin wurden merodiploide Mutanten konstruiert, bei denen das *fbfD* Gen 3'-verkürzt an das promotorlose  $\Delta trpA-lacZ$ -Fusionsgen angefügt war. Eine Analyse der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach unterschiedlichen Zeiten des Hungers sollte Aufschluß über die Expression dieses Gens geben können.

### 2.10.1 Bestimmung der Expression des *fbfD* Gens in verschiedenen *fbf*-Mutanten und im Wildtyp durch RTPCR

Für die RTPCR-Analyse wurde jeweils die RNA aus vegetativen bzw. Indol-behandelten Zellen und Zellen, welche unterschiedlich lange unter Hungerbedingungen inkubiert wurden, isoliert (Wildtyp und verschiedene *fbf*-Mutanten). Die Auswahl der Primer gestaltete sich bei der Analyse der *fbfD*-Expression schwierig, da ein sehr hoher GC-Gehalt vorhanden ist. Es wurden die RTPCR-Primer *fbfD1*, *fbfD2*, *fbfD3* und *fbfD4* (siehe Material und Methoden) verwendet, die in unterschiedlichen Bereichen des Gens hybridisieren und die Bedingungen für ideale RTPCR-Primer weitgehend erfüllen. Diese Primer wurden in unterschiedlichen Kombinationen verwendet, da *fbfD1* und *D4* "forward"-Primer und *fbfD2* und *fbfD3* "reverse"-Primer sind. Alle möglichen Primer-Kombinationen führten jedoch entweder zu keinem Amplifikat, zu einem mit unerwarteter Größe oder zu vielen verschiedenen, wobei keines die zu erwartende Größe besaß. Zur Kontrolle wurde die isolierte RNA mit den RTPCR-Primern *fbfA1* und *fbfA2* (siehe 2.9.1) analysiert und die bereits dargestellten Ergebnisse der *fbfA*-RTPCR waren reproduzierbar. Das *fbfD* Gen besitzt einen hohen GC-Gehalt, ca. 88 %, und viele repetitive Sequenzen. Die konstruierten Primer wurden auch in eine PCR mit chromosomaler DNA eingesetzt. Auch hier konnte entweder kein Amplifikat oder eines mit unerwarteter Größe erzielt werden. Daher wurde versucht, alternative Primer, *CD1* und *CD2*, einzusetzen. Primer *CD1* hybridisiert 128 bp vor dem Stop des *fbfC* Gens und *CD2* hybridisiert 109 bp stromabwärts des Startkodons von *fbfD*. Die Verwendung des Primerpaares *CD1* und *CD2* in der RTPCR führte zu dem erwarteten Amplifikat von ca. 254 bp.

Das DNA-Fragment wurde isoliert und mit Hilfe des Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kits in den Vektor pCR-Blunt II-TOPO kloniert und sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte, daß es sich dabei um die erwartete Sequenz handelte. Dieses Ergebnis beweist, daß die beiden Gene *fbfC* und *fbfD* zusammen transkribiert werden und daß die Primer *CD1* und *CD2* für eine RTPCR-Analyse verwendet werden können. Zunächst wurde die RNA aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Wildtyps analysiert. In Abbildung 2.83 ist das *fbfC/fbfD*-spezifische Amplifikat (254 bp) in vegetativen und Indol-behandelten Zellen nur als schwache Bande erkennbar. Unter Hungerbedingungen (4-40 h) ist das Amplifikat deutlich sichtbar.

Abbildung 2.83: Analyse der *fbfD*-Expression im Wildtyp unter verschiedenen Bedingungen durch RTPCR. Die Amplifikatgröße wurde anhand der 100 bp ladder (Spur: 1) bestimmt. Abkürzungen: V: vegetative Zellen; I: Indol-behandelte Zellen; FK: Fruchtkörper.

Die RNA aus verschiedenen *fbf*-Mutanten, BS34 (*fbfB*-Mutante), BS14 (*fbfA*-Mutante), SM6 (*fbfC*-Mutante) und SM8 (*fbfD*-Mutante) wurde einer RTPCR-Analyse unterworfen. In den Mutanten BS34 und BS14 erfolgte die Expression von *fbfD* analog der *fbfC*-Expression (Abb. 2.63). Das spezifische Fragment ist unter den getesteten Bedingungen immer sichtbar. In der *fbfC*-Mutante (SM6) ist kein Amplifikat vorhanden, was jedoch dadurch zustande kommt, daß die Primer stromabwärts der Insertionsstelle des Kanamycin-Resistenz-Gens dieser Mutante hybridisieren. In der *fbfD*-Mutante SM8 ist das Amplifikat sichtbar. Die Primer hybridisieren hier stromaufwärts der inserierten Kanamycin-Resistenz-Kassette (Abb. 2.84).

Abbildung 2.84: RTPCR-Analyse der *fbfD*-Expression in verschiedenen *fbf*-Mutanten und im Wildtyp: Wildtyp (WT), *fbfB*-Mutante (BS34), *fbfA*-Mutante (BS14), *fbfC*-Mutante (SM6) und *fbfD*-Mutante (SM8). Die Amplifikatgröße wurde anhand der 100 bp ladder (Spur: 1) bestimmt. Abkürzungen: V: vegetative Zellen; I: Indol-behandelte Zellen; FK: Fruchtkörper.

## 2.10.2 Bestimmung der *fbfD*-Expression mittels eines transkriptionellen $\Delta trpA$ -*lacZ*-Fusionsgens

Analog zur Analyse der *fbfC*-Expression sollte der Beginn und der zeitliche Verlauf der *fbfD*-Expression während der Entwicklung bestimmt werden. Das 3'-verkürzte *fbfD* Gen wurde dazu an das promotorlose  $\Delta trpA$ -*lacZ*-Genkonstrukt zur Bildung einer transkriptionellen Fusion gekoppelt. Mit Hilfe solcher Konstrukte, bei denen unterschiedlich große Bereiche der stromaufwärts-Region von *fbfD* vorhanden sind, konnten verschiedene merodiploide Mutanten konstruiert werden.

### 2.10.2.1 Konstruktion der Mutante SM14 und Bestimmung des Verlaufs der *fbfD*-Expression

Für die Konstruktion einer Mutante, die eine *fbfD*- $\Delta trpA$ -*lacZ*-Fusion enthält, wurde das Plasmid pSM16 verwendet (Abb. 2.85 A). Dieses Plasmid enthält ein 1460 bp *fbfC*/*fbfD*-DNA-Fragment, welches mittels der Primer SMPCR17 und SMPCR18 in einer PCR unter Verwendung chromosomaler *S. aurantiaca* Wildtyp-DNA amplifiziert wurde. Das *fbfC*/*fbfD*-Fragment enthält 1052 bp des *fbfC* Gens (die ersten 39 bp fehlen), 16 bp der intercistronischen Region der beiden *fbf* Gene und 393 bp des *fbfD* Gens. Dieses Amplifikat wurde als ein *Spe* I/*Eco* RI-Fragment in den Klonierungsvektor pBC SK- (siehe Anhang) eingefügt und diente auch der Sequenzierung der *fbfD* stromaufwärts-Region. Weiter enthält das Plasmid eine Kanamycin-Resistenz-Kassette zur Selektion und das  $\Delta trpA$ -*lacZ*-Fusionsgen. Das Plasmid pSM16 wurde mit den Enzymen *Kpn* I/*Fse* I verdaut und das ca. 7.9 kbp DNA-Fragment wurde nach elektrophoretischen Auftrennung der Restriktionsfragmente isoliert. Aus dem Plasmid pBS1, welches ein 12 kbp chromosomales DNA-Fragment mit den Genen *fbfB*, *fbfA*, *fbfC* und *fbfD* enthält (Abb. 2.39 A), wurde ein ca. 4.3 *Kpn* I/*Fse* I-Fragment gewonnen (enthält einen Teils des *fbfB* Gens, die Gene *fbfA* und *fbfC* sowie 340 bp von *fbfD*) und mit dem 7.9 kbp Fragment des Plasmids pSM16 ligiert. Dies führte zu Plasmid pSM31 (Abb. 2.85 A), in dem das verkürzte *fbfD* Gen und ca. 4 kbp seiner stromaufwärts-Region an das  $\Delta trpA$ -*lacZ*-Gen angefügt sind. Das Plasmid wurde zur Bildung einer merodiploiden Mutante in den *S. aurantiaca* Wildtyp durch Elektroporation transferiert.



Abbildung 2.85: Schematische Darstellung der Plasmide pSM16, pSM31 und des Genotyps der Mutante SM14. A) Konstruktion des Plasmides pSM31 unter Verwendung der Plasmide pSM16 und pBS1. B) Darstellung des Genotyps der merodiploiden Mutante SM14.

Die Transformanten wurden mit Kanamycinsulfat selektioniert. Der Genotyp der selektionierten Mutante SM14 (Abb. 2.85 B) wurde in einer Southern-Analyse überprüft, bei der die chromosomale DNA mit den Enzymen *Eco* RI/*Sa* I restringiert wurde und das *fbfD* Gen als Sonde diente. Der Wildtyp zeigt ein Signal bei ca. 6.2 kbp, die Mutante SM14 zwei Signale bei ca. 6.2 und 1.4 kbp (Abb. 2.86).

Abbildung 2.86: Southern-Analyse der Mutante SM14 im Vergleich zu dem *S. aurantiaca* Wildtyp. Die chromosomale DNA wurde mit den Enzymen *Eco* RI/*Sal* I restringiert, das *fbfD* Gen diente als Sonde. Die Größe der Fragmente wurde anhand des DNA Molecular Weight Markers II (Roche Diagnostics) bestimmt (nicht dargestellt). Spur 1: Wildtyp-DNA; Spur 2: DNA der Mutante SM14.

#### 2.10.2.2 Phänotyp-Analyse der Mutante SM14

Die Mutante SM14 wurde unter Hungerbedingungen auf Wasseragarplatten inkubiert. Die mikroskopische Analyse zeigte, daß diese Mutante zur Bildung von Wildtyp-Fruchtkörpern fähig ist (Abb. 2.87 B). Die Bildung von Indol-induzierten Sporen und die Auskeimung der in den Fruchtkörpern enthaltenen Sporen zu Schwärmen vegetativer Zellen verläuft analog dem Wildtyp (siehe 4.2.1.6).

Abbildung 2.87: SM14 Phänotyp (B) im Vergleich zu dem Wildtyp (A) unter Hungerbedingungen.

### 2.10.2.3 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Mutante SM14 im Verlauf der Fruchtkörperentwicklung

Vegetative Zellen sowie unterschiedliche Stadien der Entwicklung wurden analysiert. Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität zeigte, daß in vegetativen Zellen lediglich eine sehr geringe Aktivität vorhanden war. Im Verlauf der Fruchtkörperbildung steigt die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität an (Abb. 2.88).

Abbildung 2.88:  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Mutante SM14 im Verlauf der Fruchtkörperbildung unter Hungerbedingungen.

### 2.10.2.4 Untersuchungen zur Promotorregion von *fbfD*

Die Mutante SM14 bildet unter Hungerbedingungen Wildtyp-Fruchtkörper aus. Diese Mutante enthält stromabwärts des integrierten Plasmids pSM31 Teile des *fbfB* Gens, die Gene *fbfA*, *fbfC* und *fbfD*. Die RTPCR-Analyse (siehe 2.10.1) zeigt, daß die beiden Gene *fbfC* und *fbfD* zusammen transkribiert werden. In Abschnitt 2.8.2.3 konnte gezeigt werden, daß das Gen *fbfC* unabhängig von *fbfA* exprimiert wird. Dies wurde weiterhin durch die RTPCR-Analysen mit *fbfC*- und *fbfC/fbfD*-spezifischen Primern nachgewiesen, da in der *fbfA*-Mutante BS14 eine Expression detektiert werden konnte (siehe Abbildungen 2.63 und 2.84). Im folgenden Abschnitt werden verschiedene

merodiploide Mutanten beschrieben, die zur Analyse der Promotorregion konstruiert wurden.

Plasmid pSM31 (siehe Abb. 2.85 A) wurde mit dem Enzym *Pml* I geschnitten und nach einer elektrophoretischen Auftrennung wurde ein ca. 10 kbp langes DNA-Fragment isoliert und religiert. Dieses neue Plasmid, pSM47, enthält das Gen *fbfC* und 360 bp dessen stromaufwärts-Region sowie 340 bp von *fbfD* (Abb. 2.89 A). Weiterhin wurde das Plasmid pSM53 hergestellt, wobei auch das Plasmid pSM31 als Ausgangsplasmid diente (siehe Abb. 2.85 A). Das Plasmid pSM31 wurde mit den Enzymen *Fse* I/*Pin* AI restringiert. Das ca. 2.6 kbp große *Fse* I/*Pin* AI DNA-Fragment, welches 1050 bp des *fbfA* Gens, das Gen *fbfC* und 340 bp des *fbfD* Gens enthält, wurde isoliert. Plasmid pSM16 (siehe Abb. 2.85 A) wurde mit den Enzymen *Fse* I/*Xba* I verdaut und das ca. 8 kbp lange Fragment nach einer elektrophoretische Trennung aufgereinigt. Das ca. 2.6 kbp DNA-Fragment aus pSM31 wurde in das so restringierten Plasmid pSM16 durch eine "sticky end/blunt end"-Ligation eingefügt (Abb. 2.89 B). Die Plasmide pSM 47 und pSM53 enthalten das promotorlose  $\Delta trpA$ -*lacZ*-Fusionsgen und eine Kanamycin-Resistenz-Kassette zur Selektion. Das 3'-verkürzte *fbfD* Gen ist an das  $\Delta trpA$ -*lacZ*-Konstrukt fusioniert. Stromaufwärts von *fbfD* sind in den Plasmiden unterschiedlich große *Stigmatella* DNA-Bereiche vorhanden. pSM47 enthält stromaufwärts des verkürzten *fbfD* Gen die komplette kodierende Sequenz von *fbfC* und 360 bp dessen stromaufwärts-Region. Plasmid pSM53 enthält stromaufwärts des verkürzten *fbfD* Gens das *fbfC* Gen und ca. 1 kbp dessen stromaufwärts-Region.

Beide Plasmide wurden in den *S. aurantiaca* Wildtyp durch Elektroporation transferiert, die Selektion der Transformanten erfolgte mit Kanamycinsulfat. Die Genotypen der beiden Mutanten SM 21 (Plasmid pSM47 integriert; Abb. 2.89 A) und SM22 (Plasmid pSM53 integriert; Abb. 2.89 B) wurden in einer Southern-Analyse untersucht. Die chromosomale DNA der Mutante SM21 und die des Wildtyps wurde mit den Enzymen *Eco* RI/*Sa* I restringiert, die Kanamycin-Resistenz-Kassette diente als Sonde. Während bei dem Wildtyp kein Signal zu erkennen ist, zeigt die Mutante SM21 ein Signal bei ca. 4.6 kbp (Abb. 2.90 A). Die chromosomale DNA der Mutante SM22 und des Wildtyps wurde auch mit den Enzymen *Eco* RI/*Sa* I geschnitten, wobei das *fbfA* Gen als Sonde verwendet wurde. Der Wildtyp zeigt ein Signal bei ca. 5.2 kbp, bei Mutante SM22 sind zwei Signale von ca. 5.2 und 4.6 kbp zu erkennen (Abb. 2.90 B).

Abbildung 2.89: Schematische Darstellung der konstruierten Plasmide pSM47 und pSM53 sowie der Genotypen der Mutanten SM21 und SM22. A) Das Plasmid pSM47 enthält das Gen *fbfC* und 360 bp seiner 5'-Region. Zusätzlich ist das 3'-verkürzte *fbfD* Gen an das  $\Delta trpA-lacZ$ -Indikatorgen fusioniert. Die Kanamycin-Resistenz-Kassette ( $Kan^r$ ) dient der Selektion. Genotyp der Mutante SM21. B) pSM53 enthält analog zu Plasmid pSM47 das 3'-verkürzte *fbfD* Gen fusioniert an  $\Delta trpA-lacZ$  sowie *fbfC* und ca. 1 kbp dessen 5'-Region. Dargestellt ist weiterhin der Genotyp der Mutante SM22.

Abbildung 2.90: Die beiden Mutanten SM21 und SM22 in einer genomischen Southern-Analyse. Die chromosomale DNA der Mutanten und des Wildtyps wurde mit den Enzymen *Eco* RI/*Sa* I restringiert, die Kanamycin-Resistenz-Kassette diente als Sonde. A) Spur 1: DW4/3-1-DNA; Spur 2) Mutante SM21-DNA; B) Spur 1: Wildtyp-DNA; Spur 2: Mutante SM22-DNA.

#### 2.10.2.5 Phänotyp-Analyse der Mutanten SM21 und SM22

Die beiden merodiploiden Mutanten SM21 und SM22 bilden nur unstrukturierte Aggregate (Abb. 2.91 A, B). Die Fähigkeit zur Bildung von Indol-induzierten Sporen und zur Auskeimung der in den Aggregaten enthaltenen Sporen zu Schwärmen vegetativer Zellen ist vorhanden (siehe 4.2.1.6).

Abbildung 2.91: Die Phänotypen der Mutanten SM21 (B) und SM22 (C) im Vergleich zum Wildtyp (A) unter Hungerbedingungen.

### 3. Diskussion

#### Teil I: Klonierung und Charakterisierung der *attB* site von *S. aurantiaca*

##### 3.1 Lokalisation der *attB* site im Genom von *S. aurantiaca*

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß Plasmide, welche ein DNA-Fragment des Myxophagen Mx8 mit dem Integrase kodierenden Gen *intP* enthalten, in das Genom von *S. aurantiaca* über ortsspezifische Rekombination integrieren können (Shen, 1999). Die *attB* site sollte im Genom nachgewiesen werden. Dazu eignete sich die Methode der Southern-Analyse. Die chromosomale DNA des *S. aurantiaca* Wildtyps (DW4/3-1) und die des *M. xanthus* Wildtyps (DK1622) wurde mit dem Enzym *Bam* HI restringiert und es wurden verschiedene Sonden eingesetzt. Ein DNA-Fragment des Myxobakteriums *M. xanthus* wurde mit Hilfe der PCR-Methode amplifiziert, welches die beiden *attB* sites, *attB1* und *attB2*, die beide in der 3'-Region von tRNA<sup>Asp</sup> Genen (*trnD1* und *trnD2*) lokalisiert sind und die hoch konservierte 17 bp core-Sequenz für die ortsspezifische Rekombination enthalten. Zusätzlich befindet sich auf diesem DNA-Fragment das *trnV1* Gen kodierend für eine tRNA mit Spezifität für Valin. Es konnten keine weiteren offenen Leserahmen auf diesem DNA-Fragment lokalisiert werden. Mit dieser Sonde werden bei *M. xanthus* DNA zwei Signale bei ca. 15 und 4.5 kbp identifiziert. Bei *S. aurantiaca* ist nur ein Signal bei ca. 4 kbp zu erkennen (Abb. 2.1 A). Die beiden *attB* sites von *M. xanthus*, welche in der 3'-Region der beiden tRNA<sup>Asp</sup> Genen gelegen sind, konnten bereits auf einem ca. 4.4 kbp großen *Bam* HI DNA-Fragment identifiziert werden (Tojo et al., 1996). Bei dem ca. 15 kbp großen Fragment von *M. xanthus* könnte es sich um ein DNA-Fragment handeln, auf dem weitere *trnD* und/oder *trnV* Gene lokalisiert sind. Andererseits könnte mit der Sonde eine weitere core-Sequenz identifiziert werden, die vermutlich einige Abweichungen in der Basensequenz aufweist. Die Vermutung, es handle sich um eine weitere core-Sequenz mit einer veränderten Basenzusammensetzung basiert darauf, daß die Integration des Phagen Mx8 oder von Plasmiden lediglich in einen chromosomalen Locus erfolgt (Tojo et al., 1996).

Die Verwendung einer 29 bp großen (synthetischen) ssDNA-Sonde (Bio-*attB*) erzeugt ein verändertes Ergebnis bei beiden Organismen. Diese Sonde enthält den hoch konservierten Bereich der core-Sequenz, welcher aus einer 7 bp asymmetrischen Sequenz besteht, die auf beiden Seiten von symmetrischen Sequenzen (5 bp) flankiert ist. Diese DNA-Sequenz kommt in der *attP* site des Myxophagen Mx8 sowie in den beiden *attB* sites von *M. xanthus* vor. Zusätzlich zu diesen 17 bp waren 12 weitere Basen vorhanden, die in dem Integrase kodierenden Gen *intP* und in dem *trnD1* Gen vorkommen (Abb. 2.2). Bei *M. xanthus* und *S. aurantiaca* konnten die beiden Signale von ca. 4.5 und 4 kbp identifiziert werden, welche mit dem *attB* *M. xanthus* DNA-Fragment erkannt wurden. Zusätzlich wird bei *M. xanthus* ein Fragment von ca. 20 kbp sichtbar. Auch hier kann man vermuten, daß es sich entweder um eine weitere, modifizierte core-Sequenz handelt oder um eine tRNA mit Spezifität für Asparaginsäure. Bei *S. aurantiaca* wird zusätzlich ein Signal bei ca. 3.5 kbp erkannt, welches aber nicht zugeordnet werden konnte. Da das ca. 4 kbp DNA-Fragment bei *S. aurantiaca* von beiden Sonden erkannt wird, kann vermutet werden, daß die *attB* site auf einem *Bam* HI Fragment dieser Größe im Chromosom lokalisiert ist.

### **3.2 Ortsspezifische Integration von Plasmiden in die *attB* site von *S. aurantiaca* und die Auswirkung auf die Fruchtkörperbildung**

Wie bereits beschrieben integrieren Plasmide, die das *IntP* kodierende Gen des Myxophagen Mx8 enthalten, immer in eine bestimmte Stelle des Genoms von *S. aurantiaca*. Hui Shen konnte dies in ihrer Doktorarbeit durch Southern-Analysen verschiedener Mutanten zeigen, in denen das Plasmid pSH8 (Abb. 2.3 A) integriert in der *attB* site von *S. aurantiaca* vorlag (Shen, 1999). Der Phänotyp dieser Mutanten war jedoch im Rahmen der Doktorarbeit von Hui Shen nicht untersucht worden. Um die Veränderungen des Phänotyps in Abhängigkeit von der Plasmidintegration zu untersuchen, wurde das Plasmid pSH8, welches ein ca. 5.5 kbp Mx8 DNA-Fragment enthält, für die Transformation des *S. aurantiaca* Wildtyps verwendet. Das ca. 5.5 kbp große DNA-Fragment des Myxophagen Mx8 (Abb. 2.3 C) enthält neben dem Integrase kodierenden Gen *intP* das *uoi* Gen (kodierend für eine putative Excisionase), welches mit dem *intP* Gen überlappt und dessen putative Promotorregion enthält. Zusätzlich sind 5 weitere offene Leserahmen mit unbekanntem Funktionen vorhanden. Sie weisen



keine Homologien zu bereits bekannten Proteinen auf (Salmi et al., 1998). Aufgrund der ortsspezifischen Rekombination des Plasmids pSH8 entstand Mutante SM4 (Abb. 2.3 B). Bei der Integration entstanden die beiden Wirts-Phagen-Verbindungen *attL* und *attR*. Die Southern-Analyse der Mutante SM4 bestätigte die Ergebnisse von Hui Shen: Die Rekombination erfolgte im identischen Genort. Die Mutante SM4 (Abb. 2.5 B) bildet jedoch unter Hungerbedingungen einen heterogenen Phänotyp aus, welcher aus Aggregaten sowie aus morchel- und champignonartigen Strukturen besteht, die auch in der Wildtyp-Fruchtkörperbildung als Zwischenformen nach ca. 12 und 15 Stunden auftreten (White, 1993). Dieses Ergebnis zeigt, daß die Fruchtkörperentwicklung durch die ortsspezifische Integration von Plasmiden in den *attB* Locus von *S. aurantiaca* beeinflusst wird. Der heterogene Phänotyp verdeutlicht, daß die Bildung von Zwischenformen der Entwicklung von Fruchtkörpern zwar möglich ist, daß die Entwicklung aber unkoordiniert zu verlaufen scheint. Eine Inkubation der Mutante SM4 auf Wasseragarplatten mit dem Substrat für  $\beta$ -Galaktosidase X-Gal führte überwiegend zu einer champignonartigen Struktur (Abb. 2.5 C). Dieser Versuch wurde durchgeführt, da das Plasmid pSH8 (Abb. 2.3 A) auch das promotorlose  $\Delta trpA-lacZ$ -Fusionsgen enthält. Eine mögliche Erklärung für die überwiegende Bildung dieser Art von Zwischenform könnte sein, daß die Entwicklung in Gegenwart von X-Gal verlangsamt abläuft und somit eine spezifische Strukturbildung mit größerer Häufigkeit erfolgen kann. Weiter zeigt das Mischexperiment der Mutante SM4 mit dem *S. aurantiaca* Wildtyp, bei dem die beiden Zelltypen vor dem Transfer auf das Hungermedium in verschiedenen Verhältnissen gemischt wurden, nur die Bildung von Fruchtkörperzwischenformen (Abb. 2.5 D). Beide "pilzartigen" Strukturen (Morchel und Champignon) sind erkennbar. Gefolgert werden kann, daß die Zellen der Mutante SM4 die Wildtyp-Zellen in ihrer Entwicklung hemmen, da keine Fruchtkörper mit Wildtyp-Struktur sichtbar sind und es sich um einen multizellulären Prozess handelt. Die Mutante SM4 wurde allerdings partiell phänotypisch komplementiert, weil vermehrt Morchel- und Champignonstrukturen auftreten. Solche Phänomene sind auch für das Myxobakterium *M. xanthus* beschrieben (McVittie et al., 1962).

Zunächst wurde vermutet, daß der heterogene Phänotyp der Mutante SM4 durch die Genprodukte der putativen offenen Leserahmen des ca. 5.5 kbp großen Mx8 DNA-Fragmentes (Abb. 2.3 C) verursacht sein könnte. Weder die Genprodukte noch deren Funktion sind bekannt. Für die ortsspezifische Rekombination von *M. xanthus* ist ein 2.9 bzw. 2.2 kbp DNA-Fragment des Myxophagen Mx8 ausreichend (Tojo et al., 1996; Salmi et al., 1998). Daher wurde im Rahmen der Arbeit das 2.9 kbp große Mx8 DNA-

Fragment mittels PCR amplifiziert und kloniert. Der Vektor pSM28 (Abb. 2.6 A), der dieses Fragment enthält, mit dem ca. 1.6 kbp großen *intP* Gen, dem ca. 0.2 kbp großen *uoi* Gen sowie Teilen des putativen ORF 10 (Abb. 2.12 A), wurde in den *S. aurantiaca* Wildtyp-Stamm transferiert. Die selektionierte Mutante SM12 (Abb. 2.6 B), die die beiden Wirts-Phagen-Verbindungen *attL* und *attR* enthält, sowie das integrierte Plasmid pSM28, wurde genauer analysiert. Durch eine Southern-Analyse konnte bestätigt werden, daß die ortsspezifische Integration in einen definierten Bereich des *S. aurantiaca* Genoms erfolgt. Weiter wurde der Phänotyp der Mutante SM12 auf Hungermedium analysiert. Wie die Mutante SM4 (Abb. 2.5 B) bildet SM12 einen heterogenen Phänotyp aus (Abb. 2.8 B) bei dem klumpige Aggregate aber auch die Morchel- und Champignonstrukturen sichtbar sind. Daher sollten die offenen Leserahmen mit unbekannter Funktion auf dem ca. 5.5 kbp großen Mx8 DNA-Fragment des Plasmids pSH8 nicht für die Bildung dieser heterogenen Phänotypstruktur der Mutante SM4 verantwortlich sein. Diese Leserahmen kommen nicht auf dem verwendeten Mx8 DNA-Fragment des Plasmids pSM28 vor. Das mit der Mutante SM12 durchgeführte Mischexperiment mit Zellen des Wildtyps vor dem Transfer auf das Hungermedium führte wie bei der Mutante SM4 zu einer partiellen phänotypischen Komplementation. Es bildeten sich Aggregate mit Sporangiole, die aber keine Wildtyp-Fruchtkörperstruktur darstellen (Abb. 2.8 C). Das heißt, die ortsspezifische Integration beeinflußt die Fruchtkörperbildung und die Mutante SM12 hemmt die Ausbildung der typischen Fruchtkörperstruktur des Wildtyps da es sich um einen multizellulären Prozess handelt. Beide Stämme, SM4 und SM12, bilden wie der Wildtyp Indol-induzierte Sporen. Die in den heterogenen Fruchtkörperformen vorhandenen Sporen der Mutanten SM4 und SM12 keimen auf geeignetem Medium zu vegetativen Zellen aus und bilden Schwärme. Eine Veränderung der Lebensfähigkeit der Sporen bei diesem heterogenen Phänotyp ist nicht zu beobachten. Doch können keine Aussagen über die Sporenquantität gemacht werden.

### **3.3 Klonierung der Wirts-Phagen-Verbindungen *attL* und *attR* der *S. aurantiaca* Mutante SM12**

Wie unter Punkt 3.1 beschrieben, ist die Wahl einer geeigneten Sonde zur Detektion der *S. aurantiaca attB* site im Genom durch eine Southern-Analyse schwierig. Die verwendeten Sonden enthielten zwar beide die hoch konservierte core-Sequenz der *attB* site von *M. xanthus* und des Myxophagen Mx8 und es war anzunehmen, daß die

core-Sequenz auch hoch konserviert in *S. aurantiaca* vorkommt. Doch enthalten sie auch Sequenzen oder Teilsequenzen von tRNA Genen. Bisher ist die Anzahl und Verteilung von tRNA Genen im *S. aurantiaca* Genom ungeklärt. Zur Klonierung der *attB* site von *S. aurantiaca* bieten sich folgende Möglichkeiten an. Mit den oben beschriebenen Sonden ließe sich eine Phagen-Bank mit chromosomaler *S. aurantiaca* DNA durchmustern. Weiter könnte versucht werden, das in den beiden Southern-Analysen detektierte (Abb. 2.1 A, B) ca. 4 kbp große Fragment chromosomaler DNA zu klonieren. Da beide Mutanten SM4 und SM12 einen heterogenen Phänotyp bilden, ist davon auszugehen, daß durch die ortsspezifische Integration der Plasmide pSH8 und pSM28 eine Veränderung im Genom erfolgt, die diesen Phänotyp zur Folge hat. Daher erschien es sinnvoll die beiden Wirts-Phagen-Verbindungen der Mutante SM12 (Abb. 2.6 B) zu klonieren und zu sequenzieren. In Abbildung 2.9 ist der Genotyp der Mutante SM12 mit allen bekannten Restriktionsschnittstellen dargestellt. Da keine Informationen über Restriktionsschnittstellen in den angrenzenden chromosomalen Bereichen der beiden Wirts-Phagen-Verbindungen vorhanden waren, wurden Enzyme verwendet, die in der Sequenz des Plasmids pSM28 nur singular vorkommen. Die chromosomale DNA der Mutante SM12 wurde daher mit den Enzymen *Bam* HI, *Cla* I, *Xba* I, *Spe* I und *Kpn* I restringiert und in eine Religation eingesetzt. Nach Transformation von *E. coli* wurden Transformanten selektioniert, die die Fähigkeit besitzen auf einem Kulturmedium mit den Antibiotika Kanamycinsulfat und Chloramphenicol zu wachsen. Wachstum ist nur möglich, wenn der Replikationsursprung des Plasmids pSM28 (ColE1) vorhanden ist. Lediglich die Restriktion mit den Enzymen *Xba* I oder *Kpn* I und nachfolgende Ligation führte zu Transformanten unter den genannten Selektionsbedingungen. So konnten die zwei Plasmide isoliert werden von denen das eine, pSM48 die *attR* site enthält, das andere, pSM49 die *attL* site (Abb. 2. 9). Die Plasmide wurden durch Restriktion und in einer Southern-Analyse (Abb. 2.10 und 2.11) genauer untersucht. Das Plasmid mit der *attR* site der Mutante SM12 (pSM48) konnte durch Restriktion mit den Enzymen *Xba* I und *Kpn* I in zwei ca. 5 und 3 kbp große DNA-Fragment zerlegt werden. Mit Hilfe des ca. 2.9 kbp großen Mx8 DNA-Fragmentes wurde die *attR* site auf dem ca. 3 kbp großen DNA-Fragment lokalisiert. Die Restriktion des Plasmids pSM49 mit den Enzymen *Xba* I und *Cla* I führte zu zwei ca. 5 und 7 kbp großen DNA-Fragmenten. Die *attL* site konnte in einer Southern-Analyse mit der oben beschriebenen Sonde auf dem ca. 7 kbp großen Fragment detektiert wurde (Abb. 2.10 und 2.11).

Die ortsspezifische Rekombination findet an definierten Stellen statt, die im Vergleich zur homologen Rekombination nur aus kurzen, identischen Sequenzen bestehen, den

core-Sequenzen. Diese Art der Rekombination ist unabhängig von der homologen Rekombinationsmaschinerie, es findet kein DNA-Verlust und keine DNA-Neusynthese statt (Craig, 1988). Die *attP* site muß im Gegensatz zur *attB* site in einer "supercoiled" Form vorliegen, die die Intasombildung fördert (Mizuuchi und Mizuuchi, 1979). Weiterhin sind die Ereignisse des "DNA unwinding" (Umlauf und Cox, 1988) und des "DNA-bending" (Schwartz und Sadowski, 1989) unerlässlich für diesen Vorgang. Allgemein bestehen die *att* sites aus dem identischen core (O) und den Armsequenzen (B, B', P und P'), die an das "core" angrenzen und sehr unterschiedlich in ihrer Sequenz sein können, was auch für den Myxophagen Mx8 (*attP*) und das Myxobakterium *M. xanthus* (*attB*) beschrieben wurde (Magrini et al., 1999 b). Der Vorgang der ortsspezifischen Rekombination ist für den Phagen  $\lambda$  am besten untersucht (Campbell, 1962). Die Integration von Myxophagen in das Genom von Myxobakterien oder von Plasmiden, welche das Integrase kodierende Gen enthalten, verläuft dazu analog. Dies kann angenommen werden, da die Integrase beider Phagentypen zur Familie der Tyrosinrekombinasen gehören (Nunes-Düby et al., 1998). In *E. coli* beginnt diese Rekombinationsreaktion damit, daß die Integrase und der "integration host factor" (IHF) von *E. coli* an bestimmte Sequenzen in den Armregionen der *attP* site binden. IHF stellt ein akzessorisches Protein dar, welches die Integrase-Aktivität verstärkt und bestimmte Sequenzen in den *attP* Armsequenzen erkennt an die der Faktor bindet (Ross und Landy, 1982; Craig und Nash, 1984). Es entsteht eine stabile, hoch spezifische Protein-DNA-Struktur, die als Intasom bezeichnet wird und die dann nach der komplementären *attB* site sucht und die räumlich Nähe der beiden *att* sites für die Rekombination gewährleistet. An die *attB* site bindet kein weiteres Protein (Richtel et al., 1988; Patsey und Bruist, 1995). Ein sequenzieller Austausch der DNA-Stränge durch Bruch- und Wiedervereinigungsreaktionen ähnlich der Aktivität der Topoisomerase I folgt. Jeweils ein Strang wird an einer spezifischen Stelle (im 17 bp core) gespalten und die Rekombinase bindet kovalent über eine Phosphotyrosinbindung an die Spaltstelle. Die Energie aus der Spaltung der Phosphoesterbindung bleibt konserviert, so daß die folgenden Schritte keine energiereichen Cofaktoren (z.B. ATP) benötigen. Die gespaltenen DNA-Stränge werden anschließend mit neuen Partner verbunden, wobei die neuen Phosphoesterbindungen auf Kosten der Protein-DNA-Verknüpfungen erzeugt werden. Als Intermediat dieses Spaltungs- und Neuverknüpfungsvorganges ist eine Holliday-Struktur zu beobachten (Nunes-Düby et al., 1995; Azaro und Landy, 1997). Damit die Reaktion beendet werden kann, muß dieser Vorgang an einer zweiten Stelle innerhalb jedes der beiden Rekombinationsbereiche wiederholt werden. Dies führt zur

Bildung der beiden Wirts-Phagen-Verbindungen, die aus Phagen und bakterieller DNA bestehen. Die core-Sequenzen bilden den Übergang zwischen Phagen- und Bakterien-DNA (Craig, 1988).

Da die Lage der *attP* site und somit der core-Sequenz, die in der kodierenden Sequenz des *intP* Gens des Myxophagen Mx8 liegt, auf dem 2.9 kbp Mx8 DNA-Fragment genau bekannt ist, konnte eine genauere Karte der *attR* site und *attL* site in den Plasmiden pSM48 und pSM49 angefertigt werden (Abb. 2.12 B). Die 17 bp core-Sequenz der *attP* site ist in der Sequenz des ca. 2.9 kbp Mx8 DNA-Fragmentes (Abb. 2.12 A) im Bereich der bp 2398-2415 gelegen und somit im 3'-Bereich der kodierenden Sequenz der Integrase (Gen *intP* liegt auf dem 2.9 kbp Mx8 Fragment in dem Bereich der bp 1031-2755). Da die ortsspezifische Rekombination einen sehr spezifischen Prozess darstellt, konnte davon ausgegangen werden, daß die *attR* site, die in dem Plasmid pSM48 vorhanden ist, die bp 1-2415 des 2.9 kbp Mx8 Fragmentes enthält, und die *attL* site des Plasmids pSM49 die bp 2398-2900 dieses Fragmentes. Die beiden Plasmide wurden sequenziert: Die oben beschriebenen Bereiche der Mx8 Phagen-DNA sind wie erwartet in den beiden Wirts-Phagen-Verbindungen vorhanden (siehe Anhang). Die core-Sequenz stellt den Übergang zur bakteriellen DNA dar. Bei Plasmid pSM48 sind ca. 0.6 kbp der *S. aurantiaca* DNA vorhanden, bei Plasmid pSM49 ca. 7 kbp, von denen ca. 3 kbp sequenziert wurden. Die Sequenzierung der *attR* site des Plasmids pSM48 führte zu einem weiteren, aufschlussreichen Ergebnis. Da die *attP* site in der Sequenz des Integrase Gens *intP* gelegen ist, kommt es durch den Prozeß der ortsspezifischen Rekombination bei *M. xanthus* zur Verkürzung der kodierenden Sequenz der Integrase. Die Integration führt zur Bildung einer weniger aktiven Integrase, kodiert durch *intX*, durch das Einführen eines Stopkodons in die Sequenz (Tojo et al., 1996; Magrini et al., 1999 b). Diese Integrase, die einen veränderten C-Terminus enthält, besitzt weiterhin Integraseaktivität, die aber gegenüber des IntP Proteins wesentlich geringer ist (Magrini et al., 1999 b). Der Myxophage Mx8 ist bisher das einzige Beispiel, bei der die *attP* site in der kodierenden Sequenz der Integrase lokalisiert ist und bei dem die ortsspezifische Rekombination zu einer Veränderung der kodierenden Sequenz der Integrase führt. Beim temperenten *Streptococcus thermophilus* Bacteriophagen  $\phi$ Sfi21 ist die *attP* site in der 3'-Region des *int* Gens lokalisiert. Die ortsspezifische Integration führt zu keiner Veränderung der kodierenden Region des Integrase Gens, da die *attB* site des Bakteriums eine identische Sequenz beinhaltet (Bruttin et al., 1997). Auch der *Sulfolobus shibatae* Virus SSV1 enthält die *attP* site in dem *int* Gen (Palm et al., 1991; Muskhelishvili et al., 1993).

In der Abbildung 2.13 ist die Sequenz der Mutante SM12 im Bereich der *attR* site, die durch die Integration des Plasmids pSM28 (Abb. 2.6) in die *attB* site des *S. aurantiaca* Wildtyps entstanden war, dargestellt. Nach der ortsspezifischen Rekombination bleibt die core-Sequenz erhalten. Die kodierende Sequenz der Integrase wird jedoch auch bei *S. aurantiaca* analog zu *M. xanthus* durch Einführen eines Stopkodon verändert, da die Integration in einem DNA-Bereich erfolgt, der dem von *M. xanthus* identisch ist.

### 3.4 Klonierung und Sequenzanalyse der *attB* site von *S. aurantiaca*

Die Sequenzen der beiden Wirts-Phagen-Verbindungen der Mutante SM12 wurden verwendet, um die Sequenz der chromosomale *attB* site des *S. aurantiaca* Wildtyps zu bestimmen. Die beiden Sequenzen können einfach im Bereich der core-Sequenz aneinander gefügt werden. Der Wildtyp *attB* Locus (909 bp) wurde mit Hilfe von Primern, die aufgrund dieser Sequenzdaten konstruiert wurden, aus chromosomaler DNA amplifiziert, kloniert und sequenziert. Die core-Sequenz wurde bestätigt. Bei *M. xanthus* erfolgt die ortsspezifische Integration bevorzugt in die *attB1* site. Diese liegt in dem 3'-Bereich des *trnD1* Gens, das für eine tRNA mit Spezifität für Asparaginsäure, kodiert (Magrini et al., 1999 a). Auch die *attB* site von *S. aurantiaca* ist in einem tRNA Gen lokalisiert. Es besitzt die gleiche Sequenz wie das entsprechende *M. xanthus* Gen in das die ortsspezifische Integration erfolgt. Core-Sequenzen für die ortsspezifische Integration sind bevorzugt Teile von tRNA Gene (Reiter et al., 1989; Campbell, 1992). Da die Identifikation von tRNA Genen nicht einfach über eine BLAST Suche erfolgen kann, wurde ein spezielles Programm, tRNAscan-SE v.1.11 (Lowe und Eddy, 1997) verwendet. In dem *attB* Locus von *S. aurantiaca* konnten zwei tRNA Gene identifiziert werden, welche nur 8 bp voneinander getrennt sind (Abb. 2.14 A). Das *trnD1* Gen, kodierend für eine tRNA mit Spezifität für Asparaginsäure, enthält die 17 bp core-Sequenz. Stromaufwärts findet man das *trnV1* Gen, kodierend für eine tRNA mit Spezifität für Valin, deren Sequenz keine core-Sequenz beinhaltet. Im *attB* Locus von *M. xanthus* (Abb. 2.14 B) findet man zwei *trnD* Gene, welche beide die core-Sequenz beinhalten, *attB1* und *attB2*, wobei die Rekombination in *attB1* bevorzugt ist. Die temperenten Corynephagen  $\beta$ ,  $\omega$  und  $\gamma$  integrieren in eine der beiden *attB* sites, *attB1* und *attB2*, des *Corynebacterium diphtheriae* C7 Chromosoms mit gleicher Effizienz. Die beiden *attB* sites liegen auch hier in den 3'-Bereichen von tRNA Genen (tRNA<sup>Arg</sup>), die

nahe beieinander im Genom lokalisiert sind (Rappuoli und Ratti, 1984; Ratti et al., 1997). Die beiden *trnD* Gene von *M. xanthus* sind 93 bp voneinander entfernt und stromaufwärts von *trnD1* befindet sich ein Gen (*trnV1*) kodierend für eine tRNA<sup>Val</sup>, welches keine core-Sequenz enthält. Die beiden *M. xanthus trnD* Gene enthalten in ihrer 3'-Region putative "stem-loop" Strukturen, die als Terminatoren dienen. Bei den beiden tRNA Genen des *attB* Locus von *S. aurantiaca* wurden keine solchen Terminatoren gefunden.

Für *E. coli* ist die Existenz von Rho-unabhängigen (Komine et al., 1990) sowie von Rho-abhängigen (Rossi et al., 1981) Terminatoren bei tRNA Genen beschrieben. Bei Prokaryonten sind die tRNA Gene, die meist aus ca. 75-95 bp bestehen, in Clustern angeordnet, das heißt, mehrere tRNA Gene sind nahe beieinander im Chromosom lokalisiert und werden zusammen transkribiert. Weiterhin findet man die tRNA Gene in polycistronischen Operons zusammen mit rRNA- und Protein-kodierenden Genen. In *S. aurantiaca* wurde z.B. das tRNA-*tufB* Operon identifiziert (Bremaud et al., 1995), in dem drei tRNA Gene zusammen mit dem *tufB* Gen transkribiert werden, das für das EF-Tu Protein kodiert. Für beide Myxobakterien, *M. xanthus* und *S. aurantiaca*, gibt es keine Kartierung der Lage und Verteilung von tRNA Genen auf dem Chromosom. Diese Informationen sollten aber in nächster Zukunft durch die Sequenzierung der Genome der beiden Organismen zur Verfügung stehen. Die beiden tRNA Gene von *S. aurantiaca*, *trnD1* und *trnV1*, bilden ein bicistronisches System und liegen nicht in einem polycistronischen Operon zusammen mit rRNA- oder Protein-kodierenden Genen vor. Der Sequenzvergleich der *trnD* und *trnV* Gene von *M. xanthus* und *S. aurantiaca* zeigte (Abb. 2.15 A und B), daß die *trnD* Gene beider Organismen eine Sequenzübereinstimmung von 100 % besitzen. Die core-Sequenz ist in Bezug auf Lage und Sequenz identisch. Die *trnV* Gene, die für eine tRNA mit Spezifität für Valin kodieren, unterscheiden sich in 3 bp. Dieses Ergebnis ist nicht verwunderlich, da tRNA Gene sehr stark konserviert sind.

Mit Hilfe der tRNAscan-SE Software ist auch eine Modellierung der putativen Sekundärstruktur der tRNA Genprodukte möglich, die in Abbildung 2.16 dargestellt ist. Beide tRNAs besitzen den für Prokaryoten typischen Akzeptorarm mit einem 7 bp Stamm, der die 5'- und 3'-Enden miteinander verbindet. Das CCA-Ende, welches für die Anheftung der spezifischen Aminosäure durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen benötigt wird, ist bei beiden tRNA Genen nicht in der kodierenden Sequenz zu finden. Nur bei dem *trnD1* Gen von *M. xanthus* wurde die CCA-Sequenz stromabwärts der

kodierenden Sequenz des tRNA Gens gefunden und wird somit als tRNA der Klasse I bezeichnet (Magrini et al., 1999 a). tRNA Gene, welche die CCA-Sequenz nicht enthalten werden als tRNA der Klasse II bezeichnet. Bei diesen wird das CCA-Ende nach der Prozessierung des tRNA-Vorläufers durch tRNA-Nucleotidyltransferase angeheftet (Deutscher, 1990). Aufgrund von Sequenzdaten vieler verschiedener Organismen (Sprinzel et al., 1989) kann eine pauschale Regel aufgestellt werden: Eukaryontische tRNA Gene besitzen keine CCA-Sequenz. Prokaryonten können sowohl tRNA Gene mit oder ohne die CCA-Sequenz besitzen oder auch Gene beider tRNA-Typen. Bei *S. aurantiaca* ist die core-Sequenz in der tRNA<sup>Asp</sup> in dem Akzeptorarm, dem T-Arm, sowie in der T-Schleife zu finden. Diese tRNA<sup>Asp</sup> enthält in der Antikodonschleife das Antikodon GUC. Es gibt für die Asparaginsäure lediglich zwei Antikodons. Die tRNA<sup>Val</sup> enthält in der Antikodonschleife das Antikodon UAC, eines von vier möglichen Antikodons für die Aminosäure Valin. Die beiden tRNAs besitzen die typischen Strukturen einer tRNA, die variable Schleife von 4 bp, einen T-Arm von 5 bp und den D-Arm (4 bp). Invariante tRNA Basen sind in der Abbildung 2.16 in Kreisen dargestellt.

Wie bereits beschrieben wurde, trägt das *trnD1* Gen des *S. aurantiaca attB* Locus die 17 bp spezifische core-Sequenz in ihrem 3'-Bereich. Komplementär befindet sich die core-Sequenz in der Phagen *attP* site im 3'-Bereich des Integrase kodierenden Gens *intP*. Durch die ortsspezifische Integration wird bei *S. aurantiaca* nicht nur die kodierende Sequenz der Integrase verändert, wobei das verkürzte *intX* Gen durch das Einführen eines TAA-Stopkodon entsteht, sondern auch der 3'-Bereich des *trnD1* Gens. In der Abbildung 2.17 ist dargestellt, daß der stromabwärts-Bereich des *trnD1* Gens, in dem nicht wie bei *M. xanthus* eine Terminatorstruktur gefunden wurde, durch den Mx8-spezifischen Terminator t<sub>Mx8</sub> ersetzt wird. Bei *M. xanthus* wird der t<sub>D1</sub> Terminator des *trnD1* Gens durch den t<sub>Mx8</sub> Terminator ersetzt (Magrini et al., 1999 a). Bei der *S. aurantiaca* Mutante SM12, die unter Hungerbedingungen einen heterogenen Phänotyp erzeugt (Abb. 2.8 B) entsteht also stromabwärts des *trnD1* Gens eine Terminatorstruktur, die im *S. aurantiaca* Wildtyp nicht vorhanden ist. Die Einführung einer solchen Terminatorstruktur könnte die Transkription und/oder die Prozessierung des tRNA-Vorläufers verändern oder beeinflussen und damit einen Einfluß auf das Angebot an Aminoacyl-tRNAs und/oder die Proteinsynthese ausüben. Bei *M. xanthus* ist keine Veränderung in der Fruchtkörperstruktur nach der ortsspezifischen Integration des Phagen Mx8 oder von Plasmiden in den *attB* Locus beschrieben. Der *M. xanthus* Wildtyp bildet im Vergleich zu *S. aurantiaca* unter Hungerbedingungen eine weniger



komplexe Fruchtkörperstruktur aus, es sind kugelförmige Fruchtkörper. *S. aurantiaca* hingegen bildet eine komplexe, baumartige Struktur. Es könnte sein, daß die Veränderung in der Fruchtkörperstruktur bei *M. xanthus*, falls sie existieren sollte, sehr unauffällig ist und daher nicht beobachtet werden kann. *M. xanthus* Gene, welche an *lacZ* fusioniert waren und in den *attB* Locus über Plasmide mit *intP* durch ortsspezifische Rekombination integrierten, wurden weniger stark exprimiert als in merodiploiden Mutanten, in denen diese Gene im normalen chromosomalen Locus vorliegen. Es wird vermutet, daß die Expression von Genen in diesem *attB* Locus einem "silencing" unterliegt (Li und Shimkets, 1988; Fisseha et al., 1996).

Sehr viele Beispiele sind bekannt, bei denen tRNA Gene als Integrationsstellen für die ortsspezifische Rekombination dienen. Diese Art der Integration unterliegt folgenden Regeln (Gabriel et al., 1995): (i) Die Core-Sequenz ist im 3'-Ende eines tRNA Gens lokalisiert. (ii) Nach der Integration bleibt ein intaktes tRNA Gen erhalten ohne veränderte stromaufwärts-Region an der Wirts-Phagen-Verbindung. (iii) Die tRNA, die als Ziel der Integration dient, ist ein funktionelles Gen. (iv) Die Antikodonsequenz ist Teil der core-Region. Prinzipiell werden alle hier aufgestellten Regeln auch bei *S. aurantiaca* erfüllt. Ungeklärt ist, ob der nach der ortsspezifischen Integration im stromabwärts-Bereich existierende Terminator  $t_{Mx8}$  einen Einfluß auf die Prozessierung der tRNA oder auf das Anheften der CCA-Sequenz hat. Der Akzeptorstamm mit der "discriminator base", auf die die CCA-Sequenz der tRNAs folgt, ist eine der wichtigen Erkennungsstellen für die Aminoacyl-tRNA-Transferasen, neben dem Antikodon und der D-Schleife (Meinzel et al., 1995). Veränderungen in der CCA-Sequenz, wie z.B. Veränderungen in der Sequenzlänge, Basenmodifikation oder Substitutionen führen meist zu tRNA-Inaktivierungen (Deutscher, 1990). Die Häufigkeit mit der man tRNA Gene als Ziele für die ortsspezifische Rekombination beschrieben findet, läßt vermuten, daß Gründe hierfür die hohe Konservierung der tRNA Sequenzen oder auch ein horizontaler Gentransfer sein könnte. Letzteres könnte es ermöglichen, daß genetische Elemente sich sehr leicht in heterogenen Bakterienpopulationen verbreiten könnten. Die Regionen mit einer zweigeteilten Symmetrie in den tRNA Genen stellen putative Bindestellen für Enzyme dar, die an dieser Art der Rekombination beteiligt sind (Reiter et al., 1989).

In vielen beschriebenen Beispielen wird die Sequenz der tRNA nach der ortsspezifischen Rekombination nicht verändert. Der temperente *Streptococcus*

*thermophilus* Bacteriophagen  $\phi$ Sfi21 integriert z. B. in ein tRNA<sup>Arg</sup> Gen. Die beiden *att* sites enthalten eine gemeinsame Sequenz von 40 bp, welche mit den terminalen 18 bp des *intP* Gens des Phagen und mit den terminalen 11 bp des tRNA Gens derart überlappt, daß beide Transkriptionseinheiten nicht verändert werden (Bruttin et al., 1997). Auch für Archaeobakterien sind tRNA Gene als Integrationstellen beschrieben. Die "virus-like particle" SSV1 integrieren in eine tRNA<sup>Arg</sup>, ohne daß deren kodierende Sequenz verändert wird (Reiter et al., 1989; Reiter und Palm, 1990). Die ortsspezifische Rekombination des genetischen Elementes SLP1, welches durch "mating" von *Streptomyces coelicolor*, wo dieses Element natürlich im Genom vorkommt, auf *Streptomyces lividans* übertragen wird, verursacht keine Veränderung der kodierenden Sequenz der essentiellen tRNA<sup>Tyr</sup>, die die *attB* site enthält. Die *attB* site von *Streptomyces lividans* und somit die tRNA<sup>Tyr</sup> konnte nur deletiert werden, wenn eine zweite Kopie im Genom vorhanden ist (Vöggtli und Cohen, 1992). tRNA Gene findet man auch in den flankierenden Sequenzen der Pathogenitätsinseln (Pais) von bestimmten *E. coli* Stämmen, die Infektionen im Urogenitaltrakt verursachen. Diese Pais enthalten Gene, welche für spezifische Pathogenitätsfaktoren, wie z.B. Adhäsine, Fimbrien, O-Antigene, Hämolyse und Siderophore kodieren. Virulenz geht als Folge der Rekombination zwischen kurzen direkten Wiederholungssequenzen, die in den die Pais flankierenden tRNA Genen vorkommen, mit den Pais verloren. Bei dem uropathogenen *E. coli* Stamm 536 ist die Pai I mit dem *sefC* Gen, kodierend für eine tRNA mit Spezifität für Selenocystein (tRNA<sup>Sec</sup>) assoziiert, die Pai II hingegen mit dem *leuX* Gen, kodierend für eine tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup>. Die beiden tRNA Loci ermöglichen bestimmte Funktionen und sind an der Bildung der Pathogenitätsfaktoren beteiligt. Die tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup>, eine Isoform, erkennt das seltene Leucinkodon UUG, welches in der mRNA-Sequenz des *fimB* Gens mehrfach vorkommt, welches notwendig ist für die Ausbildung von Typ 1 Fimbrien. Eine Deletion von tRNA<sub>5</sub><sup>Leu</sup> verhindert die Bildung von diesen Typ 1 Fimbrien nicht vollständig, da die tRNA<sub>4</sub><sup>Leu</sup>, kodiert durch das *leuZ* Gen, die Fähigkeit besitzt durch "wobbling" das UUG Kodon zu akzeptieren, es kommt jedoch zu einer verminderten Bildung der Typ 1 Fimbrien (Ritter et al., 1995; 1997).

Das *trnD1* Gen von *S. aurantiaca* könnte auch eine spezifische Isoform einer tRNA<sup>Asp</sup> darstellen, die zwar das gleiche Antikodon enthält wie eine andere tRNA<sup>Asp</sup>, aber durch spezifische Charakteristika in der Sequenz oder Form durch den Elongationsfaktor erkannt wird und für das Einfügen von Asparaginsäure an bestimmten Stellen von Proteinen notwendig ist, welche in der Fruchtkörperentwicklung eine Rolle spielen.

Neben den tRNAs als Integrationstellen sind auch Protein kodierende Gene beschrieben, die eine *attB* site enthalten, wie z.B. das *icd* Gen des *E. coli* Stammes K-12. Dieses Gen kodiert für eine Isocitratdehydrogenase. Der lambdaoide Coliphage  $\lambda$ e14 integriert über den Mechanismus der ortsspezifischen Rekombination in die *attB* site, die im 3'-Bereich des *icd* Gens lokalisiert ist. Durch die Integration wird das 165 bp 3'-Ende des Gens durch eine alternative Sequenz ersetzt. Dies hat nur geringe Auswirkungen auf die spezifische Aktivität des Enzyms (Hill et al., 1989; Wang et al., 1997).

### **3.5 Analyse der Expression der tRNA Gene des *attB* Locus von *S. aurantiaca***

Die Expression der tRNA Gene des *S. aurantiaca attB* Locus wurde mit verschiedenen Methoden analysiert. Die tRNA Gene wurden zum einen an das promotorlose  $\Delta$ *trpA-lacZ*-Fusionsgen angefügt und die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase der Zellen wurde unter verschiedenen Bedingungen bestimmt. Weiterhin wurde versucht die Expression mit Hilfe der RTPCR- und Northern-Analyse zu untersuchen.

#### **3.5.1 Analyse der Expression der tRNA Gene des *attB* Locus von *S. aurantiaca* durch Fusion der Gene an $\Delta$ *trpA-lacZ***

Die beiden tRNA Gene, *trnD1* und *trnV1*, wurden an das promotorlose  $\Delta$ *trpA-lacZ*-Konstrukt fusioniert. Mittels der PCR-Methode wurde ein 479 bp großes DNA-Fragment aus dem Genom von *S. aurantiaca* amplifiziert und in den Vektor pSM*lacZ* kloniert, welcher das  $\Delta$ *trpA-lacZ* DNA-Fragment enthält sowie das Kanamycin-Resistenz-Gen zur Selektion. Das  $\Delta$ *trpA-lacZ* DNA-Fragment besitzt 150 bp des *trpA* Gens fusioniert an *lacZ*. Das *trpA*-Fragment enthält Stopkodons in den drei möglichen Leserahmen, so daß lediglich transkriptionelle Fusionen mit *lacZ* möglich sind. Das 479 bp *S. aurantiaca* Amplifikat enthält 343 bp der stromaufwärts-Region des *trnV1* Gens, das *trnV1* Gen und 57 bp des *trnD1* Gens. Dieses Konstrukt, pSM63, wurde verwendet um die merodiploide Mutante SM25 (Abb. 2.26 A und B) zu erzeugen. Die merodiploide Mutante enthält die tRNA<sup>Val</sup> und Teile der tRNA<sup>Asp</sup> unter Wildtyp-Promotorkontrolle fusioniert an das promotorlose  $\Delta$ *trpA-lacZ*-Konstrukt, sowie die beiden tRNA Gene mit 343 bp der putativen Promotorregion stromabwärts des integrierten Plasmids. Eine Untersuchung der Fähigkeit der Mutante SM25 zur Bildung von Fruchtkörpern unter

Hungerbedingungen zeigte, daß die Mutante lediglich zur Bildung von Aggregaten fähig ist (Abb. 2.28 B). Dies verdeutlicht, daß der putative Promotorbereich von 343 bp stromaufwärts des *trnV1* Gens, der stromabwärts des integrierten Plasmids vorhanden ist, nicht für eine korrekte Expression der tRNA Gene ausreicht, da sonst eine Wildtyp-Fruchtkörperstruktur entstehen sollte. Ein weiterer Grund für den klumpigen Phänotyp könnte darin liegen, daß ein tRNA-Vorläufer-Molekül gebildet wird, welches nicht mehr korrekt prozessiert werden kann, damit funktionelle tRNAs entstehen können.

Über die Promotorstrukturen der bis jetzt identifizierten *S. aurantiaca* Gene ist nur wenig bekannt. Es liegen keine Informationen über die Strukturen von tRNA Promotoren bei Myxobakterien vor (auch nicht bei *M. xanthus*). In *E. coli* können die typischen Konsensussequenzen prokaryontischer Promotoren bei -10 und -35 in der stromaufwärts-Region von tRNA Genen gefunden werden. Der Spacer zwischen diesen beiden Elementen entspricht auch den bei anderen Promotoren identifizierten Größen von ca. 15-18 bp. Da die tRNA Gene der stringenten Kontrolle unterliegen, das heißt bei Aminosäuremangel wird ihre Transkription herunterreguliert, findet man bei solchen Genen in dem Promotor ein ca. 7 bp GC-reiches Sequenzelement (Travers, 1984; Josaitis et al., 1995). Die Identifikation eines solchen spezifischen Elementes bei *S. aurantiaca* konnte nicht erfolgen, zumal der Organismus einen sehr hohen GC-Gehalt (67-70 %) aufweist.

Nach Inkubation unter verschiedenen Bedingungen wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im zellfreien Extrakt der Mutante SM25 bestimmt (Abb. 2.27). Vergleicht man die Aktivität, welche unter vegetativen Bedingungen [64 Fluoreszenzeinheiten (FE)] und während der Indol-Induktion (15 min, 62 FE; 30 min, 64 FE) gefunden werden, so kann man von einer unveränderten Expression dieser Gene unter diesen Bedingungen ausgehen. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität unter Hitzeschock zeigte im Vergleich zu den gemessenen Werten in vegetativen Zellen einen starken Abfall (15 min, 29 FE; 30 min, 25 FE). Unter Hungerbedingungen, das heißt bei Aminosäuremangel, ist zunächst ein Anstieg der Aktivität zu verzeichnen. Während 4 Stunden Hungern ist ein Anstieg um 17 FE auf 81 FE meßbar. Danach ist ein stetiger Abfall (siehe Abbildung 2.27), der nach 40 Stunden (30 FE) auf vergleichbare Werte, die man auch unter Hitzeschockbedingungen findet, zu beobachten. Dies Ergebnis ist nicht verwunderlich, da wie bereits beschrieben die tRNA Expression unter Aminosäuremangel, einer Stresssituation, herunterreguliert wird. Der Abfall der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in der Fruchtkörperentwicklung könnte durch einen Abbau der  $\beta$ -Galaktosidase-mRNA

zustande kommen. Vermutlich wird keine neue  $\beta$ -Galaktosidase gebildet, da keine tRNA-Synthese mehr erfolgt. Weiterhin wird der Abfall der Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase ganz oder teilweise durch Proteolyse, die in der Fruchtkörperbildung stattfindet, verursacht.

In *M. xanthus* konnte gezeigt werden, daß (p)ppGpp als Initiationssignal der Entwicklung dient und wie auch bei *E. coli* in den Zellen bei Aminosäuremangel akkumuliert (Manoil und Kaiser, 1980 a, b). Das Gen *relA*, welches für die (p)ppGpp-Synthetase kodiert wurde bei *M. xanthus* kloniert. *RelA*-Mutanten zeigen eine Blockierung in der Entwicklung noch vor der Aggregationsphase, in der A-Faktor-Produktion und in der Akkumulation von (p)ppGpp. Der A-Faktor stellt bei *M. xanthus* ein Zelldichte-Signal dar, welches früh in der Entwicklung wirkt. Das *relA* Gen von *E. coli* kann diese Defekte komplementieren (Singer und Kaiser, 1995; Harris et al., 1998). Weiterhin wirkt (p)ppGpp positiv auf die Transkription des *csgA* Gens, welches für ein extrazelluläres Protein kodiert, das mit der Oberfläche der Zellen assoziiert ist und in der Fruchtkörperbildung von *M. xanthus* eine zentrale Rolle einnimmt (Shimkets und Rafiee, 1990; Crawford und Shimkets, 2000 a, b).

In *E. coli* ist die stringente Kontrolle am besten untersucht. Diese stellt eine Anpassung des Bakteriums auf Umweltstress dar, eine Konservierung von Energie unter Aminosäuremangel, wobei die erste regulatorische Antwort ein Verlust der Akkumulation von stabiler RNA darstellt, also auch von tRNA (Sands und Roberts; 1952). Unter diesen Bedingungen akkumulieren (p)ppGpp und ppGpp in der Zelle als Reaktion auf nicht aminoacylierte tRNA Moleküle, die in der A-Stelle der 50S Ribosomen-Untereinheit erkannt werden und zur Aktivierung der (p)ppGpp-Synthetase (*RelA*) führen und letztendlich zu einem Herunterregulieren der Proteinsynthese (Cashel und Gallant, 1969; Haseltine und Bock, 1973). Viele genetische und biochemische Daten über die regulatorische Funktion von ppGpp verdeutlichen, daß die Kontrolle der Genexpression hauptsächlich auf der Transkriptionsebene stattfindet (Ishihama, 1999). Die  $\beta$ -Untereinheit der RNA-Polymerase (RNAP) interagiert mit ppGpp (Reddy et al., 1995). In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, daß die Regulation der Promotoren durch zwei kinetische Parameter bestimmt wird, die Stabilität des RNAP offenen Promotorkomplexes und die Konzentration an freier RNAP. ppGpp inhibiert die rRNA Transkription durch Herabsetzen der Halbwertszeit von kurzlebigen offenen Promotorkomplexen, was zu einem Anstieg der freien RNAP Konzentration führt (Barker et al., 2001 a und b).

### 3.5.2 Untersuchung der Expression der tRNA Gene des *attB* Locus von *S. aurantiaca* durch RTPCR- und Northern-Analyse

Die Expression der beiden tRNA Gene, *trnD1* und *trnV1*, des *S. aurantiaca attB* Locus wurde unter verschiedenen Entwicklungsbedingungen mit RTPCR analysiert. Die Untersuchungen wurden parallel im *S. aurantiaca* Wildtyp DW4/3-1 und in der Mutante SM12 (Abb. 2.6 B), die unter Hungerbedingungen einen heterogenen Phänotyp bildet, durchgeführt. RNA wurde aus vegetativen, Indol- oder Hitzeschock-behandelten Zellen isoliert. Zusätzlich wurde die RNA aus Aggregaten nach unterschiedlichen Zeiten des Hungerns aufgearbeitet. Wichtig war die Überprüfung der RNA auf DNA-Kontamination, da diese falsch positive Ergebnisse erzeugen. Die RTPCR wurde mit Primern durchgeführt, welche 123 bp stromaufwärts des *trnV1* Gens und 28 bp stromabwärts des *trnD1* Gens hybridisierten (Abb. 2.29 A). Es sollte zu einem spezifischen Amplifikat von 230 bp bei einer Expression der tRNA Gene kommen. Im *S. aurantiaca* Wildtyp (Abb. 2.29 B) kann dies unter vegetativen Bedingungen, nach Indol- und Hitzeschock-Behandlung nachgewiesen werden. Auch während der Entwicklung unter Hungerbedingungen ist diese Bande sichtbar. Die Ausprägung, das heißt die Stärke der Bande, hat bei der RTPCR keine Aussagekraft, da es sich hier nicht um eine quantitative Bestimmung handelt. Da die tRNA Expression auch unter Hungerbedingungen sichtbar ist, ist zu vermuten, daß die kodierende mRNA nur langsam abgebaut wird. Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in der merodiploiden Mutante SM25 besitzt eine stärkere Aussagekraft (Abb. 2.27). Die Bildung des 230 bp Amplifikats verdeutlicht, daß die beiden tRNA Gene in einem Operon lokalisiert sind und daher ein Transkript bilden. Die RTPCR-Analyse der Mutante SM12 liefert die gleichen Ergebnisse wie beim Wildtyp, was darauf hindeutet, daß die Integration eines Plasmids in die *attB* site von *S. aurantiaca* die Expression der tRNA Gene nicht unterdrückt. Damit ist nicht geklärt, ob die Transkriptmengen vergleichbar sind oder ob die exprimierten tRNA Gene einen dem Wildtyp entsprechenden tRNA-Vorläufer bilden und ob dieser korrekt prozessiert wird. Beim *S. aurantiaca* Wildtyp sowie der Mutante SM12 tritt unter Hitzeschock und nach Indol-Behandlung ein Signal bei ca. 350 bp auf. Die Klonierung und Sequenzierung der beiden Fragmente, die in dieser RTPCR-Reaktion auftreten, zeigte, daß das Fragment mit der erwarteten Größe tatsächlich die beiden tRNAs des *attB* Locus repräsentiert.

Das größere Fragment besitzt eine 100 %ige Identität zu dem Tyrosin-tRNA Gen und zu Teilen des Glycin-tRNA Gens des tRNA-*tufB* Operons von *S. aurantiaca* (Bremaud et al., 1995). Vergleicht man die tRNA<sup>Asp</sup> und tRNA<sup>Val</sup> DNA-Sequenzen mit denen der beiden beschriebenen tRNAs, die im tRNA-*tufB* Operon vorkommen, so findet man keine Homologie. Daraus ist zu folgern, daß es sich um eine unspezifische Amplifikation handelt.

Weiter wurde die Expression der tRNA Gene des *attB* Locus von *S. aurantiaca* in einer Northern-Analyse untersucht. Zunächst wurde versucht eine geeignete Sonde für die Hybridisierung zu finden. Zum einen wurde mit spezifischen Primern das 73 bp große *trnD1* Gen amplifiziert und in einer Southern-Analyse mit *Bam* HI restringierter *S. aurantiaca* Wildtyp-DNA eingesetzt. Mit dieser Sonde kann ein starkes Signal bei ca. 4.2 kbp entdeckt werden (Abb. 2.30 A). Zusätzlich sind in größeren und kleineren kbp Bereichen viele schwache Banden zu sehen. Die Bildung des starken Signals bei ca. 4.2 kbp ist damit zu erklären, daß der *attB* Locus von *S. aurantiaca* und somit das *trnD1* Gen auf einem ca. 4 kbp großen *Bam* HI DNA-Fragment lokalisiert ist (siehe Abbildung 2.1 A und B). Das Auftreten der schwächeren Signale unterschiedlicher Größen verdeutlicht, daß vermutlich weitere *trnD* Gene oder Gene mit Sequenzhomologien zu dem *trnD1* Gen im Genom von *S. aurantiaca* vorkommen. Als weitere Sonde wurde ein 253 bp DNA-Fragment mittels der PCR-Methode aus dem *S. aurantiaca* Wildtyp-Genom amplifiziert, welches 128 bp der stromaufwärts-Region des *trnV1* Gens, *trnV1* und die ersten 63 bp des *trnD1* Gens enthält. Diese Sonde führte in einer Southern-Analyse mit *Bam* HI restringierter *S. aurantiaca* Wildtyp-DNA zu einem anderen Ergebnis. Neben einem Signal bei ca. 5 kbp, traten weitere schwache Signale in kleineren und größeren kbp Bereichen auf. Die schwachen Signale deuten auch hier auf das Vorhandensein von weiteren *trnD* und/oder *trnV* Genen im Genom von *S. aurantiaca* hin. Warum mit dieser Sonde, auf der beide tRNA Gene des *attB* Locus vorhanden sind, ein ca. 5 kbp großes *Bam* HI Fragment gut detektiert wird, ist unklar. Wie bereits beschrieben, befindet sich der *attB* Locus auf einem ca. 4 kbp großen *Bam* HI Fragment. Die verwendete Sonde enthält auch 128 bp der stromaufwärts-Region der beiden tRNA Gene. Es könnte also ein DNA-Fragment erkannt werden, welches eine Homologie zu diesem Bereich besitzt. Trotz dieses bis jetzt nicht erklärbaren Ergebnisses in der Southern-Analyse wurde diese Sonde in die Northern-Analyse eingesetzt, da hier die beiden tRNA Gene des *attB* Locus von *S. aurantiaca* vorhanden sind. Für die Northern-Analyse wurde die RNA des Wildtyps (verschiedenen Bedingungen: Vegetativ, Hitzeschock, Indol-Behandlung und Hungerbedingungen)

isoliert. Die RNA-Präparation enthielt das typische Muster mit der 23S und 16S rRNA, sowie der 5S rRNA und tRNA-Fraktion. Die Verwendung der beschriebenen Sonde von 253 bp führte jedoch zu einer unspezifischen Hybridisierung mit der 23S und 16 S rRNA bei allen isolierten RNA-Präparaten. Dieses unspezifische Ergebnis könnte durch Probleme beim Transfer der RNA auf die Nylonmembran verursacht worden sein. Es besteht die Möglichkeit, daß die tRNA nicht auf die Nylonmembran transferiert wurde, oder der Transfer erfolgte zu lange und die tRNA war nicht mehr auf der Membran vorhanden.

### **3.6 Inaktivierung der tRNA Gene des *attB* Locus von *S. aurantiaca* durch die Insertion einer Antibiotika-Resistenz-Kassette**

Die beiden tRNA Gene, *trnD1* und *trnV1*, sind in dem *attB* Locus von *S. aurantiaca* gelegen und werden gemeinsam transkribiert. Das *trnD1* Gen enthält die core-Sequenz, die für die ortsspezifische Integration von Phagen oder Plasmiden dient, welche das Integrase kodierende Gen *intP* mit der korrespondierenden *attP* site enthalten. Die Integration der Plasmide pSH8 und pSM28 (Abb. 2.3 und Abb. 2.6), welche unterschiedlich große DNA-Fragmente (mit *intP* und *attP*) des Myxophagen Mx8 enthalten, in den *S. aurantiaca* Wildtyp *attB* Locus verursachte einen heterogenen Phänotyp (Abb. 2.5 B und Abb. 2.8 B). Durch die Konstruktion der Mutante SM12 (Abb. 2.6 B) konnte widerlegt werden, daß die ORFs mit unbekannter Funktion auf Plasmid pSH8 (Abb. 2.3 C) die Ursache darstellen, da das für die ortsspezifische Rekombination verwendete Plasmid (pSM28) lediglich das *intP* Gen mit der *attP* site und das stromaufwärts gelegene *uoi* Gen beinhaltet und trotzdem ein heterogener Phänotyp gebildet wurde. Es stellte sich nun die Frage, ob auch eine Insertion eines Antibiotika-Resistenz-Gens in die beiden tRNA Gene oder in ihre stromaufwärts-Region einen auffälligen Phänotyp verursacht.

Zunächst wurde das Plasmid pSM58 (Abb. 2.21) konstruiert, das eine Kanamycin-Resistenz-Kassette in der core-Sequenz des *trnD1* Gens des *S. aurantiaca attB* Locus enthält. Für die Konstruktion dieses Plasmids wurden zwei DNA-Fragmente des *attB* Locus Bereiches aus chromosomaler DNA mit spezifischen Primern amplifiziert. Zum einen handelte es sich um ein 479 bp DNA-Fragment, welches die 342 bp der stromaufwärts-Region von *trnV1* enthält, sowie das *trnV1* Gen und die ersten 57 bp des



73 bp großen *trnD1* Gens. Das zweite 733 bp DNA-Fragment enthält die restlichen 13 bp des *trnD1* Gens und 721 bp seiner stromabwärts-Region. Beide Fragmente wurden getrennt durch eine Antibiotika-Resistenz-Kassette in den pUC18 Klonierungsvektor kloniert. Die Resistenz-Kassette liegt somit in der core-Sequenz. Das Plasmid wurde linearisiert und in den *S. aurantiaca* Wildtyp-Stamm transferiert. Es waren nur sehr wenige Transformanten zu selektionieren, obwohl die Transformation mehrmals mit verschiedenen DNA-Konzentrationen durchgeführt wurde. Mittels einer Dot-Blot-Analyse, in der das Ausgangsplasmid (pUC18) als Sonde verwendet wurde, konnten die Klone mit einem einfachen Rekombinationsereignis von denen mit einem putativ doppelten unterschieden werden. Lediglich zwei Transformanten zeigten keine Hybridisierung mit der pUC18-Sonde. Diese Klone wurden durch eine PCR-Analyse auf das Vorhandensein der Kanamycin-Resistenz-Kassette in der core-Sequenz der tRNA<sup>Asp</sup> überprüft (Abb. 2.22). Dadurch wurde gezeigt, daß es sich lediglich um spontane, Kanamycin-resistente Klone handelte, da die Resistenz-Kassette nicht nachgewiesen werden konnte. Das Plasmid wurde sequenziert, um die mittels PCR amplifizierten chromosomalen DNA-Bereiche zu überprüfen.

Um dieses Problem zu beheben, wurde Plasmid pSM77 (Abb. 2.23 A) konstruiert, welches ein 1.2 kbp großes DNA-Fragment des *S. aurantiaca attB* Locus trägt, das nicht durch PCR amplifiziert wurde. Das 1.2 kbp DNA-Fragment des Plasmid pSM77 enthält die beiden tRNA Gene des *attB* Locus sowie 416 bp der stromabwärts- und 668 bp der stromaufwärts-Region. Dieses Plasmid stellte den Ausgangsvektor für die Konstruktion der Plasmide pSM80, pSM81 und pSM82 dar (Abb. 2.23 B). Das Plasmid pSM80, mit dem die Mutante SM31 konstruiert wurde (Abb. 2.23 C), enthält das Antibiotika-Resistenz-Gen in der *Bss* HII-Restriktionsschnittstelle, welche 87 bp stromaufwärts des *trnV1* Starts gelegen ist, also in der putativen Promotorregion der beiden tRNA Gene. Das Plasmid pSM81 enthält die Kanamycin-Resistenz-Kassette 16 bp stromabwärts des Starts des *trnV1* Gens in der *Blp* I-Schnittstelle (Abb. 2.23 B). Es wurde für die Konstruktion der Mutante SM32 (Abb. 2.23 C) verwendet. Die Mutante SM33 konnte durch das Ereignis der doppelten Rekombination mit dem Plasmid pSM82 erhalten werden, welches die Kanamycin-Resistenz-Kassette 31 bp stromabwärts des *trnD1* Starts enthält. Die Genotypen der Mutanten wurden in einer Southern-Analyse überprüft (Abb. 2.24) und die Beurteilung des Phänotyps erfolgte unter Hungerbedingungen (Abb. 2.25). Alle genannten Mutanten bilden unter diesen Entwicklungskonditionen nur klumpige Aggregate aus. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß dieser DNA Locus bei der Fruchtkörperbildung eine Rolle spielt. In diesem DNA-

Bereich sind die tRNA Gene *trnD1* und *trnV1* enthalten, die bei den Mutanten durch die Insertion eines Antibiotika-Resistenz-Gens in ihrer Transkription unterbrochen werden. Man kann daraus schließen, daß die Genprodukte, die tRNA<sup>Asp</sup> und/oder tRNA<sup>Val</sup>, bei der Synthese von bestimmten Proteinen, welche bei der Fruchtkörperbildung eine Rolle spielen, notwendig sind. Durch das Fehlen der beiden tRNA Moleküle, könnte die Translation dieser Proteine beeinflusst werden. Die Mutante SM31 (Abb. 2.23 B) enthält die Insertion in der putativen Promotorregion und bildet klumpigen Phänotyp unter Hungerbedingungen. Mutante SM25 (Abb. 2.26) ist eine merodiploide Mutante, bei der die beiden tRNA Gene an das promotorlose  $\Delta trpA-LacZ$ -Konstrukt fusioniert sind. Stromabwärts des integrierten Plasmids enthält diese Mutante lediglich 343 bp der putativen Promotorregion der beiden tRNA Gene. Sie bildet unter Hungerbedingungen lediglich klumpige Aggregate (Abb. 2.28 B). Daraus kann man folgern, daß die Verkürzung der Promotorregion der beiden tRNA Gene oder die Insertion einer Antibiotika-Resistenz-Kassette in diesen Bereich die Transkription und/oder die Prozessierung des tRNA-Vorläufer Moleküls beeinflusst. Eine Veränderung der stromabwärts-Region der tRNA Gene, wie sie bei den Mutanten SM4 und SM12 (Abb. 2.17) nach der ortsspezifischen Rekombination erfolgt, die stromabwärts-Region enthält den Mx8 spezifischen Terminator t<sub>Mx8</sub>, führt zur Bildung heterogener Fruchtkörper (Abb. 2.5 B und 2.8 B). Die Einführung des Terminators könnte außer der Transkription der beiden tRNA Gene auch die posttranskriptionelle Prozessierung beeinflussen. Die tRNA Genprodukte sind vermutlich in dieser Mutante nur in geringeren Mengen vorhanden oder eines der tRNA Genprodukte fehlt. Möglicherweise ist die tRNA<sup>Asp</sup> eine Isoform, die zwar das gleiche Antikodon wie andere tRNA<sup>Asp</sup> Moleküle besitzt, aber spezifische Sequenzunterschiede in anderen Teilen der komplexen tRNA Struktur enthält, die für die Erkennung der Aminoacyl-tRNA-Synthetase und/oder den Elongationsfaktor EF-TU notwendig sind. Alle hier diskutierten Möglichkeiten lassen jedoch verstärkt den Schluß zu, daß das *trnD1* Gen eine zentrale Rolle einnimmt. In den Mutanten SM4 und SM12 ist dessen stromabwärts-Region durch das Einfügen eines Terminators verändert (Abb. 2.17). Das *trnD1* Gen wird transkribiert, was durch die RTPCR-Studien gezeigt wurde (Abb. 2.29 B), aber es ist fraglich, ob diese tRNA zu einer funktionelle Form prozessiert wird. Vielleicht sind in den Mutanten SM4 und SM12 noch geringe Konzentrationen dieser tRNA<sup>Asp</sup> vorhanden und so könnte die Synthese bestimmter Proteine, welche in der Fruchtkörperbildung eine Rolle spielen, bis zu einem gewissen Grad erfolgen. Eine weitere Unterstützung für diese Hypothese ist Mutante SM33 (Abb. 2.23 B), bei der

vermutlich nur das *trnV1* Gen exprimiert, die Mutante bildet aber lediglich klumpige Aggregate.

### 3.7 Komplementation des Phänotyps der *S. aurantiaca* Mutante SM12

Die Mutante SM12, welche nach der ortsspezifischen Integration des Plasmids pSM28 entstand, enthält die beiden Wirts-Phagen-Verbindungen und bildet einen heterogenen Fruchtkörper unter Hungerbedingungen (Abb. 2.6 und 2.8). Auf genetischer Ebene verändert sich lediglich die stromabwärts-Region des *trnD1* Gens durch den Mx8 spezifischen Terminator  $t_{Mx8}$  (Abb. 2.17). Die Insertion einer Antibiotika-Resistenz-Kassette in den putativen Promotor oder in die beiden tRNA Gene verursacht die Bildung von klumpigen Aggregaten (Abb. 2.23 C und Abb. 2.25). Der Phänotyp der Mutante SM12 sollte genetisch komplementierbar sein, falls die beiden tRNA Gene für diesen Phänotyp verantwortlich sind und wenn der *attB* Locus zusätzlich zur Verfügung gestellt wird.

Mutante SM 23 wurde (Abb. 2.31 B) nach ortsspezifischer Rekombination des Plasmids pSM29 in den *attB* Locus des *S. aurantiaca* Wildtyps erhalten. Plasmid pSM29 enthält das 2.9 kbp Mx8 DNA-Fragment mit dem Integrase kodierenden Gen *intP* und der darin enthaltenen *attP* site sowie das *uoi* Gen und Teile des ORFs 10 (Abb. 2.12). Zusätzlich ist das 909 bp *attB* Fragment in dem Plasmid vorhanden, welches die beiden tRNA Gene und 416 bp der stromabwärts- und 341 bp der stromaufwärts-Region der tRNA Gene enthält. Durch ortsspezifische Rekombination entstehen die beiden Wirts-Phagen-Verbindungen *attL* und *attR*, wie bei der Mutante SM12 (Abb. 2.6). Zusätzlich ist aber der *attB* Locus zwischen den beiden Wirts-Phagen-Verbindungen vorhanden (Abb. 2.31 B). Die Analyse des Phänotyps zeigte, daß Mutante SM23 einen heterogenen Fruchtkörper bildet (Abb. 2.33 B). Aus Aggregaten entspringen Stiele mit Sporangiolen. Aufgrund der Form des Fruchtkörpers der merodiploiden Mutante SM25 (Abb. 2.28 B), bei der die Promotorregion der tRNA Gene stromabwärts des integrierten Plasmids pSM63 lediglich 343 bp lang ist (Abb. 2.26 B), kann angenommen werden, daß der Promotor nicht für eine Expression der tRNA Gene ausreicht und/oder, daß kein korrekter tRNA-Vorläufer für die posttranskriptionelle Prozessierung gebildet wird. Der Fehlschlag der genetischen Komplementation der Fruchtkörperbildung von SM12 durch Einfügen eines zusätzlichen *attB* Locus, der nur 341 bp der stromaufwärts-Region und somit der Promotorregion enthält, ist auf Grund dieser Ergebnisse nicht

unerwartet. Der Phänotyp der Mutante SM25 war zum Zeitpunkt der Konstruktion der Mutante SM23 nicht bekannt und somit lagen auch keine Informationen über die notwendige Promotorregion vor.

Zur Charakterisierung des *attB* Bereiches wurde eine weitere Strategie verfolgt. Der *attB* Locus von *S. aurantiaca* mit einer größeren Promotorregion (668 bp) für die beiden tRNA Gene, sollte in das *mtaB* Gen der Mutante SM12 eingefügt werden. *MtaB* kodiert für eine putative Polyketidsynthase und ist nicht in die Fruchtkörperentwicklung des *S. aurantiaca* Wildtyps involviert (Silakowski et al., 1998). Dazu wurde das Plasmid pSM86 konstruiert, welches einen Teil des *mtaB* Gens, eine Tetracyclin-Resistenz-Kassette und ein 1.2 kbp großes *attB* DNA-Fragment des Wildtyps enthält (Abb. 2.34 A). Auf diesem *attB* Fragment sind die beiden tRNA Gene, *trnD1* und *trnV1*, sowie 416 bp der stromabwärts- und 668 bp ihrer stromaufwärts-Region enthalten. Das Plasmid wurde zunächst in den *S. aurantiaca* Wildtyp transferiert um die merodiploide Mutante SM34 (Abb. 2.34 B) herzustellen. Die Analyse des Phänotyps dieser Mutante zeigte, daß *mtaB* nicht in die Fruchtkörperbildung involviert ist, da Wildtyp-Fruchtkörper gebildet (Abb. 2.38 C). Damit werden zum einen die von Barbara Silakowski (Silakowski et al., 1998) durchgeführten Experimente bestätigt, und SM34 ist eine Mutante, die zwei core-Sequenzen für die ortsspezifische Integration enthält sowie die duplizierten *trnD1* und *trnV1* Gene. Die Integration des Plasmids pSM86 in den *mtaB* Locus war bevorzugt, da das *mtaB* DNA-Fragment des Plasmids eine Größe von ca. 2.3 kbp hat. Der auch vorhandene *attB* Locus hingegen besitzt nur 1.2 kbp und somit stehen für die homologe Rekombination in den *mtaB* Locus größere homologe Bereiche zur Verfügung. Eine Integration von pSM86 über ortsspezifische Rekombination in den *attB* Locus ist nicht möglich, da das Plasmid für keine Integrase kodiert. Die Mutante kann nun für die ortsspezifische Integration von Plasmiden mit der Mx8 *attP* site benutzt werden. Erfolgt die Integration in nur eine der beiden zur Verfügung stehenden *attB* sites der Mutante SM34, so müßte die Fähigkeit zur Wildtyp-Fruchtkörperbildung erhalten bleiben und es könnte die Expression von Genen, welche z.B. in die Fruchtkörperbildung involviert sind, mit diesem System untersucht werden. Ein Vorteil der ortsspezifischen Integration ist die erhöhte (Faktor 100) Transformationseffizienz.

Plasmid pSM86 wurde auch in die Mutante SM12 mit Hilfe der Elektroporation transferiert. In diesem Fall gab es drei Möglichkeiten der Integration. Zum einen hätte die Integration in den *mtaB* Locus wie beim Wildtyp erfolgen können, da genügend große DNA-Bereiche für die homologe Rekombination in diesen Genombereich zur

Verfügung stehen. Zum anderen kann die Integration über ortsspezifische Rekombination in die beiden Wirts-Phagen-Verbindungen *attL* und/oder *attR* erfolgen. Das Plasmid enthält zwar nicht das Integrase kodierende Gen *intP*, aber das für eine weniger aktive Integrase kodierende Gen *intX* wird von der rechten Wirts-Phagen-Verbindungen (*attR*) des Mutantengenoms kodiert (Abb. 2.36). Es gab nur genetische Beweise für das Vorhandensein des *intX* Gens, aber keine Beweise für die Funktion dieser Integrase *in vivo*. Die ortsspezifische Rekombination erfolgt wesentlich häufiger als die homologe Rekombination (Stephens und Kaiser; 1987). In der Abbildung 2.36 sind die beiden Möglichkeiten der ortsspezifischen Rekombination dargestellt. Bei den untersuchten 12 Transformanten wurde die ortsspezifische Rekombination des Plasmids pSM86 in die *attR* site nachgewiesen. Exemplarisch wurde Mutante SM35 weiter untersucht. Mutante SM35 enthält zwei *attL* sites, *attL1* und *attL2*, die beide aus Phagen- und *S. aurantiaca*-Sequenzen bestehen. *AttL2* enthält in der kodierenden Sequenz das *intX* Gen. Die entstandene *attR1* site der Mutante SM35 besteht nur aus bakteriellen Sequenzen. Hier sind die beiden tRNA Gene, *trnD1* und *trnV1* sowie deren Wildtyp-Promotorstruktur und 416 bp der stromabwärts-Region vorhanden. Die Analyse der Fruchtkörperbildung zeigte, daß Mutante SM35 (Abb. 2.38 C) Wildtyp-Fruchtkörpern bildet. Der heterogene Phänotyp der Mutante SM12 konnte durch Bereitstellung eines intakten *attB* Locus mit den beiden darin enthaltenen tRNA Genen zum Wildtyp-Phänotyp komplementiert werden. Dies Ergebnis beweist, daß dieser Genlocus in die Bildung der Fruchtkörperstruktur involviert ist. Die Mutante SM12, bei der das Plasmid pSM28 in die *attB* site integriert ist (Abb. 2.6), bildet einen heterogenen Phänotyp (Abb. 2.8 B). In dieser Mutante sind die beiden tRNA Gene vorhanden, es kommt jedoch zu einer Veränderung der stromabwärts-Region des *trnD1* Gens durch das Vorhandensein des Mx8-spezifischen Terminators  $t_{Mx8}$ . Die RTPCR-Analyse der Mutante SM12 (Abb. 2.29) zeigt, daß beide tRNA Gene exprimiert werden. Es kann jedoch keine Aussage gemacht werden, ob die tRNA<sup>Asp</sup> in einer funktioneller Form überführt wird. Bei der Mutante SM35 führte die Bereitstellung eines bestimmten *attB* Bereiches und somit der beiden tRNA Gene zu einem Wildtyp-Phänotyp. Der heterogene Phänotyp der Mutante SM12 ist so komplementierbar. Aufgrund dieser Daten kann gefolgert werden, daß die Veränderung der stromabwärts-Region des *trnD1* Gens für den Phänotyp der Mutante SM12 verantwortlich ist. Die Bereitstellung eines weiteren *trnD1* Gens mit einer Wildtyp stromabwärts-Region, wie es bei der Mutante SM35 der Fall ist, unterstützt diese Vermutung.

### 3.8 Charakterisierung des stromaufwärts- und stromabwärts-Bereiches des *S. aurantiaca attB* Locus

Die beiden Wirts-Pagen-Verbindungen der Mutante SM12 (Abb. 2.6 B) wurden kloniert (Plasmide pSM48 und pSM49) und sequenziert. Die Sequenzierung der rechten Wirts-Phagen-Verbindung lieferte Aufschluß über den Genbereich, in den die ortsspezifische Rekombination erfolgte und über den stromaufwärts-Bereich der beiden tRNA Gene des *attB* Locus. Die Analyse der *attL* site gab Aufschluß über den stromabwärts-Bereich des *attB* Locus von *S. aurantiaca*. Mittels Computeranalyse wurden sowohl in dem stromabwärts- als auch in dem stromaufwärts-Bereich der beiden tRNA Gene, *trnD1* und *trnV1*, putative offene Leserahmen identifiziert (Abb. 2.18). In dem stromaufwärts-Bereich, 268 bp stromaufwärts vom Start der tRNA<sup>Val</sup>, wurde ein Teil eines putativen ORF (453 bp), *isa*, identifiziert, der in entgegengesetzter Transkriptionsrichtung zu den beiden tRNA Genen des *attB* Locus angeordnet ist. Dieser Leserahmen beginnt mit einem ATG-Startkodon, eine putative Shine-Dalgarno-Sequenz (GGAG) ist vorgelagert. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von 151 Aminosäuren zeigt, daß signifikante Homologien zu Isoamylasevorläufern der Organismen *Flavobacterium* und *Pseudomonas* vorhanden sind (Abb. 2.19 B). Da von der stromaufwärts-Region der beiden tRNA Gene des *attB* Locus nur ca. 0.6 kbp an Sequenzinformation vorhanden sind, konnte nur ein Teil dieser putativen Isoamylase von *S. aurantiaca* sequenziert werden. Das Stopkodon des putativen ORFs wurde nicht identifiziert. Isoamylasen hydrolysieren die  $\alpha$ -1,6-D-glykosidischen Bindungen in Stärke, Glykogen und Oligosacchariden. Im Gegensatz zu dem anderen Stärke abbauenden Enzym Pullulanase ist die Isoamylase dadurch charakterisiert, daß sie die  $\alpha$ -1,6-Verbindungen in Glykogen spaltet und nicht die in Pullulan. Die Pullulanase hingegen spaltet Pullulan zu Maltotriose, besitzt aber wenig enzymatische Aktivität gegenüber Glykogen (Lee und Whelan, 1971; Harada, 1984). Isoamylasen besitzen vier verschiedene, hoch konservierte Regionen mit "Spacern" in bestimmten Intervallen (Janse et al., 1993). Die N-terminale Region der kodierenden Sequenz der Isoamylasen enthält in der Regel ein putatives Sekretionssignal, AHA, typisch für prokaryontische Signalpeptide (Oliver, 1987). Die proteolytische Spaltung erfolgt bei der *Pseudomonas* Isoamylase Sequenz AHAAI zwischen den beiden Alaninresten (Amemura et al., 1988; Togononi et al., 1989). Bei *S. aurantiaca* gibt es keine Informationen über typische Signalsequenzen für die Sekretion. Bei *M. xanthus* wurden Signalsequenzen beschrieben, die aber auch

nicht den typischen Signalpeptiden entsprechen. Die Spaltung erfolgt aber auch hier zwischen zwei Alaninresten (Gollop et al., 1991). Bei dem putativen *S. aurantiaca* Isoamylase Vorläufer wurde im Gegensatz zu der beschriebenen Signalsequenz AHAAI von *Pseudomonas* und *Flavobacterium* die Sequenz PAAA identifiziert. Es werden zunächst Vorläuferenzyme gebildet, die durch die äußere Membran geschleust werden und so in die extrazelluläre Umgebung gelangen. Viele verschiedene Bakterien wie z.B. *Pseudomonas* sp. (Tognoni et al., 1989), *Flavobacterium* sp. (Sato und Park, 1980) und *Bacillus amyloliquefasciens* (Urlaub und Wober, 1975) bilden das Enzym Isoamylase. Bei *Stigmatella brunnea* wurde der Abbau von Stärke beschrieben (McCurdy und Khouw, 1969). Da Myxobakterien unter anderem auch auf abgestorbenem Pflanzenmaterial wachsen, dessen Hauptbestandteil neben der Cellulose auch die Stärke ist, könnte diese putative Isoamylase von *S. aurantiaca* am Abbau der pflanzlichen Stärke beteiligt sein. Die Expression des putativen Isoamylasevorläufers wurde mittels der RTPCR-Methode in dem *S. aurantiaca* Wildtyp DW4/3-1 und in der Mutante SM12 (Abb. 2.20) getestet. Die RNA aus vegetativen, Indol-behandelten Zellen sowie der Fruchtkörper oder den Zwischenformen, wie sie bei der Mutante SM12 unter Hungerbedingungen vorkommen, wurde isoliert. Mit den Primern Iso1 und Iso2, welche 93 und 427 bp stromabwärts des putativen Startkodons des *isa* Gens hybridisieren, konnte unter den untersuchten Bedingungen kein Transkript nachgewiesen werden (Abb. 2.20 A, B). Vermutlich wird das Gen nur in Anwesenheit von Stärke oder Glykogen exprimiert wird. Daher ist keine Aussage über die Expression möglich.

In der stromabwärts-Region der beiden tRNA Gene, *trnD1* und *trnV1*, wurde ein weiterer ORF, *ire*, identifiziert. Das putative GTG-Startkodon mit der vorgelagerten Shine-Dalgarno-Sequenz (GAAGG) liegt 748 bp stromabwärts des Stops von *trnD1* (Abb. 2.18). Die Transkriptionsrichtung ist entgegengesetzt zu dem tRNA Operon. Die abgeleitete Aminosäuresequenz besitzt eine Identität von ca. 30% zu den Integrasen/Rekombinasen *xerD* von *Pyrococcus abyssi* und *xerC* von *Pyrococcus horikoshii* (Abb. 2.19 A). XerC und XerD gehören zur Familie der Tyrosin-Rekombinasen der Integrase-Familie. Zu dieser Familie gehören z.B. auch die Integrase des Phagen  $\lambda$ , die FLP Rekombinase des 2  $\mu$ m Plasmids der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und XerC und XerD von *E. coli* (Landy, 1989; Schwartz und Sadowski, 1989; Blakely et al. 1991). Für die Wirkung dieser Rekombinasen sind oft akzessorische Proteine notwendig. Sie katalysieren einen sequenziellen Austausch von zwei Paaren von DNA Strängen an definierten Phosphodiesterpositionen, wobei als

Intermediat Holliday-Strukturen entstehen. Cofaktoren werden für diesen Vorgang nicht benötigt. Im Verlaufe des Prozesses entsteht eine kovalente Protein-DNA-Verbindung durch einen 3'-Phosphoester an einem definierten Tyrosinrest der Integrase (Grainge und Jayaram, 1999). Aufgrund eines Vergleiches der Sequenzen von 105 Mitgliedern dieser Familie, konnten verschiedene Bereiche definiert werden, in denen es große Homologien in den sonst recht divergenten Proteinen gibt. Diese Bereiche enthalten katalytische Domänen in denen definierte Aminosäuren hoch konserviert sind. Der Reihenfolge nach unterscheidet man Patch I, Box I, Patch II, Patch III und Box II, wobei meist nur die Boxen I und II, in welchen die Homologien am höchsten sind, zu einem Aminosäuresequenzvergleich herangezogen werden (Nunes-Düby et al., 1998). Wie in Abbildung 2.19 A dargestellt, sind der hoch konservierte Argininrest in Box I und die Histidin-, Arginin- und Tyrosin-Reste in der Box II vorhanden. XerC und XerD wirken in *E. coli* als ortsspezifische Rekombinationssysteme, um dimere Plasmidmoleküle, welche durch homologe Rekombination entstehen, in monomere umzuwandeln. So wird eine stabile Weitergabe der Plasmide auf Tochterzellen ermöglicht (Summers und Sherratt, 1984). Dieses System der Rekombinasen wirkt aber auch bei der Umwandlung von dimeren zu monomeren Bakterien-Chromosomen, die dann an die Tochterzellen weitergegeben werden (Clerget, 1991). Dimere Chromosomen entstehen zu einem gewissen Prozentsatz in einer Zellpopulation und werden durch ortsspezifische Rekombination am *dif* Locus aufgelöst, welcher in der Region der Replikationstermination gelegen ist, (Steiner und Kuempel, 1998; Perals et al., 2000). Mutationen in den Genen *xerC*, *xerD* und *dif* führen bei *E. coli* zu einem filamentösen Phänotyp der dadurch entsteht, daß die Zellen verknüpfte Chromosomen enthalten, die nicht getrennt wurden (Kuempel et al., 1991). Mutationen in *xer* führen zu einer Verlangsamung des Wachstums. Ca. 15 % der Zellteilungen führen zu nicht lebensfähigen Nachkommen (Perals et al., 2000). Das Xer-System ist auf Grund seiner wichtigen Funktion hoch konserviert und es wurden *xerC*- und *xerD*-Homologe in vielen verschiedenen gram-negativen und gram-positiven Bakterien gefunden welche ein zirkuläres Chromosom besitzen (Recchia und Sherratt, 1999). XerC und XerD besitzen eine Aminosäuresequenzidentität von ca. 37%, was vermuten läßt, daß deren Gene einen gemeinsamen Ursprung haben. Die beiden Integrasen binden kooperativ an die palindromischen Sequenzen der *dif*-Stelle und ermöglichen ein "bending" der DNA. Anschließend katalysieren sie die sequenziellen Strangaustauschreaktionen, wobei beide Rekombinasen katalytisch autonom sind (Blakely et al., 1993; Arciszewska und Sherratt, 1995). Wie bereits erwähnt, werden die Gene für diese Rekombinasen in



vielen verschiedenen Bakterien gefunden. Die Expression des *ire* Gens von *S. aurantiaca*, das möglicherweise für eine putative XerC/XerD Rekombinase kodiert, wurde in einer RTPCR-Analyse untersucht. Die Primer Int1 und Int2 wurden so ausgewählt, daß sie mit Bereichen hybridisieren, die die hoch konservierte Box II enthalten. Wie Abbildung 2.20 A und B zeigt, läßt sich das Transkript im Wildtyp und in Mutante SM12 unter vegetativen nachgewiesen. Unter vegetativen Bedingungen findet ständig eine Zellteilung statt und somit ist die Expression einer XerC/XerD Rekombinase unter diesen Bedingungen sicher notwendig. Nach der Zugabe von Indol wandeln sich die vegetativen Zellen in resistente Sporen um (Gerth und Reichenbach, 1994). Dieser Vorgang ist nicht nach 15 min abgeschlossen. Unter diesen Bedingungen ist jedoch keine Transkript des *ire* Gens nachweisbar. Unter Hungerbedingungen (20 h) ist auch kein Amplifikat zu beobachten. Während der Fruchtkörperbildung kommt es zu einer massiven Zellyse und Umwandlung von vegetativen Zellen in die Fruchtkörpersporen. Dieser Prozeß ist nach 20 h sehr weit fortgeschritten, so daß auch keine Zellteilung mehr stattfindet und das XerC/XerD Rekombinase System offenbar nicht mehr benötigt wird.

## Teil II: Analyse der Fruchtkörperbildung von *S. aurantiaca*

Die Bildung von Fruchtkörpern, komplexe baumartige Strukturen, unter Hungerbedingungen bei *S. aurantiaca* ist ein Prozeß, über den nur wenig bekannt ist. In dieser Entwicklung finden Zellbewegung, Zellkommunikation und eine koordinierte zeitliche und räumliche Regulation von Genen, deren Produkte in diese Strukturbildung involviert sind statt. Der Lebenszyklus von *S. aurantiaca* beinhaltet die Bildung des Pheromons Stigmolon, eines niedermolekularen, extrazellulären Kommunikationsfaktors, welcher die Bildung von Aggregaten stimuliert (Hull et al., 1998; Plaga et al., 1998). Die Konstruktion und Analyse von *Tn5lacZ*-Mutanten führte zur Identifikation der beiden an der Fruchtkörperbildung beteiligten Gene, *fbfA* und *fbfB*, welche während dieses Prozesses exprimiert werden (Silakowski, 1996). Das Genprodukt von *fbfB* zeigt signifikante Homologien zur Galaktoseoxidase des Pilzes *Dactylium dendroides*. Dieses Enzym oxidiert spezifisch Galaktose und unspezifisch primäre Alkohole zu den entsprechenden Aldehyden und benötigt Kupfer als Cofaktor. Die konservierten Kupferbindestellen sind in dem putativen FbfB-Polypeptid vorhanden und es wird vermutet, daß dieses Protein an der Modifikation von Schleim an der bakteriellen Oberfläche und somit an der Vernetzung und Zellaggregat-Stabilisierung beteiligt ist (Silakowski et al., 1998). Stromaufwärts des *fbfB* Gens wurde ein weiteres Gen, *fbfA*, identifiziert, welches an der Fruchtkörperbildung beteiligt ist. FbfA besitzt signifikante Homologien zu NodC von Rhizobien, eine N-Acetylglucosaminyltransferase, die an der Bildung des Zuckerrückgrads von Nodulationsfaktoren, Signalmoleküle, die in der Knöllchenbildung eine wichtige Rolle spielen, beteiligt ist. Aufgrund der Homologie wird vermutet, daß das *fbfA*-Genprodukt an der Bildung von Signalmolekülen, welche in den komplexen Prozeß der Fruchtkörperbildung einbezogen sind, involviert ist (Silakowski et al., 1996).

Die Region stromabwärts von *fbfB* wurde genauer analysiert, was zur Identifikation des *mta* Genclusters (*mtaA-G*) führte. Die Genprodukte sind an der Bildung und Modifikation des Sekundärmetaboliten Myxothiazol, ein Inhibitor des bc<sub>1</sub>-Komplexes der Atmungskette, beteiligt (Beyer et al., 1999; Silakowski et al., 1999). Die Insertion eines Antibiotika-Resistenz-Gens in die Gene *mtaA* oder *mtaB* führte zu keinen sichtbaren Abweichungen in der Fruchtkörperbildung, das heißt, die Genprodukte sind nicht an der Bildung der Fruchtkörperstruktur beteiligt (Silakowski et al., 1998). Die Region stromabwärts des *fbfA* Gens war zu Beginn dieser Arbeit zwar sequenziert, es gab jedoch nur Hinweise auf die Existenz eines ORF ca. 1 kbp stromabwärts des *fbfA*

Stopkodons. Dieser ORF, *sspA*, kodiert für ein putatives Produkt mit Homologien zu dem humanen Phosphoprotein Synapsin IA, das in die Transmitterausschüttung am synaptischen Spalt involviert ist (Thiel, 1993; Silakowski et al., 1996).

### 3.9 Konstruktion einer *fbfB-fbfA*-Doppelmutante und Versuche zur genetischen Komplementation

Zu Beginn dieses Projektes lag die Information vor, daß die Produkte der *fbfB* und *fbfA* Gene an der Fruchtkörperbildung beteiligt sind. Mutanten mit einer Antibiotika-Resistenz-Kassette in diesen Genen (BS34 und BS14) sind nur zur Bildung von Aggregaten unter Hungerbedingungen fähig (Silakowski, 1996). Es sollte untersucht werden, ob diese beiden *fbf* Gene, wenn sie ektopisch in einer *fbfB-fbfA*-Doppelmutante integriert werden, den Phänotyp komplementieren können. Dazu wurde das Plasmid pSM3 konstruiert, welches zwei ca. 2.2 kbp Fragmente mit chromosomalen *S. aurantiaca*-Sequenzen enthält, sowie eine Tetracyclin-Resistenz-Kassette, die zwischen diesen Fragmenten liegt (Abb. 2.39 A). Eines dieser 2.2 kbp großen DNA-Fragmente enthält die stromabwärts-Region (ca. 1 kbp) von *fbfA*, das Gen *sspA* und dessen stromabwärts-Region. Das andere chromosomale DNA-Fragment enthält die ersten 20 bp des Gens *mtaB*, das Gen *mtaA*, die Region zwischen *mtaA* und *fbfB*, sowie 63 bp des Gens *fbfB*. Die Mutante SM1 (Abb. 2.39 B), welche durch das Ereignis der doppelten Rekombination von pSM3 mit dem Genom entstanden war, stellt eine *fbfB-fbfA*-Doppelmutante dar. Wie die *fbfB*- und *fbfA*-Mutante, kann auch SM1 nur Aggregate bilden (Abb. 2.41 B). Die beiden oben erwähnten *fbf*-Mutanten (BS14 und BS34) können phänotypisch durch Mischexperimente mit der nichtaggregierenden *Tn5lacZ*-Insertionsmutante AP191 (Abb. 2.41 C), bei der der Ort der Integration des Transposons noch ungeklärt ist, partiell phänotypisch komplementiert werden. Die Mischung der Zellen von BS34 (*fbfB*-Mutante) mit denen von AP191 vor dem Transfer auf das Hungermedium erzeugt champignonähnliche Fruchtkörper, die auch bei der Fruchtkörperbildung des Wildtyps nach ca. 15 h beobachtet werden. Die Mischung der Mutante BS14 (*fbfA*-Mutante) mit AP191 vor dem Hungern führt zur Bildung morchelartiger Strukturen, wie sie auch nach ca. 12 h beim Wildtyp auftritt (Silakowski et al., 1998). Die *fbfB-fbfA*-Doppelmutante SM1 wurde auch mit der *Tn5lacZ*-Insertionsmutante AP191 vor dem Transfer auf das Hungermedium gemischt, sie bildet aber nur klumige Aggregate aus, es findet also keine phänotypische Komplementation statt (Abb. 2.41 D). Dies Ergebnis läßt vermuten, daß eines der beiden *fbf* Gene in

intakter Form vorhanden sein muß, um eine partielle phänotypische Komplementation durch AP191 zu ermöglichen.

Es wurde nun untersucht, ob der Phänotyp der *fbfB-fbfA*-Doppelmutante SM1 durch die Bereitstellung der beiden *fbf* Gene in einem ektopischen Locus im Genom dieser Mutante komplementierbar ist. Dazu wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wurden die Gene in das *mta* Gencluster eingefügt, da dieser Genlocus nicht in die Fruchtkörperbildung involviert ist (Silakowski et al., 1998) und zum anderen wurden die *fbf* Gene mittels eines Plasmids mit der *attP* site des Myxophagen Mx8 über ortsspezifische Rekombination in die *attB* site eingefügt, da diese Art der Rekombination weitaus effizienter ist als die homologe Rekombination.

Zunächst wurde der Versuch unternommen, den Phänotyp der *fbfB-fbfA*-Doppelmutante SM1 durch die Integration der beiden *fbf* Gen in den *attB* Locus der Mutante SM1 zu komplementieren. Dazu wurde das Plasmid pSM9KAB1 (Abb. 2.42 A) konstruiert, welches eine Kanamycin-Resistenz-Kassette zur Selektion enthält und ein 2.9 kbp großes Fragment des Myxophagen Mx8 (Abb. 2.12 A), welches das Integrase kodierende Gen *intP* mit der *attP* site für die ortsspezifische Rekombination enthält. Zusätzlich enthält das Plasmid pSM9KAB1 ein ca. 3.6 kbp großes chromosomales DNA-Fragment mit den beiden Genen *fbfB* und *fbfA* sowie 609 bp der stromabwärts-Region von *fbfB* und 23 bp der stromabwärts-Region von *fbfA*. Dieses Plasmid wurde in seiner zirkulären Form in die Mutante SM1 transferiert was zu Mutante SM5 (Abb. 2.42 B) führte. Mutante SM5 bildet unter Hungerbedingungen eine heterogene Struktur, es sind Aggregate mit Ansätzen einer Stielbildung zu beobachten (Abb. 2.44 B). Dieses Projekt wurde durchgeführt, bevor bekannt war, das die ortsspezifischen Rekombination von Plasmiden in die *attB* site von *S. aurantiaca* einen Phänotyp verursacht. Die beiden Mutanten SM4 (Abb. 2. 3 B) und SM12 (Abb. 2.6), welche beide ein Plasmid in der *attB* site integriert haben, bilden unter Entwicklungsbedingungen eine heterogene Struktur aus (Abb. 2.5 B und Abb. 2. 8 B). Das Mischexperiment der Mutante SM5 mit der *Tn5lacZ*-Insertionsmutante AP191 führte zu einer partiellen phänotypischen Komplementation, es werden Aggregate mit Stielen und Sporangien gebildet (Abb. 2.44 D). Der Grund hierfür könnte darin liegen, daß die beiden *fbf* Gene in dem *attB* Locus nur zu einem gewissen Teil exprimiert werden und daß die Mutante AP191 eventuell durch den Zellkontakt Signalmoleküle, oder spezielle Faktoren zur Verfügung stellt, die diese Strukturbildung ermöglichen. Abschließend kann aber die Aussage getroffen werden, daß der *attB* Locus keinen geeigneten ektopischen

Genombereich darstellt, um die genotypische Komplementation der *fbfB-fbfA*-Doppelmutante SM1 zu untersuchen, da die Integration von Plasmiden in diesen Locus die Fruchtkörperbildung beeinträchtigt.

Der *mta* Genlocus stellt im Gegensatz dazu einen geeigneten Bereich im *S. aurantiaca* Genom dar, weil Integrationen von Antibiotika-Resistenz-Genen in die Gene *mtaA* und *mtaB* keinen Einfluß auf die Entwicklung unter Hungerbedingungen haben (Silakowski et al., 1998). Es wurde daher versucht, den Phänotyp der Mutante SM1 dadurch zu komplementieren, daß die beiden *fbf* Gene in das *mtaB* Gen integriert wurden. Für dieses Vorhaben wurde das Plasmid pSM33 konstruiert, welches eine Kanamycin-Resistenz-Kassette zur Selektion enthält, ein ca. 2.3 kbp großes Fragment des *mtaB* Gens für die homologe Rekombination in diesen Bereich und das 3.6 kbp große DNA Fragment mit den beiden *fbf* Genen, wie es bereits für das Plasmid pSM9KAB1 beschrieben wurde (Abb. 2.45 A). Nach einfacher Rekombination des Plasmids pSM33 mit dem Genom von Mutante SM1 wurde Mutante SM17 erhalten (Abb. 2.45 B), die dem Genotyp der Mutante SM1 entspricht, in dem die beiden *fbf* Gene weitgehend durch eine Tetracyclin-Resistenz-Kassette ersetzt sind. Zusätzlich sind die beiden *fbf* Gene ektopisch in dem *mtaB* Gen integriert. Die Analyse der Fähigkeit zur Fruchtkörperbildung lieferte jedoch ein unerwartetes Ergebnis. Die Mutante SM17 bildet Aggregate aus und durch ein Mischexperiment mit der nichtaggregierenden *Tn5lacZ*-Insertionsmutante AP191 konnte keine partielle phänotypische Komplementation der Fruchtkörperbildung erzielt werden (Abb. 2.47 B und D). Dieses Ergebnis verdeutlichte, daß die beiden *fbf* Gene, *fbfB* und *fbfA*, alleine nicht ausreichend sind, um den Phänotyp der *fbfB-fbfA*-Doppelmutante SM1 zu komplementieren. Es wurde vermutet, daß weitere Gene in der stromabwärts-Region von *fbfA* vorkommen, die an der Fruchtkörperbildung beteiligt sind. Diese Gene könnten in der Mutante SM1, in der die beiden *fbf* Gene weitgehend durch eine Tetracyclin-Resistenz-Kassette ersetzt sind, in ihrer Expression beeinträchtigt sein.

### 3.10 Genetische Analyse des stromabwärts-Bereiches des *fbfA* Gens

Da die Fruchtkörperbildung der *fbfB-fbfA*-Doppelmutante SM1 nicht durch eine ektopische Integration der beiden *fbf* Gene in den *mtaB* Locus komplementiert werden konnte, lag die Vermutung nahe, daß weitere Gene, deren Produkte an der Fruchtkörperbildung beteiligt sind, in der Mutante SM1 betroffen sind. Die stromabwärts-Region von *fbfB* war durch Insertionen von Antibiotika-Resistenz-Genen genauer analysiert worden; dadurch war der *mta* Gencluster identifiziert worden, der nicht in die Fruchtkörperbildung involviert ist (Silakowski et al., 1998; 1999). Der ORF *sspA*, mit einer Homologie zu dem humanen Phosphoprotein Synapsin IA, wurde ca. 1 kbp stromabwärts des *fbfA* Stopkodons identifiziert. Es war ungeklärt, ob das Genprodukt in der Entwicklung eine Rolle spielt, oder ob weitere entwicklungsrelevante ORFs in der Region zwischen *fbfA* und *sspA* oder stromabwärts von *sspA* vorhanden sind. Aufgrund einer erneuten Sequenzierung von *fbfA*, dessen stromabwärts-Region und *sspA* mit dessen stromabwärts-Region sollten neue ORFs identifiziert werden. Die Sequenzanalyse führte zur Modifikation des anfänglich vorhandenen Bildes des *fbf* Genclusters (Abb. 2.48). Ein neuer ORF, *fbfC*, konnte identifiziert werden. Das ATG-Startkodon von *fbfC* überlappt mit dem Stopkodon von *fbfA*. Das 1095 bp große *fbfC* Gen kodiert für ein putatives Protein von 365 Aminosäuren und besitzt keine Homologie zu bereits bekannten Proteinen. Weiter wurden durch die erneute Sequenzierung Fehler in der Sequenz von *sspA* identifiziert, die zu einer Verschiebung des Leserahmens und zu einer Vergrößerung des putativen Gens führten, das nun als *fbfD* gezeichnet wird. Zwischen den beiden Genen, *fbfC* und *fbfD*, liegen 16 bp. Das *fbfD* Gen besitzt ein GTG-Startkodon, besteht aus 1113 bp und kodiert für ein putatives Protein von 370 Aminosäuren. Das abgeleitete FbfD Polypeptid besitzt eine Homologie (25 % identische Aminosäuren) zu dem putativen OFR2 Protein von *M. xanthus*, das von einem Gen kodiert wird, welches stromaufwärts des Gens *argE* (kodierend für eine putative Acetylornithindeacetylase) gelegen ist (Abb. 2.49). Das OFR2 Genprodukt ist nicht an der Bildung von Fruchtkörpern in *M. xanthus* beteiligt (Harris und Singer, 1998). Die Gene *fbfA*, *fbfC* und *fbfD* werden in einer Richtung transkribiert, *fbfA* und *fbfC* überlappen und *fbfC* und *fbfD* sind nur durch wenige Basenpaare getrennt. Es könnte sich hier um ein Operon handeln, indem die Gene gemeinsam transkribiert werden und deren Produkte alle an der Fruchtkörperbildung beteiligt sind. Stromabwärts

von *fbfD* wurden weitere, kleine ORFs identifiziert, die aber alle keine Homologien zu bereits bekannten Proteinen aufweisen und keine charakteristischen Shine-Dalgarno-Sequenz besitzen. Die Beteiligung der *fbfC*- und *fbfD*-Genprodukte an der Fruchtkörperentwicklung von *S. aurantiaca* wurde durch die Insertion von Antibiotika-Resistenz-Kassetten in verschiedenen Stellen stromabwärts des *fbfA*- Stopkodons untersucht.

Das Gen *fbfC* enthält für die Insertion einer Antibiotika-Resistenz-Kassette zwei geeignete Restriktionsschnittstellen, *Eco* RI und *Bgl* II, die 26 und 745 bp stromabwärts des *fbfC*-Startkodons gelegen sind (Abb. 2.50). In diese wurde eine Kanamycin-Resistenz-Kassette eingefügt und die so erhaltenen Plasmide pSM9 (Abb. 2.51 A) und pSM10 (Abb. 2.52 A) wurden zur Konstruktion der Mutanten SM6 (Kan<sup>r</sup> in der *Bgl* II Schnittstelle; Abb. 2.51 B) und SM7 (Kan<sup>r</sup> in der *Eco* RI Schnittstelle; Abb. 2.52 B) verwendet. Die Analyse des Phänotyps von SM6 und SM7 zeigte, daß beide Mutanten nicht zur Bildung von Wildtyp-Fruchtkörpern fähig sind, sie bilden lediglich klumpige Aggregate (Abb. 2.54 B und C). Dies beweist die Beteiligung des putativen *fbfC* Genproduktes an der Fruchtkörperbildung von *S. aurantiaca*. Mutante SM6 wurde in einem Mischexperiment mit der *Tn5lacZ*-Insertionsmutante AP191 unter Hungerbedingungen auf eine phänotypische Komplementation untersucht. Die Fruchtkörperbildung der *fbfC*-Insertionsmutante SM6 konnte in diesem Experiment nicht komplementiert werden, das heißt sie bildet auch unter diesen Bedingungen den SM6 Phänotyp aus (Abb. 2.54 E). Das Phänomen der phänotypische Komplementation ist auch für andere Myxobakterien beschrieben (McVittie et al., 1962) und basiert vermutlich auf dem Austausch von Signalmolekülen und/oder auf Zellkontakten. Die beiden Mutanten SM6 und SM7 sind zur Bildung von Indol-induzierten Sporen fähig und die in den Aggregaten enthaltenen Sporen können unter geeigneten Nährstoffbedingungen wieder zu Schwärmen von vegetativen Zellen auskeimen. Die Fähigkeit zur Sporulation und die Lebensfähigkeit der in den Aggregaten enthaltenen Sporen ist trotz Insertion einer Antibiotika-Resistenz-Kassette in das *fbfC* Gen vorhanden.

Um zu klären, ob *fbfD* an der Fruchtkörperbildung beteiligt ist, wurde das Gen durch die Insertion des *neo* Gens in eine singuläre *Fse* I Schnittstelle inaktiviert. Diese Insertionsmutante SM8 (Abb. 2.55 B) bildet unter Hungerbedingungen lediglich Klumpen (Abb. 2.57 B). Der Phänotyp konnte in einem Mischexperiment mit der *Tn5lacZ*-Insertionsmutante AP191 nicht komplementiert werden (Abb. 2.57 D). Dieses

Ergebnis zeigt, daß auch das Genprodukt von *fbfD* an der Fruchtkörperbildung beteiligt ist. Mutante SM8 kann Indol-induzierten Sporen bilden und die in den Aggregaten enthaltenen Sporen scheinen zum Teil lebensfähig, da sie auf einem Vollmedium wieder zu vegetativen Schwärmen auskeimen können.

Um die Bedeutung weiterer kleiner ORFs stromabwärts von *fbfD* für die Fruchtkörperbildung zu untersuchen, die keine typische Shine-Dalgarno-Sequenz besitzen und keine Homologien zu bekannten Proteinen aufweisen, wurde das *neo* Gen in die *Pml* I-Restriktionsschnittstelle eingefügt, die 639 bp stromabwärts des *fbfD*-Stopkodons lokalisiert ist. Die erhaltene Mutante SM16 (Abb. 2.59) bildet unter Hungerbedingungen Wildtyp-Fruchtkörper (Abb. 2.61 B) mit lebensfähigen Sporen. Auch die durch Indolzugabe induzierbare Bildung von Sporen ist nicht beeinträchtigt. Dies zeigt, daß die putativen kleinen ORFs, die in einer Computeranalyse in diesem Bereich stromabwärts von *fbfD* gefunden wurden, für keine Genprodukte kodieren in an der Fruchtkörperbildung beteiligt sind.

Auch 3.7 bzw. 3.6 kbp stromabwärts des *fbfD*-Stopkodons wurde das *neo* Gen (in eine *Cla* I und *Avr* II Restriktionsschnittstelle; Abb. 2. 58) inseriert. Der Transfer der so konstruierten Plasmide pSM37 und pSM38 in den Wildtyp führte jedoch nur zur Bildung von Mutanten mit einfachem Rekombinationsereignis, obwohl beide in ihrer linearisierten Form transferiert wurden. Für eine doppelte Rekombination sind demnach größere homologe Bereiche auf beiden Seiten (größer als 0.4 kbp) notwendig.

### 3.11 Expression der Gene *fbfB* und *fbfA*

Die Beteiligung der beiden *fbf* Gene, *fbfA* und *fbfB*, an der Fruchtkörperbildung war durch die Konstruktion der beiden Insertionsmutanten BS14 und BS34 gezeigt worden (Silakowski et al., 1996, 1998). Diese bilden unter Hungerbedingungen nur Aggregate aus. Die Expression der beiden Gene war durch die Konstruktion von merodiploiden Mutanten analysiert worden, in denen die beiden Gene jeweils verkürzt an das promotorlose Indikatorgen  $\Delta trpA-lacZ$  fusioniert waren. Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach verschiedenen Zeiten in der Entwicklung hatte zeigt, daß das Gen *fbfA* bereits nach ca. 8 h exprimiert wird und ein Maximum der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität liegt nach ca. 40 h vor. Bei *fbfB* beginnt die Expression nach ca. 14 h, die maximale  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wird nach ca. 30 h erreicht (Silakowski et al., 1996; 1998). Unbekannt war, ob die Expression der beiden *fbf* Gene, *fbfA* und *fbfB*,



voneinander abhängig ist. Die beiden Gene sind in entgegengesetzten Transkriptionsrichtungen angeordnet. Ihre Startkodons liegen 153 bp auseinander (Abb. 2.48). Ein Überlappen beider Promotoren und damit eine gegenseitige Beeinflussung wäre möglich. Die Promotorstrukturen der beiden Gene sind nicht geklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgeprüft, ob die Expression von *fbfA* und *fbfB* von den Produkten der Gene *fbfC* und *fbfD* abhängig ist. Dies wurde mit Hilfe der RTPCR überprüft; doch können keine quantitativen Aussagen getroffen werden.

Die Expression des *fbfA* Gens wurde mittels spezifischer Primer untersucht, die stromaufwärts und stromabwärts der Insertionsstelle der Kanamycin-Resistenz-Kassette in der *fbfA*-Mutante BS14 hybridisieren und im Wildtyp zu einem 390 bp Amplifikat führen sollten. Die Mutante BS14 diene als negative Kontrolle. Im *S. aurantiaca* Wildtyp (Abb. 2.79), findet man das 390 bp Amplifikat unter vegetativen Bedingungen und während der Indol-Behandlung in geringer Menge. Diese Art der RTPCR zeigt lediglich das Vorhandensein der mRNA an, ohne eine quantitative Aussage zu treffen. Unter Hungerbedingungen ist das 390 bp RTPCR-Produkt in dem Zeitraum zwischen 4 und 30 h deutlich sichtbar. In der merodiploiden *fbfA* Mutante (BS23), in der die Expression über den Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt wurde, ist ein Anstieg der Aktivität nach ca. 8 h sichtbar, ein Maximum wird nach ca. 40 h erreicht (Silakowski et al., 1996). Bei der RTPCR genügen bereits Spuren der spezifischen RNA um ein positives Ergebnis zu erhalten. 40 h nach Beginn des Hungerns konnte in der RTPCR kein Amplifikat detektiert werden, was vermutlich dafür spricht, daß die *fbfA*-mRNA schneller abgebaut wird als das  $\beta$ -Galaktosidase-Protein. In einer Northern-Analyse konnte die *fbfA*-Expression nur nachgewiesen werden, wenn das verkürzte Gen an das *pufBA*-Fragment von *Rhodobacter capsulatus* fusioniert wurde. Das *pufBA*-Fragment kodiert für die pigmentbindenden Proteine des LHI-Komplexes und dessen Transkript besitzt eine Halbwertszeit von 30 min, da am 3'-Ende eine spezifische, stabile "hairpin-loop"-Struktur vorhanden ist. Die *fbfA*-Expression konnte indirekt während der Entwicklung zw. 8 und 64 h nachgewiesen werden, wenn das *pufBA*-Fragment als Sonde diene. Es wurde gefolgert, daß das *fbfA*-Transkript sehr instabil ist (Silakowski et al., 1996). Ein "Primer-Extension"-Experiment führte zu keinem Ergebnis, was auf die geringe Expression und/oder auf die Instabilität der mRNA von *fbfA* zurückzuführen ist. Über die Promotorstruktur der *fbf* Gene kann bei *S. aurantiaca* bisher keine Aussage gemacht werden.

Zusätzlich ist in der RTPCR-Analyse ein unspezifisches Amplifikat von ca. 250 bp vorhanden, welches nach Klonierung sequenziert wurde. Durch eine Computeranalyse konnte keine signifikante Homologie zu anderen Proteinen gefunden werden. Dieses Amplifikat ist während der Indol-Behandlung und auch in der Entwicklung (8-30 h) sichtbar. Die Expression des *fbfA* Gens in der *fbfB*-Mutante (BS34), der *fbfA*-Mutante (BS14), der *fbfC*-Mutante (SM6) und der *fbfD*-Mutante (SM8) wurde untersucht (Abb. 2.80). Die RNA aus vegetativen und Indol-behandelten Zellen (10 min) sowie aus Zellen, die 15 h auf Wasseragarplatten inkubierten, wurde verwendet. In der *fbfB*-Mutante und im Wildtyp ist das *fbfA* Transkript unter allen Bedingungen nachweisbar. Auch das unspezifische Amplifikat ist vorhanden. Dies zeigt, daß das *fbfB*- Genprodukt keinen Einfluß auf die *fbfA*-Transkription ausübt. Aussagen über den Einfluß auf die Transkriptionsstärke oder den Verlauf der Expression können mit einer solchen RTPCR nicht getroffen werden. In der Mutante BS14 (diente als Negativkontrolle) konnte nur das unspezifische Amplifikat nachgewiesen werden. Ein *fbfA*-Transkript war in den Mutanten SM6 (*fbfC*-Mutante) und SM8 (*fbfD*-Mutante) vorhanden. Diese beiden Gene liegen stromabwärts des *fbfA* Gens und beeinflussen dessen Expression nicht. Da die Gene *fbfA*, *fbfC* und *fbfD* alle in einer Transkriptionsrichtung liegen und dicht geclustert sind, könnte man vermuten, daß sie in einem Operon gelegen sind. Das RTPCR Ergebnis der *fbfA*-Expression in den Mutanten SM6 und SM7, welche eine Kanamycin-Resistenz-Kassette stromabwärts von *fbfA*, in den Genen *fbfC* und *fbfD* enthalten, liefert aber keine Beweise für diese Hypothese, da die Insertion einer Resistenz-Kassette stromabwärts von *fbfA*, selbst wenn die drei *fbf* Gene in einem Operon liegen würden, auf die *fbfA* Transkription keinen Einfluß hätte.

Auch das Transkript von *fbfB* wurde analog zu *fbfA* mittels RTPCR in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien untersucht. Das *fbfB*-spezifische Amplifikat von 351 bp wird beim *S. aurantiaca* Wildtyp in vegetativen und in Indol-behandelten Zellen in geringer Menge erhalten. Während des Hungerns (4-20 h) ist das Transkript gut nachweisbar (Abb. 2.81). Nach 30 h Entwicklung scheint keine *fbfB*-RNA mehr vorhanden zu sein. Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in der merodiploiden *fbfB*-Mutante BS35, die ein verkürztes *fbfB* Gen an das promotorlose  $\Delta trpA-lacZ$ -Konstrukt fusioniert enthält, hat gezeigt, daß unter vegetativen Bedingungen nur eine geringe Aktivität vorhanden ist. Ein Anstieg der Aktivität war nach ca. 14 h in der Entwicklung nachweisbar. Das Maximum der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität war nach 30 h erreicht (Silakowski et al., 1998). Eine weitere *fbfB*-Mutante (BS34), bei der ein

verkürztes *fbfB*-Fragment an das *pufBA*-Fragment von *Rhodobacter capsulatus* fusioniert ist, war für eine Northern-Analyse verwendet worden, da mit RNA aus Wildtyp-Zellen kein Signal detektierbar war. Unter vegetativen Bedingungen konnte keine *fbfB*-Expression nachgewiesen werden. Bei der Fruchtkörperbildung wurde ein schwaches Signal nach 8 h entdeckt, des im Verlauf der Entwicklung stärker ausgeprägt sichtbar wurde. Nach 24 h ist das Signal aber nur noch schwach vorhanden. Es wurde postuliert, daß die mRNA von *fbfB* nur in geringen Mengen gebildet wird und/oder das Transkript sehr instabil ist (Silakowski et al. 1998). Nach 30 h Hungern konnte mit der RTPCR kein *fbfB*-Transkript mehr nachgewiesen werden, was auch für einen schnellen Abbau der mRNA spricht. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in der merodiploiden *fbfB*-Mutante BS35 erreichte ein Maximum nach ca. 30 h, was auf einen langsameren Abbau der  $\beta$ -Galaktosidase-mRNA oder des  $\beta$ -Galaktosidase-Proteins hinweist.

Die Expression des *fbfB* Gens wurde in den verschiedenen *fbf*-Mutanten untersucht, um einen möglichen Einfluß der Genprodukte auf die *fbfB*-Expression aufzudecken. Analog der Analyse der *fbfA*-Expression wurde die RNA aus verschiedenen Entwicklungsstadien der Mutanten BS14 (*fbfA*-Mutante), SM6 (*fbfC*-Mutante) und SM8 (*fbfD*-Mutante) untersucht (Abb. 2.82). Die Transkription von *fbfB* konnte in allen genannten Mutanten nachgewiesen werden, was zeigt, daß die Genprodukte von *fbfA*, *fbfC* und *fbfD* prinzipiell keinen Einfluß auf die *fbfB*-Expression haben. Natürlich kann auch hier keine Aussage über die Transkriptionsstärke gemacht werden.

## **3.12 Analyse der *fbfC*-Expression**

### **3.12.1 RTPCR-Analyse der *fbfC*-Expression**

Auch zum Nachweis des *fbfC*-Transkriptes unter verschiedenen physiologischen Bedingungen im Wildtyp und in Mutanten wurde die RTPCR eingesetzt. Dazu wurden Primer verwendet, die stromaufwärts bzw. stromabwärts der Insertionsstelle des *neo* Gens in der *fbfC*-Mutante SM6 hybridisieren. Mutante SM6 wurde als Negativkontrolle verwendet. Im Wildtyp ist die Expression in vegetativen und in Indol-behandelten Zellen nur schwach zu erkennen. Unter Hungerbedingungen wird ein positives Signal im Zeitraum von 4-40 h deutlich sichtbar (Abb. 2.62). In der *fbfB*-Mutante (BS34), der *fbfA*-Mutante (BS14) und der *fbfD*-Mutante (SM8) ist die Expression während der

Fruchtkörperbildung gut sichtbar. In vegetativen Zellen und nach Indol-Behandlung ist ein spezifische Amplifikat zu erkennen (Abb. 2.63).

### 3.12.2 Studien zur *fbfC*-Expression, in Abhängigkeit von anderen *fbf*-Genprodukten

Die Beteiligung des *fbfC*-Genproduktes an der Fruchtkörperbildung konnte durch die Konstruktion der beiden *fbfC*-Mutanten SM6 und SM7 (Abb. 2.51 und Abb. 2.52), welche eine Antibiotika-Resistenz-Kassette an verschiedenen Stellen in der kodierenden Sequenz enthalten, bewiesen werden. Sie bilden unter Hungerbedingungen lediglich Aggregate (Abb. 2.54 B und C). Der Nachweis der *fbfC*-Expression mittels RTPCR zeigte, daß die Genprodukte von *fbfB*, *fbfA* und *fbfD* keinen Einfluß auf die Expression haben. Doch kann keine Aussage über den Einfluß auf den Verlauf der Expression oder auf die Expressionsstärke gemacht werden. Um weitere Information über den zeitlichen Verlauf und über die Abhängigkeit von anderen *fbf*-Genprodukten zu erhalten, wurden merodiploide Mutanten hergestellt, in denen das Indikatorgen  $\Delta trpA-lacZ$  and das 3'-verkürzte *fbfC* Gen fusioniert wurde.

Das Stopkodon des *fbfA* Gens überlappt mit dem Startkodon von *fbfC* und beide Gene sind in einer Richtung angeordnet (Abb. 2.48). Da die Informationen über Start- und Stopkodons nur durch eine Computeranalyse gewonnen wurden, sollte dies auch auf genetischer Ebene überprüft werden. Dazu wurde die merodiploide Mutante SM10 durch eine Transformation des *S. aurantiaca* Wildtyps mit dem Plasmid pSM17 konstruiert (Abb. 2.64). Das Plasmid enthält ein *Eco* RI/ *Bgl* II-Fragment des *fbfC* Gens, auf welchem die ersten 26 bp des Gens fehlen. Dieses auch 3'-verkürzte *fbfC*-Fragment liegt in einer transkriptionellen Fusion mit dem  $\Delta trpA-lacZ$ -Konstrukt vor. Die merodiploide Mutante SM10 besitzt also stromabwärts des integrierten Plasmids pSM17 ein verkürztes *fbfC* Gen (die ersten 26 bp fehlen), das *fbfD* Gen und dessen stromabwärts-Region (Abb. 2.64 B). Unter Hungerbedingungen bildet Mutante SM10 klumpige Aggregaten (Abb. 2.66 B). Dies beweist, daß der tatsächliche Genstart von *fbfC* stromaufwärts der *Eco* RI-Schnittstelle gelegen ist.

Durch die Anordnung der Gene *fbfA*, *fbfC* und *fbfD* in einer Transkriptionsrichtung lag die Vermutung nahe, daß diese Gene, deren Produkte alle an der Fruchtkörperbildung beteiligt sind, ein Operon bilden. Die Überprüfung der *fbfC*-Expression durch eine RTPCR zeigte, daß *fbfC* in der *fbfA*-Mutante BS14 exprimiert wird (Abb. 2.63). Dies war der erste Hinweis darauf, daß *fbfA* und *fbfC* kein bicistronisches Operons bilden, da

sonst *fbfC* in der Mutante BS14 (*fbfA*-Mutante) nicht exprimiert würde. Der Nachweis des *fbfC*-Transkriptes in der *fbfD*-Mutante SM8 gibt aber keinen Aufschluß darüber, ob *fbfC* und *fbfD* ein Operon bilden, da das *neo* Gen in der Mutante SM8 stromabwärts von *fbfC* gelegen ist. Zur Bestätigung der Unabhängigkeit der *fbfC*-Expression von *fbfA* wurden zwei merodiploide Mutanten konstruiert, SM11 und SM18. Die merodiploide Mutante SM11 enthält stromabwärts des integrierten Plasmids pSM22, in dem *fbfC* verkürzt an das  $\Delta trpA-lacZ$ -Konstrukt fusioniert ist, das Gen *fbfA* mit 300 bp seiner Promotorregion, sowie die Gene *fbfC* und *fbfD* (Abb. 2.67 A und B). Unter Hungerbedingungen bildet SM11 Wildtyp-Fruchtkörperstruktur (Abb. 2.70 B). Mit dieser merodiploiden Mutante wurde gezeigt, daß die in dieser Mutante vorhandenen 300 bp der stromaufwärts-Region von *fbfA* für die Expression von *fbfA* ausreichend sind. Wäre ein größerer Bereich für die Expression notwendig, so würde Mutante SM11 keine Wildtyp-Fruchtkörper bilden. Die merodiploide Mutante SM18 enthält stromabwärts des integrierten Plasmids pSM45, in dem *fbfC* an das  $\Delta trpA-lacZ$ -Konstrukt fusioniert ist, das Gen *fbfA* ausgehend von seinem ATG-Startkodon, sowie die Gene *fbfC* und *fbfD* (Abb. 2.68 B). Der Wildtyp-Phänotyp der Mutante SM18 (Abb. 2.70 C) beweist, daß die Gene *fbfC* und/oder *fbfD*, die stromabwärts des Plasmids pSM45 vorliegen, nicht von *fbfA* abhängig sind. Da in den beiden merodiploiden Mutanten das *fbfC* Gen verkürzt an das  $\Delta trpA-lacZ$ -Konstrukt fusioniert vorliegt, konnte die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase und somit indirekt die *fbfC*-Expression analysiert werden. In vegetativen Zellen ist nur eine geringe  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität vorhanden. Während der Fruchtkörperentwicklung steigt die Aktivität nach ca. 8 an, und nach ca. 40 h wird das Maximum erreicht (Abb. 2.71). Die *fbfC*-Expression verläuft analog der des *fbfA* Gens, obwohl beide Gene in keinem Operon liegen.

Die Promotorregion von *fbfC* wurde eingehender analysiert. In der *fbfA*-Mutante BS14 (Abb. 2.63), die die Kanamycin-Resistenz-Kassette 636 bp stromaufwärts des *fbfC*-Startkodons enthält, konnte die *fbfC*-Expression mit Hilfe der RTPCR nachgewiesen werden. Damit liegt die *fbfC*- Promotorregion in diese ca. 600 bp große Bereich vor. Die merodiploide Mutante SM26 wurde konstruiert, um die Promotorregion von *fbfC* weiter eingrenzen zu können. Mutante SM26 (Abb. 2.72 B) besitzt stromabwärts des integrierten Plasmids pSM65 (Abb. 2.72 A) die beiden Gene *fbfC* und *fbfD* sowie 211 bp der stromaufwärts-Region von *fbfC*. Mutante SM26 bildet nur klumpige Fruchtkörper (Abb. 2.74). Dies beweist, daß der Promotor von *fbfC* sich über mehr als 211 bp erstreckt. Andernfalls müßten Wildtyp-Fruchtkörper gebildet werden. Für die

Promotorregionen von *S. aurantiaca* Genen, speziell von Genen, welche in die Fruchtkörperbildung involviert sind, stehen keine Sequenzdaten zur Verfügung. Dies erschwert es ganz wesentlich Aussagen über Promotorstrukturen bei *S. aurantiaca* zu treffen. Dennoch konnte mit Hilfe der Mutante SM26 die *fbfC*-Promotorregion in den bp 211-636 stromaufwärts von *fbfC* lokalisiert werden.

Da die RTPCR-Analyse der *fbfC*-Expression in den verschiedenen *fbf*-Mutanten keine Aussage liefern konnte über den Einfluß auf den Expressionsverlauf und/oder die Expressionsstärke, wurden zusätzliche Mutanten konstruiert um die *fbfC*-Expression genauer analysieren zu können. Das Plasmid pSM74 (Abb. 2.75 A) wurde für dieses Vorhaben hergestellt. Es enthält eine Tetracyclin- und Kanamycin-Resistenz-Kassette zur Selektion, sowie ein ca. 2.9 kbp großes DNA-Fragment des Myxophagen Mx8 mit dem Integrase kodierenden Gen *intP*, welches die *attP* site für die ortsspezifische Integration enthält. Um die Expression von *fbfC* bestimmen zu können enthält das pSM74 zusätzlich ein verkürztes *fbfC* Gen fusioniert an das  $\Delta trpA-lacZ$ -Konstrukt sowie das *fbfA* Gen mit 300 bp seiner stromaufwärts-Region. Plasmid pSM74 wurde in die *attB* site des Wildtyps, der *fbfD*-Mutante SM8, der *fbfB*-Mutante BS34 und der *fbfA*-Mutante BS14 eingefügt (Abb. 2.75 B-E). Somit sollte der Einfluß der jeweils durch die Insertion einer Antibiotika-Resistenz-Kassette unterbrochenen *fbf* Gene auf die *fbfC*-Expression analysiert werden. Die Mutante SM27 enthält das Plasmid pSM74 integriert in der *attB* site des *S. aurantiaca* Wildtyps. Integrationen von Plasmiden, die lediglich eine Antibiotika-Resistenz-Kassette und das ca. 2.9 kbp Mx8 DNA-Fragment mit *intP* enthalten, haben die Bildung heterogener Fruchtkörper zur Folge (Abb. 2.8 B). Der Einfluß der Integration von Plasmiden in die *attB* site von *S. aurantiaca* wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht und ist im vorhergehenden Abschnitt der Diskussion behandelt. Der Grund für den überwiegend klumpigen Fruchtkörper der Mutante SM27 (erwartet wurde ein heterogener Phänotyp) ist nicht bekannt. Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität und somit der Expression von *fbfC* in der Mutante SM27 zeigt, daß nach ca. 8 h Hungern ein Anstieg erfolgt, der Verlauf und die Höhe der Aktivität ist aber stark vermindert (Abb. 2.78). Dies ist augenfällig, wenn man die *fbfC*-Expression mit der der beiden merodiploiden *fbfC*-Mutanten SM11 und SM18 vergleicht, bei denen die Expression von *fbfC* im Wildtyp-Locus bestimmt wurde (Abb. 2.71). Solche Phänome wurden auch für die *attB* site in *M. xanthus* unter anderem für die Expression von *csgA*, einem in der Entwicklung von *M. xanthus* transkribierten Gen, beobachtet. Die Autoren diskutierten die Möglichkeit, daß die chromosomale Position

eine wichtige Rolle bei der Expression spielt und/oder, daß die Chromosomenabschnitte in der Entwicklung in verschiedenen Kondensationszuständen vorliegen und dies einen Einfluß auf die Expression ausübt (Li und Shimkets, 1988; Fisseha et al., 1996). Negatives "supercoiling" von DNA-Bereichen kann biologische Prozesse wie Replikation, Transposition, Rekombination and Transkription beeinflussen (Drlica, 1992). Die Transkription kann aber auch "supercoils" in der DNA erzeugen, die wiederum einen Effekt auf die Aktivierung oder auf das "silencing" von bestimmten Promotoren ausüben wie es z.B. für den *leu-500* Promotor von *Salmonella typhimurium* beschrieben wurde (Hanafi und Bossi, 2000).

Die Mutanten SM28, SM29 und SM30 sind Derivate der *S. aurantiaca* Mutanten SM8 (*fbfD*-Mutante), BS34 (*fbfB*-Mutante) und BS14 (*fbfA*-Mutante), welche das Plasmid pSM74 in der *attB* site enthalten. Alle genannten Mutanten, die für die Transformation mit dem Plasmid pSM74 verwendet wurden, bilden lediglich unstrukturierte Aggregate. Der Phänotyp der Mutanten SM28, SM29 und SM30 (Bildung von Aggregaten unter Hungerbedingungen; Abb. 2.78 C-E) entspricht dem der zu ihrer Konstruktion verwendeten Ausgangsstämmen. In diesen Mutanten wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität und somit die Expression von *fbfC* unter Entwicklungsbedingungen bestimmt (Abb. 2.78). Mutante SM30 zeigt analog der Mutante SM27 (Wildtyp-Hintergrund) eine stark verminderte *fbfC*-Expression. Daraus kann geschlossen werden, daß das *fbfA*-Genprodukt einen Einfluß auf die *fbfC*-Expression ausübt. Das *fbfA* Gen kodiert für ein putatives Protein mit Homologie zu NodC aus Rhizobien, eine N-Acetylglucosaminyltransferase, die an der Bildung von Signalmolekülen beteiligt ist. Möglicherweise könnte das *fbfA*-Genprodukt Transkriptionsaktivatoren in ihrer Funktion beeinflussen. Weiter könnte eine spezielle Überstruktur der DNA im Umfeld des *attB* Locus die Transkription von Genen an dieser Stelle direkt beeinflussen oder Transkriptionsaktivatoren könnten aufgrund dieser Struktur ihren Wirkungsort, den Promotor von *fbfC*, nicht erreichen oder binden.

Die Mutanten SM28 und SM29 zeigen im Vergleich zur Mutante SM27 eine verstärkte Expression von *fbfC*, obwohl diese jeweils in dem *attB* Locus analysiert wurde (Abb. 2.78). Der zeitliche Verlauf ist ähnlich dem, der am Wildtyp-Locus bestimmt wurde (siehe Abb. 2.71). Die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase in SM28 und SM29 ist im Vergleich zu der in SM27 nach 20 h Hungern um das 3.5-4fache erhöht. Beide Mutanten (SM28 und SM29) besitzen eine Insertion einer Antibiotika-Resistenz-Kassette in den Genen

*fbfB* und *fbfD* (Abb. 2.75 C und D). Man kann folgern, daß die Inhibition der *fbfB*- und *fbfD*-Expression einen positiven Einfluß auf die Expression des *fbfC* Gens ausübt. Eine weitere Möglichkeit wäre auch hier die veränderte DNA-Topologie im Bereich der *attB* site dieser beiden Mutanten, die womöglich eine verstärkte Transkription des *fbfC* Gens ermöglicht.

### 3.13 Analyse der *fbfD*-Expression

#### 3.13.1 RTPCR-Analyse der *fbfD*-Expression

Analog den bereits diskutierten *fbf* Genen, wurde die Expression von *fbfD* auch mit der RTPCR analysiert. Zunächst wurden verschiedene Primer-Kombinationen getestet, die aber entweder zu keinem oder zu einem unspezifischen Amplifikat führten. Das *fbfD* Gen besitzt einen besonders hohen GC-Gehalt und viele repetetive Sequenzen, was womöglich zu den beschriebenen Ergebnissen führte. Die beiden Gene *fbfC* und *fbfD* sind 16 bp voneinander getrennt und liegen in einer Transkriptionsrichtung. Es konnte gezeigt werden, daß die beiden Gene *fbfA* und *fbfC*, deren Start- und Stopkodons überlappen, kein Operon bilden. Da die Analyse der *fbfD*-Expression nicht mit *fbfD*-spezifischen Primern durchgeführt werden konnte, wurde ein Primerpaar konstruiert, bei dem einer der Primer 128 bp stromaufwärts des *fbfC* Stopkodons hybridisierte und der andere 109 bp stromabwärts des *fbfD* Startkodons. Mit diesen Primern konnte die *fbfD*-Expression analysiert werden, da ein Amplifikat entstand, dessen Sequenz überprüft wurde. Aufgrund der Existenz dieses Amplifikats konnte auch bewiesen werden, daß die beiden Gene, *fbfC* und *fbfD*, in einem Operon lokalisiert sind. Das spezifische Amplifikat von 256 bp ist im Wildtyp unter vegetativen Bedingungen und nach Indol-Behandlung in geringen Mengen nachweisbar. Unter Entwicklungsbedingungen findet man das spezifische Produkt zw. 4-40 h nach Beginn des Hungerns (Abb. 2.83). Analog zur *fbfC*-Expression findet man das spezifische Produkt in der *fbfB*- (BS34), in der *fbfA*- (BS14) und der *fbfD*-Mutante (SM8). Das *fbfC*/*fbfD*-Transkript läßt sich nicht in der *fbfC*-Mutante (SM6; Abb. 2.85) nachweisen. Dieses Ergebnis kommt dadurch zustande, daß die Primer beide stromabwärts der inserierten Antibiotika-Resistenz-Kassette in der Mutante SM6 hybridisieren. Das positive Ergebnis in der Mutante SM8 (*fbfD*-Mutante) kann damit erklärt werden, daß die beiden Primer stromaufwärts der inserierten Antibiotika-Resistenz-Kassette in der Mutante SM8 hybridisieren.



### 3.13.2 Weitere Studien zur *fbfD*-Expression

Zur Analyse der *fbfD*-Expression wurden zusätzlich verschiedene merodiploide Mutanten konstruiert. Zunächst wurde unter Verwendung des Plasmids pSM31 die merodiploide Mutante SM14 hergestellt. Plasmid pSM31 (Abb. 2.85 A) enthält ein verkürztes *fbfB* Gen, die Gene *fbfA*, *fbfC* und ein verkürztes *fbfD* DNA-Fragment, welches an das  $\Delta trpA-lacZ$ -Konstrukt fusioniert ist. Die mit diesem Plasmid nach einfache Rekombination selektionierte, merodiploide Mutante SM14 enthält stromabwärts des integrierten Plasmids pSM31 also ein verkürztes *fbfB* Gen und die Gene *fbfA*, *fbfB* und *fbfC* (Abb. 2.85 B). Die Mutante bildet normale, dem Wildtyp entsprechende Fruchtkörper aus (Abb. 2.87). Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach unterschiedlichen Zeiten der Entwicklung zeigt einen stetigen Anstieg der Aktivität (Abb. 2.88). Zur Detektion eines Maximums der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität hätten weitere Untersuchungen nach längeren Inkubationszeiten erfolgen müssen.

Die Konstruktion der beiden Mutanten SM21 und SM22, sollte einen weiteren Aufschluß über die stromaufwärts-Region von *fbfC* und somit auch von *fbfD* liefern. Die Mutante SM21, die durch Insertion von pSM47 hergestellt wurde, enthält stromabwärts des integrierten Plasmids die beiden Gene *fbfC* und *fbfD*, sowie 360 bp der stromaufwärts-Region von *fbfC* (Abb. 2.89 A). Aufgrund der diskutierten putativen Promotorregion von *fbfC*, sollte diese Mutante Wildtyp-Fruchtkörper bilden. Die Mutante bildet jedoch unstrukturierte Aggregate (Abb. 2.91 B). Auch die Konstruktion der merodiploiden Mutante SM22 (Abb. 2.89) führte zu einem unerwarteten Ergebnis. Diese enthält stromabwärts des integrierten Plasmids pSM53 die beiden *fbf* Gene, *fbfC* und *fbfD*, sowie 1 kbp der stromaufwärts-Region von *fbfC*. Auch SM22 bildet lediglich Aggregate unter Hungerbedingungen (Abb. 2.91 C). Die beiden merodiploiden Mutanten SM11 und SM18 (Abb. 2.67 B und Abb. 2.68 B), die stromabwärts der integrierten Plasmide die Gene *fbfA*, *fbfC* und *fbfD* enthalten, entweder mit 300 bp der stromaufwärts-Region von *fbfA* oder beginnend mit dem ATG-Startkodon von *fbfA*, sind zur Bildung von Wildtyp-Fruchtkörpern fähig (Abb. 2.70 B, C). Es scheint, daß die kodierende Sequenz des *fbfA* Gens für die Expression der beiden Gene *fbfC* und *fbfD* notwendig ist. Die detektierte Expression von *fbfC* und *fbfD* in der *fbfA*-Mutante BS14 sagt nichts über die Höhe der Expression der beiden Gene aus, da die RTPCR keine quantitative Methode darstellt. Es könnte also auch hier ein größerer Bereich stromaufwärts der beiden Gene für die korrekte Aktivierung und für die volle Transkription notwendig sein. Eine

spezifische Überstruktur der DNA in diesem Bereich könnte die Expression der beiden *fbf* Gene beeinflussen und/oder für die Bindung von Transkriptionsaktivatoren essentiell sein.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien und Lösungen

##### Spezielle Chemikalien

Aqua-Phenol	Roth
Agarose	Sigma
Ammoniumacetat	J.T.Baker
Ampicillin-Natriumsalz	Serva
Bacto Agar	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bovine Serum Albumin (BSA)	Serva
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (X-Gal)	Biomol
Bromphenolblau	Chroma
2-Butanol	Merck
Casiton	Difco
Calciumchlorid	J.T.Baker
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Merck
Complete™	Roche Diagnostics
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dinatrium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro) Tricyclo [3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decan} -4-yl) phenylphosphat (CSPD)	Roche Diagnostics
Dithiothreitol (DTT)	Serva
Essigsäure 100 %	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Serva
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ficoll	Serva
Formaldehyd	J.T.Baker
Formamid	Sigma
D(+)-Glukose(-Monohydrat)	Merck
Glyzerin	Roth
Glycin	Applichem
Indol	Sigma
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydroxyd	Roth
Kaliumphosphat	Merck
Kanamycinsulfat	Serva
Lithiumchlorid	Merck
LMP-Agarose	FMC Bioproducts
Magnesiumchlorid	J.T.Baker
Magnesiumsulfat	Merck

Maleinsäure	Merck
4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (4-MUG)	Sigma
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Serva
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Natriumacetat	J.T.Baker
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydroxyd	J.T.Baker
Natrium-Lauroylsarcosin	Fluka
Oxytetracyclin-HCl	Serva
Phenol, TE gesättigt	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Polyethylenglykol (PEG) 8000	Sigma
Polyvinylpyrrolidon	Serva
Saccharose	J.T.Baker
Salzsäure, 37%	Merck
Sephadex G50 fine	Pharmacia
Streptomycinsulfat	Serva
Tetracyclinhydrochlorid	Roche Diagnostics
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Serva
Tween 20	Merck
Xylencyanol FF	Serva

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim  
 Carl Roth GmbH, Karlsruhe  
 Merck, Darmstadt  
 Sigma, Deideshofen

#### 4.1.2 Spezielle Artikel und Geräte

Analysenwaage	Sartorius
Binocular M420	Leica
Biodyne A, B Blotting Membran	Pall
Blotting Papier GB002	Schleicher & Schüll
Digitale Kamera Olympus DP10	Olympus
Elektroporationsgerät (GenePulser)	BioRad
Fluoreszenz-Spektrophotometer RF 5301PC	Shimadzu
Geltrockner	Hoefer
Glasperlen (0.1 mm)	Bühler
Glaswolle, silikonisiert	Serva
Mikroskop Leica M420	Leica
Mikrowellplatten (96 well)	Nunc
Neubauer Zählkammer	Schreck
PCR-Maschinen (TGradient, T3Thermocycler)	Biometra
Photometer, Uvicon 810 P	Kontron
Photometer, Ultraspec 3000	Pharmacia

Polymax-Schüttler  
 Röntgenfilme X-O-Mat  
 Sonifier B-15 (Mikrotip, Cuphorn)  
 Speed-Vac-Konzentrator  
 Stereolupe Wild M 10  
 Stratalinker 1800  
 Tischzentrifuge Biofuge A  
 Vakuum Blotter  
 Vakuumfiltrationsgerät GV 025/3  
 Zentrifugen, Ultrazentrifugen

Heidolph  
 Kodak  
 Branson  
 Bachhofer  
 Leica  
 Stratagene  
 Heraeus  
 Appligene  
 Schleicher & Schüll  
 Beckmann

#### 4.1.3 Radioaktives Material

$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml

Amersham

#### 4.1.4 Enzyme und Kitsysteme

##### Enzyme

Biotin High Prime  
 DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)  
 Lysozym  
 Proteinase K  
 Alkalische Phosphatase  
 PowerScript DNA-Polymerase  
 Restriktionsenzyme

Roche Diagnostics  
 Roche Diagnostics  
 Serva  
 Roche Diagnostics  
 Roche Diagnostics  
 PanSystems  
 Roche Diagnostics,  
 Biolabs, Promega  
 Roche Diagnostics  
 Promega  
 Roche Diagnostics  
 Roche Diagnostics  
 Roche Diagnostics  
 Biolabs

RNase, DNase frei  
 Taq DNA-Polymerase  
 T4 DNA-Ligase  
 T4 DNA-Polymerase  
 T4 Polynucleotidkinase  
 Vent DNA-Polymerase

##### Kitsysteme

Access RTPCR System  
 Bio Rad Protein Assay  
 Biotin Luminescent Detektion Kit  
 GeneClean Kit II  
 Nick Translation Kit  
 Plasmidisolierungskit Nucleobond  
 Plasmidisolierungskit Nucleospin  
 QIAquick PCR Reinigungs Kit  
 QIAquick Gel Extraktraktions Kit  
 Zero Blunt Topo PCR Cloning Kit

Promega  
 Bio Rad  
 Roche Diagnostics  
 QBIOgene  
 Roche Diagnostics  
 Macherey & Nagel  
 Macherey & Nagel  
 Qiagen  
 Qiagen  
 Invitrogen

## 4.1.5 Nukleinsäuren

### Nukleotide

Desoxyribonucleotide (dNTPs)

Roche Diagnostics

Random primer p(dN)<sub>6</sub>

Roche Diagnostics

### Adapter (5'-3')

delfbf1 CGCGTCCTAGGACTAGTGTCTGACGCATGCGGTACCGCCCGG  
CGAATTCGCTAGCGATATCCCTAGG  
delfbf2 CGCGCCTAGGGATATCGCTAGCGAATTCGCCCGGGCGGTACC  
GCATGCGTCGACACTAGTCCTAGGA

### Biotin markierte Primer (5')

BIO-*attB* AAAAGTGGCGAGGAGTACGGGACTTGAACCCGTGAGGAGGA  
CCTG

### PCR-Primer (5'-3')

Asp1 AGGAGTACGGGACTTG  
Asp2 GGGAGTTAGTTCAGTTG  
SMATT3 CGGGATCCCTGCAGCCCGGGGATGGAGCCA  
SMATT4 CGGAATTCAGATCTATGCGGTGGACCATGA  
SMATT17 GGAATTCCAATCGGCATCTGAAGG  
SMATT18 CGGGATCCGAGGCCGACCGCAAGC  
SMATT19 TCCCCCGGGGTCCCGTACTCCTCG  
SMATT20 TCCCCCGGGTTGAACCCGTGGCCTC  
SMATT26 GCTCTAGAACGTGGACTTCCGGCGAG  
SMATT28 GGAATTCTTGAACCCGTGGCCTC  
SMATT29 GACTAGTGAGGCCGACCGCAAG  
SMATT34 ACGAGAACCTCTCCACCAC  
SMATT35 CTGGACCGGCAGTGGACA  
SMATT36 GCAGATGCCAGTCCACC  
SMATT37 GCCAGCACCTTGCGCTC  
SMATT39 AGTGAGCGCGCGTAATACG  
SMPCR11 GGACTAGTGTGCGACTGCGCAGGTCCGCGGA  
SMPCR12 GCTCTAGACCCGGGCGGCCTTGCGGAATGA  
SMPCR13 GGACTAGTCCCGGTTGTCATCGTCCACAACAT  
SMPCR14 CCGGGGTACCCACACCTGTCTCCTTGGGATTA  
SMPCR17 GGACTAGTGTGAGCGCCTACAAAGCGCTGGGA  
SMPCR18 CCGGGAATTCCTGGGCGGTCCCCATGCCGGG  
SMPCR21 GGACTAGTAGCCAACCCTGACGCCATT  
SMPCR22 CGGAATTCTGTGGAGAGGCCCTCCGCGG  
SMPCR26 CGGAATTCACCTTGTGGCGACTTGCTG  
SMPCR36 GGACTAGTGTGGCGATGGAGCTATTTCC  
SMPCR41 GGACTAGTACCTGGTGGACATGTTGGG

Tcrv	CCGGAGATCTCAATTGAATTCAGTTCTCCGCAAGAATTGATTGGC
Tcrv1	CCGGGGTACCAGTTCTCCGCAAGAATTGATTG
Tcfw	CCGGAGATCTCAATTGAATTCTCATGTTTGACAGCTTAT
Tcfw1	CCGGGGTACCTCATGTTTGACAGCTTAT
tRNA2	ACCGGCAGTGGACAGCGC
tRNA3	GGAATTGAACCCGTGGCCT

**RT-PCR-Primer (5'-3')**

CD1	GAAGTCTCGGTGAAGCATCC
CD2	CAGGCAGGTACGGAGGGC
fbfA1	ATCGTTTCGGTGGACTCGGA
fbfA2	GGTGAAGCAGACCGCGGCGG
fbfB1	TGGCTGGAGCGCCAGGGCCC
fbfB2	CCTTCCTCGAGGATGGCCGG
fbfC1	TTGGAGCGTGAATACACCCG
fbfC2	CTTGGAGCTGGAGCTCCACC
fbfD1	TTCAAAGCGCGTTCCAGGCC
fbfD2	AGGCGGATGTCCCAGGCCCG
fbfD3	ACACCTCGCGCAGCCGGG
fbfD4	TCGAAGCGGCCATCCC
Int1	AGCTCCACATCCGGCAATCA
Int2	CTGGATGGCCTTAGCGGG
Iso1	TGTGGCGCCTCGGACCCT
Iso2	ACGACTCACTATAGGGCGAA
tRNA2	ACCGGCAGTGGACAGCGC
SMATT51	GGCGTTCTAACCAACTGAA

**Sequenzierprimer (5'-3')****pSM48**

ATTP1	CCCGGGGATGGAGCCAGA
ATTP2	AACTCAAGACAGCAACGA
ATTP3	CAGAAGACGGACGAGGTG
ATTP4	GACAAGGAACTCGGTGTG
ATTP5	GGATGACCTGATTCTCCC
ATTP6	TGCATCGCGCGTATTGAATT
ATTP7	TCCTGAAGGCGACCGAGAAG
ATTP8	GCCCTGTGACTTGCGCGAG
SMATT3	CGGGATCCCTGCAGCCCGGGGATGGAGCCA
SMATT5	ATGGTCGACGCCTACACGAC
SMATT7	GAGTGCCAAGCTGTGACAGC
SMATT9	CGCTCAAGCAGTGGTGAAG

**pSM49**

SMATT4	CGGAATTCAGATCTATGCGGTGGACCATGA
SMATT6	ATCTGCTGACGCACCACGGC
SMATT8	AGTCCGTGCCAGTTTGGCGG
SMATT10	CGTGGAGCGCTCGTGTCAC
SMATT12	CAACCTCACCTGCCTGCAC
SMATT30	TTCGTGGACAGATCCTTC

SMATT31 CTTTGGAGCCTTGAGCA  
 SMATT32 TGGATGTCCTCGTGCGT  
 SMATT33 CGGCAGAAGCTCGCTC  
 SMATT45 AGGACGAAGGGCAGCGG  
 SMATT46 GCATGGGGCTCGGTGTCC  
 SMATT47 TCGCTCTGGCAGAGTCGC  
 SMATT50 CAGGCGGCTCGGGCATCT  
 SMATT53 GCCAGCCTGATAGAGCCTC  
 SMATT54 AGATAGCTGCCCCGACAACA

**pSM20**

SEQSM1 CAGCGACACTTCCCTCATGC  
 SEQSM2 CAGCTCAACTCGCAGATTGC  
 SEQSM3 GATGCTTCACCGAGACTTC  
 SEQSM4 CTGCACGGACGCTGTCTGAG  
 SMP13 GGACTAGTCCCGGTTGTCATCGTCCACAACAT  
 SMP14 CCGGGGTACCCACACCTGTCTCCTTGGGATTA

**pSM24**

SEQSM5 ATGAAAAGCACCCCACTCC  
 SEQSM6 CAAGCGCAAGGGCATCAACC  
 SEQSM7 GAGAGGCATGAGGGAAGTG  
 SMP21 GGACTAGTAGCCAACCCTGACGCCATT  
 SMP22 CGGAATTCTGTGGAGAGGCCCTCCGCGG

**pBS4**

SeqfbfD1 CCTGACCGTGGCCTTCG  
 SeqfbfD2 TACACCCGGAGCGTGGC  
 SeqfbfD3 CGAGACCACAGCCCTG  
 SeqfbfD4 CCACCAGGACGGACACC  
 SeqfbfD5 GCTCCAGCTCCAAGACGG  
 SeqfbfD6 AGCACGAGCACGGCCCG  
 SeqfbfD7 AGATCTCCAGGCGCTCGAT  
 SeqfbfD8 CTACGACAACCTGGATGAC  
 SeqfbfD9 CTACGACAACCTGGATGAC  
 SeqfbfD10 GTATAGCCCCGGTTGCCAC  
 SeqfbfD11 CAGGGCCAGCACGAGCAC  
 SeqfbfD12 GTCGATCAGCTCGTCGTAG  
 SeqfbfD13 ACGCTCCGGGTGTAATCAC

**4.1.6 Plasmide**

mini Tn5 lacZ1	(de Lorenzo et al., 1990)
pBC SK+/-	Stratagene
pBS SK+/-	Stratagene
pBS II SK+/-	Stratagene
pBR 322	Biolabs
pUC4 KIXX	(Barany, 1985)
pUC18	(Yanish-Perron et al., 1985)



**Andere Nukleinsäuren**

DNA Molecular Weight Marker II, III, IV, VI	Roche Diagnostics
RNA Molecular Weight Marker I	Roche Diagnostics
DNA aus Heringssperma	Serva

**4.1.7 Bakterienstämme*****E. coli***

DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> ( $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>deoR</i> , <i>thi-1</i> sup E44, <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> $\lambda$ -
SCS110	<i>rpsL</i> , ( <i>Str</i> <sup>r</sup> ), <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>endA</i> , <i>thi-1</i> , <i>lacY</i> , <i>galK</i> , <i>galT</i> , <i>ara</i> , <i>tonA</i> , <i>tsx</i> , <i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>supE44</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), (F' <i>traD</i> 36 <i>proAB lacI</i> <sup>q</sup> <i>Z</i> $\Delta$ M15)
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , (F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>Z</i> $\Delta$ M15, Tn10( <i>tet</i> <sup>r</sup> ))
XL1-Blue MRF'	$\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183 $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> <sup>q</sup> <i>Z</i> $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]

***S. aurantiaca* und *M. xanthus***

DW4/3-1	Wildtyp <i>S.aurantiaca</i> , ( <i>Str</i> <sup>r</sup> ); (Qualls et al., 1978)
DK 1622	Wildtyp <i>M.xanthus</i> ; (Kaiser, 1979)

**4.1.8 Medien und Antibiotika-Stammlösungen**

<b>LB</b>	1% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 1% NaCl pH 7.2 mit NaOH eingestellt
<b>SOC</b>	2% Trypton, 0.36% Glukose, 0.5% Hefextrakt, 0.019% KCl 0.2% MgCl <sub>2</sub> , 0.25% MgSO <sub>4</sub> , 0.059% NaCl pH 7.0 mit NaOH eingestellt
<b>Casiton</b>	1% Casiton, 0.15% MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O pH 7.2 mit NaOH eingestellt
<b>CTT</b>	1% Casiton, 10 mM Tris/HCl pH 7.6, 1 mM Kaliumphosphat 8.4 mM MgSO <sub>4</sub> pH 7.2 mit NaOH eingestellt
<b>CY</b>	0.3% Casiton, 0.1% Hefeextrakt, 0.1% CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O pH 7.2 mit NaOH eingestellt
<b>Trypton</b>	1% Trypton, 0.2% MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O pH 7.2 mit NaOH eingestellt
<b>Wasseragar</b>	0.1% CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O

Zum Verfestigen der Medien wurde 0.75% bzw. 1.5% Bacto-Agar zugegeben.  
Alle Medien wurden bei 121°C und 1.5 bar 20 Minuten autoklaviert.

**Antibiotika**

	<u>Stammlösung</u>	<u>Endkonzentration</u>
Ampicillin-Natriumsalz	25 mg/ml in 70% Ethanol	50 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in 100% Ethanol	34 µg/ml
Kanamycinsulfat	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 µg/ml
Streptomycinsulfat	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O	120 µg/ml
Tetracyclinhydrochlorid	10 mg/ml in 0.1 M HCl	10 µg/ml
Oxytetracyclin	7.5 mg/ml in DMSO	7.5 µg/ml

**4.1.9 Puffer und Lösungen****Enzympuffer**

10 x A, B, H, L, M Puffer	Roche Diagnostics
10 x NEB 1, 2, 3, 4 Puffer	Biolabs

**GLB 5 x**            60% Glyzerin, 1% SDS, 0.05% Xylencyanol, 125 mM Na<sub>2</sub>EDTA  
0.01% Bromphenolblau

**GTE Puffer**        50 mM Glukose, 25 mM Tris/HCl (pH 8), 10 mM EDTA,  
100 µg/ml RNase

**Hepes Puffer**     100 mM Hepes, 10 mM CaCl<sub>2</sub>  
pH 7.2 mit NaOH eingestellt, Sterilfiltration

**SET Puffer**        75 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 25 mM EDTA

**SSC 20 x**          175.3 g NaCl, 88.2 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat  
auf 1 l; pH 7.2 mit NaOH eingestellt

**TAE 50 x**          242 g Tris, 82 g Natriumacetat, 18.6 g EDTA  
auf 1 l; pH 7.5 mit Essigsäure eingestellt

**TBS**                8 g NaCl, 0.2 g KCl, 3 g Tris-Base; pH 8.0 mit HCl

**TE**                 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA

**4.2 Methoden****4.2.1 Mikrobiologische Techniken****4.2.1.1 Plattenkulturen von Bakterien**

Bakterienkulturen werden mit Hilfe einer Impföse auf festen Nährmedien ausgestrichen. Diesen Nährmedien werden, falls Antibiotikaresistenzen vorliegen, Antibiotika in geeigneten Konzentrationen zugesetzt. Die Inkubation erfolgt unter den für die Bakterien geeigneten Bedingungen.

**Plattenkultur von *E. coli***

Für die Kultivierung von *E. coli* eignen sich LB- und SOC-Agar-Medien (1.5% Agar). Die Inkubation erfolgt bei 37°C über Nacht. Eine Lagerung der Kulturplatten kann für 14 Tage bei 4°C erfolgen. Dann sollte eine Neuüberimpfung erfolgen.

**Plattenkulturen von *S. aurantiaca***

Zur Kultivierung von *S. aurantiaca* in Plattenkultur eignen sich Casiton-, und Trypton-Medien. Die Flüssigkulturen werden zur Plattenkultivierung auf das jeweilige Medium aufgetropft und bei 32°C zwei Tage inkubiert. Eine längere Lagerung kann nur bei Raumtemperatur erfolgen. Zur Selektion von *S. aurantiaca* Klonen nach einer Transformation werden geeignete Kulturvolumina (bis zu 0.5 ml) mit 3 ml ca. 42°C warmen Softagar (0.75% Agar) des jeweiligen Mediums gemischt und anschließend plattiert (auf 1.5% Agar). Die Inkubation erfolgt bei 32°C für ca. 8 Tage.

**4.2.1.2 Fruchtkörperbildung bei *S. aurantiaca***

*S. aurantiaca* Kulturen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, werden mit 4000 x g, 15 min bei 4°C sedimentiert. Das Sediment wird einmal mit dem gleichen Volumen 100 mM HEPES Puffer gewaschen und mit HEPES Puffer so resuspendiert, daß eine Zellzahl von  $4 \times 10^{10}$ /ml vorliegt. Wichtig ist die sorgfältige Resuspendierung der Zellen. Von dieser Suspension werden 5 µl (entspricht  $2 \times 10^8$  Zellen) auf getrocknete Wasseragarplatten (1.5% Agar; 30 min unter der Sterilbank getrocknet) aufgetropft und ca. 20 min getrocknet. Die Inkubation erfolgt für ca. 48 h bei 32°C. Zur Detektion der β-Galaktosidase Aktivität in einer Mutante wird dem Wasseragar vor dem Erkalten X-Gal (20 µg/ml) zugesetzt. Die Qualität und Konzentration des X-Gal ist kritisch, da sowohl eine zu hohe Konzentration an gespaltenem X-Gal (Kroos and Kaiser, 1984), als auch der Reinheitsgrad die Fruchtkörperbildung stark beeinflussen. Die Auswertung der Fruchtkörperbildung erfolgt an einem Binokular bei 10-125-facher Vergrößerung.

**4.2.1.3 Flüssigkulturen von Bakterien**

Einzelne Bakterienklone werden mit einer Impföse in Flüssigmedium überführt oder die Medien werden mit einem geeigneten Volumen einer flüssigen Vorkultur angeimpft. Sollten die Bakterien spezielle Antibiotikaresistenzen besitzen, so werden diese Antibiotika in geeigneten Konzentrationen zugesetzt, um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten.

### **Bestimmung des Bakterientiters**

Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer kann der Bakterientiter bestimmt werden. Diese Zählkammer enthält ein spezielles Raster bestehend aus Groß- und Kleinquadraten. Nach dem Beschicken der Zählkammer mit der Bakterienkultur wird die Zahl der Bakterien in einem Kleinquadrat ermittelt. Dazu müssen mehrere Zählungen durchgeführt werden. Die ermittelte Zahl wird dann mit  $2 \times 10^7$  multipliziert und ergibt die Zellzahl/ml.

### **Flüssigkulturen von *E. coli***

Zur Kultivierung von *E. coli* eignen sich LB, und SOC-Medien. Die Kulturen werden mit 1/100 Volumen einer ausgewachsenen Vorkultur angeimpft und auf einem Schüttler bei 37°C und 170 rpm inkubiert bis die gewünschte Zelldichte erreicht ist.

### **Flüssigkulturen von *S. aurantiaca* und *M. xanthus***

Zur Kultivierung von *S. aurantiaca* werden Casiton- oder Trypton-Medien mit mindestens  $10^6$  Zellen/ml angeimpft, da die Kulturen bei geringer Dichte nur schwer anwachsen. Die Kultivierung erfolgt bei 32°C und 130 rpm bis zur gewünschten Zelldichte. Die Verdopplungszeit in der logarithmischen Phase beträgt ca. 7 h. Nach Erreichen der stationären Phase sterben die Zellen schnell ab. Nach Transformationen werden die selektierten Klone aus Softagar zunächst in 3 ml Flüssigmedium überführt um ein Anwachsen der Kulturen zu ermöglichen. *M. xanthus* wird analog zu *S. aurantiaca* in CTT-Medium kultiviert.

#### **4.2.1.4 Indol-induzierte Sporenbildung bei *S. aurantiaca* (Gerth und Reichenbach, 1994)**

Die Sporenbildung kann bei *S. aurantiaca* von der Fruchtkörperbildung durch die Gabe von Indol entkoppelt werden. Dazu werden spät-logarithmische Kulturen ( $2 \times 10^8$ /ml) mit Indol (1 M in Ethanol) auf eine Endkonzentration von 0.5 mM Indol eingestellt und bei 32°C inkubiert. Die Sporenbildung wird mikroskopisch nach verschiedenen Zeiten kontrolliert.

#### **4.2.1.5 Langzeitlagerung von Bakterien**

##### **Langzeitlagerung von *E. coli***

*E. coli* Kulturen der logarithmischen Phase werden bei 4°C, 4000 x g, 15 min sedimentiert, in 1/5 Volumen der Ausgangskultur resuspendiert und mit sterilem

Glyzerin auf eine Endkonzentration von 20% eingestellt. Eine Lagerung kann bei -20°C oder bei -80°C (Langzeitlagerung) erfolgen.

#### **Langzeitlagerung von *S. aurantiaca***

Die Lagerung von *S. aurantiaca* kann ausschließlich bei -80°C oder in Flüssigstickstoff erfolgen. Dazu werden 1.5 ml einer logarithmischen Kultur bei 4°C, 4000 x g, 15 min abzentrifugiert, in 1/5 des Ausgangsvolumens resuspendiert und mit sterilem Glyzerin versetzt, so daß eine Endkonzentration von 20% vorliegt. Nach schnellem Auftauen kann das gesamte Volumen in Trypton-Medium zur neuen Kultivierung überführt werden. Wird wie oben beschrieben eine sechsfach konzentrierte Suspension hergestellt und bei -80°C gelagert, so kann von dieser zur Rekultivierung mit einer Impföse ein Teil entnommen und auf Trypton-Agarplatten ausgestrichen werden. Bleibt die Kühlkette erhalten, so können diese Stocks wieder bei -80°C eingefroren werden. Eine weitere Möglichkeit der Langzeitlagerung von *S. aurantiaca* sind Filterkonserven. Die Fruchtkörperbildung erfolgt in diesem Fall auf Wasseragar mit sterilen Filterpapierblättchen (ca. 1cm<sup>2</sup>). Nach einer zehntägigen Inkubation bei 32°C werden die Filterblättchen mit den Fruchtkörpern in einem Exsikkator (Vakuum und Trocknungsmittel) unter sterilen Bedingungen mindestens 10 Tage getrocknet und dann in lichtgeschützte, sterile Glasgefäße überführt. Eine solche Lagerung ist für mehrere Jahre möglich.

#### **4.2.1.6 Auskeimung von *S. aurantiaca* Sporen; Sporulationsassay**

Filterkonservenblättchen von *S. aurantiaca* werden zur Sporenkeimung auf CY-Agar gelegt. Zuerst werden die Filter mit der fruchtkörpertragenden Seite nach unten zwei Tage inkubiert, dann gewendet und weitere zwei Tage inkubiert. Am Rande der Filterblättchen werden schwärmende, vegetative Zellen sichtbar. Es handelt sich hier lediglich um eine qualitative Methode, mit der keine Aussage über eine erhöhte oder verminderte Zahl von Fruchtkörpersporen getroffen werden kann.

#### **4.2.1.7 Elektroporation**

Diese physikalische Methode ermöglicht die effiziente und schnelle Transformation von prokaryontischen Zellen (Shigekawa und Dower, 1988). Ein kurzzeitig angelegtes Feld mit hoher Spannung regt Zellmembranen dazu an, reversible Poren auszubilden. Diese Poren können von Makromolekülen passiert werden, was zur Einschleusung von

rekombinanter DNA in die Zellen genutzt werden kann. Bis zu  $10^{10}$  Transformanten pro  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA können so erzielt werden (Dower et al., 1988).

### **Elektroporation von *E. coli***

Der zu transformierende *E. coli* Stamm wird in 250 ml SOC Medium bis zu einer optischen Dichte von 0.6 bei 600 nm kultiviert, für 30 min auf Eis inkubiert und bei 4000 x g, 15 min bei 4°C zentrifugiert. Es folgt ein zweimaliger Waschschrift mit 250 ml 4°C kaltem, sterilem a.dest. Das Sediment wird in 1ml 10%igem Glycerin resuspendiert. Die Zellen können entweder aliquotiert bei -80°C gelagert oder direkt für die Elektroporation eingesetzt werden. Die so vorbereiteten Zellen (50  $\mu\text{l}$ ) werden auf Eis mit 5  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung (5 pg bis 0.5  $\mu\text{g}$ ) gemischt und in eine sterile, gekühlte Elektroporationsküvette (0.1 cm Elektrodenabstand) überführt. Elektroporationsbedingungen: 200 Ohm, 25  $\mu\text{F}$  und 12.5 kV/cm Feldstärke. Die Pulszeit beträgt ca. 3-4 Millisekunden. Anschließend werden die Zellen in 1 ml SOC Medium für 1-2 h bei 37°C und 170 rpm inkubiert. Nach dieser Regenerationszeit werden Aliquots der Zellsuspension auf LB-Medium (mit geeignetem Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **Elektroporation von *S. aurantiaca* (Stamm et al., 1999)**

*S. aurantiaca* Zellen werden in 200 ml Trypton Medium bis zu einer Zelldichte von  $1.6\text{-}2.0 \times 10^8$  Zellen/ml kultiviert und bei 20°C, 4000 x g für 15 min abzentrifugiert. Das Zellsediment wird zuerst in 200 ml 5 mM HEPES Puffer und dann in 25 ml 5 mM HEPES Puffer bei Raumtemperatur (RT) gewaschen. Danach werden die Zellen im gleichen Puffer so resuspendiert, daß eine Zellkonzentration von  $4\text{-}6 \times 10^{10}$  Zellen/ml vorliegt. Die Zellen werden direkt für die Elektroporation verwendet. Zu 50  $\mu\text{l}$  dieser *S. aurantiaca* Suspension werden 0.5-3  $\mu\text{g}$  DNA auf Eis zugegeben und dann in sterile, gekühlte Elektroporationsküvetten (0.1 cm Elektrodenabstand) überführt. Die Elektroporation erfolgt bei 200 Ohm, 25  $\mu\text{F}$  und einer Feldstärke von 8.5 kV/cm. Die Zellen werden anschließen in 50 ml Trypton Medium überführt und über Nacht bei 32°C und 130 rpm ohne Selektionsdruck inkubiert. Die Kultur wird bei 4°C, 4000 x g, 15 min abzentrifugiert und das Sediment in 2 ml 100 mM HEPES Puffer resuspendiert. 0.1-0.5 ml dieser Zellsuspension werden mit 3 ml 42°C warmen Trypton Softagar (0.75% Agar; Antibiotika) gemischt und auf Trypton Agarplatten, welche die geeigneten Antibiotika enthalten, gegossen. Die Platten werden bei 32°C 5-10 Tage inkubiert.

## 4.2.2 Isolierung und Bearbeitung von DNA

### 4.2.2.1 Plasmidpräparation

#### Alkalische Lyse

Diese schnelle und effiziente Methode eignet sich für das Durchmustern von Stämmen mit rekombinanter Plasmid-DNA. Die Bakterien werden über Nacht unter Selektionsdruck kultiviert. Das Sediment einer 1.5 ml Kultur wird in 100 µl GTE Puffer resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Die Zugabe von 200 µl 0.2 N NaOH/1% SDS (Inkubation für 5 min auf Eis) führt zum Aufbrechen der Zellen und zu einer Denaturierung der bakteriellen Proteine, der chromosomalen und der Plasmid-DNA. Die Lösung wird durch 150 µl 3 M Kaliumacetatlösung (pH 4.8) neutralisiert (vortexen der Lösung und Inkubation für 5 min auf Eis). Die kovalent geschlossene Plasmid-DNA renaturiert schnell. Die chromosomale DNA und die Proteine präzipitieren und können durch eine Zentrifugation bei 4°C, 13 000 rpm, 15 min von der Plasmid-DNA getrennt werden. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt und die Plasmid-DNA wird mit 2 Volumen kaltem 98%igem Ethanol gefällt. Nach dem Waschen der DNA mit 70%igem Ethanol wird die Plasmid-DNA in einem Vakuum-Konzentrator für 5 min getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE Puffer gelöst.

#### Aufreinigung von Plasmid-DNA mit Anionen-Austauschersäulen

Diese Aufreinigung ist eine Modifikation der oben beschriebenen Alkalischen Lyse-Methode. Der Überstand nach der Alkalischen Lyse, welcher die Plasmid-DNA enthält, wird auf Anionen-Austauschersäulen gegeben. Durch die negative Ladung der Nukleinsäuren können diese von anderen Bestandteilen über diese Säulen aufgereinigt werden. Es wurden die Kitsysteme Nucleospin (Minipräp.) und Nucleobond (Maxipräp.) der Firma Macherey & Nagel verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

### 4.2.2.2 Präparation der chromosomalen DNA von *S. aurantiaca* (Neumann et al., 1992)

50-100 ml einer exponentiell wachsenden Kultur werden bei 4°C, 6000 x g, 15 min abzentrifugiert. Das Sediment wird in 5 ml SET Puffer resuspendiert und nach der Zugabe von 1/10 Volumen 10% SDS und 1 mg/ml Proteinase K für mindestens 2 h unter gelegentlichem Schütteln bei 55°C inkubiert. Die Suspension wird mit 1/3 Volumen 55°C warmem 5 M NaCl versetzt und dann vorsichtig gemischt. Es folgt die

Zugabe von 1 Volumen Chloroform und die Inkubation für 1 h auf einem Rollenmischer. Nach einer Zentrifugation bei 3000 x g, 15 min wird die obere wäßrige Phase, welche die chromosomale DNA enthält, abpipettiert. Nach erneuter Chloroformextraktion wird die DNA mit dem doppelten Volumen Isopropanol gefällt, dreimal mit 70%igem und einmal mit 98%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wird in TE Puffer gelöst.

#### **4.2.2.3 Phenolextraktion von DNA (Sambrook et al., 1989)**

Diese Standardmethode ermöglicht die Reinigung von DNA, wobei Proteine durch die Zugabe von Phenol und Chloroform denaturiert werden. Der Einsatz von Isoamylalkohol verhindert das Schäumen der Lösung und ermöglicht das bessere Trennen der organischen und wäßrigen Phase. Die DNA-Lösung wird im Verhältnis 1:1 mit TE-gesättigtem Phenol (pH 7.0) versetzt und gut gemischt. Eine Zentrifugation bei RT, 13 000 rpm, 15 min führt zur Phasentrennung. Die obere wäßrige Phase wird abpipettiert und einmal mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Eine Fällung der DNA erfolgt entweder mit Ethanol oder Isopropanol.

#### **4.2.2.4 Alkoholfällung von DNA**

Nukleinsäuren werden durch die Zugabe von Salz und Ethanol gefällt, indem ihre Löslichkeit durch Absättigung der geladenen Phosphatgruppen herabgesetzt wird. Diese Methode eignet sich zur Konzentrierung von DNA-Lösungen und für die Entfernung von Phenol- und Chloroform-Resten in einer DNA-Lösung. Die Lösungen werden mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) oder 10 M Lithiumacetat versetzt. Die Fällung erfolgt durch die Zugabe von 2.5 Volumen 98%igem Ethanol und Fällung bei -80 °C für 1-2 h oder durch die Zugabe von 0.7 Volumen Isopropanol und Inkubation bei RT für mindestens 30 min. Die gefällte DNA wird bei 4°C, 13 000 rpm, 30 min abzentrifugiert, in 70%igem Ethanol gewaschen, in einem Vakuum-Konzentrator getrocknet und in TE Puffer gelöst.

#### **4.2.2.5 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA-Lösungen**

Durch die Messung der Extinktion von DNA-Lösungen im Spektralphotometer bei 260 nm und 280 nm kann die Konzentration und die Reinheit der Lösung bestimmt werden.



Das Verhältnis  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$  ist ein Maß für die Verunreinigung der DNA-Lösungen mit Proteinen. Dieser Wert sollte im Idealfall zwischen 1.8 und 2.0 liegen.

dsDNA: 1  $OD_{260}$  = 50  $\mu\text{g/ml}$

ssDNA: 1  $OD_{260}$  = 33  $\mu\text{g/ml}$

#### **4.2.2.6 Restriktion von DNA**

Restriktionsenzyme erkennen definierte Sequenzen (meist 4-8 Nukleotide) auf doppelsträngiger DNA (dsDNA) und spalten die Phosphodiesterbindungen in den beiden Strängen. Die Restriktion von chromosomaler und Plasmid-DNA wird nach den üblichen Standardmethoden (Sambrock et al., 1989) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen werden abhängig von den verwendeten Enzymen nach den Herstellerangaben ausgewählt. Die Kontrolle der Restriktion erfolgt durch eine gelelektrophoretische Auftrennung. Zur Inaktivierung der Enzymreaktion können verschiedene Methoden angewendet werden: Hitzeinaktivierung (Herstellerangaben) Phenolextraktion, Bindung der DNA an Glaspartikel (GeneClean Kit), Zusatz von EDTA (20 mM Endkonzentration).

#### **4.2.2.7 Ligation doppelsträngiger DNA**

Restriktionsenzyme erzeugen entweder "sticky ends", das heißt sie bilden DNA-Fragmente mit überstehenden 3'- oder 5'- Enden, oder sie spalten die dsDNA an direkt gegenüberliegenden Stellen und bilden somit glatte Enden, "blunt ends". Die T4 DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphoesterbrücke zwischen benachbarten 3'-OH- und 5'-Phosphat-Termini innerhalb von DNA unter Verbrauch von ATP. In einer Ligrationsreaktion in 1 x konzentriertem Ligasepuffer werden 100 ng Vektor-DNA, die 2-3fache (molare) Menge an Insert-DNA und 1 Unit T4 DNA-Ligase in einem Endvolumen von 20  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Bei "blunt end"-Ligationen wird zusätzlich 15% PEG 8000 zugegeben. Die Reaktion wird über Nacht bei 15°C inkubiert und dann durch die Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  0.5 M EDTA (pH 8.0) abgestoppt. Nach Zugabe von 28  $\mu\text{l}$  sterilem a.dest können 5  $\mu\text{l}$  direkt für die Elektroporation verwendet werden.

#### **4.2.2.8 Herstellung und Ligation von DNA-Adapttern**

Adapter werden aus zwei einzelsträngigen DNA Oligonukleotiden (ssDNA) durch Hybridisierung hergestellt. Die Oligonukleotide werden 15 min bei 65°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und in äquimolaren Mengen gemischt. Nach erneuter Inkubation bei 65°C

(15 min) wird langsam auf RT abgekühlt. In eine Ligationreaktion werden 100 ng Vektor-DNA und der 50fache (molare) Überschuß pro Vektorende an Adapter eingesetzt.

#### **4.2.2.9 Auffüllen von 5'-DNA-Überhängen**

Diese Auffüllreaktion wird verwendet, wenn das zu klonierende Insert und die Vektor-DNA keine kompatiblen Enden besitzen. Das Klenow-Enzym, welches durch proteolytische Spaltung der *E. coli* DNA-Polymerase I gewonnen wird, besitzt die DNA-Polymerase- sowie die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, wohingegen die 5'-3'- Exonuklease-Aktivität fehlt. Das Enzym katalysiert die Template-spezifische Polymerisation von Mononukleotiden aus Desoxynukleosid-5'-triphosphaten an das 3'-OH-Ende einer Template-DNA. Die so gebildeten "blunt end" DNA-Fragmente können dann ligiert werden. Ein Reaktionsansatz (10 µl) in 1x Restriktionsenzympuffer H (Roche Diagnostics) enthält 0.2-5 µg DNA, 0.1 mM je dNTP und 1 U Klenow-Enzym pro µg DNA. Nach 30 min bei 37°C erfolgt eine Hitzeinaktivierung für 10 min bei 75°C oder die DNA kann durch Phenolextraktion aufgereinigt werden.

#### **4.2.2.10 Entfernung von 3'-DNA-Überhängen**

Die T4 DNA-Polymerase besitzt neben der DNA-abhängigen DNA-Polymerase-Aktivität auch eine sehr aktive 3'-5'-Exonuklease. Die 5'-3'- Exonuklease-Aktivität fehlt. Für die Entfernung von 3'-Überhängen an DNA-Molekülen werden in einem Volumen von 25 µl 2 µg DNA, 1 x konzentrierter Restriktionspuffer A (Roche Diagnostics), 0.05 mM je dNTP, 2.5 µg BSA und 10 U T4 DNA-Polymerase eingesetzt. Nach 15 min bei 12°C erfolgt eine Phenolextraktion zur Aufreinigung der DNA.

#### **4.2.2.11 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Um in Ligationansätzen die Religation der Vektor-DNA zu verhindern und somit die Effizienz der Klonierung zu erhöhen, wird die Vektor-DNA an den 5'-Enden mittels alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Durch die Entfernung der Phosphatgruppen bleibt die Möglichkeit erhalten, phosphorylierte Insert-DNA in den Vektor zu klonieren. Die Reaktion wird mit linearisiertem Vektor in einem 20 µl Ansatz wie folgt durchgeführt. 1 x konzentrierter Dephosphorylierungspuffer (Roche Diagnostics), 1 U alkalische Phosphatase und 100 ng DNA. Bei 5'-überhängenden DNA-Enden erfolgt die Inkubation bei 37°C für 10 min. Besitzt die DNA 3'-überhängende oder glatte Enden, so

erfolgt die Inkubation bei 37°C für 60 min. Die Phosphatase wird bei 65°C für 15 min inaktiviert, und falls notwendig wird die DNA durch eine angeschlossene Phenolextraktion aufgereinigt.

#### 4.2.2.12 Synthese von DNA durch PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die PCR ist eine schnelle Methode für die enzymatische *in vitro* Synthese von DNA (Saiki et al., 1985). Das Reaktionsprinzip entspricht der Replikation der DNA in der Zelle. Eine thermostabile DNA-Polymerase synthetisiert neue DNA an einer vorhandenen DNA-Matrize (Template), ausgehend von chemisch synthetisierten Oligonukleotidprimern, die mit der Template-DNA hybridisieren. Weiterhin werden Desoxynukleotidtriphosphate und geeignete Pufferbedingungen benötigt. Die gesamte Reaktion besteht aus drei Teilschritten mit unterschiedlichen Temperaturen, die mehrfach wiederholt werden. Im ersten Schritt wird die DNA denaturiert, im zweiten Schritt (Annealing) hybridisieren die beiden Oligonukleotidprimer mit der Template-DNA und dienen im dritten Schritt (Polymerisation) der DNA-Polymerase als Startmoleküle für die Synthese der beiden Stränge. Die Primer sollten eine Länge zwischen 15-20 Nukleotiden besitzen und keine intermolekularen Paarungen sowie "loop"-Strukturen bilden. Für die Klonierungen von PCR-Produkten, können die verwendeten Primer am 5'-Ende um entsprechende Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme verlängert werden. Die Reaktionsansätze variieren in Abhängigkeit der Template-DNA und der verwendeten Polymerase-Systeme.

In einem 100 µl PCR-Ansatz werden 1 x konzentrierter Polymerase-Puffer, 300 nM je dNTP, je 100 pmol der Primer und Template-DNA (0.01 pmol Plasmid-DNA oder 200-500 ng chromosomale DNA) eingesetzt. Bei Anwendung der PAN-Power-Script-Polymerase, welche sich besonders für die PCR mit chromosomaler *Stigmatella* DNA eignet, wird zusätzlich ein "Enhancer" zugesetzt (die Zusammensetzung wird von PAN-Systems nicht angegeben). Die Endkonzentration an Magnesiumionen beträgt 1-2 mM in der PCR. Die Konzentration an Polymerase beträgt 1-2 Units. Die Reaktionsansätze werden falls notwendig mit 100 µl sterilem Paraffinöl überschichtet. Die PCR besteht in der Regel aus 25-30 Zyklen:

1 min, 94°C (Denaturierung der DNA)

2 min, 50-68°C (Annealing der Primer): Die Annealing-Temperatur wird aus der Basenzusammensetzung der Primer mittels der 4+2-Regel berechnet. Für jedes GC-rechnet man 4°C und für jedes AT-Paar summiert man 2°C.

1-3 min, 74-78°C (DNA-Synthese): Die Syntheszeit richtet sich nach der Länge der zu amplifizierenden DNA (1 min pro 1 kbp).

Als Kontrollen werden Ansätze ohne Template-DNA bzw. ohne Primer mitgeführt. Zur Analyse werden 10 µl des PCR-Ansatzes in einen Agarosegel aufgetrennt.

#### **4.2.2.13    Aufreinigung von PCR-Produkten**

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde der QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen verwendet. Die DNA absorbiert an eine spezielle Silikagel-Membran in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen während Verunreinigungen abgetrennt werden. Die DNA wird gewaschen und mit einem Puffer mit niedriger Salzkonzentration eluiert. Die Durchführung erfolgt gemäß den Herstellerangaben.

#### **4.2.2.14    DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung von dsDNA-Proben wurde in der Sequenziereinheit des ZMBH durchgeführt, in der das ABI Prism<sup>TM</sup> 377 DNA Sequencer System (Perkin-Elmer Corporation) verwendet wurde. Die Sequenzierung basiert auf der klassischen Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977).

### **4.2.3        Elektrophorese-Techniken und Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

#### **4.2.3.1    Agarose-Gelelektrophorese von DNA**

Zur Analyse von DNA-Fragmenten wurde die horizontale Gelelektrophorese verwendet. Eine Agarosekonzentration zwischen 0.5 und 2% wurde abhängig von der aufzutrennenden DNA-Fragmentgröße eingesetzt. Zur Kontrolle des Laufverhaltens und zur Erhöhung der Probendichte wurde den DNA-Proben 1/5 Volumen 5 x GLB Puffer zugesetzt. Die Auftrennung erfolgte in 1 x TAE-Puffer bei 20-100 Volt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einer 0.5 µg/ml konzentrierten Ethidiumbromidlösung angefärbt, die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert (Mitsubishi, video copy processor). Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten werden verschiedene DNA-Größenstandards (Roche Diagnostics) verwendet.

#### 4.2.3.2 Isolierung von DNA aus "low melting" Agarose

Nach der Auftrennung, Anfärbung und Größenbestimmung von DNA in "low melting" Agarosegelen, können die gewünschten DNA-Fragmente isoliert werden. Es stehen verschiedene Kitsysteme zur Verfügung, die im Einzelnen beschrieben werden.

##### **GeneClean II Kit (BIO101)**

Dieser Kit wurde verwendet, um DNA-Fragmente größer als 200 bp zu isolieren. Das Gelstück mit dem zu isolierenden DNA-Fragment wird mit 2-3 Volumen einer 3 M Natriumiodid-Lösung versetzt und bei 55°C vollständig aufgelöst. Es folgt die Zugabe einer Glasmilch-Suspension (5 µl/µg DNA) und eine Inkubation für 5 min auf Eis. Die DNA bindet bei hoher Natriumiodidkonzentration an die Glaspartikel und kann durch kurze Zentrifugation (13 000 rpm, 30 sec) sedimentiert werden. Um störende Bestandteile zu entfernen, wird das Sediment dreimal mit eiskalter "New Wash"-Lösung (ethanolhaltige Lösung) gewaschen. Die DNA wird durch eine Inkubation (5 min, 55°C) in Puffer von den Glasmilchpartikeln getrennt, die Partikel werden durch Zentrifugation abgetrennt. Diese Methode eignet sich auch für die Aufreinigung von DNA aus Lösungen (z.B. nach Restriktion). In solchen Fällen beginnt man direkt mit der Zugabe der Natriumiodid-Lösung.

##### **QIAquick Gel-Extraktions-Kit**

Eine weitere effiziente Methode für die Isolierung von DNA-Fragmenten zwischen 100 bp und 10 kbp stellt der QIAquick Gel-Extraktions-Kit der Firma Qiagen dar. Das Gelstück wird in einer chaotropen Salzlösung aufgelöst. Das Prinzip entspricht dem QIAquick PCR Purification Kit. Die Aufreinigung wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt.

#### 4.2.4 Radioaktive und Biotin-Markierung von DNA

##### 4.2.4.1 Radioaktive Markierung von DNA

###### **"Nick Translation"**

Durch "nick translation" werden DNA-Fragmente radioaktiv markiert, indem in einen DNA-Doppelstrang willkürlich Einzelstrangbrüche (nicks) mit dem Enzym DNase I eingeführt werden und an dem entstehenden 3'-Ende die Neusynthese von DNA unter Verdrängung des alten Stranges beginnt. Das Enzym DNA-Polymerase I katalysiert diese Reaktion, wobei neben unmarkierten dNTPs auch  $\alpha^{32}\text{P}$ -markierte dNTPs eingebaut werden. Die Reaktion wurde mit dem Nick Translation Kit von Roche

Diagnostics durchgeführt. Folgender Reaktionsansatz wird angesetzt und für 30 min bei 15°C inkubiert:

100 ng zu markierende DNA, je 20 nM dCTP, dGTP und dTTP, 20 µCi  $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP, 2 µl Enzymlösung. Der Ansatz wird mit a. dest. auf 20 µl aufgefüllt.

Die Reaktion wird durch die Zugabe von 2 µl 0.5 M EDTA gestoppt und die nicht inkorporierten dNTPs werden durch eine Gelfiltration von der markierten DNA abgetrennt. Die markierte DNA wird vor der Zugabe in die Hybridisierungslösung 10 min bei 98°C denaturiert und auf Eis abgekühlt.

### **"Random priming"**

Bei der Methode des "random priming" hybridisieren kurze Oligonukleotide (Hexamere) mit zufälligen Sequenzen (random Primer) an die zu markierende, denaturierte DNA. Der komplementäre DNA-Strang wird von dem Klenow-Enzym unter Verwendung der 3'-OH-Enden der Oligonukleotide als Primer neu synthetisiert. Radioaktiv markierte Desoxynukleotidtriphosphate werden eingebaut. Herstellung der DNA-Sonde:

100 ng DNA werden bei 98°C 10 min denaturiert. Der Ansatz wird auf Eis abgekühlt.

1 x Hexanukleotidmix (Roche Diagnostics); 2-3 min 37°C (annealing)

Je 1 mM dCTP, dGTP, dTTP, 1 x Puffer H (Roche Diagnostic), 4 U Klenow-Enzym, 20 µCi  $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP.

Mit a.dest. wird der Ansatz auf 20 µl aufgefüllt, 1 h bei 37°C inkubiert und durch die Zugabe von 2 µl 0.5 M EDTA abgestoppt. Die nicht eingebauten dNTPs werden mittels Gelfiltration entfernt. Die markierte DNA wird vor dem Hybridisierungsexperiment 10 min bei 98°C denaturiert und auf Eis abgekühlt.

### **Gelfiltration (Spin column-Methode)**

Mit dieser Methode können nicht eingebaute radioaktive oder nicht-radioaktive Nukleotide und Oligonukleotide von markierten DNA-Fragmenten abgetrennt werden. Eine 1ml Einwegspritze wird mit Glaswolle verschlossen und mit ca. 1 ml Sephadex G-50 fine (äquilibriert in TE-Puffer) gefüllt. Die Spritze wird in ein 15 ml Röhrchen überführt und 2 min bei 1200 x g abzentrifugiert. Der zu reinigende Reaktionsansatz wird mit TE-Puffer auf 100 µl aufgefüllt und auf die Sephadex-Säule aufgetragen. Nach einer Zentrifugation für 2 min bei 1200 x g werden 100 µl TE-Puffer auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Das markierte DNA-Fragment befindet sich in diesem TE-Eluat, die Nukleotide verbleiben im Säulenmaterial.

#### **4.2.4.2 Nicht-radioaktive DNA-Markierung mit Biotin**

##### **Biotin High Prime Kit (Roche Diagnostics)**

Analog zur radioaktiven Markierung durch random priming (4.2.4.1) wird hier die zu markierende DNA nach Denaturierung mit Hexanukleotiden, Klenow-Enzym, dATP, dCTP, dGTP, dTTP und Biotin-16-dUTP (enthalten in der Biotin High Prime Suspension) inkubiert. Das molare Verhältnis von Biotin-16-dUTP zu dTTP ist so gewählt, daß jedes 20-25ste Nukleotid in synthetisierter DNA mit Biotin derivatisiert ist. Es werden 100-500 ng DNA nach den Herstellerangaben über Nacht markiert. Eine Lagerung der markierten DNA-Sonde ist für längere Zeit bei -20°C möglich.

#### **4.2.5 DNA-Hybridisierungstechniken**

##### **4.2.5.1 Dot-Blot-Verfahren**

Bei dieser Methode wird denaturierte DNA (Plasmid- oder chromosomale DNA) auf eine Nylonmembran (Biodyne B, Pall) transferiert und durch UV-Licht immobilisiert. So können rekombinante Klone durchmustert werden. 5-10 µg chromosomale DNA oder 0.5 µg Plasmid-DNA werden mit 2 µl 1 M NaOH/50 mM EDTA vermischt, für 10 min bei 98°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die DNA-Proben werden auf eine in a.dest. angefeuchtet Nylonmembran aufgespottet und getrocknet. Die Membran wird in 2 x SSC gewaschen, getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung an die Membran fixiert. Die Membran ist bei 4°C lagerbar oder kann direkt für die Hybridisierung eingesetzt werden.

##### **4.2.5.2 Koloniehybridisierung**

Mit der Koloniehybridisierung können positive Klone in einer Vielzahl von negativen Klonen aufgefunden werden, ohne daß vorher die chromosomale- oder Plasmid-DNA isoliert werden muß. Es gibt verschiedene Methoden die Klone auf eine Nylonmembran zu transferieren. Die Bakterienklone werden in 96-Loch Mikrotiterplatten kultiviert und mit einem sterilisierten Replikator auf eine Nylonmembran, die auf einer LB-Agarplatte liegt, transferiert. Es folgt eine Inkubation bis die Kolonien ca. 2 mm groß sind. Wenn die Bakterien direkt auf den Agarplatten wachsen, wird eine Nylonmembran faltenfrei auf die Platten gelegt und wieder abgezogen. Bei diesem Prozeß bleiben Bakterien an der Membran hängen. Platten und Membranen müssen für eine spätere Zuordnung asymmetrisch markiert werden. Die weitere Verarbeitung der Membranen ist für beide

Verfahren identisch. Die Membranen werden mit den Bakterien nach oben nacheinander jeweils für 5 min auf mit verschiedenen Lösungen getränkte Blotting-Papiere gelegt:

Lösung 1: 0.5 M NaOH

Lösung 2: 1 M Tris/HCl, pH 7.5

Lösung 3: 0.5 M Tris/HCl, pH 7.5/ 1.5 M NaCl

Die Membranen werden getrocknet, die DNA mit UV-Bestrahlung an die Membran fixiert und verbleibende Bakterienreste in 1 x TBS-Puffer abgewaschen. Ein Proteinase K-Verdau (200 µg/ml 1 x TBS) für 1 h bei 37°C entfernt eventuell noch verbleibende Bakterienbestandteile. Danach werden die Membranen 5 min in 1 x TBS gewaschen und anschließend getrocknet. Es folgt entweder eine Lagerung bei 4°C oder direkt eine Hybridisierung.

#### **4.2.5.3 Southern-Transfer (Southern, 1975)**

Diese Methode dient zur Übertragung von restringierter DNA aus Agarosegelen auf Nylonmembranen.

Restringierte chromosomale oder Plasmid-DNA wird in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Anfärbung und Dokumentation der Restriktion wird das Gel in 0.25 M HCl für 15 min unter leichtem Schütteln inkubiert, um die DNA-Fragmente zu zerstückeln, und um so einen Transfer auf die Nylonmembran zu erleichtern. Das Gel wird anschließend kurz in H<sub>2</sub>O geschwenkt und für 30 min in 0.5 M NaOH/1.5 M NaCl zur Denaturierung der DNA inkubiert. Darauf folgt eine Neutralisation für 30 min in 1 M Tris/HCl, pH 7.5/ 1.5 M NaCl. Der Transfer der DNA-Fragmente erfolgt unter neutralen Bedingungen (10 x SSC als Transferpuffer) bei 60 mbar für 45 min unter Verwendung eines Vakuum-Blotters der Firma Appligene auf eine Nylonmembran. Die DNA wird durch UV-Bestrahlung auf der Membran fixiert. Eine Lagerung bei 4°C ist möglich.

#### **4.2.5.4 Hybridisierung und Detektion mit Biotin-markierten DNA-Proben**

Die Detektion des Biotins ist möglich, da Biotin Streptavidin mit hoher Affinität bindet. Streptavidin ist über einen Linker mit alkalischer Phosphatase gekoppelt und kann in einem Assay durch die Zugabe des Chemilumineszenz-AP-Substrates (CSPD) detektiert werden. CSPD wird enzymatisch von der alkalischen Phosphatase gespalten. Die Umlagerung des Produktes geht mit einer Lichtemission bei einem



Wellenlängenmaximum von 447nm einher. Dies kann durch Auflegen von Röntgenfilmen dokumentiert werden.

Eine Prähybridisierung der Membranen erfolgt in einer formamidhaltigen Lösung (20 ml/100 cm<sup>2</sup> Filterfläche) bei 42°C unter Schütteln für 1 h. Danach wird die Lösung gewechselt und die markierte DNA-Sonde wird nach Denaturierung (10 min, 98°C) zugegeben. Die Menge an Sonde richtet sich nach der Konzentration (pro Fläche) der zu detektierenden Fragmente und nach dem spezifischen Biotingehalt der Sonde. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 42°C unter leichtem Schütteln. Die Hybridisierungssonden-Lösung kann bei -20°C gelagert und nach erneuter Denaturierung bei 68°C für 10 min wiederholt eingesetzt werden. Es folgen zwei Waschschritte zur Entfernung von unspezifisch gebundener DNA-Sonde für jeweils 30 min bei 42°C, zuerst ein "low stringency" Schritt mit 2 x SSC/0.1% SDS und dann ein "high stringency" Schritt mit 0.1 x SSC/0.1% SDS. Die Detektion der Biotin-Markierung wurde mit dem Biotin Detektion Kit der Firma Roche Diagnostics durchgeführt. Die Membran wird in Waschpuffer 5 min bei RT gewaschen und dann für 30 min bei RT mit 5 x Blockierungslösung inkubiert (schütteln) um Hintergrundssignale zu minimieren. Es folgt die Zugabe von 5 x Blockierungslösung mit 1: 5000 verdünnter Streptavidin-AP-Lösung für 30 min bei RT unter Schütteln. Die Membranen werden anschließend 2 x 15 min in Waschpuffer und 1 x 5 min in Detektionspuffer gewaschen. Die Detektion der alkalischen Phosphatase erfolgt durch die Zugabe von CSPD-Substrat. Die Dauer der Röntgenfilmexponierung muß für jede Hybridisierung ausgetestet werden und liegt in der Regel zwischen 1-20 min .

Prä-/Hybridisierungslösung: 5 x SSC, 5 x Blockierungsreagenz,  
50% Formamid, 0.02% SDS, 0.1% N-Lauroylsarkosin

10 x Blockierungsreagenz: 25 g Blockierungsreagenz werden in 250 ml  
0.1 M Maleinsäure/ 0.15 M NaCl (pH 7.5 mit  
NaOH) gelöst

Waschpuffer: Maleinsäurepuffer (0.1 M Maleinsäure/ 0.15 M  
NaCl, pH 7.5 mit NaOH), 0.3% Tween 20 (v/v)

Detektionspuffer: 1 M Tris/HCl, pH 9.5/ 1 M NaCl

#### 4.2.5.5 Hybridisierung und Detektion mit radioaktiv-markierten DNA-Proben

Die Bindungsstellen der Nylonmembran werden durch eine einstündige Inkubation bei 60°C unter leichtem Schütteln in Prähybridisierungslösung abgesättigt.

Die durch "nick translation" oder "random priming" markierten DNA-Sonden werden für 10 min bei 98°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 55-60°C (abhängig von der Homologie der verwendeten Sonde) in Hybridisierungslösung mit  $10^5$ - $10^6$  cpm/ml unter leichtem Schütteln. Das Entfernen unspezifisch gebundener DNA-Sonde erfolgt durch einen zweifachen Waschschrift bei 60°C für je 30 min mit 0.1 x SSC/0.1% SDS. Die Position radioaktiver Signale auf Membranen lassen sich durch Auflegen von Röntgenfilmen ermitteln. Die Exponierungszeit bei  $^{32}\text{P}$  kann durch Verstärkerfolien und Inkubation bei -80°C verkürzt werden.

50 x Denhardt's-Lösung: 5 g Ficoll, 5 g BSA, 5 g Polyvinylpyrrolidone  
a.dest. ad 500 ml

Prähybridisierungspuffer: 5 x Denhardt's-Lösung, 5 x SSC, 0.5% SDS  
50 µg/ml Heringssperma-DNA

Heringssperma-DNA: Stocklösung 10mg/ml  
Die Heringssperma-DNA wird in a.dest. gelöst und mit 0.1 Volumen 1 M NaOH versetzt und für 20 min auf Eis beschallt (Mikrotip).  
Die Lösung wird 10 min bei 98°C inkubiert, durch Zugabe von 0.1 Volumen HCl neutralisiert und aliquotiert bei -20°C gelagert.

#### 4.2.6 Isolierung und Bearbeitung von RNA

Alle Lösungen und Puffer werden mit DEPC inkubiert oder in DEPC behandeltem a. dest. angesetzt um RNasen zu aktivieren und somit einen Abbau der RNA zu verhindern. Während des Arbeitens müssen ständig Handschuhe getragen werden. Einmal verwendbares Plastikmaterial eignet sich besonders für das Arbeiten mit RNA. Glasmaterialien sollten mit DEPC-Wasser gespült und anschließend autoklaviert werden.

Zur Herstellung von DEPC-Wasser wird 1 ml DEPC zu 1 l a. dest. gegeben und über Nacht bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend autoklaviert.

#### 4.2.6.1 Isolierung von RNA

Das Sediment vegetativer (ca.  $10^{10}$  Zellen), Indol-behandelter Zellen oder von Fruchtkörpern wird in 250 µl kaltem Saccharosepuffer resuspendiert. Es folgt die Zugabe von 125 µl Lysepuffer, kräftiges Vortexen und eine Inkubation bei 65 °C für 90 Sekunden. Nach der Zugabe von 250 µl Aqua-Phenol wird gevortext und es folgt eine Inkubation für 3 min bei 65 °C und anschließend bei -80°C. Durch eine Zentrifugation bei 13 000 rpm für 10 min werden die Phasen getrennt. Die obere, wäßrige Phase wird in ein neues Gefäß überführt und die Aqua-Phenol-Extraktion wird wie oben beschrieben zweimal wiederholt. Es folgt eine Fällung der RNA und DNA der wäßrigen Phase durch Zusatz von 40 µl 3 M Natriumacetat (pH 4.5) und 1 ml 98% Ethanol für mindestens 2.5 h bei -20°C. Die Nukleinsäuren werden nach einer Abzentrifugation bei 13 000 rpm und einem Waschschrift mit 70%igem Ethanol getrocknet und in 180 µl RNA-Lagerpuffer resuspendiert. Zur Entfernung von DNA in der Lösung werden 20 µl 10x DNase-Puffer und 80 U DNase I (RNase-frei) zugegeben und bei RT für ca. 30 min inkubiert. Durch eine TE-Phenol-Extraktion wird das Enzym entfernt. Die RNA wird durch Zugabe von 25 µl 3 M Natriumacetat (pH 4.5) und 1 ml 98% Ethanol für mindestens 2.5 h bei -20°C gefällt. Ein Zentrifugationsschritt bei 13 000 rpm und ein Waschschrift mit 70%igem Ethanol folgt. Das RNA-Sediment wird in einem Vakuum-Konzentrator getrocknet und in 50 µl RNA-Lagerpuffer gelöst. Eine Lagerung der RNA erfolgt bei -80°C.

Saccharosepuffer :	0.3 M Saccharose, 0.01 M Natriumacetat (pH 4.5)
Lysepuffer:	2% SDS, 0.01 M Natriumacetat (pH 4.5)
RNA-Lagerpuffer:	20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.5), 1 mM EDTA
10 x DNase-Puffer:	0.2 M Natriumacetat (pH 4.5), 0.1 M MgCl <sub>2</sub> , 0.1 M NaCl

#### 4.2.6.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA

Durch die Messung der Extinktion im Spektralphotometer bei 260 nm und 280 nm kann die Konzentration und die Reinheit der RNA-Lösung bestimmt werden. Das Verhältnis der optischen Dichte von 260 nm zu 280 nm sollte bei reiner RNA 2.0 betragen.

$$1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ µg/ml RNA}$$

#### 4.2.6.3 Gelelektrophorese von RNA

Zur Analyse von RNA wurde die horizontale Gelelektrophorese verwendet, wobei die RNA in 1%igen Agarose-Formaldehydgelen aufgetrennt wird. Dazu wird 1 g Agarose in 72 ml DEPC-H<sub>2</sub>O geschmolzen und auf 65°C abgekühlt. Es folgt die Zugabe von 10 ml 10 x MOPS-Puffer und 18 ml deionisiertem Formaldehyd. Die Agarose-Lösung wird in einen mit 1 M NaOH und anschließend DEPC-H<sub>2</sub>O gespülten Gelschlitten gegossen. Die Elektrophoresekammer wird ebenfalls mit 1 M NaOH und anschließend mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült. 5-20 µg RNA werden in einem Vakkum-Konzentrator getrocknet, anschließend in 9 µl RNA-Probenpuffer gelöst und für 10 min bei 65°C denaturiert. Es folgt die Zugabe von 1 µl RNA-StoppLösung und der Transfer in die Geltaschen. Die Elektrophorese erfolgt bei 70 Volt für 4 h in 1 x MOPS-Puffer. Ein Größenstandard wird parallel zur RNA aufgetrennt. Die Färbung der RNA erfolgt in 0.5 µg/ml Ethidiumbromid für 10 min. Die Entfärbung in DEPC-H<sub>2</sub>O erfolgt für ca. 2 h mit anschließender Dokumentation.

10 x MOPS-Puffer: 0.2 M MOPS, 80 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA  
(pH 7 mit NaOH)

RNA-Probenpuffer: 100 µl 10 x MOPS-Puffer, 500 µl Formamid, 178 µl Form-  
aldehyd, 222 µl DEPC-H<sub>2</sub>O

RNA-Stoppuffer: 625 µl Glycerin (80%), 25 µl 0.25 M EDTA, 375 µl DEPC-  
H<sub>2</sub>O, eine Spatelspitze Bromphenolblau

#### 4.2.6.4 Northern-Transfer und Hybridisierung

Vor dem Transfer der RNA nach der Gelelektrophorese wird das Gel jeweils für 30-60 min in 0.05 M NaOH/0.15 M NaCl (Fragmentierung) und anschließend in 0.1 M Tris/HCl, pH 7.5/0.15 M NaCl (Neutralisation) inkubiert. Der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran erfolgt unter Vakuum mit 10 x SSC als Transferpuffer unter Verwendung des Vakuum-Blotters der Firma Appligene bei 60 mbar für ca. 45 min. Durch UV-Licht (UV-crosslinker; Stratagene) wird die RNA an die Membran gebunden. Es folgt entweder eine Aufbewahrung bei RT oder direkt die Prähybridisierung. Die Hybridisierung und die Detektion wurde analog Punkt 4.2.5.4 durchgeführt.

#### **4.2.6.5 Reverse Transkriptase PCR (RTPCR)**

Mit Hilfe dieser sehr sensitiven Technik kann man die Genexpression in unterschiedlichen Zelltypen nachweisen. Die RTPCR besteht aus zwei Schritten. Zuerst wird die isolierte RNA in die korrespondierende cDNA umgeschrieben (reverse Transkription). Diese cDNA dient als Template für die Synthese des zweiten DNA-Stranges und darauf folgt die Amplifikation der DNA durch PCR. Mit Hilfe des Access RTPCR Systems der Firma Promega sind alle Schritte in einem Reaktionsgefäß möglich. Von der isolierten RNA, die zuvor auf DNA-Verunreinigungen überprüft wurde, werden jeweils 200 ng eingesetzt. Alle weiteren Schritte erfolgten nach dem Herstellerprotokoll. Lediglich die Annealingtempertur wurde abhängig von den Primern modifiziert.

### **4.2.7 Proteinchemische Methoden**

#### **4.2.7.1 Proteinisolierung**

Zur Gewinnung von zellfreien Extrakten werden vegetative, Indol-behandelte Zellen, Fruchtkörper oder Zellen, die einem Hitzeschock ausgesetzt wurden, verwendet. Das Material wird dazu in 150 µl Puffer A resuspendiert und bei 4°C nach Zugabe einer Spatelspitze Glasperlen (0.1 mm im Durchmesser) in einem Cuphorn für 4 x 20 sec sonifiziert. Danach werden die Glasperlen bei 13 000 rpm abzentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wird nochmals einem Ultrazentrifugationsschritt (50 000 g, 4°C, 1 h) unterzogen. Der Überstand wird dann bei -80 °C gelagert.

Puffer A:                50 mM MOPS, 0.01 M MgCl<sub>2</sub>, pH 7.5 mit NaOH  
                              Proteinase-Inhibitor-Cocktail Complete™ (Roche Diagnostics)

#### **4.2.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)**

Mit Hilfe der Proteinbestimmung nach Bradford läßt sich die Proteinkonzentration einer Lösung bestimmen. Dieser Methode liegt die Beobachtung zugrunde, daß das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blue G-250 sich von 465 nm auf 595 nm verschiebt, wenn eine Proteinbindung stattfindet (Bradford, 1976). Es wurde mit dem Bio Rad Protein Assay System gearbeitet. Dazu wird 1 µl der zu bestimmenden Proteinlösung mit 800 µl Puffer A (siehe Punkt 4.2.7.1) gemischt und es folgt die Zugabe von 200 µl filtriertem Farbreagenz. Diese Lösung wird gevortext und

5 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die Absorption der Probe bei 595 nm gegen einen Nullwert ohne Protein gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt anhand einer mit Proteinstandards (BSA) erstellten Eichkurve.

#### **4.2.7.3 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (Ruan et al., 1993)**

Zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in einer Proteinprobe werden 10  $\mu$ g Protein in 100  $\mu$ l Puffer A (siehe Punkt 4.2.7.1) mit 300  $\mu$ l Puffer B gemischt. Es folgt eine Inkubation für 30 min bei 37°C. Die Reaktion wird durch Zugabe von 3 ml 0.1 M Glycinpuffer (pH 10.3 mit NaOH) abgestoppt. Der Puffer B enthält das Fluoreszenzsubstrat 4-MUG (4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid), welches durch  $\beta$ -Galaktosidase hydrolysiert wird. Das so entstehende, fluoreszierende Methylumbelliferon kann mittels eines Fluoreszenzspektrometers (Shimadzu RF-5000) bei 360 nm (Excitation) und 450 nm (Emission) gemessen werden. Die Analysen wurden als Doppelbestimmung in zweifacher Ausführung durchgeführt. Alle verwendeten Puffer müssen vor ihrer Verwendung entgast und filtriert werden.

Puffer B:            10 mM Natriumphosphat (pH 7.0), 0.1 M NaCl, 1 mM  
                         MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ g 4-MUG/300  $\mu$ l, 0.1 % BSA

## 5. Literatur

- Amemura, A., Chakraborty, R., Fujita, M., Noumi, T. and Futai, M. (1988). Cloning and nucleotide sequence of the isoamylase gene from *Pseudomonas amyloclavata*. J. Biol. Chem. 263: 9271-9275.
- Apelian, D. and Inouye, S. (1990). Development-specific sigma-factor essential for late stage differentiation of *Myxococcus xanthus*. Genes & Dev. 4: 1396-1403.
- Apelian, D. and Inouye, S. (1993). A new putative sigma factor of *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 175: 3335-3342.
- Arciszewska, L. K. And Sherratt, D. J. (1995). Xer site-specific recombination *in vitro*. EMBO 14: 2112-2120.
- Armitage, J. P. and Schmitt, R. (1997). Bacterial chemotaxis: *Rhodobacter sphaeroides* and *Sinorhizobium meliloti* variations on a theme? Microbiology 143: 3671-3682.
- Arnold, J. W. and Shimkets, L. J. (1988). Cell surface properties correlated with cohesion in *Myxococcus xanthus*. J Bacteriol. 170: 5771-5777.
- Azaro, M. A. and Landy, A. (1997). The isomeric preference of Holliday junctions influences resolution bias by  $\lambda$  integrase. EMBO 16: 3744-3755.
- Baker, M. E. (1994). *Myxococcus xanthus* C-factor, a morphogenetic paracrine signal, is similar to *Escherichia coli* 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase and human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Biochem. J. 301: 311-312.
- Barany, F. (1985). Single-stranded hexameric linkers: a system for in-phase insertion mutagenesis and protein engineering. Gene 37: 111-123.
- Barker, M. M., Gaal, T., Josaitis, C. A. and Gourse, R. L. (2001 a). Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation *in vivo* and *in vitro*. J. Mol. Biol. 305: 673-688.
- Barker, M. M., Gaal, T., and Gourse, R. L. (2001 b). Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models of positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. J. Mol. Biol. 305: 689-702.
- Behmlander, R. M. and Dworkin, M. (1991). Extracellular fibrils and contact-mediated cell interactions in *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 173: 7810-7821.
- Behmlander, R. M. and Dworkin, M. (1994). Integral proteins of the extracellular matrix fibrils of *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 176: 6304-6311.
- Beyer, S., Kunze, B., Silakowski, B. and Müller, R. (1999). Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90. Biochim. Biophys. Acta 1445: 185-195.

- Biran, D. and Kroos, L. (1997). In vitro transcription of *Myxococcus xanthus* genes with RNA polymerase containing sigmaA, the major sigma factor in growing cells. *Mol. Microbiol.* 25: 463-472.
- Blackhart, B. D. and Zusman, D. R. (1985). Frizzy" genes of *Myxococcus xanthus* are involved in control of frequency of reversal of gliding motility. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 82: 8767-8770.
- Blackhart, B. D. and Zusman, D. R. (1986). Analysis of the products of the *Myxococcus xanthus* *frz* genes. *J. Bacteriol.* 166: 673-678.
- Blair, D. F. (1995). How bacteria sense and swim. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 489-522.
- Blakely, G., Colloms, S., May, G., Burke, M. and Sherratt, D. (1991). *Escherichia coli* XerC recombinase is required for chromosomal segregation at cell division. *New Biol.* 3: 789-798.
- Blakely, G., May, G., McCulloch, R., Arciszewski, L. K., Burke, M., Lovett, S. T. and Sherratt, D. (1993). Two related recombinases are required for site-specific recombination at *dif* and *cer* in *E. coli* K12. *Cell* 75: 351-361.
- Bowden, M. G. and Kaplan, H. B. (1998). The *Myxococcus xanthus* lipopolysaccharide O-antigen is required for social motility and multicellular development. *Mol. Microbio.* 30: 275-284.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bremaud, L., Fremaux, C., Laalami, S. and Cenatiempo, Y. (1995). Genetic and molecular analysis of the tRNA-*tufB* operon of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Nucleic Acids Res.* 23: 1737-1743.
- Bruttin, A., Foley, S. and Brüssow, H. (1997). The site-specific integration system of the temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophage  $\phi$ Sfi21. *Virology* 237: 148-158.
- Burchard, R. P. and Dworkin, M. (1966). A bacteriophage for *Myxococcus xanthus*: Isolation, characterization and relation of infectivity to host morphogenesis. *J. Bacteriol.* 91: 1305-1313.
- Burchard, R. P. (1981). Gliding motility of prokaryotes: ultrastructure, physiology, and genetics. *Annu. Rev. Microbiol.* 35: 497-529.
- Butterfaß, H. J. (1992). Isolierung und Charakterisierung des *csgA*-Genes aus *Stigmatella aurantiaca*. Diplomarbeit, Rubert-Karls-Universität, Heidelberg.
- Campbell, A. M. (1962). Episomes. *Adv. Genet.* 11: 101-145.
- Campbell, A. M. (1992). Chromosomal insertion sites for phages and plasmids. *J. Bacteriol.* 174: 7495-7499.



- Cashel, M. and Gallant, J. (1969). Two compounds implicated in the function of the RC gene of *E. coli*. *Nature* 221: 838-841.
- Chang, B. Y. and Dworkin, M. (1994). Isolated fibrils rescue cohesion and development in the Dsp mutant of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 176: 7190-7196.
- Chen, H., Keseler, I. M. and Shimkets, L. J. (1990). Genome size of *Myxococcus xanthus* determined by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 172: 4206-4213.
- Chen, H. W., Kuspa, A., Keseler, I. M. and Shimkets, L. J. (1991). Physical map of the *Myxococcus xanthus* chromosome. *J. Bacteriol.* 173: 2109-2115.
- Cheng, Y. and Kaiser, D. (1989 a). *dsg*, a gene required for cell-cell interaction early in *Myxococcus* development. *J. Bacteriol.* 171: 3719-3726.
- Cheng, Y. and Kaiser, D. (1989 b). *dsg*, a gene required for *Myxococcus* development, is necessary for cell viability. *J. Bacteriol.* 171: 3727-3731.
- Cho, K. and Zusman, D. R. (1999 a). Sporulation timing in *Myxococcus xanthus* is controlled by the *espAB* locus. *Mol. Microbiol.* 34: 714-725.
- Cho, K. and Zusman, D. R. (1999 b). AsgD, a new two-component regulator required for A-signalling and nutrient sensing during early development of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* 34: 268-281.
- Clerget, M. (1991). Site-specific recombination promoted by a short DNA segment of plasmid R1 and by a homologous segment in the terminus region of *Escherichia coli* chromosome. *New. Biol.* 3: 780-788.
- Craig, N. L. (1988). The mechanism of conservative site-specific recombination. *Annu.Rev. Genet.* 22: 77-105.
- Craig, N. L. and Nash, H. A. (1984). *E. coli* integration host factor binds to specific sites in DNA. *Cell* 39: 707-716.
- Crawford, E. W. and Shimkets, L. J. (2000 a). The *Myxococcus xanthus* *socE* and *csgA* genes are regulated by the stringent response. *Mol. Microbiol.* 37: 788-799.
- Crawford, E. W. and Shimkets, L. J. (2000 b). The stringent response in *Myxococcus xanthus* is regulated by SocE and the CsgA C-signaling protein. *Genes & Dev.* 14: 483-492.
- Davis, J. M., Mayor, J. M. and Plamann, L. S. (1995). *asgC767* is an allele of the major sigma factor gene of *Myxococcus xanthus*. *Int. Conf. Biol. Myxobacteria.*
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. and Timmis, K. N. (1990): Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172: 6568-6572.
- Deutscher, M. P. (1990). Ribonucleases, tRNA nucleotidyltransferase, and the 3' processing of tRNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 39: 209-240.

- Dower, W. J., Miller, J. F. and Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6144.
- Downard, J. S. and Zusman, D. R. (1985). Differential expression of protein S genes during *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* 161: 1146-55.
- Downard, J., Ramaswamy, S. V. and Kil, K. S. (1993). Identification of *esg*, a genetic locus involved in cell-cell signaling during *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* 175: 7762-70.
- Downard, J. and Toal, D. (1995). Branched-chain fatty acids: the case for a novel form of cell-cell signalling during *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* 16: 171-5.
- Drlica, K. (1992). Control of bacterial supercoiling. *Mol. Microbiol.* 6: 425-433.
- Dworkin, M., Keller, K. H. and Weisberg, D. (1983). Experimental observations consistent with a surface tension model of gliding motility of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 155: 1367-71.
- Dworkin, M. (1994). Increases in the intracellular concentration of glycerol during development in *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 120: 369-73.
- Dworkin, M. (1996). Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol. Rev.* 60: 70-102.
- Ellehaug, E., Norregaard-Madsen, M. and Soogrand-Anderson, L. (1998). The FruA signal transduction protein provides a checkpoint for the temporal coordination of intercellular signals in *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* 30: 807-817.
- Fink, J. M. and Zissler, J. F. (1989). Defects in motility and development of *Myxococcus xanthus* lipopolysaccharide mutants. *J. Bacteriol.* 171: 2042-2048.
- Fisseha, M., Gludemans, M., Gill, R. E. and Kroos, L. (1996). Characterization of the regulatory region of a cell interaction-dependent gene in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 178: 2539-2550.
- Fontes, M. and Kaiser, D. (1999). *Myxococcus* cells respond to elastic forces in their substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8052-8057.
- Freese, A., Reichenbach, H., and Lünsdorf, H. (1997). Further characterization and in situ localization of chain-like aggregates of the gliding bacteria *Myxococcus fulvus* and *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 179: 1246-1252.
- Gabriel, K., Schmid, H., Schmidt, U. and Rausch, H. (1995). The actinophage RP3 DNA integrates site-specifically into the putative tRNA<sup>Arg</sup> (AGG) gene in *Streptomyces rimosus*. *Nucleic Acids Res.* 23: 58-63.
- Garza, A. G., Harris, B. Z., Pollack, J. S. and Singer, M. (2000 a). The *asgE* locus is required for cell-cell signalling during *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* 35: 812-824.

- Garza, A. G., Harris, B. Z., Greenberg, B. M. and Singer, M. (2000 b). Control of *asgE* expression during growth and development of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 182: 6622-6629.
- Gerth, K., Irschik, H., Reichenbach, H. and Trowitzsch, W. (1980). Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus flavus* (Myxobacterales). I. Cultivation, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* 36: 1474-1479.
- Gerth, K., Jansen, R., Reifenstahl, G., Höfle, G., Irschik, H., Kunze, B., Reichenbach, H. and Thierbach, G. (1983). The myxalamids, new antibiotics from *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales). I. Production, physico-chemical and biological properties, and mechanism of action. *J. Antibiot.* 36: 1150-1156.
- Gerth, K., Metzger, R. and Reichenbach, H. (1993). Induction of myxospores in *Stigmatella aurantiaca* (myxobacteria) - Inducers and inhibitors of myxospore formation, and mutants with a changed sporulation behaviour. *J. Gen. Microbiol.* 139: 865-871.
- Gerth, K., Bedorf, N., Irschik, H., Höfle, G. and Reichenbach, H. (1994). The soraphens: a family of novel antifungal compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). I. Soraphen A1 alpha: fermentation, isolation, biological properties. *J. Antibiot.* 47: 23-31.
- Gerth, K. and Reichenbach, H. (1994). Induction of myxospores in *Stigmatella aurantiaca* (myxobacteria): analysis of inducer-inducer and inducer-inhibitor interactions by dose-response curves. *Microbiology* 140: 3241-3247.
- Gerth, K., Bedorf, N., Höfle, G., Irschik, H. and Reichenbach, H. (1996). Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* 49: 560-563
- Gill, R. E. and Cull, M. G. (1986). Control of developmental gene expression by cell-to-cell interactions in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 168: 341-347
- Gill, R. E., Karlok, M. and Benton, D. (1993). *Myxococcus xanthus* encodes an ATP-dependent protease which is required for developmental gene transcription and intercellular signaling. *J. Bacteriol.* 175: 4538-4544
- Gollop, R., Inouye, M., Inouye, S. (1991). Protein U, a late-developmental spore coat protein of *Myxococcus xanthus*, is a secretory protein. *J. Bacteriol.* 173: 3597-3600.
- Gorski, L., Gronewold, T., and Kaiser, D. (2000). A sigma(54) activator protein necessary for spore differentiation within the fruiting body of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 182: 2438-2444.
- Grainge, I. and Jayaram, M. (1999). The integrase family of recombinases: organization and function of the active site. *Mol. Microbiol.* 33: 449-456.
- Hagen, D. C., Bretscher, A. P. and Kaiser, D. (1978). Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* 284-296.
- Hagen, T. J. and Shimkets, L. J. (1990). Nucleotide sequence and transcriptional products of the *csg* locus of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 172: 15-23.

- Hanafi, D. and Bossi, L. (2000). Activation and silencing of *leu-500* promoter by transcription-induced DNA supercoiling in the *Salmonella* chromosome. *Mol. Microbiol.* 37: 583-594.
- Hanlon, W. A., Inouye, M. and Inouye, S (1997). Pkn9, a Ser/Thr protein kinase involved in the development of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* 23: 459-471.
- Harada, T. (1984). Isoamylase and its industrial significance in the production in sugars from starch. In: Russell GE (ed) *Biotechnology Genetic Eng. Rev.* 1: 39-63.
- Harris, B. Z., Kaiser, D. and Singer, M. (1998). The guanosine nucleotide (p)ppGpp initiates development and A-factor production in *Myxococcus xanthus*. *Genes & Dev.* 12: 1022-1035.
- Harris, B. Z. and Singer, M. (1998). Identification and characterization of the *Myxococcus xanthus argE* Gene. *J. Bacteriol.* 180: 6412-6414.
- Hartzell, P. and Kaiser, D. (1991 a). Function of MglA, a 22-kilodalton protein essential for gliding in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 173: 7615-7624.
- Hartzell, P. and Kaiser, D. (1991 b). Upstream gene of the *mgl* operon controls the level of MglA protein in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 173: 7625-7635.
- Hartzell, P. L. (1997). Complementation of sporulation and motility defects in a prokaryote by a eukaryotic GTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94: 9881-9886.
- Haseltine, W. A. and Bock, R. (1973). Synthesis of guanosine tetra and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 70: 1564-1568.
- Heidelbach, M., Skladny, H. and Schairer, H. U. (1993 a). Heat shock and development induce synthesis of a low-molecular-weight stress-responsive protein in the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *J. Bacteriol.* 175: 7479-7482.
- Heidelbach, M., Skladny, H. and Schairer, H. U. (1993 b). Purification and characterization of SP21, a development-specific protein of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *J. Bacteriol.* 175: 905-908.
- Henrichsen, J. (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.* 36: 478-503.
- Henrichsen, J. (1983). Twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* 37: 81-93.
- Hill, C. W., Gray, J. A. and Brody, H. (1989). Use of the isocitrate dehydrogenase structural gene for attachment of e14 in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 171: 4083-4084.
- Hodgkin, J. and Kaiser, D. (1977). Cell-to-cell stimulation of movement in nonmotile mutants of *Myxococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 74: 2938-2942.

- Hodgkin, J. and Kaiser, D. (1979 a). Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): genes controlling movement of single cells. *Mol. Gen. Genet.* 171: 167-176.
- Hodgkin, J. and Kaiser, D. (1979 b). Genetics of gliding mobility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): two gene systems control movement. *Mol. Gen. Genet.* 171: 177-191.
- Hoiczyk, E. and Baumeister, W. (1998). The junctional pore complex, a prokaryotic secretion organelle, is the molecular motor underlying gliding motility in cyanobacteria. *Current Biol.* 8: 1161-1168.
- Hull, W. E., Berkessel, A., Plaga, W. (1998). Structure elucidation and chemical synthesis of stigmolone, a novel type of prokaryotic pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95: 11268-11273.
- Inouye, M., Inouye, S. and Zusman, D. R. (1979 a). Biosynthesis and self-assembly of protein S, a development-specific protein of *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 76: 209-213.
- Inouye, M., Inouye, S. and Zusmann, D.R. (1979 b). Gene expression during development of *Myxococcus xanthus*: pattern of protein synthesis. *Dev. Biol.* 68: 579-591.
- Inouye, S., Ike, Y. and Inouye, M. (1983 a). Tandem repeat of the genes for protein S, a development-specific protein of *Myxococcus xanthus*. *J. Biol. Chem.* 258: 38-40.
- Inouye, S., Franceschini, T. and Inouye, M. (1983 b). Structural similarities between the development-specific protein S from a gram-negative bacterium, *Myxococcus xanthus*, and calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 80: 6829-6833.
- Inouye, S. (1990). Cloning and DNA sequence of the gene coding for the major sigma factor from *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 172: 80-85.
- Ishihama, A. (1999). Stringent control. In *Encyclopaedia of Molecular Biology*. Edited by Creighton T. E. John Wiley & Sons, Inc.: 2451-2455.
- Janse, B. J. H., Steyn, A. J. C. and Pretorius, I. S. (1993). Regional sequence homologies in starch-degrading enzymes. *Curr. Genet.* 24: 400-407.
- Josaitis, C. A., Gaal, T. and Gourse, R. L. (1995). Stringent control and growth-rate-dependent control have nonidentical promoter sequence requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92: 1117-1121.
- Julien, B., Kaiser, D. and Garza, A. (2000). Spatial control of cell differentiation in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97: 9098-9103.
- Kaiser, D. (1979). Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 76: 5952-5956.
- Kaiser, D. and Kroos, L. (1993). Intercellular signaling. *Myxobacteria II*. M. Dworkin and D. Kaiser. Washington, American Society for Microbiology: 257-283.

- Kaiser, D. (2000). Bacterial motility: how do pili pull? *Current Biol.* 10: 777-780.
- Kalman, L. V., Cheng, Y. L. and Kaiser, D. (1994). The *Myxococcus xanthus* *dsg* gene product performs functions of translation initiation factor IF3 in vivo. *J. Bacteriol.* 176: 1434-1442.
- Kashefi, K. and Hartzell, P. L. (1995). Genetic suppression and phenotypic masking of a *Myxococcus xanthus* *frzF*- defect. *Mol. Microbiol.* 15: 483-494.
- Keseler, I. M. and Kaiser, D. (1997). Sigma54, a vital protein for *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94: 1979-1984.
- Kim, S. K. and Kaiser, D. (1990). Cell alignment required in differentiation of *Myxococcus xanthus*. *Science* 249: 926-928.
- Kim, S. K. and Kaiser, D. (1991). C-factor has distinct aggregation and sporulation thresholds during *Myxococcus* development. *J. Bacteriol.* 173: 1722-1728.
- Komano, T., Furuichi, T., Inouye, M., and Inouye, S. (1984). Effects of deletion of the gene for the development-specific protein S on differentiation in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 158: 1195-1197.
- Komine, Y., Adachi, T., Inokuchi, H. and Ozeki, H. (1990). Genomic organization and physical mapping of the transfer RNA genes in *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* 21: 2579-2598.
- Kroos, L. and Kaiser, D. (1984). Construction of Tn5*lac*, a transposon that fuses lacZ expression to exogenous promoters, and its introduction into *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 81: 5816-5820.
- Kroos, L., Kuspa, A. and Kaiser, D. (1986). A global analysis of developmentally regulated genes in *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* 117: 252-266.
- Kroos, L. and Kaiser, D. (1987). Expression of many developmentally regulated genes in *Myxococcus* depends on a sequence of cell interactions. *Genes & Dev.* 1: 840-854.
- Kroos, L., Hartzell, P., Stephens, K. and Kaiser, D. (1988). A link between cell movement and gene expression argues that motility is required for cell-cell signaling during fruiting body development. *Genes & Dev.* 2: 1677-1685.
- Kuempel, P. L., Henson, M., Dircks, L., Tecklenburg, M. and Lim, D. F. (1991). *Dif*, a *recA*-independent recombination site in the terminus region of the chromosome of *Escherichia coli*. *New Biol.* 3: 799-811.
- Kunze, B., Kemmer, T., Höfle, G. and Reichenbach, H. (1984). Stigmatellin, a new antibiotic from *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales). I. Production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* 37: 454-461.
- Kuspa, A. and Kaiser, D. (1989). Genes required for developmental signalling in *Myxococcus xanthus*: three *asg* loci. *J. Bacteriol.* 171: 2762-2772.

- Kuspa, A., Plamann, L. and Kaiser, D. (1992 a). Identification of heat-stable A-factor from *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 174: 3319-3326.
- Kuspa, A., Plamann, L. and Kaiser, D. (1992 b). A-signalling and the cell density requirement for *Myxococcus xanthus* development. J. Bacteriol. 174: 7360-7369.
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of  $\lambda$  site-specific recombination. Annu. Rev. Biochem. 58: 913-49.
- Lee, E. Y. C. and Whelan, W. J. (1971). Glykogen and starch debranching enzymes. In: Boyer, P. D. (ed) The enzymes, Academic Press, New York. 5: 191-234.
- Lee, K. and Shimkets, L. J. (1994). Cloning and characterization of the *socA* locus which restores development to *Myxococcus xanthus* C-signaling mutants. J. Bacteriol. 176: 2200-2209.
- Lee, B. U., Lee, K., Mendez, J. and Shimkets, L. J. (1995). A tactile sensory system of *Myxococcus xanthus* involves an extracellular NAD(P)(+)-containing protein. Genes & Dev. 9: 2964-2973.
- Lee, K. and Shimkets, L. J. (1996). Suppression of a signaling defect during *Myxococcus xanthus* development. J. Bacteriol. 178: 977-984.
- Li, S. and Shimkets, L. J. (1988). Site-specific integration and expression of a developmental promoter in *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 170: 5552-5556.
- Li, S., Lee, B. U. and Shimkets, L. J. (1992). *CsgA* expression entrains *Myxococcus xanthus* development. Genes & Dev. 6: 401-410.
- Li, Y. and Plamann, L. (1996). Purification and in vitro phosphorylation of *Myxococcus xanthus* AsgA protein. J. Bacteriol. 178: 289-292.
- Lowe, T., M. and Eddy, S. R. (1997). tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. Nucleic Acids Res. 25: 955-964.
- Lünsdorf, H., Schairer, H. U. and Heidelberg, M. (1995). Localization of the stress protein SP21 in indole-induced spores, fruiting bodies, and heat-shocked cells of *Stigmatella aurantiaca*. J. Bacteriol. 177: 7092-7099.
- Lünsdorf, H. and Schairer, H. U. (2001). Frozen motility of gliding bacteria outlines inherent features of motility apparatus. Microbiology 147: 939-947.
- MacNeil, S. D., Calara, F. and Hartzell, P. L. (1994 a). New clusters of genes required for gliding motility in *Myxococcus xanthus*. Mol. Microbiol. 14: 61-71.
- MacNeil, S. D., Mouzeyan, A. and Hartzell, P. L. (1994 b). Genes required for both gliding motility and development in *Myxococcus xanthus*. Mol. Microbiol. 14: 785-795.
- Magrini, V., Salmi, D., Thomas, D., Herbert, S. K., Hartzell, P. L. and Youderian P. (1997). Temperate *Myxococcus xanthus* phage Mx8 encodes a DNA adenine methylase, Mox. J. Bacteriol. 179: 4254-4263.

- Magrini, V., Creighton, C. and Youderian, P. (1999 a). Site-specific recombination of temperate *Myxococcus xanthus* phage Mx8: Genetic elements required for integration. *J. Bacteriol.* 181: 4050-4061.
- Magrini, V., Storms, M. L. and Youderian, P. (1999 b). Site-specific recombination of temperate *Myxococcus xanthus* phage Mx8: Regulation of integrase activity by reversible, covalent modification. *J. Bacteriol.* 181: 4062-4070.
- Manoil, C. and Kaiser, D. (1980 a). Accumulation of guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate in *Myxococcus xanthus* during starvation and myxospore formation. *J. Bacteriol.* 141: 297-304.
- Manoil, C. and Kaiser, D. (1980 b). Guanosine pentaphosphate and guanosine tetraphosphate accumulation and induction of *Myxococcus xanthus* fruiting body development. *J. Bacteriol.* 141: 305-315.
- Martin, S., Sodergren, E., Masuda, T. and Kaiser, D. (1978). Systematic isolation of transducing phages for *Myxococcus xanthus*. *Virology* 88: 44-53.
- Mayo, K. A. and Kaiser, D. (1989). *AsgB*, a gene required early for developmental signalling, aggregation, and sporulation of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Gen. Genet.* 218: 409-418.
- McBride, M. J., Weinberg, R. A. and Zusman, D. R. (1989). "Fizzy" aggregation genes of the gliding bacterium *Myxococcus xanthus* show sequence similarities to the chemotaxis genes of enteric bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 86: 424-428.
- McBride, M. J., Kohler, 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.
- McCleary, W. R. and Zusman, D. R. (1990). Purification and characterization of the *Myxococcus xanthus* FrzE protein shows that it has autophosphorylation activity. *J. Bacteriol.* 172: 6661-6668.
- McCleary, W. R., McBride, M. J., and Zusman, D. R. (1990). Developmental sensory transduction in *Myxococcus xanthus* involves methylation and demethylation of FrzCD. *J. Bacteriol.* 172: 4877-4887.
- McCleary, W. R., Esmon, B. and Zusman, D. R. (1991). *Myxococcus xanthus* protein C is a major spore surface protein. *J. Bacteriol.* 173: 2141-2145.
- McCurdy, H. D. and Khouw, B. T. (1969). Studies on *Stigmatella brunnea*. *Canadian Journal of Microbiology.* 15: 731-738.
- McVittie, A., Messik, F. and Zahler, S. (1962). Developmental biology of *Myxococcus*. *J. Bacteriol.* 84: 546-551.
- Meinzel, T., Mechulam, Y. and Blanquet, S. (1995). tRNA: Structure, biosynthesis, and function. Söll, D. and RajBhandary, U., L. Washington, American Society for Microbiology: 251-293.



- Merz, A. J., So, M. and Sheetz, M. P. (2000). Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* 407: 98-102.
- Mizuuchi, K., and Mizuuchi, M. (1979). Integrative recombination of bacteriophage  $\lambda$ : In vitro study of the intermolecular reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43: 1111-1114.
- Munoz-Dorado, J., Inouye, S. and Inouye, M. (1991). A gene encoding a protein serin/threonine kinase is required for normal development of *Myxococcus xanthus*, a Gram negative bacterium. *Cell* 67: 995-1006.
- Muskhelishvili, G., Palm, P. and Zillig, W. (1993). SSV1-encoded site-specific recombination system in *Sulfolobus shibatae*. *Mol. Gen. Genet.* 237: 334-342.
- Neumann, B., Pospiech, A. and Schairer, H. U. (1992). Size and stability of the genomes of the myxobacteria *Stigmatella aurantiaca* and *Stigmatella erecta*. *J. Bacteriol.* 174: 6307-6310.
- Nunes-Düby, S. F., Azaro, A. and Landy, A. (1995). Swapping DNA strands and sensing homology without branch migration in  $\lambda$  site-specific recombination. *Curr. Biol.* 5: 139-148.
- Nunes-Düby, S. E., Kwon, H. J., Tirumalai, R. S., Ellenberger, T. and Landy, A. (1998). Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res.* 26: 391-406.
- Nunn, D., Bergmann, S. and Lory, S. (1990). Products of three accessory genes, *pilB*, *pilC*, and *pilD* are required for biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pili. *J. Bacteriol.* 172: 2911-2919.
- O'Connor, K. A. and Zusman, D. R. (1997). Starvation-independent sporulation in *Myxococcus xanthus* involves the pathway for beta-lactamase induction and provides a mechanism for competitive cell survival. *Mol. Microbiol.* 24: 839-850.
- Ogawa, M., Fujitani, S. Mao, X., Inouye, S. and Komano, T. (1996). *FruA*, a putative transcription factor essential for the development of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* 22: 757-767.
- Oliver, D. B. (1987). Periplasm and protein segregation. In: Neidhardt F. C. (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : Cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1: 56-69.
- Orndorff, P., Stellwag, E., Starich, T., Dworkin, M. and Zissler, I. (1983). Genetic and physical characterization of lysogeny by bacteriophage MX8 in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 154: 772-779.
- Otani, M., Kozuka, S., Xu, C., Umezawa, C., Sano, K. and Inouye, S. (1998). Protein W, a spore-specific protein in *Myxococcus xanthus*, formation of a large electron-dense particle in a spore. *Mol. Microbiol.* 30: 57-66.

- Palm, P., Schleper, C., Gramp, B., Yeats, S., McWilliam, P., Reiter, W., D. and Zillig, W. (1991). Complete nucleotide sequence of the virus SSV1 of the archaebacterium *Sulfolobus shibatae*. *Virology* 185: 242-250.
- Pate, J. L. and Chang, L.-Y. E. (1979). Evidence that gliding motility in prokaryotic cells is driven by rotary assemblies in the cell envelope. *Current Microbiol.* 2: 59-64.
- Patsey, R. L. and Bruist, M. F. (1995). Characterization of the interaction between the lambda intasome and *attB*. *J. Mol. Biol.* 252: 47-58.
- Perals, K., Cornet, F., Merkt, Y., Delon, I. and Louarn, J. M. (2000). Functional polarization of the *Escherichia coli* chromosome terminus: The *dif* site acts in chromosome dimer resolution only when located between stretches of opposite polarity. *Mol. Microbiol.* 36: 33-43.
- Plaga, W., Stamm, I. and Schairer, H. U. (1998). Intercellular signaling in *Stigmatella aurantiaca*: Purification and characterization of stigmolone, a myxobacterial pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95: 11263-11267.
- Plamann, L., Kuspa, A. and Kaiser, D. (1992). Proteins that rescue A-signal-defective mutants of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 174: 3311-3318.
- Plamann, L., Davis, J. M., Cantwell, B. and Major, J. (1994). Evidence that *asgB* encodes a DNA-binding protein essential for growth and development of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 176: 2013-2020.
- Plamann, L., Li, Y., Cantwell, B. and Major, J. (1995). The *Myxococcus xanthus asgA* gene encodes a novel signal transduction protein required for multicellular development. *J. Bacteriol.* 177: 2014-2020.
- Pospiech, A. (1992). Isolierung und Charakterisierung entwicklungsbiologischer Mutanten des Myxobakteriums *Stigmatella aurantiaca*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.
- Qualls, G. T., Stephens, K. and White, D. (1978). Morphogenic movements and multicellular development in the fruiting myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Dev. Biol.* 66: 270-274.
- Raki, A., Noelting, C., Schropp, P. and Heesemann, J. (2001). Integrative module of the high-pathogenicity islands of *Yersinia*. *Mol. Microbiol.* 39: 407-415.
- Rappuoli, R. and Ratti, G. (1984). Physical map of the chromosomal region of *Corynebacterium diphtheriae* containing corynephage attachment site *attB1* and *attB2*. *J. Bacteriol.* 158: 325-330.
- Ratti, G., Covacci, A. and Rappuoli, R. (1997). A tRNA<sup>Arg</sup> gene of *Corynebacterium diphtheriae* is the chromosomal integration site for toxinogenic bacteriophages. *Mol. Microbiol.* 25: 1179-1181.
- Recchia, G. D. and Sherratt, D. J. (1999). Conservation of *xer* site-specific recombination genes in bacteria. *Mol. Microbiol.* 34: 1146-1148.

- Reddy, P. S., Raghavan, A., and Chatterji, D. (1995). Evidence for the ppGpp-binding site of *Escherichia coli* RNA polymerase: Proximity relationship with the rifampicin-binding domain. *Mol. Microbiol.* 15: 255-265.
- Reichenbach, H. and Dworkin, M. (1970). Induction of myxospore formation in *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales) by monovalent cations. *J. Bacteriol.* 101: 325-326.
- Reichenbach, H. (1984). Myxobacteria: A most peculiar group of social prokaryotes. Myxobacteria, development and cell interactions. New York, Springer-Verlag New York Inc.: 1-51.
- Reichenbach, R. and Dworkin, M. (1992). The order Myxobacterales. Berlin, Springer-Verlag KG.
- Reichenbach, H. and Dworkin, M. (1993). The myxobacteria. The prokaryotes. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.-H. Schleifer. New York, Springer-Verlag: 3416-3487.
- Reiter, W. D., Palm, P. and Yeats, S. (1989). Transfer RNA genes frequently serve as integration sites for prokaryotic genetic elements. *Nucleic Acids Res.* 17: 1907-1914.
- Reiter, W., D. and Palm, P. (1990). Identification and characterization of a defective SSV1 genome integrated into a tRNA gene in the archaebacterium *Sulfolobus* sp. B12. *Mol. Gen. Genet.* 221: 65-71.
- Rhie, H. G. and Shimkets, L. J. (1989). Developmental bypass suppression of *Myxococcus xanthus* *csgA* mutations. *J. Bacteriol.* 171: 3268-3276.
- Richet, E., Abcarian, P. and Nash, H. A. (1988). Synapsis of attachment sites during lambda integrative recombination involves capture of a naked DNA by a protein-DNA complex. *Cell* 52: 9-17.
- Ridgway, H. F. (1977). Ultrastructural characterization of goblet-shaped particles from the cell wall of *Flexibacter polymorphus*. *Can. J. Microbiol.* 23: 1201-1213.
- Ritter, A., Blum, G., Emödy, L., Kerényi, M., Böck, A., Neuhierl, B., Rabsch, W., Scheutz, F. and Hacker, J. (1995). tRNA genes and pathogenicity islands: Influence on virulence and metabolic properties of uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 17: 109-121.
- Ritter, A., Gally, D. L., Olsen, P. B., Dobrindt, U., Friedrich, A., Klemm, P. and Hacker, J. (1997). The Pai-associated *leuX* specific tRNA<sup>Leu</sup> affects type 1 fimbriation in pathogenic *Escherichia coli* by control of FimB recombinase expression. *Mol. Microbiol.* 25: 871-882.
- Rodriguez-Soto, J. P. and Kaiser, D. (1997 a). The *tgl* gene: Social motility and stimulation in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 179: 4361-4371.
- Rodriguez-Soto, J. P. and Kaiser, D. (1997 b). Identification and localization of the Tgl protein, which is required for *Myxococcus xanthus* social motility. *J. Bacteriol.* 179: 4372-4381.

- Rosenberg, E., Vaks, B., Zuckerberg, A. (1973). Bactericidal action of an antibiotic produced by *Myxococcus xanthus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4: 507-513.
- Ross, W. and Landy, A. (1982). Bacteriophage  $\lambda$  int protein recognizes two classes of sequence in the phage *att* site: Characterization of two arm-type sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7724-7728.
- Rossi, J., Egan, J., Hudson, L. and Landy, A. (1981). The *tyrT* locus: Termination and processing of a complex transcript. *Cell* 26: 305-314.
- Ruan, K.-H., Kulmasz, R. J., Wilson, A., and Wu, K. K. (1993). Highly sensitive fluorimetric enzyme immunoassay for prostaglandin H synthase solubilized from cultured cells. *J. Immunol. Meth.* 162: 23-30.
- Sager, B. and Kaiser, D. (1994). Intercellular C-signaling and the traveling waves of *Myxococcus*. *Genes & Dev.* 8: 2793-2804.
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Ehrlich, H. A. and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Salmi, D., Magrini, V., Hartzell, P. L. and Youderian, P. (1998). Genetic determinants of immunity and integration of temperate *Myxococcus xanthus* phage Mx8. *J. Bacteriol.* 180: 614-621.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sands, M. K. and Roberts, R. B. (1952). The effect of tryptophan-histidine deficiency in a mutant of *E. coli*. *J. Bacteriol.* 63: 505-511.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 74: 5463-5467.
- Sato, H. H. and Park, Y. K. (1980). Purification and characterization of extracellular isoamylase from *Flavobacterium* sp. *Starch/Stärke* 32: 132-136.
- Schairer, H. U. (1993). *Stigmatella aurantiaca*, an Organism for Studying the Genetic Determination of Morphogenesis. *Myxobacteria II*. M. Dworkin and D. Kaiser. Washington, American Society for Microbiology: 333-346.
- Schwartz, C. J. E. and Sadowski, P. D. (1989). FLP recombinase of the 2  $\mu$ m circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae* bends its DNA target: Isolation of FLP mutants defective in DNA bending. *J. Mol. Biol.* 205: 647-658.
- Shen, H. (1999). Regulation der Transkription des *hspA* Gens in *Stigmatella aurantiaca* und Analyse der Funktion des HspA Proteins. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.
- Shi, W. and Zusman, D. R. (1993). The two motility systems of *Myxococcus xanthus* show different selective advantages on various surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90: 3378-3382.

- Shigekawa, K. and Dower, W. J. (1988). Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: A general approach to the introduction of macromolecules into cells. *BioTechniques* 6: 742-751.
- Shimkets, L. J. and Asher, S. J. (1988). Use of recombination techniques to examine the structure of the *csg* locus of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Gen. Genet.* 211: 63-71.
- Shimkets, L. J. and Rafiee, H. (1990). *CsgA*, an extracellular protein essential for *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* 172: 5299-5306.
- Shimkets, L. and Woese, C. R. (1992). A phylogenetic analysis of the myxobacteria: Basis for their classification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89: 9459-9463.
- Silakowski, B., Pospiech, A., Neumann, B. and Schairer, H. U. (1996). *Stigmatella aurantiaca* fruiting body formation is dependent on the *fbfA* gene encoding a polypeptide homologous to chitin synthases. *J. Bacteriol.* 178: 6706-6713.
- Silakowski, B. (1997). Die Fruchtkörperbildung beim Myxobakterium *Stigmatella aurantiaca*: Die Gene *fbfA* und *fbfB*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.
- Silakowski, B., Ehret, H. and Schairer, H. U. (1998). *FbfB*, a gene encoding a putative galactose oxidase, is involved in *Stigmatella aurantiaca* fruiting body formation. *J. Bacteriol.* 180: 1241-1247.
- Silakowski, B., Schairer, H. U., Ehret, H., Kunze, B., Weinig, S., Nordsick, G., Brandt, P., Blöcker, H., Höfle, G., Beyer, S. and Müller, R. (1999). New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1. *J. Biol. Chem.* 274: 37391-37399.
- Silakowski, B., Müller, S., Skladny, H., Ehret, H. and Schairer, H. U. (2001). SigB, an alternative sigma factor of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*, is synthesized during development and heat shock. *Microbiology* 147: 2265-2273.
- 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.
- Skladny, H., Heidelbach, M. and Schairer, H. U. (1992). Cloning and DNA sequence of *sigB* gene of *Stigmatella aurantiaca*. *Nucleic Acids Res.* 20: 6416.
- Skladny, H., Heidelbach, M., and Schairer, H. U. (1994). Cloning and characterization of the gene encoding the major sigma factor of *Stigmatella aurantiaca*. *Gene* 143: 123-127.
- Skladny, H. (1994). Sigmafaktoren des Myxobakteriums *Stigmatella aurantiaca*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.
- Sogaard-Andersen, L. and Kaiser, D. (1996). C factor, a cell-surface-associated intercellular signaling protein, stimulates the cytoplasmic Frz signal transduction system in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93: 2675-2679.

- Sogaard-Andersen, L., Slack, F. J., Kimsey, H. and Kaiser, D. (1996). Intercellular C-signaling in *Myxococcus xanthus* involves a branched signal transduction pathway. *Genes & Dev.* 10: 740-754.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Spormann, A. M. and Kaiser, D. (1999). Gliding mutants of *Myxococcus xanthus* with high reversal frequencies and small displacements. *J. Bacteriol.* 181: 2593-2601.
- Sprinzl, M., Hartmann, T., Weber, J., Blank, J. and Zeidler, R. (1989). Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 17: 1-172.
- Stamm, I., Leclerque, A. and Plaga, W. (1999). Purification of cold-shock-like proteins from *Stigmatella aurantiaca* - molecular cloning and characterization of the *cspA* gene. *Arch. Microbiol.* 172: 175-181.
- Steiner, W. W. and Kuempel, P. L. (1998). Cell division is required for resolution of dimer chromosomes at the *dif* locus in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 27: 257-268.
- Stellwag, E., Fink, J. M. and Zissler, J. (1985). Physical characterization of the genome of the *Myxococcus xanthus* bacteriophage Mx8. *Mol. Gen. Genet.* 199: 123-132.
- Stephens, K. and Kaiser, D. (1987). Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus*: Molecular cloning of the *mgl* locus. *Mol. Gen. Genet.* 171: 819-830.
- Stephens, K., Hartzell, P. and Kaiser, D. (1989). Gliding motility in *Myxococcus xanthus*: *mgl* locus, RNA, and predicted protein products. *J. Bacteriol.* 171: 819-830.
- Summers, D. K. and Sherratt, D. J. (1984). Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell* 36: 1097-1103.
- Sun, H., Zusman, D. R. and Shi, W. (2000). Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the *frz* chemosensory system. *Current Biol.* 10: 1143-1146.
- Teintze, M., Thomas, R., Furuichi, T., Inouye, M. and Inouye, S. (1985). Two homologous genes coding for spore-specific proteins are expressed at different times during development of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 163: 121-125.
- Thaxter, R. (1892). Contribution from the Cryptogamic Laboratory of Harvard University, XVIII. On the Myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes. *Bot. Gaz.* 14: 389-406.
- Thiel, G. (1993). Synapsin I, synapsin II, and synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles. *Brain. Pathol.* 3: 87-95.
- Toal, D. R., Clifton, S. W., Roe, B. A. and Downard, J. (1995). The *esg* locus of *Myxococcus xanthus* encodes the E1 alpha and E1 beta subunits of a branched-chain keto acid dehydrogenase. *Mol. Microbiol.* 16: 177-189.

- Tognoni, A., Carrera, P., Galli, G., Lucchese, G., Camerini, B. and Grangi, G. (1989). Cloning and nucleotide sequence of the isoamylase gene from a strain of *Pseudomonas* sp. *J. Gen. Microbiol.* *135*: 37-45.
- Tojo, N., Sanmiya, K., Sugawara, H., Inouye, S. and Komano, T. (1996). Integration of bacteriophage Mx8 into the *Myxococcus xanthus* chromosome causes a structural alteration at the C-terminal region of the IntP protein. *J. Bacteriol.* *178*: 4004-4011.
- Travers, A. A. (1984). Conserved features of coordinately regulated *E. coli* promoters. *Nucleic Acids Res.* *12*: 2605-2618.
- Trudeau, K. G., Ward, M. J. and Zusman, D. R. (1996). Identification and characterization of FrzZ, a novel response regulator necessary for swarming and fruiting-body formation in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* *20*: 645-655.
- Udo, H., Munoz Dorado, J., Inouye, M. and Inouye, S. (1995). *Myxococcus xanthus*, a Gram negative bacterium, contains a transmembrane protein serine/threonine kinase that blocks the secretion of beta-lactamase by phosphorylation. *Genes & Dev.* *9*: 972-83.
- Ueki, T. and Inouye, S. (1998). A new sigma factor, SigD, essential for stationary phase is also required for multicellular differentiation in *Myxococcus xanthus*. *Genes Cells* *3*: 371-385.
- Umlauf, S. W. and Cox, M. M. (1988). The functional significance of DNA sequence structure in a site-specific recombination and regulatory implications. *J. Bacteriol.* *168*: 1343-1351.
- Urlaub, H. and Wober, G. (1975). Identification of isoamylase, a glycogen-debranching enzyme, from *Bacillus amyloliquefasciens*. *FEBS Lett.* *57*: 1-4.
- Van Mellaert, L., Mei, L., Lammertyn, E., Schacht, S. and Anne, J. (1998). Site-specific integration of bacteriophage VWB genome into *Streptomyces venezuelae* and construction of a VWB-based integrative vector. *Microbiology* *144*: 3351-3358.
- Vögtli, M. and Cohen, S. N. (1992). The chromosomal integration site for the *Streptomyces* plasmid SLP1 is a functional tRNA<sup>Tyr</sup> gene essential for cell viability. *Mol. Microbiol.* *6*: 3041-3050.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. and Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta- subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO* *1*: 945-951.
- Wall, D. and Kaiser, D. (1998). Alignment enhances the cell-to-cell transfer of pilus phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *95*: 3054-3058.
- Wall, D., Wu, S. S. and Kaiser, D. (1998). Contact stimulation of Tgl and type IV pili in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* *180*: 759-761.
- Wall, D., Kohlenbrander, P. E. and Kaiser, D. (1999). The *Myxococcus xanthus* *pilQ* (*sgIA*) gene encodes a secretin homolog required for type IV pilus biogenesis, social motility and development. *J. Bacteriol.* *181*: 24-33.

- Wang, H., Yang, C. H., Lee, G., Chang, F., Wilson, H., Campillo-Campbell, A. and Campbell, A. (1997). Integration specificities of two lambdaoid Phages (21 and e14) that insert at the same *attB* site. *J. Bacteriol.* 179: 5705-5711.
- Ward, M. J., Lew, H., Treuner-Lange, A. and Zusman, D. R. (1998). Regulation of motility behavior in *Myxococcus xanthus* may require an extracytoplasmic-function sigma factor. *J. Bacteriol.* 180: 5668-5675.
- Weimer, R. M., Creighton, C., Stassinopoulos, A., Youderian, P and Hartzell, P. L. (1998). A chaperone in the HSP70 family controls production of extracellular fibrils in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 180: 5357-5368.
- White, D. (1993). Myxospore and Fruiting Body Morphogenesis. *Myxobacteria II*. M. Dworkin and D. Kaiser. Washington, American Society for Microbiology: 307-332.
- Wistow, G., Summers, L. and Blundell, T. (1985). *Myxococcus xanthus* spore coat protein S may have a similar structure to vertebrate lens beta gamma-crystallins. *Nature* 315: 771-773.
- Wu, S. S. and Kaiser, D. (1996). Markerless deletions of pil genes in *Myxococcus xanthus* generated by counterselection with the *Bacillus subtilis sacB* gene. *J. Bacteriol.* 178: 5817-5821.
- Wu, S. S., Wu, J. and Kaiser, D. (1997). The *Myxococcus xanthus pilT* locus is required for social gliding motility although pili are still produced. *Mol. Microbiol.* 23: 109-121.
- Wu, S. S. and Kaiser, D. (1997). Regulation of expression of the *pilA* gene in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 179: 7748-7758.
- Wu, S. S., Wu, J. , Cheng, Y. L. and Kaiser, D. (1998). The *pilH* gene encodes an ABC transporter homologue required for type IV pilus biogenesis and social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* 29: 1249-1261.
- Yang, Z., Geng, Y., Xu, D., Kaplan, H. B. and Shi, W. (1998). A new set of chemotaxis homologues is essential for *Myxococcus xanthus* social motility. *Mol. Microbiol.* 30: 1123-1130.
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
- Zhang, W. D., Munoz Dorado, J. Inouye, M. and Inouye, S. (1992). Identification of a putative eukaryotic-like protein kinase family in the developmental bacterium *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 174: 5450-5453.
- Zhang, W., Inouye, M. and Inouye, S. (1996). Reciprocal regulation of the differentiation of *Myxococcus xanthus* by Pkn5 and Pkn6, eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases. *Mol. Microbiol.* 20: 435-447.
- Zusman, D. R. (1982). "Frizzy" mutants: a new class of aggregation-defective developmental mutants of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 150: 1430-1437.



## Publikationen und Präsentationen

### Publikationen

Silakowski, B., Müller, S., Skladny, H., Ehret, H. and Schairer, H. U. (2001). SigB, an alternative sigma factor of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*, is synthesized during development and heat shock. *Microbiology* 147: 2265-2273.

Müller, S., Shen, H. and Schairer, H. U. (2002). Site-specific recombination of plasmids into the *attB* site of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* impairs fruiting body formation. In Vorbereitung.

Müller, S. and Schairer, H. U. (2002). New genes involved in the fruiting body formation process of *Stigmatella aurantiaca*. In Vorbereitung.

### Präsentationen

#### Poster

Müller, S., Hofmann, D., Silakowski, B. and Schairer, H. U. (2000). Transcriptional analysis of genes involved in the fruiting body formation of *Stigmatella aurantiaca* and 2D-Analysis of different development stages. Jahrestagung der VAAM, München.

#### Vorträge

Müller, S., Silakowski, B. and Schairer, H. U. (1998). New genes involved in the fruiting process of *Stigmatella aurantiaca* ? 25th International Conference on the Biology of the Myxobacteria, Arahova, Greece; 21.-23. Juni.

Müller, S., Silakowski, B. and Schairer, H. U. (1998). The interdependence of the genes *fbfA* and *fbfB* in the fruiting body formation of *Stigmatella aurantiaca*. Jahrestagung der VAAM, Frankfurt.

Müller, S., Silakowski, B. and Schairer, H. U. (1999). An operon for fruiting body formation of *Stigmatella aurantiaca* ? 26th International Conference on the Biology of the Myxobacteria, Mt. Hood, Oregon; 20.-23. Juni.

Müller, S., Silakowski, B. and Schairer, H. U. (1999). ). New genes involved in the fruiting process of *Stigmatella aurantiaca*. Jahrestagung der VAAM, Göttingen.

Müller, S. and Schairer, H. U. (2000). The integration of plasmids containing the Mx8 *uoi* and *intP* genes into the *Stigmatella aurantiaca attB* site impairs fruiting body formation. 27th International Conference on the Biology of the Myxobacteria, Winter Park, Colorado; 3.-6. August.

Müller, S. and Schairer, H. U. (2001). The *fbf* gene cluster of *Stigmatella aurantiaca*. 28th International Conference on the Biology of the Myxobacteria, Warwick, England; 18.-22. Juli.

## 6. Anhang

### 6.1 Abkürzungen

Amp <sup>r</sup>	Ampicillin-Resistenz
AP	alkalische Phosphatase
Asp	Asparaginsäure
<i>attB</i>	<i>attachment B site</i>
<i>attL</i>	<i>attachment L site</i>
<i>attP</i>	<i>attachment P site</i>
<i>attR</i>	<i>attachment R site</i>
bar	Bar
bp	Basenpaare
BSA	Rinderalbuminserum
c	centi
ca.	circa
cDNA	<i>copy-DNA</i>
Ci	Curie
cpm	<i>counts per minute</i>
CSDP	Dinatrium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decan} -4-yl) phenylphosphat
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
F	Farad
G	Guanin
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HTH	<i>helix turn helix motif</i>
k	Kilo
Kan <sup>r</sup>	Kanamycin-Resistenz

I	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
4-MUG	4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
M	Molar
m	Milli
$\mu$	Mikro
MCP	<i>methyl accepting protein</i>
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
<i>M.xanthus</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>
n	Nano
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
p	Pico
ppGpp	Guanosintetraphosphat
pppGpp	Guanosinpentaphosphat
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTPCR	<i>reverse transkriptase polymerase chain reaction</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
<i>S.aurantiaca</i>	<i>Stigmatella aurantiaca</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
ss	einzelsträngig
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Unit
usw	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
Val	Valin
W	Watt
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid

## 6.2 Sequenzen

Nachfolgend sind die DNA-Sequenzen der Inserts der Plasmide pBS4 (unvollständig), pSM20, pSM24, pSM48, pSM49 (unvollständig) und pSM54 dargestellt.

pBS4 enthält ein ca. 6.1 kbp *S. aurantiaca* DNA-Fragment mit der stromabwärts-Region von *fbfA*. Dieses Plasmid wurde für die wiederholte Sequenzierung des Gens *fbfD* verwendet (doppelsträngig in dem angegebenen Bereich).

pSM20 enthält ein ca. 1.4 kbp *S. aurantiaca* DNA-Fragment in dem das *fbfC* Gen enthalten ist. Es erfolgte eine Sequenzierung beider Stränge.

pSM24 wurde für die Sequenzierung des *fbfA* Gens konstruiert. Das Plasmid enthält ein ca. 1.5 kbp langes *S. aurantiaca* DNA-Fragment das doppelsträngig sequenziert wurde.

Plasmid pSM48 enthält die *attR* site der *S. aurantiaca* Mutante SM12 (siehe Abb. 2.12). Die Bereiche der Phagen DNA (bp 1-2415) wurden einzelsträngig sequenziert, der darauffolgende *S. aurantiaca* DNA-Bereich doppelsträngig.

Plasmid pSM49 enthält die *attL* site der *S. aurantiaca* Mutante SM12 (siehe Abb. 2.12). Die Phagen DNA in diesem Bereich (bp 1-490 ) wurde einzelsträngig sequenziert, die ca. 3 kbp der *S. aurantiaca* DNA doppelsträngig.

Plasmid pSM54 enthält ein 909 bp Insert mit dem chromosomalen *attB* Locus von *S. aurantiaca* der doppelsträngig sequenziert wurde.































## 6.3 Plasmide







## Zusammenfassung

Das Myxobakterium *Stigmatella aurantiaca* bildet unter Hungerbedingungen artspezifische, vielzellige Fruchtkörper. Diese bestehen aus einem Stiel mit Verzweigungen an denen sich Sporangiolen befinden, die die resistenten Dauerformen, die Sporen, beinhalten. Zum einen wurden im Rahmen dieser Arbeit Gene identifiziert, deren Produkte an der Fruchtkörperbildung beteiligt sind, zum anderen erfolgte eine Identifizierung und Charakterisierung der *attB* site (eine spezifische Integrationsstelle für Phagen) von *S. aurantiaca*.

Die *attB* site stellt einen Genombereich dar, in den die ortsspezifische Integration von Plasmiden erfolgen kann, wenn diese die korrespondierende *attP* site des Myxophagen Mx8 enthalten. Die *attP* site liegt in der Sequenz des Integrase kodierenden Gens *intP*. Plasmide die über diese Art der Rekombination in die *attB* site von *S. aurantiaca* integrieren, erzeugen zwei Wirts-Phagen-Verbindungen (*attR*, *attL*). Anstelle der komplexen Fruchtkörper entstehen Aggregate und pilzartige Strukturen. Die *attB* site ist in dem 3'-Bereich eines tRNA<sup>Asp</sup> Gens lokalisiert, welches zusammen mit dem stromaufwärts gelegenen tRNA<sup>Val</sup> Gen transkribiert wird. Diese tRNA Gene unterliegen der stringenten Kontrolle, das heißt die Expression der Gene wird unter Hungerbedingungen herunterreguliert. Durch die ortsspezifische Integration von Plasmiden wird in die stromabwärts-Region des tRNA<sup>Asp</sup> Gens ein Mx8-spezifischer Terminator eingefügt, der vermutlich für den veränderten Phänotyp unter Entwicklungsbedingungen verantwortlich ist. Der Phänotyp einer solchen Mutante kann durch eine Integration von Plasmiden über die ortsspezifische Integration in die *attR* site komplementiert werden, wenn diese Plasmide ein ca. 1.2 kbp großes Fragment der *attB* site von *S. aurantiaca* enthalten, in dem die beiden tRNA Gene sowie bestimmte Anteile ihrer stromaufwärts- und stromabwärts-Region enthalten sind. Die Insertion von Antibiotika-Resistenz-Genen in die tRNA Gene oder in die stromaufwärts-Region führt zur Bildung von Aggregaten statt der komplexen Fruchtkörper. Stromaufwärts des tRNA<sup>Val</sup> Gens konnte eine putative Isoamylase identifiziert werden. Stromabwärts des tRNA<sup>Asp</sup> Gens wurde ein Gen, *ire*, lokalisiert, dessen putatives Polypeptid signifikante Homologien zu den Tyrosinrekombinasen XerC und XerD aufweist.

Neben den bereits charakterisierten Genen *fbfB* und *fbfA*, deren Produkte in die Fruchtkörperbildung involviert sind, konnten zwei weitere Gene, *fbfC* und *fbfD*,

identifiziert und charakterisiert werden. Diese *fbf* Gene liegen stromabwärts von *fbfA* und sind nahe beieinander lokalisiert. Das Startkodon von *fbfC* überlappt mit dem Stopkodon von *fbfA*. Die Inaktivierung der Gene bewies die Beteiligung ihrer Genprodukte an der Fruchtkörperbildung, da die Mutanten nur noch Aggregate bilden. Das abgeleitete FbfC-Polypeptid besitzt keine Homologien zu bereits bekannten Proteinen. Die Analyse der *fbfC*-Expression, die in einer merodiploiden Mutante durch die Fusion des 3'-verkürzten Gens mit einem  $\Delta trpA-lacZ$ -Konstrukt und der Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität durchgeführt wurde, zeigte einen Anstieg der Aktivität nach ca. 8 h in der Entwicklung, nach ca. 40 h wird ein Maximum erreicht. Der putative Promotorbereich von *fbfC* befindet sich in der kodierenden Sequenz von *fbfA*. Stromabwärts des *fbfC* Stopkodons (16 bp) konnte das Gen *fbfD* identifiziert werden, das zusammen mit *fbfC* in einem Operon organisiert ist. FbfD ist homolog zu einem putativen Polypeptid des nahe verwandten Myxobakteriums *Myxococcus xanthus*, dem aber keine Rolle in der Fruchtkörperentwicklung zugeordnet wird. Analysen der Promotorregion von *fbfC/fbfD* durch die Konstruktion von merodiploiden Mutanten zeigten, daß die kodierende Sequenz des *fbfA* Gens, welches stromaufwärts der beiden Gene gelegen ist, für die Expression von *fbfC/fbfD* benötigt wird. Vermutlich spielt die Topologie in diesem DNA-Bereich eine wichtige Rolle.

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich in dieser Zeit begleitet haben.

Herrn Prof. Dr. Hans Ulrich Schairer für die Vergabe des Themas meiner Doktorarbeit, für die zahlreichen theoretischen und praktischen Ratschläge und die ständige Bereitschaft zur Förderung meiner Weiterbildung.

Herrn Prof. Dr. Thomas Rausch für die Übernahme des Korreferats.

Wulf Plaga und Diana Hofmann für das Korrekturlesen und die vielen Ratschläge besonderer Art.

Meiner wunderbaren Familie, Heinrich und Helga Müller, Stefanie, Stefan und Phillip Frech für das Vertrauen in mich und die vielfältige Unterstützung.

Frau Dr. Katrin Eisfeld für die letzten 10 Jahre.

Einen besonderen Dank an spezielle Freunde: Andreas Lohrum, Miriam Dorst, Heidi Ehret.

Weiterhin möchte ich folgenden Personen danken:

Wulf Plaga, Diana Hofmann und Ana Milosevic (das legendäre Labor 322)

Elke, Stefan und Fabian Luca Lehner

Barbara Silakowski, Hui Shen, Esther Duperchy, Hong Wan, Andreas Leclerque, Frank Bautz, Klaus Rehfeldt, Markus Luy, Marcus Christl, Oliver Hohn, Johannes Mentges, Milan und Odin....